

FRIEDRICH WEYGAND und HANS FRITZ

*N*-Trifluoracetyl-aminosäuren, XX<sup>1)</sup>

## Über *N*-TFA-Asparaginsäure-Derivate

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule München

(Eingegangen am 3. Juli 1964)

Für *N*-TFA-L-Asparaginsäureanhydrid (II) wird eine verbesserte Darstellung angegeben. Nach Umsetzung von II mit Äthanol zu den isomeren *N*-TFA-L-Asparaginsäure- $\alpha$ - und - $\beta$ -äthylestern bzw. mit L-Valin-methylester zu den isomeren Dipeptidderivaten konnte das Isomerenverhältnis (nach Veresterung mit Diazomethan) gaschromatographisch ermittelt werden. Bei den  $\beta$ -Peptidderivaten der *N*-TFA-Asparagyl-aminosäure-dimethylester tritt im heißen Einspritzblock des Gaschromatographen und auch mit Triäthylamin erhebliche Imidbildung ein. 0.1 n NaOH bewirkt beim *N*-TFA- $\beta$ -L-Asp-L-Val-dimethylester neben partieller Racemisierung eine intramolekulare Umesterung und Ummidierung zum  $\alpha$ -Peptidderivat.

Bei der Nacharbeitung der früher beschriebenen Methode zur Darstellung von *N*-TFA-L-Asparaginsäureanhydrid (II) aus L-Asparaginsäure und Trifluoracetanhydrid<sup>2,3)</sup> wurde festgestellt, daß Schmp. und Drehwert von geringfügigen Änderungen der Reaktionsbedingungen abhängen. Reproduzierbare Ergebnisse werden hingegen erhalten, wenn die Aminosäure in der notwendigen Menge wasserfreier Trifluoressigsäure gelöst und mit etwa demselben Volumen Trifluoracetanhydrid (ca. 3 Mol-Äquiv.) zwischen 0 und 20° mehrere Std. stehengelassen wird. Das beim Eindampfen i. Vak. und Trocknen über Kaliumhydroxyd erhaltene Produkt zeigt dieselben Konstanten wie die umkristallisierte Verbindung.

Hydrolyse von II mit Wasser unter Erhitzen liefert *N*-TFA-L-Asparaginsäure, die in Schmp. und optischer Drehung mit einer aus L-Asparaginsäure und Trifluorthioessigsäure-S-äthylester hergestellten Probe übereinstimmt, und die mit Trifluoracetanhydrid ein Produkt ergibt, das mit dem direkt gewonnenen II identisch ist.

Bei der Darstellung von II in Äther oder THF aus L-Asparaginsäure und Trifluoracetanhydrid entstehen unscharf und niedriger schmelzende Produkte, was vermutlich auf partieller Azlactonbildung und hierdurch bedingter Racemisierung beruht.

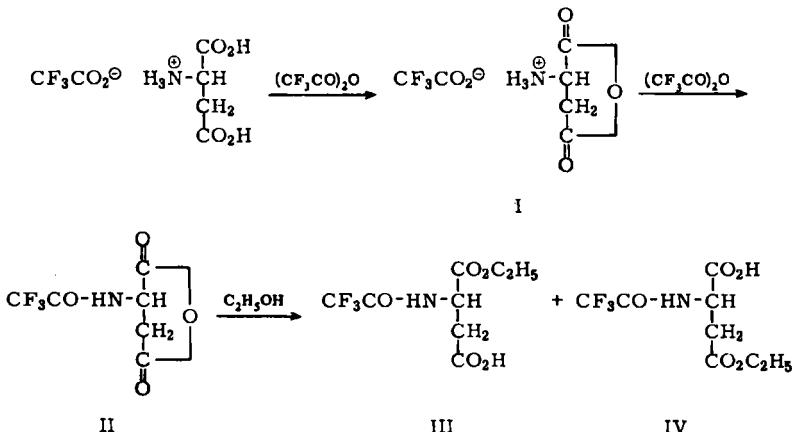
Um einen Überblick über die Reaktionsfolge bei der Bildung von II in Trifluoressigsäure zu erhalten, wurde der Überschuß an Trifluoracetanhydrid verringert, die Menge an Trifluoressigsäure erhöht und die Reaktionszeit verkürzt. Der trifluoressigsäurefreie Eindampfrückstand zeigte nach Lösen in absol. Methanol im Dünnschichtchromatogramm mit Ninhydrin neben Asparaginsäure und dem in einem Blindversuch (auch ohne Trifluoracetanhydrid) gebildeten 4-Methylester auch den 1-Methyl-

<sup>1)</sup> XIX. Mitteil.: F. WEYGAND und Mitarbb., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 322, 38 [1960]. Abkürzungen: DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid; THF = Tetrahydrofuran.

<sup>2)</sup> F. WEYGAND, P. KLINKE und I. EIGEN, Chem. Ber. 90, 1896 [1957].

<sup>3)</sup> F. WEYGAND und G. ADERMANN, Chem. Ber. 93, 2334 [1960].

ester, der nur aus L-Asparaginsäureanhydrid-trifluoracetat (I) entstanden sein kann. In Trifluoressigsäure entsteht daher über ein unsymmetrisches Anhydrid zunächst I, das dann N-trifluoracetyliert wird.



Das Mengenverhältnis der bei der Aufspaltung von II mit Äthanol entstehenden 1- und 4-Äthylester (III und IV) der N-TFA-L-Asparaginsäure ließ sich leicht nach Veresterung mit Diazomethan gaschromatographisch bestimmen<sup>2,4)</sup> (relative Gesamtretentionswerte  $q_g$  Tab. 1). Unter den im Versuchsteil angegebenen Bedingungen entstanden aus II und Äthanol 77% III und 23% IV. Die präparative Trennung gelingt sauber, wie schon beschrieben<sup>2)</sup>, nur durch Kristallisation der Dicyclohexylammoniumsalze.

