

metal ion and the ligand protons liberated in complex formation.

The ligands under study is a very weak acid $pK_a = 10.96$. Thus the ligand protons as such are not in a titrable form. Hydrolysis of these metal ions in 70% dioxan-water mixture have been studied⁷ and are not likely to interfere in the stability determinations. Moreover, there was no precipitation during the chelation titrations, ruling out the possibility of hydrolysis of these metal ions in presence of large excess of ligands. Thus, the consumption of an excess of alkali in chelation titration over the simple ligand titration is due to the ligand

protons liberated during the complex formation. This may be represented as:



The following order of stability of BPHA metal chelates was found. Paladium > copper > nickel > zinc > manganese.

The authors express their gratitude to Professor R. C. MEHROTRA for providing facilities in the department. They are also grateful to the Council of Scientific & Industrial Research for granting a research fellowship to one of them (J. P. C. JAIMNI).

⁷ D. N. PUROHIT and N. C. SOGANI, *Naturwissenschaften* **51** (23), 553 [1964].

Massenspektrometrie von Cysteinpeptiden

ERNST BAYER, GÜNTHER JUNG und WILFRIED KÖNIG

Chemisches Institut der Universität Tübingen

(Z. Naturforschg. **22 b**, 924—931 [1967]; eingegangen am 18. Februar 1967)

Zur massenspektrometrischen Sequenzbestimmung von Cysteinpeptiden eignen sich die *S*-Benzyl-*N*-Trifluoracetylpeptidäthylester. Verschiedene Di-, Tri- und Tetrapeptide mit Cystein sind neu dargestellt und deren Massenspektren eingehend untersucht worden. Eine Feststellung von *N*- und *C*-terminalem Cystein sowie der Position von Cystein in einer Peptidkette ist leicht möglich. Die Gas-Chromatographie einiger Dipeptide wird mitgeteilt.

Im Rahmen der Synthese von Peptiden aus der Sequenz des Ferredoxins mittels klassischer Methoden und an fester Phase nach MERRIFIELD¹ war die Sequenz und die Konstitution der insbesondere Cystein enthaltenden Peptide zu überprüfen. Hierfür erschien die Massenspektrometrie der *N*-Trifluoracetyl-Peptidester geeignet, die von WEYGAND^{2,3} und STENHAGEN⁴ ausführlich untersucht worden ist.

Obwohl bereits viele Peptide mit neutralen und sauren Aminosäuren massenspektrometrisch untersucht worden sind, fehlen bisher eingehendere Studien über Cysteinylpeptide. Bei der *N*-Trifluoracetylierung und Veresterung von Cysteinylpeptiden laufen durch H_2S -Eliminierung und Disulfidbildung unerwünschte und unkontrollierbare Nebenreaktionen ab. WEYGAND⁵ hat daher die Entschwefe-

lung der Cysteinreste mit Raney-Nickel vorgeschlagen, wobei die entsprechenden Alaninderivate entstehen. Die direkte massenspektrometrische Unterscheidung von ursprünglich vorhandenem Alanin ist dann aber schwierig. Es erschien daher günstiger, die SH-Gruppe durch Verätherung zu schützen. Dadurch werden Nebenreaktionen vermieden. Als Schutzgruppe eignet sich die Benzylgruppe, die bei vielen Synthesen ohnehin bereits eingeführt wird und somit zumindest bei der Kontrolle von Synthesen am günstigsten ist. Aber auch bei der massenspektrometrischen Sequenzanalyse ist diese Schutzgruppe vor bzw. nach der Hydrolyse leicht einzuführen und somit auch in diesen Fällen empfehlenswert.

N-Trifluoracetyl-Peptidester können nach WEYGAND gaschromatographisch bis zu Tetrapeptiden^{6a}

¹ G. R. MARSHALL u. R. B. MERRIFIELD, *Biochemistry* **4**, 2394 [1965].

² F. WEYGAND, A. PROX, W. KÖNIG u. H. H. FESSEL, *Angew. Chem.* **75**, 724 [1963].

³ F. WEYGAND, A. PROX, H. H. FESSEL u. K. KUN SUN, *Z. Naturforschg.* **20 b**, 1169 [1965].

⁴ E. STENHAGEN, *Z. analyt. Chem.* **181**, 462 [1961].

⁵ F. WEYGAND, A. PROX, E. C. JORGENSEN, R. AXEN u. P. KIRCHNER, *Z. Naturforschg.* **18 b**, 93 [1963].

⁶ F. WEYGAND et al., *Chem. Ber.* **92**, 2099 [1959].

^{6a} A. PROX u. F. WEYGAND, Sequenzanalyse durch Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie; VIII. Europ. Peptidsymposium, Sept. 1966, Noordwijk, North Holland Publ. Amsterdam, im Druck.

Verbindung	Relative Intensitäten in % bezogen auf intensivsten Peak										Temperatur des Proben- halters bei Verdampfung (ca. 10 ⁻⁷ Torr) [°C]
	<i>m/e</i> 91	<i>M</i> -91	<i>m/e</i> 123	<i>m/e</i> 124	<i>m/e</i> 137	<i>m/e</i> 149	<i>m/e</i> 166	<i>m/e</i> 176	<i>m/e</i> 177	<i>M</i>	
TFA-Cys(BZL)-Gly-OEt *	100	14	8	3	4	3	—	8	2	4	ca. 50
TFA-Cys(BZL)-Ala-OEt *	100	23	6	4	6	3	1	5	6	6	ca. 50
TFA-Cys(BZL)-Val-OEt *	100	27	6	4	4	3	2	3	10	7	ca. 60
TFA-Cys(BZL)-Ile-OMe *	100	16	5	5	6	3	2	3	6	2	ca. 50
TFA-Ser(Ac)-Cys(BZL)-OEt	100	10	5	4	9	11	6	8	—	4	ca. 80
TFA-Gly-Ala-Cys(BZL)-OEt	100	13	1	10	3	3	7	4	—	1	ca. 80
TFA-Thr-Cys(BZL)-Ile-OMe	100	17	3	6	3	8	9	5	8	2	ca. 85
TFA-His-Ala-Cys(BZL)-OEt	98	33	3	16	3	2	—	—	—	4	160—180
TFA-Cys(BZL)-Pro-Val-OMe	100	6	9	4	10	4	—	3	2	2	ca. 70
TFA-Cys(BZL)-Ala-Ser(Ac)-OEt	100	11	7	7	6	5	—	16	10	2	ca. 80
TFA-Ala-Cys(BZL)-Ala-OEt	91	26	4	5	2	7	8	5	6	3	ca. 80
TFA-Gly-Ala-Cys(BZL)-Ala-OEt	96	17	4	10	2	4	19	4	5	2	180—200

