

Peptide der p-Aminophenylelessigsäure

VON W. LANGENBECK, M. AUGUSTIN und A. BÜGE

Inhaltsübersicht

Es werden neue Peptide der p-Aminophenylelessigsäure hergestellt. Dabei wurde die Peptidbindung einmal an der NH_2 -Gruppe und zum anderen an der COOH -Gruppe der p-Aminophenylelessigsäure mit Hilfe der Chloracetylmethode und über die gemischten Anhydride geknüpft.

Das einzige bisher bekannte Peptid der p-Aminophenylelessigsäure ist das p-Aminophenacetylglycin auch p-Aminophenacetursäure genannt, das von HOTTER¹⁾ durch Nitrierung von Phenacetursäure und anschließende Reduktion erhalten werden konnte. CERECEDO und SHERWIN²⁾ isolierten das genannte Peptid aus dem Harn von Hunden, an die p-Aminophenylelessigsäure verfüttert wurde. Im Körper von Kaninchen wird die p-Aminophenylelessigsäure durch Acetylierung der NH_2 -Gruppe entgiftet.

JACOBS und HEIDELBERGER³⁾ beschrieben die Umsetzung von p-Aminophenylelessigsäure (APE) mit Chloracetylchlorid, wobei die N-(Chloracetyl)-p-aminophenylelessigsäure erhalten wurde. Wir haben diese Verbindung mit Ammoniak in 70proz. Ausbeute zur N-(Glycyl)-p-aminophenylelessigsäure, dem einfachsten Dipeptid aus Glycin und APE umgesetzt. Durch weitere Reaktion mit Chloracetylchlorid erhielten wir N-(Chloracetylglycyl)-p-aminophenylelessigsäure, die nur in 30proz. Ausbeute mit Ammoniak zum entsprechenden Tripeptid, der N-(Glycylglycyl)-p-aminophenylelessigsäure, überführt werden konnte. Nach dieser Methode konnten wir ein Di- und Tripeptid erhalten.

Diese beiden neuen Peptide erhielten wir ebenfalls auf anderen Wegen. N-Phthalylglycylchlorid konnte durch Umsetzung mit APE bzw. des entsprechenden Esters zur N-(Phthalylglycyl)-p-aminophenylelessigsäure umgesetzt werden, während aus N-Phthalylglycylglycylchlorid mit APE die N-

¹⁾ E. HOTTER, J. prakt. Chem. (2) **38**, 113 (1888).

²⁾ CERECEDO u. SHERWIN, J. Biol. Chem. **62**, 226 (1925).

³⁾ W. A. JACOBS u. M. HEIDELBERGER, J. Amer. chem. Soc. **41**, 458 (1919).

(Phthalylglycylglycyl)-p-aminophenylelessigsäure erhalten werden konnten. Die Abspaltung der Schutzgruppen gelang nach SCHUMANN und BOISSONAS⁴⁾ mit Phenylhydrazin. Dabei wurden die Di- und Tripeptide zum zweiten Mal erhalten. Die Mischschmelzpunkte zeigten keine Depression.

Als weitere Schutzgruppe kam der Cbo-Rest zur Anwendung. Aus Cbo-Chlorid und APE entstand die noch nicht bekannte N-Cbo-p-aminophenylelessigsäure in Form weißer glitzernder Blättchen. Eine ähnlich gebaute Verbindung wurde bereits von BLASTERFIELD und WRIGHT⁵⁾ beschrieben. Diese Autoren hatten APE mit Chlorameisensäureäthylester zur N-Carbäthoxy-p-aminophenylelessigsäure umgesetzt. Über die gemischten Anhydride gelang nun die Kupplung von Cbo-Glycin mit APE bzw. mit N-(Glycyl)-p-aminophenylelessigsäure. Auch die Umsetzung von Cbo-diglycin mit p-Aminophenylelessigsäure verlief mit recht guten Ausbeuten. Somit entstanden die Cbo-Di- und Tripeptide, die durch Umkristallisation aus Methanol leicht rein erhalten werden konnten. Nach Abspaltung der Schutzgruppe mit HBr-Eisessig konnten wiederum die freien Peptide N-(Glycyl)-APE und N-(Glycylglycyl)-APE erhalten werden.

