

Adenosin- und Aminoacyladenosingflecke wurden eluiert und die Nucleosid-Mengen gegen einen Papierblindwert UV-spektroskopisch gemessen.

c) Je 10 μ Mol der Valylnucleoside und des Valyl-AMP wurden bei jedem Versuch eingesetzt. Der Laugeverbrauch während der Verseifung wurde durch einen an den Autotitrator angeschlossenen Schreiber fortlaufend registriert.

Die *Reaktion mit Hydroxylamin* wurde in der folgenden Weise ausgeführt: 20 μ Mol der Valylnucleoside und des Valyl-AMP wurden in je 2 ccm einer auf 0° abgekühlten Hydroxylaminlösung gelöst (4 *m* NH₂OH·HCl, 0.1 *m* Kollidin-perchlorat, mit Natronlauge bei 0° auf *p*_H 6.0 eingestellt). In gemessenen Zeitabständen wurden je 0.1 ccm der Lösungen in 2 ccm FeCl₃-Lösung (7.5-proz. FeCl₃·6 H₂O in 0.4 *n* HCl) pipettiert. Die Extinktion des entstandenen Hydroxamsäure-Eisenkomplexes wurde bei 546 *m* μ gegen einen Reagenzblindwert im Photometer Eppendorf gemessen; sie ist in jeder Probe über längere Zeit konstant und gut reproduzierbar. Auch der Kurvenverlauf wurde in allen Fällen mehrfach reproduziert.

HANS GEORG ZACHAU und WOLFGANG KARAU

Reaktionsfähige Aminosäureester als Modelle der Aminoacyl-ribonucleinsäure, II¹⁾

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München

(Eingegangen am 24. März 1960)

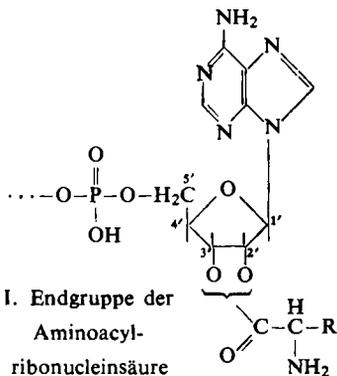
Um den Einfluß zweier Strukturelemente der Ribose auf die Reaktionsfähigkeit der Aminoacyl-ribonucleinsäure zu studieren, wurden als Modelle die Monoester der Essigsäure, des Glycins und Valins mit cyclischen Alkoholen (3-Hydroxy-tetrahydrofuran, Cyclopentanol) und Diolen (*trans*- und *cis*-3.4-Dihydroxy-tetrahydrofuran, *trans*- und *cis*-1.2-Dihydroxy-cyclopentan) synthetisiert und alkalisch verseift sowie mit Hydroxylamin umgesetzt. Aus dem Vergleich der kinetischen Daten ergibt sich, daß die Reaktionsfähigkeit der Esterbindung außer durch die Säurekomponente durch den Ringsauerstoff im Alkohol und — bei den Diolen — durch die nachbarständige Hydroxylgruppe stark beeinflußt wird. Die Beteiligung von Wasserstoffbrücken sowie induktiven und sterischen Effekten an diesen Einflüssen wird diskutiert.

In früheren Arbeiten²⁾ wurde gezeigt, daß der Aminosäure-Ribonucleinsäure-Ester (I) als neuer Typ einer „energiereichen“ Verbindung anzusehen ist. Vom chemischen und biochemischen Standpunkt aus ist es daher interessant, die Strukturelemente zu bestimmen, die die hohe Reaktionsfähigkeit dieses Esters bedingen. In der voran-

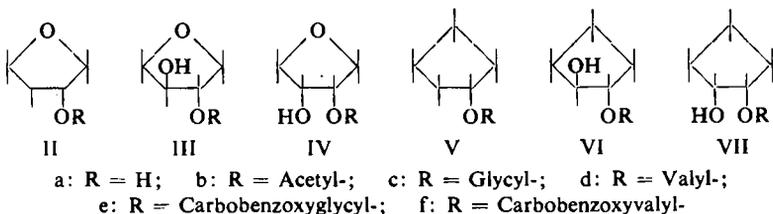
¹⁾ I. Mitteil.: H. G. ZACHAU, Chem. Ber. 93, 1822 [1960], vorstehend.

