

HARTMUT NIEDRICH

Hydrazinverbindungen als Heterobestandteile in Peptiden, VI¹⁾

Weitere Derivate der Hydrazinoessigsäure und ihre Verwendung zur Synthese von Hydrazino- und *N*-Amino-peptiden *)

Aus dem Institut für Pharmakologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Berlin-Buch

(Eingegangen am 25. März 1965)

Als Schutzgruppen werden Isopropyliden und Tosyl am β -Stickstoff sowie tert.-Butyloxycarbonyl und Benzyloxycarbonyl am α - und β -Stickstoff des Hydrazinoessigsäure-äthylesters eingeführt. Die Einsatzfähigkeit dieser Produkte zur Synthese von Heteropeptiden wird am Beispiel ihrer Glycinpeptide erprobt. Ferner wird die Anwendbarkeit verschiedener Peptidsynthesemethoden zur Acylierung des frei verbliebenen α - oder β -Stickstoffs untersucht. Die isomeren Hydrazide und *N*-Amino-amide zeigen charakteristische Unterschiede in den IR-Spektren.

Um den freien, nucleophilen α -Stickstoff der Hydrazinopeptide vom Typ
 $Z-\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO}-\text{N}^\beta\text{H}-\text{N}^\alpha\text{H}-\text{CH}_2-\text{COX}$

zu schützen und diese Verbindungen für weitere Peptidsynthesen verwenden zu können, waren durch direkte Acylierung der Tosyl-²⁾ und der Benzyloxycarbonyl-Rest³⁾ in die Heterodipeptide eingeführt worden. Diese Möglichkeit ist infolge von Komplikationen bei der Einführung und Abspaltung in Abhängigkeit vom Aminosäurepartner nur beschränkt anwendbar.

Für die Synthese höherer Peptide ist der tert.-Butyloxycarbonyl-Rest als Schutzgruppe für NH₂- und OH-Gruppen in den Seitenketten von großem Vorteil⁴⁾. Die Einführung von BOC⁵⁾ am α -Stickstoff von Hydrazinopeptiden gelingt jedoch weder über den BOC-Nitrophenylester⁶⁾ noch mittels BOC-Azid⁷⁾.

Den selektiven Schutz des α - oder des β -Stickstoffs der Hydrazinosäuren und die anschließende Anknüpfung von geschützten Aminosäuren an den frei verbliebenen Stickstoff zu Hydrazino- und *N*-Amino-peptiden untersuchten wir zunächst am Beispiel des Hydrazinoessigesters und seiner Glycinpeptide.

*) Auszugsweise vorgetragen auf dem VII. Europäischen Peptidsymposium, Budapest 1964.

1) Die Arbeit *H. Niedrich*, Chem. Ber. 97, 2527 (1964), über Aminosäure- und Peptidsemicarbazide, zählt als V. Mitteil. dieser Reihe. IV. Mitteil.: *H. Niedrich* und *R. Grupe*, J. prakt. Chem. 27, 108 (1965).

2) *H. Niedrich*, Chem. Ber. 96, 2774 (1963).

3) *H. Niedrich* und *W. Knobloch*, J. prakt. Chem. 17, 263 (1962).

4) *R. Schwyzer* und *H. Kappeler*, Helv. chim. Acta 46, 1550 (1963).

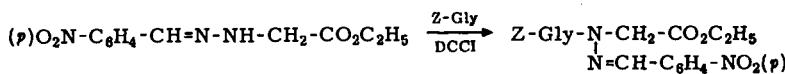
5) Abkürzungen: BOC = tert.-Butyloxycarbonyl, Z = Benzyloxycarbonyl, DCCI = Di-cyclohexylcarbodiimid, TFA = Trifluoressigsäure, DMF = Dimethylformamid, Gly = Glycyl; N $^\alpha$ -X-(NH₂)-Gly bzw. N $^\beta$ -X-NH-Gly = Hydrazinoacetyl an N $^\alpha$ bzw. N $^\beta$ substituiert.

6) *G. W. Anderson* und *A. C. McGregor*, J. Amer. chem. Soc. 79, 6180 (1957).

7) *R. Schwyzer*, *P. Sieber* und *H. Kappeler*, Helv. chim. Acta 42, 2622 (1959).

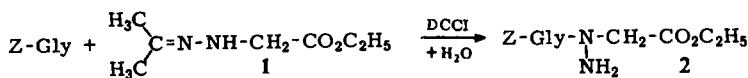
A. N^{β} -SCHUTZ DURCH DEN p -NITRO-BENZYLIDEN-REST

[p -Nitro-benzyliden]-hydrazinoessigsäure-äthylester ließ sich in geringfügiger Ausbeute mit Z-Glycin nach der DCCI-Methode⁸⁾ acylierten. Dieses Hydrazon ist gegen HCl und HBr/Eisessig stabil. Eine milde Abspaltung des Aldehyds gelingt nicht.



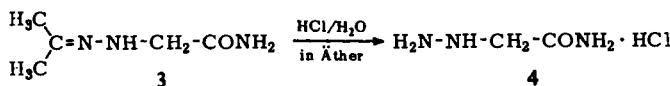
B. N^{β} -SCHUTZ DURCH DEN ISOPROPYLDEN-REST

Beim Lösen von freiem Hydrazinoessigester in Aceton entsteht unter Erwärmen der Isopropyliden-hydrazinoessigsäure-äthylester (**1**), der sofort, jedoch besser nach Isolierung durch Destillation, am α -Stickstoff mittels DCCI acyliert werden kann. Bei der Aufarbeitung spaltet der Isopropyliden-Rest spontan ab.



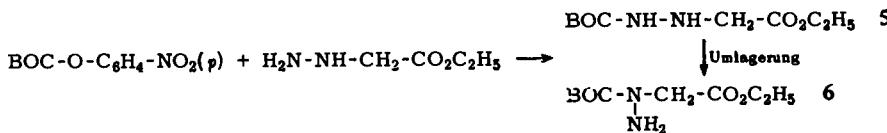
(N -Acyl-Derivate von **2** sind unter D. und E. beschrieben.) Die N -Amino-Struktur wurde durch Herstellung des Benzyliden-Derivates von **2** bewiesen.