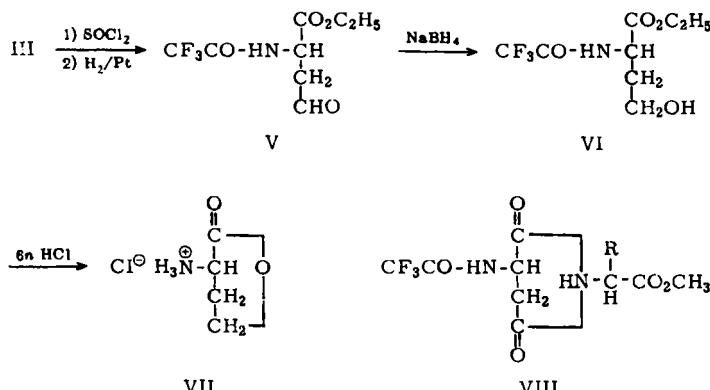
Tab. 1. Gaschromatographische Trennung isomerer N-TFA-L-Asparaginsäure-methyl-äthylester an einer 50-m-Stahlkapillare, belegt mit Polypropylenglykol (R Säule von Perkin-Elmer). Trägergas He, 0.96 Nml/Min., 181°. Relative Gesamtretentionswerte  $q_g$ , bez. auf Myristinsäure-methylester = 1

	$q_g$
N-TFA-Asparaginsäure-dimethylester	1.60
N-TFA-Asparaginsäure-4-methyl-1-äthylester	1.78
N-TFA-Asparaginsäure-1-methyl-4-äthylester	1.85

Aus III konnte in hohen Ausbeuten reines L-Homoserin erhalten werden. Das Säurechlorid wurde nach ROSEN MUND und der resultierende L-2-Trifluoracetamino-4-oxo-buttersäure-äthylester (V) mit Natriumborhydrid reduziert, worauf der N-TFA-L-Homoserin-äthylester (VI) mit 6n HCl in das L-Homoserinlacton-hydrochlorid (VII) verwandelt wurde. Dieses stimmte in allen Konstanten mit den Angaben der Literatur<sup>5)</sup> überein.

<sup>4)</sup> Analoge Untersuchungen mit Glutaminsäurederivaten: F. WEYGAND, A. PROX, E. C. JORGENSEN, R. AXÉN und P. KIRCHNER, Z. Naturforsch. 18b, 93 [1963].

<sup>5)</sup> S. M. BIRNBAUM und J. P. GREENSTEIN, Arch. Biochem. Biophysics 42, 212 [1953]; J. P. GREENSTEIN und M. WINITZ, Chemistry of the Amino Acids, S. 2612–16 und 2638, J. Wiley & Sons, New York 1961.



Die von uns früher entwickelte gaschromatographische Methodik zur Untersuchung von Dipeptiden<sup>1,4,6)</sup> erlaubt auch eine Bestimmung des bei der Umsetzung von II mit Aminosäureestern sich bildenden Isomerenverhältnisses von  $\alpha$ -zu  $\beta$ -Peptid.

Die zur Identifizierung notwendigen isomeren  $\alpha$ - und  $\beta$ -N-TFA-L-Asparagyl-L-aminosäure-dimethylester wurden zunächst am Beispiel des L-Valins aus den N-TFA-L-Asparaginsäure-monomethylestern und L-Valin-methylester mit Hilfe von DCCI hergestellt und zwar, um eine Racemisierung zu vermeiden, mit dem dest. Aminosäureester<sup>6)</sup> in absol. Acetonitril bei  $-30$  bis  $0^\circ$ . Die Ester liefern je einen scharfen Peak im Gaschromatogramm und daneben eine Spur des Imidpeaks (Imid VIII, R =  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

In Tab. 2 sind die Aufspaltungen von II mit Aminosäure-methylestern aufgeführt. Man ersieht aus ihr ferner, daß die Imidbildung im Gaschromatographen von der Seitenkette der jeweiligen Aminosäure in den *N*-TFA-Asparagyl-aminosäure-dimethyl-estern abhängt. Am geringsten ist sie bei Valin, dann folgen Leucin und Alanin, sehr stark ist sie beim Phenylalanin, und nur den Imidpeak beobachtet man bei den *N*-TFA-Asp-Gly-diestern. Auf andere Weise hergestelltes *N*-TFA- $\alpha$ -L-Asp( $\beta$ -OCH<sub>3</sub>)-Gly-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> ergab nur den Imidpeak, wie ihn authentisches *N*-TFA- $\alpha$  $\beta$ -L-Asp-Gly-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub><sup>3)</sup> zeigte.

Tab. 2. Aufspaltung von *N*-TFA-*L*-Asparaginsäureanhydrid (II) mit Aminosäure-methyl-estern (dest.) und Imidbildung, gaschromatographisch bestimmt

Methylester von	$\alpha$ -L-L-Peptid %	Imide $I_1 + I_2^*)$ %	$\beta$ -L-L-Peptid %
L-Valin	70	Spur	30
L-Leucin	64	6	30
L-Alanin	52	17	31
L-Phenylalanin	4	62	34
Glycin	—	100 **)	—

<sup>\*)</sup> S. S. 75

\*\*) Nur ein Peak, da nicht diastereomer.

- <sup>6)</sup> F. WEYGAND, A. PROX, L. SCHMIDHAMMER und W. KÖNIG, *Angew. Chem.* **75**, 282 [1963]; *Angew. Chem. internat. Edit.* **2**, 183 [1963]; Peptide Symposium, S. 97–107, Pergamon Press, Oxford 1963.

Es wurde ferner beobachtet, daß die Imidbildung vorzugsweise aus den  $\beta$ -Peptid-derivaten erfolgt. Tab. 2 gibt daher nur im Falle des Valins und des Leucins (Imidbildung 6%) das wahre bzw. angenähert richtige Aufspaltungsverhältnis bei der Umsetzung von II mit Aminoäureestern wieder.

