

THEODOR WIELAND, KJU HI SHIN und BÄRBEL HEINKE

Synthese einiger Pyruvyl-aminosäuren nach der Phosphoroxchlorid-Methode

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt a. M.

(Eingegangen am 6. Dezember 1957)

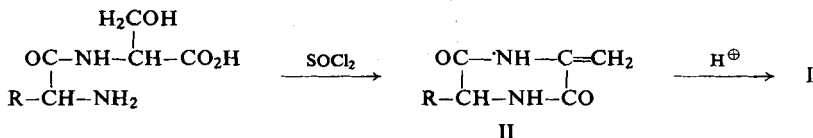
Herrn Professor Dr. Wolfgang Graßmann zum 60. Geburtstag

Die *N*-Pyruvylderivate von Glycin, Alanin, Valin und Leucin werden auf folgendem einfachen Weg erhalten: Kupplung der Brenztraubensäure mit den Aminosäure-benzylestern mit Hilfe von Phosphoroxchlorid in Tetrahydrofuran/Pyridin und anschließende Abspaltung der Benzylreste mit katalytisch erregtem Wasserstoff. Zur Erkennung der Substanzen im Papierchromatogramm und -pherogramm dient Nitroprussid-Na, dann NH_3 , wobei tiefblaue Flecken sichtbar werden.

Aminosäuren, die den Rest der Brenztraubensäure am Stickstoff gebunden enthalten, *N*-Pyruvyl-aminosäuren (I),



verdienen ein gewisses Interesse, da sie als Hydrolysenprodukte mancher Peptide, z. B. der „Lactotyryne“ isoliert¹⁾ wurden und in anderen, z. B. manchen Mutterkornalkaloiden²⁾ oder dem Fusarienwelkstoff Lycomarasmin³⁾ als Bausteine angenommen werden müssen oder können. Die Untersuchung dieser Aminosäurederivate wurde 1925 von M. BERGMANN und seinen Mitarbeitern aufgenommen, die beobachteten, daß bei der sauren Hydrolyse von Methylen-diketopiperazinen (II), die bei Einwirkung von Thionylchlorid auf Glycyl- oder Alanyl-serin entstehen, Pyruvylglycin (I, R = H) bzw. Pyruvylalanin (I, R = CH_3) gebildet wird^{4, 5)}.



Zur präparativen Gewinnung dieser Verbindungsklasse wurde dort später⁶⁾ Brenztraubensäure mit Acetamid zur α, α -Diacetamidoverbindung III vereinigt und diese

1) S. POSTERNAK, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **184**, 307 [1927].

2) A. STOLL, A. HOFMANN und TH. PETRZILKA, Helv. chim. Acta **34**, 1544 [1951], und früher.

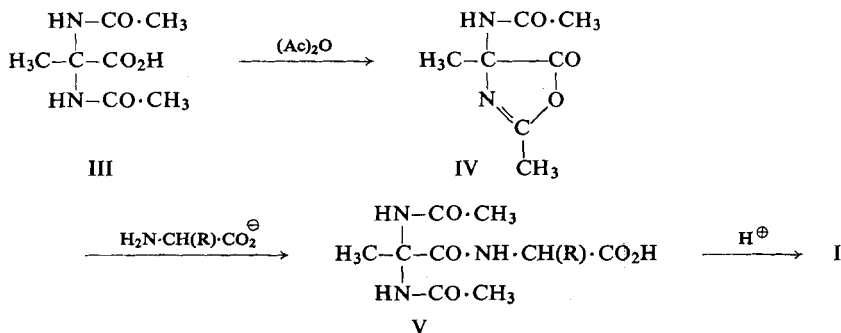
3) P. A. PLATTNER, N. CLAUSON-KAAS, A. BOLLER und U. NAGER, Helv. chim. Acta **31**, 860 [1948].

