

CHEMISCHE BERICHTE

Fortsetzung der

BERICHTE DER DEUTSCHEN CHEMISCHEN
GESELLSCHAFT

92. Jahrg. Nr. 3

S. 517—754

FRIEDRICH WEYGAND und HELMUT RINNO

N-Trifluoracetyl-aminosäuren, XIII¹⁾

Serin- und Threonin-Verbindungen

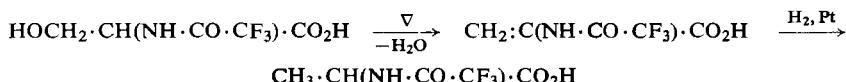
Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Universität Berlin,
Berlin-Charlottenburg

(Eingegangen am 27. Oktober 1958)

Die Trifluoracetylierung von Serin und Threonin wird beschrieben. Aus *N*-TFA-Seryl- und -Threonyl-Verbindungen läßt sich mit alkoholischer Salzsäure der Trifluoracetylrest überraschend leicht abspalten, was zur Synthese von Seryl- und Threonylpeptiden ausgenützt wird.

A. TRIFLUORACETYLIERUNGEN

Bei der Trifluoracetylierung von Serin nach F. WEYGAND und R. GEIGER²⁾ in Trifluoressigsäure mit 1.2 Moll. Trifluoressigsäure-anhydrid wurde nur ein Teil des Produktes ätherlöslich, der Rückstand zeigte noch Ninhydrinreaktion, war also nicht trifluoracetyliert worden. Der ätherlösliche Teil zersetzte sich bei der versuchten Hochvakuumdestillation, wobei 25—35 % *N*-TFA- α -Amino-acrylsäure in krist. Form isoliert wurden. Daß diese vorlag, ging aus der Hydrierung zu *N*-TFA-DL-Alanin hervor.



Wurde hingegen die Trifluoracetylierung in Trifluoressigsäure mit 2.2 Moll. Trifluoressigsäure-anhydrid vorgenommen, so resultierte in guter Ausbeute das krist. *N,O*-Bis-trifluoracetyl-DL-serin, das im Hochvakuum ohne Zersetzung sublimierbar ist. In wäßriger Lösung findet, wie von einem Trifluoressigsäureester zu erwarten ist, schnelle Verseifung zu *N*-TFA-DL-Serin statt. Bei längerem Stehenlassen in Wasser entsteht auch freies Serin, worauf weiter unten noch eingegangen wird.

Wesentlich reineres *N*-TFA-Serin erhält man durch Trifluoracetylierung mit $\text{F}_3\text{C} \cdot \text{CO} \cdot \text{SC}_2\text{H}_5$ ³⁾.

1) XII. Mitteil.: F. WEYGAND und W. STEGLICH, Chem. Ber. 92, 313 [1959].

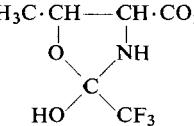
2) Chem. Ber. 89, 647 [1956].

3) E. E. SCHALLENBERG und M. CALVIN, J. Amer. chem. Soc. 77, 2779 [1955].

Die Darstellung der entsprechenden optisch aktiven Serin- und Threoninverbindungen wurde nach den gleichen Methoden vorgenommen. *N,O*-Bis-TFA-L-serin ist kristallin, *N*-TFA-L-Serin ein Sirup (vgl. Tab. 1). Die thermische Beständigkeit der trifluoracetylierten Threoninverbindungen ist größer als die der Serinverbindungen. So konnten bei der Sublimation von *N*-TFA-Threonin nur Spuren von *N*-TFA- α -Amino-crotonsäure nachgewiesen werden.

Die Titration der genannten Trifluoracetylverbindungen mit Lauge bis zur Neutralisation zeigt die erwarteten Ergebnisse: *N,O*-Bis-TFA-serin und *N,O*-Bis-TFA-threonin verbrauchen 1.98 bis 2.03, *N*-TFA-Serin und *N*-TFA-Threonin 0.97 bis 0.99 Mol. NaOH/Mol.

Infrarotspektroskopisch wurde noch geprüft, ob z. B. dem *N*-TFA-Threonin die offene oder die nebenstehende cyclische Struktur zukommt. Da die Amid I- und Amid II-Banden vorhanden sind (1700 und 1550/cm), trifft die cyclische Struktur nicht zu.



B. ABSPALTUNG DES TRIFLUORACETYLRESTES

1. *Alkalisch*. F. S. DAFT und R. D. COGHILL⁴⁾ haben über eine große Empfindlichkeit von L-Serin in alkalischem Medium berichtet. Es war daher zunächst zu prüfen, ob eine alkalische Enttrifluoracetylierung unter Erhaltung der optischen Aktivität überhaupt möglich ist. Dabei ergab sich in Übereinstimmung mit anderen Autoren⁵⁾ eine weit geringere Racemisierungsgeschwindigkeit für L-Serin als angegeben wird. Nach 20stdg. Stehenlassen von L-Serin in 0.3*n* NaOH war noch keine meßbare Änderung der optischen Aktivität feststellbar. Erst nach 65 Stdn. konnte eine Abnahme der optischen Drehung gemessen werden.

Einer Abspaltung des *N*-TFA-Restes aus Serinderivaten durch kurzzeitige Behandlung mit verd. Laugen stand also nichts im Wege. Es wurde papierchromatographisch ermittelt, daß *N*-TFA-Serin wie *N*-TFA-Alanin bei 20° in 0.5*n* NaOH bereits nach 8 Min. praktisch vollständig enttrifluoracetyliert ist. Bei 0° waren unter sonst gleichen Bedingungen noch geringe Mengen *N*-TFA-Verbindungen nachweisbar.

2. *Sauer*. Mehrere Beobachtungen deuten darauf hin, daß der *N*-TFA-Rest von den β -Hydroxy- α -aminosäuren sauer wesentlich leichter abspaltbar ist als von den anderen bisher untersuchten *N*-TFA- α -Aminosäuren.

