

ZUR REAKTION VON N-HYDROXYSUCCINIMID MIT DICYCLOHEXYLCARBODIIMID

H. GROSS* und L. BILK†

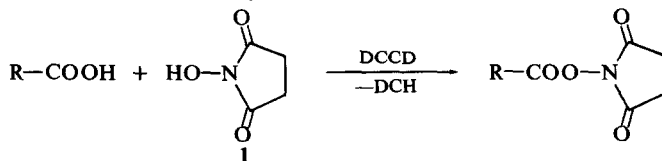
Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Institut für Organische Chemie

(Received in Germany 28 June 1968; Received in the UK for publication 9 July 1968)

Zusammenfassung—N-Hydroxysuccinimid reagiert mit Dicyclohexylcarbodiimid im Molverhältnis 3:1 unter Bildung von Dicyclohexylharnstoff und Succinimidoxycarbonyl- β -alanin-hydroxysuccinimidester 7, dessen Struktur mittels NMR und auf chemischem Wege eindeutig sichergestellt werden konnte.

Abstract—N-Hydroxysuccinimide reacts with dicyclohexylcarbodiimid in molar-proportion (3:1) forming dicyclohexylurea and succinimide oxycarbonyl- β -alanin-hydroxysuccinimide ester 7. The structure of 7 has been confirmed by NMR and chemical methods.

BEI Umsetzung eines Gemisches von Acylaminosäure und N-Hydroxysuccinimid (**1**) mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) erhält man neben Dicyclohexylharnstoff (DCH) den Hydroxysuccinimidester der Acylaminosäure (**2**, R = Acylaminoalkyl).² Diese Hydroxysuccinimidester eignen sich, ebenso wie die schon vorher bekannten



analogen Derivate des N-Hydroxyphthalimids,³ für die Peptidsynthese.² Wünsch und Drees⁴ sowie Weygand *et al.*⁵ vereinfachten das Verfahren für die Peptidsynthese insofern, als sie Acylaminosäure, Aminosäureester, **1** und DCCD im Einstufenverfahren umsetzten. Hierbei erwies sich die Verwendung von 2 Mol **1** pro Mol DCCD als empfehlenswert.⁶

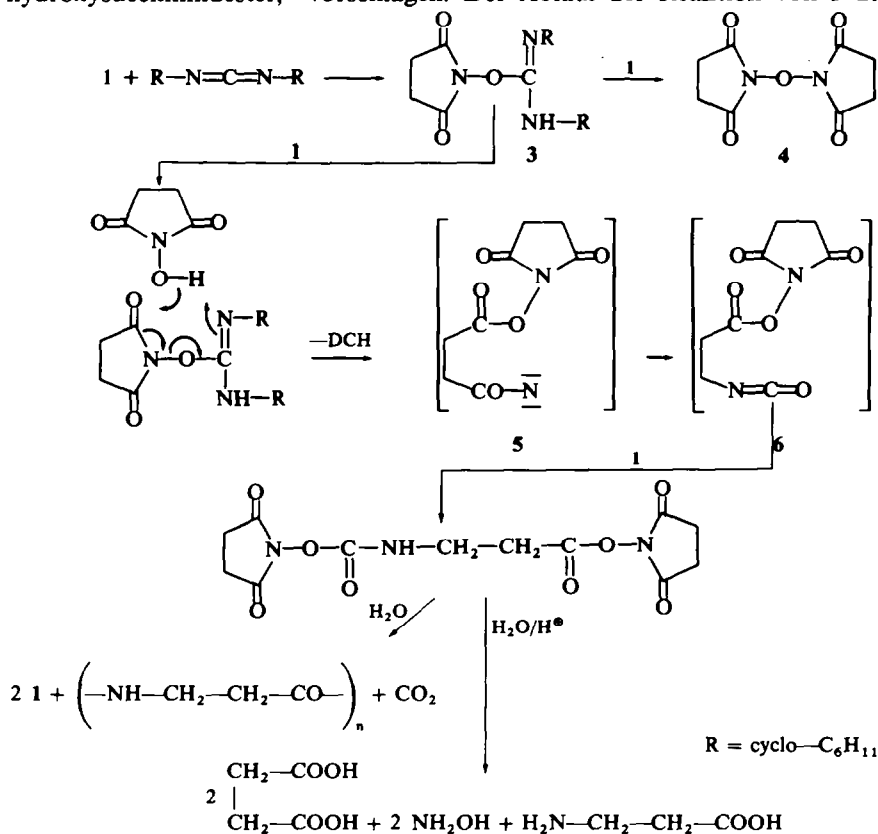
Löw und Kisfaludy⁷ berichteten schon früher ohne experimentelle Details über ein bei Umsetzung von DCCD und **1** mit wenig reaktiven Carbonsäuren auftretendes Nebenprodukt. Die Verbindung entstand auch bei Umsetzung von DCCD und **1** ohne weitere Reagentien unter Bildung von DCH als Coprodukt. Die Autoren schlugen für die Verbindung die Struktur **4**, eines Hydroxyimid-Anhydrids vor. Die Bildung dieses bisher nicht bekannten Anhydrids aus **1** und DCCD scheint jedoch vom Standpunkt des Reaktionsablaufs schwer verständlich: Zweifelloso bildet sich aus **1** und DCCD zunächst ein "Isoharnstoff"-Derivat **3**, das dann mit einem weiteren Mol **1** zu **4** reagieren sollte. Dieser zweite Reaktionsschritt ist jedoch insofern wenig wahrscheinlich, da er einen nucleophilen Angriff des **1**-Anions auf den Imid-Stickstoff von **3** unter gleichzeitiger Lösung der N—O-Bindung bedingen würde. Wir haben deshalb diese Reaktion wiederholt und die Struktur des als **4**