1 wird durch NH₃/Methanol in Isopropyliden-hydrazinoacetamid (**3**) übergeführt, von dem die Schutzgruppe mit HCl in organischen Lösungsmitteln momentan entfernt wird.

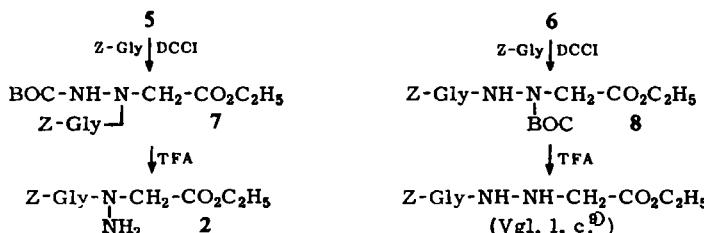


C. N^{α} - UND N^{β} -SCHUTZ DURCH TERT.-BUTYLOXYCARBONYL-REST

Beim Verschmelzen von BOC-Nitrophenylester mit Hydrazinoessigester entsteht ein Gemisch von N^{β} - und N^{α} -BOC-Hydrazinoessigsäure-äthylester (**5** und **6**), die durch zweifache Vakuumdestillation getrennt werden.



Bei der Destillationstemperatur wurde eine geringe Umlagerung von **5** zu **6** beobachtet. Die Struktur konnte, außer durch das *o*-Hydroxy-benzyliden-Derivat von **6**, durch folgende Synthese bewiesen werden.



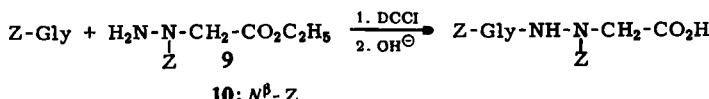
⁸⁾ J. C. Sheehan und G. P. Hess, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1067 (1955).

⁹⁾ W. Knobloch und H. Niedrich, J. prakt. Chem. **17**, 273 (1962).

Die Endprodukte waren mit den auf anderen Wegen erhaltenen Z-Glycyl-hydrazinoessigestern identisch. **7** und **8** konnten auch aus einem Gemisch von **5** und **6** hergestellt und durch fraktionierte Kristallisation getrennt werden.

D. N^{α} - UND N^{β} -SCHUTZ DURCH DEN BENZYLOXYCARBONYL-REST

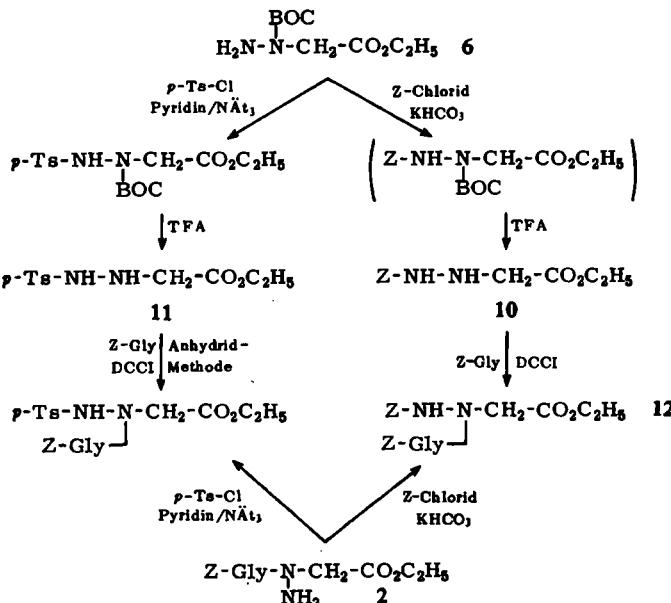
Aus dem Z-Nitrophenylester und Hydrazinoessigester wird ebenfalls ein Gemisch von N^{α} - und N^{β} -Benzylloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure-äthylester (**9** und **10**) erhalten. Während **10** auskristallisiert, kann **9** durch Vakuumdestillation rein erhalten werden. Der aus Z-Glycin und **9** mit DCCI erhaltene Ester war nach Verseifung mit der auf anderem Wege dargestellten N^{α} -Benzylloxycarbonyl- N^{β} -[benzylloxycarbonyl-glycyl]-hydrazinoessigsäure³⁾ identisch.



Eine zweite Möglichkeit zur Gewinnung von **10** geht von **6** aus. Durch Behandlung mit Z-Chlorid in KHCO_3 -Lösung erhält man nicht kristallisierbares Z-NH-N-(BOC)-CH₂-CO₂C₂H₅, aus dem mit TFA in situ **10** entsteht. Die Anknüpfung von Z-Gly an den α -Stickstoff von **10** mit DCCI liefert das gleiche Produkt **12**, das durch Einwirkung von Z-Chlorid auf **2** erhalten wurde (vgl. Formelschema).

E. N^{β} -SCHUTZ DURCH DEN TOSYLREST (vgl. Formelschema)

Mittels *p*-Tosylchlorid/Triäthylamin in Pyridin²⁾ lässt sich der β -Stickstoff von **6** leicht tosylieren. Abspaltung von BOC mit TFA ergibt N^{β} -Tosyl-hydrazinoessigsäure-äthylester (**11**). Die Acylierung des freien α -Stickstoffs mit Z-Gly nach der DCCI-

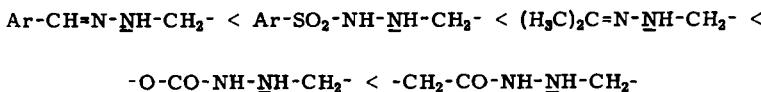


Methode zeigte keinen verwertbaren Erfolg (14%). Die Methode der gemischten Anhydride¹⁰⁾ ergab dagegen 40% Ausbeute.