²⁾ Mitteil., Fußnoten^{3, 5-7)}, Chem. Ber. 93, 1822 [1960], vorstehend.

gehenden Arbeit¹⁾ wurde der Einfluß des Ribonucleinsäure-Makromoleküls, der verschiedenen Purin- und Pyrimidinbasen und der Phosphorsäure auf die Reaktionsfähigkeit der Esterbindung untersucht. Möglich sind außerdem Einflüsse der zur Esterbindung benachbarten Hydroxylgruppe, des Ringsauerstoffs und der Substituenten am C-1- und C-4-Atom der Ribose. In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung der ersten beiden dieser Strukturelemente abgegrenzt. Zu diesem Zweck wurden Essigsäure-, Glycin- und Valinester (b, c, d) des 3-Hydroxy-tetrahydrofurans (IIa), der *cis-trans*-isomeren 3.4-Dihydroxy-tetrahydrofurane (IVa, IIIa) des Cyclopentanol (Va) und des *cis*- und *trans*-1.2-Dihydroxy-cyclopentans (VIIa, VIa) synthetisiert. Als Maß für die Reaktionsfähigkeit der Ester wurde wieder die alkalische Verseifung und die Reaktion mit Hydroxylamin benutzt.



Die Essigsäureester wurden aus den Alkoholen und Acetylchlorid hergestellt und durch Destillation gereinigt. — Zur Synthese der Aminosäureester wurden die Alkohole mit den Carbobenzoxyaminosäuren kondensiert. Als Kondensationsmittel bewährten sich *N,N'*-Carbonyl-diimidazol³⁾ und *N,N'*-Dicyclohexyl-carbodiimid⁴⁾. Der Verlauf der Veresterung konnte analytisch mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie⁵⁾ verfolgt werden. Bei den zweiwertigen Alkoholen entstand neben den gesuchten Monoestern, wie zu erwarten, immer eine gewisse Menge der Diester. Die Monoester konnten durch Chromatographie an Kieselgel isoliert werden; sie waren



in der Dünnschichtchromatographie einheitlich. Zwei der Ester wurden auch durch UV- und IR-Spektren und durch Elementaranalysen charakterisiert. Die Carbobenzoxygruppe ließ sich durch katalytische Hydrierung abspalten. Die Aminosäureester wurden als Salze der Oxalsäure kristallisiert erhalten und ihre Reinheit in allen Fällen durch Elementaranalysen gesichert. Der Oxalsäuregehalt wurde durch Titration mit Permanganat bestimmt. Die Ester der *cis-trans*-isomeren Dihydroxy-tetrahydrofurane sind mit großer Wahrscheinlichkeit auch sterisch einheitlich: Auf Grund der Papierelektrophorese von Esterhydrolysaten in Boratpuffer⁶⁾ kann man eine gegen-

³⁾ H. A. STAAB, *Angew. Chem.* **71**, 194 [1959].

⁴⁾ Dtsch. Bundes-Pat. 825 684 (1950), FARBENFABRIKEN BAYER (Erfinder: E. SCHMIDT und R. SCHNEGG), *C.* **1952**, 5008; H. G. KHORANA und A. R. TODD, *J. chem. Soc. [London]* **1953**, 2257; J. C. SHEEHAN und G. P. HESS, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1067 [1955].

⁵⁾ E. STAHL, *Chemiker-Ztg.* **82**, 323 [1958].

⁶⁾ L. JAENICKE, *Naturwissenschaften* **39**, 86 [1952].

seitige Verunreinigung ausschließen. Bei den Dihydroxy-tetrahydrofuranen (IIIa, IVa) läßt sich dieses Ergebnis auch infrarotspektroskopisch bestätigen. Außerdem spricht dafür die Tatsache, daß die *cis*-Ester (IVc, VIIc) als neutrale und die *trans*-Ester (IIIc, VIc) als saure Salze der Oxalsäure kristallisieren.

Die dargestellten Ester wurden bei p_H 9.8 und 30° alkalisch verseift und mit Hydroxylamin umgesetzt; die Bedingungen und die Meßmethoden waren die gleichen wie in der vorangehenden Arbeit¹⁾. Die bei p_H 6.0 und 0° sehr langsam mit Hydroxylamin reagierenden Ester wurden bei p_H 6.0 und 35° sowie bei p_H 8.0 und 35° umgesetzt. Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 1–4 aufgeführt; ihre Auswertung zeigt den Einfluß der einzelnen Strukturelemente (Tab. 5–7). Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten lassen sich mit einer Genauigkeit von $\pm 7\%$ bei der Verseifung und $\pm 5\%$ bei der Reaktion mit Hydroxylamin angeben. Bei sehr langsam oder sehr schnell verlaufenden Reaktionen ist die Genauigkeit geringer; die Daten dieser Reaktionen wurden daher nicht in die Tabellen aufgenommen.

