

FRIEDRICH WEYGAND\*) und ADOLF RÖPSCH

*N*-Trifluoracetyl-aminoäuren, XIV<sup>1)</sup>

## *N*-Trifluoracetylierungen von Aminoäuren und Peptiden mit Trifluoressigsäure-phenylester

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Universität Berlin

(Eingegangen am 17. April 1959)

*Herrn Professor Dr. Dr. h. c. Stefan Goldschmidt zum 70. Geburtstag*

Aminoäuren und Peptide lassen sich durch Erwärmen mit Trifluoressigsäure-phenylester in Phenol, bei günstigen Löslichkeitseigenschaften auch ohne Phenol, in ausgezeichneten Ausbeuten in *N*-Trifluoracetylverbindungen überführen.

Erwärmte man eine Aminoäure, die in geschmolzenem Phenol gelöst oder suspendiert ist, mit Trifluoressigsäure-phenylester auf 120–150°, so findet schnell *N*-Trifluoracetylierung statt. Ist die Aminoäure in warmem Phenol gut löslich, wie z.B. Tryptophan, so kann auch bei niederer Temperatur unter Verlängerung der Reaktionszeit gearbeitet werden. In anderen Fällen, wie beim Alanin, Leucin oder Isoleucin, kann der Phenolzusatz unterbleiben. Sobald die Reaktion eingesetzt hat, wird Phenol frei, und die Aminoäuren gehen schnell in Lösung. Lediglich Cystin konnte bisher auf die neue Weise nicht trifluoracetyliert werden.

Die Aufarbeitung ist sehr einfach (vgl. Versuchsteil), und meist sind die Rohprodukte schon recht rein. Das zeigt sich insbesondere beim *N*-TFA-L-Alanin, das, nach anderen Methoden hergestellt, meist hygroskopisch ist und zunächst i. Vak. vor dem Umkristallisieren sublimiert werden muß. Auf die neue Weise hergestellt, kann es sofort aus Toluol umkristallisiert werden. Auch *N*-TFA-L-Isoleucin wird sofort kristallin erhalten.

Die Trifluoracetylierung mit Trifluoressigsäure-phenylester erfolgt meist ohne Racemisierung. Eine Ausnahme macht anfangs *N*-TFA-Histidin. Auf Grund der Vorstellungen A. NEUBERGERS<sup>2)</sup> über die Racemisierung von Aminoäuren gelingt es jedoch, durch Zusatz einer Base infolge der Ausbildung des doppelten Anions die Racemisierung zu vermeiden. Die optische Aktivität des mit Triäthylaminzusatz hergestellten *N*-TFA-L-Histidins stimmt befriedigend mit einem Produkt überein, das nach der Methode von E. E. SCHALLENBERG und M. CALVIN<sup>3)</sup> mit Trifluor-thioessigsäure-S-äthylester in wäßriger Lösung hergestellt wird.

An Stelle von Phenol können als Lösungsmittel auch Kresole und zweiwertige Phenole, wie Resorcin, verwandt werden, was jedoch keine Vorteile bringt. Mit Resorcin treten Verfärbungen auf, und in *o*-Kresol geht die Reaktion langsamer vor sich.

\*) Neue Anschrift: Organisch-Chemisches Institut der Technischen Hochschule München, München 2.

<sup>1)</sup> XIII. Mitteil.: F. WEYGAND und H. RINNO, Chem. Ber. 92, 517 [1959].

<sup>2)</sup> Advances Protein Chem. 4, 297 [1948]. <sup>3)</sup> J. Amer. chem. Soc. 77, 2779 [1955].

Peptide können mit Trifluoressigsäure-phenylester ebenfalls *N*-trifluoracetyliert werden. Hierbei tritt keine Peptidspaltung auf. Es erwies sich in den untersuchten Fällen als vorteilhaft, einen größeren Überschuß an Trifluoressigsäure-phenylester und weniger Phenol zu nehmen. Die Reaktionsprodukte kristallisieren meist schon beim Abkühlen der Schmelze aus.

Mit Trifluoressigsäure-phenylester kann man unter Zusatz von 1 Äquiv. Lauge in einer größeren Menge Puffer vom  $p_{\text{H}}$  10 Aminosäuren und Peptide auch in wäßrigem Medium *N*-trifluoracetylieren. Die Ausbeuten sind jedoch gegenüber der Reaktion in Phenol geringer, und die Aufarbeitung ist schwieriger. Ebenfalls unvorteilhaft ist die Verwendung von Trifluoressigsäure-cyanmethylester, der in geringer Ausbeute aus Natriumtrifluoracetat und Chloracetonitril darstellbar ist. Er hydrolysiert schnell mit Wasser, und bei der Trifluoracetylierung von Aminosäuren in Phenol werden mit ihm unreine Produkte erhalten, vielleicht durch Zersetzung von Cyanmethylalkohol und Reaktion des entstehenden Formaldehyds mit den Aminosäuren.