Wesentlich schwieriger gestaltete sich die Umsetzung der N-Cbo-APE mit Glycin, N-(Glycyl)-APE und mit der p-Aminophenylelessigsäure selbst, wobei wir mit der letzteren die Synthese des linearen Dipeptids APE-APE anstrebten. Wir arbeiteten zunächst unter den üblichen Bedingungen, indem die wäßrig-alkalische Lösung der p-Aminophenylelessigsäure zum gemischten Anhydrid — entstanden aus der Cbo-Verbindung und Chlorameisensäureäthylester in absolutem Tetrahydrofuran — zugegeben wurde. Während die Reaktion mit Cbo-Glycin noch recht gut verlief, konnten mit den anderen genannten Verbindungen keine Peptide auf diese Weise erhalten werden. Die geringe Reaktionsfreudigkeit ist auf die parallel laufende Konkurrenzreaktion des gemischten Anhydrids mit Wasser zurückzuführen, wobei die Aminolyse zurückgedrängt wird. Wir versuchten deshalb, die an der Carboxylgruppe der p-Aminophenylelessigsäure neu geknüpften Peptidbindungen auf eine etwas abgewandelte Weise aufzubauen, wobei es besonders auf ein wasserfreies Medium ankam, um die Hydrolyse auszuschalten. Durch Umsetzung des gemischten Anhydrids aus Chlorameisensäureäthylester und N-Cbo-APE in Tetrahydrofuran mit dem p-Aminophenylelessigsäureäthylester konnte in 33proz. Ausbeute der N-(Cbo-p-aminophenacetyl)-p-aminophenylelessigester erhalten werden, der nach Abspaltung der Schutzgruppe und Verseifung das lineare Dipeptid der p-Aminophenylelessigsäure liefert.

⁴⁾ I. SCHUMANN u. R. A. BOISSONAS, Nature (London) **169**, 154 (1952).

⁵⁾ S. BLASTERFIELD u. H. N. WRIGHT, J. Amer. chem. Soc. **48**, 2367 (1926).

Beschreibung der Versuche

1. p-Aminophenylelessigsäure

Aus p-Nitrophenylelessigester durch Reduktion und anschließende Verseifung⁶⁾.

2. N-(Glycyl)-p-aminophenylelessigsäure

25,5 g N-(Chloracetyl)-p-aminophenylelessigsäure³⁾ wurden mit 300 ml konz. Ammoniak in einer Druckflasche zwölf Stunden auf 30–35° gehalten. Die Lösung wurde im Vakuum eingengt und mit verdünnter Salzsäure kongosauer gemacht. Nach Zugabe von Natriumacetatlösung fiel das Dipeptid aus. Es wurde aus Wasser umkristallisiert. Weiße Blättchen, durch Umfällen aus Natriumbicarbonatlösung/verdünnte Salzsäure weißes Pulver.

Ausbeute 70%. Fp. 251°.

$C_{10}H_{12}N_2O_3$ ber.: C 57,75; H 5,81; N 13,45;
gef.: C 57,27; H 5,72; N 13,67.

3. N-(Chloracetylglycyl)-p-aminophenylelessigsäure

12,5 g N-(Glycyl)-p-aminophenylelessigsäure wurden in 60 ml 1 n Natronlauge gelöst, mit 2 cm³ Äther überschichtet und bei 0° tropfenweise mit 7,2 ml Chloracetylchlorid ersetzt. Nach dem Abtrennen des Äthers wurde mit verdünnter Salzsäure schwach angesäuert, die N-(Chloracetylglycyl)-p-aminophenylelessigsäure abgesaugt und aus Eisessig—Wasser umkristallisiert. Farblose, stäbchenförmige Kristalle, löslich in heißem Eisessig, sehr schwer löslich in heißem Wasser und Alkohol.