Tab. 1. Verseifung bei p_H 9.8 und 30°

Substanz	Glycin- äthylester	IIc	IIIc	III d	IVc	IVd	Valyl- adenosin	VIc	VIIc
$10^4 k$ (sec ⁻¹)	0.79	1.5	3.4	0.43	10	1.2	6.0	1.2	1.5
$t_{1/2}$ (Min.)	150	75	35	270	11	100	19	94	77

Tab. 2. Hydroxylamine-Reaktion bei p_H 6.0 und 0°

Substanz	IIIc	IVc	IVd	Valyladenosin
$10^4 k$ (sec ⁻¹)	3.2	9.5	0.60	5.2
$t_{1/2}$ (Min.)	37	12	190	22

Tab. 3. Hydroxylamin-Reaktion bei p_H 6.0 und 35°

Substanz	IIc	IIIb	IIIc	III d	IVb	IVc	IVd	VIc	VIIc
$10^4 k$ (sec ⁻¹)	10	2.7	77	6.1	7.1	230	14	6.2	5.9
$t_{1/2}$ (Min.)	11	42	1.5	19	16	0.51	8.3	19	20

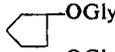
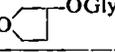
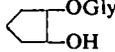
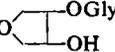
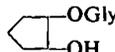
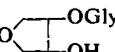
Tab. 4. Hydroxylamin-Reaktion bei p_H 8.0 und 35°

Substanz	Glycin- äthylester	IIb	IIc	II d	III b	III d	Vc	VIc
$10^4 k$ (sec ⁻¹)	10	5.1	71	3.1	34	20	3.2	31
$t_{1/2}$ (Min.)	11	22	1.6	37	3.4	5.7	36	3.7

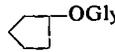
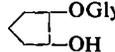
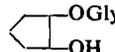
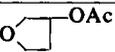
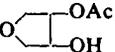
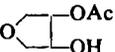
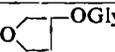
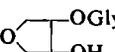
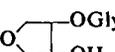
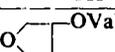
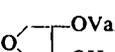
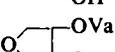
Die Tatsache, daß die Ester der Tetrahydrofuranalkohole reaktionsfähiger sind als die der Cyclopentanalkohole (Tab. 5) schreiben wir weitgehend dem induktiven Effekt des Ringsauerstoffs zu. Dieser Effekt macht sich bei der Hydroxylamin-Reaktion stärker bemerkbar als bei der alkalischen Verseifung, möglicherweise deswegen, weil die durch das Dipolmoment des Tetrahydrofurans verstärkte Polarisierung des Ester-carbonyls die Reaktion mit dem polarisierten Hydroxylamin-Molekül⁷⁾ ver-

⁷⁾ W. P. JENCKS, J. Amer. chem. Soc. **80**, 4585 [1958].

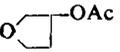
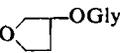
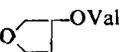
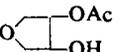
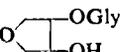
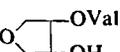
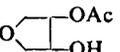
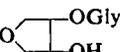
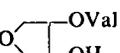
Tab. 5. Einfluß des Ringsauerstoffs

Substanz	Verseifung		Hydroxylamin-Reaktion			
	$10^4 k$	$k_{rel.}$	bei p_H 6.0 u. 35°		bei p_H 8.0 u. 35°	
			$10^4 k$	$k_{rel.}$	$10^4 k$	$k_{rel.}$
Vc 					3.2	1
IIc 					71	22
VIc  <i>trans</i>	1.2	1	6.2	1		
IIIc  <i>trans</i>	3.4	2.8	77	12		
VIIc  <i>cis</i>	1.5	1	5.9	1		
IVc  <i>cis</i>	10	6.7	230	39		

Tab. 6. Einfluß des nachbarständigen Hydroxyls

Substanz	Verseifung		Hydroxylamin-Reaktion			
	$10^4 k$	$k_{rel.}$	bei p_H 6.0 u. 35°		bei p_H 8.0 u. 35°	
			$10^4 k$	$k_{rel.}$	$10^4 k$	$k_{rel.}$
Vc 					3.2	1
VIc  <i>trans</i>	1.2	1	6.2	1.1	31	9.7
VIIc  <i>cis</i>	1.5	1.2	5.9	1		
IIb 					5.1	1
IIIb  <i>trans</i>			2.7	1	34	6.7
IVb  <i>cis</i>			7.1	2.6		
IIc 	1.5	1	10	1		
IIIc  <i>trans</i>	3.4	2.3	77	7.7	1	
IVc  <i>cis</i>	10	6.7	230	23	3.0	
IIId 					3.1	1
IIIId  <i>trans</i>	0.43	1	6.1	1	20	6.5
IVId  <i>cis</i>	1.2	2.8	14	2.3		