Tab. 1. Charakteristische Peaks einiger *S*-Benzyl-Cysteinylpeptide. * Gaschromatographisch untersucht entsprechend Bedingungen von Abb. 1.

getrennt werden. Andererseits eignen sich diese Derivate auch zur massenspektrometrischen Identifizierung²⁻⁴. Beide Methoden sollten deshalb bei der Sequenzanalyse von Polypeptiden einen wesentlichen Fortschritt erbringen.

Bei Peptiden mit neutralen und sauren Aminosäure-Bestandteilen ist die Brauchbarkeit dieser Methode im Prinzip auch aufgezeigt worden. Schwierigkeiten treten insbesondere bei cystein- und serinhaltenen Peptiden auf. Es zeigte sich nun, daß die *S*-Benzyläther von Cystein enthaltenden *N*-Trifluoracetyl-Peptidestern wegen ihrer relativ hohen Flüchtigkeit (s. Tab. 1) für massenspektrometrische Untersuchungen geeignet sind. Die hohe Thermostabilität dieser Verbindungen erlaubte auch die Trennung einiger dieser Derivate mit dem kombinierten Gas-Chromatograph-Massenspektrometer (LKB 9000) (s. Tab. 1 und Abb. 1). Da die Massenspektren der von der GC-Säule eluierten Substanzen und der im Direkt-Einlaß-System untersuchten, ungereinigten Verbindungen keine Unterschiede aufweisen, kann angenommen werden, daß die *N*-Trifluoracetylierung dieser *S*-Benzyl-Cystein-Derivate ohne Bildung von flüchtigen Nebenprodukten abläuft.

Über die Fragmentierung von *N*-TFA-Peptidestern liegen bereits ausführliche Untersuchungen vor²⁻⁴. Die dabei gefundenen Gesetzmäßigkeiten werden durch das Vorhandensein von *S*-Benzyl-Cystein in der Peptidsequenz im Prinzip nicht verändert. Die Elektronenanhäufung in der *S*-Benzyl-Seitenkette bewirkt zusätzlich eine große Intensität der durch Reaktionen dieses Restes entstehenden Ionen in den

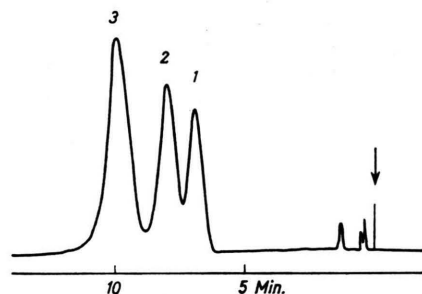


Abb. 1. Gas-Chromatogramm eines Gemisches von TFA-Cys(BZH)-Ala-OEt (1), TFA-Cys(BZL)-Gly-OEt (2) und TFA-Cys(BZL)-Val-OEt (3). LKB-9000 Gas-Chromatograph-Massenspektrometer, Säule: 5', 1/8" (Stahl); 5% SE 30 auf Chromosorb W, Trägergas: 60 ml He/min, Temperatur: Injektor 290 °C, Säule: 170 °C isotherm, Separator: 270 °C, Ionenquellentemperatur: 290 °C. Probe: 1 µl einer Lösung der Komponenten in Essigester.

Massenspektren. So fällt besonders die große Intensität des Peaks bei *m/e* 91 (C₇H₇⁺) auf, der in den Spektren fast aller untersuchten Beispiele am größten ist. Auch ein Peak der Masse *M*-91 zeichnet sich in allen Fällen durch große Intensität aus. Weitere auf den *S*-Benzyl-Rest zurückzuführende Ionen sind aus Tab. 2 ersichtlich. Die jeweiligen relativen Intensitäten sind in Tab. 1 angegeben. Die entsprechenden

<i>m/e</i> 123	[C ₆ H ₅ -CH ₂ -S]
<i>m/e</i> 124	[C ₆ H ₅ -CH ₂ -SH]
<i>m/e</i> 137	[C ₆ H ₅ -CH ₂ -S-CH ₂]
<i>m/e</i> 149	[C ₆ H ₅ -CH-S-CH-CH ₂]
<i>m/e</i> 166	[C ₆ H ₅ -CH ₂ -S-CH ₂ -CH=NH ₂]
<i>m/e</i> 176	[C ₆ H ₅ -CH-S-CH-CH-C=O]
<i>m/e</i> 177	[C ₆ H ₅ -CH ₂ -S-CH-CH-C=O]

Tab. 2. Auf den *S*-Benzyl-Rest zurückzuführende Fragmentionen.