- Wäßrige Lösungen von *N*-TFA-Serin sind nicht beständig. Nach eintägigem Stehenlassen bei Raumtemperatur ist mit Ninhydrin freies Serin nachweisbar.
- Auf Papierchromatogrammen ist *N*-TFA-Serin ninhydrinnegativ, beim Liegen an der Luft tritt jedoch nach einigen Tagen eine Ninhydrinreaktion ein.
- Beim Versuch, von *N*-TFA-Serin-tritylhydrazid durch kurzes Behandeln mit alkoholischer Salzsäure nur den Tritylrest abzuspalten¹⁾, resultierte Serinhydrazid-dihydrochlorid. In allen anderen bisher untersuchten Fällen blieb unter diesen Bedingungen die *N*-TFA-Gruppierung intakt.

⁴⁾ J. biol. Chemistry 90, 341 [1931].

⁵⁾ I. C. CRAWHALL und D. F. ELLIOT, Biochem. J. 48, 237 [1951].

Die leichte Abspaltbarkeit des Trifluoracetylrestes aus *N*-trifluoracetylierten β -Hydroxy-aminosäurederivaten ist offenbar auf eine primäre $N \rightarrow O$ -Acylwanderung zurückzuführen, die im vorliegenden Fall nicht reversibel ist, da bekanntlich Trifluoressigsäureester in wäßriger Lösung schnell verseift werden und in alkoholischer Lösung Umesterung erleiden⁶⁾.

Es sei in diesem Zusammenhang an die saure Spaltbarkeit von nichtterminal-serinhaltigen Peptiden erinnert, die infolge $N \rightarrow O$ -Acylwanderung zum Auftreten von Serylpeptiden führt⁷⁾.

Die durch die $N \rightarrow O$ -Acylwanderung bedingte leichte Abspaltbarkeit des Trifluoracetylrestes in saurem Medium lässt sich für präparative Zwecke ausnutzen. Zunächst wurde festgestellt, daß *N*-TFA-Serin-methylester, in 1*n* methanol. HCl 25 Min. auf 65° erhitzt, bereits 80 % an Serin-methylester-hydrochlorid liefert. Auch unter so schonenden Bedingungen, wie sie von CHIBNALL und Mitarbb.⁸⁾ zur Veresterung längerkettiger natürlicher Peptide (z. B. Insulin) unter Vermeidung von Peptidspaltungen ausgearbeitet wurden, konnte der *N*-TFA-Rest vom *N*-TFA-Serin bereits abgespalten werden. Bei 50stdg. Aufbewahren der Verbindung in 0,13*n* HCl in Methanol wurden bereits 60 % d. Th. an Serin-methylester-hydrochlorid isoliert. Die Übertragung der Reaktion auf *N*-TFA-Serylpeptidester gelang ebenfalls. Aus *N*-TFA-Seryl-methionin-methylester und *N*-TFA-Seryl-isoleucin-methylester wurden bei kurzem Erwärmen mit alkoholischer Salzsäure in guten Ausbeuten die Peptidester-hydrochloride erhalten. Auch die Abspaltung des *N*- und *O*-Trifluoracetylrestes aus *N,O*-Bis-TFA-threonin-methylester mit methanol. Salzsäure wurde durchgeführt.

C. PEPTIDSYNTHESEN

Die Verwendung von *N,O*-Bis-TFA-serin zu Peptidsynthesen bewährte sich nicht, da z. B. bei der Umsetzung mit einem Aminosäureester mit Dicyclohexylcarbodiimid als Kondensationsmittel auch der *O*-Trifluoracetylrest übertragen wurde. So wurde mit Tyrosin-methylester auch *N*-TFA-Tyrosin-methylester gebildet; außerdem färbten sich die Ansätze dunkel, und es wurden meist nur schmierige Produkte isoliert.

Wurde hingegen *N*-TFA-Serin eingesetzt, so erfolgte die Umsetzung ohne Schwierigkeiten, und auf diese Weise wurden einige *N*-TFA-L-Serylpeptidester gewonnen (vgl. Tab. 1). Als Lösungsmittel dienten Tetrahydrofuran oder Methylenchlorid.

Wegen der leichten Abspaltbarkeit des *N*-TFA-Restes von Seryl- und Threonylverbindungen in saurer Lösung ist die Tritylhydrazid-Methode von WEYGAND und STEGLICH¹⁾ auf die Fälle beschränkt, in denen es nicht erforderlich ist, im Verlaufe der Synthese einen Tritylrest dann abzuspalten, wenn *N*-terminal Serin oder Threonin steht. Für alle anderen Fälle ist die Blockierung der alkoholischen Gruppe unerlässlich. Am geeignetsten hierfür ist die Benzylgruppe, da sie unter den Bedingungen der *N*-TFA- und Tritylhydrazidspaltung nicht hydrolysiert wird. Durch Verwendung

⁶⁾ E. J. BOURNE, C. E. M. TATLOW und J. C. TATLOW, J. chem. Soc. [London] 1950, 1367.

⁷⁾ P. DESNUELLE und Mitarbb., Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 2, 64, 134 [1948].

⁸⁾ A. C. CHIBNALL, J. L. MANGAN und M. W. REES, Biochem. J. 68, 114 [1958].

