

Hydrazinosäuren als Heterobestandteile in Peptiden. IV

Optisch aktive Hydrazinosäuren aus optisch aktiven Aminosäuren

VON HARTMUT NIEDRICH UND RENATE GRUPE

Inhaltsübersicht

Durch Einwirkung von Hydrazin auf α -Bromcarbonsäuren gelingt die Synthese der optisch aktiven α -Hydrazinocarbonsäuren, die dem Phenylalanin, Leucin und Alanin analog sind. Durch Spaltung mittels RANEY-Nickel zu den Aminosäuren werden die absolute Konfiguration und der Razematgehalt der erhaltenen Produkte bestimmt.

Die Synthese von Peptiden, die Hydrazinosäuren als Fremdbausteine enthalten, ist bisher nur mit der Hydrazinoessigsäure durchgeführt worden¹⁾²⁾, wobei das Glycin im Oxytocin durch diese einfachste Hydrazinosäure ersetzt wurde³⁾. Für den Austausch anderer Aminosäuren in wirksamen Peptiden gegen die analogen Hydrazinosäuren ist der Einsatz von L-Hydrazinosäuren notwendig. Die Herstellung der NH-Homologen von Phenylalanin, Leucin, Valin und Alanin ist bisher lediglich für die Razemate beschrieben⁴⁻⁸⁾. Nur im Falle der α -Hydrazinophenylelessigsäure hat DARAPSKY⁹⁾ durch Razematspaltung und über die optisch aktive α -Brom-phenylelessigsäure durch Umsetzung mit Hydrazin die optischen Antipoden erhalten.

Wir setzten ebenfalls optisch aktive Bromcarbonsäuren mit Hydrazin um, die wir nach MAIMIND und SCHEMJAKIN¹⁰⁾ aus optisch aktiven Amino-

1) W. KNOBLOCH u. H. NIEDRICH, J. prakt. Chem. **17**, 273 (1962); H. NIEDRICH u. W. KNOBLOCH, ebenda **17**, 263 (1962).

2) H. NIEDRICH, Chem. Ber. **96**, 2774 (1963).

3) H. NIEDRICH, B. WIEGERSHAUSEN u. E. GÖRES, Proc. of the Second Pharmac. Meeting, Sympos. X., Pergamon Press, Oxford 1964 S. 173.

4) A. DARAPSKY, J. prakt. Chem. (2) **96**, 251 (1917); **146**, 219 u. 268 (1936).

5) J. R. BAILEY u. J. THIELE, Liebigs Ann. Chem. **303**, 75 (1898).

6) J. THIELE u. J. HEUSER, ebenda **240**, 1 (1896).

7) W. TRAUBE u. G. LONGINESCU, Ber. **29**, 670 (1896).

8) J. R. BAILEY u. A. MIKESKA, J. Amer. Chem. Soc. **38**, 1782 (1916).

9) A. DARAPSKY, J. prakt. Chem. **99**, 179 (1919).

10) W. J. MAIMIND, K. M. ERMOLJAJEW u. M. M. SCHEMJAKIN, Ž. obščej Chim. (J. allg. Chem.) **26**, 2313 (1956).

säuren durch Umsetzung mit KBr/NaNO_2 in schwefelsaurer Lösung erhielten. Zur Gewinnung der strukturverwandten L - α -Aminoxycarbonsäuren gingen TESTA und Mitarbeiter¹¹⁾ ebenso vor.

Zur Reaktion der α -Bromcarbonsäuren mit Hydrazin wurden die von DARAPSKY⁴⁾ sowie CARMI, POLLAK und YELLIN¹²⁾ angegebenen Verfahren modifiziert, um eine möglichst hohe optische Reinheit der Hydrazinosäure-Antipoden zu erreichen. Der Nachweis der absoluten Konfiguration der synthetisierten Hydrazinosäuren erfolgte durch reduktive Spaltung mit RANEY-Nickel, aktiviert nach¹³⁾, und Messung der spezifischen Drehung der so zurückerhaltenen Aminosäuren. Da diese Reaktion nicht am asymmetrischen C-Atom abläuft, muß die Hydrazinosäure die gleiche absolute Konfiguration wie die erhaltene Aminosäure gehabt haben. Nach Durchlaufen dieses Zyklus gibt der Vergleich der spezifischen Drehung mit der Ausgangsaminosäure zugleich ein Maß für die Anreicherung des gewünschten Hydrazinosäure-Antipoden an. Daß sich das Verhältnis der Antipoden durch die reduktive Spaltung und alle damit zusammenhängenden Reinigungsoperationen nicht verschiebt, wurde durch entsprechende Umsetzung eines vorgegebenen Gemisches von D - und L -Komponente von α -Hydrazino- β -phenylpropionsäure überprüft und bestätigt.

