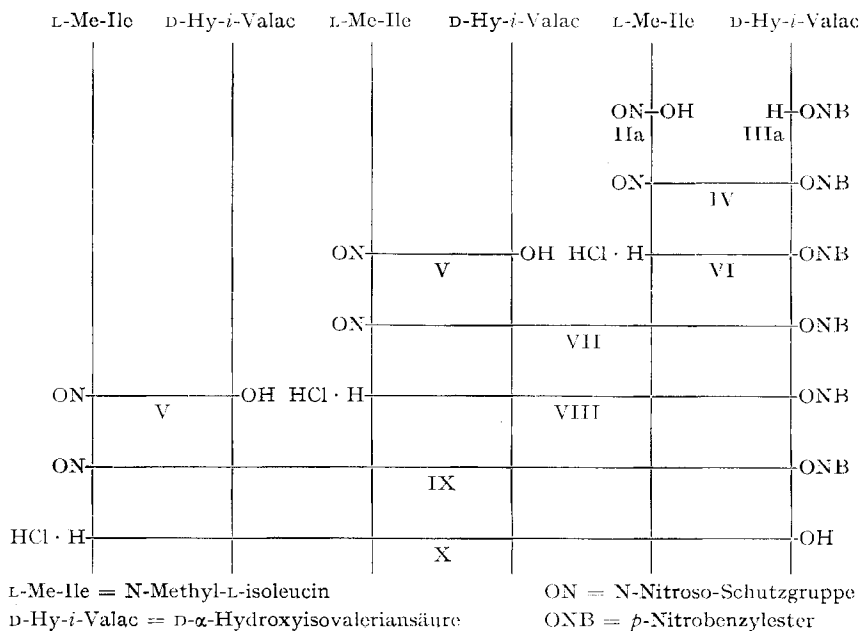


Die Nitrosoaminosäuren II stellen leicht gelbliche oder graustichige Substanzen dar, die meist kristallin oder wachsartig sind und sich im Hochvakuum destillieren oder sublimieren lassen. Im Dunkeln stabil, scheinen sie sich jedoch nach längerer Lichteinwirkung langsam zu zersetzen. Ihre Spaltung erfolgt am besten im Chlorwasserstoffstrom in Benzol oder Eisessig bei etwa 10°, wobei man direkt die Hydrochloride von I erhält. Bromwasserstoff in Wasser oder Eisessig entfernt zwar die Nitrosogruppe ebenfalls rasch, doch entsteht als unerwünschtes Nebenprodukt freies Brom. Andere Mineralsäuren sind weniger aktiv, wie auch ZAHRADNIK[7] festgestellt hat. Unter den Bedingungen der Hydrogenolyse, wie sie zur Debenzylierung und Decarbobenzoylierung in Frage kommen, ist die Nitrosfunktion hinreichend stabil. Sekundäres Amin ist auch nach tagelangem Hydrieren in Eisessig bei Raumtemperatur mit Palladiumkohle nur in Spuren festzustellen.

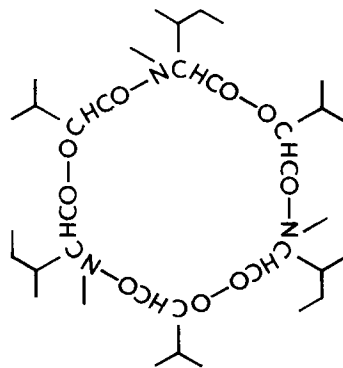
Bei den Reaktionen I → II und II → I bleibt die Asymmetrie am α-C-Atom unverändert. Reaktionen an der Carboxylgruppe hingegen, wie sie zur Knüpfung von Peptid- und Depsipeptid-Bindungen nötig sind, führen je nach Art der gewählten Methode zu mehr oder weniger starker Racemisierung. Zur Knüpfung der Esterbindung eines Depsipeptids eignet sich am besten die Säurechloridmethode. Das Säurechlorid von II wird mittels PCl₅ in Äther unter Eiskühlung hergestellt und bei 30–35° im Vakuum vom Lösungsmittel und POCl₃ befreit. Die Reaktion mit der Hydroxykomponente muss indessen bei möglichst tiefer Temperatur (– 60°) vorstatten gehen, um die hier auftretende Racemisierung zurückzudrängen. Diese Racemisierung eines am Carboxyl aktivierten Derivats von II ist stets in alkalischem Medium anzutreffen. Aus diesem Grunde ist die früher benützte Benzolsulfochloridmethode[1][8][9] hier nicht anwendbar. Vollständig ist die Racemisierung allerdings

Reaktionsschema



auch bei der Säurechloridmethode nicht zu unterdrücken, ebensowenig wie bei Anwendung der von BRENNER *et al.* [10] beschriebenen «Phosgenmethode». Das Endprodukt muss entweder durch Kristallisation oder Säulenchromatographie von seinem Diastereoisomeren abtrennbar sein. Die weiteren Schritte, welche keine Reaktionen am Carboxyl der Alkylaminosäure mehr einschliessen, verlaufen dann aber optisch einheitlich.