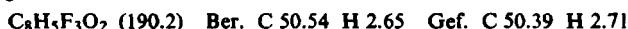
Das neue Verfahren dürfte die bekannten in den meisten Fällen ersetzen. Wie schon erwähnt wurde, versagt es bei Cystin, und bei Asparaginsäure und Glutaminsäure ist es ohne Interesse, da die mit Trifluoressigsäure-anhydrid erhältlichen *N*-trifluoracetylierten inneren Anhydride allein für Peptidsynthesen wertvoll sind.

Es liegt nahe, die vorstehend beschriebene Methode auch zur Herstellung von Peptidbindungen zu verwenden, indem aktivierte Ester von Acylaminosäuren mit Aminosäuren oder Peptiden in Phenol ohne oder mit Basenzusatz erhitzt werden. Über diese und andere ähnliche Versuche soll später berichtet werden. Es sei jetzt schon erwähnt, daß hierbei erhebliche oder vollständige Racemisierung der Acylaminosäure-Komponente eintritt. Im Versuchsteil ist die Herstellung von *N*-TFA-Glycyl-L-leucin aus *N*-TFA-Glycin-phenylester durch Erwärmen mit L-Leucin in Phenol unter Triäthylaminzusatz in 73-proz. Ausbeute beschrieben, ferner die analoge Synthese von *N*-TFA-Glycyl-L-phenylalanin aus *N*-TFA-Thioglycin-S-äthylester und L-Phenylalanin in 65-proz. Ausbeute. Beide Verbindungen wurden mit wäßrigem Ammoniak in die freien Peptide verwandelt.

#### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*Trifluoressigsäure-phenylester:* 110 g (77 ccm) *Trifluoressigsäure-anhydrid* und 47 g *Phenol* wurden in einem mit Rückflußkühler und Calciumchloridrohr versehenen Kolben langsam erwärmt. Als das Phenol geschmolzen war, setzte stürmische Reaktion ein, die nach wenigen Min. beendet war. Es wurde noch  $\frac{1}{2}$  Stde. im Ölbad auf 100° erhitzt. Ausb. nach doppelter Destillation 75.6 g (80 % d. Th.), Sdp. 148–149°,  $d_{22.5}^{25}$  1.269.

Die Verbindung kann in einer Ausb. von 55 % d. Th. auch aus Trifluoressigsäure, Phenol und  $\text{P}_2\text{O}_5$  dargestellt werden.



#### Allgemeine Vorschrift zur *N*-Trifluoracetylierung von Aminosäuren und Peptiden

Erhitzt man die Aminosäure mit der 1.2- bis 2fachen mol. Menge Trifluoressigsäure-phenylester und der 1 bis 4fachen Gewichtsmenge Phenol unter Schütteln oder Röhren auf 120–150°, so löst sie sich innerhalb von 2 bis 20 Min. auf.

Zur Isolierung der *N*-TFA-Aminosäure können das Phenol und der im Überschuß angewandte Trifluoressigsäure-phenylester entweder i. Vak. abdestilliert oder mit viel Petroläther oder Tetrachlorkohlenstoff + Petroläther in Lösung gebracht werden, wobei die *N*-TFA-Aminosäure auskristallisiert. Das Abdestillieren empfiehlt sich bei zu großer Löslichkeit der *N*-TFA-Verbindung im Phenol/Petroläther-Gemisch. Sollte sich eine Probe nicht vollständig in Äther lösen, so war die Trifluoracetylierung noch nicht beendet; man trennt dann die *N*-TFA-Verbindung von nichtumgesetzter Aminosäure durch Behandeln mit Äther ab.

Die Trifluoracetylierung von Peptiden wird analog ausgeführt. Man kann weniger Phenol und mehr Trifluoressigsäure-phenylester nehmen.

### Dargestellte Verbindungen

*N*-Trifluoracetyl-glycin: Ausb. 93 % d. Th., aus Äther + Petroläther, Schmp. 118°, Lit. 4, 5, 3): 116°, 120–121°, 114–116°.

*N*-Trifluoracetyl-DL-alanin: Ausb. 92 % d. Th., Schmp. 120°, Lit. 4, 5, 6): 116.5–117°, 120.5°, 120–121°.