4) M. BERGMANN, A. MIEKELEY, F. WEINMANN und E. KANN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **143**, 108 [1925].

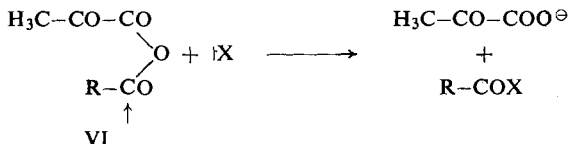
5) M. BERGMANN, A. MIEKELEY und E. KANN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **146**, 247 [1925].

6) M. BERGMANN und K. GRAFE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **187**, 196 [1930].

mit Acetanhydrid in das Acetamidoazlacton IV verwandelt, das mit Estern oder Salzen von Aminosäuren zum „Peptid“ V verknüpft wurde. Zur Abspaltung der schützenden Acetamidmolekeln aus V muß schließlich mit 1 *n* HCl 1–2 Std. zum Sieden erhitzt werden, wobei eine merkliche, die Ausbeute schmälernde Hydrolyse der Amidbindung zwischen den beiden Bausteinen stattfindet.



Es wurde deshalb versucht, den Rest der Brenztraubensäure ohne Maskierung der Ketogruppe an den Stickstoff von α -Aminosäuren anzugliedern. Das Chlorid der Brenztraubensäure, das zu diesem Zweck als Reagenz besonders geeignet wäre, läßt sich aber nach den geläufigen Methoden nicht, in der auch bei empfindlichen Säuren manchmal zum Ziel führenden Umsetzung des Na-Salzes mit Phosgen in Äther nur mit sehr geringer Ausbeute herstellen⁷⁾. Auch die Bereitung des Azids, die aus dem Ester über das Hydrazid vorgenommen werden müßte, scheidet hier, da Brenztraubensäureester mit Hydrazin besonders leicht an der Ketogruppe reagiert. Von den neueren Acylierungsmethoden versagt an der Brenztraubensäure diejenige der „gemischten Anhydride“⁸⁾, die bei anderen empfindlichen Acylkomponenten den Erfolg brachte⁹⁾, weil in diesen Acylierungsmitteln (VI) die Aufspaltung der Anhydridgruppierung durch nucleophile Reagenzien stets an der CO-Gruppe der fremden Acylhälfte erfolgt, die gegenüber der der Brenztraubensäure elektrophiler ist.



Bei den von uns¹⁰⁾ vor kurzem zur Peptidsynthese verwendeten gemischten Anhydriden aus Carbonsäuren und Phosphorsäuredichlorid ist indessen diese ungünstige Aufspaltungsart unmöglich. Deshalb wurde jetzt versucht, Brenztraubensäure über ihr gemischtes Anhydrid mit Phosphorsäuredichlorid (VII) mit Aminosäureestern zur Reaktion zu bringen. Aminosäuremethyl- oder -äthylester, die sich so zwar mit Brenz-

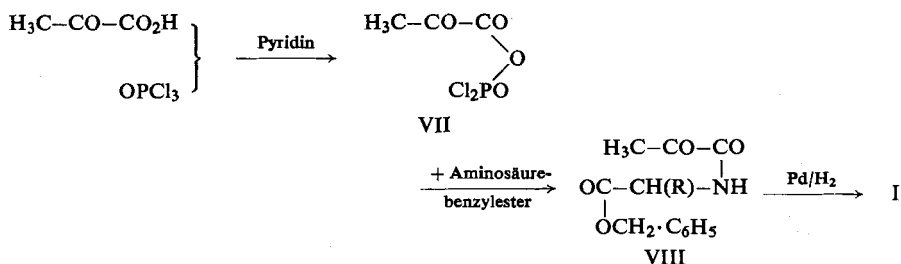
7) TH. WIELAND und H. KÖPPE, Liebigs Ann. Chem. **588**, 15 [1954].