Das Aufbauprinzip eines Depsipeptids mittels Nitroschutzgruppen sei am Beispiel von Enniatin A illustriert (s. Reaktionsschema). Es unterscheidet sich vom früher angewendeten Prinzip [1] in der Vertauschung der Schutzgruppentypen. Da die Nitrosogruppe von IIa acidolytisch gespalten wird, gegen Hydrierung jedoch stabil ist, trägt jetzt die Hydroxykomponente IIIa eine hydrogenolytisch entfernbare Funktion, in diesem Falle den gut zugänglichen *p*-Nitrobenzylester. Die Komponenten IIa und IIIa wurden nun mittels der oben angeführten Säurechloridmethode zum Didepsipeptid IV vereinigt, das dann einerseits durch Hydrogenolyse und andererseits mittels HCl in Benzol in die Bausteine V bzw. VI übergeführt werden konnte. Die Säure V wurde sodann über ihr Säurechlorid in ausgezeichneter Ausbeute mit der aus VI freigesetzten Esterbase zum geschützten Tetradsipeptid VII verbunden. Dessen Denitrosierungsprodukt VIII verknüpfte man auf dieselbe Weise erneut mit dem Säurechlorid von V zum Nitroso-hexadsipeptid-*p*-nitrobenzylester IX. Hydrogenolyse und nachfolgende Denitrosierung von IX führten zum offenkettigen Hexadsipeptid-hydrochlorid X, das man ähnlich wie das in der 2. Mitteilung beschriebene Hydrobromid [1] zu XI cyclisierte. Das cyclische Produkt XI war in jeder Beziehung mit natürlichem Enniatin A identisch.



Enniatin A (XI)

Verglichen mit der in der 1. und 2. Mitteilung [1][8] beschriebenen Synthesemethode ist die im ersten Schritt auftretende Racemisierung ein Nachteil, der aber durch die höhere Kupplungsausbeute wettgemacht wird. Zudem erhält man mehr als die Hälfte der Zwischenstufen in kristalliner Form, so ausser IIa und IIIa auch die Säure V und die Hydrochloride VI und VIII. Dasselbe trifft auch für die analog ausgeführte Synthese des als Vorstufe von Enniatin B aufgebauten Nitroso-tetradsipeptidbenzylesters XV zu, von dessen Vorstufen sogar das geschützte Didepsipeptid XII kristallin anfiel.

Es erhebt sich hier die Frage, ob die Nitrososchutzgruppe auch bei der Synthese von N-Alkylaminosäure-haltigen Peptidanalogen Anwendung finden könnte. Vorläufige Versuche in dieser Richtung verliefen nicht sehr ermutigend, da die entstehenden Diastereoisomergemische infolge der geringen Kristallisationstendenz von N-Alkylpeptidderivaten schwer zu trennen sind. Zudem sind nicht alle Methoden der Peptidverknüpfung für Nitrosoaminosäurederivate anwendbar und Nebenreaktionen sind häufig. Nitrosierung eines Peptidfragments zum vorübergehenden Schutz ist zwar möglich, aber nur in Abwesenheit primärer und sekundärer Amidfunktionen, die in unerwünschte Nitrosoamide oder Nitroso-urethane übergeführt würden. Die Anwendung von Nitrosoaminosäuren dürfte also nur in speziellen Fällen – wie hier im Falle von Depsipeptiden – von präparativem Wert sein.

Experimenteller Teil²⁾

A) N-Nitroso-alkylaminosäuren. - *N-Nitroso-N-methyl-L-isoleucin* (IIa). 48 g (0,33 Mol) N-Methyl-L-isoleucin [1] [11] werden in 800 ml Eisessig suspendiert und bis zur vollständigen Lösung mit 70 g (0,60 Mol) Isoamylnitrit bei Raumtemperatur gerührt (ca. 30 Min.). Dann wird 16 Std. bei Raumtemperatur belassen und anschliessend im Vakuum eingedampft. Den Rückstand nimmt man in Äther auf, wäscht mit 1N HCl und Wasser und extrahiert erschöpfend mit 10-proz. KHCO₃-Lösung. Die Kaliumhydrogencarbonat-Extrakte werden mit 3N HCl vorsichtig auf Kongo angesäuert und sofort 2mal mit Äther ausgezogen. Nach Waschen, gutem Trocknen und Eindampfen im Vakuum erhält man ein Öl, das unter Petroläther auf Anreiben fest wird. Nach Trocknen im Vakuum bei Raumtemperatur erhält man 49 g (85% d. Th.) hellgelbe Nitrosoverbindung, die zur Analyse bei 50° im Hochvakuum sublimiert wird. Smp. 47–50°, $[\alpha]_D^{26} = -60,8^\circ$ ($c = 1,0$ in Alkohol).