Tab. 1. Übersicht über die hergestellten Serin- und Threoninverbindungen

Nr.	Verbindung	Ausb. ¹⁾ % d. Th.	Schmp. °C	[α] _D in ° c Lösungsmittel	Optische Drehung r°	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analyse		
							C	H	N
1	<i>N</i> -TFA-DL-Serin	89 (1)				C ₅ H ₆ F ₃ NO ₄ (201.1)			Mol.-Gew. gef. 208
2	<i>N</i> -TFA-L-Serin	(1)		—4.02	22	C ₅ H ₆ F ₃ NO ₄ (201.1)			Mol.-Gew. gef. 208
3	<i>N</i> -TFA-DL-Threonin	71 (1)	121—122			C ₆ H ₈ F ₃ NO ₄ (215.1)	Ber. 33.50 3.75 Gef. 33.24 3.92	6.51 6.45	
4	<i>N,O</i> -Bis-TFA-DL-serin	73 (2)	99			C ₇ H ₅ F ₆ NO ₅ (297.1)	Ber. 28.30 1.70 Gef. 28.40 1.87	4.72 5.06	
5	<i>N,O</i> -Bis-TFA-L-serin	(2)	69—70	+17.5	21	C ₇ H ₅ F ₆ NO ₅ (297.1)			
6	<i>N,O</i> -Bis-TFA-DL-threonin	82 (2)	84			C ₈ H ₇ F ₃ NO ₅ (311.2)	Ber. 30.88 2.27 Gef. 30.94 2.60	4.50 4.66	
7	<i>N,O</i> -Bis-TFA-L-threonin-methylester	51		+29.0	24	C ₉ H ₉ F ₆ NO ₅ (325.2)	Ber. 33.24 2.79 Gef. 33.38 2.87	4.31 4.58	
8	<i>N</i> -TFA-L-Threonin-hydrazid	65 (3)	65	—12.0	24	C ₆ H ₁₀ F ₃ N ₃ O ₃ (229.2)	Ber. 31.44 4.40 Gef. 31.22 4.52	18.35 18.63	
9	<i>N</i> -TFA- <i>O</i> -Benzyl-DL-serin	90 (2)	104			C ₁₂ H ₁₂ F ₃ NO ₄ (291.2)	Ber. 49.53 4.16 Gef. 49.74 4.42	4.81 5.19	
10	<i>N</i> -TFA- <i>O</i> -Benzyl-L-serin	85 (2)	72.5	+49.0	24	C ₁₂ H ₁₂ F ₃ NO ₄ (291.2)	Ber. 49.53 4.16 Gef. 49.48 4.26	4.81 5.03	
11	<i>N</i> -TFA- <i>O</i> - α -Tetrahydro-pyranyl-DL-serin-methylester	65 (4)	83			C ₁₁ H ₁₆ F ₃ NO ₅ (299.3)	Ber. 44.15 5.39 Gef. 43.94 5.43	4.68 4.94	
12	<i>N</i> -TFA- <i>O</i> - α -Tetrahydro-pyranyl-L-threonin-methylester	60 (4)		+15.6	21	C ₁₂ H ₁₈ F ₃ NO ₅ (313.3)	Ber. 46.00 5.79 Gef. 45.71 5.61	4.47 4.72	

13	<i>N</i> -TFA-L-Serin-tritylhydrazid	43 (5)	190, 184 Sintern 184	-25.0	25	2	Tetrahydrofuran	$C_{24}H_{22}F_3N_3O_3$ (457.4)	Ber. 63.02 4.85 Gef. 62.84 4.79	9.19 9.25
14	<i>N</i> -TFA-L-Alanyl-L-serin-methylester ¹⁾	79 (6)	142	-33.5	22	2	Äthanol	$C_9H_{13}F_3N_2O_3$ (286.2)	Ber. 37.77 4.58 Gef. 38.08 4.79	9.79 9.54
15	<i>N</i> -TFA-L-Seryl-L-alanin-methylester	75 (6)	124	-87.4	22	2.5	Wasser	$C_9H_{13}F_3N_2O_3$ (286.2)	Ber. 37.77 4.58 Gef. 37.81 4.75	9.79 9.65
16	<i>N</i> -TFA-L-Seryl-L-phenylalanin-methylester	54 (6)	155	-5.3	24	2	Äthanol	$C_{15}H_{17}F_3N_2O_3$ (362.4)	Ber. 49.71 4.73 Gef. 49.71 4.71	7.73 7.50
17	<i>N</i> -TFA-L-Seryl-L-isoleucin-methylester	99 (6)	flüssig						nicht analysiert	
18	L-Seryl-L-isoleucin	54 (7) ³⁾	210 (Zers.), Sintern 200	-5.2	23	2	Wasser	$C_9H_{18}N_2O_4$ (218.3)	Ber. 49.53 8.31 Gef. 49.48 8.15	12.84 12.90
19	<i>N</i> -TFA-L-Threonyl-L-serin-methylester	55 (8)	152	-44.5	21	2	Wasser	$C_{10}H_{15}F_3N_2O_6$ (316.2)	Ber. 37.98 4.78 Gef. 37.92 4.92	8.86 9.02
20	<i>N</i> -TFA-L-Threonyl-glycine- äthylester	75 (8)	128	-22.3	22	2	Äthanol	$C_{10}H_{15}F_3N_2O_5$ (300.2)	Ber. 40.00 5.04 Gef. 40.10 4.98	9.33 9.51
21	<i>N</i> -TFA-O-Benzyl-DL-seryl-L-tyrosin-tritylhydrazid	79 (9)	134, Sintern 125					$C_{40}H_{37}F_3N_4O_5$ (760.8)	Ber. 67.59 5.25 Gef. 67.46 5.11	7.88 8.03
22	<i>N</i> -TFA-O-Benzyl-DL-seryl-L-tyrosin-hydrazid	50 (10) ⁴⁾	185 (Zers.)					$C_{21}H_{22}F_3N_4O_5$ (468.4)	Ber. 53.85 4.95 Gef. 53.51 4.95	11.96 11.92
23	<i>N</i> -TFA-L-Threonyl-L-seryl-L-isoleucin-methylester	58 (11)	172	+12.4	20	2.5	Äthanol	$C_{16}H_{26}F_3N_3O_7$ (429.4)	Ber. 44.75 6.10 Gef. 44.59 5.85	9.79 9.95
24	<i>N</i> -TFA-L-Threonyl-L-valyl-L-alanin	16.5 (12)	219-221	nicht gemessen				$C_{14}H_{22}F_3N_3O_6$ (385.3)	Ber. 43.64 5.76 Gef. 43.48 5.85	10.91 11.25