Tab. 7. Einfluß der Säurekomponente

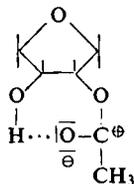
Substanz	Verseifung		Hydroxylamin-Reaktion				
	$10^4 k$	$k_{rel.}$	bei p_H 6.0 u. 35°		bei p_H 8.0 u. 35°		
			$10^4 k$	$k_{rel.}$	$10^4 k$	$k_{rel.}$	
IIb 					5.1	1	1.6
IIc 					71	14	23
IId 					3.1	0.61	1
IIIb  <i>trans</i>			2.7	1			
IIIc  <i>trans</i>	3.4	7.9	77	29	13		
IIId  <i>trans</i>	0.43	1	6.1	2.3	1		
IVb  <i>cis</i>			7.1	1			
IVc  <i>cis</i>	10	8.3	230	32	16		
IVd  <i>cis</i>	1.2	1	14	2.0	1		

gleichsweise stärker begünstigt, als sie den nucleophilen Angriff des Hydroxylions erleichtert. — Obwohl der Cyclopentan- und Tetrahydrofuranring nur wenig vom ebenen Bau abweichen, ist die Beteiligung sterischer Faktoren an der Wirkung des Ringsauerstoffs nicht auszuschließen. — Daß die Ringe selbst einen — möglicherweise sterischen — Einfluß auf die Esterbindung ausüben, ergibt sich aus der Tatsache, daß der Glycinester des Cyclopentanol etwa dreimal langsamer mit Hydroxylamin reagiert als der des Äthanol (Tab. 4). Bekanntlich sind die Ester sekundärer Alkohole allgemein weniger reaktionsfähig als die primärer Alkohole.

Die zur Esterbindung nachbarständige Hydroxylgruppe übt einen deutlichen Einfluß auf deren Reaktionsfähigkeit aus (Tab. 6). Die Reaktionsgeschwindigkeiten der Ester ohne benachbarte Hydroxylgruppe verhalten sich zu denen der Ester, die eine *trans*-ständige Hydroxylgruppe in 1.2-Stellung tragen, wie 1:2.3 bis 1:9.7⁸⁾. Die Wirkung einer *cis*-ständigen Hydroxylgruppe ist wenig größer als die einer *trans*-ständigen. Bei den Estern der Dihydroxy-tetrahydrofurane beträgt der Faktor 2.3 bis 3.0; bei den Estern der Dihydroxy-cyclopentane sind die Unterschiede nicht signifikant.

⁸⁾ Dieser Wert ist mit dem Verhältnis 1:2.45 für das Paar Essigsäure-äthylester/-glykolester (zitiert nach J. HINE, Reaktivität und Mechanismus in der organischen Chemie, Thieme-Verlag, Stuttgart 1960, S. 266) vergleichbar.

Die benachbarte Hydroxylgruppe beeinflusst die Reaktionsfähigkeit der Esterbindung mit Sicherheit durch induktive und sterische Effekte und in einzelnen Fällen auch durch Wasserstoffbrückenbindungen. Intramolekulare Wasserstoffbrücken von der Hydroxyl- zur Estercarbonylgruppe, die bei dem *cis*- und auch bei den *trans*-Dioleestern räumlich möglich sind, würden die Entstehung eines Carboniumions begünstigen und den nucleophilen Angriff erleichtern (VIII)⁹⁾. Infrarotspektroskopisch (Perkin Elmer, Modell 21, Calciumfluorid-Optik, Messungen in Tetrachlorkohlenstofflösung) wurde die Existenz einer intramolekularen Wasserstoffbrücke beim Essigsäureester des *trans*-Dihydroxy-tetrahydrofurans (III b) wahrscheinlich gemacht: Die O—H-Valenzschwingungsbande ist aufgespalten und zeigt ein Maximum bei 2.77 μ (3610/cm), eine Schulter bei 2.82 μ (3546/cm) und ein zweites Maximum bei 2.88 μ (3472/cm); beim Verdünnen verschwindet das Maximum bei 2.88 μ , das auf eine intermolekulare Assoziation zurückgeht, während die Schulter bei 2.82 μ auch bei starker Verdünnung nicht verschwindet und daher wahrscheinlich auf eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zurückzuführen ist. Bei analog durchgeführten Messungen am Essigsäureester des *cis*-Dihydroxy-tetrahydrofurans (IVb) läßt sich keine entsprechende Schulter nachweisen*. — Das Versuchsmaterial reicht nicht aus, die Wirkung von induktiven und sterischen Faktoren und von Wasserstoffbrücken mit Sicherheit gegeneinander abzugrenzen.



VIII

Einfluß der Wasserstoffbrücke auf die Ausbildung des Carboniumions

Aus Tab. 7 kann man entnehmen, daß die Glycinerester, übereinstimmend mit der allgemeinen Erfahrung, reaktionsfähiger sind als die Essigsäureester. Die Tatsache, daß Valinester langsamer reagieren als Glycinerester, hat ihre Parallele in der Peptidchemie¹⁰⁾.