Eine Verminderung der Nucleophilie des α -Stickstoffes durch die Nachbarschaft der stark elektronegativen Sulfonylgruppierung und die erschwerte sterische Zugänglichkeit mögen Gründe hierfür sein, denn bei den entsprechenden Acylierungen von 5 und 10 konnten mit DCCI ca. 60% Ausbeute erhalten werden.

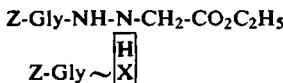
Weitaus günstiger liegen die Ausbeuten bei der Acylierung von Hydrazino-dipeptiden. N^α -Acylierung von Z-Gly-NH-NH-CH₂-CO₂C₂H₅ erfolgt zu 90%³⁾.

Die Nucleophilie des α -Stickstoffes, gemessen an der Acylierung mittels DCCI, nimmt in folgender Reihenfolge zu:



Die Abhängigkeit der N^α -Acylierbarkeit von der Acylierungsmethode geht aus Tab. I hervor.

Tab. 1. Ausbeuten bei der Acylierung



Methode	% Ausb.	Methode	% Ausb.
1. DCCI	89	4. Azid-	< 5
2. Gemischtes Anhydrid	70	5. Nitrophenylester	0
3. Mit <i>p</i> -Ts-Gly-Cl	80		

Während Nitrophenylester nicht reagieren, überwiegen bei der Azid-Methode infolge des langsamens Reaktionsablaufes die Nebenreaktionen¹¹⁾, wie die Anwesenheit von Z-Gly-NH₂ im Reaktionsprodukt zeigt.

Die hier beschriebenen methodischen Grundlagen sind in gewissem Ausmaß auf Heteropeptide mit anderen Aminosäure- und Hydrazinosäure-Komponenten übertragbar. Darüber wird an anderer Stelle berichtet.

IR-SPEKTREN

Die in Tab. 2 angeführten Substanzen enthalten Carbonylgruppen, die zu Carbamid-, Hydrazid-, *N*-Amino-amid- und Estergruppierungen gehören. Entsprechend vielfältig erscheint die Carbonylbande um 1750/cm.

Charakteristisch für *N*-Amino-Bindungen ist die tiefe Aufspaltung der C=O-Bande und die Intensivierung der C=O-Schwingung mit der niedrigsten Wellenzahl (wahrscheinlich der *N*-Amino-amid-Bindung zuzuordnen) sowie das Auftreten der NH₂-Valenzschwingung um 1640/cm. Die Amid II-Bande um 1520/cm findet sich nur bei 7) und 8), die eine Carbamid-Struktur enthalten.

10) R. A. Boissonnas, Helv. chim. Acta 34, 874 (1951).

11) E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. 659, 168 (1962); J. Honzík und J. Rudinger, Collect. czechoslov. chem. Commun. 26, 2333 (1961).

Tab. 2. Charakteristische IR-Banden (cm^{-1})

Verbindung	C=O	Amid II	-NH ₂	
1) BOC-NH-NH ₂	1732	—	1637	1462
2) (CH ₃) ₂ C=N-NH-CH ₂ -CO ₂ C ₂ H ₅ (1)	1750	—	—	1448
3) BOC-NH-NH-CH ₂ -CO ₂ C ₂ H ₅ (5)	1755 1730	—	—	1458
4) BOC-N-CH ₂ -CO ₂ C ₂ H ₅ (6)	1775 1735	—	1650	—
5) Z-NH-NH-CH ₂ -CO ₂ C ₂ H ₅ (10)	1745 1730	—	—	1462
6) Z-N-CH ₂ -CO ₂ C ₂ H ₅ (9)	1750 1715	—	1635	—
7) Z-Gly-NH-NH-CH ₂ -CO ₂ C ₂ H ₅	1735	1520	—	(1465)
8) Z-Gly-N-CH ₂ -CO ₂ C ₂ H ₅ (2)	1762 1745 1698	1515	—	—

Die Verbindungen mit einer Hydrazidbindung zeigen um 1450/cm eine ausgeprägte Bande, die den N-Amino-amiden fehlt. Eine Aufspaltung der NH-Valenzschwingung im Bereich 3200–3400/cm weist ebenfalls auf das Vorliegen einer Hydrazidbindung hin. Nach diesen Merkmalen kann die Position des Acylrestes an Acylhydrazino-säureestern bestimmt werden.

Für zuverlässige technische Mitarbeit sei Frau E. Seidel gedankt. Die Mikroanalysen wurden von Frau F. Knobloch und N. Smirnowa angefertigt. Für die Aufnahme der IR-Spektren bin ich Herrn Dipl.-Phys. K. Schwarz, Institut für Biophysik der DAdW, verbunden.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Mikro-Heiztisch nach Boetius bestimmt und sind korrigiert. Für die Dünnschichtchromatographie verwandte man Aluminiumoxid*) und Essigester/Methanol/n-Heptan (1:1:5), wobei die Reproduzierbarkeit der R_F -Werte einige Schwierigkeiten bereitete. Anfärbung erfolgte mit Ninhydrin sowie mit *p*-Dimethylamino-benzaldehyd in verd. Salzsäure. Die Analysenproben wurden 5 Stdn. bei 55°/0.1 Torr getrocknet. Die IR-Spektren nahm man mit dem UR 10 vom VEB Zeiss Jena auf. Substanzen, die in Tetrachlorkohlenstoff schwer löslich waren, wurden in Chloroform vermessen.

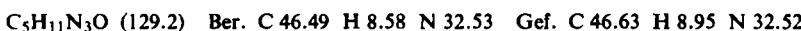
Isopropyliden-hydrazinoessigsäure-äthylester (1): 11.8 g *Hydrazinoessigsäure-äthylester* (100 mMol, frisch dest.) werden in ca. 60 ccm Aceton gelöst. Unter Erwärmung tritt Reaktion ein. Nach 30 Min. wird überschüss. Aceton i. Vak. entfernt und die verbleibende Flüssigkeit (16.6 g) an der Ölzpumpe destilliert. Sdp._{0.2} 71–72°, Ausb. 15.1 g (95%), n_D^{20} 1.4582, R_F 0.72, Schmp. –3 bis –1°.