Die Ergebnisse der Synthese von D - bzw. L - α -Hydrazino- β -phenylpropionsäure sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

	Phenylalanin	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{Br})\text{COOH}$	NH-Phe ^{a)}	Phe aus NH-Phe ^{a)}
	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ in	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ in	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ in	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ in
1. b)	L $-4,5$ HCl ^{d)}	L $-7,8$ Äthanol ^{d)}	D $+16,3$ HCl ^{d)}	D $+4,3$ HCl
2. c)	L $-4,7$ HCl	L $-7,9$ dto.	D $+16,2$ HCl	D $+4,8$ HCl
3. b)	D $+32,9$ H ₂ O	D $+7,5$ dto.	L $-16,5$ HCl	L $-33,2$ H ₂ O
4. c)	D $+32,8$ H ₂ O	D $+7,5$ dto.	L $-16,4$ HCl	L $-33,0$ H ₂ O

a) Phe = Phenylalanin; in Anlehnung an die auf dem V. Europ. Peptidsymposium empfohlenen Abkürzungen wird die Hydrazino-phenylpropionsäure als NH-Phe abgekürzt.

b) Die Umsetzung erfolgte bei Zimmertemperatur.

c) Die Umsetzung erfolgte in der Siedehitze.

d) In allen Fällen war $c = 1$ und die HCl = 6 n.

Der mittlere Fehler bei der Messung der spezifischen Drehung beträgt $\pm 0,3^\circ$. Die $[\alpha]$ -Werte von NH-Phe waren nach ein- und mehrmaliger Umkristallisation unverändert.

¹¹⁾ E. TESTA, B. J. R. NICOLAUS, L. MARIANI u. G. PAGANI, *Helv. Chim. Acta* **46**, 766 (1963).

¹²⁾ A. CARMI, G. POLLAK u. H. YELLIN, *J. Org. Chem.* **25**, 44 (1960); *J. Medicinal Chem.* **7**, 220 (1964).

¹³⁾ *Organic Syntheses*, Coll. Vol. III, 181.

Bei entsprechend durchgeführter Reaktionsfolge, ausgehend vom Leucin und Alanin, über die im folgenden berichtet wird, wurde der gleiche Konfigurationswechsel, WALDENsche Umkehr bei der Hydrazinolyse der α -Bromcarbonsäure, gefunden. Somit entspricht der sterische Ablauf dieser Reaktionsfolge den Verhältnissen, wie sie E. FISCHER und Mitarbeiter am Beispiel des Alanins¹⁴⁾¹⁵⁾, Leucins¹⁶⁾¹⁷⁾ und Phenylalanins¹⁸⁾ beim Durchlaufen des Zyklus: Aminosäure \rightarrow Bromcarbonsäure \rightarrow Aminosäure erstmals beobachteten. Die Analogie des Reaktionsablaufes und der Reaktionsbedingungen berechtigen zu der Schlußfolgerung, daß auch die Hydrazinolyse nach dem S_N-2 -Mechanismus abläuft.

Im Falle der α -Hydrazino- β -phenylpropionsäure (Tab. 1) hat die Temperatur auf den sterischen Ablauf der Reaktion keinen Einfluß, wogegen bei der Synthese von D- α -Hydrazinoisocaprionsäure aus L- α -Bromisocaprionsäure, wie aus Tab. 2 hervorgeht, ein Temperatureinfluß vorliegt.

Tabelle 2

Reaktionsbedingungen	Siedetemperatur	Zimmertemperatur
	$[\alpha]_D^{20}$ Versuch *)	$[\alpha]_D^{20}$ Versuch *)
100proz. $NH_2-NH_2 \cdot H_2O$ in absol. Äthanol	-3,3 a	-12,7 d
100proz. $NH_2-NH_2 \cdot H_2O$ ohne Lösungsmittel	—	— 8,8 e
25proz. wäßr. $NH_2-NH_2 \cdot H_2O$ in Äthanol	-0,5 b	-10,5 f
25proz. wäßriges $NH_2-NH_2 \cdot H_2O$	-1,5 c	-13,1 g

$[\alpha]_D^{20}$ wurde jeweils in 6 n HCl bei der Konzentration $c = 1$ ermittelt.

*) siehe experimentellen Teil.