*N*-Trifluoracetyl-L-alanin: Ausb. 84 % d. Th., aus Toluol, Schmp. 65–67°, Lit. 7, 5, 6): 66 bis 68°, 66°, 66–66.5°;  $[\alpha]_D^{25}$ : –60.3° (c = 2, in Wasser) wie Lit. 7, 5, 6).

*N*-Trifluoracetyl-L-phenylalanin: Ausb. 84 % d. Th., aus Toluol, Schmp. 120–121°, Lit. 3, 9): 119–120.6°, 120–122°;  $[\alpha]_D^{25}$ : +17.2° (c = 2, in Alkohol).

*N*-Trifluoracetyl-L-valin: Überschüssiger Trifluoressigsäure-phenylester und Phenol wurden i. Vak. abdestilliert. Ausb. 94 % d. Th., aus Toluol, Schmp. 86–87°, Lit. 8, 6): 86–88°, 86–87°;  $[\alpha]_D^{25}$ : –16.0° (in Wasser), Lit. 8, 6): –15.2° (c = 2, in Wasser), –15.1° (c = 1.7, in Wasser).

*N*-Trifluoracetyl-L-isoleucin: 1.32 g *L*-Isoleucin gingen durch Erhitzen mit 2.3 g Trifluoressigsäure-phenylester auf 135–140° innerhalb von 5 Min. in Lösung. Man hielt noch 2 Min. bei dieser Temperatur, kühlte und destillierte i. Vak. Phenol und Trifluoressigsäure-phenylester ab. Nach zweimaligem Nachdestillieren von Toluol war der Phenolgeruch verschwunden. Der Rückstand kristallisierte beim Anreiben mit ca. 30 ccm Petroläther. Lösungsmittel wurde zäh festgehalten. Daher wurde unter  $10^{-3}$  Torr sublimiert, Badtemp. 80°. Das Sublimat löste sich nicht klar in Äther. Nach Abfiltrieren eines geringen Rückstandes wurde der Äther verdampft, wobei die Verbindung in feinen Nadeln kristallisierte. Ausb. 2.16 g (95 % d. Th.), Schmp. 65–67° (Sintern);  $[\alpha]_D^{20}$ : +3.3° (c = 4, in Alkohol).

$C_8H_{12}F_3NO_3$  (227.2) Ber. C 42.29 H 5.32 N 6.17 Gef. C 42.23 H 5.26 N 6.32

Eine Probe wurde durch einstündiges Stehenlassen in halbkonz. Ammoniak bei Raumtemperatur enttrifluoracetyliert. Nach dem Eindampfen i. Vak. wurde der feste Rückstand mit warmem Alkohol, in dem Ammoniumtrifluoracetat löslich ist, behandelt. Das so gewonnene freie *L*-Isoleucin zeigte folgenden Drehwert  $[\alpha]_D^{25}$ : +11.9° (c = 2, in Wasser), das ursprünglich eingesetzte *L*-Isoleucin  $[\alpha]_D^{25}$ : +11.6° (c = 2, in Wasser).

*N*-Trifluoracetyl-L-tryptophan: Die Trifluoracetylierung wurde bei 70–80° innerhalb von 11/4 Stdn. vorgenommen, wobei sie noch nicht beendet war. L-Tryptophan (28%) wurde mit Äther abgetrennt. Ausb. 94 % d. Th. nach Abzug des nicht umgesetzten Anteils. Schmp. 160°, Lit. 3, 6): 162–164°, 162–163°;  $[\alpha]_D^{25}$ : +1.8° (c = 2, in Alkohol).

4) F. WEYGAND und E. CSENDES, Angew. Chem. 64, 136 [1952].

5) F. WEYGAND und E. LEISING, Chem. Ber. 87, 248 [1954].

6) F. WEYGAND und R. GEIGER, Chem. Ber. 89, 647 [1956].

7) W. S. FONES, J. org. Chemistry 17, 1661 [1952].

8) W. S. FONES und M. LEE, J. biol. Chemistry 210, 227 [1954].

In der Lit. ist kein Drehwert angegeben. Durch Umkristallisieren erhöhen sich Schmp. und Drehung nicht. Eine Probe wurde mit halbkonz. Ammoniak enttrifluoracetyliert: L-Tryptophan,  $[\alpha]_D^{25} : -31.7^\circ$  ( $c = 1$ , in Wasser), wie Lit.<sup>9)</sup>.