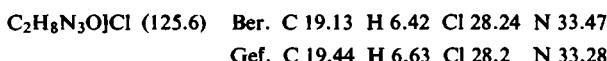
Die Isopropilengruppe wurde durch Zugabe von *HCl* in Äther zur alkohol. Lösung momentan abgespalten und das ausgefallene Produkt als *Hydrazinoessigsäure-äthylester-hydrochlorid* identifiziert.

*) Aluminiumoxid zur Dünnschichtchromatographie des VEB-Chemiewerkes Greiz-Döla.

Isopropyliden-hydrazinoacetamid (**3**): 8.0 g (50 mMol) **1** löst man in ca. 100 ccm mit Ammoniak gesätt. Methanol und läßt 24 Stdn. stehen. Nach Einengen i. Vak. wird der Rückstand mit Äther verrieben; man erhält 4.75 g kristallines Produkt, Schmp. 76–80°. Vom Filtrat wird der Äther entfernt; nach erneuter Einwirkung von NH₃/Methanol erhält man weitere 1.07 g, Gesamtausb. 90%. Das Produkt ist zur Weiterverarbeitung rein genug. Beim Erwärmen erfolgt Zersetzung. Die Reinigung durch Lösen in Essigester unter Zusatz von wenig Aceton und Fällen mit Äther ist verlustreich. R_F 0.14.



Hydrazinoacetamid-hydrochlorid (**4**): 1.3 g **3** in 10 ccm Methanol werden nach Filtrieren mit ca. 5 ccm HCl-gesätt. Äther versetzt und der Niederschlag nach weiterer Ätherzugabe kristallin gerieben. Rohausb. 1.2 g. Nach Lösen in wenig heißem Wasser und Fällen mit Methanol und Äther Schmp. 176–180°. Die Analysenprobe schmolz bei 183–185° (aus Methanol).



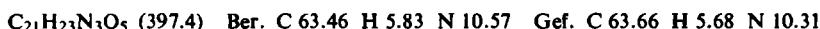
N^a-[Benzylloxycarbonyl-glycyl]-hydrazinoessigsäure-äthylester (**2**): Eine auf 0° gekühlte Lösung von 11.8 g frisch dest. Hydrazinoessigsäure-äthylester in 200 ccm Aceton wird nach Auflösen von 21 g *Z-Glycin* (0.10 Mol) portionsweise mit 20.5 g DCCI versetzt. Nach 24 Stdn. bei Raumtemperatur fügt man 0.5 ccm Eisessig hinzu, entfernt nach einer weiteren Stde. das Aceton i. Vak., löst in 200 ccm Essigester, schüttelt mit n HCl, n KHCO₃ und Wasser aus und erhält nach Einengen einen Sirup, aus dem nach Verreiben mit feuchtem Äther/Hexan nach 48 Stdn. im Kühlschrank 9.4 g (30%), Schmp. 55–60°, auskristallisieren. Aus Benzol/Hexan 8.9 g. Schmp. der Analysenprobe 64–65°.



Aus den verbleibenden 18 g Sirup werden noch 10.1 g reines *Benzal-Derivat* isoliert, so daß die Gesamtausb. 55.5% beträgt.

Bei Einsatz von 10 mMol isoliertem Isopropyliden-hydrazinoessigester in 20 ccm Dioxan wurde auf gleiche Weise eine Rohausb. von 1.75 g (57%), Schmp. 54–57°, erhalten.

Benzal-Derivat: 310 mg vorstehender Verbindung werden mit 120 mg *Benzaldehyd* 15 Min. bei 100° verschmolzen. Aus Äthanol 355 mg (90%), Schmp. 121–122°.



p-Nitro-benzal-Derivat: Zweimal aus Äthanol/Wasser umkristallisiert, Schmp. 154–156°.

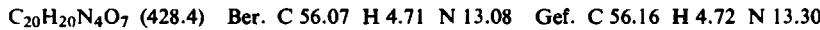


o-Hydroxy-benzal-Derivat: Zweimal aus Methanol umkristallisiert, Schmp. 150–152°.



N^a-[Benzylloxycarbonyl-glycyl]-hydrazinoessigsäure-methylester: Wie bei **2** beschrieben, werden aus 25 mMol Ausgangsprodukt 4.55 g (61%) nicht kristallisierbarer Sirup erhalten.

p-Nitro-benzal-Derivat: Aus 650 mg sirupöser Verbindung Ausb. 750 mg Derivat (80%) vom Schmp. 149–152°. Aus Methanol Schmp. 150–152°.



Die gleiche Verbindung konnte, allerdings in sehr geringen Ausbeuten, wie folgt erhalten werden:

Beim Zusammengießen von 2.8 g *Hydrazinoessigester-hydrochlorid* in 120 ccm 0.5*n* HCl und 3.0 g *p-Nitro-benzaldehyd* in 50 ccm Äthanol fällt das Benzal-Derivat aus. Ausb. 4.2 g (88%). Nach zweimaliger Umkristallisation aus Äthanol Schmp. 120–121°.



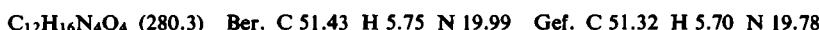
0.6 g [*p-Nitro-benzyliden*]-*hydrazinoessigester* und 0.53 g *Z-Glycin* in 10 ccm DMF werden mit 0.51 g *DCCI* kondensiert. Nach üblicher Aufarbeitung verbleiben 0.6 g, Schmp. 112 bis 118°. Unter starken Verlusten können nach dreimaligem Umkristallisieren aus Methanol 30 mg, Schmp. 142–144°, erhalten werden. Misch-Schmp. ohne Depression.