¹⁾ Darstellungsweise in Klammern: (1) Mit Trifluorothioessigsäure-S-äthylester, (2) In wasserfreier Trifluoressigsäure mit Trifluoressigsäure-anhydrid, (3) Aus *N*-O-Bis-TFA-L-threonin-methylester + Hydrazin, (4) Aus *N*-TFA- β -Hydrazino- α -aminosäuremethylester + Hydrazin, (5) Aus *N*-TFA- α -Aminosäure + Aminosäureester mittels Dicyclohexylcarbodiimids, (6) Aus *N*-TFA- α -Aminosäure + Aminosäureester mittels Dicyclohexylcarbodiimids, (7) Aus dem *N*-TFA- α -Peptidester mit Bariumhydroxidlösung, (8) Aus *N*-TFA- α -Aminosäure-azid + Aminosäureester, (9) Aus *N*-TFA- α -Aminosäure + Aminosäure- α -tritylhydrazid mittels Dicyclohexylcarbodiimids, (10) Aus dem *N*-TFA- α -Dipeptid-tritylhydrazid mit alkoholischem HCl isoliert, (11) Aus *N*-TFA-L-Threonin-azid + L-Seryl-L-isoleucin-methylester, (12) Aus *N*-TFA-L-Threonin-azid + L-Valyl-L-alanin in Wasser + Triethylamin, als freies Hydrazid isoliert, (13) Aus dem Ronprodukt Nr. 17. ⁴⁾ Es wurde zunächst versucht, das schlecht zu handhabende Hydrazin-hydrochlorid zu isolieren, wodurch sich die Ausb. erniedrigte.

von *O*-Benzyl-serin⁹⁾ oder *O*-Benzyl-threonin ist gleichzeitig die Möglichkeit ausgeschlossen, daß bei der Abspaltung des Tritylrestes mit alkoholischer Salzsäure von einem längeren *N*-TFA-Peptid-tritylhydrazid, das nicht-terminal einen Seryl- oder Threoninrest trägt, durch Acylwanderung ein „*O*-Peptid“ entsteht. Wenn man also die Hydroxylgruppen durch *O*-Benzylie rung schützt, kann die Tritylhydrazid-Methode angewandt werden. Hierbei zeigte es sich noch, daß es manchmal besser ist, nach der Abspaltung des Tritylrestes nicht die Hydrazid-hydrochloride, sondern die freien Hydrazide zu isolieren.

Zur Darstellung von L-Threonylpeptiden wurde der krist. *N,O*-Bis-TFA-threonin-methylester mit 2.5 Moll. wasserfreiem Hydrazin¹⁰⁾ in *N*-TFA-L-Threonin-hydrazid übergeführt, das durch Sublimation im Hochvakuum von gebildetem *N*-TFA-Threonin-methylester und Trifluoracetyl-hydrazin abgetrennt wird. Geringe Mengen ebenfalls gebildetes L-Threonin-hydrazid werden mit einem schwach sauren Ionenaustauscher entfernt¹⁰⁾. Über die Azidmethode wurden einige *N*-TFA-L-Threonyl-aminosäureester hergestellt (vgl. Tab. 1), von denen die Sequenz L-Threonyl-L-seryl-L-isoleucin im Insulin von Schwein und Wal vorkommt¹¹⁾.

Die Umsetzung von *N*-TFA-L-Threonin-azid, in Essigester gelöst, mit L-

9) K. OKAWA und H. TANI, J. chem. Soc. Japan, pure Chem. Sect. [Nippon Kagaku Zasshi] **75**, 1199 [1954]; W. GRASSMANN, E. WÜNSCH, P. DEUFEL und A. ZWICK, Chem. Ber. **91**, 538 [1958].

10) F. WEYGAND und W. SWODENK, Chem. Ber., in Vorbereitung.

11) J. I. HARRIS, F. SANGER und M. A. NAUGHTON, Arch. Biochem. Biophysics **65**, 427 [1956].

Tab. 2. Übersicht über sonstige hergestellte Verbindungen

Nr.	Verbindung	Ausb. ¹⁾ % d.Th.	Schmp. °C	[α] _D in° c	Optische Drehung °	Lösungsmittel	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analyse		
								C	H	N
25	<i>N</i> -TFA-L-Alanin-tritylhydrazid ²⁾	53 (13)	208—209	—48.8	21	2	Tetrahydrofuran	$C_{26}H_{26}F_3N_3O_2S$ (500.5)	Ber. 62.27 5.23 Gef. 62.34 5.21	8.39 8.43
26	<i>N</i> -TFA-L-Methionin-tritylhydrazid	62 (5)	188—189	—13.4	19.5	2.5	Tetrahydrofuran	$C_{30}H_{26}F_3N_3O_3$ (533.3)	Ber. 67.53 4.92 Gef. 67.66 5.27	7.88 7.95
27	<i>N</i> -TFA-L-Tyrosin-tritylhydrazid	51 (5) 53 (13)	141—143, Sintern 125	+8.4 +8.3	20 22	3 7	Tetrahydrofuran	$C_{11}H_{17}F_3N_2O_4$ (298.3)	Ber. 44.29 5.75 Gef. 44.43 5.72	9.39 9.43
28	<i>N</i> -TFA-L-Valyl-L-alanin-methylester	71 (14) 68 (5)	146 151	—48.5 —47.5	21 21	4 4	Tetrahydrofuran	$C_8H_{16}N_2O_3$ (188.2)	Ber. 51.04 8.57 Gef. 51.09 8.45	14.88 14.54
29	L-Valyl-L-alanin	63 (8)	253—254	+7.8	21	2.5	Wasser			

¹⁾ Darstellungsweise in Klammern, (1) bis (12) s. Tab. 1, (13) Aus *N*-TFA-Aminosäure + Tritylhydrazin mittels $POCl_3$, (14) Aus *N*-TFA-Aminosäure + Aminosäureester + Phosphotrichlorid.

²⁾ Die Konstanten stimmen mit der nach der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode hergestellten Verbindung überein¹⁾.