Aus den Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Hydroxylamin-Reaktion bei 0° und 35° (Tab. 2 und 3) läßt sich die Aktivierungsenergie dieser Reaktion zu 15 kcal/Mol berechnen.

Die hohe Reaktionsfähigkeit des Aminoacyl-Ribonucleinsäure-Esters (I) wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit weitgehend erklärt. Der Ringsauerstoff im Tetrahydrofuran und die zur Esterbindung benachbarte und besonders die *cis*-ständige Hydroxylgruppe tragen zur Erhöhung der Reaktionsfähigkeit wesentlich bei. Der

*) *Anm. b. d. Korrr.:* Auch bei VII b^{14a)} läßt sich IR-spektroskopisch nur eine intermolekulare Wasserstoffbrücke nachweisen. Im IR-Spektrum von VI b^{14a)} ist dagegen bei allen Verdünnungen die einer intramolekular assoziierten OH-Gruppe entsprechende Bande (2.82 μ) stärker als die der nicht assoziierten OH-Gruppe (2.77 μ); die intramolekulare Wasserstoffbrücke ist hier so stark, daß anscheinend kaum intermolekulare Assoziation stattfindet, und daß die durch sie bedingte Erhöhung der Reaktionsfähigkeit der Esterbindung etwa gleich groß ist wie die durch den Übergang vom *trans*- zum *cis*-Ester hervorgerufene Steigerung. Damit wird erklärt, daß sich die Ester der *cis-trans*-isomeren Cyclopentandiole im Gegensatz zu denen der isomeren Tetrahydrofurandiole in ihrer Reaktionsfähigkeit kaum unterscheiden (Tab. 6).

⁹⁾ H. G. ZACHAU, W. KARAU und M. TADA, Vortrag Dtsch. Physiol. Chem. Ges., Berlin, 1959 (Ber. ges. Physiol. exp. Pharmakol., im Druck).

¹⁰⁾ P. A. LEVENE, R. E. STEIGER und A. ROTHEN, J. biol. Chemistry 97, 717 [1932].

Glycin-cyclopentanol-ester, der diese Strukturelemente nicht besitzt, reagiert so viel langsamer mit Hydroxylamin als der Glycinester des *cis*-3.4-Dihydroxy-tetrahydrofurans, daß es bisher nicht möglich war, die Reaktionsgeschwindigkeiten unter gleichen Bedingungen mit der wünschenswerten Genauigkeit zu messen. Die eine Substanz mußte bei p_{H} 8.0 und die andere bei p_{H} 6.0 umgesetzt werden (Tab. 3 und 4). Bei zwei Glycinestern (IIc und VIc in Tab. 3 und 4), deren Reaktionsgeschwindigkeiten sich unter beiden Bedingungen genau messen lassen, verläuft die Reaktion mit Hydroxylamin bei p_{H} 8.0 7.1 mal bzw. 5.0 mal schneller als bei p_{H} 6.0. Unter der Voraussetzung, daß dieser Faktor übertragbar ist, kann man abschätzen, daß der Glycinester des *cis*-3.4-Dihydroxy-tetrahydrofurans etwa 500 mal schneller reagiert als der des Cyclopentanol-esters. Bei den entsprechenden Valinestern ergab sich etwa der gleiche Wert.

Ein vergleichsweise geringer Unterschied der Reaktionsfähigkeit ist noch nicht erklärt: Valyladenosin reagiert 8.7 mal schneller mit Hydroxylamin und wird 5.0 mal schneller verseift als der Valylester des *cis*-3.4-Dihydroxy-tetrahydrofurans (IVd in Tab. 1 und 2). Es sind daher auch Einflüsse auf die Esterbindung durch die Substituenten am C-1- und C-4-Atom der Ribose anzunehmen. Die Frage soll durch Untersuchung der Ester von Ribosederivaten geklärt werden.

Herrn Professor Dr. Dr. h. c. A. BUTENANDT danken wir herzlich für die verständnisvolle und großzügige Förderung dieser Arbeit. Herrn Doz. Dr. E. BIEKERT, Fräulein I. KÖHLER und Fräulein T. SCHILD sei für die Aufnahme und Diskussion der IR- bzw. der UV-Spektren gedankt. Für die Überlassung von Dihydrofuran und 3-Hydroxy-tetrahydrofuran sind wir der BADISCHEN ANILIN- & SODA-FABRIK, Ludwigshafen, zu Dank verpflichtet.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert. Die Elementaranalysen wurden von Dr. A. SCHOELLER, Kronach (Oberfranken), und von A. BERNHARDT, Mülheim (Ruhr), ausgeführt.