Andere Zahlenverhältnisse über die Aufspaltung von II mit Aminoäureestern findet man bei Verwendung der Aminoäureester-hydrochloride unter Zusatz von Triäthylamin (s. Versuchsteil). Man stellt hierbei auch einen höheren Imidgehalt fest. Alle *N*-TFA-*L*-Asparagyl-aminoäure-monomethylester zeigen im Gaschromatogramm als solche oder nach Umsetzung mit DCCI nur die Imidpeaks und zwar auch, wenn die Aminoäure optisch aktiv ist; dann jedoch zwei, weil gleichzeitig Racemisierung erfolgt (Abbild. 1, Peaks  $I_1$  und  $I_2$ ).



Abbild. 1

Gaschromatogramm des Aufspaltungsproduktes von *N*-TFA-*L*-Asparaginsäure-anhydrid (II) mit *L*-Valin-methylester: Bildung der diastereomeren Imide (VIII, R =  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $I_1$  und  $I_2$ ) im Gaschromatographen. Myristinsäure-methylester als Standard (S)., 50-m-Stahlkapillare, belegt mit Polypheyläther (Säule OS 138 von Perkin-Elmer), 220°, Trägergas  $\text{N}_2$ , 0.6 Nml/Min.

Die Umsetzung von II mit destilliertem *DL*-Valin-methylester liefert nach Veresterung mit Diazomethan die gaschromatographisch trennbaren diastereomeren Dimethylester der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptide von *N*-TFA-*L*-Asp-*L*-Val und *N*-TFA-*L*-Asp-*D*-Val (Abbild. 2). Es findet eine gewisse asymmetrische Lenkung statt, denn die  $\alpha$ -*L*-*L*- und die  $\beta$ -*L*-*D*-Verbindung werden in größerer Menge gebildet als die  $\alpha$ -*L*-*D*- und die  $\beta$ -*L*-*L*-Verbindung.

Von Bedeutung für die Chemie der Asparaginsäurepeptide sind die folgenden Beobachtungen. Wird den beiden isomeren Dipeptidderivaten *N*-TFA- $\alpha$ -*L*-Asp( $\beta$ -OCH<sub>3</sub>)-*L*-Val-OCH<sub>3</sub> bzw. *N*-TFA- $\beta$ -*L*-Asp( $\alpha$ -OCH<sub>3</sub>)-*L*-Val-OCH<sub>3</sub> in absol. Acetonitril etwas Triäthylamin zugesetzt, so kann nach zweistündigem Stehenlassen bei Raumtemperatur beim  $\alpha$ -Peptid nur 7%, beim  $\beta$ -Peptid dagegen 22% Imidbildung gaschromatographisch und (qualitativ) dünnenschichtchromatographisch nachgewiesen werden. Auch bei den  $\beta$ -Peptidderivaten von Leucin und Alanin wurde nach der Behandlung in Acetonitril mit Triäthylamin erhebliche Imidbildung festgestellt: Ohne Triäthylamin-

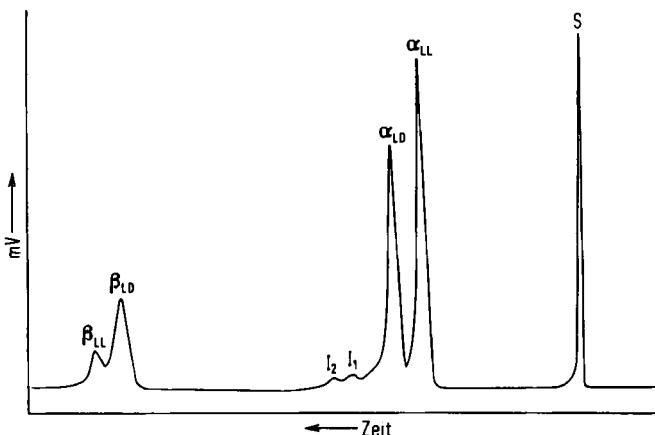


Abbildung. 2. Gaschromatogramm des Aufspaltungsproduktes von *N*-TFA-*L*-Asparaginsäure-anhydrid (II) mit *D,L*-Valin-methylester nach Veresterung mit Diazomethan. Myristinsäure-methylester als Standard (S). Gaschromatographische Bedingungen wie bei Abbild. 1  
 $\alpha_{LL}$  = *N*-TFA- $\alpha$ -*L*-Asp( $\beta$ -OCH<sub>3</sub>)-*L*-Val-OCH<sub>3</sub>,  $\alpha_{LD}$  = *N*-TFA- $\alpha$ -*L*-Asp( $\beta$ -OCH<sub>3</sub>)-*D*-Val-OCH<sub>3</sub>,  
 $\beta_{LL}$  = *N*-TFA- $\beta$ -*L*-Asp( $\alpha$ -OCH<sub>3</sub>)-*L*-Val-OCH<sub>3</sub>,  $\beta_{LD}$  = *N*-TFA- $\beta$ -*L*-Asp( $\alpha$ -OCH<sub>3</sub>)-*D*-Val-OCH<sub>3</sub>

behandlung bildeten sich beim Leucinpeptid im Gaschromatographen 25% Imid, dünnenschichtchromatographisch war keines nachzuweisen, nach der Triäthylaminbehandlung waren es 65% und dünnenschichtchromatographisch war es nunmehr auffindbar. Beim Alaninpeptid waren es zunächst 36% und nach der Behandlung 100%. Der nicht in Imid verwandelte Anteil der  $\beta$ -Peptidderivate von Valin und Leucin war deutlich racemisiert.

Imide sind als Zwischenstufen bei der alkalischen Verseifung von Methylbernsteinsäure-ester-aniliden zuerst formuliert<sup>7)</sup> und bei der alkalischen Verseifung von Benzyloxycarbonyl-*L*-asparagin-methylester und Benzyloxycarbonyl-*L*-isoasparagin-methylester<sup>8)</sup> sowie von Benzyloxycarbonyl- $\alpha$ -*L*-Asp( $\beta$ -OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)-glycin-ester<sup>9)</sup> isoliert worden. E. SONDHEIMER und R. W. HOLLEY<sup>8)</sup> formulierten einen primären Angriff von OH<sup>⊖</sup> auf die Amidgruppe unter Bildung des stark nucleophilen  $-NH^{\ominus}$ -Ions, das durch Reaktion mit der Estergruppe unter Abspaltung von RO<sup>⊖</sup> den Ringschluß herbeiführt.

