

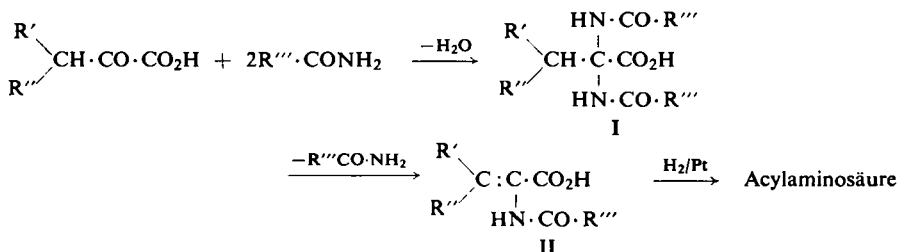
THEODOR WIELAND, GERHARD OHNACKER*) und WERNER ZIEGLER**)
AMINOSÄURE-SYNTHESEN MIT α -ACYLAMINO-ACRYLESTERN

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt a. M.

(Eingegangen am 23. November 1956)

Durch eine verbesserte Bergmann-Grafe-Kondensation, bei der das Reaktionswasser durch azeotrope Destillation entfernt wird, konnten aus Brenztraubensäure und mehreren Säureamiden einige neue α -Acylamino-acrylsäuren dargestellt werden. An α -Acetamino- und α -Phenylacetamino-acrylester lassen sich in einer Michael-Addition Verbindungen mit beweglichem Wasserstoff anlagern. Es wurden auf diese Weise Glutaminsäure, γ -Nitro-leucin und Isohistidin synthetisiert.

α -Amino-acrylsäuren (Dehydroaminosäuren), $\text{R}'\text{R}''\text{C}=\text{C}(\text{NH}_2)\cdot\text{CO}_2\text{H}$, sind wegen der Enaminstruktur nicht beständig. Hingegen konnten M. BERGMANN und K. GRAFE¹⁾ durch Erhitzen von Brenztraubensäure mit Acetamid oder Chloracetamid i. Vak. die diacylierten α,α -Diamino-propionsäuren (I, R' , $\text{R}'' = \text{H}$, $\text{R}''' = \text{CH}_3$ bzw. CH_2Cl) gewinnen, die beim kurzen Kochen mit Eisessig in die entsprechenden z. T. schon in den Reaktionsansätzen enthaltenen α -Acylamino-acrylsäuren (II) übergingen.



Später wurde von D. SHEMIN und R. M. HERBST²⁾ in ähnlicher Weise aus Phenylbrenztraubensäure und Acetanhydrid *N*-Acetyl-dehydrophenylalanin (II, $\text{R}' = \text{C}_6\text{H}_5$, $\text{R}'' = \text{H}$, $\text{R}''' = \text{CH}_3$) und aus Brenztraubensäure und Benzamid *N*-Benzoyl-dehydroalanin (II, R' , $\text{R}'' = \text{H}$, $\text{R}''' = \text{C}_6\text{H}_5$) dargestellt. Mit anderen Säureamiden konnten damals keine Kondensationsprodukte erhalten werden, doch gelang es O. SÜS³⁾, Phenylacetamid mit Brenztraubensäure zum *N*-Phenacetyl-dehydroalanin (II, R' , $\text{R}'' = \text{H}$, $\text{R}''' = \text{CH}_2\cdot\text{C}_6\text{H}_5$) zu vereinigen, wenn dem Ansatz als Lösungsvermittler Campher zugesetzt wurde.

SYNTHESEN EINIGER α -ACYLAMINO-ACRYLSÄUREN

Die Acylaminoacrylsäuren II gehen bei der katalytischen Hydrierung in *N*-Acylaminosäuren über. Deshalb war es bei Beginn der Untersuchungen unsere Absicht,

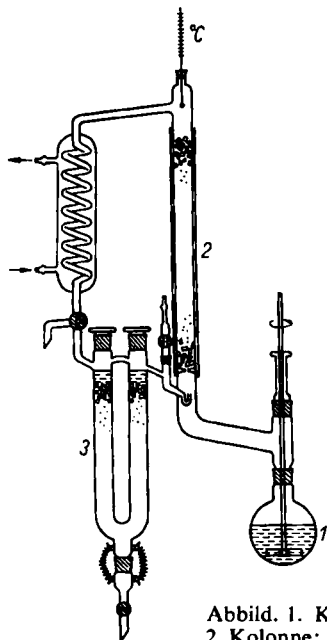
*) Teil der Dissertation G. OHNACKER, Mainz 1951.

