

## DIE ZERSETZUNG DER AMINOSÄUREESTER AUF EINWIRKUNG VON HBr IN EISESSIG

J. BAYER, S. DUALSZKY UND L. KISFALUDY

*Analytisches und Synthetisches Forschungslaboratorium der Firma  
Gedeon Richter AG, Budapest (Ungarn)*

(Eingegangen den 26. November 1960)

Um eine eindeutig ablaufende Reaktion zu erhalten, werden bei der Synthese der verschiedenen Peptide jene Gruppen der bifunktionalen Aminosäuren, die in der Reaktion nicht teilnehmen sollen, bekanntlich geschützt. Zum Schutz der Carboxylgruppe bedient man sich in vielen Fällen des mit Benzylalkohol (BzOH) gebildeten Esters, während die Aminogruppe in der Regel in Form des Carbobenzoxy-Derivats (CBO-) geschützt wird<sup>1</sup>.

Vor der Koppelung des N-terminalen Teiles eines N-CBO-dipeptid-benzylesters mit einer neuen Aminosäure muss die Schutzgruppe abgespalten werden; das zu diesem Zweck meist verwendete Verfahren ist die Behandlung mit eisessigsäurem HBr. Im Laufe unserer Versuche stellten wir fest, dass sich das bei der Reaktion von papierchromatographisch reinem Glutaminsäure-dibenzylester und *p*-Cl-CBO-Alanin gebildete N-*p*-Cl-CBO-ala-glu-(OBz)<sub>2</sub> – dessen Elementaranalyse mit den berechneten Werten übereinstimmte – nach Behandlung mit eisessigsäurem HBr papierchromatographisch nicht als einheitlich erwies, sondern mehrere Verunreinigungen in nicht zu vernachlässigender Menge enthielt. Diese Beobachtung bildete die Grundlage unserer Versuche. Die Chromatogramme führten zwangsweise zur Schlussfolgerung, dass auf Einwirkung des eisessigsäuren HBr nicht nur die Schutzgruppen des N-terminalen Molekülteiles abgespalten wurden, sondern dass dabei auch die Esterbindungen weitgehend "hydrolysiert" wurden.

Zwecks Klärung dieses Problems stellten wir verschiedene Ester einiger Aminosäuren dar, behandelten diese mit eisessigsäurem HBr, chromatographierten das Produkt und führten die Auswertung der Chromatogramme nach Entwicklung mit Ninhydrin mit einem Densitometer durch. Aus den Lösungen wurde das Chromatographieren und die Auswertung nach 24-stündigem Stehen wiederholt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengefasst.

Aus den Daten der Tabelle I geht deutlich hervor, dass die Zersetzung einiger Aminosäureester eine weitgehende ist. Bei den präparativen Arbeiten bereiten die Nebenreaktionen ziemliche Schwierigkeiten; über diese berichteten wir an dem III. Europäischen Peptid-Symposium, 1960, in Basel<sup>9</sup>. Werden an Stelle der Benzylester die weniger reaktionsfähigen Äthylester verwendet, so ist das Ausmass der Zersetzung zwar geringer, jedoch noch immer bedeutend. Als das am meisten zersetzliche in der

Reihe der untersuchten Aminosäure-Derivate erwies sich das Glu- $\gamma$ -OBz. Interessanterweise erscheint nach der Behandlung des Glu- $\alpha$ -OBz mit eisessigsäurem HBr am Papierchromatogramm auch der Fleck des Dibenzylesters – und zwar in ziemlich bedeutendem Masse. Die Erklärung dieser Erscheinung dürfte darin zu suchen sein,

TABELLE I

Aminosäure Derivat	Herstellung; Lit.	Prozentueller Anteil					
		nach d. Behandlung			nach 24 Stunden		
		Diester	Monoester	Säure	Diester	Monoester	Säure
Glu(OBz) <sub>2</sub>	2	42	41	17	25	42	33
Asp(OBz) <sub>2</sub>	3	76	18	6	55	27	18
Glu- $\gamma$ -OBz	4	0	27	73	0	10	90
Asp- $\beta$ -OBz	3	0	84	16	0	67	33
Glu- $\alpha$ -OBz	2	39	43	18	22	41	37
Asp- $\alpha$ -OBz	3	0	90	10	0	80	20
Glu(OEt) <sub>2</sub>	5	64	36	0	8	40	52
Glu- $\gamma$ -OEt	6	0	84	16	0	47	53
Asp- $\beta$ -OEt	6	0	96	4	0	86	14
Gly-OBz	7	—	79	21	—	—	—
Gly-OEt	8	—	88	12	—	—	—