Ausbeute 85%. Fp. 190–192° (Zers.).

$C_{12}H_{13}N_2O_4Cl$ ber.: N 9,85; gef.: N 9,95.

4. N-(Diglycyl)-p-aminophenylelessigsäure

13,5 g N-(Chloracetylglycyl)-p-aminophenylelessigsäure wurden mit 150 ml konz. Ammoniaks 24 Stunden bei Zimmertemperatur in einer Druckflasche stehen gelassen. Die Lösung wurde im Vakuum eingengt und mit HCl schwach angesäuert. Dabei fiel ein feinkristalliner weißer Niederschlag aus. Zur Vervollständigung der Ausfällung wurde Natriumacetatlösung zugegeben und die Lösung mehrere Tage im Eisschrank aufbewahrt. Nach Absaugen und Waschen mit Wasser konnte aus Wasser umkristallisiert werden, wobei ein weißes, feinkristallines Pulver — schwer löslich in heißem Wasser — erhalten werden konnte.

Ausbeute 32%. Fp. 156°.

$C_{12}H_{15}N_3O_4$ ber.: C 54,30; H 5,71; N 15,85;
gef.: C 54,86; H 5,63; N 15,71.

5. N-(Phthalylglycyl)-p-aminophenylelessigester

8,6 g Phthalylglycylchlorid⁷⁾ wurden in 50 ml Chloroform gelöst und unter Rühren binnen 2 Stunden zu einer Lösung von 9,9 g p-Aminophenylelessigester in 50 ml Chloroform zugetropft. Es wurde noch 1 Stunde gerührt und dann das Chloroform im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde mit Wasser versetzt und die leicht braune Masse abgesaugt.

⁶⁾ E. FERBER u. H. BENDIX, Ber. dtsch. chem. Ges. **72**, 839 (1939).

⁷⁾ F. E. KING, J. chem. Soc. London **1957**, 875.

Durch Umkristallisation aus 800 ml Alkohol konnten weiße Nadeln erhalten werden. Leicht löslich in Essigester, löslich in heißem Alkohol, schwer löslich in heißem Wasser.

Ausbeute: 86,4%. Fp. 209–210°.

$C_{20}H_{18}N_2O_5$ ber.: N 7,64; gef.: N 7,97.

6. N-(Phthalylglycyl)-p-aminophenyllessigsäure

a) Durch Verseifung des oben beschriebenen Esters

3,7 g N-(Phthalylglycyl)-p-aminophenyllessigester wurden mit 25 ml 1n alkoholischer KOH 15 Minuten am Rückfluß gekocht. Die Lösung wurde mit Wasser auf das dreifache ihres Volumens verdünnt und mit halbkonzentrierter Salzsäure kongosauer gemacht. Nach Köhlen im Eisschrank konnte die freie Säure abgesaugt werden. Weiße Nadeln, löslich in heißem Methanol, unlöslich in Wasser.

Ausbeute: 88,2%. Fp. 263–264°.

b) Aus Phthalylglycylchlorid und p-Aminophenyllessigsäure

1,5 g p-Aminophenyllessigsäure und 0,55 g Soda wurden in 30 ml Wasser gelöst. Binnen 45 Minuten wurden unter Kühlung mit Eiskochsalzmischung und Rühren gleichzeitig 2,23 g Phthalylglycylchlorid in 25 ml Dioxan und 0,55 g Soda in 25 ml Wasser zugetropft. Nach einer Stunde wurde mit halbkonzentrierter Salzsäure kongosauer gemacht, abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Weiße Nadeln.

Ausbeute: 72%. Fp. 262–264°.

$C_{18}H_{14}N_2O_5$ ber.: C 64,0; H 4,18; N 8,27;
gef.: C 64,56; H 4,50; N 8,65.