Die Infrarotspektren der neu dargestellten Verbindungen sollen in der Kartei „Dokumentation der Molekülspektroskopie“ (Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße) veröffentlicht werden.

Darstellung der Diole

trans-3.4-Dihydroxy-tetrahydrofuran (IIIa): 70 g 2.5-Dihydro-furan wurden, wie für Cyclohexen beschrieben¹¹⁾, mit Perameisensäure oxydiert und der entstandene Ameisensäureester verseift. Die alkalische Lösung wurde mit Essigsäure neutralisiert, i. Vak. zur Trockene eingeeengt und der Rückstand mit Dioxan mehrmals extrahiert. Die Extrakte wurden getrocknet, das Dioxan abdestilliert und der Rückstand i. Vak. destilliert. Sdp.₁₇ 180–185° (Badtemperatur)¹²⁾. Ausb. 34 g (33 % d. Th.).

cis-3.4-Dihydroxy-tetrahydrofuran (IVa) wurde aus Mesoerythrit in Analogie zu einer Vorschrift von W. REPPE und Mitarbb.¹³⁾ dargestellt. Sdp._{0.2} 160–170° (Badtemperatur)¹²⁾. Ausb. 51 % d. Th.

¹¹⁾ Org. Syntheses 28, 35 [1948].

¹²⁾ H. KLOSTERMANN und F. SMITH, J. Amer. chem. Soc. 74, 5336 [1952].

¹³⁾ Liebigs Ann. Chem. 596, 138 [1955].

cis- und *trans*-1.2-Dihydroxy-cyclopentan (VIIa, VIa) wurden aus Cyclopenten dargestellt^{14, 14 a, 15}).

Carbobenzoxyaminosäureester: a) Die in Tab. 8 angegebene Menge *Carbobenzoxyaminosäure* in 30 ccm Tetrahydrofuran wurde mit *N,N'*-Carbonyl-diimidazol³) versetzt (Mol.-Verhältnis 1:1.1) und 1 Stde. unter Rückfluß erwärmt. Nach Zusatz der Lösung des *Alkohols* (ebenfalls 1.1 Mol auf 1 Mol Säure) in 10 ccm Tetrahydrofuran wurde noch 1 Stde. unter Rückfluß erhitzt und das Tetrahydrofuran anschließend im Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in 50 ccm Chloroform aufgenommen und die Lösung zweimal mit je 20 ccm gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung, danach dreimal mit je 20 ccm Wasser extrahiert. Die getrocknete Chloroformlösung wurde auf eine Kieselgelsäule (3 × 50 cm) aufgetragen und mit Chloroform/Aceton (85:15) eluiert („Kieselgel für Verteilungschromatographie“ der Firma Merck, Darmstadt, durch Zusatz von 15 ccm Wasser zu 100 g Kieselgel inaktiviert).

Der Verlauf der Chromatographie wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie⁵⁾ verfolgt (Lösungsmittelsystem: Chloroform/Aceton (85:15)). Sichtbar gemacht wurden die Substanzen in Anlehnung an ein Verfahren von H. N. RYDON und P. W. G. SMITH¹⁶⁾: Die Platten wurden 1 Stde. bei 120° getrocknet und anschließend 1/2 Stde. in ein Chlorbad gestellt. Nachdem überschüssiges Chlor durch Bewegen der Platten an der Luft vertrieben worden war, wurde mit einer Kaliumjodid-Stärke-Lösung besprüht.

Die Fraktionen, die nur Monoester enthielten, und die, die außer Mono- noch Diester enthielten, wurden zusammengespült. Das Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer weitgehend entfernt; anschließend wurden die Substanzen 2 Stdn. bei 0.5 Torr getrocknet. Die Gewichte der so erhaltenen Öle wurden der Ausbeutebestimmung zugrunde gelegt (Tab. 8). Die Ausbeuten beziehen sich auf eingesetzte Carbobenzoxyaminosäure. Auf diesem Weg sind die in Tab. 8 aufgeführten Substanzen hergestellt worden.

Tab. 8. Übersicht über die dargestellten Carbobenzoxyaminosäureester

Subst.	eingesetzte Menge Säure	Gesamt-ausbeute	Ausb. an reinem Monoester % d. Th.	Beschreibung der Substanz
Ie	20 mMol	89	89	farbl. Öl
II f	15 mMol	91	91	farbl. Öl
III e	40 mMol	57	31	farbl. Krist. (aus Toluol), Schmp. 66°
III f	21 mMol	90	52	farbl. Öl
IV e	30 mMol	67	32	farbl. Krist. (aus Benzol/Petroläther), Schmp. 71°
IV f	21 mMol	94	61	farbl. Öl
Ve	20 mMol	81	81	farbl. Öl
V f	15 mMol	30	30	farbl. Öl
VI e	21 mMol	≈ 100	60	farbl. Öl
VII e	15 mMol	73	41	farbl. Krist. (aus Benzol/Petroläther), Schmp. 63.5–65°

¹⁴⁾ VAN LOON, Dissertat. Delft 1919, S. 46.