* Institut für Organische Chemie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, DDR-1199 Berlin-Aldershof.

† Forschungsabteilung des VEB Berlin-Chemie, Berlin-Adlershof.

deklarierten Produktes genau untersucht. Beim Vermischen der Lösungen von 1 und DCCD in Tetrahydrofuran im Molverhältnis 3:1 tritt Bildung eines schwerlöslichen Niederschlages ein, dessen Menge praktisch der der eingesetzten Reagentien entspricht. Bei Behandlung mit Acetonitril erhält man in quantitativer Ausbeute DCH. Der aus der Acetonitrillösung durch Einengen in einer Ausbeute von 95% d.Th. erhaltene kristalline Rückstand (A) wurde aus Dioxan und Dioxan/Äther umkristallisiert. Das NMR-Spektrum von A zeigt zwei Singulets bei $\tau = 7.28$ und $\tau = 7.33$ und zwei Triplets bei $\tau = 6.57$ und $\tau = 7.17$ ($J = 6$ Hz) im Verhältnis von ca. 2:2:1:1. Die Hydrolyse von A im neutralen Medium führt unter CO_2 -Entwicklung zu 1 und einer schwerlöslichen, offenbar polymeren Verbindung, deren Kernresonanzspektrum auf das Vorhandensein der Gruppierung des β -Alanins deutet. Vollständige saure Hydrolyse führt in guter Ausbeute zu Bernsteinsäure, Hydroxylamin und β -Alanin.

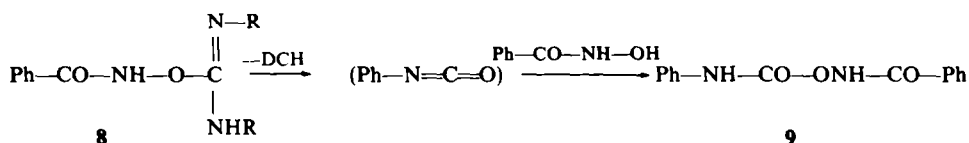
Auf Grund dieser Reaktionen, der Bruttozusammensetzung und des NMR-Spektrums möchten wir für A die Struktur 7, Succinimidoxycarbonyl- β -alaninhydroxysuccinimidester,* vorschlagen. Der Ablauf der Reaktion von 3 zu 7, die