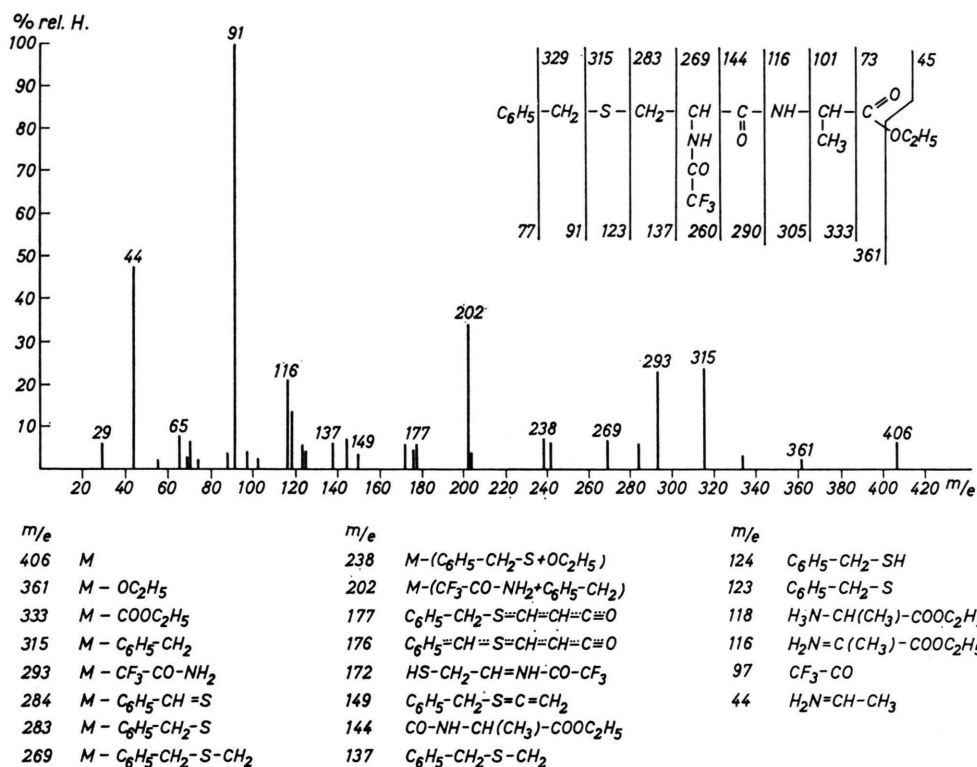


Abb. 2. Massenspektrum, Fragmentierungsschema und Fragmentationen von TFA-Cys(BZL)-Ala-OEt, Massenspektrometer: LKB 9000. Elektronenenergie: 50 eV. Ionenquellentemperatur: 270 °C.

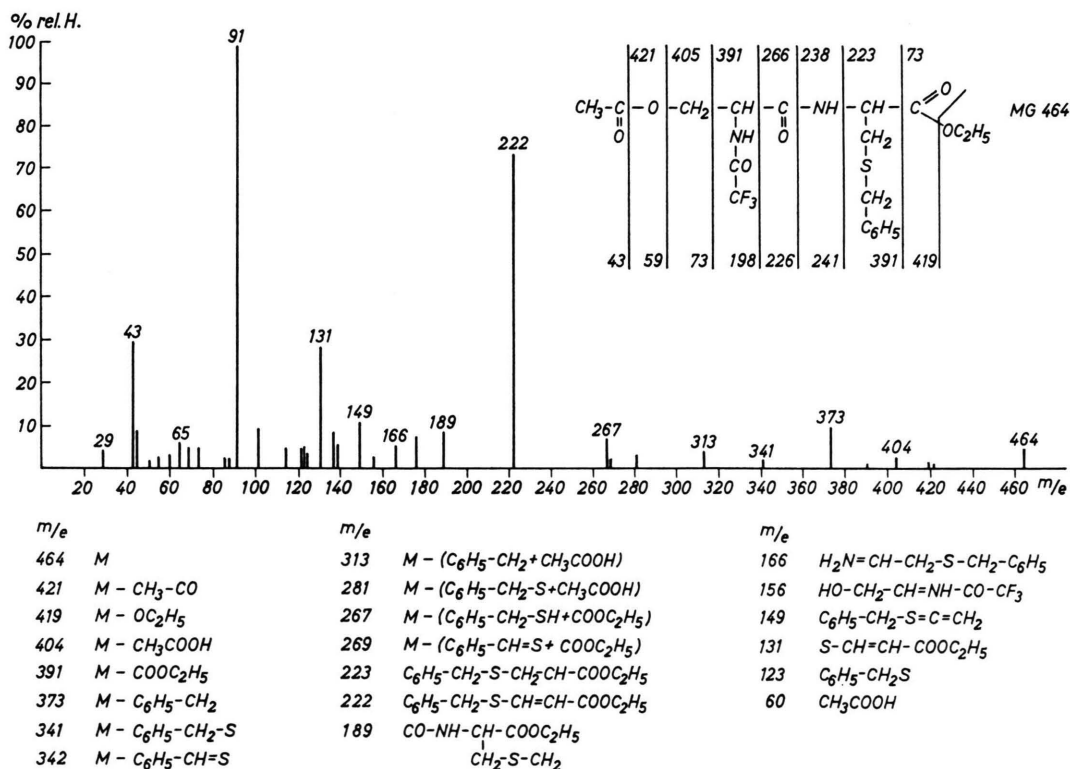
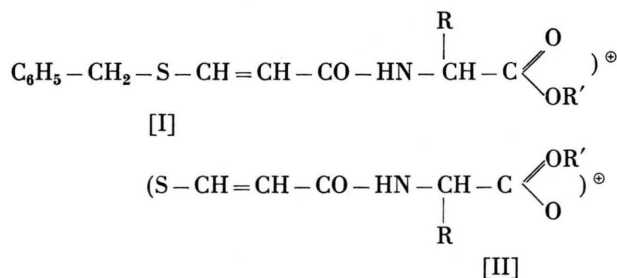


Abb. 3. Massenspektrum, Fragmentierungsschema und Fragmentationen von TFA-Ser(Ac)-Cys(BZL)-OEt. Massenspektrometer: LKB 9000. Elektronenenergie: 50 eV. Ionenquellentemperatur: 270 °C.

Ionen, bei denen die positive Ladung am Molekülrest verbleibt, finden sich in fast allen untersuchten Fällen bei $M-123$, $M-137$ und auch bei $M-122$ (Abspaltung von $C_6H_5-CH=S$).