N^a-Glycyl-hydrazinoessigsäure-äthylester-hydrobromid: Man löst bei absolutem Feuchtigkeitsausschluß 3.1 g **2** in 15 ccm 4*n* *HBr/Eisessig* unter kräftigem Rühren. Ein Körnchen Phenol fängt evtl. vorhandenes freies Br₂ ab. Nach 30 Min. fällt man das Produkt durch schnelle Zugabe von absol. Äther, saugt ab, wäscht mit Äther, löst in wenig absol. Methanol und tropft die Lösung in Äther ein. Ausb. 2.86 g (95%) reines, nicht hygroskopisches Produkt, Schmelzbereich 154–165°.



N^a-[Benzylloxycarbonyl-glycyl]-hydrazinoacetamid: Man lässt 1.0 g **2** mit NH₃-gesätt. Methanol und lässt 24 Stdn. stehen. Dabei scheidet sich das *Amid* aus; Ausb. 720 mg (79%), Schmp. 144–149°. Schmp. der Analysenprobe 147–149° (aus Äthanol, 600 mg).



Benzal-Derivat: 2.0 g *Benzal-Derivat des Esters* **2** werden in einer Druckflasche in 25 ccm mit NH₃-gesätt. Methanol durch Erwärmen auf 40° gelöst und bei Raumtemperatur belassen. Nach 24 Stdn. sind 1.45 g (78%), Schmp. 195–200°, auskristallisiert. Aus viel Äthanol Schmp. 198–200°.

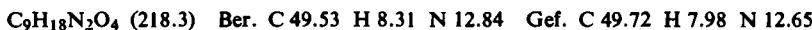


N^a-[Benzylloxycarbonyl-glycyl]-N^b-[benzylloxycarbonyl-L-valyl]-hydrazinoessigsäure-methyl-ester: 2.51 g *Z-Val* (10 mMol) und 2.97 g sirupöses *N^a-Z-Gly-(NH₂)-Gly-OCH₃* in 20 ccm Dioxan werden mit 2.03 g *DCCI* verknüpft. Nach üblicher Aufarbeitung verbleiben 1.01 g kristalliner Rückstand. Die zweite der beiden aus Essigester/n-Hexan auskristallisierten Fraktionen (800 mg), Schmp. 176–178°, ist nach dem Misch-Schmp. identisch mit der früher auf anderem Wege erhaltenen gleichen Verbindung³⁾. Aus Essigester Schmp. 178–180°.



N^a-tert.-Butyloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure-äthylester (**6**): 25 g (100 mMol) *BOC-p-Nitro-phenylester* werden mit 13.6 g (115 mMol) frisch dest. *Hydrazinoessigsäure-äthylester* unter Rühren übergossen. Die Mischung verflüssigt sich unter starker Erwärmung und wird anschließend 3 Stdn. auf 70° erwärmt. Nach 24 Stdn. bei Raumtemperatur löst man in 200 ccm Essigester, filtriert vom ausgeschiedenen Nitrophenol (ca. 3 g) ab, schüttelt die Lösung 5 mal mit je 30 ccm 8-proz. Ammoniaklösung, einmal mit 50 ccm 5-proz. Zitronensäure in gesätt. NaCl-Lösung und einmal mit gesätt. NaCl-Lösung aus. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Entfernen des Essigesters i. Vak. wird der Rückstand an der Ölspalte destilliert. Bei 102–115°/0.5–0.8 Torr gehen 8.5 g über, bei 115–130° 3.6 g.

Wenn der Destillationsrückstand zuviel Nitrophenol enthält, kommt es zu Zersetzung, die starke Verluste bedingen. In solchen Fällen empfiehlt es sich, vor Destillation der zweiten Fraktion den Rückstand in Essigester erneut mit Ammoniak zu extrahieren. — Erneute Destillation der 1. Fraktion, Sdp._{0.14} 76–80°, ergibt 7.7 g (35%) reines Produkt. η_3^{20} 1.4477.



Aus dem Rückstand und der 2. Fraktion können durch langsame Destillation, Sdp.0.2 80–90°, noch 2.5 g (11.5%) leicht mit N^{β} -Isomerem verunreinigtes Produkt erhalten werden, das durch wiederholte Destillation zu reinigen ist. R_F 0.77.

o-Hydroxy-benzal-Derivat: Durch Erhitzen von 440 mg 6 mit 250 mg *Salicylaldehyd* 5 Min. auf 100° und Kristallisieren aus Äthanol/Wasser werden 520 mg (80%) Derivat erhalten. Schmp. 84–85°.



Bei Einsatz des Isomerengemisches gibt die Menge an *o*-Hydroxy-benzal-Derivat eine Orientierung über den Gehalt an N^{α} -BOC-Isomerem.

N^{β} -tert.-Butyloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure-äthylester (5): Aus dem Destillationsrückstand vorstehender Verbindung werden durch schnelle Destillation 3.9 g (18%), Sdp.0.1 110 bis 115°, erhalten. Sie kristallisieren nach längerem Aufbewahren im Tiefkühlschrank. n_D^{20} 1.4520, R_F 0.63, Schmp. 22–26°.

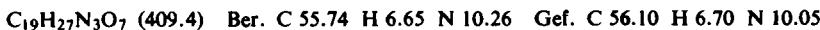


Die Gesamtausb. beträgt damit 64.5%.

Beide isomeren BOC-Hydrazinoessigerester zeigen eine geringfügige Tendenz, sich ineinander umzulagern. So ist in N^{α} -BOC-(NH₂)-Gly-Oät nach mehrwöchigem Aufbewahren N^{β} -BOC-NH-Gly-Oät chromatographisch nachweisbar.

Beim 8 stdg. Erhitzen von 700 mg reinem N^{β} -BOC-NH-Gly-Oät am Kugelrohr auf 120° bei 0.1 Torr können 60 mg reines N^{α} -BOC-(NH₂)-Gly-Oät isoliert werden.