7. N-(Phthalylglycyl)-p-aminophenyllessigsäure

Zu einer Lösung von 2,1 g N-(Glycyl)-p-aminophenyllessigsäure und 0,55 g Soda in 30 ml Wasser wurden unter Kühlung und Rühren gleichzeitig 2,23 g Phthalylglycylchlorid in 25 ml Dioxan und 0,7 g Soda in 30 ml Wasser zugetropft. Schon während des Zutropfens fiel ein weißer Niederschlag aus. Es wurde kongosauer gemacht, abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Weiße, nadelförmige Kristalle, löslich in heißem Methanol, unlöslich in Wasser.

Ausbeute 25,3%. Fp. 270° (Zers.).

$C_{20}H_{17}N_3O_6$ ber.: C 60,7; H 4,35; N 10,63;
gef.: C 60,26; H 4,66; N 10,79.

8. Abspaltung des Phthalylrestes aus den beschriebenen Phthalylpeptiden

1,7 g N-(Phthalylglycyl)-p-aminophenyllessigsäure bzw. 1 g N-(Phthalylglycyl)-p-aminophenyllessigsäure wurden mit 1,1 g bzw. 0,6 g Phenylhydrazin und 1 g bzw. 0,5 g Tri-N-butylamin in 50 ml bzw. 30 ml Alkohol zwei Stunden am Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen der Lösung wurden 75 ml bzw. 50 ml Methyläthylketon und 0,3 ml bzw. 0,15 ml Eisessig zugegeben. Es wurde über Nacht im Kühlschranks stehen gelassen, abgesaugt, mit Wasser gewaschen. Dabei wurden die entsprechenden Di- und Tripeptide erhalten.

N-(Diglycyl)-p-aminophenyllessigsäure:

Ausbeute: 77%, Fp. 250°.

Die Mischschmelzpunkte mit den nach der Chloracetylmethode hergestellten Peptiden ergaben keine Depressionen.

9. N-Cbo-p-aminophenylelessigsäure

22,7 g p-Aminophenylelessigsäure wurden in 75 ml 2 n Natronlauge gelöst, binnen 45 Minuten bei Temperaturen unter 0° mit 27 g Cbo-Chlorid und 60 ml 4 n Natronlauge versetzt und anschließend 10 Stunden gerührt. Es wurde ausgeäthert und mit HCl angesäuert. Der hellbraune, kristalline Niederschlag wurde aus Methanol/Wasser unter Zugabe von A-Kohle umkristallisiert. Die Verbindung fiel in Form weißer, glitzernder Blättchen an. Ausbeute: 52%. Fp. 156,5—157°.

$C_{16}H_{15}NO_4$ ber.: C 67,36; H 5,30; N 4,91;
gef.: C 67,54; H 5,64; N 5,11.

10. N-(Cbo-glycyl)-p-aminophenylelessigsäure

4,18 g Cbo-Glycin und 2,8 ml Triäthylamin wurden in 100 ml absolutem Toluol auf -10° abgekühlt und tropfenweise mit 2,17 g Chlorameisensäureäthylester unter Rühren versetzt. Es wurde noch weitere 30 Minuten bei -10° gehalten. Nach dem Zutropfen von 3 g p-Aminophenylelessigsäure in 20 ml 1 n Natronlauge wurde noch 3 Stunden gerührt, die wäßrige Schicht abgetrennt und zweimal ausgeäthert. Nach dem Ansäuern mit halbkonzentrierter Salzsäure fiel ein hellbrauner Niederschlag an, der aus Dimethylformamid/Wasser oder aus Methanol umkristallisiert wurde. Dabei entstand ein weißes, kristallines Produkt.

Ausbeute: 60%. Fp. 198—199°.

$C_{18}H_{18}N_2O_5$ ber.: C 63,15; H 5,30; N 8,18;
gef.: C 62,84; H 5,68; N 8,39.