Außerordentlich wichtig für die Ableitung der Sequenz sind die Ionen, die bei N-terminaler bzw. C-terminaler Stellung von *S*-Benzyl-Cystein auftreten. In den Abb. 2 und 3 ist je ein Beispiel wiedergegeben. Bei N-terminaler Stellung tritt regelmäßig ein Peak bei m/e 172 auf, der wahrscheinlich dem Ion $CF_3-CO-NH=CH-CH_2-SH$ zukommt. Bei m/e 262 ($CF_3-CO-NH=CH-CH_2-S-CH_2-C_6H_5$) wurde dagegen in keinem Fall ein Peak mit bemerkenswerter Intensität festgestellt. Charakteristisch für N-terminales *S*-Benzyl-Cystein sind auch Ionen, die aus dem Molekül durch Eliminierung von $CF_3-CO-NH_2$ ($M-113$) bzw. von $CF_3-CO-NH_2 + C_6H_5-CH_2$ ($M-204$) entstehen. Der aufeinanderfolgende Zerfall $M^+ \rightarrow (M-113)^+ \rightarrow (M-204)^+$ ist durch die Beobachtung metastabiler Ionen in mehreren Fällen gesichert und wurde ausschließlich bei *N*-TFA-Peptidestern mit aminoendständigem *S*-Benzyl-Cystein beobachtet (Tab. 3). Die Ionen der Form [I] und [II] scheinen besonders stabilisiert zu sein und wurden in sämtlichen untersuchten Fällen mit großer Intensität beobachtet.



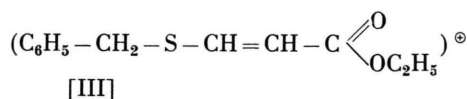
Diese Ionen lassen einen eindeutigen Schluß über die Stellung des Cysteins in der Sequenz in höheren

Peptiden zu, wie dies für ein Tri- und Tetrapeptid als Beispiel in Tab. 4 gezeigt wird.

Peptid	Relative Intensität [%]	
	m/e 222 (Ion [III])	m/e 131
TFA-Ser(Ac)-Cys(BZL)-OEt	75	28
TFA-Gly-Ala-Cys(BZL)-OEt	22	12
TFA-His-Ala-Cys(BZL)-OEt	2	5

Tab. 4. Intensitäten einiger charakteristischer Peaks bei C-terminalem Cystein.

Bei C-terminalem *S*-Benzyl-Cystein tritt bei jedem der drei untersuchten Beispiele ein Peak bei m/e 222 [III] sowie ein daraus durch Abspaltung von $C_6H_5-CH_2$ entstehendes Ion bei m/e 131 auf (Tab. 5).



Sehr wichtig für die Sequenzableitung ist auch das Erkennen des Molekularions. Es tritt in allen untersuchten Fällen mit ungewöhnlich großer Intensität auf (s. Tab. 1). Dies dürfte auf den aromatischen Molekülanteil des Benzylrestes zurückzuführen sein und spricht wiederum für die Stabilität dieser *S*-Benzyl-Cystein-Derivate. Bei Peptiden ohne aromatischen Molekülanteil liegt die Intensität des Molekularions oft sogar unterhalb der Nachweisgrenze,

Peptid	Relative Intensität [%]	
	Ion [I]	Ion [II]
TFA-Ala-Cys(BZL)-Ala-OEt	6	31
TFA-Thr-Cys(BZL)-Ile-OMe	4	42
TFA-Gly-Ala-Cys(BZL)-Ala-OEt	5	30

Tab. 5. Intensitäten der charakteristischen Peaks bei Cystein in der Sequenz.

Peptid	Relative Intensität [%]		
	m/e 172 ($M-CF_3CO \cdot NH_2$)	m/e ($M-CF_3CONH_2 + \varphi-CH_2$)	m/e
TFA-Cys(BZL)-Gly-OEt	7	23	31
TFA-Cys(BZL)-Ala-OEt	6	23	33
TFA-Cys(BZL)-Val-OEt	7	12	32
TFA-Cys(BZL)-Ile-OMe	6	7	24
TFA-Cys(BZL)-Pro-Val-OMe	7	1	2
TFA-Cys(BZL)-Ala-Ser(Ac)-OEt	3	<1	4

Tab. 3. Intensität einiger charakteristischer Peaks bei N-terminalem Cystein.

während hier Intensitäten bis zu 7% erreicht werden. Dies erleichtert wesentlich die Deutung der Massenspektren.

Eine Übersicht über die Fragmentierung mit Interpretation aller wichtigen Ionen ist in Abb. 2 für ein Cysteinylpeptid mit N-terminalem S-Benzyl-Cystein und in Abb. 3 für ein Peptid mit C-terminalem S-Benzyl-Cystein angeführt.

Die hier verwendeten Peptide sind in den meisten Fällen bisher noch nicht beschrieben worden. Zur Synthese wurden die üblichen Verfahren der Peptidchemie verwendet, die im einzelnen aus dem experimentellen Teil ersichtlich sind. Über die an fester Phase synthetisierten Peptide werden wir gesondert berichten.

Beschreibung der Versuche *

1. Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden mit einem LKB-9000 Gas-Chromatograph-Massenspektrometer mit einer Elektronenenergie von 50 eV bei einer Ionenquellentemperatur von 270° aufgenommen. Als Einlaßsystem diente ein Direkt-Einlaßsystem mit direkter Heizung und Wasserkühlung.

2. Darstellung der S-Benzyl-Cystein-Peptidester

Z-L-Cys(BZL)-Gly-OEt wurde nach GOLDSCHMIDT und JUTZ⁷ dargestellt.

Z-L-Cys(BZL)-DL-Ala-OEt

34,5 g (0,1 Mol) Z-L-Cys(BZL)-OH⁷ werden mit 14,3 g (0,1 Mol) Carbonylamino-DL-Alaninäthylester⁸ und 10 ml Pyridin übergossen. Nachdem die Kohlendioxidentwicklung schwächer wird, erhitzt man noch 3 Stdn. auf 80°. Danach wird das Pyridin im Vakuum verdampft, der Rückstand in 300 ml Essigester aufgenommen und je dreimal mit 50 ml 2-n. Salzsäure, 10-proz. Sodalösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und mit Petroläther gefällt. Eine weitere Umfällung erfolgt aus Essigester-Petroläther. Schmp. 114–115,5°; Ausbeute 24,2 g (54,5%).

C₂₃H₂₈O₅N₂S (444,6)

Ber. C 62,00 H 6,38 O 18,05 N 6,35 S 7,22,
Gef. C 61,50 H 6,30 O 18,16 N 6,44 S 7,44.

