

N-[4.6-Benzal-1-*D*-glucosyl]-*L*-glutaminsäure-diisopropylester (If): 2.3 g *L*-Glutaminsäure-diisopropylester⁹⁾ (10 mMol, frisch dest.) und 1.35 g 4.6-Benzal-*D*-glucose (5 mMol) werden auf dem Dampfbad erhitzt, bis ein farbloser Sirup entstanden ist. Dieser wird 12 Std. im Kühlschrank aufbewahrt. Die mikrokrist. erstarrte Masse wird gründlich mit Petroläther verrieben und nach 1 Stde. abgesaugt. Man erhält 1.75 g (73% d. Th.) Rohprodukt. Nach Umkristallisieren aus Isopropylalkohol und aus Isopropylalkohol/Wasser (1:3) Schmp. 83°; $[\alpha]_D^{25}$: -5° ($c = 1.0$, in Pyridin).

$C_{24}H_{35}NO_9$ (481.5) Ber. C 59.86 H 7.32 N 2.91 Gef. C 60.27 H 7.44 N 2.94

N-[1-Desoxy-4.6-benzal-1-*D*-fructosyl]-*L*-glutaminsäure-diisopropylester (III_f): 1.45 g If (3 mMol) werden in 20ccm absol. Tetrahydrofuran gelöst. Unter Umschütteln wird in einem Guß eine Lösung von 450mg wasserfreier Oxalsäure (5 mMol) in 10ccm absol. Tetrahydrofuran zugegeben. Die alsbald mikrokrist. erstarrte Masse wird mit 40ccm Äther verrieben. Nach 3stdg. Aufbewahren im Kühlschrank wird das farblose Produkt abgesaugt und mit Äther gründlich gewaschen. 1.2g, Schmp. 123° (Zers.).

Das Produkt besteht auf Grund der Titration der Oxalsäure aus 60% IIf und 40% IVf.

640mg des oxalsauren Salzes (enthaltend etwa 390mg IIf) werden in 2ccm Wasser suspendiert und portionsweise etwa 25ccm $n/10$ NaOH unter gelindem Erwärmen zugesetzt. Dabei geht zunächst das Oxalat in Lösung; auf weiteren Zusatz von Lauge bis p_H 8–9 und mehrstdg. Aufbewahren im Kühlschrank scheidet sich die freie Base krist. ab. Nach Absaugen, Waschen mit Eiswasser und Trocknen über P_2O_5 ; 250mg Rohprodukt (76% d. Th., bez. auf IIf). Nach 2maligem Umkristallisieren aus Isopropylalkohol Schmp. 107°; $[\alpha]_D^{25}$: -54° ($c = 0.75$, in Pyridin).

$C_{24}H_{35}NO_9$ (481.5) Ber. C 59.86 N 7.32 N 2.91 Gef. C 59.80 H 7.33 N 2.92

⁹⁾ H. M. CHILES und W. A. NOYES, J. Amer. chem. Soc. 44, 1806 [1922].

FRITZ MICHEEL und HORST HANEKE

Peptidsynthesen nach dem Oxazolidonverfahren, II¹⁾

Peptide der *L*-Glutaminsäure

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Münster (Westf.)

(Eingegangen am 13. Oktober 1958)

Das in der I. Mitteil.¹⁾ beschriebene Verfahren der Peptidsynthese über die Oxazolidonderivate der *N*-Tosyl-aminosäuren wurde auf die Synthese von *L*-Glutaminsäurederivaten angewandt.

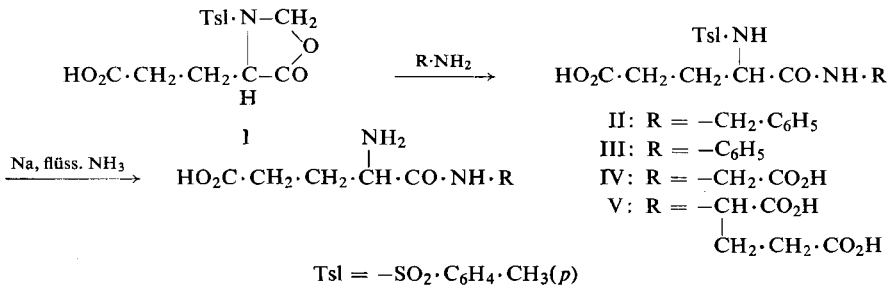
Wie in der I. Mitteil.¹⁾ beschrieben, können *N*-Tosyl- α -aminosäuren mit Formylaldehyd leicht zu Oxazolidonderivaten kondensiert werden. Seinerzeit wurde die Kon-

¹⁾ I. Mitteil.: F. MICHEEL und S. THOMAS, Chem. Ber. 90, 2906 [1957].