Bald darauf wurde gezeigt, daß bei der milden alkalischen Hydrolyse von *N*-Benzoyl- $\alpha$ -Asp( $\beta$ -OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)- und *N*-Benzoyl- $\beta$ -Asp( $\alpha$ -OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)-gly-n-hexylamid jeweils gleichviel (75%) *N*-Benzoyl- $\beta$ -peptid-n-hexylamid entsteht. Demnach ist der die Verseifungsgeschwindigkeit bestimmende Schritt in der Imidbildung zu sehen<sup>10)</sup>. Weitere Experimente<sup>10)</sup> mit *N*-Benzoyl-isoasparagin-äthylester und Benzamino-succinimid, die bei der Alkalibehandlung dasselbe Verhältnis an *N*-Benzoyl-asparagin : *N*-Benzoyl-isoasparagin (65 : 35) liefern, bestätigen diese Vorstellung.

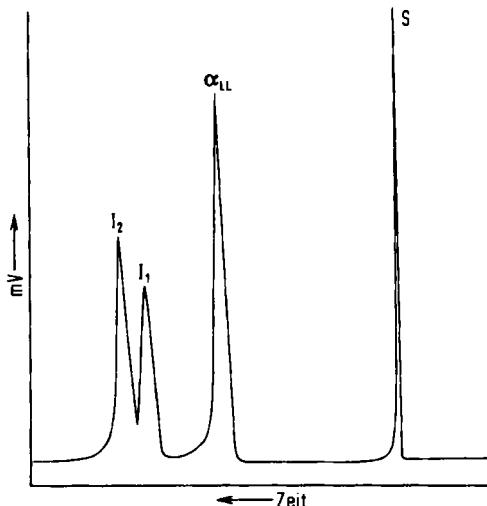
7) J. E. H. HANCOCK und R. P. LINSTEAD, J. chem. Soc. [London] 1953, 3490.

8) E. SONDHEIMER und R. W. HOLLEY, J. Amer. chem. Soc. 76, 2467 [1954].

9) B. ISELIN und R. SCHWYZER, Helv. chim. Acta 45, 1499 [1962].

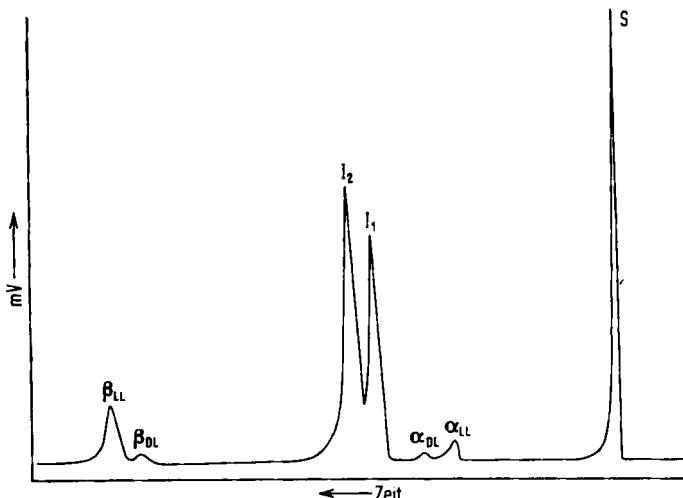
10) A. R. BATTERSBY und J. C. ROBINSON, J. chem. Soc. [London] 1955, 259.

Nach eingehenden kinetischen Untersuchungen entwickelten BERNHARD et al.<sup>11)</sup> detaillierte mechanistische Vorstellungen über die alkalische Hydrolyse der  $\beta$ -Ester von *N*-Acyl-peptiden.



Abbild. 3

Gas chromatogramm der Neutralsubstanz nach kurzer Behandlung von *N*-TFA- $\alpha$ -L-Asp( $\beta$ -OCH<sub>3</sub>)-L-Val-OCH<sub>3</sub> mit 0.1 n NaOH. Myristinsäuremethylester als Standard (S). Gaschromatographische Bedingungen wie bei Abbild. 1,  $\alpha_{LL}$  usw. wie bei Abbild. 2.



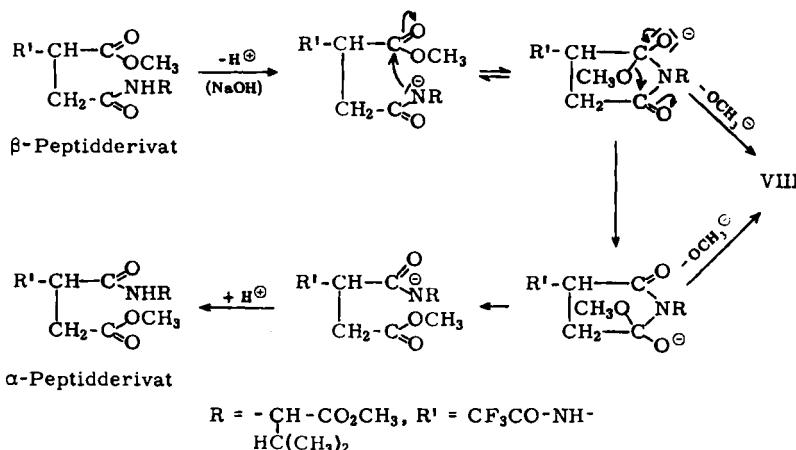
Abbild. 4. Gas chromatogramm der Neutralsubstanz nach kurzer Behandlung von *N*-TFA- $\beta$ -L-Asp( $\alpha$ -OCH<sub>3</sub>)-L-Val-OCH<sub>3</sub> mit 0.1 n NaOH. Myristinsäuremethylester als Standard (S). Gaschromatographische Bedingungen wie bei Abbild. 1,  $\alpha_{LL}$  usw. analog Abbild. 2.