C₇H₁₄O₃N₂ (174,20) Ber. C 48,26 H 8,10 N 16,08% Gef. C 48,18 H 8,12 N 16,16%

Auf gleiche Weise hergestellt: *N-Nitroso-N-methyl-L-valin* (IIb). Aus N-Methyl-L-valin [11]. Ausbeute 88%, Smp. 70–74° (aus Tetrachlorkohlenstoff). $[\alpha]_D^{26} = -85,5^\circ$ ($c = 0,91$ in Alkohol).

C₈H₁₂O₃N₂ (160,17) Ber. C 44,99 H 7,55 N 17,49% Gef. C 44,87 H 7,76 N 17,21%

N-Nitroso-N-methyl-L-leucin (IIc). Aus N-Methyl-L-leucin [11]. Ausbeute 85%, Smp. 44–47°, wachsartige Masse, $[\alpha]_D^{27} = -29,8^\circ$ ($c = 0,97$ in Alkohol).

C₇H₁₄O₃N₂ (174,20) Ber. C 48,26 H 8,10 N 16,08% Gef. C 47,91 H 8,03 N 16,11%

N-Nitroso-N-methyl-L-phenylalanin (IId). Aus N-Methyl-L-phenylalanin [11]. Ausbeute 77%, Smp. 135–136° (aus Äther/Petroläther), $[\alpha]_D^{28} = -130^\circ$ ($c = 1,0$; in Alkohol).

C₁₀H₁₂O₃N₂ (208,21) Ber. C 57,68 H 5,81 N 13,46% Gef. C 57,81 H 5,92 N 13,57%

N-Nitroso-N-benzyl-L-leucin (IIe). Aus N-Benzyl-L-leucin [11] Ausbeute 76%, Smp. 92–94° (aus Äther/Petroläther), $[\alpha]_D^{21} = -49,8^\circ$ ($c = 1,0$; in Alkohol).

C₁₃H₁₈O₃N₂ (250,29) Ber. C 62,38 H 7,29 N 11,21% Gef. C 62,50 H 7,24 N 11,46%

B) Synthese von Enniatin A. - *D-α-Hydroxyisovaleriansäure-p-nitrobenzylester* (IIIa). 5,9 g (0,050 Mol) *D-α-Hydroxyisovaleriansäure* [12] und 7,0 ml (0,050 Mol) Triäthylamin in 100 ml trockenem Essigester werden mit 8,6 g (0,050 Mol) *p*-Nitrobenzylchlorid 16 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wird mit 1N HCl, 10-proz. KHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das verbleibende Öl kristallisiert auf Anreiben. Aus Äther/Petroläther erhält man bei –20° 7,5 g (60%) *p*-Nitrobenzylester vom Smp. 28–34°. $[\alpha]_D^{26} = +10^\circ$ ($c = 1,0$ in Alkohol).

C₁₂H₁₈O₅N (253,25) Ber. C 56,91 H 5,97 N 5,53% Gef. C 56,87 H 5,73 N 5,80%

²⁾ Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Die Analysenmuster wurden – sofern nicht sublimiert – 16 Std. über P₂O₅ bei 0,01 Torr und 50–80° getrocknet. Die Mikroanalysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung unter der Leitung der Herren Dres. H. WALDMANN und A. DIRSCHERL ausgeführt.

N-Nitroso-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxyisovaleriansäure-p-nitrobenzylester (IV). 14 g (0,080 Mol) *N-Nitroso-N-methyl-L-isoleucin (IIa)*, gelöst in 150 ml abs. Äther, werden mit 16,7 g (0,080 Mol) PCl_5 bei 0° 15 Min. gerührt; anschließend wird das Gemisch ohne Filtrieren bei 35° Badtemperatur im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird zur Entfernung des POCl_3 noch 2mal mit Toluol im Vakuum abgedampft, dann in 50 ml abs. Äther aufgenommen und auf -60° gekühlt. Bei dieser Temperatur setzt man unter starkem Rühren eine vorgekühlte Lösung von 19 g (0,075 Mol) *D- α -Hydroxyisovaleriansäure-p-nitrobenzylester (IIIa)* in 100 ml abs. Äther zu und gleich darauf ebenfalls auf -60° gekühlte Mischung von 15 ml Pyridin und 15 ml Äther. Man lässt unter fortwährendem Rühren auf 0° aufwärmen und hält 2 Std. bei dieser Temperatur. Danach wird mit 1N HCl, 10-proz. KHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Man erhält 20,2 g Öl, das in Hexan/Benzol (3:2) auf 300 g Aluminiumoxid³⁾ gegeben wird. Mit Benzol und Benzol/Essigester (90:10) werden 16,4 g (53%) öliges geschütztes Didepsipeptid⁴⁾ IV erhalten. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -37,5^\circ$ ($c = 1,0$ in Benzol).