²⁾ Vgl. D. BENISHAI, J. Amer. chem. Soc. 79, 5736 [1957].

densation derart durchgeführt, daß eine Lösung von Formaldehyd in Eisessig, erhalten aus 30-proz. wäßr. Formaldehydlösung mit Acetanhydrid/Eisessig, bei Gegenwart von Schwefelsäure zur Anwendung gelangte. Wir haben statt der Schwefelsäure jetzt Thionylchlorid als Katalysator verwendet. Dies bietet bei ähnlicher Ausbeute an Oxazolidonderivat den Vorteil, daß der Katalysator bzw. seine Umwandlungsprodukte durch Abdestillieren entfernt werden können. An Stelle der wäßrigen Formaldehydlösung kann ebensogut fester Paraformaldehyd oder Trioxymethylen dienen. Eine andere Abwandlung des Verfahrens, die ebenfalls zu guten Ausbeuten führt, besteht darin, daß die *N*-Tosyl-aminosäure mit Paraformaldehyd in Benzol oder in einem Gemisch von Trioxymethylen mit Methylenechlorid gelöst wird. Als Katalysator wird *p*-Toluolsulfonsäure verwendet und das bei der Reaktion sich bildende Wasser durch Abdestillieren des Benzols entfernt²⁾.

Noch einfacher kann man zum Ziele gelangen, wenn man die betreffende *N*-Tosyl-aminosäure (hier *N*-Tosyl-L-glutaminsäure) mit etwas *p*-Toluolsulfonsäure und mit Paraformaldehyd verreibt und die Masse zum Schmelzen erhitzt (135°). Dieses Verfahren wird am besten nur in kleineren Ansätzen (bis zu etwa 3g Aminosäurederivat) ausgeführt. Wir beschreiben hier die aus *N*-Tosyl-L-glutaminsäure erhaltene β -[3-*p*-Tosyl-5-oxo-oxazolidinyl-(4)]-propionsäure (I) und ihre Umsetzungen. I ist durch seine Fähigkeit ausgezeichnet, beim Umkristallisieren Lösungsmittel, z.B. Benzol, im Kristall zu binden. Dies erschwert es, eine analysenreine Substanz zu erhalten. Es ist gegen Wasser und Alkohole recht beständig. Mit primären Aminen und Aminosäureestern setzt I sich leicht um. So wurden die Amide II bzw. III und die Peptide IV bzw. V synthetisiert.



Durch Abspalten des Tosyl-Restes mit Natrium in flüss. Ammoniak können die freien Peptide erhalten werden, wobei das Natriumion aus den erhaltenen Rohprodukten am besten mit einem Austauschere entfernt wird.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

 β -[3-*p*-Tosyl-5-oxo-oxazolidinyl-(4)]-propionsäure (I)

a) 3 g *N-p*-Tosyl-*L*-glutaminsäure werden in 20–25ccm Eisessig unter Erwärmen gelöst, 600mg (2 Moll.) Paraformaldehyd oder Trioxymethylen, 1.0g Acetanhydrid und 3–4 Tropfen Thionylchlorid hinzugegeben und die Mischung auf dem Dampfbad unter Feuchtigkeitsschluß 3–4 Stdn. erhitzt. Die klare, farblose Lösung wird i. Vak. eingedampft, der zurückbleibende farblose Sirup in 50ccm Benzol gelöst und diese Lösung mit 50ccm dest. Wasser ausgeschüttelt. Das Wasser wird nochmals mit 30ccm Benzol ausgeschüttelt, die vereinigten benzol. Lösungen dampft man nach dem Trocknen über Natriumsulfat i. Vak. auf 20–25ccm ein. Nach dem Abkühlen im Kühlraum erhält man ein farbloses Kristallisat, das abgesaugt wird. Aus der Mutterlauge wird nach dem Einengen eine zweite Fraktion gewonnen, Ausb. 2.2g. Die Kristalle enthalten auch nach längerem Trocknen noch Benzol. Reinigung siehe unten.