Wir konnten noch einen weiteren, bisher nicht beobachteten Reaktionstyp auffinden, nämlich die kombinierte intramolekulare Umesterung und Urmamidierung: Bei der Verseifung von reinstem *N*-TFA- $\alpha$ -L-Asp( $\beta$ -OCH<sub>3</sub>)-L-Val-OCH<sub>3</sub> und *N*-TFA-

<sup>11)</sup> S. A. BERNHARD, A. BERGER, J. H. CARTER, E. KATCHALSKI, M. SELA und Y. SHALITIN, J. Amer. chem. Soc. 84, 2421 [1962].

$\beta$ -L-Asp( $\alpha$ -OCH<sub>3</sub>)-L-Val-OCH<sub>3</sub> mit 0.1 n NaOH blieb nach 8 Min. bei Raumtemperatur beim  $\beta$ -Peptid wesentlich weniger Neutralsubstanz übrig als beim  $\alpha$ -Peptid. Die Gaschromatogramme der Neutralfraktion zeigten ausgehend vom  $\alpha$ -Peptid einen starken Imidgehalt (Abbild. 3), ausgehend vom  $\beta$ -Peptid neben überwiegendem Imidgehalt noch  $\alpha$ -L- und  $\alpha$ -D-L-Peptid (Abbild. 4). Es hat also neben der Racemisierung in geringem Umfange ein Platzwechsel zwischen der Amin- und der Alkoholgruppierung im  $\beta$ -Peptidderivat stattgefunden.

In Analogie zu den Formulierungen von BERNHARD et al.<sup>11)</sup> kann die Umwandlung des  $\beta$ -Peptidderivates in das  $\alpha$ -Derivat (ohne die gleichzeitig erfolgende Racemisierung zu berücksichtigen) folgendermaßen formuliert werden:



Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danken wir für Unterstützung, Herrn Dr. A. PROX für Beratung bei der gaschromatographischen Untersuchung, und Fräulein I. KESSLER für geschickte und zuverlässige Ausführung der gaschromatographischen Arbeiten.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

**N-Trifluoracetyl-L-asparaginsäureanhydrid (II):** 92 g (70 m Mol) *L*-Asparaginsäure wurden in ca. 300 ccm wasserfreier Trifluoressigsäure unter gelindem Erwärmen größtenteils gelöst. Unter Kühlung und Feuchtigkeitsausschluß wurden 300 ccm Trifluoracetanhydrid rasch zuge tropft. Man ließ 1 Stde. bei 0° und sodann unter gelegentlichem Umschütteln bei Raumtemperatur stehen bis kein Bodenkörper mehr vorhanden war (bis zu 12 Stdn.). Überschüss. Trifluoracetanhydrid und die Trifluoressigsäure wurden i. Vak. (Bad bis 30°) abdestilliert und in Fallen, die mit Aceton/Trockeneis und mit flüssigem Stickstoff gekühlt waren, aufgefangen. Gegen Ende der Destillation erstarrte der Kolbeninhalt schlagartig. Nach der Zerkleinerung wurde über viel Kaliumhydroxid bis zum Verschwinden des stechenden Geruchs der Trifluoressigsäure getrocknet. Ausb. 146 g (100%), Schmp. 134–135°,  $[\alpha]_{D}^{20} = -36.2^\circ$  ( $c = 3.4$  in absol. THF), Lit.<sup>2)</sup>: Schmp. 133–134°,  $[\alpha]_D = -22.3^\circ$  ( $c = 0.6$  in absol. THF).

#### *N*-Trifluoracetyl-L-asparaginsäure

a) Aus *L*-Asparaginsäure mit Trifluorthioessigsäure-S-äthylester: 1.33 g (10 mMol) *L*-Asparaginsäure wurden in 14 ccm 1 n NaOH mit 2 ccm Trifluorthioessigsäure-S-äthylester 48 Stdn. heftig gerührt. Den pH-Wert der Lösung hielt man durch gelegentliche Zugabe von 1 n NaOH

bei etwa 9. Nach Ansäuern schied sich zunächst ein Öl aus, das nach Aufnehmen in Essigester beim Eindampfen kristallisierte. Ausb. 1.1 g (48%), Schmp. 149–151°. Zur Analyse wurde aus Diisopropyläther/Petroläther umkristallisiert; Schmp. 151°,  $[\alpha]_{546}^{20} : -35.4^\circ$  ( $c = 2.3$  in absolut. Methanol).



b) Aus *N-TFA-L-Asparaginsäureanhydrid mit Wasser*: Das *Anhydrid* wurde mit wenig Wasser bis zur völligen Lösung erwärmt (30–40°), darauf i. Vak. eingedampft. Schmp. 151–152°, Ausb. quantitativ.

*Indirekter Nachweis der Bildung von L-Asparaginsäureanhydrid-trifluoracetat (I):* 266 mg (2.00 mMol) *L-Asparaginsäure* in 3 ccm *Trifluoressigsäure* wurden mit 0.6 ccm (4 mMol) Trifluoracetanhydrid versetzt. Nach 14 stdg. Stehenlassen bei 20° wurde i. Vak. zur Trockne verdampft, über Kaliumhydroxid stehengelassen, in absolut. Methanol gelöst und nach 2 Std. i. Vak. eingedampft. Das Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel G mit wassergesätt. Phenol als Laufmittel zeigte beim Entwickeln mit Ninhydrin neben *L-Asparaginsäure-4-methylester* ( $R_F$  0.34, gelbbraun), der unter den Reaktionsbedingungen auch ohne Trifluoracetanhydrid entsteht, den *L-Methylester* ( $R_F$  0.43, rosa). Authent. Vergleichsproben hatten dieselben  $R_F$ -Werte.

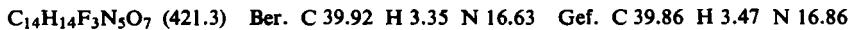
*Alkoholyse von N-TFA-L-Asparaginsäureanhydrid (II):* 1.3 g *II* in 15 ccm absolut. Äthanol wurden 15 Min. bei 20° stehengelassen und sodann 10 Min. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Eindampfen i. Vak. wurde eine Probe mit *Diazomethan* (in Äther) verestert und an einer Kapillarsäule (s. Tab. 1) gaschromatographiert. Das Verhältnis von *L-Äthylester* : *4-Äthylester* war 77 : 23. Die präparative Trennung der Monoäthylester über die Dicyclohexylammoniumsalze ist bereits beschrieben worden<sup>21</sup>.