**) Teil der Dissertation W. ZIEGLER, Frankfurt a. M. 1956.

1) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **187**, 187 [1930].

2) J. Amer. chem. Soc. **60**, 1954 [1938]. 3) Liebigs Ann. Chem. **569**, 153 [1950].

Brenztraubensäure und andere α -Ketosäuren mit den Amid-acylierter Aminosäuren zu kondensieren und durch katalytische Hydrierung der so erhaltenen Dehydropeptide Dipeptide aufzubauen. Es wurde daher versucht, die Bergmann-Grafe-Kondensation so zu verbessern, daß sämtliche Säureamide zur Reaktion gebracht werden konnten. Hierzu erwies es sich als vorteilhaft, das Kondensationswasser nicht einfach, wie bisher, durch Evakuieren aus dem System zu entfernen, sondern die azeotrope Destillation anzuwenden. Die in Abbild. 1 abgebildete Apparatur gestattete es, das im Reaktionskolben entstehende Wasser kontinuierlich mit einem Umwälzmittel, am besten Trichloräthylen, azeotrop zu entfernen, dieses in einem U-Rohr mit Silicagel zu trocknen und wieder in den Kolben zurückzuführen. Der Erfolg dieser Methode war, daß die Ausbeuten an bereits bekannten Aminoacrylderivaten z. T. wesentlich verbessert, andere, auch empfindliche Verbindungen dieses Typs erstmalig dargestellt werden konnten. Tab. 1 gibt die aus Brenztraubensäure erhaltenen Verbindungen mit Ausbeuten und Schmelzpunkten wieder.



Abbild. 1. Kondensationsapparatur: 1. Reaktionskolben mit Rührer; 2. Kolonne; 3. U-Rohr, gefüllt mit Silicagel (Blaugel) und Schleppmittel

Tab. 1. Derivate des Dehydroalanins $\text{H}_2\text{C}=\text{C} \begin{smallmatrix} \text{NH} \cdot \text{CO} \cdot \text{R} \\ \text{CO}_2\text{H} \end{smallmatrix}$

Ausgangsamid	Produkt, R =	Ausb., bez. auf Amid (%)	Schmp.° (Zers.)	Nr.
$\text{H}_3\text{C} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2$	CH_3	86	196–198	III
$\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2$	$\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CH}_2$	72	184–185	IV
$\text{ClCH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2$	ClCH_2	30	162–164	V
$\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2$	C_6H_5	47	122	VI
$\text{H}_2\text{C}:\text{CH} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2$	$\text{H}_2\text{C}:\text{CH}$	17	163	VII
$\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{O} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2$	$\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{O}$	48	119	VIII
$\text{CbO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2$	$\text{CbO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_2$	45	187	IX

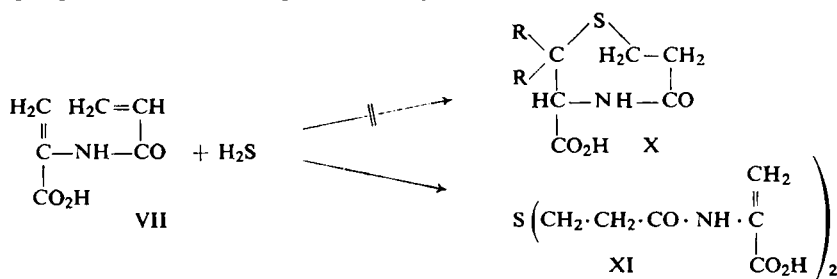
CbO = Carbobenzoxy-Rest

Außerdem gelang es auf diese Weise, Acetamid mit Dimethylbrenztraubensäure in 48% Ausbeute zum *N*-Acetyl-dehydrovalin (II, $\text{R}', \text{R}'', \text{R}''' = \text{CH}_3$) zu kondensieren. Versuche, Sulfonamide ebenfalls zur Reaktion zu bringen, verliefen erfolglos. Auch beim Brenztraubensäure-methylester trat weder mit Acetamid noch mit Phenylacetamid Kondensation ein.