Die höchste spezifische Drehung wurde bei den Versuchsansätzen d und g ermittelt, wobei die Bedingungen von g vorzuziehen sind, da hier die D- α -Hydrazinoisocaprionsäure in sehr schönen glänzenden Blättchen auskristallisiert.

Der durch Spaltung der D- α -Hydrazinoisocaprionsäure zum D-Leucin ermittelte Gehalt an D-Komponente betrug unter den günstigsten Bedingungen etwa 97% (3% Razemat).

Ein weitaus geringerer Gehalt an D-Komponente zeigte sich nach der Rückspaltung von D- α -Hydrazinopropionsäure zum D-Alanin. Die beste in einer Reihe von Versuchen erzielte Anreicherung ist aus Tabelle 3 ersichtlich.

¹⁴⁾ E. FISCHER u. A. SKITA, Z. physiol. Chem. **33**, 177 (1901).

¹⁵⁾ E. FISCHER, Liebigs Ann. Chem. **340**, 171 (1905).

¹⁶⁾ E. FISCHER, Ber. **39**, 453 (1906).

¹⁷⁾ E. FISCHER u. E. SCHOELLER, Liebigs Ann. Chem. **357**, 1 (1907).

¹⁸⁾ E. SCHOELLER, ebenda **357**, 11 (1907).

Tabelle 3

	L-Alanin	L—H ₃ C—CH(Br)COOH	D—NH—Ala	D-Alanin
$[\alpha]_D^{20}$	+ 11,5 HCl c=1	—26,6 absol. Äthanol c=1	+ 25,3 HCl c=1	—7,1 HCl c=1

Versuche, mit der gleichen Methodik auch optisch aktive α -Hydrazinoisovaleriansäure zu synthetisieren, führten unter keiner der bei den vorangegangenen Beispielen erprobten Bedingungen zu einem verwertbaren Ergebnis. Während die Rohprodukte noch geringe optische Aktivität besaßen, war nach Umkristallisation die Drehung gleich Null. RANEY-Nickel-Spaltung zum D,L-Valin bestätigte die totale Razemisierung. Die Aminolyse von Bromisovaleriansäure verläuft nach E. FISCHER und SCHEIBLER¹⁹⁾ entgegen der Regel unter Retention. Der dafür diskutierte S_N—1-Mechanismus erklärt die bei der Aminolyse gelegentlich beobachtete partielle und die von uns bei der Hydrazinolyse gefundene totale Razemisierung, vgl.²⁰⁾

Beschreibung der Versuche

D- α -Hydrazino- β -phenylpropionsäure

a) Zu einer Lösung von 3,6 g 100proz. Hydrazinhydrat in 15 ml absolutem Äthanol wurde unter Wasserkühlung allmählich eine Lösung von 5,5 g L- α -Brom- β -phenylpropionsäure gegeben. Nach 20stündigem Aufbewahren bei Zimmertemperatur hatte sich ein kristalliner Niederschlag gebildet, der nach Zugabe von etwas Äther abgesaugt und aus heißem Wasser umkristallisiert wurde. Ausbeute: 1,6 g (38%), Schmp. 185—190°. Durch Aufarbeitung der Reaktionslösung konnte kein weiteres Produkt erhalten werden.

b) Der gleiche Ansatz wurde nach dem Zusammengeben 30 Minuten zum Sieden erhitzt. Nach 10 Minuten begann die Kristallausscheidung. Die Reaktionsmischung wurde eine Stunde im Kühlschrank bei —10° aufbewahrt und wie unter a) aufgearbeitet. Ausbeute: 1,65 g (38,5%), Schmp. 188—192°.

C₉H₁₂N₂O₂ (180, 211) ber.: C 59,98; H 6,71; N 15,55;
gef.: C 59,96; H 6,73; N 15,67.

L- α -Hydrazino- β -phenylpropionsäure

Die Synthese aus D- α -Brom- β -phenylpropionsäure erfolgte wie oben.

a) Ausbeute: 1,5 g (35%), Schmp. 189—194°.

b) Ausbeute: 1,7 g (40%), Schmp. 191—194°.

gef.: C 60,00; H 6,90; N 15,88.

D- α -Hydrazino-isocapronsäure

a) Zu 3 g 100proz. Hydrazinhydrat in 6 ml absolutem Äthanol werden bei Siedetemperatur 3,9 g L- α -Brom-isocapronsäure, gelöst in 4 ml Äthanol, getropft. Nach 30 Minuten Erhitzen auf dem Wasserbad am Rückfluß wird abgekühlt, eine Stunde im Kühlschrank

¹⁹⁾ E. FISCHER u. H. SCHEIBLER, Ber. **41**, 881 u. 1881 (1909).