*DL-2-Trifluoracetamino-4-oxo-buttersäure-äthylester (racem. V): N-TFA-DL-Asparaginsäure-1-äthylester-4-chlorid* (analog der *L*-Verbindung<sup>2</sup>) hergestellt, Schmp. 94–96°,  $\text{C}_8\text{H}_9\text{ClF}_3\text{NO}_4$  (275.6) Ber. C 34.87 H 3.27 Cl 12.88 N 5.08, Gef. C 34.51 H 3.51 Cl 12.24 N 4.74 wurde nach l. c.<sup>12</sup>) mit Pd/Bariumsulfat-Katalysator in Gegenwart von Chinolin-Schwefel-Regulator<sup>13)</sup> in Xylol reduziert. Die HCl-Entwicklung setzte bei etwa 120° ein. Sobald sie beendet war (2–4 Std.), wurde noch heiß durch ein Filterbett aus Cellulose-Aktivkohle gesaugt, worauf der *Aldehyd* auskristallisierte.

Aus 2.75 g Säurechlorid in 30 ccm Xylol mit 0.5 g Katalysator und 0.02 ccm Regulator wurden innerhalb von 4 Std. (Bad zunächst 130°, sodann 90°) bis zu 85% Aldehyd erhalten. Schmp. 69–71°, aus Xylol derselbe Schmp.



*2,4-Dinitro-phenylhydrazon*: Gelbe Nadelchen (aus Äthanol), Schmp. 181–182°.



*L-2-Trifluoracetamino-4-oxo-buttersäure-äthylester (V):* 22 g (80 mMol) des *L-Säurechlorids*<sup>2)</sup> wurden in 200 ccm Xylol in Gegenwart von 6 g Katalysator und 5 Tropfen Regulator bei einer Badtemperatur von 130°, später 100°, während 3 1/2 Std. wie vorstehend reduziert. Aus Xylol lange, glänzende Nadeln (wie Glaswolle), Ausb. 17.2 g (89%), Schmp. 86–87°; aus der Mutterlauge erhält man noch 0.9 g (4.6%) vom Schmp. 78–82°, wenig löslich in kaltem Wasser, in den üblichen organischen Lösungsmitteln gut löslich.  $[\alpha]_{546}^{20} : +8.7^\circ$  ( $c = 1.8$  in absolut. THF).

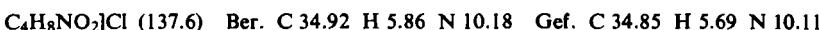


12) Methoden der organ. Chemie (Houben-Weyl), Bd. 7/I, S. 285 ff., G. Thieme Verlag, Stuttgart 1954.

13) l. c.<sup>12</sup>) S. 289.

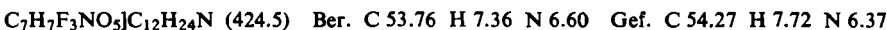
**2.4-Dinitro-phenylhydrazon:** Gelbe Nadelchen, Schmp. 167–168° (aus Äthanol).

**L-Homoserinlacton-hydrochlorid (VII):** Der Lösung von 3.63 g (15 mMol) *V* in 28 ccm Methanol/H<sub>2</sub>O (25 : 3) wurden unter Rühren innerhalb einer Stde. 0.40 g (10.8 mMol) *Natriumborhydrid* in 6 ccm Wasser zugetropft. Durch gleichzeitiges Zugeben von 2*n* HCl wurde der pH-Wert zwischen 5 und 7 gehalten. Nach dem Ansäuern mit verd. Salzsäure auf pH 2 wurde i. Vak. das Methanol verdampft, das ausgeschiedene Öl in Äther aufgenommen und die wässr. Lösung nach Neutralisation mit *Natriumhydrogencarbonat* mehrmals mit Äther ausgezogen. Beim Verdampfen der äther. Lösungen hinterblieb ein Öl (*N-TFA-L-Homoserin-äthylester*). Es wurde in 10 ccm Äthanol gelöst und mit 2mal 20 ccm halbkonz. Salzsäure (2. Zugabe nach 15 Min.) 30 Min. auf dem Wasserbad erhitzt. Sodann wurde eingedampft und wiederholt Äthanol nachdestilliert. Aus absolutem Äthanol fielen 1.77 g feine farblose Nadelchen aus, Schmp. 215–217° (Zers.). Der Rückstand der zur Trockne eingedampften äthanol. Mutterlauge wurde nochmals mit 10 ccm halbkonz. Salzsäure erhitzt: Weitere 0.33 g, Schmp. 216–217°. Gesamtausb. 92%. Zur Analyse wurde aus wenig Wasser mit Äthanol gefällt: noch 74%, Schmp. 219° (Zers.). Das IR-Spektrum stimmt völlig mit dem von GREENSTEIN<sup>5)</sup> angegebenen überein, ebenso die optische Drehung.

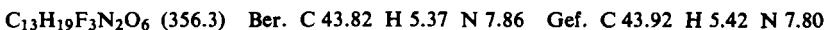


Die ebenfalls nach GREENSTEIN<sup>5)</sup> vorgenommene Überführung in *L-Homoserin* ergab ein in allen Angaben übereinstimmendes Produkt.

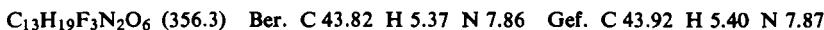
**N-Trifluoracetyl-L-asparaginsäure-4-methylester-L-dicyclohexylammoniumsalz:** Aus *L-Asparaginsäure-4-methylester-hydrochlorid*<sup>14)</sup> wurde mit *Triäthylamin* der freie Ester (Schmp. nach Krist. aus Wasser/Methanol/Äthanol 187° (Zers.),  $[\alpha]_{546}^{20} : +26.8^\circ$ ,  $c = 2.6$  in 6*n* HCl) hergestellt. 4.4 g (30 mMol) davon wurden mit 15 ccm (81 mMol) *Trifluoressigsäure-phenylester*<sup>15)</sup> 3 Stdn. auf 90° erhitzt. Sodann wurde das *Dicyclohexylammoniumsalz* in Diisopropyläther hergestellt: Ausb. 12 g, Schmp. 153–156°; aus Essigester 10.2 g (83%), Schmp. 156° (Zers.),  $[\alpha]_{546}^{20} : +6.4^\circ$  ( $c = 2$  in absolutem Methanol).



