

HELMUT ZAHN und WALTER PÄTZOLD *)

Synthese von α,ω -Oligamiden aus L-Glutaminsäure und L-Lysin **) *)**

Aus dem Deutschen Wollforschungsinstitut an der Technischen Hochschule Aachen
(Eingegangen am 8. Dezember 1962)

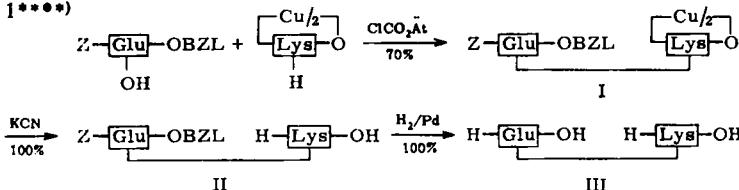
Einige Oligamide des Nylon-5,5-Typs mit abwechselnd einer freien Carboxyl- bzw. Aminogruppe je Monomereinheit wurden nach den Methoden der Peptidchemie aus Glutaminsäure- und Lysinderivaten synthetisiert. Weiter wurden Polykondensationsversuche mit Derivaten dieser beiden Aminosäuren unternommen. Die Zersetzungsreaktionen beim Kochen in wäßriger Lösung sowie das Verhalten gegenüber salpetriger Säure wurden untersucht.

Synthetische Polyamidfasern besitzen im Gegensatz zu Wolle und Seide keine polaren Seitengruppen. Dieser Mangel äußert sich in einem geringen Bindevermögen für Wasser und saure oder basische Farbstoffe. Ein α,ω -Polyamid aus Glutaminsäure und Lysin entspräche in seinem Aufbau dem Nylon-5,5-Typ mit frei verfügbaren Carboxyl- (von Lysin) und Aminoseitengruppen (von der Glutaminsäure). Daraus hergestellte Fasern sollten in den genannten Eigenschaften der Wolle und Seide näherkommen.

SYNTHESEN

Einen Überblick über die durchgeführten Synthesen vermitteln die schematischen Darstellungen:

Schema 1****)



Schema 1. — Für die selektive Amidverknüpfung der ϵ -Aminogruppe des Lysins erwies sich die Verwendung des Kupferkomplexes nach D. THEODOROPOULOS¹⁾ als

*) Teil der Dissertation, W. PÄTZOLD, Techn. Hochschule Aachen 1961.

**) XXXV. Mitteil. über Peptide, XXXIV. Mitteil. vgl. E. SCHNABEL, Liebigs Ann. Chem., im Druck.

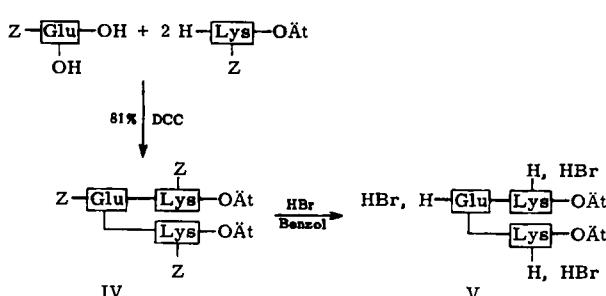
***) Die Synthesen wurden ausschließlich mit L-Aminosäuren durchgeführt. Die nähere Kennzeichnung der Konfiguration wird daher weggelassen.

****) Abkürzungen: Z = Carbobenzoxy-, BZL = Benzyl-, Ät = Äthyl-, DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, DCH = Dicyclohexylbarnstoff, NP = p-Nitrophenyl-, TFA = Trifluoracetyl-, THF = Tetrahydrofuran, TÄA = Triäethylamin, MeCN = Acetonitril, MeOH = Methanol, DMF = Dimethylformamid.

1) J. org. Chemistry 23, 140 [1958].

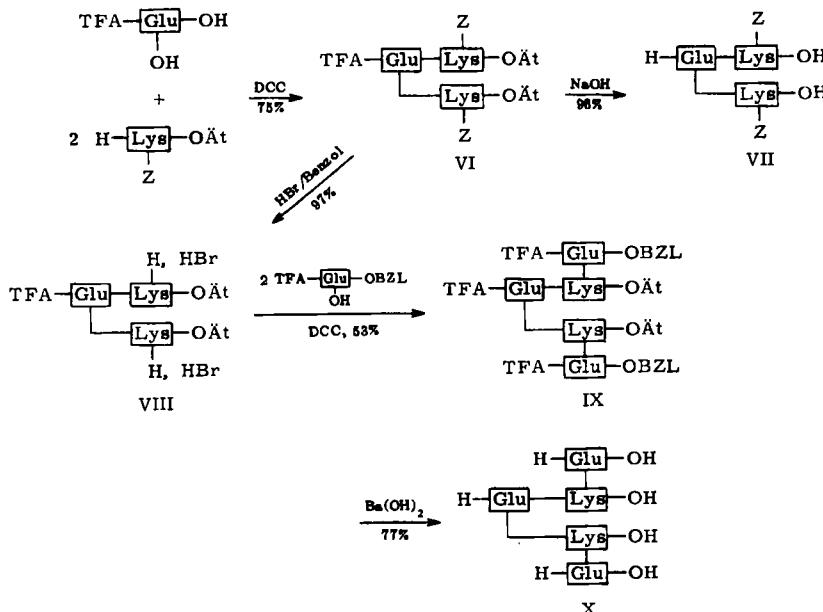
vorteilhaft. Die quantitative Entfernung der Cu^{2+} -Ionen gelang besser mit Kaliumcyanid in 20-proz. Essigsäure als durch Ausfällung mit Schwefelwasserstoff; die H_2S -Methode führte zu Schwierigkeiten bei der späteren katalytischen Hydrogenolyse der Z-Gruppen.