Valyl-L-alanin und 1 Mol. Triäthylamin durch Turbinieren in Wasser führte in nur 16-proz. Ausbeute zu *N*-TFA-L-Threonyl-L-valyl-L-alanin, da hierbei der *N*-TFA-Rest infolge der alkalischen Reaktion des Mediums größtenteils abgespalten wird¹²⁾.

Wir haben ferner untersucht, ob die von T. WIELAND und B. HEINKE¹³⁾ eingeführte Aktivierungsmethode mit Phosphoroxychlorid bei *N*-TFA-Verbindungen anwendbar ist (vgl. Tab. 2). Der nach dieser Methode erhaltene *N*-TFA-L-Valyl-L-alanin-methylester wurde mit einem nach der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode von SHEEHAN hergestellten verglichen. Die Ausbeuten und die optischen Drehungen waren fast gleich. Bei der Darstellung von *N*-TFA-Aminosäure-tritylhydraziden mußte eine kleine Änderung vorgenommen werden, da unsere Verbindungen im Gegensatz zu den Carbobenzoxyverbindungen, an denen die Methode ausgearbeitet wurde, säureempfindlich sind: Zur Zerstörung der nach beendeter Synthese noch vorhandenen Säurechloride der Phosphorsäure mußte entweder gleichzeitig Triäthylamin und Wasser zugesetzt oder mit einem Überschuß an wäßriger Natriumhydrogen-carbonatlösung geschüttelt werden. Trotz dieser Vorsichtsmaßnahmen blieben die Ausbeuten gegenüber den mit Dicyclohexylcarbodiimid erhaltenen zurück. Die Übertragung der POCl_3 -Methode auf die Darstellung von *N*-TFA-Seryl-peptidestern gelang nicht.

In Tab. 1 sind auch zwei *O*- α -Tetrahydropyranyl-Verbindungen von Serin und Threonin verzeichnet, die hergestellt wurden, weil B. ISELIN und R. SCHWYZER¹⁴⁾ mit den entsprechenden Carbobenzoxyverbindungen erfolgreich Peptidsynthesen ausführen konnten.

Herrn Dr. E. WÜNSCH, München, danken wir für die Überlassung von *O*-Benzyl-DL-serin und *O*-Benzyl-L-serin, $[\alpha]_D^{25} : +8.5^\circ$ ($c = 2$, in n HCl).

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. *N*-Trifluoracetyl-DL-serin: 4.9 g *DL*-Serin wurden in 46.6 ccm n NaOH gelöst und mit 9.8 ccm *Trifluorthioessigsäure-Säthylester* (60 % Überschuß) 6 Stdn. geschüttelt. Sodann wurde i. Vak. bis zur beginnenden Kristallisation des Natriumsalzes von *N*-TFA-DL-Serin eingedampft. Nach Versetzen mit 12 ccm 2*n* H_2SO_4 wurde 4 mal mit je 40 ccm Äther ausgeschüttelt und die äther. Lösung mit Natriumsulfat getrocknet. Der beim Verdampfen des Äthers hinterbleibende Sirup wurde zur Entfernung von Trifluoressigsäure einige Tage im Vakuumexsikkator über Kaliumhydroxyd aufbewahrt. Die Verbindung ist sehr gut löslich in Wasser, Äther, Essigester und Äthanol, wenig löslich in Benzol und fast unlöslich in Petroläther. Da sie nicht kristallisierte und auch nicht ohne Zers. destillierbar ist, wurden außer dem Äquiv.-Gewicht keine weiteren analytischen Daten bestimmt.

2. *N*-Trifluoracetyl-L-serin: Darstellung analog 1., kristallisierte bisher ebenfalls nicht.

3. *N*-Trifluoracetyl-DL-threonin: Darstellung analog 1., wobei die Verbindung sofort krist. anfiel. Aus Diisopropyläther + Petroläther farblose Nadeln, Ausb. 71 % d. Th., aus den Mutterlaugen weitere 7 %. Zur Analyse wurde nochmals aus Diisopropyläther + Petroläther umkristallisiert.

4. *N,O*-Bis-trifluoracetyl-DL-serin: 2.10 g *DL*-Serin wurden in 25 ccm wasserfreier *Trifluoressigsäure* auf -15° gekühlt, worauf 6.3 ccm *Trifluoressigsäure-anhydrid* i. Vak. langsam eindestilliert wurden. Nach 2 stdg. Aufbewahren bei Raumtemperatur kristallisierte die

¹²⁾ Die Umsetzung von Carbobenzoxy-aminosäure-aziden auf diese Weise bewährte sich gut (K. HOFMANN, A. JÖHL, A. E. FURLENMEIER und H. KAPPELER, J. Amer. chem. Soc. **79**, 1636 [1957]).

¹³⁾ Liebigs Ann. Chem. **599**, 70 [1956].

¹⁴⁾ Helv. chim. Acta **39**, 57 [1956].

Verbindung beim Einengen i. Vak. meist aus. Aus Benzol (Animpfen!) 5.02 g, nach Sublimation bei 90°/10⁻³ Torr 4.34 g.

5. *N,O-Bis-trifluoracetyl-L-serin*: Darstellung analog 4. Farbloses Öl, Sdp._{0.001} 105–110°, das im Verlaufe von einigen Tagen kristallisierte.

6. *N,O-Bis-trifluoracetyl-DL-threonin*: Darstellung analog 4., farbloses Öl, Sdp._{0.001} 85 bis 90°, innerhalb einiger Tage Kristallisation. Zur Analyse wurde i. Hochvak. sublimiert.

7. *N,O-Bis-trifluoracetyl-L-threonin-methylester*: Aus *N-TFA-L-Threonin-methylester* durch Trifluoracetylierung mit *Trifluoressigsäure-anhydrid*. Umkrist. aus Petroläther.