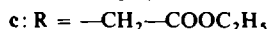
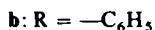
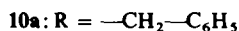
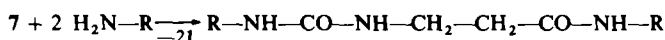
* Herr Dr. A. Prox, Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule München, untersuchte freundlicherweise 7 auf massenspektrometrischem Wege: ähnlich wie bei Peptiden mit Urethan-Schutzgruppe verliert 7 im Massenspektrometer thermisch sofort den "Urethan-Alkohol", hier also 1. Das massenhöchste Ion ist daher m/e 212; 4 würde das gleiche Ion geben. Im Massenspektrum treten jedoch immer das intensive M^+ -Ion von 1 (m/e 115) und dessen weitere Zerfallsprodukte auf. 1 kann jedoch nur aus 7 und nicht aus 4 stammen.

eine Umlagerung des Bernsteinsäurederivats in ein Derivat des β -Alanins einschliesst, ist mittels einfacher und gut gesicherter Schritte erklärbar. Primär entsteht wahrscheinlich durch nucleophilen Angriff des 1-Anions auf ein Imid-Carbonyl von **3** unter gleichzeitiger Ringöffnung und Abspaltung von DCH im Sinne der Pfeile ein Acylnitren **5**, das sofort im Sinne einer Lossen-Umlagerung zum Isocyanat **6** reagiert. Addition eines weiteren Mols **1** an **6** gibt **7**.

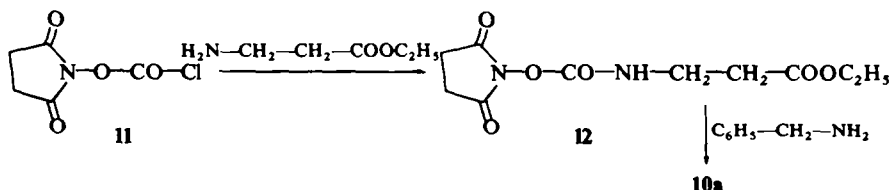
Über eine analoge Lossen-Umlagerung von Benzhydroxamsäure mittels DCCD berichten Kisfaludy und Löw⁸ und später Nagarajan, *et al.*:⁹ aus dem **3**-analogen Additionsprodukt **8** entsteht primär Phenylisocyanat, das mit weiterer Benzhydroxamsäure das Anilinocarbamoylderivat **9** liefert.



Verbindung **7** reagiert wie Hydroxysuccinimidester anderer Acylaminosäuren beim Erwärmen mit Aminen glatt zum entsprechenden Amid. Dabei setzt sich gleichzeitig auch die N-terminale Succinimidoxycarbonylgruppe in analoger Weise um: Mit Benzylamin, Anilin oder Glycinester entstehen Verbindungen vom Typ



10, die als Harnstoffderivate von β -Alaninamiden anzusehen sind. Die Struktur von **10a** konnte auch noch auf chemischem Wege sichergestellt werden: der aus β -Alanin-äthylester und Succinimidoxycarbonylchlorid¹⁰ (**11**) zugängliche Succinimidoxy-



carbonyl- β -alaninäthylester (**12**) gibt beim Erwärmen mit Benzylamin unter Aminolyse das gleiche Produkt, das auch aus **7** und Benzylamin entsteht.

EXPERIMENTELLER TEIL

Succinimidoxycarbonyl- β -alanin-hydroxysuccinimidester (**7**)

(a) In Tetrahydrofuran. 3.09 g (0.015 Mol) DCCD werden in 20 ml THF mit 5.18 g (0.045 Mol) **1** in 30 ml THF versetzt. Es bildet sich ein Niederschlag, dessen Ausscheidung durch Stehen über Nacht bei 4° vervollständigt wird. Nach Absaugen wird zweimal mit Acetonitril digeriert. Es bleiben 2.9 g DCH (86% d.Th.) ungelöst. Das Filtrat wird i. Vak. eingedampft, der kristalline Rückstand (4.7 g, 95% d.Th.) aus heissem Dioxan und dann aus Dioxan-Äther umkristallisiert. Man erhält 4.1 g (83% d.Th.), Schmp. 156–163°.

