

FRIEDRICH WEYGAND und ROLF GEIGER

N-Trifluoracetyl-aminosäuren, VIII¹⁾

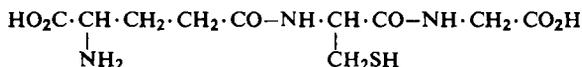
SYNTHESE DES GLUTATHIONS

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Universität Berlin,
Berlin-Charlottenburg

(Eingegangen am 18. Januar 1957)

Aus dem leicht zugänglichen *N*-Trifluoracetyl-L-glutaminsäure-1-äthylester wird über das Azid mit L-Cysteinyl-glycin-äthylester der *N*-TFA-Glutathiondiäthylester (Ausb. 86%) gewonnen, welcher in einfacher Weise in Glutathion verwandelt werden kann: Durch Behandeln mit verd. Natronlauge in Dioxan, Versetzen mit der äquiv. Menge verd. Jodwasserstoffsäure, Eindampfen, Fällern und Umkristallisieren wird reines Glutathion (Ausb. 35%) erhalten.

Bei den bisher bekannt gewordenen Synthesen des Glutathions



fiel nach Herstellung der beiden Peptidbindungen stets ein Glutathionderivat an, bei dem die Carboxylgruppen ganz oder teilweise verestert vorlagen und die Aminogruppe durch den Carbobenzoxyrest verschlossen war²⁻⁶⁾. Die oxydationsempfindliche Sulfhydrylgruppe wurde von DU VIGNEAUD³⁾ durch Benzilyerung blockiert, ein Verfahren, dem die meisten späteren Synthesen folgen, während HARINGTON und MEAD, denen die erste Synthese des Glutathions gelungen war, noch mit ungeschützter SH-Gruppe arbeiteten²⁾. Das carbobenzoxylierte oder außerdem noch *S*-benzilyerte Glutathionderivat mußte in zwei Schritten in freies Glutathion übergeführt werden: Zuerst waren die Estergruppen alkalisch zu verseifen, was bei der Labilität der γ -Glutamylbindung nach HARINGTON und MEAD²⁾ nur mit einer Mischung von 1 *n* NaOH und Dioxan gut gelingt. In einem weiteren Schritt mußten die schützenden Reste an der Amino- und Sulfhydrylgruppe entfernt werden. HARINGTON und MEAD²⁾ spalteten den *N*-Carbobenzoxyrest bei freier SH-Gruppe mit Phosphoniumjodid in Eisessig ab, die Ausbeute an Glutathion betrug jedoch nur 11% d. Theorie. Eine Verbesserung brachte die Methode von DU VIGNEAUD und LORING⁷⁾, bei der der *N*-Carbobenzoxy- und der *S*-Benzylrest gleichzeitig mit Natrium in flüssigem Ammoniak abgespalten werden.

1) VII. Mitteil.: F. WEYGAND, R. GEIGER und W. SWODENK, *Angew. Chem.* **68**, 307 [1956].

2) C. R. HARINGTON und T. H. MEAD, *Biochem. J.* **29**, 1602 [1935].

3) V. DU VIGNEAUD und G. L. MILLER, *J. biol. Chemistry* **116**, 469 [1936].

4) B. HEGEDÜS, *Helv. chim. Acta* **31**, 737 [1948].

5) J. RUDINGER und F. SORM, *Collect. czechoslov. chem. Commun.* **16**, 214 [1951]; *C. A.* **46**, 6592 h [1952].

6) ST. GOLDSCHMIDT und CH. JUTZ, *Chem. Ber.* **86**, 1116 [1953].

7) H. S. LORING und V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chemistry* **111**, 385 [1935]; W. J. PATTERSON und V. DU VIGNEAUD, *ebenda* **111**, 393 [1935].

Kürzlich haben G. AMIARD, R. HEYMES und L. VELLUZ⁸⁾ eine neue Synthese des Glutathions beschrieben, bei der als Zwischenprodukt *N,S*-Ditrityl-glutathion auftritt. Dieses läßt sich leicht mit trockenem Chlorwasserstoff in Chloroform in Glutathion überführen (Ausb. 15%).