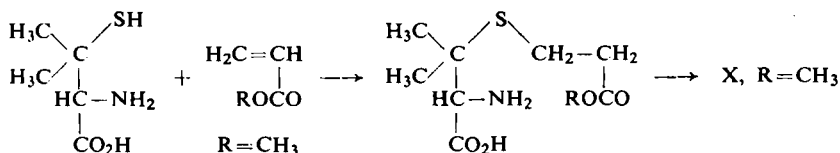
Der ursprünglich geplanten Peptidsynthese kam in Anbetracht der mäßigen Ausbeute am Dehydropeptid IX nur noch theoretisches Interesse zu. Die katalytische Hydrierung von IX führt zwar glatt zu Glycyl-alanin, das papierchromatographisch nachgewiesen wurde, doch ließ auch die Tatsache, daß hierbei Peptide racemischer Aminosäuren entstehen, eine weitere Verfolgung dieses Weges vorerst nicht lohnend

erscheinen. Die Carbobenzoxyverbindung VIII geht mit katalytisch erregtem Wasserstoff in DL-Alanin über. Eine solche Aminosäuresynthese aus der entsprechenden α -Ketosäure verspricht aber ebenfalls nur in besonderen Fällen nützlich zu werden.

Wir versuchten, aus *N*-Acryloyl-dehydroalanin (VII) durch Einlagerung von Schwefelwasserstoff den 7-gliedrigen Grundheterocyclus des Penicillins, das Lactam des *S*-[β -Carboxy-äthyl]-cysteins (X, R, R=H) darzustellen, das aus der vereinfachten Molekel des Antibioticums durch hydrierende Aufspaltung der den beiden Ringen gemeinsamen Bindung entstanden gedacht werden kann.



Es reagierten aber zwei Molekeln von VII mit trockenem Schwefelwasserstoff in natriummethylat-haltigem Methanol unter Bildung des Thioäthers XI, der bei der sauren Hydrolyse zu Thio-dipropionsäure, Ammoniak und Brenztraubensäure aufgespalten wird. Die Synthese der geminalen Dimethylverbindung X (R, R = CH₃) konnte auf einem anderen Weg verwirklicht werden. Penicillamin wurde mit Acrylsäure-methylester zur *S*-[β -Carbomethoxy-äthyl]-Verbindung alkyliert, die beim längeren Erhitzen auf 70° i. Vak. intramolekular Methanol abspaltet.



Dieselbe Verbindung wurde vor einiger Zeit auch von I. L. KNUNYANTS und Mitarbeitern⁴⁾ durch Einwirkung von Baryt auf β -Chlorpropionyl-penicillamin-methylester erhalten.

AMINOSÄUREN AUS ACRYLSÄUREESTERN

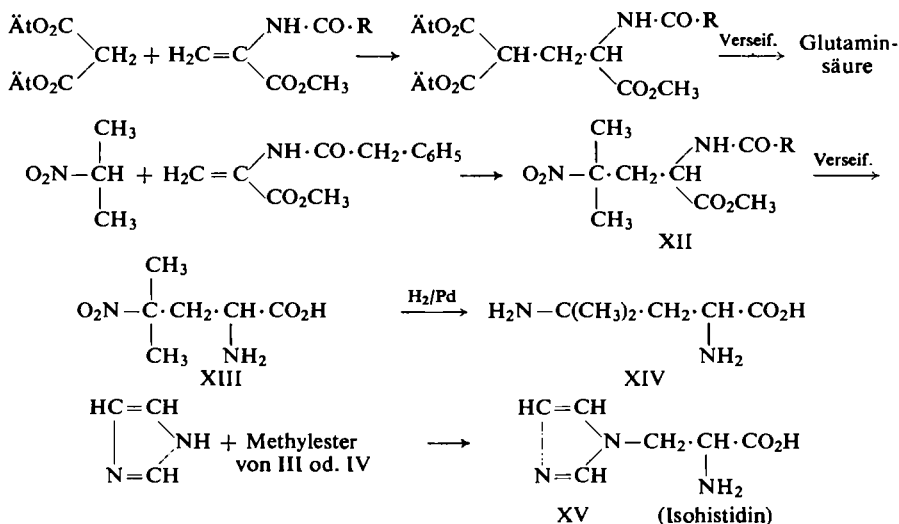
Die Additionsfreudigkeit der Acryldoppelbindung ließ Versuche aussichtsreich erscheinen, durch Michael-Addition C-H-acider Komponenten C-reichere Aminosäuren aus Acyl-dehydroalaninen aufzubauen. Experimente mit Malonester, die zum Skelett der Glutaminsäure führen müßten, verliefen jedoch am *N*-Acetyl-dehydroalanin (III) negativ. Deshalb mußte die aktivierende Wirkung der Carboxylgruppe durch Veresterung verstärkt werden. Unsere Wahl fiel zunächst auf den α -Acetyl-amino-acrylsäure-methylester, dann auf den α -Phenacetyl-amino-acrylsäure-methylester (entspr. IV), weil dieser sich aus der Säure mit Diazomethan in Äther nahezu quantitativ erhalten läßt⁵⁾. Das gleiche Vorgehen führt bei III nur zu einer 10-proz.