8. *N-Trifluoracetyl-L-threonin-hydrazid*: 3.1 g (9.5 mMol) *N,O-Bis-TFA-L-threonin-methylester* wurden mit 0.75 ccm (24 mMol) wasserfreiem *Hydrazin* versetzt, wobei schnell Verflüssigung eintrat. Innerhalb der ersten 10 Min. wurde die Temp. unter 35° gehalten (gelegentlich Eiskühlung). Nach 48 stdg. Aufbewahren bei Raumtemperatur wurde nicht umgesetztes *Hydrazin* und das gebildete *Methanol* bei 60° Badtemperatur i. Hochvak. abdestilliert, worauf *N-TFA-L-Threonin-hydrazid* an einen auf 80° erwärmten Finger sublimiert wurde. *Trifluoressigsäure-hydrazid* und *N-TFA-L-Threonin-methylester*, die bei der Reaktion ebenfalls entstehen, wurden in einer eisgekühlten Vorlage aufgefangen.

Das grau gefärbte Sublimationsprodukt wurde zur Entfernung einer geringen Menge *L-Threonin-hydrazid* in 30 ccm 50-proz. Äthanol gelöst, worauf so viel Ionenaustauscher *Amberlite XE 64* (H⁺-Form) eingetragen wurde, daß der pH-Wert auf 6 sank. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert und gut gewaschen. Nach Eindampfen der Lösung i. Vak. wurde erneut an einen auf 80° gehaltenen Finger sublimiert.

9. *N-Trifluoracetyl-O-benzyl-DL-serin*: 2.67 g *O-Benzyl-DL-serin* wurden in *Trifluoressigsäure* mit 2.5 ccm *Trifluoressigsäure-anhydrid* in üblicher Weise trifluoracetyliert. Die Verbindung läßt sich unter geringer Zers. bei 130° (Bad)/10⁻³ Torr destillieren. Zur Analyse wurde aus Benzol + Petroläther umkristallisiert.

10. *N-Trifluoracetyl-O-benzyl-L-serin*: Darstellung analog 9.

11. *N-Trifluoracetyl-O- α -tetrahydropyranyl-DL-serin-methylester*: 3.82 g *N-TFA-DL-Serin-methylester* (aus *DL-Serin-methylester-hydrochlorid* mit *Trifluoressigsäure-methylester* und *Triäthylamin* erhalten) wurden in 5 ccm *Dihydropyran* gelöst, mit 0.2 ccm 2n *HCl* in Essigester versetzt, anschließend kurz auf 40° erwärmt und 3 Stdn. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Durch wiederholtes Ausschütteln mit *Natriumhydrogencarbonatlösung* und Wasser wurden *HCl* und nicht umgesetzter *N-TFA-Serin-methylester* abgetrennt. Nach dem Trocknen und Verdampfen des Äthers hinterblieben 4.22 g schwach gelb gefärbtes Öl, das bald kristallisierte, Schmp. 82°. Nach Umkrist. aus Benzol + Petroläther Ausb. 3.43 g (65 % d. Th.), nach Sublimation bei 80° (Bad)/10⁻³ Torr (ohne Zers.) Schmp. 83°.

12. *N-Trifluoracetyl-O- α -tetrahydropyranyl-L-threonin-methylester*: 1.28 g *N-TFA-L-Threonin-methylester* (aus 1.85 g *N,O-Bis-TFA-L-threonin-methylester* durch Einwirkung von Wasser und Trocknen über *P₂O₅* und *KOH* im Vakuumexsikkator) wurden mit 4.2 ccm *Dihydropyran* und 0.1 ccm 2n *HCl* in Essigester analog 11. umgesetzt. Die Verbindung, die bis jetzt nicht kristallisierte, wurde einer Kurzwegdestillation i. Hochvak. unterworfen.

13. *N-Trifluoracetyl-L-serin-tritylhydrazid*: Aus 10 mMol *N-TFA-L-Serin*, 9 mMol *Tritylhydrazin* und 9 mMol *Dicyclohexylcarbodiimid* in 60 ccm Tetrahydrofuran. Aus Benzol verfilzte Nadelchen.

14. *N-Trifluoracetyl-L-alanyl-L-serin-methylester*: Die Kondensation von *N-TFA-L-Alanin* und *L-Serin-methylester*, der aus dem Hydrochlorid mit *Triäthylamin* in *Methylenchlorid* freigesetzt worden war, wurde mit *Dicyclohexylcarbodiimid* bei –15° und sodann im Eisschrank (4 Tage lang) ausgeführt. Bei der Aufarbeitung war darauf zu achten, daß das

Reaktionsprodukt in Wasser gut löslich ist. Dicyclohexylharnstoff wurde durch Lösen in Äthanol und Fällen mit Wasser abgetrennt, worauf die währ. Lösung i. Vak. eingedampft wurde. Umkrist. wurde aus Essigester + Petroläther und Äthanol + Diisopropyläther (1:1.5 Vol.-Tl.). Die Substanz ist gut löslich in Wasser, Äthanol, Essigester, wenig löslich in Äther, heißem und kaltem Benzol.

15. *N-Trifluoracetyl-L-seryl-L-alanin-methylester*: Darstellung analog 14. Der Reaktionsansatz war nach einigen Stdn. stark gelb bis rotbraun gefärbt. Ausb. 75 % d. Th., Schmp. 123° (aus Wasser), nach nochmaligem Umkrist. aus Wasser Schmp. 124°, grobe Nadeln. Löslichkeitseigenschaften wie unter 14.

16. *N-Trifluoracetyl-L-seryl-L-phenylalanin-methylester*: Darstellung analog 14., weniger in Wasser löslich als 14. Umkrist. wurde aus Essigester + Diisopropyläther (1:4 Vol.-Tl.) und 2 mal aus Toluol, feine verfilzte Nadelchen.

17. *N-Trifluoracetyl-L-seryl-L-isoleucin-methylester*: Darstellung analog 14. Das Produkt kristallisierte nicht und wurde als Rohprodukt (99 % d. Th.) in 18. übergeführt.

18. *L-Seryl-L-isoleucin*: 1.05 g Rohprodukt 17. wurden in 130 ccm 0.25 n Ba(OH)₂ über Nacht stehengelassen, die Ba²⁺-Ionen mit der äquiv. Menge Schwefelsäure ausgefällt und der pH-Wert mit Trifluoressigsäure auf 5 gebracht. Nach Eindampfen i. Vak. wurde 2 mal aus Wasser + Äthanol umkristallisiert.