Schema 2



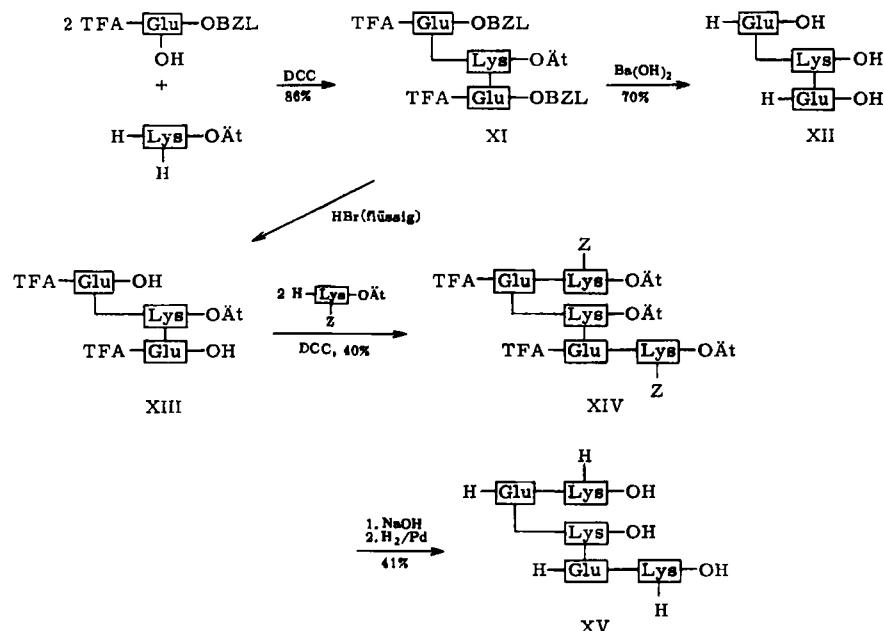
Schema 2. — Die katalytische Hydrogenolyse der Z-Gruppen von IV ergab schwer trennbare Gemische, ebenso die Behandlung von IV mit HBr/Eisessig. Zu einem chromatographisch einheitlichen Produkt führte die modifizierte Spaltung mit HBr in Benzol nach E. R. BLOUT und M. IDELSON²⁾. Sowohl das Peptidhydrobromid als auch das daraus mittels eines Ionenaustauschers (IRA 400) erhaltene freie Peptid sind hygroskopisch. Die freie Base färbt sich an der Luft braun. Gut zu handhaben ist das Tri-Reineckat.

Schema 3



²⁾ J. Amer. chem. Soc. 80, 4909 [1958].

Schema 3. — Die kombinierte Anwendung der TFA- und der Z-Gruppe ermöglichte den schrittweisen Aufbau des geschützten Pentapeptids IX. Die Synthese von VI gelang besser nach dem DCC- als nach dem *p*-Nitrophenylesterverfahren, weil die Entfernung des *p*-Nitrophenols nach der Reaktion wegen der Alkaliempfindlichkeit der TFA-Gruppe durch verlustreiches Umkristallisieren erfolgen mußte. Die Z-Gruppen von VI wurden wieder mit HBr/Benzol abgespalten und das erhaltene Hydrobromid (VIII) zur Charakterisierung in das Di-Reineckat übergeführt. Aus VIII wurde nach dem DCC-Verfahren IX gebildet. Aus IX erhielten wir dann durch Alkalibehandlung X in einem Schritt. X ist leicht löslich in Wasser, schwer löslich dagegen in organischen Lösungsmitteln. Um eine aufwendige Abtrennung von anorganischen Salzen zu umgehen, verseiften wir mit Ba(OH)₂ und fällten die Ba²⁺-Ionen durch eine äquivalente Menge H₂SO₄ aus.

Schema 4

Schema 4. — Die selektive Abspaltung der Benzylgruppen von XI gelang am besten mit flüssigem Bromwasserstoff. In Benzol/HBr ist die Löslichkeit von XI zu gering. Die Umsetzung von XIII mit 33 % Überschuß *N*^ε-Z-Lysin-äthylester nach dem DCC-Verfahren ergab nur 40% XIV; daneben entstand eine stark gefärbte Verbindung, die an einer Aluminiumoxydsäule abgetrennt wurde. Anschließend wurden die Schutzgruppen nacheinander mit NaOH und durch katalytische Hydrierung abgespalten. Die Aminosäurezusammensetzung des freien Pentapeptids XV wurde nach Totalhydrolyse, papierchromatographischer Trennung und Umsetzung mit Ninhydrin

durch colorimetrische Bestimmung der Cadmium-Komplexe³⁾ bestimmt. Wir fanden Glutaminsäure : Lysin = 2 : 2.8 (ber. 2 : 3).

POLYKONDENSATIONSVERSUCHE

Bei der Umsetzung von Carbobenzoxy-glutaminsäure-bis-[*p*-nitro-phenylester] mit Lysin-äthylester in DMF entstand ein hochmolekulares Produkt, das nach der Reinigung bei 145–160° unter Sintern schmolz. Die Endgruppenbestimmung *) ergab ein mittleres Molekulargewicht von 3000. Aus diesem Produkt wurden durch Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln nacheinander folgende Fraktionen erhalten:

Tab. 1.