4) I. L. KNUNYANTS, M. G. LIN'KOVA und P. G. IGNATENOK, C. A. 50, 1592 [1956].

5) M. BRENNER und K. RUFENACHT, Helv. chim. Acta 36, 1832 [1953].

Ausbeute an Methylester, wahrscheinlich wegen der hier besonders rasch verlaufenden konkurrierenden Anlagerung des Diazomethans an die Doppelbindung. Der Methylester aus III läßt sich zwar mit Dimethylsulfat in methanolischem Alkali oder durch Umsetzung des Silbersalzes mit Methyljodid erhalten, aber auch nur in Ausbeuten von 40–50%.

Die Methylester beider α -Acylamino-acrylsäuren lagern in Gegenwart katalytischer Mengen von Natriummethylat in Methanol bei 30° in einigen Stunden Malonsäure-diäthylester an die Doppelbindung an. Die Reaktionsprodukte wurden nicht in reiner Form isoliert, sondern mit halbkonzentrierter Salzsäure zu *Glutaminsäure* verseift, die als Hydrochlorid in reiner Form gewonnen und als Dinitrophenylderivat charakterisiert wurde.

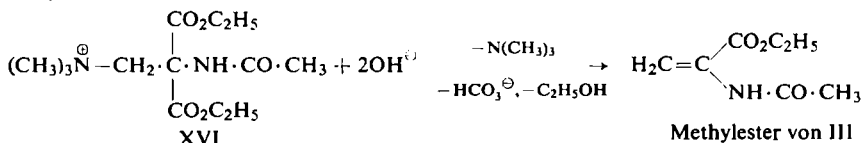


Besonders glatt verlief die Anlagerung von 2-Nitro-propan an den Methylester von IV in tert.-Butanol als Lösungsmittel und mit Triton B (Benzyl-trimethylammoniumhydroxyd) als Katalysator. Der in fast quantitativer Ausbeute isolierte Ester XII liefert bei Hydrolyse mit Salzsäure α -Amino- γ -nitro-isocaprönsäure (γ -Nitro-leucin) (XIII), die eine kanariengelbe Ninhydrinreaktion gibt. Sie wurde mit negativem Ergebnis auf bakteriostatische Wirkung an Staphylokokken geprüft. Bei der katalytischen Hydrierung geht sie in γ -Amino-leucin (XIV) über, das als Pikrat kristallisiert wurde. Die Reduktion des Esters XII ergibt ebenfalls eine γ -Aminoverbindung, die wir zum Vergleich mit Bausteinen der Knollenblätterpilzgifte mit Salpetriger Säure in die γ -Hydroxyverbindung zu verwandeln versuchten. Sie erwies sich aber als äußerst resistent bei der Diazotierung, so daß dieses Vorhaben nicht gelang.

Schließlich wurde noch versucht, Imidazol mit dem Methylester von III oder IV zur Reaktion zu bringen, in der Hoffnung, auf diese Weise eine einfache Synthese des *Histidins* zu ermöglichen. Der Heterocyclus addiert sich aber mit einem seiner N-Atome, und es entsteht bei der Verseifung des Addukts die dem Histidin isomere Aminosäure XV (Isohistidin), die sich papierchromatographisch und -elektrophore-

tisch dem Histidin äußerst ähnlich verhält, aber als *N*-substituiertes Imidazolderivat keine Kupplung mit diazotierter Sulfanilsäure (Pauly-Reaktion) erkennen läßt.

Während wir mit diesen Untersuchungen beschäftigt waren, konnten H. HELLMANN und E. FOLZ⁶⁾ zeigen, daß die von R. O. ATKINSON⁷⁾ beschriebene Synthese der Asparaginsäure aus der quartären Mannich-Verbindung des Acetamino-malonesters (XVI) mit Natriumcyanid über den Acetamino-acrylester verläuft, der unter Trimethylamin- und Carbäthoxyl-Abspaltung aus XVI entsteht und rasch das nucleophile Agens anlagert. Daraufhin konnten einige weitere Verbindungen mit beweglichem Wasserstoff dieser modifizierten Michael-Addition zugänglich gemacht werden.