19. *N-Trifluoracetyl-L-threonyl-L-serin-methylester*: Die Lösung von 1.33 g (5.8 mMol) *N-TFA-L-Threonin-hydrazid* (Nr. 8) in 15 ccm 1.3 n HCl und 0.5 ccm Eisessig wurde bei 0° mit 60 ccm eiskaltem Essigester überschichtet. Unter heftigem Rühren ließ man die Lösung von 442 mg *Natriumnitrit* in 5 ccm Wasser langsam zutropfen. Nach 10 Min. wurde die Essigesterschicht abgetrennt, mit gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Die währ. Phasen wurden 2 mal mit je 50 ccm Essigester ausgeschüttelt. Die vorher bereits benutzte Natriumhydrogencarbonatlösung wurde zum Waschen dieser Essigesterextrakte verwendet, worauf die Essigesterextrakte vereinigt wurden.

1.35 g *L-Serin-methylester-hydrochlorid* (8.7 mMol) wurden fein zerrieben in 20 ccm Essigester suspendiert und mit 1.2 ccm Triäthylamin 45 Min. kräftig gerührt. Anschließend wurde filtriert, auf 0° gekühlt und mit der zuvor vom Trockenmittel abgetrennten Lösung des Azids vereinigt.

Nach 4tägigem Stehenlassen im Eisschrank wurde auf 100 ccm eingeengt und nacheinander mit gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung, 0.5 n HCl und Wasser ausgeschüttelt, die vereinigten währigen Lösungen einmal mit 50 ccm Essigester ausgeschüttelt (weiteres Ausschütteln mit Essigester wäre evtl. ausbeuteverbessernd gewesen). Nach dem Trocknen der Essigesterlösung und Einengen auf 10 ccm konnten mit Petroläther 1.0 g farblose, lange dünne Nadelchen gefällt werden. Zur Analyse wurde 2 mal aus Äthanol + Petroläther umkristallisiert. Die Verbindung ist gut löslich in Wasser, Äthanol, Essigester, wenig in Äther und Benzol, fast unlöslich in Petroläther.

20. *N-Trifluoracetyl-L-threonyl-glycin-äthylester*: Darstellung analog 19. Die Aufarbeitung wurde verbessert, indem zunächst der Essigester i. Vak. vollständig verdampft, der Rückstand in wenig Äthanol aufgenommen und mit 40 ccm Wasser versetzt wurde, worauf die fast klare Lösung durch kleine Säulen von je 10 ccm Ionenaustauscher Dowex 50 X 4 (200 bis 400 mesh/inch, H⁺-Form) und Amberlite XE 58 (OH⁻-Form) filtriert wurde. Der nach dem Eindampfen erhaltene fast farblose Rückstand wurde aus Essigester + Petroläther gefällt, Schmp. 124°, und zur Analyse noch 2 mal aus Äthanol + Petroläther umkristallisiert, Schmp. 128°.

21. *N-Trifluoracetyl-O-benzyl-DL-seryl-L-tyrosin-tritylhydrazid*: 2.95 g (5.5 mMol) *N-TFA-L-Tyrosin-tritylhydrazid* (Nr. 27) wurden in 15 ccm Äthanol gelöst, mit 14 ccm n NaOH ver-

setzt und 30 Min. auf 55° erhitzt. Die Lösung wurde i. Vak. eingeengt, mit 6 ccm *n* HCl (zur Freisetzung der phenolischen Hydroxylgruppe) und etwas Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt und 2mal mit Essigester ausgeschüttelt. Die Kondensation des so erhaltenen *L*-Tyrosin-tritylhydrazids mit *N*-TFA-*O*-Benzyl-*DL*-serin (5.5 mMol) mittels *Dicyclohexylcarbodiimids* (5.5 mMol) erfolgte in üblicher Weise. Nach Umfällen aus Essigester + Petroläther lagen 3.5 g (90 % d. Th.), Schmp. 127° (Sintern ab 120°), nach weiterem Umfällen aus Benzol + Diisopropyläther + Petroläther (1:2:2 Vol.-Tle.) 3.1 g, Schmp. 134° (Sintern ab 125°), vor.

22. *N*-Trifluoracetyl-*O*-benzyl-*DL*-seryl-*L*-tyrosin-hydrazid: Verbindung Nr. 21 wurde in üblicher Weise vom Tritylrest befreit. Das ausgefällte Hydrazid-hydrochlorid war geleetartig, ließ sich schlecht filtrieren und war hygroskopisch. Zur Überführung in das freie Hydrazid wurde es in Wasser + etwas verd. Salzsäure gelöst, worauf zur Entfernung von Verunreinigungen mit Essigester ausgeschüttelt wurde. Daraufhin wurde die wässr. Phase mit festem Natriumhydrogencarbonat bis pH 7–8 versetzt. Hierbei fiel das *Hydrazid* aus. Es wurde mit Essigester ausgeschüttelt und aus wenig Äthanol umkristallisiert.

Die Ausb. wäre sicherlich höher gewesen, wenn nicht zunächst versucht worden wäre, das Hydrazid-hydrochlorid zu isolieren.

23. *N*-Trifluoracetyl-*L*-threonyl-*L*-seryl-*L*-isoleucin-methylester: 2.26 g *L*-Seryl-*L*-isoleucin-methylester-hydrochlorid (8.4 mMol) (erhalten durch 25 min. Erhitzen von *N*-TFA-*L*-Seryl-*L*-isoleucin-methylester in *n* methanol. HCl unter Rückfluß) wurden zur Freisetzung des Esters nach der Methode von G. HILLMANN¹⁵⁾ in 70 ccm Chloroform suspendiert und mit 10 ccm 1.2*n* NH₃ in Chloroform 30 Min. bei 0° gerührt. Da sich das gebildete Ammoniumchlorid nicht abfiltrieren ließ, wurde i. Vak. eingedampft und in 50 ccm Essigester aufgenommen. Da auch nunmehr das Ammoniumchlorid nicht abgetrennt werden konnte, wurde auf 0° gekühlt und mit einer Lösung von 7.5 mMol *N*-TFA-*L*-Threonin-azid in 250 ccm Essigester versetzt. Nach üblicher Aufarbeitung lagen 2.39 g (74.5 % d. Th.) farbloses Tripeptiderivat vor, nach dem Umkrist. aus Essigester + Petroläther 1.87 g, Schmp. 171°, nach weiterem Umkristallisieren Schmp. 172°.