**N-Trifluoracetyl-*a-L-asparagyl-L-valin-dimethylester*:** Zu 1.22 g (5.00 mMol) *N-TFA-L-Asparaginsäure-4-methylester*, aus 2.12 g des *Dicyclohexylammoniumsalzes* mit Dowex 50 (H<sup>+</sup>-Form) hergestellt, und 0.66 g (5.00 mMol) i. Vak. dest. *L-Valin-methylester* in 40 ccm absolutem Acetonitril wurden bei –30° 1.13 g (5.5 mMol) *DCCI* in wenig Acetonitril unter Schütteln innerhalb von 10 Min. gegeben. Sodann bewahrte man 14 Stdn. bei 0° auf. Nach dem Absaugen des *Dicyclohexyl-harnstoffs* wurde i. Vak. eingedampft, der krist. Rückstand in Essigester gelöst und die Lösung mit verd. Salzsäure, *Natriumhydrogencarbonat* und Wasser gewaschen, mit *Natriumsulfat* getrocknet und eingedampft. Nach 2maligem Umkrist. aus Essigester/Diisopropyläther Ausb. 1.2 g (68%) Nadeln, Schmp. 112–113°,  $[\alpha]_{546}^{20} : -25.4^\circ$  ( $c = 2.3$  in Essigester).



**N-Trifluoracetyl-*β-L-asparagyl-L-valin-dimethylester*:** Darstellung wie vorstehend aus *N-Trifluoracetyl-L-asparaginsäure-I-methylester*<sup>16)</sup>. Ausb. 73% (2mal aus Essigester/Diisopropyläther), Nadelchen vom Schmp. 150–151°,  $[\alpha]_{546}^{20} : +6.2^\circ$  ( $c = 1.7$  in Essigester).



<sup>14)</sup> H. SCHWARZ, F. M. BUMPUS und I. H. PAGE, J. Amer. chem. Soc. **79**, 5697 [1957].

<sup>15)</sup> F. WEGAND und A. RÖPSCH, Chem. Ber. **92**, 2095 [1959]; vgl. dazu I. c.4).

<sup>16)</sup> Y. LIWSCHITZ, R. D. IRSAY und A. I. VINCZE, J. chem. Soc. [London] **1959**, 1308.

*N-Trifluoracetyl-L-asparaginsäure-1-benzylester-4-dicyclohexylammoniumsalz:* 8.44 g (40 mMol) *N-TFA-L-Asparaginsäureanhydrid* (II) wurden mit 10 ccm frisch dest. *Benzylalkohol* 1 Stde. auf 100° erhitzt. Nach dem Abkühlen verdünnte man mit 60 ccm Äther und tropfte 8 ccm *Dicyclohexylamin* unter Kühlung und Reiben ein. 12 g *Dicyclohexylammoniumsalz* (60%), Schmp. 161–165°, fielen aus. Sie wurden mit Wasser bei 90° digeriert, abgesaugt und gewaschen: 9.6 g (48%), Schmp. 166–168°. Aus Wasser/Äthanol Schmp. 168–170°,  $[\alpha]_{546}^{20}$ : –15.5° (c = 1 in absol. Methanol).

$C_{25}H_{35}F_3N_2O_5$  (500.6) Ber. C 59.98 H 7.05 N 5.60 Gef. C 60.32 H 7.06 N 5.82

*N-Trifluoracetyl-L-asparaginsäure-1-benzylester:* 9.3 g der voranstehenden Verbindung wurden mit 24 g Dowex 50 (H<sup>+</sup>-Form) in 150 ccm Äthanol geschüttelt. Aus dem Filtrat nach Eindampfen i. Vak. aus Äther/Petroläther Ausb. 5.2 g (88%), Schmp. 116–117°,  $[\alpha]_{546}^{20}$ : –35.3° (c = 2.3 in Essigester).

$C_{13}H_{12}F_3NO_5$  (319.2) Ber. C 48.90 H 3.79 N 4.39 Gef. C 49.08 H 3.84 N 4.68

*N-Trifluoracetyl-β-L-asparagyl-L-valin-methylester:* Die Lösung von 3.2 g (10 mMol) *N-TFA-L-Asparaginsäure-1-benzylester* und 1.3 g (10 mMol) *L-Valin-methylester* in 40 ccm absol. Acetonitril wurde bei 20° mit 2.2 g *DCCI* (11 mMol) in wenig Acetonitril versetzt und 12 Stdn. bei 0° aufbewahrt. Ausb. aus Essigester/Äther/Petroläther 3.3 g (77%) *N-Trifluoracetyl-β-L-asparagyl(α-benzylester)-L-valin-methylester*, Schmp. 152–154°.

Zur Entfernung der Benzylgruppe wurde mit Pd/Bariumsulfat-Katalysator in absol. Methanol hydriert, nach Absaugen des Katalysators i. Vak. eingedampft, in Essigester gelöst und mit Natriumhydrogencarbonatlösung ausgezogen. Beim Ansäuern fielen 2.5 g (95%) *N-TFA-β-L-Asp-L-Val-OCH<sub>3</sub>* aus, Schmp. 162–164° (auch nach Umkristallisieren aus Äthanol/Diisopropyläther),  $[\alpha]_{546}^{20}$ : +24.3° (c = 1.3 in Essigester).