^{14a)} L. N. OWEN und P. N. SMITH, J. chem. Soc. [London] 1952, 4026.

¹⁵⁾ P. E. VERKADE, J. COOPS JR., C. J. MAAN und A. VERKADE-SANDBERGEN, Liebigs Ann. Chem. 467, 217 [1928].

¹⁶⁾ H. N. RYDON und P. W. G. SMITH, Nature [London] 169, 922 [1952].

IIIe $C_{14}H_{17}NO_6$ (295.3) Ber. C 56.94 H 5.80 N 4.74 Gef. C 57.18 H 5.93 N 4.89

Gehalt an Carbobenzoxyglycin (aus dem UV-Spektrum bestimmt): 72% (Ber. 71%).

IVe $C_{14}H_{17}NO_6$ (295.3) Ber. C 56.94 H 5.80 N 4.74 Gef. C 57.07 H 5.91 N 4.67

Gehalt an Carbobenzoxyglycin: 72% (Ber. 71%).

Bei der Kondensation von Carbobenzoxyglycin und IIIa wurde auch der *Diester von IIIa* isoliert und aus Methanol umkristallisiert. Schmp. 124°.

$C_{24}H_{26}N_2O_9$ (486.5) Ber. C 59.25 H 5.39 N 5.76 Gef. C 59.23 H 5.29 N 5.65

Der Gehalt an Carbobenzoxyglycin wurde zu 87% bestimmt (Ber. 86%).

b) Der *Carbobenzoxyglycinmonoester des trans-3.4-Dihydroxy-tetrahydrofurans (IIIe)* ist auch auf folgendem Wege erhalten worden: Eine Lösung von 4.0 mMol *Carbobenzoxyglycin* und 4.8 mMol *IIIa* in 5 ccm trockenem Pyridin wurde mit einer Lösung von 8.0 mMol *N,N'*-Dicyclohexyl-carbodiimid⁴⁾ in 2 ccm Pyridin 1 Tag bei Raumtemperatur stehengelassen. Das Pyridin wurde im Rotationsverdampfer entfernt, aus dem Rückstand überschüssiges Kondensationsmittel mit Petroläther herausgewaschen und das zurückgebliebene Öl in Chloroform aufgenommen. Der *N,N'*-Dicyclohexyl-harnstoff wurde abfiltriert und die Chloroformlösung wie oben beschrieben chromatographiert. Ausb. an Monoester: 40% d. Th., bezogen auf Carbobenzoxyglycin.

Aminosäureester: 1 g *Carbobenzoxyaminosäureester* wurde in 10 ccm Eisessig bei Raumtemperatur und geringem Überdruck mit Wasserstoff und Platinoxid nach ADAMS hydriert. Nach beendeter Wasserstoffaufnahme wurde der Katalysator abzentrifugiert und der Eisessig durch Gefriertrocknung entfernt. Das zurückgebliebene Öl wurde in Äthanol gelöst und mit einem Überschuß an äthanol. Oxalsäurelösung versetzt. Nach Zusatz von Äther fiel der Aminosäureester als Oxalat aus und wurde aus Äthanol/Äther umkristallisiert. Die Ausbeuten lagen zwischen 40 und 90%. Da sich die Substanzen bei höherer Temperatur langsam zersetzen, wurden die Schmelzpunkte nach Vorheizen des Schmelzpunktapparates auf 100° durch schnelles Erhitzen (ca. 5° pro Min.) bestimmt.

Die folgenden Aminosäureester-oxalate wurden dargestellt:

1. *Glycinester des 3-Hydroxy-tetrahydrofurans (IIc)*, Schmp. 143–144°.

$C_6H_{11}NO_3 \cdot H_2C_2O_4$ (235.2) Ber. C 40.85 H 5.57 N 5.96 $H_2C_2O_4$ 38.3
Gef. C 40.88 H 5.64 N 6.09 $H_2C_2O_4$ 38.7

2. *Valinester des 3-Hydroxy-tetrahydrofurans (II d)*, Schmp. 142–143°.

$C_9H_{17}NO_3 \cdot H_2C_2O_4$ (277.3) Ber. C 47.65 H 6.91 N 5.05 $H_2C_2O_4$ 32.5
Gef. C 47.63 H 6.85 N 5.02 $H_2C_2O_4$ 33.1

3. *Glycinester des trans-3.4-Dihydroxy-tetrahydrofurans (IIIc)*, Schmp. 136–137°.