24. *N*-Trifluoracetyl-*L*-threonyl-*L*-valyl-*L*-alanin: Die Lösung von 4.2 mMol *N*-TFA-*L*-Threonin-azid in 250 ccm Essigester wurde bei 0° mit der Lösung von 2.8 mMol *L*-Valyl-*L*-alanin und 2.8 mMol Triäthylamin 3 Tage gerührt. Zusatz von etwas Wasser, Abtrennen der Essigesterphase und 2maliges Ausschütteln mit Essigester schlossen sich an. Die Freisetzung des *N*-TFA-Tripeptids aus der wässr. Lösung und die Abtrennung von freien Peptiden erfolgte mit einer kleinen Säule des Ionenaustauschers Dowex 50X4 (H⁺-Form). Umkristallisiert wurde aus Äthanol + Petroläther.

*Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von *N*-Trifluoracetyl-aminoäure-tritylhydraziden nach der Phosphoroxychlorid-Methode*

10 mMol *N*-TFA-Aminosäure werden zur Lösung von 10 mMol Tritylhydrazin in Tetrahydrofuran gegeben und in Eis/Kochsalz auf –15° abgekühlt. (Das Tritylhydrazin wird vorher aus 10.5 mMol seines Hydrochlorids in Tetrahydrofuran mit Triäthylamin freigesetzt, worauf vom entstandenen Triäthylammoniumchlorid abfiltriert wird). Der kalten Lösung wird unter Rühren eine Suspension von 1.0 ccm Phosphoroxychlorid (11 mMol) und 3.5 ccm Triäthylamin (12 mMol) in 10 ccm Tetrahydrofuran innerhalb von 3 Min. zugefügt. Als bald fällt Triäthylammoniumchlorid aus. Nach 1 Stde. im Kältebad wird zur Zerstörung noch vorhandener Säurechloride der Phosphorsäure gleichzeitig mit 0.5 ccm Wasser und 3.5 ccm Triäthylamin versetzt, anschließend das Lösungsmittel i. Vak. verdampft. Der Rückstand

¹⁵⁾ Z. Naturforsch. 1, 682 [1946].

wird mit 50 ccm Essigester und 20 ccm gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung geschüttelt. Sodann wird die organische Phase nacheinander mit gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung, 0.5 n HCl und Wasser gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Verdampfen des Essigesters wird aus Essigester + Petroläther oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert.

25. *N-Trifluoracetyl-L-alanin-tritylhydrazid*: Nach vorstehender Vorschrift in 47-proz. Ausb. erhalten, Schmp. und Misch-Schmp. 204° (Lit.¹: 204°). Daraus hergestelltes *N-TFA-L-Alanin-hydrazid-hydrochlorid* Schmp. und Misch-Schmp. 187°.

26. *N-Trifluoracetyl-L-methionin-tritylhydrazid*: Aus *N-TFA-L-Methionin*, *Tritylhydrazin* und *Dicyclohexylcarbodimid* in Methylchlorid bei -15°, sodann 4 Tage bei 0°. Umkristallisiert wurde aus Benzol.

28. *N-Trifluoracetyl-L-valyl-L-alanin-methylester*: Aus *N-TFA-L-Valin* und *L-Alanin-methylester* mittels Phosphoroxychlorids bei -15° unter Zusatz von Triäthylamin analog der allgemeinen Vorschrift für die Darstellung von *N-TFA-Aminosäure-tritylhydraziden* mittels Phosphoroxychlorids. Umkristallisation aus Äthanol + Wasser, i. Hochvak. sublimierbar, lange Nadeln. Schmp. 146°.

Die zum Vergleich mittels *Dicyclohexylcarbodiimids* hergestellte Verbindung schmolz bei 151°, Misch-Schmp. beider Verbindungen ohne Erniedrigung.

N-Trifluoracetyl-α-amino-acrylsäure: *N-TFA-DL-Serin* wurde i. Hochvak. im langen Rohr mit Temperaturgefälle auf 100–120° erhitzt. Dabei zersetzte sich der größere Teil zu einer nichtflüchtigen Schmiere. Die *N-TFA-α-Amino-acrylsäure* schlug sich an den kälteren Teilen des Rohres in Form von Rosetten nieder. Ausb. 25–35 % d. Th., Schmp. 124° (aus Benzol).

$C_5H_4F_3NO_3$ (183.1) Ber. C 32.79 H 2.20 N 7.65 Gef. C 32.47 H 2.26 N 7.85

35 mg der Verbindung wurden mit 20 mg Platinoxyd nach Adams in 15 ccm Äthanol 3 Std. mit Wasserstoff geschüttelt. Hochvakumsublimation lieferte 27.6 mg *N-TFA-DL-Alanin*, Schmp. und Misch-Schmp. 120°.

Trifluoressigsäure-hydrazid: Das bei der Darstellung von *N-TFA-L-Threonin-hydrazid* (Nr. 8) anfallende Gemisch von Trifluoressigsäure-hydrazid und *N-TFA-L-Threonin-methylester* wurde wiederholt bei 12–14 Torr im Rohr mit Temperaturgefälle sublimiert. Schmp. 115°, in den meisten organischen Lösungsmitteln schwer löslich, gut löslich in heißem Äthanol und Wasser, sehr gut löslich in verd. Säuren.

$C_2H_3F_3N_2O$ (128.1) Ber. C 18.76 H 2.36 N 21.88 Gef. C 18.79 H 2.40 N 21.70