b) 3 g *N-p*-Tosyl-*L*-glutaminsäure werden mit 1.5–2ccm einer konz. Lösung von Trioxymethylen in Methylenchlorid versetzt. Die beim Erwärmen auf 60–70° erhaltene klare Lösung versetzt man mit 25–30mg *p*-Toluolsulfonsäure und läßt langsam Benzol zutropfen. Gleichzeitig wird zum Sieden erhitzt, so daß Benzol und Wasser abdestillieren. Die Tropfgeschwindigkeit wird so reguliert, daß etwas mehr Benzol zutropft als abdestilliert, so daß das Vol. im Verlaufe von 2½–3 Stdn. auf 40–50ccm steigt. Da das Trioxymethylen mit dem Benzol etwas flüchtig ist, fügt man dem zutropfenden Benzol zweckmäßigerweise etwas Trioxymethylen zu. Zum Schluß wird bei leichtem Unterdruck und einer Badtemperatur von 40–50° auf 15–20ccm eingedampft und die Lösung nach dem Impfen im Kühlraum bei +4° zur Kristallisation gebracht. Aufarbeitung wie oben.

Nach nochmaligem Umkristallisieren aus Benzol werden 2.1–2.2g eines Produktes erhalten, das frei von Formaldehyd ist.

c) 3 g *N-p*-Tosyl-*L*-glutaminsäure werden, mit 600mg Paraformaldehyd und 20–30mg *p*-Toluolsulfonsäure gut verrieben, in einem Kölbchen im Ölbad auf 135° erhitzt. Das Gemisch schmilzt unter Aufschäumen. Während des langsamen Abkühlens im Ölbad wird evakuiert. Die glasige farblose Masse wird sodann in 10–15ccm warmem Benzol gelöst, die Lösung filtriert und zur Kristallisation gebracht. Nach nochmaligem Umkristallisieren aus Benzol: 2.0–2.1g. Dieses letzte Verfahren ist nur für Ansätze bis zu 3g anwendbar.

Die nach einem dieser 3 Verfahren erhaltene, noch benzolhaltige Verbindung I wird in wenig Eisessig warm gelöst, die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und wenig Petroläther zugegeben, so daß sich noch keine zweite Phase bildet. Nach Animpfen und Abkühlen im Eisschrank erhält man ein Kristallisat, das in der Kälte abgesaugt und ausgewaschen wird. Man trocknet zunächst i. Hochvak. bei Raumtemperatur über NaOH und, sobald der Geruch des Eisessigs nahezu verschwunden ist, bei 50° über NaOH. Ausb. 60–70% d. Th., Schmp. 75 bis 76°. $[\alpha]_D^{25}$: +199–200° ($c = 1$, in Chlf.).

$C_{13}H_{15}NO_6S$ (313.3) Ber. C 49.84 H 4.83 N 4.47 Gef. C 49.43 H 4.75 N 4.94

N-p-Tosyl-*L*-glutaminsäure- α -benzylamid (II): 1g I wird mit 1.4g (4 Moll.) Benzylamin versetzt. Unter Selbsterwärmung tritt schnelle Lösung ein. Es wird noch 10–15 Min. auf dem Dampfbad erhitzt, abgekühlt, mit 5–10ccm Wasser versetzt und mit 10-proz. Salzsäure angesäuert. Der ausgefallene Niederschlag wird abgesaugt, in Na_2CO_3 -Lösung unter Erwärmen gelöst, die Lösung filtriert und wiederum mit 10-proz. Salzsäure gefällt. Das Rohprodukt wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und i. Vak. getrocknet. Ausb. 1.0–1.1g (80–87% d. Th.); Schmp. 191–192° (aus Isopropylalkohol). $[\alpha]_D^{25}$: +3° ($c = 1$, in Methanol).

$C_{19}H_{22}N_2O_5S$ (390.4) Ber. C 58.45 H 5.68 N 7.48 Gef. C 58.76 H 5.62 N 7.31

N-p-Tosyl-L-glutaminsäure- α -anilid (III): 1 g *I* wird mit 1.2 g frisch dest. *Anilin* versetzt und bis zur vollkommenen Lösung auf dem Dampfbade erhitzt. Nach 10–15 Min. (70–80°) wird, wie bei *II* angegeben, aufgearbeitet. Das Rohprodukt wird durch mehrfaches Umkristallisieren aus viel Wasser oder besser aus Isopropylalkohol völlig farblos erhalten. Schmp. 195° (Lit.³⁾: 198–200°).