N^{α} -tert.-Butyloxycarbonyl- N^{β} -(benzyloxycarbonyl-glycyl)-hydrazinoessigsäure-äthylester (8): 4.2 g Z-Gly und 4.4 g N^{α} -BOC-(NH₂)-Gly-Oät werden in 40 ccm absol. Dioxan mit 4.2 g DCCI kondensiert. Der nach der üblichen Aufarbeitung verbleibende Sirup kristallisiert über Nacht. 6.45 g (79%), Schmp. 69–74°. Aus Essigerster/Hexan Schmp. 70–72°.



Abspaltung der BOC-Schutzgruppe: Nach einer Stde. Einwirkung von 3 ccm Trifluoressigsäure auf 1.0 g 8 bei Raumtemperatur wird die Säure i. Vak. entfernt und der Rückstand in Benzol mit KHCO₃-Lösung neutral gewaschen. Nach Entfernung des Lösungsmittels verbleiben 350 mg, Schmp. 90–94°, aus Benzol Schmp. 93–95°. Der Misch-Schmp. zeigt die Identität mit dem früher beschriebenen N^{β} -(Benzylloxycarbonyl-glycyl)-hydrazinoessigsäure-äthylester⁹⁾.

N^{α} -(Benzylloxycarbonyl-glycyl)- N^{β} -tert.-butyloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure-äthylester (7)

a) Ausgehend von 1.65 g eines Gemisches beider BOC-Hydrazinoessigsäure-äthylester, in dem der Gehalt an N^{α} -Isomerem als *o*-Hydroxy-benzal-Derivat und dünnenschichtchromatographisch zu ca. 60% bestimmt wurde, erfolgt die Umsetzung wie beim oben beschriebenen Isomeren. Beim Verreiben des Sirups mit Äther werden 300 mg, Schmp. 105–108°, erhalten. Petrolätherzugabe lässt über Nacht 1.67 g, Schmp. 77–94°, kristallisieren. Durch weitere Kristallisation aus Essigerster/Petroläther können letztlich 410 mg (17%) neben 1.37 mg N^{α} -BOC-Isomerem (Schmp. 69–77°) erhalten werden. Schmp. der reinen Verbindung 7 111 bis 113°.



b) Ausgehend von 210 mg Z-Gly und 220 mg N^{β} -BOC-NH-Gly-Oät in 3 ccm Dioxan werden mittels DCCI analog a) 245 mg (60%) erhalten. Schmp. 104–107°.

Abspaltung der BOC-Schutzgruppe: Aus 200 mg BOC-Verbindung 7 in 0.5 ccm TFA werden, wie vorstehend beschrieben, nach Kristallisation aus Cyclohexan 70 mg, Schmp. 58–60°, erhalten. Misch-Schmp. mit authent. N^{α} -Z-Gly-(NH₂)-Gly-Oät⁹⁾ ohne Depression.

N^B-Benzylloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure-äthylester (10)

a) Zu einer stark emulgierten Mischung von 4 g KHCO_3 in 50 ccm Wasser (Vibromischer), 4.1 g *Z-Chlorid* in 30 ccm Äther und 5 ccm DMF werden innerhalb von einer Stde. 4.4 g (20 mMol) *N^a-BOC-Hydrazinoessigsäure-äthylester (6)* in 30 ccm Äther getropft. Die Durchmischung wird nach Zugabe von weiteren 0.95 g *Z-Chlorid* noch 3 Stdn. fortgesetzt. Durch Zugabe von 1.5 ccm Pyridin wird der Überschuß an *Z-Chlorid* zerstört, die wäßrige Phase nochmals ausgeäthert und der Ätherextrakt bei 0° mit *n HCl*, KHCO_3 -Lösung sowie Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Äthers verbleiben 6.9 g bliger Rückstand, der, in 8 ccm *Trifluoressigsäure* gelöst, 1 Stde. bei Raumtemperatur stehen-gelassen wird. Der nach der üblichen Aufarbeitung verbleibende Rückstand kristallisiert spontan in langen Nadeln. 2.48 g (49%), Schmp. 86–92°. Die Analysenprobe wurde zweimal aus Essigester mit Petroläther auskristallisiert. Schmp. 94–95°. R_F 0.49.

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ (252.3) Ber. C 57.13 H 6.39 N 11.10 Gef. C 57.06 H 6.44 N 10.93

b) 6.2 g frisch dest. *Hydrazinoessigsäure-äthylester* (52 mMol) und 12 g *Kohlsäure-(p-nitro-phenylester)-benzylester* werden 2 Stdn. bei 80° verschmolzen. Der erkalte Sirup, in 10 ccm Methylenchlorid gelöst, verbleibt 24 Stdn. bei Raumtemp. Nach Lösen in 100 ccm Essigester wird das Produkt, wie bei 6 beschrieben, vom Nitrophenol befreit. Aus dem sirupösen Rückstand kristallisieren auf Zugabe von Essigester/Heptan während 2 Tagen 4.3 g rohes *N^B-Z-NH-Gly-OÄt* (39% Ausb.). Lösen in Essigester und Fällen mit *n*-Heptan ergibt 2.95 g (27%), Schmp. 93–95°. Es verbleiben 6.4 g Sirup, der überwiegend das *N^a-Z*-Isomere (74% als *o*-Hydroxy-benzal-Derivat bestimmt) neben *N^B-Z*-Isomerem und Lösungsmittelresten enthält.

N^a-Benzylloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure-äthylester (9): 19.4 g des sirupösen Produktes, vgl. 10 b), werden an der Ölspülung destilliert und bei 0.2 Torr 2 Fraktionen aufgefangen: Sdp. 145–155°, 5.8 g, und 155–170°, 8.8 g.