8) TH. WIELAND und R. SEHRING, Liebigs Ann. Chem. **569**, 122 [1950]; TH. WIELAND und H. BERNHARD, Liebigs Ann. Chem. **572**, 190 [1951]; R. A. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta **34**, 874 [1951]; J. R. VAUGHAN und R. L. OSATO, J. Amer. chem. Soc. **73**, 3547 [1951].

9) TH. WIELAND und G. HÖRLEIN, Liebigs Ann. Chem. **591**, 192 [1954].

10) TH. WIELAND und B. HEINKE, Liebigs Ann. Chem. **599**, 70 [1956].

traubensäure kuppeln lassen, können nach der Acylierung jedoch nicht in der üblichen Weise, durch Alkali, verseift werden, da *N*-Pyruvyl-aminosäuren hierbei Kondensationen an der reaktionsfähigen Methylgruppe des Brenztraubensäurerestes erleiden^{6, 11, 12}). Die saure Verseifung der Alkylester erfordert andererseits Bedingungen, unter denen die Peptidbindung ebenfalls merklich angegriffen wird (s. o.). Deshalb fiel unsere Wahl auf die Benzylester der Aminosäuren, deren Spaltung mit katalytisch erregtem Wasserstoff möglich ist und die heute aus den Aminosäuren und Benzylalkohol durch Erhitzen mit *p*-Toluolsulfonsäure gut zugänglich sind¹³). Die Umsetzung der Brenztraubensäure mit den Benzylester-*p*-toluolsulfonaten von Glycin, DL-Alanin, DL-Valin und DL-Leucin durch Phosphoroxchlorid in Tetrahydrofuran/Pyridin, ergab die Pyruvylbenzylester (VIII) in Ausbeuten von 35–55%.



Die anschließende katalytische Hydrierung mit Pd-Mohr oder braunem PdO-BaSO₄¹⁴) erfordert Bedingungen, unter denen der Katalysator immer in großem Überschuß zum Hydriergut vorhanden ist. Man erreicht dies durch langsames Zutropfenlassen der Benzylesterlösung zu dem unter Wasserstoff und Lösungsmittel geschüttelten Katalysator (Tropfhydrierung). Notwendig ist ferner, daß die Ester VIII vor der Hydrierung sehr sorgfältig von jeglicher Spur an *p*-Toluolsulfonsäure befreit werden, da sonst der Katalysator vergiftet wird. Die Hydrierung dauert etwa eine Stunde und greift die Ketogruppe des Pyruvylrestes nicht an. Bei allzu langer Dauer (über 5 Stdn.) beobachteten wir aber eine merkliche, wohl hydrogenolytische Abspaltung des Acylrestes, denn es wurden dann bei der Aufarbeitung deutliche Mengen ätherunlöslicher freier Aminosäuren aufgefunden.

Zum Beweis der Struktur haben wir die kristallisierten 4-Nitro- und 2,4-Dinitrophenylhydrazone dieser Verbindungen analysiert und das 4-Nitrophenylhydrazon des Pyruvylglycins mit Na-Amalgam in milchsaurer Lösung reduziert¹⁵). Das Reduktionsprodukt erwies sich im Papierchromatogramm als identisch mit Alanyl-glycin. Zur analytischen Verfolgung der beschriebenen Syntheseveruche wurde auch die Papier-electrophorese mit Erfolg herangezogen. Der Nachweis der Pyruvylverbindungen auf dem Papier gelang dabei empfindlich durch Besprühen mit wäßriger Na-Nitroprussidlösung¹⁶) und Einbringen in eine Ammoniakatmosphäre, wobei die Substanzen als blaue Flecken in Erscheinung treten.

11) M. ERRERA und J. P. GREENSTEIN, Arch. Biochemistry 14, 477 [1947]; 15, 445 [1947].

12) J. V. SCUDI, J. Amer. chem. Soc. 59, 1403 [1937].