(b) *In Acetonitril*. DCCD und 1 werden wie oben in 40 ml Acetonitril umgesetzt und über Nacht stehen gelassen. Man saugt vom abgeschiedenen DCH (3.3 g, 98% d.Th.) ab und engt das Filtrat zur Trockne ein. Umkristallisation aus Acetonitril/Äther gibt 4.5 g 7 (91% d.Th.), Schmp. 156–163°. ($C_{12}H_{13}N_3O_8$ (327.3) Ber.: C, 44.0; H, 3.96; N, 12.8. Gef.: C, 43.3; H, 4.40; N, 12.4%); NMR-Spektrum* s. Text.

Berkristallisiert man nur aus Dioxan um, so erhält man ein Produkt, das lt. NMR-Spektrum genau ein Mol Dioxan enthält. Das Solvat verliert das Dioxan durch Trocknen bei 100° oder beim Umkristallisieren aus Dioxan/Äther.

Hydrolyse von 7

(a) *In neutralem Medium*. Man kocht 7 in der 10fachen Menge Wasser bis zur vollständigen Lösung und Beendigung der CO_2 -Abspaltung (ca. 5 Min.). Der eingedampfte Rückstand wird mit Äthanol ausgezogen. In der Äthanollösung lassen sich dünnschichtchromatographisch 1 und β -Alanin sowie wenig Bernsteinsäure nachweisen. Der unlösliche Rückstand besteht aus einem offenbar polymeren β -Alanin (Schmp. 300°, Zers.), das bei saurer Hydrolyse ausschliesslich β -Alanin gibt.

(b) *In saurem Medium*. Man kocht 7 mit der 10fachen Menge conc. HCl 90 Min. am Rückfluss und dampft i. Vak. zur Trockne ein. Der Rückstand enthält nach dünnschichtchromatographischer Untersuchung lediglich Bernsteinsäure, β -Alanin und Hydroxylamin.

Aminolyse von 7

(a) *Mit Benzylamin*. 1.09 g (0.0033 Mol) 7 werden mit 1.45 ml (0.0132 Mol) Benzylamin in 10 ml Dioxan versetzt. Dabei fällt sofort das Benzylaminsalz des Hydroxysuccinimids aus, das sich beim Erwärmen weiter umsetzt. Man kocht 3 Stdn. am Rückfluss, dampft i. Vak. zur Trockne ein und nimmt mit $CHCl_3$ auf. Die $CHCl_3$ -Lösung wird mit Wasser ausgeschüttelt, mit Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft, der Rückstand aus $CHCl_3$ /Petroläther und Äthanol/ H_2O umkristallisiert. Man erhält 0.90 g 10a (93% d.Th.), Schmp. 180–184° (Zers.). ($C_{18}H_{21}N_3O_2$ (311.3) Ber.: C, 69.5; H, 6.75; N, 13.5. Gef.: C, 69.9; H, 7.00; N, 13.2%).

(b) *Mit Anilin*. 1.09 g (0.0033 Mol) 7 werden mit 1.25 (0.0132 Mol) Anilin in 10 ml Dioxan 3 Stdn. unter Rückfluss gekocht. Dann wird i. Vak. zur Trockne eingedampft und wie unter (a) aufgearbeitet und umkristallisiert. Man erhält 0.85 g 10b (90% d.Th.) Schmp. > 175° (Zers.). $C_{16}H_{17}N_3O_2$ (283.2) Ber.: C, 67.8; H, 6.0; N, 14.8. Gef.: C, 68.2; H, 5.9; N, 14.5%.

(c) *Mit Glycinäthylester*. 2.8 g (0.02 Mol) Glycinäthylester-hydrochlorid und 2.78 ml Triäthylamin werden in 20 ml Dioxan 30 Min. gerührt, dann vom Triäthylamin-hydrochlorid abgesaugt, mit 1.09 g (0.0033 Mol) 7 versetzt und 3 Stdn. unter Rückfluss gekocht. Anschliessend wird i. Vak. eingedampft und der Rückstand aus Essigester/Petroläther und schliesslich aus wenig H_2O umkristallisiert. Man erhält 0.51 g 10c (66% d.Th.) Schmp.: > 110° Umwandlung in Nadeln. Zers. bei ca. 140°. ($C_{12}H_{21}N_3O_6$ (303.3) Ber.: C, 47.5; H, 6.93; N, 13.9. Gef.: C, 46.4; H, 6.70; N, 13.6%).