11. N-(Cbo-diglycyl)-p-aminophenylelessigsäure

Die Darstellung erfolgte analog der N-(Cbo-glycyl)-p-aminophenylelessigsäure über das gemischte Anhydrid. Bessere Ausbeuten wurden erhalten, wenn als Lösungsmittel an Stelle von Toluol absolutes Tetrahydrofuran verwendet wurde. Vor dem Ausäthern mußte mit Wasser verdünnt werden. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Dimethylformamid/Wasser wurde ein weißes Pulver erhalten. Leicht löslich in Dimethylformamid, schwer löslich in heißem Methanol.

a) Aus Cbo-glycylglycin und p-Aminophenylelessigsäure: Ausbeute 55%. Fp. 218,5°.

b) Aus Cbo-glycin und N-(Glycyl)-p-aminophenylelessigsäure: Ausbeute 50%. Fp. 217 bis 218°.

$C_{20}H_{21}N_3O_6$ ber.: C 60,14; H 5,30; N 10,52;
gef.: C 60,45; H 5,35; N 10,77.

12. N-Cbo-p-aminophenacetylglycin

Die Darstellung aus N-Cbo-p-aminophenylelessigsäure und Glycin erfolgte analog der beschriebenen Vorschrift über das gemischte Anhydrid. Es mußte mehrmals aus Dimethylformamid/Wasser oder Methanol/Wasser umkristallisiert werden, um unumgesetzte N-Cbo-p-aminophenylelessigsäure aus dem Produkt zu entfernen. Weißes Pulver, leicht löslich in Dimethylformamid und heißem Methanol, schwer löslich in Wasser.

Ausbeute: 40%. Fp. 149—152°.

$C_{18}H_{18}N_2O_5$ ber.: N 8,18; gef.: N 8,43.

Die Darstellung obiger Verbindung gelang analog aus N-Cbo-p-aminophenylelessigsäure und Glycinäthylesterhydrochlorid über den N-Cbo-p-aminophenylacetyl-glycinäthylester, der in 52proz. Ausbeute isoliert werden konnte.

Fp. des Esters 109—112°.

$C_{20}H_{22}N_2O_5$ ber.: N 7,54; gef.: N 7,21.

13. N-(Cbo-p-aminophenacetyl-glycyl)-p-aminophenylelessigsäure

Die Darstellung aus N-Cbo-p-aminophenylelessigsäure und N-(Glycyl)-p-aminophenylelessigsäure über das gemischte Anhydrid erfolgte analog der für die N-(Cbo-glycyl)-p-aminophenylelessigsäure gegebenen Vorschrift. Es wurde mehrmals aus Dimethylformamid/Wasser umkristallisiert. Schwach hellgelb gefärbtes Pulver.

Ausbeute: 21%. Fp. 249,5—251,5°.

$C_{26}H_{25}N_3O_6$ ber.: C 65,7; H 5,3; N 8,84;
gef.: C 65,25; H 5,6; N 8,75.

14. N-(Cbo-p-aminophenacetyl)-p-aminophenylelessigester

5,7 g N-Cbo-p-aminophenylelessigsäure und 2,8 ml Triäthylamin wurden in 70 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst, auf -12° gekühlt und unter Rühren tropfenweise mit einer Lösung von 1,94 ml Chlorameisensäureäthylester in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran versetzt. Nach 30 Minuten wurden — noch bei -12° — 3,6 g p-Aminophenylelessigester in 35 ml absolutem Methanol zugetropft. Es wurde noch drei Stunden gerührt und während dieser Zeit langsam auf Zimmertemperatur gebracht. Es wurde mit Wasser auf das Dreifache des Volumens verdünnt, dreimal mit Essigester ausgeschüttelt, die Essigesterschicht mit Wasser, Bicarbonat und wiederum Wasser gewaschen. Der Cbo-Peptidester konnte mit Petroläther gefällt, aus Methanol/Wasser umkristallisiert und im Trockenschrank bei 100° getrocknet werden. Farblose Blättchen, leicht löslich in Alkohol und Essigester, sehr schwer löslich in Wasser.