$\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{O}_7\text{N}_3$ (409,43) Ber. C 55,73 H 6,65 N 10,26% Gef. C 55,69 H 6,71 N 10,26%

N-Nitroso-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxyisovaleriansäure (V). 11,6 g (0,028 Mol) *p-Nitrobenzylester IV* werden in 95-proz. Essigsäure mit 3 g 5-proz. Palladiumkohle bei Raumtemperatur hydrogenolysiert, wobei 2950 ml Wasserstoff aufgenommen werden. Nach Filtration und Verdampfen im Vakuum wird in 10-proz. KHCO_3 -Lösung und Äther aufgenommen und noch zwei weitere Male mit KHCO_3 -Lösung extrahiert. Die vereinigten Kaliumhydrogencarbonat-Auszüge werden mit konz. HCl vorsichtig auf Kongo angesäuert. Deren Ätherextrakt liefert nach Waschen, Trocknen und Eindampfen im Vakuum einen kristallisierenden Rückstand, der nach 2maligem Umkristallisieren aus Äther/Petroläther 5,9 g (77%) der Säure V ergibt. Smp. 60–61°. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -26,7^\circ$ ($c = 1,09$ in Alkohol).

$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{N}_2$ (274,31) Ber. C 52,54 H 8,08 N 10,21% Gef. C 52,24 H 7,91 N 10,00%

N-Methyl-L-isoleucyl- α -oxyisovaleriansäure-p-nitrobenzylester-hydrochlorid (VI). Durch eine Lösung von 9,5 g (0,023 Mol) Nitrosoverbindung (IV) in 100 ml abs. Benzol wird unter Rühren während 10 Min. ein starker HCl-Strom geleitet, wobei die Temperatur höchstens 12° erreichen soll. Die Lösung färbt sich vorerst dunkelbraun, hellt dann unter Abklingen der Wärmetönung wieder auf. Man bläst noch 10 Min. ohne Kühlung Stickstoff durch die Mischung und verdampft dann im Vakuum zur Trockne. Der feste Rückstand liefert aus Essigester 7,7 g (79%) Hydrochlorid VI. Smp. 156–158° (unter Sublimation). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +31,4^\circ$ ($c = 1,15$ in Alkohol).

$\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{O}_6\text{N}_2\text{Cl}$ (416,90) Ber. C 54,74 H 7,01 N 8,51% Gef. C 55,03 H 7,01 N 8,52%

N-Nitroso-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxyisovaleryl-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxyisovaleriansäure-p-nitrobenzylester (VII). – a) *Freisetzung der Esterkomponente*. 9,1 g (0,022 Mol) Didepsipeptidesterhydrochlorid VI werden in Äther suspendiert, mit konz. NH_3 -Lösung und Eis versetzt und sofort gut geschüttelt. Die Ätherschicht wird mit Wasser gewaschen, getrocknet und bei 30° Badtemperatur im Vakuum eingedampft und liefert 8,2 g (ca. quantitativ) ölige Esterbase.

b) *Säurechloridkupplung*. 5,9 g (0,024 Mol) Nitroso-didepsipeptid V, gelöst in 80 ml abs. Äther, werden bei 0° mit 5,0 g (0,024 Mol) PCl_5 20 Min. gerührt und nach Filtration bei 30° Badtemperatur im Vakuum eingedampft. Den Rückstand löst man in 45 ml abs. Äther und tropft

³⁾ Ölige Zwischenprodukte wurden durch Chromatographie an Alox (neutral, Aktivitätsstufe I) oder an Kieselgel (Korngröße 0,2–0,5 mm) gereinigt. Es wurde jeweils eine Säule mit der 10- bis 15fachen Menge Adsorbens in Hexan/Benzol oder Benzol zubereitet und nach Adsorption der Substanz mit folgenden Lösungsmitteln eluiert: 1. Benzol, 2. Benzol/Essigester (98:2), 3. Benzol/Essigester (95:5), 4. Benzol/Essigester (90:10), 5. Benzol/Essigester (80:20), 6. Benzol/Essigester (50:50).