Der Mechanismus der ähnlichen Anlagerung von Indol an α -Acetamino-acrylsäure in Eisessig-Acetanhydrid⁸⁾ ist indessen noch nicht genau bekannt.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Darstellung der in Tab. I aufgeführten α -Acylamino-acrylsäuren

Die *allgemeine Darstellungsweise* besteht darin, daß man ein *Säureamid* und die dreifach molare Menge frisch dest. *Brenztraubensäure* mit 100—300 ccm *Trichloräthylen* pro 0.1 Mol Amid in der in Abbild. 1 abgebildeten Apparatur solange unter Rühren zum Sieden erhitzt, bis das aus dem Kühler ins U-Rohr ablaufende Kondensat nicht mehr durch Wasser getrübt ist. Dies dauert in der Regel mehrere Stunden.

N-Acetyl-dehydroalanin (III): 11.8 g *Acetamid* und 63 g *Brenztraubensäure* werden in 150 ccm *Trichloräthylen*, wie oben beschrieben, zum Sieden erhitzt. Reaktionsdauer 5 Stdn. Beim Abkühlen scheidet sich ein Teil des Produkts in Kristallen aus der Lösung aus. Nach dem Absaugen wird die Mutterlauge mit wäßriger Hydrogencarbonatlösung extrahiert, dieser Extrakt mit der Auflösung des Kristallisats in Hydrogencarbonatlösung vereinigt, *Trichloräthylen* durch kurzes Evakuieren entfernt und die Lösung unter Kühlung mit Salzsäure gegen Kongo angesäuert. Die krist. abgeschiedene *Säure III* wird nach dem Absaugen aus Eisessig oder Alkohol umkristallisiert. Schmp. 196—198° (Zers.), Ausb. 22.8 g.

$\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_3\text{N}$ (129.1) Ber. C 46.51 H 5.47 N 10.85 Gef. C 46.62 H 5.47 N 10.89

N-Phenacetyl-dehydroalanin (IV): Kondensation von 27.3 g *Phenylacetamid* und 53 g *Brenztraubensäure* und Aufarbeitung wie oben liefern 29.5 g Endprodukt vom Schmp. 170° (Zers.), der nach dem Umkristallisieren aus Alkohol auf 184—185° ansteigt.

$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$ (205.2) Ber. C 64.38 H 5.40 N 6.83 Gef. C 64.17 H 5.35 N 6.97

N-Chloracetyl-dehydroalanin (V): 9.4 g *Chloracetamid* und 22 g *Brenztraubensäure* liefern wie oben 4.9 g Rohprodukt, das nach dem Umkristallisieren aus Chloroform bei 162—164° (Zers.) schmilzt.

$\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_3\text{NCl}$ (163.6) Ber. N 8.6 Gef. N 8.14

⁶⁾ Chem. Ber. 88, 1944 [1955]; 89, 2000 [1956].

⁷⁾ J. chem. Soc. [London] 1952, 3317.

⁸⁾ H. R. SNYDER und J. A. MACDONALD, J. Amer. chem. Soc. 77, 1257 [1955].

N-Benzoyl-dehydroalanin (VI): Kondensation von 6.1 g *Benzamid* und 13.2 g *Brenztraubensäure* in 150 ccm *Trichloräthylen* und Aufarbeitung wie oben liefern ein krist. Rohprodukt, das beim Umkristallisieren aus Chlorbenzol 4.5 g Kristalle vom Schmp. 122° (Zers.) ergibt.

$C_{10}H_9O_3$ (191.2) Ber. C 62.82 H 4.81 N 7.27 Gef. C 62.57 H 4.75 N 7.33

N-Acryloyl-dehydroalanin (VII): Zur Darstellung dieser Verbindung wird die Umwälzapparat mit einem Dreihalskolben als Reaktionsgefäß versehen, an dessen freien Öffnungen ein Tropftrichter und ein bis in die Flüssigkeit tauchendes Gaseinleitungsrohr angebracht sind. Die Reaktion wird in Stickstoffatmosphäre durchgeführt. In der Apparatur werden 100 ccm *Trichloräthylen* im Stickstoffstrom zum Sieden gebracht, sodann läßt man durch den Tropftrichter eine warme Lösung von 7 g *Acrylsäureamid* und 17.5 g *Brenztraubensäure* in 50 ccm desselben Lösungsmittels in dem Tempo einlaufen, daß der Lösungsmittelkreislauf nicht unterbrochen wird. Sobald sich an der Kolbenwand eine größere Menge einer Gallerte absetzt, wird die Kondensation beendet und das Lösungsmittel bei 40° i. Vak. abdestilliert. Den Rückstand nimmt man in Wasser auf, schüttelt mehrmals mit Äther aus, wobei schmierige Verunreinigungen durch Filtrieren entfernt werden. Nach dem Abdampfen des Äthers i. Vak. extrahiert man den Rückstand mit Methanol und vertreibt dieses nach dem Filtrieren durch Vakuumdestillation. Der feste Rückstand wird nun mit wenig Chloroform aufgekocht, wobei er zu farblosen Kristallen erstarrt, die abgesaugt und getrocknet werden. Umkristallisieren aus Chlorbenzol und Waschen mit Petroläther. Schmp. 162° (Zers.); Ausb. 3.1 g.