Succinimidoxycarbonyl- β -alanin-äthylester (12) β -Alaninäthylester. HCl (9.25 g; 0.06 Mol) werden in 75 ml Dioxan und 40 ml Tetrahydrofuran suspendiert, mit 16.7 ml (0.12 Mol) Triäthylamin 30 Min. bei Raumtemperatur gerührt und dann auf –10 bis –15° abgekühlt. Sodann werden 10.5 g (0.06 Mol) 11¹⁰ in 40 ml Dioxan zugetropft. Anschliessend wird 1 Stde. bei –10° und 2 Stdn. bei Raumtemp. nachgerührt. Nach Eindampfen i. Vak. wird der Rückstand in $CHCl_3$ aufgenommen und dreimal mit wenig H_2O ausgeschüttelt. Die getrocknete $CHCl_3$ -Schicht wird i. Vak. eingedampft und der Rückstand (12.2 g, 78% d.Th.) in Essigester aufgenommen. Die filtrierte Lösung wird mit Petroläther versetzt, die abgeschiedenen Kristalle werden nach 1 Stde. abgesaugt. Nach Umkristallisation aus Essigester/Petroläther erhält man 6.9 g 12 (44% d.Th.), Schmp. 79–82°. ($C_{10}H_{14}N_2O_6$ (258.2) Ber.: C, 46.5; H, 5.43; N, 10.9. Gef.: C, 46.0; H, 5.70; N, 11.1%).

Aminolyse von 12 mit Benzylamin

2.58 g (0.01 Mol) 12 werden mit 5.45 ml (0.05 Mol) Benzylamin in 15 ml Dioxan 4 Stdn. unter Rückfluss gekocht. Dann wird i. Vak. eingedampft, der Rückstand mit 20 ml Essigsäure digeriert und die filtrierte Lösung mit H_2O versetzt. Man erhält 2.9 g 10a (93% d.Th.) Nach zweimaliger Umkristallisation aus CH_3COOH/H_2O Schmp. 180–182°; keine Depression mit dem aus 7 erhaltenen Produkt.

* Aufgenommen von Dr. E. Gründemann mit einem Varian A-60 Spektrometer in Acetonitril mit TMS als Standard.

Der in Eisessig unlösliche Anteil erwies sich als Bernsteinsäuredibenzylamid, Schmp. 210–211°. Keine Depression mit einem aus Bernsteinsäurediäthylester und Benzylamin hergestellten Produkt. ($C_{18}H_{20}N_2O_2$ (296.2) Ber: C, 73.0; H, 6.75; N, 9.4. Gef: C, 71.9; H, 6.80; N, 9.2%).

LITERATUR

- ¹ IV. Mitteil. über α -Aminosäuren—III. Mitteil.: J. Gloede, K. Poduska, H. Gross und J. Rudinger, *Coll. Czech. Comm.* **33**, 1307 (1968).
- ² G. W. Anderson, J. E. Zimmermann u. F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1839 (1964).
- ³ G. H. I. Nefkens u. G. I. Tesser, *Ibid.* **83**, 1263 (1961).
- ⁴ E. Wünsch und F. Drees, *Chem. Ber.* **99**, 110 (1966).
- ⁵ F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, *Z. Naturforsch.* **21b**, 426 (1966).
- ⁶ Siehe hierzu auch F. Weygand und U. Ragnarsson, *Z. Naturforsch.* **21b**, 1141 (1966).
- ⁷ M. Löw und L. Kisfaludy, *Acta Chim. Hung.* **44**, 61 (1965).
- ⁸ L. Kisfaludy und M. Löw, Vortrag anlässlich des Kongresses der Ungarischen Chemischen Gesellschaft in Sopron, September 1965 (Privatmitteilung von Dr. L. Kisfaludy).
- ⁹ K. Nagarajan, R. Rajappa und V. S. Iyer, *Tetrahedron* **23**, 1049 (1967).
- ¹⁰ H. Gross und L. Bilk, *Angew. Chem.* **79**, 532 (1967); *Angew. Chem. Internat. Edit.* **6**, 570 (1967).