$C_{12}H_{17}F_3N_2O_6$  (342.3) Ber. C 42.10 H 5.01 N 8.18 Gef. C 42.20 H 5.08 N 8.08

*N-Trifluoracetyl-α-L-asparagyl-L-valin-methylester:* Der Lösung von 2.11 g (10 mMol) *N-TFA-L-Asparaginsäureanhydrid* (II) wurde bei 0° 1.35 g (10 mMol) dest. *L-Valin-methylester* zugegeben. Nach 2stdg. Stehenlassen bei 20° wurde i. Vak. eingeengt, das zurückbleibende Öl, in Äthanol gelöst, mit 1.75 ccm (9.00 mMol) *Dicyclohexylamin* versetzt und das ausgefallene, mit Äther gewaschene *Dicyclohexylammoniumsalz* vom Schmp. 184–185° (1.7 g, 32%) mit 3.5 g Dowex 50 (H<sup>+</sup>-Form) in Methanol/Wasser (1:1) zerlegt. Aus dem Filtrat kristallisierten 0.9 g (26%) *N-TFA-α-L-Asp-L-Val-OCH<sub>3</sub>*, Schmp. 120–122°,  $[\alpha]_{546}^{20}$ : –30.0° (c = 1.7 in Essigester).

$C_{12}H_{17}F_3N_2O_6$  (342.3) Ber. C 42.10 H 5.01 N 8.18 Gef. C 42.05 H 5.08 N 8.03

*Umsetzung von N-Trifluoracetyl-L-asparaginsäureanhydrid (II) mit Aminosäureestern für die gaschromatographischen Untersuchungen*

a) Die Lösung von 1 mMol *N-TFA-L-Asparaginsäureanhydrid* in wenig absol. THF wurde, mit dem gleichen Vol. Äther verdünnt, mit 1 mMol dest. *Aminosäureester* versetzt, 2 Stdn. bei 20° stehengelassen und danach i. Vak. eingedampft. Die nach dem Verreiben des Rückstandes mit Diisopropyläther/Petroläther anfallende Festsubstanz wurde entweder in Essigester gelöst direkt eingespritzt (*N-TFA-L-Asparagyl-aminosäure-monomethylester*) oder nach Veresterung mit *Diazomethan* in absol. THF (*N-TFA-L-Asparagyl-aminosäure-dimethylester*).

b) Statt der dest. Aminosäureester wurden ihre Lösungen in THF eingesetzt, hergestellt aus äquiv. Mengen (je 1 mMol) Aminosäuremethylester-hydrochlorid und Triäthylamin in absol. Chloroform (2–4 ccm). Nach Fällen des Triäthylamin-hydrochlorids mit absol. Äther (3–5 ccm) und vorsichtigem Einengen des Filtrats i. Vak. wurde weiter wie bei a) verfahren.

Abweichend von Tab. 2 ergaben sich so bei der gaschromatographischen Bestimmung der Aminolyseprodukte nach Veresterung mit Diazomethan folgende Verhältnisse:

Aminolyse mit Methylester von	$\alpha$ -L-L-Peptid %	Imide ( $I_1 + I_2$ ) %	$\beta$ -L-L-Peptid %
L-Valin	69	2	29
L-Leucin	44	41	15
L-Alanin	34	36	30
L-Phenylalanin	8	78	14

c) *Imidsynthesen*: Die nach a) erhaltenen Isomerengemische der *N*-TFA-Dipeptid-mono-methylester wurden in absol. Acetonitril bei 0° mit der äquiv. Menge *DCCI* versetzt, der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abgesaugt, das Filtrat i. Vak. eingedampft und der ölige Rückstand, in Essigester gelöst, direkt eingespritzt.

*Imidbildung bei der Behandlung von N-TFA- $\alpha$ -L-Asparagyl-*L*-aminoäure-dimethylestern mit Triäthylamin*: Die *N*-TFA- $\beta$ -L-Asparagyl-*L*-aminoäure-dimethylester wurden mit Hilfe der Dicyclohexylcarbodiimid-Synthese bei 0° in absol. Acetonitril aus dem *N*-TFA-*L*-Asparagin-säure-*L*-methylester und den jeweiligen dest. Aminoäureestern hergestellt. Auf je 50 mg, gelöst in absol. Acetonitril, ließ man bei 20° 4 Stdn. 3 Tropfen *Triäthylamin* einwirken, dampfte das Lösungsmittel danach i. Vak. ab und entfernte restliches *Triäthylamin* über konz. Schwefelsäure i. Vak.

In der folgenden Übersicht sind die aufgefundenen Verhältnisse quantitativ (Gaschromatogramme) sowie qualitativ (Dünnschichtchromatogramme, Laufmittel: Chloroform/Aceton (4:1), Entwickler: tert.-Butylhypochlorit/Kaliumjodid-Stärke) dargestellt.

<i>N</i> -TFA-Dipeptid-dimethylester von	Gaschromatogramm		Dünnschichtchromatogramm	
	$\alpha$ -Peptid %	Imide %	$\alpha$ -Peptid %	Imide %
$\alpha$ -L-Asp-L-Val	100	—	+	—
	93	7	+	+
$\beta$ -L-Asp-L-Val		$\beta$ -Peptid	Imide	$\beta$ -Peptid
	100		Spur	+
vor TÄA-Behandlung	78	22		—
			+	+
$\beta$ -L-Asp-L-Leu	75	25	+	—
	35	65	+	+
$\beta$ -L-Asp-L-Ala	64	36		**)
	—	100		**)

\*) TÄA = Triäthylamin.

\*\*)  $\beta$ -Peptid und Imid waren nicht trennbar.

*Verseifung der isomeren N-TFA- $\alpha$ -L-Asparagyl-*L*-valin-dimethylester in 0.1n NaOH*: Je ca. 40 mg des  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptid-derivates wurden in 3 ccm 0.1n NaOH bei 20° gelöst, die Lösungen nach 8 Min. (vom Beginn der Zugabe an gerechnet) mit verd. Salzsäure neutralisiert und i. Vak. ohne zu erwärmen eingedampft. Die Lösung des halbkristallinen Rückstandes in Essigester wurde mit verd. Salzsäure und anschließend mit Natriumhydrogencarbonatlösung geschüttelt, getrocknet und i. Vak. eingeengt. Der Rückstand der  $\alpha$ -Peptidprobe kristallisierte, während bei der  $\beta$ -Peptidprobe nur noch wenig Öl anfiel. Gaschromatogramme s. Abbild. 3 und 4.