Z-L-Cys(BZL)-DL-Val-OEt

34,54 g (0,1 Mol) Z-L-Cys(BZL)-OH⁷, 17,1 g (0,1 Mol) Isocyanat-DL-Val-OEt⁸ in 20 ml absolutem Pyri-

din werden bei 80° 3 Stdn. erhitzt. Nach dem Entfernen des Pyridins im Vakuum und Aufnehmen des Rückstandes in 300 ml Essigester wird mit je dreimal 50 ml 2-n. HCl, 10-proz. Natriumcarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird der Essigester eingeeengt und mit Petroläther gefällt. Ausbeute nach einer weiteren Umfällung aus Essigester-Petroläther: 26,0 g (55% d. Th.), Schmp. 104–107°.

C₂₅H₃₂O₅N₂S (472,6)

Ber. C 63,54 H 6,83 O 16,93 N 5,93 S 6,78,
Gef. C 63,75 H 6,65 O 16,88 N 5,99 S 6,92.

Z-L-Cys(BZL)-L-Ile-OMe

14,5 g (0,08 Mol) H-L-Ile-OMe·HCl werden in 150 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst, auf 0° abgekühlt und mit 11,2 ml (0,08 Mol) Triäthylamin versetzt. Nach Absaugen des ausgefallenen Triäthylaminhydrochlorids wird das Filtrat zu einer Lösung von 27,6 g (0,08 Mol) Z-L-Cys(BZL)-OH in 150 ml absolutem THF gegeben und die Lösung auf 5° abgekühlt. Nun gibt man 16,5 g (0,08 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid in 40 ml Tetrahydrofuran zu, läßt die Mischung unter Rühren auf Raumtemperatur kommen und fügt nach 2 Stdn. 0,5 ml Eisessig zu. Danach wird vom Harnstoff abgesaugt, das Filtrat im Vakuum eingeeengt und der ölige Rückstand in 300 ml Essigester aufgenommen. Die Lösung wird mit je dreimal 0,75-n. HCl, 40 ml Wasser, 5-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, mit Petroläther bis zur Trübung versetzt und auf –70° gekühlt. Der Dipeptidester kristallisiert bei langsamem Erwärmen auf Raumtemperatur in schönen Nadelchen. Nach dem Absaugen, Waschen mit Petroläther und Trocknen über Diphosphorpentoxid wird aus Essigester-Petroläther umkristallisiert. Schmp. 79,5–80°, Ausbeute: 32,1 g (85% d. Th.).

C₂₅H₃₂O₅N₂S (472,6)

Ber. C 63,40 H 6,83 O 16,90 N 5,92 S 6,78,
Gef. C 63,48 H 7,08 O 16,82 N 5,89 S 6,91.

H-L-Cys(BZL)-L-Ile-OMe·HBr

18,95 g (0,04 Mol) Z-L-Cys(BZL)-L-Ile-OMe werden mit einer eiskalten Mischung aus 10 ml Eisessig und 34 ml 40-proz. Bromwasserstoff-Eisessiglösung übergossen und nach Zusatz einiger Resorcin kristalle eine Stde. bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Abziehen des Eisessigs am Rotationsverdampfer wird der Rückstand mit 300 ml absolutem Äther übergossen und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Das gut kristallisierte Dipeptidesterhydrobromid wird nach dem Absaugen über Kaliumhydroxid und Diphosphorpentoxid getrocknet. Ausbeute: 16,4 g (97,5% d. Th.).

C₁₇H₂₇O₃N₂SBBr (419,4)

* Nomenklatur und Abkürzungen wurden entsprechend den IUPAC-Empfehlungen ausgeführt: IUPAC Information Bulletin Nr. 20, Juli 1963, S. 16–18 und Nr. 25, Februar 1966, S. 32–40.

⁷ S. GOLDSCHMIDT u. C. JUTZ, Chem. Ber. **86**, 1116 [1953].

⁸ S. GOLDSCHMIDT u. M. WICK, Liebig's Ann. Chem. **575**, 217 [1952].

Z-DL-Ser-L-Cys(BZL)-OEt

25,33 g (0,1 Mol) Z-DL-Ser-NHNH₂⁹ werden in einer Mischung von 250 ml H₂O, 25,3 ml Eisessig und 8,5 ml konzentrierter Salzsäure gelöst und auf -5° abgekühlt. Unter Rühren wird eine kalte Lösung von 8 g NaNO₂ in 25 ml Wasser zugetropft. Nach 5 Min. wird das ölige Azid 2-mal mit je 100 ml eiskaltem Essigester extrahiert, mit kaltem Wasser gewaschen und 10 Min. unter Rühren bei 0° mit Natriumsulfat getrocknet. Die getrocknete Lösung wird mit einer Lösung von H-L-Cys(BZL)-OEt versetzt, die durch Suspension von 27,58 g (0,1 Mol) H-L-Cys(BZL)-OEt·HCl in 40 ml Wasser und 200 ml Äther, Abkühlen auf 0°, Zusatz von 14 ml (0,1 Mol) Triäthylamin unter Schütteln und Trocknen bei 0° über Natriumsulfat erhalten worden ist. Die vereinigten Lösungen werden durch eine Glasfritte gesaugt und 48 Stdn. bei 0° stehengelassen. Nach dem Absaugen und Waschen mit Äther wird aus Äther-Chloroform-Petroläther, Äther-Essigester-Petroläther und Äthanol (500 ml) umkristallisiert. Nach dem Trocknen über Diphosphorpentoxid erhält man lange Nadelchen vom Schmp. 118,5–119°; Ausbeute 31,8 g (69%).

C₂₃H₂₈O₆N₂S (460,6)

Ber. C 60,00 H 6,08 O 20,90 N 6,07 S 6,96,

Gef. C 60,01 H 6,01 O 21,05 N 6,07 S 7,14.

Z-Gly-DL-Ala-L-Cys(BZL)-OEt

6,9 g (0,025 Mol) H-Cys(BZL)-OEt·HCl werden in 10 ml Wasser und 50 ml Äther suspendiert und bei 0° mit 3,5 ml Triäthylamin geschüttelt. Die abgetrennte Ätherphase wird während der Azidbereitung über Natriumsulfat getrocknet.