dass das sich im Laufe der partialen Hydrolyse des  $\alpha$ -Esters bildende Benzylbromid fähig ist, die leicht veresterbare, sehr reaktive  $\gamma$ -Carboxylgruppe zu verestern. Eine ähnliche Erscheinung wurde beim  $\alpha$ -Benzylester der Asparaginsäure nicht beobachtet.

Zwar zeigen die Monoester die gleichen  $R_F$ -Werte, führten unsere Versuche dennoch zu dem Ergebnis, dass die Zersetzung der Diester praktisch zu reinen  $\alpha$ -Monoestern führt. In der Asparaginsäure-Serie zeigte sich dies in den verschiedenen Farben der beiden Monoester, und in der Glutaminsäure-Serie darin, dass es gelang, aus dem Diester durch Behandlung mit eisessigsäurem HBr das Glu- $\alpha$ -OBz präparativ zu erhalten<sup>9</sup>.

Da eine Zersetzung auch bei den Glycineestern beobachtet werden kann, darf man annehmen, dass auf Wirkung von eisessigsäurem HBr jeder Aminosäureester mehr oder weniger zersetzt wird.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

##### *Behandlung mit eisessigsäurem Bromwasserstoff*

20 mg des zu untersuchenden Aminosäureesters wurden mit 0.5 ml 30 %igem eisessigsäurem HBr 15 Minuten geschüttelt, die Aminosäure-Derivate dann mit 5 ml Äther gefällt und unter Äther in 5 ml Wasser gelöst. Unmittelbar aus der wässrigen Phase wurde dann die Lösung auf das chromatographische Filterpapier aufgetragen.

*Papierchromatographische Untersuchung*

Aus der Lösung der zu untersuchenden Probe trugen wir mit Hilfe einer Mikropipette (VEB Glaswerke, Ilmenau) 5–60  $\gamma$  auf einen Papierstreifen (Schleicher-Schüll 2043a) auf und chromatographierten mit der oberen, organischen Phase eines *n*-Butanol–Eisessig–Wasser (4:1:5) Gemisches 15–16 Stunden mit aufsteigender Technik. Der aus dem Zylinder gehobene Papierstreifen wurde an freier Luft getrocknet, einige Male durch eine 0.2%ige Ninhydrinlösung (in *n*-Butanol–Chloroform 1:1) gezogen und bei  $100 \pm 2^\circ$  genau 10 Minuten getrocknet. Die  $R_F$ -Werte der untersuchten Aminosäuren und ihrer Derivate sowie die mit Ninhydrin gebildeten Farben zeigt Tabelle II.

TABELLE II

<i>Aminosäuren und ihre Derivate</i>	<i>R<sub>F</sub>-Wert</i>	<i>Farbe</i>
Glu(OH) <sub>2</sub>	0.17	violett
Glu(OBz) <sub>2</sub>	0.82	violett
Glu- $\gamma$ -OBz	0.58	violett
Glu- $\alpha$ -OBz	0.59	violett
Glu(OEt) <sub>2</sub>	0.68	violett
Glu- $\gamma$ -OEt	0.46	violett
Asp(OH) <sub>2</sub>	0.15	violett
Asp(OBz) <sub>2</sub>	0.82	gelblich braun
Asp- $\beta$ -OBz	0.62	gelblich braun
Asp- $\alpha$ -OBz	0.63	violett
Asp(OEt) <sub>2</sub>	0.65	gelblich braun
Asp- $\beta$ -OEt	0.35	gelblich braun
Gly-OH	0.12	violett
Gly-OBz	0.65	violett
Gly-OEt	0.43	violett
Gly-OMe	0.27	violett

*Densitometrische Auswertung*

Die nach der oben beschriebenen Methode entwickelten und gefärbten Chromatogramme wurden mit Hilfe eines JOUAN'schen Densitometers (Ref. 1606) ausgewertet<sup>10</sup>. Der Papierstreifen war nicht lichtdurchlässig präpariert.