Extraktionsmittel	Anteil in %	\overline{M}_n	Schmp. °C
heißes Wasser	27	1100	120–140 (Sintern)
Aceton	30	2900	130–135 (Sintern)
Äthanol	22	3700	135–138 (Sintern)
Chloroform	5	4300	135–140 (Sintern)
Dimethylformamid	5	5500	135–145 (Sintern)
	89		

AUTOLYSEREAKTIONEN

Nach YOUNG und Mitarbb.^{4–6)} werden γ -Glutamyldipeptide beim Kochen der wäßrigen Lösungen unter Bildung von Pyrrolidoncarbonsäure gespalten. α -Glutamyl-dipeptide bilden zunächst Pyrrolidoncarbonylpeptide, die dann vielfach unter Freisetzung von Pyrrolidoncarbonsäure hydrolysiert werden. Wir unterwarfen die vorstehend beschriebenen Verbindungen VII, X, XII und XV der Autolyse, indem wir sie mehrere Stunden in 1-proz. wäßriger Lösung kochten. In bestimmten Zeitabständen wurden aliquote Anteile chromatographisch bzw. elektrophoretisch untersucht. Die Mengenverhältnisse der auftretenden Substanzen wurden aus der Intensität der Flecken nach Anfärbung mit Ninhydrin und Überführung in den Kupferkomplex bzw. Entwicklung nach dem Chlorverfahren⁷⁾ abgeschätzt. Die Ergebnisse der chromatographischen Untersuchung sind in der Tab. 2 zusammengefaßt. Nicht identifizierte Produkte sind mit einem (?) versehen. Ihre Identität wird gegenwärtig durch Vergleich mit synthetischen Verbindungen untersucht.

*) Die Aminogruppen wurden potentiometrisch in 90-proz. Phenol mit *n*/25 HCl, die Carboxylgruppen konduktometrisch in Benzylalkohol mit *n*/25 KOH titriert. Der Zahlenmittelwert des Molekulargewichtes läßt sich dann nach folgender Formel errechnen:

$$\overline{M} = \frac{2 \cdot \text{Einwaage}}{\text{Endgruppen}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{mVal}} \right].$$

³⁾ J. HEILMANN, J. BARROLIER und E. WATZKE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **309**, 219 [1957].

⁴⁾ W. J. LE QUESNE und G. T. YOUNG, J. chem. Soc. [London] **1950**, 1959.

⁵⁾ W. J. LE QUESNE und G. T. YOUNG, J. chem. Soc. [London] **1952**, 594.

⁶⁾ D. A. ROWLANDS und G. T. YOUNG, J. chem. Soc. [London] **1952**, 3937.

⁷⁾ H. ZAHN und E. REXROTH, Z. analyt. Chem. **148**, 181 [1955].

Tab. 2. Chromatographische Verfolgung der Autolyse

Ausgangs-verbind.	0	5	10	Stdn. 20	30	45	60	Produkte
VII	+++ -	-- +++	- +++	- ++	- ++	- +	- +	Ausgangsverbindung ninhydrinnegatives, chlorposit. Zwischen- produkt mit R_F (SBA) = 0.9
	-	-	+	++	++	+++	+++	$\text{H}-\overset{\text{Z}}{\underset{\text{Lys}}{\text{OH}}}$
X	+++ -	+	- ++	- +	- +	- -	- -	Ausgangsverbindung $N\epsilon$ -[γ -Glutamyl]- lysin (?)
	-	+++ +	++ +	++ +	++ ++	+++ ++	+++ +	Pyrrolidoncarbonsäure R_F (Phenol) = 0.26
XII	-	+	+	++	++	+++	+++	$N\alpha$ -[Pyrrolidon- carbonyl]- $N\epsilon$ -[α -gluta- myl]-lysin (?)
	-	+	-	+	+	++	+	$N\alpha$ -[Pyrrolidon- carbonyl]-lysin (?)
XV	+++ -	++ +++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	Ausgangsverbindung $N\epsilon$ -[γ -Glutamyl]-lysin
	-	-	+	+	+	++	++	Pyrrolidoncarbonsäure Lysin
	+++ -	+	-	-	-	-	-	Ausgangsverbindung $N\alpha$, $N\epsilon$ -[α , γ -Gluta- myl]-bis-lysin (?)
	-	+++ +	++ +	+	-	-	-	R_F (Phenol) = 0.4
	-	+	+	++	++	+	++	$N\alpha$ -[Pyrrolidon- carbonyl]-lysin (?)
	-	+	+	++	++	+++	+++	Lysin

+++ stark, ++ mittel, + schwach.

VERHALTEN GEGENÜBER SALPETRIGER SÄURE

Bei der Bestimmung des Aminostickstoffs nach VAN SLYKE an Glutaminsäure- γ -amiden und Glutaminsäure- γ -peptiden kann unter bestimmten Voraussetzungen der γ -Amid-Stickstoff mit erfaßt werden.

Diese Beobachtung machte N. LICHTENSTEIN⁸⁾ am Glutaminsäure- γ -methylamid und - γ -äthylamid. Auch H. SACHS und E. BRAND⁹⁾ fanden, daß bei Glutaminsäure- γ -methylamid, - γ -äthylamid und bei Glutamin ca. 90 % des Gesamtstickstoffs bei der Bestimmung des Aminostickstoffs gefunden werden.