13) K. H. MILLER und H. WAELSCH, J. Amer. chem. Soc. 74, 1092 [1952].

14) R. KUHN und J. HAAS, Angew. Chem. 67, 785 [1955].

15) CH. GRÄNACHER, Helv. chim. Acta 5, 610 [1922].

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

N-Pyruvyl-aminosäure-benzylester

0.01 Mol *Aminosäure-benzylester-p-toluolsulfonat*¹³⁾ oder *Hydrochlorid* und 0.01 Mol frisch dest. *Brenztraubensäure* (0.7 ccm) werden in 50 ccm wasserfreiem Tetrahydrofuran gelöst und auf -15° abgekühlt. Dann setzt man unter Schütteln 0.01 Mol POCl_3 (0.93 ccm) und anschließend im Verlauf von 10 Min. 0.03 Mol (2.50 ccm) Pyridin hinzu. Der Ansatz bleibt dann 30 Min. bei -15° und darauf unter gelegentlichem Umschütteln 1 Stde. bei Zimmertemperatur stehen. Er soll nur ganz schwach gelb gefärbt sein. Dann wird mit 20 ccm Wasser versetzt und das Tetrahydrofuran i. Vak. bei Zimmertemperatur abdestilliert. Dabei scheiden sich die meisten Pyruvylaminosäure-benzylester ölig, der des Glycins kristallinisch ab. Zur Isolierung wird die wäßrige Emulsion nach Zusatz von etwas Wasser 3mal mit je 20 ccm Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte wäscht man je 3mal mit 20 ccm Wasser, 20 ccm 2 *n* wäßriger Salzsäure, 20 ccm 5-proz. NaHCO_3 -Lösung und schließlich mit Wasser neutral. Die mit Na_2SO_4 getrocknete Lösung hinterläßt nach Abdampfen i. Vak. bei Zimmertemperatur das Glycinderivat kristallin, die anderen als fast farblose Öle, die im Elektrotherogramm einheitlich sind.

Pyruvylglycin-benzylester, umkristallisiert aus Essigester/Petroläther, Schmp. 100° . Ausb. 35%.

$\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ (235.3) Ber. C 61.27 H 5.57 N 5.96 Gef. C 60.70 H 6.07 N 6.12

Das *p*-Nitrophenylhydrazon, das aus der methanolischen Lösung nach Zusatz von *p*-Nitrophenylhydrazin-hydrochlorid in Methanol kristallisiert, zeigt nach Umkristallisation aus Methanol/Wasser Schmp. 198° (Zers.).

$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$ (370.4) Ber. C 58.37 H 4.90 N 15.13 Gef. C 58.05 H 4.94 N 15.58

Die Benzylester von Pyruvyl-DL-alanin (54% Ausb.), -DL-valin (42%) und -DL-leucin (53%) kristallisierten nicht, auch nicht in Form ihrer 4-Nitro- oder 2,4-Dinitrophenylhydrazone.

N-Pyruvyl-aminosäuren

Die Lösung von 0.01 Mol *Pyruvylaminosäure-benzylester* in 30 ccm Methanol läßt man zu dem in ebensoviel Methanol vorhydrierten Katalysator — ca. 0.1 g Pd-Mohr oder ebensoviel braunes PdO/BaSO_4 ¹⁴⁾ — unter Wasserstoff und dauerndem Schütteln im Laufe von $\frac{1}{2}$ —1 Stde. zutropfen. Es wird in dieser Zeit 0.01 Mol Wasserstoff aufgenommen. Dann wird vom Katalysator abfiltriert und das Filtrat bei Zimmertemperatur i. Vak. abgedampft. Die *Pyruvylaminosäuren* hinterbleiben als Kristalle bis auf die ölige Leucinverbindung. Die Rohprodukte werden in möglichst wenig absol. Äther gelöst, filtriert, wieder i. Vak. eingedampft und die Rückstände aus Essigester durch vorsichtigen Petrolätherzusatz umkristallisiert. Ihre Nitrophenylhydrazone fielen beim Vermischen der Komponenten in Methanol kristallisiert aus und wurden aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Bei der papierchromatographischen Analyse der Säuren bewährte sich ein Gemisch aus sek. Butanol/Ameisensäure/Wasser (75:15:10 Vol.-Tle.).