⁴⁾ Die anfallenden Fraktionen wurden auf Dünnschicht-Kieselgelplatten chromatographiert, wobei die Nitrosoderivate ausser mit Jod auch mit GRIESS-Reagens auf folgende Art sichtbar gemacht wurden: Man besprühte die Platten mit einer frisch bereiteten Mischung von gleichen Teilen GRIESS-Reagens I, GRIESS-Reagens II und 6N HCl (vgl. F. FEIGL, Spot Tests in Organic Analysis, 5th edition, 1956, p. 157) und erhitzte auf dem Dampfbad, wobei wein- bis purpurrote Flecken entstehen. Die GRIESS-Behandlung kann auf bereits jodierten Platten angewendet werden.

diese Lösung innert 15 Min. bei -10° unter starkem Rühren zu einer Lösung des unter a) beschriebenen Esters in 100 ml abs. Äther und 6,3 ml (0,045 Mol) Triäthylamin. Anschließend lässt man auf Raumtemperatur aufwärmen und wäscht nach 2 Std. mit 1N HCl, 10-proz. KHCO_3 -Lösung und Wasser, trocknet und dampft im Vakuum ein. Der ölige Rückstand, 13,6 g (97%), $[\alpha]_D^{26} = -79,2^\circ$ ($c = 1,1$ in Benzol), ist für eine Weiterverarbeitung genügend rein. Chromatographie an 150 g Kieselgel³) liefert mit Benzol/Essigester (90:10) 13,1 g (93%) Substanz⁴). $[\alpha]_D^{26} = -83,0^\circ$ ($c = 1,25$ in Benzol).

$\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_{10}\text{N}_3$ (636,73) Ber. C 58,47 H 7,60 N 8,80% Gef. C 58,33 H 7,65 N 8,73%

N-Methyl-L-isoleucyl-D- α -oxyisovaleryl-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxyisovaleriansäure-p-nitrobenzylester-hydrochlorid (VIII). 11,6 g (0,0182 Mol) geschütztes Tetradepsipeptid VII werden, wie bei Didepsipeptid VI beschrieben, in 100 ml abs. Benzol denitrosiert. Der feste Verdampfungsrückstand liefert aus Essigester/Petroläther 8,4 g (72%) kristallines Hydrochlorid VIII. Smp. 148–149° (nach Umwandlung bei 135–140°), $[\alpha]_D^{26} = -37,7^\circ$ ($c = 1,03$ in Alkohol).

$\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_9\text{N}_3\text{Cl}$ (644,19) Ber. C 57,80 H 7,82 N 6,52% Gef. C 58,04 H 7,93 N 6,54%

N-Nitroso-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxyisovaleryl-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxyisovaleryl-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxyisovaleriansäure-p-nitrobenzylester (IX). 7,5 g (0,0117 Mol) Tetradepsipeptid-ester-hydrochlorid VIII werden in Äther suspendiert und mit konz. NH_3 -Lösung und Eis gut geschüttelt. Die nach Waschen, Trocknen und Verdampfen des Äthers im Vakuum erhaltene ölige Esterbase wird, wie bei Tetradepsipeptid VII beschrieben, mit 3,46 g (0,0126 Mol) Didepsipeptid-säure (V) umgesetzt. Der ölige Neutralteil wird an 100 g Kieselgel³) chromatographiert, wobei man mit Benzol/Essigester (90:10 und 80:20) 9,6 g (97%) öliges geschütztes Hexadepsipeptid IX erhält⁴). $[\alpha]_D^{26} = -103,0^\circ$ ($c = 1,01$ in Benzol).

$\text{C}_{43}\text{H}_{69}\text{O}_{13}\text{N}_5$ (864,02) Ber. C 59,77 H 8,05 N 8,11% Gef. C 60,23 H 8,04 N 8,06%

N-Methyl-L-isoleucyl-D- α -oxyisovaleryl-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxyisovaleryl-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxyisovaleriansäure-hydrochlorid (X). Man hydrogenolysiert 8,0 g (0,00925 Mol) geschütztes Hexadepsipeptid IX in 150 ml Eisessig mit 1,5 g 5-proz. Palladiumkohle bei Raumtemperatur, wobei 950 ml Wasserstoff aufgenommen werden. Nach Filtration wird im Vakuum eingedampft. Das verbleibende Öl wird in Äther gelöst; die Lösung wird mit 3N HCl und Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Man erhält 6,1 g zähen Schaum, der in 60 ml abs. Benzol gelöst und wie beim Didepsipeptid VI im HCl-Strom denitrosiert wird. Den Verdampfungsrückstand behandelt man in Alkohol mit etwas Tierkohle, verdampft erneut und fällt 3mal aus Äther/Petroläther um. Der entstehende Schaum (4,5 g oder 66% bezogen auf IX) ist leicht hygroskopisch. $[\alpha]_D^{25} = -50,5^\circ$ ($c = 1,02$ in Alkohol).