Unter Anwendung dieser Technik nahmen wir die Kalibrationskurven mit papierchromatographisch reinen Standardsubstanzen auf (Fig. 1 und 2). Die am Integrator direkt ablesbaren Millimeter-Entfernungen wurden in  $\mu\text{g}$  der Aminosäure-Derivate angegeben, und diese Werte in Kenntnis der Molekulargewichte, auf die Mengen der entsprechenden Aminosäuren umgerechnet. Die in der Menge der Grund-Aminosäuren ausgedrückten Werte der einzelnen Flecke wurden aufeinander bezogen und in prozentueller Verteilung angegeben (Tabelle I).

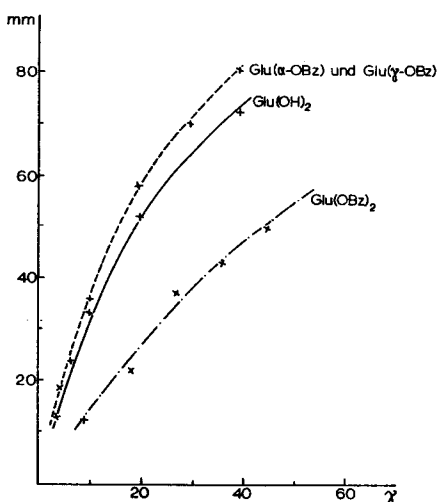


Fig. 1. Kalibrationskurven der Glutaminsäure und ihrer Benzylester.

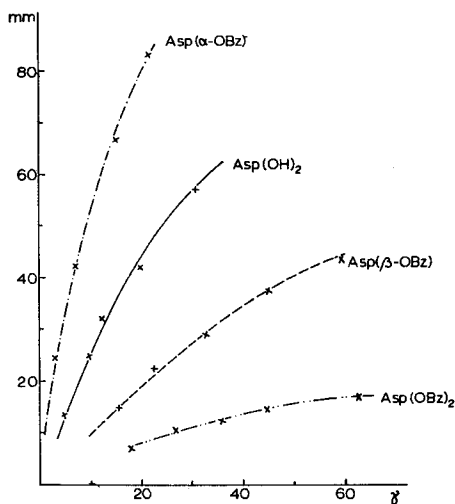


Fig. 2. Kalibrationskurven der Asparaginsäure und ihrer Benzylester.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die papierchromatographische Untersuchung einiger Aminosäureester nach Behandlung mit eisessigsäurem Bromwasserstoff durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass diese Behandlung zu einer teilweisen Spaltung der Esterbindungen führt und bei den Peptidsynthesen wird das Hauptprodukt durch diese, in der Nebenreaktion gebildeten, Verbindungen verunreinigt. Das Mass der Zersetzung wurde durch die densitometrische Auswertung der Papierchromatogramme bestimmt.

#### SUMMARY

Some amino acid esters were investigated by paper chromatography after they had been treated with hydrogen bromide in glacial acetic acid. It was found that this treatment caused partial cleavage of the ester bonds, and that in the synthesis of peptides the main product is contaminated with the compounds formed in this side reaction. The extent of the decomposition was determined by densitometric evaluation of the paper chromatograms.

#### LITERATUR

- <sup>1</sup> M. BERGMANN UND L. ZERWAS, *Ber.*, 65 (1932) 1192.
- <sup>2</sup> H. SACHS UND E. BRAND, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 4610.
- <sup>3</sup> D. BEN-ISCHAI UND A. BERGER, *J. Org. Chem.*, 17 (1952) 1567.
- <sup>4</sup> D. W. CLAYTON, G. W. KENNER UND R. C. SHEPPARD, *J. Chem. Soc.*, (1956) 371.
- <sup>5</sup> E. FISCHER, *Ber.*, 34 (1901) 453.
- <sup>6</sup> W. E. HANBY, S. G. WALEY, J. WATSON UND E. J. AMBROSE, *J. Chem. Soc.*, (1950) 3239.
- <sup>7</sup> H. K. MILLER UND H. WAELSCH, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 1092.
- <sup>8</sup> T. CURTIUS, *J. prakt. Chem.*, 37 (1871) 159.
- <sup>9</sup> L. KISFALUDY, S. DUALSZKY UND J. BAYER, *Chimia (Switz.)*, 14 (1960) 368.
- <sup>10</sup> J. BAYER, *Acta Pharm. Hung.*, im Druck.