²⁰⁾ A. NEUBERGER, in: Advances in Protein Chemistry **4**, 297 (1948).

aufbewahrt, abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und einmal aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute: 0,9 g (28%), Schmp. 194–197°.

b) Bei Anwendung von 11,3 ml 25proz. wäßrigem Hydrazinhydrat in 6 ml Alkohol beträgt die Ausbeute für den gleichen Ansatz 0,9 g (31%), Schmp. 195–200°.

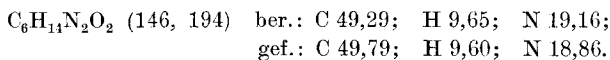
c) 3,9 g α -Bromisocaprinsäure in 11,3 ml 25proz. wäßrigem Hydrazinhydrat ohne Alkoholzusatz ergeben 0,65 g (23%) D-NH-Leu, Schmp. 185–186°.

d) Die im Ansatz a) angegebenen Mengen wurden in der Kälte zusammengegeben und standen 24 Stunden bei Zimmertemperatur. Ausbeute: 0,55 g (20%), Schmp. 185–186°.

e) 3,9 g L- α -Bromisocaprinsäure und 3 g 100proz. Hydrazinhydrat standen ohne Alkoholzusatz 24 Stunden bei Zimmertemperatur. Der entstandene Kristallbrei wurde nach dem Abzugen aus Wasser umkristallisiert. Es wurden 0,5 g erhalten (18%), Schmp. 190–193°.

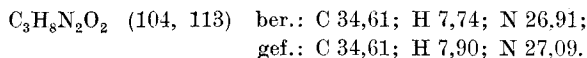
f) Entspricht Ansatz b) bei Zimmertemperatur (24 h). Ausbeute: 0,55 g (20%), Schmp. 185–186°.

g) Entspricht Ansatz c) und wurde ebenfalls 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Es schieden sich glänzende Blättchen aus, die, aus heißem Wasser umkristallisiert, bei 180–184° schmolzen. Ausbeute: 0,6 g (21%).



D- α -Hydrazinopropionsäure (vgl. dazu¹⁰)

Eine Lösung von 5 g L- α -Bromopropionsäure in 15 ml 50proz. Hydrazinhydrat wurde nach 24stündigem Stehen am rotierenden Verdampfer bei 30° zum sirupösen Rückstand eingengt, der in 100 ml Aceton/Wasser (1:6) gelöst und auf eine (45 × 2 cm) Säule von Wofatit N (OH-Form) aufgetragen wurde, die mit Aceton/Wasser vorbehandelt war. Mit weiteren 100 ml wurde eluiert und nach Entfernen des Lösungsmittels aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute: 1,5 g (45,5%), Schmp. 198–203°.



Reduktive Spaltung der Hydrazinocarbonsäuren mit RANEY-Nickel

0,04–0,06 Mol Hydrazinocarbonsäure wurden in 150 ml Wasser, wenn nötig unter Erwärmung, gelöst und bei Zimmertemperatur mit einem Überschuß an frischem RANEY-Nickel 30–40 Minuten gerührt. Durch Titration zeitweilig entnommener Proben mit etwa 0,1 n NaOBr in schwefelsaurer Lösung bis zur Entfärbung von Methylrot wurde der Endpunkt der Spaltung ermittelt. Nach Abfiltrieren vom Nickel wird die schwach alkalische Lösung mit verd. HCl auf pH = 6 gebracht und bei 40° zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen und die Aminosäure mit Alkohol/Äther gefällt. Identifizierung und Reinheitsprüfung erfolgte durch Dünnschichtchromatographie. Die Ausbeuten für die reinen Aminosäuren betragen 25–35%.

Berlin-Buch, Institute für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Institut für Pharmakologie.

Bei der Redaktion eingegangen am 26. Februar 1964.

Verantwortlich

für die Schriftleitung: Prof. Dr.-Ing. Dr. h. c. E. Leibnitz, 705 Leipzig 5, Permoserstraße 15; für den Anzeigenteil: DEWAG-Werbung Leipzig, 701 Leipzig 1, Friedrich-Ebert-Str. 110, Ruf 7851. Z. Z. gilt Anzeigenpreisliste 4; Verlag Johann Ambrosius Barth, 701 Leipzig 1, Salomonstraße 18 B; Fernruf 27681 und 27682. Veröffentlicht unter der Lizenz-Nr. 1395 des Presseamtes beim Vorsitzenden des Ministerrates der DDR

Printed in Germany



Druck: Paul Dünnhaupt, 437 Köthen (IV/5/1) L 267/64