$C_6H_7O_3N$ (141.1) Ber. C 51.06 H 5.0 N 9.93 Gef. C 50.99 H 5.14 N 9.76

Das Präparat polymerisiert sich nach einiger Zeit bei Zimmertemperatur und kann nur im Kühlschrank mehrere Tage aufbewahrt werden. Bei der katalytischen *Hydrierung* in Methanol und einigen Tropfen Eisessig mit PdO-Katalysator geht es in *N-Propionyl-alanin* vom Schmp. 90—91° über.

N-Carbobenzoxy-dehydroalanin (VIII): 7.55 g *Benzylurethan* und 13.2 g *Brenztraubensäure* werden mit 150 ccm *Trichloräthylen* 4 Stdn. in der Kondensationsapparatur gekocht. Dann wird i. Vak. bis fast zur Trockne eingedampft, in Wasser aufgenommen und, um die überschüssige *Brenztraubensäure*, die hier die Kristallisation der Verbindung hindert, zu entfernen, mit gleichen Äthervolumina mehrmals systematisch ausgeschüttelt (Gegenstromprinzip). Die vereinigten Ätherlösungen werden mit Hydrogencarbonatlösung extrahiert, durch kurzes Evakuieren vom Äther befreit und dann unter Kühlung mit Salzsäure angesäuert. Die ausgeschiedenen Kristalle werden aus Chlorbenzol umkristallisiert und mit Petroläther gewaschen. Schmp. 119° (Zers.); Ausb. 5.5 g.

$C_{11}H_{11}O_4N$ (221.2) Ber. C 59.72 H 5.01 N 6.33 Gef. C 59.97 H 5.19 N 6.26

Bei der katalytischen Hydrierung entsteht *Alanin*, das papierchromatographisch identifiziert wurde.

N-Carbobenzoxy-glycyl-dehydroalanin (IX): 1 g *Carbobenzoxy-glycylamid* und 0.9 g *Brenztraubensäure* in 150 ccm *Trichloräthylen* liefern wie bei III 0.63 g eines Rohprodukts, das nach Umkristallisieren aus 70-proz. wäBrigem Methanol bei 187° (Zers.) schmilzt.

$C_{13}H_{14}O_5N_2$ (278.3) Ber. N 10.06 Gef. N 10.23

Bei der katalytischen Hydrierung in 80-proz. Methanol und wenig Eisessig über Pd entsteht papierchromatographisch nachgewiesenes *Glycyl-alanin*.

N-Acetyl-dehydrovalin: 1.2 g *Acetamid* und 4.7 g *Dimethylbrenztraubensäure* werden in 150 ccm *Trichloräthylen* unter Feuchtigkeitsausschluß 12 Stdn. unter Rückfluß und anschließend 3 Stdn. in der Kondensationsapparatur gekocht. Die Aufarbeitung wie oben liefert nach

dem Umkristallisieren des getrockneten Rohprodukts aus wenig Alkohol 1.5 g Kristalle vom Schmp. 198° (Zers.).

$C_7H_{11}O_3N$ (167.2) Ber. C 53.50 H 7.06 N 8.92 Gef. C 53.47 H 7.19 N 8.99

S-[β -Carbomethoxy-äthyl]- β,β -dimethyl-cystein: 3.7 g *Penicillamin-hydrochlorid* werden in einer Aufschlämmung von 3.4 g $NaHCO_3$ in 10 ccm Wasser aufgelöst und mit 1.8 g *Acrylsäure-methylester* sowie einigen Kriställchen Hydrochinon unter Wasserstoff bei Zimmertemperatur auf der Maschine geschüttelt. Nach 3 Stdn. ist die Nitroprussidprobe negativ, und das Produkt hat sich in weißen Blättchen abgeschieden. Aus Wasser erhält man 2.5 g vom Zers.-P. ab 190°.