Erneute Destillation der Fraktionen (1. Sdp._{0.2} 150–153°, 2. Sdp._{0.2} 150–156°) ergibt 12.3 g. n_D^{20} 1.5123.

Im Destillat scheiden sich während der Destillation feine Kristalle, wahrscheinlich Zersetzungssprodukte, aus, die abfiltriert werden. Aus dem Destillationsrückstand kristallisiert noch etwas *N^B-Z*-Isomeres aus.

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ (252.3) Ber. N 11.10 Gef. N 11.18

o-Hydroxy-benzal-Derivat: Durch Verschmelzen der Komponenten bei 100°. Die Analysenprobe wurde zweimal aus Äthanol umkristallisiert. Schmp. 88–89°.

$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5$ (356.4) Ber. C 64.03 H 5.66 N 7.86 Gef. C 64.05 H 5.73 N 7.90

N^B-Benzylloxycarbonyl-hydrazinoacetamid: 2 g (8 mMol) *N^B-Z-NH-Gly-OÄt* löst man in ca. 100 ccm mit *NH₃* gesätt. Methanol. Nach 16–20 Stdn. wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand mit Äther verrieben; 1.71 g. Bei der Umkristallisation bleiben 150 mg, Schmp. 230–235°, ungelöst (Analyse, einmal aus Nitromethan: gef. C 53.20 H 5.30 N 18.75). Die Verbindung ist nur schwer von diesem Nebenprodukt zu befreien, das sich höchstwahrscheinlich bei der Umkristallisation wieder bildet. Ausb. 1.12 g (63%), Schmp. 106–107°, R_F 0.14.

$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$ (223.2) Ber. C 53.80 H 5.87 N 18.83 Gef. C 53.67 H 5.80 N 18.91

N^a-Benzylloxycarbonyl-N^B-[benzylloxycarbonyl-glycyl]-hydrazinoessigsäure: Die früher³⁾ aus *Z-Gly-NH-Gly-OÄt* und *Z-Chlorid* erhaltene Verbindung wurde aus *N^a-Z-(NH₂)-Gly-OÄt* gewonnen: 1.05 g *Z-Gly* und 1.26 g *N^a-Z-(NH₂)-Gly-OÄt* löst man in 5 ccm absol. Dioxan und kondensiert mittels 1.05 g *DCCI* bei 0°. Nach 24 Stdn. wird wie üblich aufgearbeitet, der

erhaltene Sirup in 25 ccm Methanol gelöst und mit 700 mg *NaOH* in 10 ccm Wasser 2 Stdn. verseift. Ausb. 0.97 g (48 %), Schmp. 129–133°, aus Essigester Schmp. 138–140°.

N^a-{Benzylloxycarbonyl-glycyl}-N^b-benzylloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure-äthylester (12)

a) In 1.55 g **2** (5.00 mMol) wird, wie beim *N^a-BOC-Hydrazinoessigester* beschrieben, der Z-Rest eingeführt, wobei 2.2 g rohes Produkt, Schmp. 40–50°, erhalten werden. Zweimalige Umkristallisation aus Essigester/Hexan ergibt 1.02 g, Schmp. 85–86°.

$C_{22}H_{25}N_3O_7$ (443.5) Ber. C 59.59 H 5.68 N 9.48 Gef. C 59.55 H 5.61 N 9.26

b) Aus *N^b-Z-NH-Gly-OÄt* nach der DCCI-Methode: 250 mg *N^b-Z-NH-Gly-OÄt* und 210 mg *Z-Gly*, gelöst in 3 ccm absol. Dioxan, werden bei 0° mit 210 mg *DCCI* kondensiert. Nach 24 Stdn. bei 20° gibt man einen Tropfen Eisessig zur Zerstörung von überschüss. *DCCI* zu und arbeitet anschließend wie üblich auf. Die nach Verreiben des Rückstandes mit Äther/Hexan verbleibenden 255 mg (57 %) Rohprodukt, Schmp. 75–85°, enthalten noch etwas höherschmelzenden Anteil (Schmp. 143–147°). Zweimalige Umkristallisation aus Essigester/Hexan ergibt 110 mg, Schmp. 84–86°.

N^a-{Benzylloxycarbonyl-glycyl}-N^b-benzylloxycarbonyl-hydrazinoessigsäure (12, H statt C_2H_5): 1.2 g **12** (Rohprodukt) in 10 ccm Äthanol lässt man nach Zugabe von 150 mg *NaOH* in 2 ccm Wasser 1 Stde. bei 20° stehen. Mit konz. Salzsäure wird kongosauer gemacht und mit Essigester das Produkt extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. scheiden sich 800 mg (70 %) Rohprodukt, Schmp. 83–88°, aus. Aus Essigester, der wenig Hexan enthielt, Schmp. 100–102°.

$C_{20}H_{21}N_3O_7$ (415.4) Ber. C 57.83 H 5.10 N 10.11 Gef. C 57.80 H 5.19 N 10.15

N^a-tert.-Butyloxycarbonyl-N^b-p-tosyl-hydrazinoessigsäure-äthylester: 2.18 g (10.0 mMol) *N^a-BOC-(NH₂)-Gly-OÄt* (**6**) und 2.24 g *p-Toluolsulfochlorid* werden in 10 ccm wasserfreiem Pyridin schnell gelöst und unter Rühren innerhalb von 2 Min. mit 1.66 ccm *Triäthylaminhydrochlorid* (1.8 g) abgesaugt, mit Pyridin nachgewaschen und das Filtrat i. Vak. eingeengt. Der sirupöse Rückstand, in 50 ccm Essigester gelöst, wird mit 2n HCl, n KHCO₃ sowie Wasser ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. vom Essigester befreit. Ausb. 2.72 g (73 %), Schmp. 136–140°, aus Essigester Schmp. 138–139°.