7,35 g (0,025 Mol) nach ZAHN und SCHNABEL¹⁰ dargestelltes Z-Gly-DL-Ala-NHNH₂ werden azidiert und in 300 ml Äther aufgenommen. Die Ätherlösung wird mit Eiswasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nun werden Azidlösung und Esterlösung vereinigt, 24 Stdn. bei 20° stehengelassen, danach abgesaugt und aus Essigester mit Petroläther ausgefällt. Ausbeute: 6,1 g (48,5% d. Th.), Schmp. 108°.

C₂₅H₃₁O₆N₃S (509,4)

Ber. C 59,83 H 6,22 O 19,13 N 8,39 S 6,43,

Gef. C 59,82 H 6,19 O 19,02 N 8,41 S 6,61.

BOC-L-Thr-L-Cys(BZL)-L-Ile-OMe

8,6 g (0,0392 Mol) nach HOFMANN u. Mitarb.¹¹ dargestelltes BOC-L-Thr-OH und 16,4 g (0,0392 Mol) H-L-Cys(BZL)-L-Ile-OMe·HBr werden in 150 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst, auf 0° gekühlt und unter Rühren 5,30 ml Triäthylamin zugegeben. Nach 10 Min. werden 8,25 g (0,04 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid in 30 ml Tetrahydrofuran zugegeben und 4 Stdn. bei 0° gerührt. Nach Stehenlassen im Kühlschrank über Nacht

⁹ G. RILEY, J. H. TURNBULL u. W. J. WILSON, J. chem. Soc. [London] 1957, 1373.

¹⁰ H. ZAHN u. E. SCHNABEL, Liebigs Ann. Chem. 604, 62 [1957].

¹¹ K. HOFMANN, R. SCHMIECHEN, R. D. WELLS, Y. WOLMAN u. N. YANAIHARA, J. Amer. chem. Soc. 87, 611 [1965].

wird 1 ml Eisessig zugegeben und am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird zweimal aus Essigester-Petroläther umkristallisiert. Ausbeute: 17,8 g (84% d. Th.), Schmp. 103°.

C₂₆H₄₁O₇N₃S (539,7)

Ber. C 57,80 H 7,65 O 20,55 N 7,78 S 5,94,

Gef. C 58,17 H 7,71 O 20,45 N 7,81 S 5,86.

Z-DL-His-DL-Ala-OEt

Die Synthese erfolgte analog der L-Verbindung nach R. W. HOLLEY und E. SONDHEIMER¹². Die Ausbeute beträgt nach einer Umkristallisation aus Äthanol 69%, Schmp. 113–114°.

C₁₉H₂₄O₅N₄ 388,4)

Ber. C 59,14 H 6,37 O 20,04 N 14,45,

Gef. C 59,45 H 6,45 O 19,95 N 14,47.

Z-DL-His-DL-Ala-NHNH₂

13,1 g Z-DL-His-DL-Ala-OEt, gelöst in 65 ml Äthanol, werden mit 3,9 ml Hydrazinhydrat (90%) kurz aufgekocht und 24 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Die auskristallisierten, langen Nadeln werden abgesaugt, mit wenig Äthanol und viel Äther gewaschen und roh zum Azid umgesetzt. Ausbeute: 11,1 g (88%), Schmp. 188–190°.

Z-DL-His-DL-Ala-L-Cys(BZL)-OEt

5,52 g (0,02 Mol) H-L-Cys(BZL)-OEt·HCl werden in Wasser und 50 ml Äther suspendiert und bei 0° mit 2,8 ml Triäthylamin kurz geschüttelt. Die Ätherphase wird über Natriumsulfat getrocknet.

7,25 g (0,02 Mol) Z-DL-His-DL-Ala-NHNH₂ werden in 250 ml Wasser und 50 ml konzentrierter Salzsäure gelöst, auf -5° gekühlt und mit 2,4 g Natriumnitrit in 15 ml Wasser azidiert. Nach 20 Min. werden 300 ml -5° kaltes Chloroform zugegeben. Mit 50-proz. Pottaschelösung wird die wäßrige Phase auf pH 9 gebracht und dann das Azid in die Chloroformphase extrahiert. Nach fünfminütigem Trocknen über Natriumsulfat bei -5° wird die Azidlösung mit der Esterlösung vereinigt und 24 Stdn. stehengelassen. Die gelatineartig verfestigte Masse wird danach mit viel Petroläther versetzt, gerührt und abgesaugt. Umkristallisiert wird aus Methanol-Wasser, Äthanol-Wasser und aus Dioxan durch Zugabe von Petroläther. Ausbeute: 7,7 g (67,5% d. Th.), Schmp. 119–121°.

C₂₈H₃₅O₆N₅S (569,7)

Ber. C 59,00 H 6,25 O 16,84 N 12,26 S 5,65,

Gef. C 59,00 H 6,26 O 16,83 N 12,25 S 5,81.

H-L-Pro-L-Val-OMe

13,45 g (0,08 Mol) H-L-Val-OCH₃·HCl¹³ werden in 200 ml absolutem Dimethylformamid gelöst, mit 11,2 ml

¹² R. W. HOLLEY u. E. SONDHEIMER, J. Amer. chem. Soc. 76, 1326 [1954].

¹³ R. A. BOISSONAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD, I.-P. WALLER, Helv. chim. Acta 39, 1421 [1956].