$\text{C}_{36}\text{H}_{66}\text{O}_{10}\text{N}_3\text{Cl}$ (736,37) Ber. C 58,72 H 9,03 N 5,71% Gef. C 58,67 H 9,01 N 5,68%

Cyclo-(N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxyisovaleryl-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxyisovaleryl-N-methyl-L-isoleucyl-D- α -oxyisovaleryl) (XI). 1,1 g (0,0015 Mol) Hexadepsipeptid-hydrochlorid X werden in 30 ml abs. Benzol mit 375 mg (0,0018 Mol) PCl_5 30 Min. bei 0° und $3\frac{1}{2}$ Std. bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird im Vakuum bei 35° Badtemperatur eingedampft, in 3000 ml abs. Benzol gelöst und unter Rühren bei Raumtemperatur innert 30 Min. tropfenweise mit 4,3 ml (0,030 Mol) Triäthylamin in 700 ml abs. Benzol versetzt. Man rührt noch 2 Std. und lässt dann 16 Std. bei Raumtemperatur stehen. Nach Eindampfen im Vakuum wird in Äther aufgenommen und mit 1N HCl, 10-proz. KHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand (1,1 g) wird auf 30 g Kieselgel³) chromatographiert. Die Benzol/Essigesterfraktionen (80:20 und 50:50) liefern 0,95 g Rohprodukt, das, aus Alkohol/Wasser umkristallisiert, 450 mg (44%) cyclisches Hexadepsipeptid vom Smp. 120–123° liefert, $[\alpha]_D^{26} = -92,1^\circ$ ($c = 1,01$ in Chloroform). Das Präparat ist mit dem auf anderem Wege hergestellten synthetischen Produkt[1] und mit natürlichem Enniatin A in jeder Beziehung identisch.

C) Depsipeptidsequenzen von Enniatin B. - *D- α -Hydroxyisovaleriansäure-benzylester (IIIb)*. 22 g (0,186 Mol) *D- α -Hydroxyisovaleriansäure* [12] werden portionenweise zu einer gerührten Lösung von Phenyl diazomethan in Äther [13] gegeben. Nach Beendigung der Stickstoffentwicklung wird die hellgelbe Lösung auf einen Drittel eingengt und mit 10-proz. KHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen und Verdampfen im Vakuum verbleibt ein Öl, das im Hochvakuum fraktioniert wird. Bei 0,03 Torr und 85–90° destillieren 33,5 g (86%) Benzylester.

$[\alpha]_D^{26} = +21,0^\circ$ (ohne Lösungsmittel) und $+14,1^\circ$ ($c = 1,2$ in Alkohol), $n_D^{22} = 1,5092$, $D_4^{20} = 1,068$ g/ml.

$C_{12}H_{16}O_3$ (208,25) Ber. C 69,20 H, 7,74% Gef. C 69,37 H 7,62%

N-Nitroso-N-methyl-L-valyl-D- α -oxyisovaleriansäure-benzylester (XII) (nach der Phosgenmethode [10]). 4,8 g (0,030 Mol) *N-Nitroso-N-methyl-L-valin* II b und 4,6 ml (0,033 Mol) Triäthylamin, gelöst in 50 Tetrahydrofuran, werden unter Rühren bei -60° mit 9,3 ml (0,033 Mol) 3,5 m6 Phosgenlösung in Toluol versetzt. Nach 15 Min. fügt man zuerst eine vorgekühlte Mischung von 6,3 g (5,9 ml [0,030 Mol]) *D- α -Hydroxyisovaleriansäure-benzylester* (III b) in 30 ml Tetrahydrofuran und gleich darauf und unter sehr kräftigem Rühren eine ebenfalls auf -60° vorgekühlte Mischung von 5 ml Pyridin und 5 ml Tetrahydrofuran auf einmal hinzu. Unter fortwährendem Rühren lässt man auf 0° aufwärmen und noch 16 Std. bei dieser Temperatur stehen. Danach wird mit Äther und 3 N HCl versetzt, die Ätherschicht gut mit 3 N HCl, 10-proz. $KHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Die verbleibenden 7,4 g Öl kristallisieren unter Petroläther. Kristalle aus Petroläther, 5,6 g (53%), Smp. $50-52^\circ$, $[\alpha]_D^{25} = -22,5^\circ$ ($c = 1,03$ in Alkohol).