$C_{16}H_{24}N_2O_6S$ (372.5) Ber. C 51.60 H 6.50 N 7.52 Gef. C 51.74 H 6.54 N 7.37

N^b-p-Tosyl-hydrazinoessigsäure-äthylester (11): Man lässt auf 1.86 g (5.0 mMol) der vorstehenden *BOC*-Verbindung 1 Stde. 2.5 ccm *Trifluoressigsäure* einwirken, entfernt die Säure i. Vak., löst in Essigester, schüttelt mit n KHCO₃ und Wasser aus, trocknet über Na₂SO₄, engt i. Vak. ein und reibt den Rückstand mit Äther kristallin. Ausb. 870 mg (64 %), Schmp. 113–115°. Aus Essigester Schmp. 114–116°.

$C_{11}H_{19}N_2O_4S$ (272.3) Ber. C 48.51 H 5.92 N 10.29 Gef. C 48.60 H 5.93 N 10.44

N^a-{Benzylloxycarbonyl-glycyl}-N^b-p-tosyl-hydrazinoessigsäure-äthylester

a) *Nach der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode:* 350 mg **11** und 300 mg *Z-Gly* werden in 5 ccm Dioxan mit 300 mg *DCCI* kondensiert und nach 24 Stdn. wie üblich aufgearbeitet. Der Rückstand ist überwiegend Ausgangsprodukt (**11**). Beim Auflösen in 5 ccm Nitromethan bleiben 70 mg (14 %) Produkt, Schmp. 143–153°, zurück, das aus Nitromethan bei 146 bis 150° schmilzt.

b) *Nach der Methode der gemischten Anhydride:* Zu dem aus 480 mg (2.3 mMol) *Z-Gly* mit 280 mg *N-Äthyl-piperidin* und 340 mg *Chlorameisensäure-sek.-butylester* in 7 ccm DMF bei –5° bereiteten Anhydrid werden bei –10° 545 mg **11** in 5 ccm DMF gegeben. Die Mischung verbleibt 1 Stde. bei 0°, über Nacht bei 20°, sowie 1 Stde. bei 70° und wird wie üblich

aufgearbeitet. Beim Entfernen des Essigesters i. Vak. fallen anfangs Kristalle aus (90 mg, Schmp. 220–221°). Das Filtrat ergibt nach Entfernen des Lösungsmittels und Verreiben mit Äther 375 mg Substanz, Schmp. 146–148°. Ausb. 40%. Umkristallisation aus Essigester.

$C_{21}H_{25}N_3O_7S$ (463.5) Ber. C 54.42 H 5.44 N 9.07 Gef. C 54.59 H 5.54 N 8.95

c) Durch Tosylierung von N^{α} -[Z-Glycyl]-hydrazinoessigester (2): Nach der für *p*-Ts-NH-N(BOC)-CH₂-CO₂C₂H₅ gegebenen Vorschrift wird ein Sirup erhalten, aus dem sich nach Wochen einige Kristalle ausscheiden. Schmp. 144–148°. Misch-Schmp. ohne Depression.

N^{α} -[Benzoyloxycarbonyl-glycyl]- N^{β} -p-tosyl-hydrazinoacetamid: Zu 1.41 g N^{α} -[Z-Glycyl]-hydrazinoacetamid in 10 ccm Pyridin und 1.15 g *p*-Tosylchlorid tropft man unter Röhren 0.82 ccm Triäthylamin. Nach einer Stde. wird vom Triäthylaminhydrochlorid abgesaugt und das Filtrat i. Vak. zur Trockne eingeengt. Der nach üblicher Aufarbeitung erhaltene Sirup wird mit Äther/Hexan verrieben. Nach einigen Tagen erfolgt Kristallisation (0.5 g). Aus Nitromethan 320 mg, Schmp. 150–152°.

$C_{19}H_{22}N_4O_6S$ (434.5) Ber. C 52.52 H 5.10 N 12.90 Gef. C 52.42 H 5.17 N 12.75

N^{α},N^{β} -Bis-[benzoyloxycarbonyl-glycyl]-hydrazinoessigsäure-äthylester

a) Nach der Anhydrid-Methode: Das aus 2.1 g Z-Gly und 1.2 g *N*-Äthyl-piperidin in 15 ccm DMF mit 1.45 g Chlorameisensäure-sek.-butylester bei –10° bereitete Anhydrid wird mit 3.1 g Z-Gly-NH-Gly-Oät in 15 ccm DMF versetzt, 30 Min. bei 0° gehalten, 2 Stdn. bei 20° und 30 Min. auf 70° erhitzt. Nach der üblichen Aufarbeitung verbleiben 3.52 g (70%), Schmp. 98–100°.

b) Nach der Azid-Methode: Das aus Z-Gly-NH-NH₂ (1.12 g) in 10 ccm DMF/2.5 ccm konz. Salzsäure bereitete Azid wird nach Neutralisation mit Triäthylamin mit 1.54 g Z-Gly-NH-Gly-Oät in 5 ccm DMF 24 Stdn. bei 0° belassen. Das nach der üblichen Aufarbeitung erhaltene Produkt mußte dreimal aus Benzol/Hexan kristallisiert werden. Schmp. 94–97°. Die Ausb. reichte zum Identitätsbeweis.

Ferner kann etwas Z-Gly-NH₂, Schmp. 133–136°, isoliert werden.

N^{β} -[Tosyl-glycyl]- N^{α} -[benzoyloxycarbonyl-glycyl]-hydrazinoessigsäure-äthylester

Z-Gly-NH-Gly-Oät wird, in wenig DMF gelöst, zu einer mittels eines Vibromischers emulgierten Mischung von *p*-Ts-Gly-Cl (10% Überschuß) in Benzol und währ. NaHCO₃-Lösung gegossen und 2 Stdn. emulgiert. Aus der Benzolschicht kristallisiert nach Schütteln mit *n* HCl ein reines Produkt mit 72–80% Ausb. Schmp. 144–145°, identisch mit authent. Material (vgl. I. c.³). Diese Methode ist der früher beschriebenen weit überlegen.

[147/65]