Pyruvylglycin wurde mit 80% Ausbeute erhalten. Schmp. 90° (Lit.⁶⁾: 90°). R_F 0.63.

4-Nitrophenylhydrazon, Schmp. 224° (Zers.).

$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$ (280.2) Ber. N 19.99 Gef. N 19.33

Eine kleine Probe des Hydrazons wurde in absol. Methanol gelöst, mit Milchsäure angesäuert und durch Zusatz von einigen Körnchen Na-Amalgam bis zum Verschwinden der

¹⁶⁾ L. J. SIMON, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **125**, 534 [1897].

Farbe reduziert. Das entstandene Alanyl-glycin konnte papierchromatographisch mit authentischem Material identifiziert werden.

Pyruvyl-DL-alanin, Ausb. 84%, Schmp. 144° (Lit.⁵): 143.5°. R_F 0.74.

4-Nitrophenylhydrazon, Schmp. 245° (Zers.).

$C_{12}H_{14}N_4O_5$ (294.3) Ber. N 19.04 Gef. N 18.84

Pyruvyl-DL-valin, Ausb. 88%, Schmp. 96°, R_F 0.81.

$C_8H_{13}NO_4$ (187.2) Ber. C 51.33 H 7.00 N 7.48 Gef. C 51.77 H 7.11 N 6.96

2,4-Dinitrophenylhydrazon, Schmp. 207° (Zers.).

$C_{14}H_{17}N_5O_7$ (367.3) Ber. N 19.07 Gef. N 19.26

Pyruvyl-DL-leucin, Ausb. 90%, farbloses Öl, R_F 0.80.

4-Nitrophenylhydrazon, Schmp. 228° (Zers.).

$C_{15}H_{20}N_4O_5$ (336.3) Ber. N 16.16 Gef. N 16.05

2,4-Dinitrophenylhydrazon, Schmp. 206° (Zers.).

$C_{15}H_{19}N_5O_7$ (381.3) Ber. C 47.24 H 5.02 N 18.37 Gef. C 47.60 H 5.47 N 18.00

ARMIN WEISS

Die innerkristalline Quellung als allgemeines Modell für Quellungsvorgänge

Aus dem Eduard-Zintl-Institut für Anorganische und Physikalische Chemie
der Technischen Hochschule Darmstadt

(Eingegangen am 16. Dezember 1957)

Herrn Prof. Dr. W. Graßmann zum 60. Geburtstag gewidmet

Die eindimensionale, innerkristalline Quellung hängt in erster Linie von der Größe der Äquivalentfläche, von der Ladung und Größe der Gegenionen und vom Solvatationsbestreben der Gegenionen und der quellenden Baueinheiten ab. Wasserstoffbrückenbindungen können auf das Quellungsverhalten recht unterschiedlich einwirken. Der p_H -Wert übt nur dann einen besonderen Einfluß aus, wenn sich mit ihm auch die Anzahl der Ladungen auf den quellenden Baueinheiten und der Gegenionen pro Flächeneinheit, also die Größe der Äquivalentfläche ändert. — Die zweidimensionale Quellung von Polyphosphaten und Desoxyribonucleinsäuren und die vorwiegend ungeordnete Quellung von Eiweiß scheinen von den gleichen Faktoren bestimmt zu werden.

Quellungsphänomene spielen im biochemischen Geschehen eine wichtige Rolle, denn der Ablauf der normalen Lebensvorgänge ist an jeweils ganz bestimmte Quellzustände in den einzelnen Organen gebunden. Unsere Kenntnisse über diese