$C_{18}H_{26}O_5N_2$ (350,40) Ber. C 61,70 H 7,48 N 8,00% Gef. C 61,80 H 7,28 N 8,16%

N-Nitroso-N-methyl-L-valyl-D- α -oxyisovaleriansäure (XIII). 1,75 g (0,005 Mol) Nitrosodidepsipeptidester XII werden in 20 ml Eisessig mit 0,2 g 5-proz. Palladiumkohle hydriert, bis die Wasserstoffaufnahme aufhört. Nach Filtrieren und Verdampfen im Vakuum erhält man einen kristallinen Rückstand, der aus Äther/Petroläther in zwei Fraktionen 0,9 g (70%) Nitrosodidepsipeptidsäure XIII liefert, die zur Weiterverarbeitung genügend rein ist, Smp. $94-96^\circ$. Weiteres Umkristallisieren aus Methanol/Wasser oder Äther/Petroläther erhöht den Smp. auf $96-98^\circ$. $[\alpha]_D^{25} = -38,2^\circ$ ($c = 0,99$ in Alkohol).

$C_{11}H_{20}O_5N_2$ (260,29) Ber. C 50,76 H 7,75 N 10,76% Gef. C 50,90 H 7,65 N 10,76%

N-Methyl-L-valyl-D- α -oxyisovaleriansäure-benzylester (XIV). 3,95 g (0,0113 Mol) Nitrosodidepsipeptidester XII werden in 50 ml abs. Benzol unter Rühren mit einem starken Strom von HCl-Gas behandelt, wobei die Temperatur um 20° gehalten wird. Nach vorübergehender Dunkel-färbung hellt sich die Reaktionsmischung wieder auf, wonach im Vakuum eingedampft wird. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen, 2mal mit Äther gewaschen, mit eiskalter Ammoniaklösung alkalisch gestellt und sofort 2mal mit Äther ausgezogen. Nach Waschen, Trocknen und Eindampfen des Äthers verbleiben 2,9 g (80%) ölige Esterbase XIV. $[\alpha]_D^{25} = +41,5^\circ$ ($c = 1,45$ in Alkohol). Eine Probe wird mit ätherischer Salzsäure ins Hydrochlorid übergeführt, das aus Methylchlorid/Äther umkristallisiert werden kann. Smp. $101-104^\circ$, $[\alpha]_D^{25} = +60,8^\circ$ ($c = 0,93$ in Alkohol).

$C_{18}H_{28}O_4NCl$ (357,87) Ber. C 60,41 H 7,89 Cl 9,91% Gef. C 60,27 N 7,91 Cl 9,88%

N-Nitroso-N-methyl-L-valyl-D- α -oxyisovaleryl-N-methyl-L-valyl-D- α -oxyisovaleriansäure-benzylester (XV). 1,3 g (0,005 Mol) Nitroso-didepsipeptidsäure XIII werden in 10 ml abs. Äther bei -20° mit 1,1 g (0,0053 Mol) PCl_5 versetzt und 15 Min. bei 0° gerührt, wobei praktisch alles in Lösung geht. Nach Filtrieren wird bei 30° im Vakuum eingedampft. Nach nochmaligem Abdampfen mit Toluol wird der Rückstand in 10 ml abs. Äther gelöst und bei -70° unter Rühren mit einer Lösung von 1,6 g (0,005 Mol) Didepsipeptidesterbase XIV und 1,4 ml (0,010 Mol) Triäthylamin in 20 ml Äther versetzt. Danach lässt man auf Raumtemperatur aufwärmen, setzt mehr Äther zu und wäscht gut mit 3 N HCl, 10-proz. $KHCO_3$ -Lösung und Wasser, trocknet und verdampft im Vakuum. Das verbleibende Öl wird in Hexan/Benzol (1:1) auf 41 g Kieselgel³⁾ gegeben. Mit Benzol/Essigester (90:10 und 80:20) werden 2,1 g (75%) (XV) eluiert⁴⁾. $[\alpha]_D^{25} = -75,2^\circ$ ($c = 1,01$ in Alkohol).

$C_{29}H_{45}O_8N_3$ (563,67) Ber. C 61,79 H 8,05 N 7,46% Gef. C 61,62 H 7,95 N 7,40%

D) Versuche zur Untersuchung der Racemisierung. - 1. *Hydrolyse des gemischten Benzolsulfosäure-Anhydrids*. 1,6 g (0,010 Mol) *N-Nitroso-N-methyl-L-valin* wurden in 20 ml Pyridin gelöst und bei $0-5^\circ$ unter Rühren mit 1,3 ml (0,010 Mol) Benzolsulfochlorid versetzt. Nach 10 Min. wurde Eis zugegeben, noch 5 Min. gerührt und dann im Vakuum eingedampft. Den Rückstand nahm man in Äther auf, wusch mit eiskalter 3 N HCl und extrahierte erschöpfend mit 10-proz. $KHCO_3$ -Lösung. Aus dieser Lösung erhielt man nach Ansäuern, Extraktion mit Äther und Waschen, Trocknen und Eindampfen desselben im Vakuum 1,25 g (78%) nicht kristallisierendes

Rückstand, der chromatographisch mit Nitrosomethylvalin identisch war⁴⁾, indessen ein $[\alpha]_D^{26}$ von nur $-8,4^\circ$ ($c = 1,18$ in Alkohol) aufwies und somit 90% Racemat enthielt⁵⁾.