Triäthylamin bei 0° versetzt und 10 Min. gerührt. Nach dem Abfiltrieren wird das Filtrat zur Lösung von 17,2 g (0,08 Mol) BOC-L-Pro-OH¹⁴ in 150 ml Tetrahydrofuran gegeben. Danach werden 16,5 g (0,08 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid in 40 ml Tetrahydrofuran zugesetzt und 2,5 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zusatz von 2 ml Eisessig saugt man den ausgefallenen Harnstoff ab und zieht die Lösungsmittel im Vakuum ab. Der Rückstand, ein leicht gelbes Öl, wird ohne weitere Reinigung zur Abspaltung der t-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe mit 250 ml 4-n. Salzsäure in absolutem Dioxan 45 Min. bei 20° gerührt. Nach dem Abziehen am Rotationsverdampfer wird der Rückstand mit absolutem Äther versetzt, eine Nacht bei 0° gerührt und dann der Äther abdekantiert. Zur Freisetzung der Esterbase wird das Hydrochlorid bei 0° mit 10-proz. Kaliumhydrogencarbonat-Lösung geschüttelt, quantitativ mit Chloroform extrahiert, mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abziehen des Chloroforms und 1-stdg. Trocknen über Diphosphor-pentoxid bei 0,01 Torr werden 16,0 g (70%) ölige Di-peptidesterbase erhalten, die sofort weiterverarbeitet wird.

H-L-Cys(BZL)-L-Pro-L-Val-OMe·HBr

11,4 g (0,05 Mol) H-L-Pro-L-Val-OMe und 17,2 g (0,05 Mol) Z-L-Cys(BZL)-OH werden in 200 ml Methylchlorid gelöst, auf -10° gekühlt und mit 11,3 g (0,055 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid in 30 ml Methylchlorid versetzt, 12 Stdn. bei -10° und weitere 2 Stdn. bei 20° gerührt. Nach Zusatz von 2 ml Eisessig wird vom Harnstoff abgesaugt, das Filtrat im Vakuum abgezogen und der Rückstand in 200 ml Essigester aufgenommen. Nach dem Waschen mit je dreimal 50 ml 5-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, Wasser, 3-proz. Salzsäure und Wasser, wird über Natriumsulfat getrocknet, der Essigester abgezogen und das zurückbleibende Öl bei 0,01 Torr über Kaliumhydroxid und Diphosphor-pentoxid getrocknet. Zur Abspaltung der Carbobenzoxy-Schutzgruppe wird das Öl mit 50 g eiskalter Bromwasserstoff-Eisessig-Lösung (40%) übergossen und unter Zusatz von etwas Resorcin 45 Min. bei Raumtemperatur gerührt. Das Hydrobromid wird dann mit absolutem Äther ausgefällt und über Kaliumhydroxid getrocknet. Das zähe Öl kristallisiert langsam nach dem Umfällen aus absolutem Methanol durch Zugabe von Äther beim weiteren Trocknen über Diphosphor-pentoxid bei 0,01 Torr. Ausbeute: 14,8 g (59% d. Th.).

Z-L-Cys(BZL)-DL-Ala-NHNH₂

10,7 g Z-L-Cys(BZL)-DL-Ala-OC₂H₅ werden in 150 ml absolutem Äthanol gelöst, mit 6 g Hydrazinhydrat (100%) versetzt und bei 20° 24 Stdn. stehengelassen. Nach dem Absaugen, Einengen der Mutterlauge und Umkristallisieren aus Äthanol werden 9,4 g (91%)

Nadelchen vom Schmp. 183,5° erhalten.

$C_{21}H_{26}O_4N_4S$ (430,5)

Ber. C 58,55 H 6,10 O 14,88 N 13,00 S 7,46,

Gef. C 58,53 H 6,18 O 15,03 N 12,96 S 7,54.

Z-L-Cys(BZL)-DL-Ala-DL-Ser-OEt

1,70 g (0,01 Mol) H-DL-Ser-OEt·HCl und 1,40 ml Triäthylamin werden in 20 ml Chloroform gelöst, mit Essigester versetzt und auf -10° gekühlt. Nach Absaugen des Triäthylaminhydrochlorids wird das Filtrat mit der Azidlösung vereinigt, die wie folgt hergestellt wird:

4,31 g (0,01 Mol) Z-L-Cys(BZL)-DL-Ala-NHNH₂ werden in einer Mischung aus 17 ml Eisessig, 14 ml 2-n. HCl und 33 ml Wasser gelöst, auf 0° gekühlt und eine kalte Lösung von 0,73 g Natriumnitrit in Wasser zugegibt. Nach 5 Min. Rühren bei 0° wird das Azid in 150 ml eiskaltem Essigester aufgenommen und die Azidlösung schnell mit eiskalter Bicarbonat-Lösung und Eiswasser neutralgewaschen. Dann wird unter Rühren 10 Min. bei -10° mit Natriumsulfat getrocknet und abgesaugt.

Die vereinigten Lösungen werden 48 Stdn. bei 0° stehengelassen, mit Petroläther ausgefällt und zweimal aus Essigester-Petroläther umgefällt. Ausbeute: 3,6 g (67,6% d. Th.), Schmp. 100–102°, Sintern ab 90°.

$C_{26}H_{33}O_7N_3S$ (531,6)

Ber. C 58,75 H 6,26 O 21,10 N 7,91 S 6,03,

Gef. C 59,63 H 6,33 O 19,31 N 8,44 S 6,29.

Z-DL-Ala-L-Cys(BZL)-DL-Ala-OEt

Z-L-Cys(BZL)-DL-Ala-OEt wird mit Bromwasserstoff-Eisessig-Lösung wie üblich decarboxyliert, die freie Base aus dem Hydrobromid durch Schütteln mit eiskalter Kaliumcarbonat-Lösung in Freiheit gesetzt und in Chloroform aufgenommen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde das Chloroform im Vakuum verdampft und der ölige, farblose Rückstand bei 0,05 mm Hg über Diphosphor-pentoxid eine Stde. getrocknet. 13,4 g (0,04 Mol) H-L-Cys(BZL)-DL-Ala-OEt werden dann zur Synthese des Tripeptidesters nach der Phosphorazomethode¹⁵ in 100 ml absolutem Pyridin gelöst, auf 0° gekühlt und mit 2,8 g (0,02 Mol) Phosphor-trichlorid in 15 ml Pyridin versetzt. Nach 30 Min. Rühren bei Raumtemperatur werden 9,6 g (0,043 Mol) Z-DL-Ala-OH zugegeben und 3 Stdn. auf 90° erhitzt. Nach dem Abziehen des Pyridins wird in 500 ml Essigester aufgenommen und je zweimal mit je 100 ml 2-n. Salzsäure, Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird die Lösung eingengt und mit Petroläther ausgefällt. Zwei weitere Umfällungen erfolgen aus Dioxan mit Petroläther. Ausbeute: 10,5 g (51% d. Th.), Schmp. 131–134°.