LICHTENSTEIN hatte schon die Bildung von α -Hydroxy-glutarsäure- γ -lacton bei der Reaktion von Glutaminsäure- γ -amid mit salpetriger Säure vermutet. SACHS und BRAND konnten diese Beobachtung bestätigen und durch colorimetrische Bestimmung des gebildeten Lactons mit Hydroxylamin nach S. HESTRIN¹⁰⁾ einen Zusammenhang zwischen den gefundenen Stickstoffwerten und der Menge des gebildeten γ -Lactons

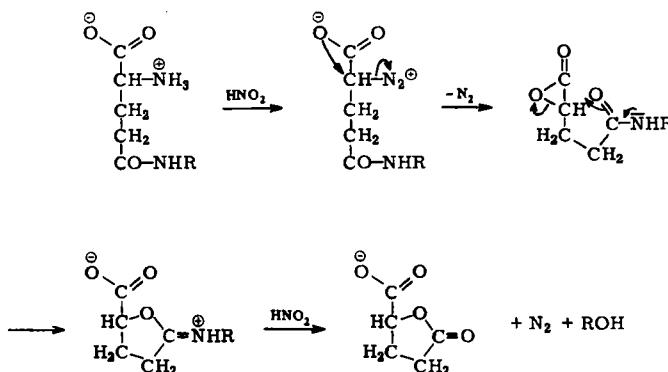
8) J. Amer. chem. Soc. 64, 1021 [1942].

9) J. Amer. chem. Soc. 76, 3601 [1954].

10) J. biol. Chemistry 180, 249 [1949].

aufzeigen. Durch diese Relation konnten die Autoren den von ihnen vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus wahrscheinlich machen.

Dieser Mechanismus fordert für die Erfassung des γ -Amid-Stickstoffs das Vorhandensein der freien α -Carboxy- und der freie Aminogruppe des Glutamylrestes.



Wir haben van Slyke-Bestimmungen an allen von uns dargestellten freien und einigen geschützten Peptiden durchgeführt. In allen Fällen fanden wir dabei, daß der γ -Carbonamidstickstoff nur erfaßt wird, wenn die α -Carboxylgruppe des γ -Glutamylrestes frei vorliegt; die α -Aminogruppe des Glutamylrestes liegt in unseren Peptiden immer frei vor. Unter Berücksichtigung dieser Bedingung entsprechen die gefundenen Werte bei allen Peptiden der Berechnung (vgl. Tab. 3).

Tab. 3. Reaktion einiger Peptide mit salpetriger Säure

	Verbindung	N gesamt (Mol)	γ -Amid gesamt (Mol)	γ -Amid neben α -CO ₂ H (Mol)	Amino- gruppen (Mol)	van Slyke- Stickstoff gefunden (Mol)
II	BZLO- $\overset{\alpha}{\text{Glu}}-\overset{\gamma \epsilon}{\text{Lys}}-\overset{\alpha}{\text{H}}$ $\alpha $ $\text{Z} \quad \alpha $ CO_2H	3	1	0	1	1
III	HO- $\overset{\alpha}{\text{Glu}}-\overset{\gamma \epsilon}{\text{Lys}}-\overset{\alpha}{\text{H}}$ $\alpha $ $\text{NH}_2 \quad \alpha $ CO_2H	3	1	1	2	2.9
VII	Z- $\overset{\epsilon}{\text{Lys}}-\overset{\alpha}{\text{Glu}}-\overset{\gamma}{\text{Glu}}-\overset{\alpha \alpha}{\text{Lys}}-\overset{\epsilon}{\text{Z}}$ $\alpha $ $\text{CO}_2\text{H} \quad \text{NH}_2 \quad \alpha $ CO_2H	5	1	0	1	1
XII	HO- $\overset{\alpha}{\text{Glu}}-\overset{\gamma \epsilon}{\text{Lys}}-\overset{\alpha}{\text{Glu}}-\overset{\gamma}{\text{Glu}}-\overset{\alpha}{\text{OH}}$ $\alpha $ $\text{NH}_2 \quad \alpha \quad \alpha $ $\text{CO}_2\text{H} \quad \text{NH}_2$	4	2	2	2	4
X	HO- $\overset{\alpha}{\text{Glu}}-\overset{\gamma \epsilon}{\text{Lys}}-\overset{\alpha}{\text{Glu}}-\overset{\alpha \alpha}{\text{Lys}}-\overset{\epsilon}{\text{Glu}}-\overset{\gamma}{\text{Glu}}-\overset{\alpha}{\text{OH}}$ $\alpha $ $\text{NH}_2 \quad \alpha \quad \alpha \quad \alpha $ $\text{CO}_2\text{H} \quad \text{NH}_2 \quad \text{CO}_2\text{H} \quad \text{NH}_2$	7	3	2	3	5
XV	H- $\overset{\epsilon}{\text{Lys}}-\overset{\alpha}{\text{Glu}}-\overset{\gamma \epsilon}{\text{Lys}}-\overset{\alpha}{\text{Glu}}-\overset{\alpha \alpha}{\text{Lys}}-\overset{\epsilon}{\text{H}}$ $\alpha $ $\text{CO}_2\text{H} \quad \text{NH}_2 \quad \alpha $ $\text{CO}_2\text{H} \quad \text{NH}_2 \quad \alpha $ CO_2H	8	2	0	4	4

Wir danken dem BUNDESWIRTSCHAFTSMINISTERIUM (Bonn, Forschungsvorhaben J 399), der ARBEITSGEMEINSCHAFT INDUSTRIELLER FORSCHUNGSGESELLSCHAFT (Köln), der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGESELLSCHAFT (Bad Godesberg) und den VEREINIGTEN GLANZSTOFF-FABRIKEN (Wuppertal) für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit, dem VERBAND DER CHEMISCHEN INDUSTRIE (Düsseldorf) und seinen Mitgliedsfirmen für die großzügige Überlassung von Chemikalien im Rahmen von Hochschullieferungen. Herrn Dr. K. L. ZIEGLER danken wir für die Anfertigung der Elektropherogramme.