$C_9H_{17}O_4NS$ (235.3) Ber. C 45.95 H 7.28 N 5.95 Gef. C 45.93 H 7.20 N 5.57

Lactam des S-[β -Carboxy-äthyl]- β,β -dimethyl-cysteins (*X*; *R*, *R* = CH_3): Ein gleicher Ansatz, wie eben beschrieben, wird, nachdem die Nitroprussidprobe negativ geworden ist, mit Essigsäure auf p_H 5.5 gebracht, i. Vak. bei 30° abgedampft und der Rückstand 8 Tage bei 70° im Vakuumtrockenschrank belassen. Das salzhaltige Reaktionsprodukt wird mit absol. Methanol extrahiert, filtriert und die methanol. Lösung i. Vak. abgedampft. Den Rückstand löst man in wenig 2 *n* NaOH und säuert nach dem Abfiltrieren mit Salzsäure an. Dabei scheidet sich die cyclische Säure in Nadeln ab, die aus Äthylencyanhydrin-Wasser umkristallisiert werden. Ninhydrinprobe negativ. Zersetzung bei raschem Erhitzen ab 260°; Ausb. 1.7 g.

$C_8H_{13}O_3NS$ (203.3) Ber. C 47.27 H 6.39 N 6.89 S 15.78
Gef. C 47.65 H 6.48 N 6.78 S 15.45

Aminosäuren aus α -Acylamino-acrylsäure-methylestern

Glutaminsäure: Zu einer Lösung von 0.05 g Na in 5 ccm absol. Methanol gibt man 1.6 g *Malonsäure-diäthylester* und läßt dazu unter Rühren die Lösung von 2.2 g α -*Phenacetamino-acrylsäure-methylester*⁵⁾ innerhalb von 15 Min. zutropfen. Man rührt 1 Stde. bei 30° und beläßt dann über Nacht bei Zimmertemperatur. Nun wird mit einigen Tropfen Eisessig neutralisiert und i. Vak. bei 40° eingengt. Der Rückstand wird mit Wasser durchgeschüttelt, die Emulsion mehrmals mit Äther extrahiert und der Extrakt nach dem Klarfiltrieren vom Lösungsmittel befreit. Dann kocht man zur Hydrolyse 8 Stdn. mit halbkonzentrierter wäßriger Salzsäure unter Rückfluß, kühlt mit Eis und entfernt die nach Stehenlassen über Nacht ausgeschiedene Phenyleisigsäure durch Filtrieren und Ausäthern der Lösung. Diese wird nun i. Vak. zur Trockne eingedampft, neuerlich mit 20 ccm Wasser aufgenommen, wieder verdampft und so noch 2 mal behandelt. Schließlich kocht man kurz mit Tierkohle auf, filtriert und bringt das helle Filtrat (etwa 10 ccm) mit konz. Ammoniak auf p_H 3.2. Beim Versetzen der nötigenfalls weiter eingengten Lösung mit der 20fachen Alkoholmenge kristallisieren 0.7 g *Glutaminsäure* aus. Zur Reinigung wird die rohe Aminosäure in wenig konz. Salzsäure gelöst und die Lösung unter Eiskühlung mit Chlorwasserstoffgas gesättigt. Das farblose *Glutaminsäure-hydrochlorid* wird abgesaugt und mit Aceton und Äther gewaschen. Umkristallisieren aus Salzsäure beträgt die Ausbeute an analysenreiner Substanz 55%.

Das *N*-Dinitrophenylderivat schmilzt in Übereinstimmung mit der Literatur⁹⁾ bei 149–150°.

In analoger Weise läßt sich *Malonester* auch mit α -*Acetylamino-acrylsäure-methylester* umsetzen, den wir aus dem Silbersalz der Säure durch Erhitzen mit Methyljodid in Äther nach 2 Stdn. und Umkristallisieren aus Petroläther mit einem Schmp. von 46–48° in 42% Ausbeute erhielten.

⁹⁾ A. L. LEVY und D. CHUNG, J. Amer. chem. Soc. 77, 2899 [1955].

α -Amino- γ -nitro-isocaprinsäure (XIII)

α -Phenacetamino- γ -nitro-isocaprinsäure-methylester: Zu einem Gemisch von 3.6 g 2-Nitropropan, 2 ccm tert.-Butanol und 1.6 ccm einer 28-proz. alkohol. Triton-B-Lösung fügt man während 15 Min. die Lösung von 4.4 g *α -Phenacetamino-acrylsäure-methylester* in 30ccm Äther-tert.-Butanol (2:1) tropfenweise zu. Man rührt 4 Stdn. bei 30° und läßt dann über Nacht bei Zimmertemperatur stehen. Nach Zugabe von Eisessig bis p_H 6 wird i. Vak. verdampft und der zurückbleibende Sirup mit 50 ccm kaltem Wasser angerieben. Dabei erhält man 5.8 g leicht gelbe Kristalle, die aus 80-proz. wäßrigem Methanol farblos erhalten werden. Schmp. 88—89°.