2. *Hydrolyse des Nitrosoaminosäurechlorids*. Das Säurechlorid wurde aus 1,6 g (0,010 Mol) N-Nitroso-N-methyl-L-valin in 50 ml abs. Äther mittels 2,1 g (0,010 Mol) PCl_5 bei 0° erhalten. Es wurde auf zwei Arten hydrolysiert:

a) Man setzte Eis zu und liess 1 Std. rühren. Nach Aufarbeitung wie unter 1. erhielt man 1,3 g (81%) chromatographisch⁴⁾ reines, kristallisiertes N-Nitroso-N-methyl-L-valin zurück ($[\alpha]_D^{26} = -81,2^\circ$ ($c = 1,30$ in Alkohol)).

b) Man gab 14 ml (0,100 Mol) Triäthylamin und gleich darauf Eis zu, liess 1 Std. rühren und arbeitete wie unter 1. beschrieben auf. Hier wurden nur 0,35 g (22%) öliges, chromatographisch mit Nitrosomethylvalin identifiziertes Produkt erhalten, mit $[\alpha]_D^{26} = -12,8^\circ$ ($c = 0,61$ in Alkohol), was rund 85% Racemisierung bedeutet⁵⁾. 0,9 g Rückstand fanden sich im Neutralteil, der im UV. bei $\lambda = 296 \text{ m}\mu$ eine Absorptionsbande zeigte, deren $\log \epsilon = 3,14$ war. Dies könnte auf die Gegenwart von 20% 3-Methyl-4-isopropyl-sydnon hindeuten (Lit.[4]: $\lambda_{\text{max}} = 296 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 3,93$).

SUMMARY

The N-nitroso function is introduced as a protecting group for secondary amino acids, and its application in the synthesis of depsipeptides – particularly of Enniatin A – is described. The method proved, however, not to be generally applicable in the synthesis of N-alkylated peptides because of partial racemisation and frequent side reactions.

Chemische Forschungsabteilung der
F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. A.G., Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 2. Mitteilung: P. QUITT, R. O. STUDER & K. VOGLER, *Helv.* **46**, 1715 (1963).
 [2] K. HEYNS & W. KÖNIGSDORF, *Z. physiol. Chem.* **290**, 171 (1952); M. CHVAPIL & R. ZAHRADNIK, *ibid.* **307**, 217 (1957).
 [3] PAULMANN, *Arch. Pharmaz.* **232**, 621 (1894); vgl. BEILSTEIN, Band IV, Hauptwerk S. 380; D. L. HAMMICK & D. J. VOADEN, *J. chem. Soc.* **1961**, 3303.
 [4] P. BROOKES & J. WALKER, *J. chem. Soc.* **1957**, 4409.
 [5] J. C. EARL & A. W. MACKNEY, *J. chem. Soc.* **1935**, 899; R. A. EADE & J. C. EARL, *ibid.* **1945**, 591.
 [6] W. BAKER & W. D. OLLIS, *Quart. Rev.* **11**, 15 (1957).
 [7] R. ZAHRADNIK, *Naturwiss.* **43**, 350 (1956).
 [8] PL. A. PLATTNER, K. VOGLER, R. O. STUDER, P. QUITT & W. KELLER-SCHIERLEIN, *Helv.* **46**, 927 (1963).
 [9] M. M. SHEMYAKIN, YU. A. OVCHINNIKOW, A. A. KIRYUSHKIN & V. T. IVANOW, *Tetrahedron Letters* **1962**, 301, No. 7; M. M. SHEMYAKIN, YU. A. OVCHINNIKOW, A. A. KIRYUSHKIN & V. T. IVANOW, *Tetrahedron* **19**, 581 (1963).
 [10] M. BRENNER, J. P. ZIMMERMANN, P. QUITT, W. SCHNEIDER & A. HARTMANN, *Helv.* **40**, 604 (1957).
 [11] P. QUITT, J. HELLERBACH & K. VOGLER, *Helv.* **46**, 327 (1963).
 [12] PL. A. PLATTNER, U. NAGER & A. BOLLER, *Helv.* **31**, 665 (1948); E. FISCHER & H. SCHEIBLER, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **41**, 2894 (1908).
 [13] P. YATES & B. C. SHAPIRO, *J. org. Chemistry* **23**, 759 (1958).
 [14] F. BEUGEL, S. S. BROWN, C. L. LEESE, G. M. TIMMIS & R. WADE, *J. chem. Soc.* **1963**, 846.

⁵⁾ Racemisches N-Nitroso-N-methylvalin konnte bisher nicht kristallin erhalten werden. Vgl. auch [14]