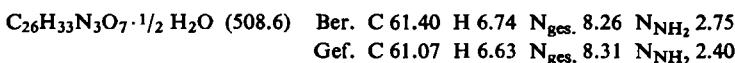
BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Schmelzpunktsapparat nach Dr. M. TOTTOLI der Fa. Büchi, Flawil/Schweiz, bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Bestimmung der R_F -Werte erfolgte in aufsteigender Technik auf Papieren Nr. 2043b der Firma Schleicher & Schüll. Laufmittel: SBA = 75 Tle. sek.-Butylalkohol, 15 Tle. 90-proz. Ameisensäure und 10 Tle. Wasser. SBN = 85 Tle. sek.-Butylalkohol und 15 Tle. 10-proz. Ammoniaklösung. „Phenol“ = 80 Tle. Phenol, 20 Tle. Wasser.

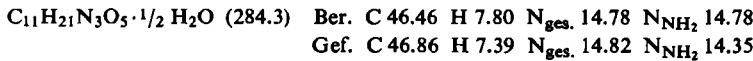
$N^{\epsilon}[\gamma\text{-Glutamyl}]$ -lysin (III) (Schema 1)

$N^{\epsilon}[\text{Z-(}\alpha\text{-BZL)-}\gamma\text{-glutamyl}]$ -lysin-Kupferkomplex (I): 9.5 g (0.025 Mol) *Z*-Glu(α -BZL) $\text{OH}^{11})$ wurden in 80 ccm absol. THF gelöst und bei -10° nach Zusatz von 3.5 ccm (0.025 Mol) TÄA mit 2.4 ccm (0.025 Mol) Chlorameisensäure-äthylester in das gemischte Anhydrid übergeführt. Nach $1/2$ Stde. ließ man bei -10° eine Lösung von 9.0 g (0.04 Mol) Lysin-Kupferkomplex-Hydrochlorid¹²⁾ und 7 ccm (0.05 Mol) TÄA in 50 ccm Wasser und 30 ccm THF (pH 10.5) innerhalb 1 Stde. unter kräftigem Rühren eintropfen. Dann wurde noch 2 Stdn. weitergerührt, wobei man die Temperatur auf 0° ansteigen ließ. Der Peptidkupferkomplex wurde durch Eingießen der Reaktionslösung in $3/4$ l Eiswasser unter gleichzeitigem starkem Rühren ausgefällt. Umkristallisieren aus Äthanol ergab ein feinkristallines Produkt. Ausb. 8.5 g (70%); Schmp. 200° (Zers.).

$N^{\epsilon}[\text{Z-(}\alpha\text{-BZL)-}\gamma\text{-glutamyl}]$ -lysin (II): 4.8 g I wurden in einer Mischung von 40 ccm Wasser und 10 ccm Eisessig suspendiert und unter kräftigem Rühren 10-proz. KCN-Lösung bis zur Entfärbung der Mischung zugesetzt. Nach mehrstdg. Aufbewahren im Eisschrank wurde abgesaugt, mehrmals mit Eiswasser gewaschen und getrocknet. Ausb. 4.4 g (100%). Aus Wasser Schmp. 204° . R_F (SBA) 0.85, R_F (SBN) 0.35.



$N^{\epsilon}[\gamma\text{-Glutamyl}]$ -lysin (III): 2.0 g II wurden in 50 ccm 90-proz. tert.-Butylalkohol 2 Stdn. in Gegenwart von 50 mg Pd-Mohr hydriert. Eindampfen der filtrierten Lösung i. Vak. ergab 1.1 g (100%) einer farblosen pulvriegen Masse. Nach Umkristallisieren aus Wasser kein Schmp., bei 250° Zers. R_F (SBA) 0.04, R_F (SBN) 0.0, R_F (Phenol) 0.57 (als Hydrochlorid), 0.27 (als freies Peptid).



Verbindung V (Schema 2)

Verbindung IV: 10.3 g (0.036 Mol) *Z*-Glu(OH)₂ wurden in 70 ccm MeCN gelöst und mit 17 g (0.08 Mol) DCC in 30 ccm MeCN vereinigt. In diese Mischung ließ man 21.5 g (0.073 Mol) N^{ϵ} -Z-Lysin-äthylester^{13,14)} in 40 ccm MeCN langsam eintropfen. Der Ester war aus dem

¹¹⁾ H. SACHS und E. BRAND, J. Amer. chem. Soc. **75**, 4610 [1953].

¹²⁾ A. NEUBERGER und F. SANGER, Biochem. J. **37**, 515 [1943].

¹³⁾ H. R. FALKENBURG, Dissertat. Techn. Hochschule Aachen 1958.

¹⁴⁾ M. BERGMANN, L. ZERVAS und W. F. ROSS, J. biol. Chemistry **111**, 245 [1935].

Hydrochlorid mit TÄA freigesetzt worden. Die Mischung blieb über Nacht bei 0° stehen. DCH wurde abgesaugt und zweimal mit je 100 ccm Äthylacetat ausgekocht. In den vereinigten Filtraten wurde überschüss. DCC mit etwas Eisessig umgesetzt, die Lösung filtriert und schließlich i. Vak. eingedampft. Es blieb eine hornartige Masse zurück, die aus Äthylacetat umkristallisiert wurde. Ausb. 24.8 g (81%). Schmp. 113°; R_F (SBA) 1.0, R_F (SBN) 0.85.