*N-Trifluoracetyl-L-histidin:* 0.77 g *L-Histidin*, 1.43 g *Trifluoressigsäure-phenylester*, 1.5 g Phenol und 0.51 g Triäthylamin wurden 15 Min. auf 130–140° erhitzt. Beim Verdünnen mit Essigester fiel das *N-TFA-L-Histidin-triäthylammoniumsalz* aus, das mit dem Ionenaustauscher Amberlite XE 64 von Triäthylamin befreit wurde. Ausb. 65% d. Th., Schmp. 207 bis 208°,  $[\alpha]_D^{25} : +21.7^\circ$  ( $c = 2$ , in Wasser). Das mit Trifluor-thioessigsäure-S-äthylester hergestellte Präparat zeigte  $[\alpha]_D^{25,7} : +22.7^\circ$  ( $c = 1.5$ , in Wasser)<sup>10)</sup>.

*N-Trifluoracetyl-triglycin:* Kurze Zeit, nachdem das Peptid bei 150° in Lösung gegangen war, begann die *N-TFA*-Verbindung auszukristallisieren. Ausb. 90%, Rohprodukt Schmp. 225–228° (Zers.), Lit.<sup>11)</sup>: 233–235°.

$R_f$  0.74 in Phenol/Wasser (80:20 Vol.) aufsteigend. Die Verbindung enthielt noch eine Spur freies Triglycin, aber kein Glycin oder Glycyl-glycin.

*N-Trifluoracetyl-DL-alanyl-glycin:* 0.67 g *DL-Alanyl-glycin*, 1.7 g *Trifluoressigsäure-phenylester* und 0.5 g Phenol wurden auf 140° erwärmt. Nach 3 Min. war das Peptid in Lösung gegangen. Nach einer weiteren Min. wurde abgekühlt und mit Äther/Petroläther versetzt, wobei sich das *N-TFA*-Peptid ausschied. Ausb. 1.1 g (98% d. Th.) an Rohprodukt, nach Sublimation unter 10<sup>-3</sup> Torr. 1.02 g (91% d. Th.), Schmp. 117–118°.

$C_7H_9F_3N_2O_4$  (242.2) Ber. C 34.73 H 3.75 N 11.57 Gef. C 35.15 H 3.91 N 11.85

*N-Trifluoracetyl-glycyl-L-leucin:* Mit Tetrachlorkohlenstoff + Petroläther gefällt. Ausb. 94% d. Th., Schmp. 185–186°;  $[\alpha]_D^{25} : -24.1^\circ$  ( $c = 2$ , in Alkohol).

$C_{10}H_{15}F_3N_2O_4$  (282.2) Ber. C 42.23 H 5.32 N 9.85 Gef. C 42.56 H 5.56 N 10.01

### Peptidsynthesen mit aktivierten Estern in Phenol

*N-Trifluoracetyl-glycin-phenylester:* 3.0 g *N-TFA-Glycin* wurden mit 6.7 g Thionylchlorid in Benzol 2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abdampfen von Thionylchlorid und Benzol i. Vak. wurde in Benzol gelöst und mit 3.3 g *Phenol* 6 Stdn. zum Sieden erhitzt und das Lösungsmittel abdestilliert. Aus 400 ccm Wasser umkristallisiert, 3.36 g (77% d. Th.), Schmp. 110–111°.

$C_{10}H_8F_3NO_3$  (247.2) Ber. C 48.70 H 3.27 F 19.46 N 5.68  
Gef. C 48.52 H 3.42 F 18.27 N 5.70

Der Ester wird bei Raumtemperatur durch 2n NaOH innerhalb weniger Minuten, durch wäßrige Natriumhydrogencarbonatlösung innerhalb mehrerer Tage verseift. Kochendes Wasser greift ihn nicht an. Auch bei viertelstündigem Erhitzen in Phenol auf 180° ist er beständig.

*N-Trifluoracetyl-glycyl-L-leucin:* 701 mg *N-TFA-Glycin-phenylester* und 370 mg *L-Leucin* wurden in 2 g Phenol und 288 mg (0.39 ccm) Triäthylamin 20 Min. auf 150° erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit Essigester verdünnt und das *N-TFA*-Dipeptid mit gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung ausgezogen. Beim vorsichtigen Ansäuern mit konz. Salzsäure schieden sich schöne Kristalle ab, die in Essigester aufgenommen wurden. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat und Verdampfen des Essigesters wurde aus Wasser umkristallisiert. Ausb. 585 mg (73% d. Th.), Schmp. 185–186°;  $[\alpha]_D^{25} : -23.7^\circ$  ( $c = 2$ , in Alkohol).

<sup>9)</sup> M. S. DUNN und M. P. STODDARD in *Handbook of Chemistry and Physics*, 31. Auflage, Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland 1955–1956.