$C_{18}H_{20}N_2O_5S$ (376.4) Ber. C 57.44 H 5.35 N 7.44 Gef. C 57.84 H 5.50 N 7.38

N-p-Tosyl-L-glutamyl- α -glykokoll (IV): 1 g *I* wird mit 1.3 g frisch dest. *Glykokoll-äthylester* versetzt, wobei unter Selbsterwärmung Lösung erfolgt. Es wird noch 15–20 Min. auf 70–80° erhitzt und sodann der überschüss. *Glykokoll-äthylester* i. Vak. abdestilliert. Zur Verseifung der Estergruppe wird eine Mischung von 6.3 ccm 2 *n* NaOH mit dem gleichen Vol. Methanol zugegeben und 1 Stde. bei Raumtemperatur stehengelassen. Man neutralisiert mit 6 *n* HCl (bis p_H 6) und dampft i. Vak. ein, bis die Ausscheidung von Natriumchlorid beginnt. Anschließend wird mit weiterer 6 *n* HCl auf p_H 2 angesäuert. Das Rohprodukt *IV* kristallisiert nach kurzer Zeit aus. Man erhält etwa 900 mg (78% d. Th.) eines bei 198–200° schmelzenden Produktes. Umkristallisiert wird aus Wasser. Schmp. 208–210°; $[\alpha]_D^{25}$: -13° ($c = 1$, in Methanol). 0.477 g werden mit $n/_{20}$ NaOH gegen Phenolphthalein als Indikator in wäßr. Lösung titriert. Verbrauch: 5.35 ccm; ber. 5.34 ccm.

$C_{14}H_{18}N_2O_7S$ (358.3) Ber. C 46.93 H 5.06 N 7.82 Gef. C 46.83 H 5.02 N 8.18

N-p-Tosyl-L-glutamyl- α -glutaminsäure (V): 2 g *I* werden mit 5.2 g frisch dest. *L-Glutaminsäure-diäthylester* umgesetzt und aufgearbeitet, wie bei *IV* beschrieben. Ausb. 2.1 g (76% d. Th.); Schmp. 195° (aus Wasser). $[\alpha]_D^{25}$: $+11^\circ$ ($c = 1$, in Methanol).

42.7 mg *V* wurden in Wasser mit $n/_{20}$ NaOH gegen Phenolphthalein titriert. Verbrauch: 5.97 ccm, ber. 5.98 ccm.

$C_{17}H_{22}N_2O_9S$ (430.4) Ber. C 47.43 H 5.15 N 6.50 Gef. C 47.68 H 5.18 N 6.71

Abspaltung der N-Tosyl-Reste: 3.0 g *N-Tosyl-L-glutamyl-glycin (IV)* werden in 100 ccm flüssigem *Ammoniak* gelöst und 1.2 g (6 Moll.) *Natrium* zugegeben. Die bleibende Blaufärbung wird mit etwas Ammoniumacetat zum Verschwinden gebracht, dann wird das *Ammoniak* abgedampft, der Rückstand in 20 ccm Eiswasser aufgenommen, 10 g Ionenaustauscher (*Amberlite IRC 50* in der Form des Ammoniumsalses) zugesetzt und letzteres nach 30 Min. abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das Filtrat wird i. Vak. (40° Badtemp.) auf 15–20 ccm eingengt und diese Lösung mit 1 *m* *Bariumacetatlösung* versetzt, bis keine weitere Fällung mehr erscheint (5–10 ccm). Das Filtrat wird i. Vak. auf 20–30 ccm eingengt, durch eine Säule von 20 g *Amberlite IRC 50* (in der NH_4^+ -Form) gegeben, die Säule mit Wasser nachgewaschen, und die gesamte Flüssigkeit (ca. 150 ccm) i. Vak. auf 15–20 ccm eingedampft. Aus dieser Lösung wird das freie *L-Glutamyl-glycin* mit Äthanol gefällt. Es wird nach mehrfachem Umfällen, wobei das beigemengte Ammoniumacetat entfernt wird, kristallin erhalten. Ausb. 1.0 g (60% d. Th.); Schmp. 175°; $[\alpha]_D^{20}$: $+82^\circ$ ($c = 1$, in Wasser).

Analog wird die *N-Tosyl-L-glutamyl-L-glutaminsäure* zur *L-Glutamyl-L-glutaminsäure* gespalten.

³⁾ Vgl. J. RUDINGER, Chem. Listy 48, 244–53; Collect. czechoslov. chem. Commun. 19, 375–38 [1954] (in Englisch); zit. nach C. A. 49, 3127 [1955].