$C_{45}H_{59}N_5O_{12}$ (829.3) Ber. C 62.71 H 6.90 N 8.12 Gef. C 62.48 H 7.07 N 8.11

Verbindung V: 3 g IV wurden unter Erwärmen in 150 ccm absol. Benzol gelöst. Leitete man bei Raumtemperatur 1/2 Stde. lang trockenes HBr ein, so fiel das Hydrobromid als farbloses Pulver aus. Nach mehrstdg. Stehenlassen im Eisschrank wurde das Produkt auf einer kleinen Glasfritte abgesaugt und mit absol. Benzol gewaschen. Dann wurde im Vakuumexsikkator über P_2O_5 , KOH und Paraffin aufbewahrt. Farbloses, außerordentlich hygrokopisches Pulver. R_F (SBA) 0.09, R_F (SBN) 0.28.

Tri-Reineckat: Ca. 1 g V wurde in 10 ccm Acetatpuffer (pH 4.6) gelöst und die Lösung filtriert. Dann wurde mit einer gesätt. wäßr. Lösung von *Reinecke-Salz* gefällt und der rot-violette Niederschlag durch Erwärmen wieder in Lösung gebracht. Beim Abkühlen kristallisierte das Komplexsalz als rosafarbenes Pulver. Nach dem Umkristallisieren aus Wasser wurde bei 57° i. Vak. getrocknet. Schmp. 150° (Zers.).

$C_{21}H_{41}N_5O_6 \cdot 3H[Cr(SCN)_4(NH_3)_2]$ (1417.8) Ber. C 27.95 H 4.41 N 22.72
Gef. C 28.18 H 4.62 N 22.05

Verbindung X (Schema 3)

a) *Verbindung VI nach dem DCC-Verfahren:* Wie bei IV beschrieben, wurden 4.8 g (0.02 Mol) *TFA-Glu(OH)₂*¹⁵⁾ in 75 ccm MeCN mit 9 g (0.45 Mol) DCC in 25 ccm MeCN vereinigt und nach Zugabe von 19.3 g (0.065 Mol) *N^ε-Z-Lys-Oät* in 50 ccm MeCN 5 Tage im Eisschrank aufbewahrt. Der dicke Brei wurde scharf abgesaugt und der Filterrückstand mit 300 ccm Äthylacetat ausgekocht. Die vereinigten Filtrate wurden i. Vak. eingedampft und die zurückbleibende zähe Masse in 150 ccm warmem Äthylacetat aufgenommen. Nach 24 Stdn. hatte sich ein Gel abgeschieden, das beim Trocknen pulvrig wurde. Aus dem Filtrat ließ sich eine zweite Fraktion von 1.9 g gewinnen. Ausb. 12.3 g (75%). Schmp. 135° (Sintern). R_F (SBA) 0.95.

$C_{39}H_{52}F_3N_5O_{11}$ (823.8) Ber. C 56.85 H 6.36 N 8.50 Gef. C 57.04 H 6.33 N 8.25

b) *TFA-Glu-(ONP)₂:* 26 g (0.10 Mol) *TFA-Glu(OH)₂*¹⁵⁾ wurden feingepulvert in 300 ccm trockenem Äthylacetat suspendiert und unter Röhren 27.8 g (0.20 Mol) *p-Nitro-phenol* und 41.2 g (0.20 Mol) DCC eingetragen. Die Mischung wurde 6 Stdn. gerührt und dann über Nacht stehengelassen. Nach dem Absaugen und Auswaschen des DCH mit Äthylacetat wurde das Filtrat i. Vak. auf ein kleines Vol. eingeengt. Das beim Abkühlen auskristallisierende Rohprodukt wurde abgesaugt und aus Benzol umkristallisiert. Feine Nadeln; Ausb. 32 g (66%); Schmp. 144°.

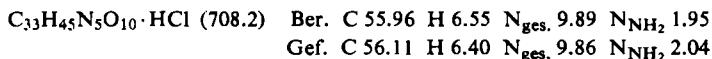
$C_{19}H_{14}F_3N_3O_5$ (485.3) Ber. C 47.02 H 2.91 N 8.66 Gef. C 47.32 H 2.84 N 8.84

c) *Verbindung VI nach der p-Nitrophenylestermethode:* 9.7 g (0.02 Mol) *TFA-Glu(ONP)₂* wurden in 50 ccm trockenem Äthylacetat gelöst und auf 0° abgekühlt. Unter Röhren ließ man eine Lösung von 12.3 g (0.04 Mol) *N^ε-Z-Lys-Oät* in 50 ccm Äthylacetat im Laufe einer Stde. eintropfen. Nach 12 stdg. Aufbewahren im Kühlschrank wurde auf die Hälfte eingeengt und bis zur beginnenden Trübung mit Äther versetzt. Nach mehrtägigem Belassen im Eis-

¹⁵⁾ F. WEYGAND und E. LEISING, Chem. Ber. 87, 248 [1954].

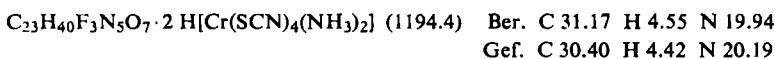
schrank hatte sich ein gelbes Gel ausgeschieden. Rohausb. 13.6 g (83%). Reinausb. nach mehrfachem Umkristallisieren aus Äthylacetat 9.5 g (58%); Schmp. 128–135°; R_F (SBA) 0.95. Ber. N 8.50 Gef. N 8.20

Verbindung VII: 4.1 g (0.005 Mol) VI wurden in 30 ccm Dioxan mit 30 ccm *n* NaOH 3 Stdn. verseift. Dann wurde mit verd. Salzsäure auf pH 2 angesäuert und das Dioxan i. Vak. (Bad 50°) abgedampft. VII schied sich nach längerer Zeit im Eisschrank als farbloses Öl ab. Das Öl wurde mit Wasser gewaschen und aus Äthanol/Wasser mit Äther kristallin gefällt. Nach Trocknen bei 57° i. Vak. Ausb. 3.4 g (96%). Die Analysenprobe wurde nochmals aus Äthanol/Wasser/Äther umkristallisiert. Schmp. 132–140° (Sintern).