$C_6H_{11}NO_4 \cdot H_2C_2O_4$ (251.2) Ber. C 38.22 H 5.22 N 5.58 $H_2C_2O_4$ 35.8
Gef. C 38.35 H 5.06 N 5.48 $H_2C_2O_4$ 35.8

4. *Valinester des trans-3.4-Dihydroxy-tetrahydrofurans (III d)*, Schmp. 136° (sintert ab 130°).

$C_9H_{17}NO_4 \cdot H_2C_2O_4$ (293.3) Ber. C 45.05 H 6.53 N 4.78 $H_2C_2O_4$ 30.7
Gef. C 44.97 H 6.70 N 4.77 $H_2C_2O_4$ 30.5

5. *Glycinester des cis-3.4-Dihydroxy-tetrahydrofurans (IVc)*, Schmp. 146–147°.

$2C_6H_{11}NO_4 \cdot H_2C_2O_4$ (412.4) Ber. C 40.78 H 5.87 N 6.79 $H_2C_2O_4$ 21.8
Gef. C 40.78 H 5.71 N 6.51 $H_2C_2O_4$ 22.7

6. *Valinester des cis-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans* (IVd), Schmp. 119° (sintert ab 114°).

$C_9H_{17}NO_4 \cdot H_2C_2O_4$ (293.3) Ber. C 45.05 H 6.53 N 4.78 $H_2C_2O_4$ 30.7
Gef. C 44.96 H 6.59 N 4.85 $H_2C_2O_4$ 29.0

7. *Glycinerester des Cyclopentanols* (Vc), Schmp. 165–167°.

$C_7H_{13}NO_2 \cdot H_2C_2O_4$ (233.2) Ber. C 46.35 H 6.48 N 6.01 $H_2C_2O_4$ 38.6
Gef. C 46.00 H 6.35 N 6.09 $H_2C_2O_4$ 39.8

8. *Valinester des Cyclopentanols* (Vd), Schmp. 165–167°.

$C_{10}H_{19}NO_2 \cdot H_2C_2O_4$ (275.3) Ber. C 52.35 H 7.69 N 5.09 $H_2C_2O_4$ 32.7
Gef. C 52.43 H 7.57 N 5.20 $H_2C_2O_4$ 33.2

9. *Glycinerester des trans-1,2-Dihydroxy-cyclopentans* (VIc), Schmp. 135–137°.

$C_7H_{13}NO_3 \cdot H_2C_2O_4$ (249.2) Ber. C 43.37 H 6.07 N 5.62 $H_2C_2O_4$ 36.2
Gef. C 43.14 H 5.97 N 5.77 $H_2C_2O_4$ 36.4

10. *Glycinerester des cis-1,2-Dihydroxy-cyclopentans* (VIIc), Schmp. 160–161° (ab 155° Braunfärbung).

$2C_7H_{13}NO_3 \cdot H_2C_2O_4$ (408.4) Ber. C 47.05 H 6.91 N 6.86 $H_2C_2O_4$ 22.0
Gef. C 46.81 H 6.74 N 6.98 $H_2C_2O_4$ 21.8

Die Essigsäureester der Alkohole IIa, IIIa und IVa wurden durch Umsetzen der Alkohole mit einem geringen Unterschub an Acetylchlorid in Tetrahydrofuranlösung bei 0° dargestellt. Durch Destillation wurden die Ester als farblose Öle erhalten.

IIb: Sdp.₁₂: 62°¹⁷⁾

IIIb: Sdp._{0.3}: 86–87°

IVb: Sdp._{0.5}: 82–83°

Die *Verseifungsgeschwindigkeit* wurde mit Hilfe eines Autotitrationsgerätes bei 30° gemessen¹⁾. 40 μ Mol Ester wurden in 4 ccm Wasser gelöst, auf p_H 9.8 gebracht und der p_H -Wert durch Zugabe von $n/_{10}$ NaOH konstant gehalten. Um Störungen durch CO_2 -Absorption aus der Luft zu vermeiden, wurde unter Stickstoff gearbeitet.

Die *Hydroxylamin-Reaktion* wurde, wie vorher beschrieben¹⁾, ausgeführt. Für die Reaktion bei p_H 8.0 wurde eine Reagenzlösung benutzt, die 4 m an Hydroxylamin-hydrochlorid und 0.1 m an KH_2PO_4 war und mit Natronlauge bei 35° auf p_H 8.0 eingestellt worden war.

¹⁷⁾ S. OLSEN, Acta chem. scand. 4, 462 [1950], und frühere Literatur.