Ausbeute: 33,5%. Fp. 166°.

$C_{26}H_{26}N_2O_5$ ber.: N 6,27; gef.: N 6,36.

15. Abspaltung der Cbo-Reste der dargestellten Cbo-Peptide mit HBr/Eisessig

5 mMol Cbo-Peptid wurden mit 8—10 ml HBr/Eisessig versetzt und bei Zimmertemperatur geschüttelt. Nach wenigen Minuten war alles gelöst. Nach 25 Minuten wurde die Lösung mit dem zehnfachen Volumen absolutem Äther versetzt und 2 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Das Peptid Hydrobromid wurde abgesaugt und das sehr hygroskopische Produkt aus absolutem Methanol/absolutem Äther umgefällt. Das so behandelte Hydrobromid war nicht mehr hygroskopisch. Es wurde abgesaugt, mit absolutem Äther gewaschen, in möglichst wenig Wasser gelöst, mit der berechneten Menge Triäthylamin versetzt und mit Aceton gefällt. Auf diese Art und Weise wurden folgende Peptide erhalten:

a) N-(Glycyl)-p-aminophenylelessigsäure: aus N-(Cbo-glycyl)-p-aminophenylelessigsäure.

Ausbeute 80%. Fp. 252°.

b) N-(Diglycyl)-p-aminophenylelessigsäure: aus N-(Cbo-diglycyl)-p-aminophenylelessigsäure.

Ausbeute: 72%. Fp. 155°.

Die Mischschmelzpunkte der beiden Peptide ergaben mit den bereits oben beschriebenen Produkten keine Depression.

c) p-Aminophenacetyl-glycin (p-Aminophenacetursäure): aus N-Cbo-p-aminophenacetyl-glycin.

Farblose Blättchen aus Methanol/Wasser. Leicht löslich in heißem Alkohol und Wasser, sehr schwer löslich in Äther und Aceton.

Ausbeute: 81%. Fp.: Die Verbindung begann bei 196–197° unter Dunkelfärbung zu sintern. In der Literatur ist ein Fp. von 200° beschrieben.

d) N-(p-Aminophenacetyl-glycyl)-p-aminophenylelessigsäure: aus N-(Cbo-p-aminophenacetyl-glycyl)-p-aminophenylelessigsäure. Schwach gelb gefärbtes kristallines Produkt, schwer löslich in heißem Methanol.

Ausbeute: 40%. Fp. 218°.

$C_{18}H_{19}N_3O_4$ ber.: N 11,76; gef.: N 11,70.

e) N-(p-Aminophenacetyl)-p-aminophenylelessigester: aus N-(Cbo-p-aminophenacetyl)-p-aminophenylelessigester. Das erhaltene Peptidesterhydrobromid wurde in wäßrigem Methanol gelöst, mit der berechneten Menge Triäthylamin versetzt und mit Wasser nach 30 Minuten gefällt. Umkristallisation aus Methanol/Wasser.

Ausbeute: 69%. Fp. 106°.

$C_{18}H_{20}N_2O_3$ ber.: N 8,95; gef.: N 9,21.

16. N-(p-Aminophenacetyl)-p-aminophenylelessigsäure

1 g N-(p-Aminophenacetyl)-p-aminophenylelessigester wurde mit 25 ml 1 n alkoholischer KOH verseift. Die Lösung wurde mit Wasser verdünnt und mit Eisessig angesäuert. Absaugen, mit Wasser waschen und über P_2O_5 trocknen. Farblose Blättchen, löslich in heißem Methanol.

Ausbeute: 82,5%. Fp. 214°.

$C_{16}H_{17}N_2O_3$ ber.: N 9,86; gef.: N 9,62.

Halle-Wittenberg, Institut für organische Chemie der Martin-Luther Universität.

Bei der Redaktion eingegangen am 25. Januar 1964.