Verbindung VIII: Die HBr-Spaltung von 10 g (0.012 Mol) VI nahmen wir in 200 ccm Benzol vor, wie bei V beschrieben. Ausb. 8.25 g (97%). R_F (SBA) 0.28, R_F (SBN) 0.65.

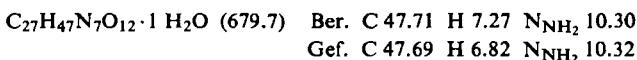
Di-Reineckat: Aus 1 g VIII in 20 ccm Acetatpuffer (pH 4.6) wie für das Tri-Reineckat von V beschrieben. Rotviolette glänzende Blättchen aus Wasser. Schmp. 140° (Zers.).



Verbindung IX gewannen wir nach dem DCC-Verfahren wie bei IV aus 8.25 g (0.015 Mol) VIII in 150 ccm MeCN, 3.15 ccm (0.023 Mol) TÄA, 9.2 g (0.027 Mol) TFA-Glu(OH)-OBZL¹⁶⁾ in 100 ccm MeCN und 6 g (0.029 Mol) DCC in 50 ccm MeCN. Übliche Aufarbeitung, Waschen mit Äther und Umkristallisieren aus 50-proz. wässr. Äthanol ergab 6.55 g (53%) mit Schmp. 169° (Sintern). R_F (SBA) 0.95.

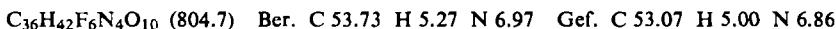


Verbindung X: 1.13 g (1 mMol) IX wurden in 30 ccm MeOH mit 30 ccm 0.34 *n* Ba(OH)₂ 3 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen. Nach Fällung der Ba²⁺-Ionen mit der äquiv. Menge *n* H₂SO₄ wurde das Filtrat i. Vak. unter N₂-Atmosphäre auf 2 ccm eingeengt und nach Zufügen von 20 ccm Aceton für mehrere Stdn. in den Eisschrank gestellt. Das ausgeschiedene Produkt wurde erneut aus Wasser/Aceton umgefällt und bei 57° i. Vak. getrocknet. Amorphes farbloses Pulver. Ausb. 520 mg (77%); Schmelzverhalten: ab 80° Sintern, ab 90° Gasentwicklung, bei 140° klare Schmelze. R_F (SBA) 0, R_F (SBN) 0, R_F (Phenol) 0.4.



Verbindung XV (Schema 4)

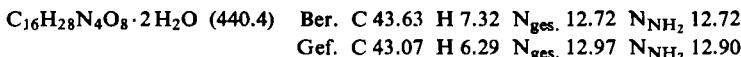
Verbindung XI: Nach dem DCC-Verfahren analog IV aus 2.5 g (0.01 Mol) *H-Lys-OÄt-2 HCl* in 50 ccm MeCN, 2.75 ccm (0.02 Mol) TÄA, 6.6 g (0.02 Mol) TFA-Glu(OH)-OBZL in 50 ccm MeCN und 5.15 g (0.025 Mol) DCC in 30 ccm MeCN. Nach der Entfernung des DCH wurde eingeengt und mit dem fünffachen Vol. Petroläther gefällt. Rohausb. 6.9 g (86%). Aus 50-proz. Äthanol Schmp. 132° (Sintern). R_F (SBA) 0.9.



Verbindung XII: 4 g XI, 75 ccm MeOH und 75 ccm 0.4*n* Ba(OH)₂ ließ man 3 Stdn. bei Raumtemperatur stehen und entfernte die Ba²⁺-Ionen mit *n* H₂SO₄. Einengen auf 5 ccm unter N₂-Atmosphäre und Ausfällen mit 100 ccm Aceton, sodann mehrfaches Umlösen aus

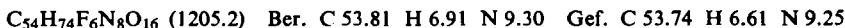
¹⁶⁾ F. WEYGAND und K. HUNGER, unveröffentlicht; K. HUNGER, Diplomarb. Techn. Univ. Berlin 1958; Privatmitteil. von F. WEYGAND.

Wasser/Aceton ergab ein feinkristallines farbloses Pulver. Ausb. 1.4 g (70%); Schmp. 227° (Zers.); R_F (SBA) 0.05, R_F (SBN) 0.00, R_F (Phenol) 0.45.



Verbindung XIII: Auf 12 g (0.015 Mol) *XI* (vorher i. Vak. über P_2O_5 getrocknet), die sich in einem mit Rührer versehenen 500-ccm-Dreihalskolben befanden, wurden ca. 200 ccm bromfreies *HBr* kondensiert. Man rührte 2 Stdn. und ließ dann das *HBr* abdampfen. Diese Arbeiten müssen alle unter peinlichem Feuchtigkeitsausschluß durchgeführt werden. Das nach dem Abdampfen des *HBr* erhaltene, fast farblose Öl wurde in einem mit KOH und Aktivkohle beschickten Vakuumexsikkator soweit wie möglich von anhaftendem *HBr* und Benzylbromid befreit. Ausb. 9 g (96%); R_F (SBA) 0.8.