$C_{26}H_{33}O_6N_3S$ (515,6)

Ber. C 60,57 H 6,45 N 8,16 S 6,22,

Gef. C 59,27 H 6,49 N 8,01 S 5,81.

¹⁴ G. W. ANDERSON u. A. C. MCGREGOR, J. Amer. chem. Soc. **79**, 6180 [1957].

¹⁵ S. GOLDSCHMIDT, Collection Czech. Chem. Commun. **24**, 15 [1959].

Z-Gly-DL-Ala-L-Cys(BZL)-DL-Ala-OEt

Die aus 7,3 g (0,025 Mol) nach ZAHN und SCHNABEL¹⁰ dargestelltem Z-Gly-DL-Ala-NHNH₂ bereitete, auf 0° gekühlte und mit Natriumsulfat getrocknete ätherische Azidlösung (s. oben) wird mit der gekühlten und getrockneten ätherischen Lösung von 7,75 g (0,025 Mol) H-L-Cys(BZL)-DL-Ala-OEt vereinigt und 36 Std. bei 0° gehalten. Nach Absaugen des voluminösen Niederschlags wird aus Essigester mit Petroläther zweimal umgefällt. Ausbeute: 4,75 g (33,2%), Schmp. 113 bis 115°.

C₂₈H₃₆O₇N₄S (572,7)

Ber. C 58,50 H 6,44 O 19,65 N 9,80 S 5,61,

Gef. C 58,05 H 6,52 O 19,78 N 10,06 S 5,82.

3. Herstellung der *N*-TFA-Peptid-Ester

Die nach obigen Vorschriften erhaltenen Carbobenzoxypeptidester werden zur Entfernung der Z-Schutzgruppe mit HBr-gesättigtem Eisessig bei Raumtemperatur behandelt. Die Trifluoracetylierung wird nach WEYGAND⁵ mit TFE-Methylester durchgeführt.

3–100 mg Z-Peptidester werden mit 2 ml gekühltem, HBr-gesättigtem Eisessig versetzt und unter Rühren 1/2 Stde. bei ca. 20° stengelassen. Danach wird im Wasserstrahlvakuum (18 Torr) bei Raumtemperatur zur Trockne eingedampft.

Der Rückstand wird in ca. 5–8 ml Methanol aufgenommen, mit Triäthylamin auf einen pH-Wert von ca. 8 gebracht und mit 2 ml Trifluoressigsäuremethylester versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 6–8 Std. bei Raumtemperatur unter Rühren stengelassen. Danach wird im Vakuum bei Raumtemperatur zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird zwischen Wasser und Essigester verteilt. Die Essigesterphase wird im Vakuum zur Trockne eingedampft. Als Rückstand bleibt ein kristallines oder öliges Produkt, das ohne weitere Reinigung massenspektrometrisch untersucht wird.

Zu bemerken wäre noch, daß die Serin-haltigen Peptidester beim Behandeln mit HBr-Eisessig *O*-acetyliert werden, was jedoch nicht stört.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe zur Beschaffung des Massenspektrometers.

Das Verhalten von Glykokoll, Alanin, α -Aminobuttersäure, Leucin, Phenylalanin und Asparaginsäure unter hydrothermalen Bedingungen

WOLFGANG WALTER, HANS-PETER HARKE und REINER POLCHOW

Chemisches Staatsinstitut, Institut für organische Chemie der Universität Hamburg

(Z. Naturforschg. **22 b**, 931–937 [1967]; eingegangen am 15. März 1967)

Ausgehend von der Frage nach der Beständigkeit von im Zuge der vororganismischen Evolution entstandenen Aminosäuren unter ihren Bildungsbedingungen wurde das Verhalten von Aminosäuren gegenüber Wasserdampf oberhalb seiner kritischen Temperatur untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Aminosäuren Glykokoll, Alanin, Phenylalanin, α -Aminobuttersäure, Leucin und Asparaginsäure unter derartigen Bedingungen nicht beständig sind. Sie geben Anlaß zur Entstehung einer Vielzahl von Verbindungen aus zahlreichen Substanzklassen, von denen ein großer Teil identifiziert wurde. Die Entstehung mehrerer der so sich bildenden Substanzen auf übersichtlichen Reaktionswegen konnte durch Modellversuche wahrscheinlich gemacht werden.

Allen Überlegungen zur Entstehung einfacher lebender Struktur ist die Frage nach der Bildung jener chemischen Verbindungen vorgelagert, an die der Ablauf der Lebensvorgänge gebunden ist. Ausgehend von den rein thermischen Umwandlungen der Aminosäuren¹ haben wir uns besonders für deren Rolle im Laufe der vororganismischen Evolution interessiert^{2, 3}. Unter der l. c.^{2, 3} diskutierten Voraussetzung, daß die Erde im Anfang ihrer Entwicklung eine reduzierende Atmosphäre aufwies,

kann mit der Bildung von Aminosäuren aus einfachen Gasen (CH₄, NH₃, H₂) gerechnet werden. Diese Synthese ist in Modellversuchen unter geeigneter Energiezufuhr nachvollziehbar^{2, 3}. Es erhebt sich jedoch die Frage nach den Bereichen vor allem hinsichtlich Temperatur und Druck, in denen hinreichende Beständigkeit entstehender Aminosäuren gewährleistet ist. Nach Berechnungen von HULL⁴ soll der photochemischen Zersetzung der Aminosäuren unter ihren Bildungsbedingungen das entschei-

¹ K. HEYNS u. K. PAVEL, Z. Naturforschg. **12 b**, 97, 109 [1957].

² K. HEYNS, W. WALTER u. E. MEYER, Naturwissenschaften **44**, 385 [1957].

³ K. HEYNS, W. WALTER u. R. POLCHOW, Handbuch der Biologie **1/2**, 605 [1965].

⁴ D. E. HULL, Nature [London] **186**, 693 [1960].