<sup>10)</sup> Nach Versuchen von W. STEGLICH in diesem Institut.

<sup>11)</sup> F. WEYGAND und W. SWODENK, *Chem. Ber.* **90**, 639 [1957].

*Glycyl-L-leucin:* 1.0 g des nach voranstehender Vorschrift hergestellten *N-TFA-Glycyl-L-leucins* wurde 35 Min. in 10 ccm halbkonz. Ammoniak stehen gelassen. Die Lösung wurde noch kurz auf 85° erwärmt. Nach dem Einengen zur Trockne i. Vak. wurde zweimal mit warmem Alkohol zur Entfernung von Ammoniumtrifluoracetat behandelt. Ausb. 578 mg (90% d. Th.), Schmp. 233–235°;  $[\alpha]_D^{25} = -36.0^\circ$  ( $c = 2$ , in Wasser), wie Lit.<sup>12)</sup>.

*N-Trifluoracetyl-glycyl-L-phenylalanin:* 774 mg *N-Trifluoracetyl-thioglycin-S-äthylester* (Schmp. 60–61°, aus *N-TFA-Glycin* und Äthylmercaptan mit Dicyclohexylcarbodiimid in 18-proz. Ausb. erhalten), 571 mg *L-Phenylalanin*, 3 g Phenol und 0.48 ccm Triäthylamin wurden 10 Min. auf 120° und sodann noch 5 Min. auf 140° erhitzt. Die Aufarbeitung erfolgte wie beim *N-TFA-Glycyl-L-leucin*. Aus Wasser und beim Einengen der Mutterlauge 718 mg (65% d. Th.), Schmp. 183–184°;  $[\alpha]_D^{25} = +41.6^\circ$  ( $c = 2$ , in Alkohol).

*Glycyl-L-phenylalanin:* 500 mg *N-TFA-Glycyl-L-phenylalanin* wurden 10 Min. in halbkonz. Ammoniak stehen gelassen. Nach kurzem Erwärmen auf 70° wurde i. Vak. eingedampft. Nach dem Behandeln mit warmem Alkohol zur Entfernung von Ammoniumtrifluoracetat und Waschen mit Alkohol 333 mg (95% d. Th.), Schmp. 257–258°;  $[\alpha]_D^{25} = +41.1^\circ$  ( $c = 2$ , in Wasser), wie Lit.<sup>13)</sup>.

<sup>12)</sup> E. FISCHER und J. STEINGROEVER, Liebigs Ann. Chem. 365, 167 [1909]; F. H. CARPENTER und D. T. GISH, J. Amer. chem. Soc. 74, 3818 [1952].

<sup>13)</sup> J. P. GREENSTEIN und Mitarbb., J. biol. Chemistry 198, 507 [1952]; E. FISCHER und W. SCHOELLER, Liebigs Ann. Chem. 357, 21 [1907]; D. BEN-Ishai, J. org. Chemistry 19, 65 [1954]; L. ZERVAS und D. THEODOROUPOULOS, J. Amer. chem. Soc. 78, 1359 [1956].

## FRIEDRICH WEYGAND \*) und ROLF GEIGER

### *N-Trifluoracetyl-aminoäuren, XV<sup>1)</sup>*

#### Trennung von Aminoäuren durch fraktionierte Destillation ihrer *N-Trifluoracetyl-methylester* \*\*)

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Universität Berlin

(Eingegangen am 17. April 1959)

*Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Stefan Goldschmidt zum 70. Geburtstag*

Zur Isolierung von Aminoäuren in präparativem Maßstab aus Proteinhydrolysaten sind die *N-TFA-Aminoäure-methylester* gut geeignet. Sie werden durch fraktionierte Destillation i. Vak. getrennt und sind leicht in die freien Aminoäuren, die Carbobenzoxyderivate oder in Aminoäureester zu verwandeln.

Frühere Versuche haben gezeigt, daß *N-TFA-Aminoäuren* von *N-TFA-Dipeptiden* durch Sublimation im Hochvakuum getrennt werden können<sup>2)</sup>. Geht man zu

\*) Neue Anschrift: Organisch-Chemisches Institut der Technischen Hochschule München, München 2.      \*\*) Dtsch. Bundes-Pat. Nr. 1051273.

<sup>1)</sup> XIV. Mitteil.: F. WEYGAND und A. RÖPSCH, Chem. Ber. 92, 2095 [1959], vorstehend.

<sup>2)</sup> F. WEIGAND, R. GEIGER und W. SWODENK, Angew. Chem. 68, 307 [1956].