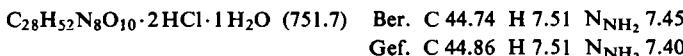
Verbindung XIV: Nach dem DCC-Verfahren aus 9 g (0.015 Mol) *XIII* in 100 ccm MeCN (pH 3–4 durch Zugabe einiger Tropfen TÄA), 7.5 g (0.036 Mol) *DCC* in 20 ccm MeCN und 12.3 g (0.04 Mol) *N^ε-Z-Lysin-äthylester* in 50 ccm MeCN. Nach der üblichen Aufarbeitung wurde die Essigesterlösung (50 ccm) über eine Säule mit saurem Aluminiumoxyd (WOELM) chromatographiert. Beim Einengen des Eluats schied sich die Substanz als Gel ab. Umfällen aus wenig Essigester oder viel Benzol lieferte 7.1 g (40%), amorph; Schmp. 125–129° (Sintern). R_F (SBA) 0.95.



Verbindung XV

a) *NaOH-Verseifung:* 1.2 g (1 mMol) *XIV* wurden in 30 ccm Dioxan mit 30 ccm *n* NaOH 3 Stdn. bei Raumtemperatur verseift. Nach dem Ansäuern auf pH 3–4 mit verd. Salzsäure wurde i. Vak. auf ca. 5 ccm eingedampft. Die Substanz schied sich als Öl ab, das mit Wasser gewaschen wurde. Lösen in Äthanol und Fällen mit Äther ergab ein chromatographisch uneinheitliches Pulver, das im Bereich von 145–155° schmolz.

b) *Katalyt. Hydrierung:* Das Rohprodukt wurde in 30 ccm 90-proz. tert.-Butylalkohol in Gegenwart von Pd-Mohr 6 Stdn. hydriert. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators wurde i. Vak. eingedampft, in 2 ccm Wasser gelöst und mit Aceton als Öl gefällt. Beim Lösen des Öls in Wasser und Eindunsten i. Vak. über KOH verblieb ein blaßgelbes hygroskopisches Pulver. Ausb. 0.29 g (41%); Schmp. 85° (Sintern), bei 115° Zers. unter Aufblähen. R_F (SBA) 0.0, R_F (SBN) 0.0, R_F (Phenol) 0.6.



Die Analysenwerte wurden unter Berücksichtigung eines Verbrennungsrückstandes (anorg. Salze) von 1.6% korrigiert.

Aminosäureverhältnis: Glu:Lys = 2:2.8 (ber. 2:3).

Polykondensationsversuche

a) *Z-Glutaminsäure-bis-p-nitrophenylester:* 14 g (0.05 Mol) *Z-Glu(OH)₂* wurden in 250 ccm Äthylacetat mit 21 g (0.15 Mol) *p-Nitro-phenol* und 24.5 g (0.12 Mol) *DCC* umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 5 Stdn. gerührt und über Nacht im Eisschrank stehengelassen. Nach Abfiltrieren des *DCH* wurde i. Vak. eingedampft und das erhaltene Öl durch mehrfaches Umlöschen aus Äthanol gereinigt. Ausb. 18.5 g (71%), Schmp. 116°.



b) *Polykondensation:* 5.0 g (0.02 Mol) *H-Lys-OÄt* · 2 *HCl* wurden in 30 ccm DMF mit 5.5 ccm (0.04 Mol) TÄA umgesetzt. In diese Lösung ließ man unter Röhren innerhalb einer

Stde. eine Lösung von 10.5 g (0.02 Mol) *Z*-Glu(*ONP*)₂ in 20 ccm DMF eintropfen. Es wurde noch 2 Stdn. bei Raumtemperatur weitergeführt; dann blieb die Mischung zwei Tage im Eis- schrank stehen. Einengen i. Vak. ergab ein gelbes Öl, das in 50 ccm heißem Aceton gelöst wurde; beim Abkühlen fiel die Substanz fest aus. Zur Spaltung nicht umgesetzten *p*-Nitrophenylesters wurde in 100 ccm Aceton/Wasser (1:1) 2 Stdn. auf 50° erwärmt. Das Polykondensat wurde durch Verdünnen mit Wasser auf 500 ccm ausgefällt. Diese Operation wiederholte man. Der Niederschlag wurde mit 100 ccm MeCN verrieben, mit 500 ccm Wasser verdünnt, die Fällung abgesaugt, mit verd. Essigsäure und Wasser gewaschen und bei 60° i. Vak. getrocknet. Ausb. 5.8 g (72%); Schmp. 145–160° (Sintern).



c) *Fraktionierung*: 5 g des Polykondensationsproduktes wurden, mit trockenen Siedesteinchen vermengt, in eine Extraktionshülse gefüllt und diese oben mit einem Wattepfropf verschlossen. Man extrahierte im Soxhlet 10 Stdn. mit Wasser. Der Extrakt wurde schonend eingedampft und der Rückstand i. Vak. getrocknet. Ausb. 1.4 g (27%). Schmp. 120–140° (sinternd).

Die Extraktionshülse wurde mit der darin befindlichen Substanz im Exsikkator über P₂O₅ getrocknet und dann in gleicher Weise mit je 500 ccm Aceton, Äthanol, Chloroform und Dimethylformamid je 10 Stdn. extrahiert. Die Extraktionshülse enthielt danach keine ungelöste Substanz mehr.

Aus den Aceton-, Alkohol- und Dimethylformamidlösungen wurde die Substanz nach dem Einengen i. Vak. durch Verdünnen mit der 10fachen Menge Wasser und aus der Chloroformlösung mit Äther ausgefällt. Nach sorgfältigem Trocknen erhielt man blaßgelbe Pulver. Ergebnisse s. Tab. 1. S. 2569.