$C_{15}H_{20}O_5N_2$ (308.3) Ber. C 58.43 H 6.54 N 9.09 Gef. C 58.32 H 6.39 N 9.17

Hydrolyse zur Aminosäure: 3 g des Esters werden mit 30 ccm halbkonz. Salzsäure 16 Stdn. unter Rückfluß gekocht und dann über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die ausgefallene Phenylessigsäure wird abgesaugt und aus der filtrierten Lösung durch Ausäthern entfernt. Dann engt man i. Vak. ein, dampft 3 mal mit Wasser nach und entfärbt schließlich mit Aktivkohle. Beim Abstumpfen der konz. wäßrigen Lösung des Hydrochlorids mit Hydrogencarbonat fallen 1.2 g dünne farblose Kristalle aus. Die durch Umkristallisieren aus heißem Wasser gewonnene reine *Aminosäure XIII* zersetzt sich bei 198—200°. Sie kristallisiert mit 1 Mol. H_2O .

$C_6H_{12}O_4N_2 \cdot H_2O$ (194.2) Ber. C 37.11 H 7.27 N 14.43 Gef. C 37.44 H 7.14 N 14.28

R_F im Lösungsmittel sek.-Butanol: Ameisensäure: Wasser (75:15:10) = 0.50. Ninhydrinreaktion: leuchtend gelb.

α,γ -Diamino-isocaprinsäure (XIV): Einige cg der *Nitrosäure XIII* werden in wäßriger 1 n HCl mit Platinoxyd und Wasserstoff bis zur berechneten Gasaufnahme geschüttelt. Nach dem Filtrieren engt man i. Vak. ein, ohne ein kristallisiertes Produkt zu erhalten. Die Lösung enthält laut Papierchromatogramm nur eine ninhydrin-positive Verbindung vom R_F 0.12 im obigen Lösungsmittel. Bei der Papierelektrophorese wandert sie im neutralen Puffer zur Kathode. Beim Versetzen der konz. neutralen wäßrigen Lösung mit *Natriumpikrat*-Lösung erhält man ein krist. *Pikrat*, das sich bei 147—148° zersetzt. Es enthält 2 Moll. Kristallwasser.

$C_{16}H_{14}O_2N_2 \cdot C_6H_3O_7N_3 \cdot 2 H_2O$ (411.3) Ber. C 35.04 H 5.15 N 17.43

Gef. C 35.67 H 5.62 N 17.14

Isohistidin (XV): 1.7 g Imidazol werden in einer Auflösung von 0.12 g Na in 30 ccm absol. Methanol aufgelöst. Dazu gibt man die Lösung von 2.87 g *α -Acetamino-acrylsäure-methylester* oder die äquivalente Menge der Phenacetylverbindung in 30 ccm absol. Alkohol langsam zu und erhitzt 1 Stde. auf dem Wasserbad zum Sieden. Dann wird i. Vak. verdampft und der Rückstand 8 Stdn. mit 10 ccm halbkonz. Salzsäure gekocht. Das Hydrolysat wird i. Vak. verdampft, 2 mal mit Wasser nachgedampft, in wenig Wasser aufgenommen und mit Aktivkohle entfärbt. Zur Isolierung der basischen Verbindung versetzt man mit 30-proz. Phosphorwolframsäure-Lösung, bis kein Niederschlag mehr ausfällt, filtriert den Niederschlag ab und zerlegt ihn durch Ausschütteln der Aufschlammung in Salzsäure mit Amylalkohol-Äther. Die saure Lösung enthält als einzige ninhydrin-positive Komponente das *Isohistidin*, das sich im Elektropherogramm wie Histidin verhält, aber im Gegensatz zu diesem mit Ninhydrin violette Färbung und mit diazotierter Sulfanilsäure keine Reaktion gibt. Beim Zusatz einer alkohol. Lösung von *Pikrolonsäure* kristallisiert ein gelbes Salz von Zers.-P. 250°.

$C_6H_9O_2N_3 \cdot 2 C_{10}H_8O_5N_4 \cdot 2 H_2O$ (718.6) Ber. C 43.39 H 4.06 N 22.41

Gef. C 43.36 H 4.18 N 23.21