Die leicht erfolgende alkalische Hydrolyse der *N*-Trifluoracetyl-Verbindungen legte den Gedanken nahe, eine Glutathionsynthese über den *N*-TFA-Glutathion-diäthylester zu versuchen. Es sollte dann möglich sein, durch Behandeln mit Natronlauge in einem Schritt Glutathion zu erhalten. Ein Verschluß der SH-Gruppe ist dabei allerdings nicht möglich. Da aber schon HARRINGTON und MEAD²⁾ ihre Glutathionsynthese mit freier SH-Gruppe ausgeführt haben, war keine prinzipielle Schwierigkeit bei der Verwendung von *L*-Cysteinyl-glycin-äthylester zu erwarten.

Auch bei der neuen Glutathionsynthese wurde die empfindliche γ -Bindung zuletzt geknüpft. Die Darstellung der Glutaminsäurekomponente ist schon von F. WEYGAND und M. REIHER⁹⁾ beschrieben worden: *N*-TFA-*L*-Glutaminsäure-anhydrid wurde der Äthanolyse unterworfen. Aus Benzol kristallisierte auf Zusatz von Dicyclohexylamin das *N*-TFA-*L*-Glutaminsäure-1-äthylester-dicyclohexylaminsalz aus (Ausb. 64%), und aus den Mutterlaugen wurde durch Kristallisation aus Wasser das hier nicht verwertbare, aber für andere Synthesen wertvolle *N*-TFA-*L*-Glutaminsäure-5-äthylester-dicyclohexylaminsalz (Ausb. 27%) gewonnen. Durch Schütteln der Salze in alkoholisch-wässriger Lösung mit der H[⊕]-Form des Austauschers Dowex 50 ließen sich die freien Säuren in 90-proz. Ausb. darstellen.

Zur Aktivierung des *N*-TFA-*L*-Glutaminsäure-1-äthylesters wurde er in das Azid verwandelt. Man gewann zunächst mit Thionylchlorid das Säurechlorid und schüttelte dieses in absol. Tetrahydrofuran mit einem geringen Überschuß an Dicyclohexylammoniumazid⁹⁾, filtrierte das ausgeschiedene Dicyclohexylammoniumchlorid ab und ließ mit *L*-Cysteinyl-glycin-äthylester reagieren.

Das *N*-TFA-*L*-Glutaminsäure-1-äthylester-5-dicyclohexylaminsalz kann aber auch direkt mit Thionylchlorid in Benzol zum Säurechlorid umgesetzt werden, wobei Dicyclohexylammoniumchlorid ausfällt. Die Verwandlung des Säurechlorids in das Azid erfolgt in der eben beschriebenen Weise.

Den *L*-Cysteinyl-glycin-äthylester stellten wir nach HARRINGTON und MEAD²⁾ her. Bis-carbobenzoxy-*L*-cystin wurde mit Phosphorpentachlorid in das Säurechlorid verwandelt und mit Glycin-äthylester zum Bis-carbobenzoxy-*L*-cystinyl-bis-glycin-äthylester umgesetzt. Durch Reduktion mit Phosphoniumjodid in Eisessig wurde hieraus in 55-proz. Gesamtausb. *L*-Cysteinyl-glycin-äthylester-hydrojodid erhalten. Dieses Salz ist in Tetrahydrofuran löslich (das Disulfid ist unlöslich und kann abfiltriert werden). Auf Zusatz der berechneten Menge Dicyclohexylamin fällt Dicyclohexylammoniumjodid aus, der Dipeptidester bleibt in Lösung.

Zur Darstellung des *N*-TFA-Glutathion-diäthylesters wurde die nach dem Abfiltrieren des Dicyclohexylammoniumjodids erhaltene Lösung des *L*-Cysteinyl-glycin-äthylesters in Tetrahydrofuran unter Stickstoff mit der Lösung des *N*-TFA-*L*-Glutaminsäure-1-äthylester-5-azids in Tetrahydrofuran vereinigt. Nach Stehenlassen über Nacht schied sich beim Einengen i. Vak. die gesuchte Verbindung aus; Ausb. nach

⁸⁾ Bull. Soc. chim. France 1956, 698. ⁹⁾ Chem. Ber. 88, 26 [1955].

¹⁰⁾ Biochemical Preparations, II, 87, Chapman & Hall, London 1952.

Waschen mit Äthanol 86%. Zur Gewinnung des freien Glutathions löste man in der zehnfachen Menge Dioxan, versetzte mit 4 Äquivv. 1*n* NaOH und hielt 1 Stde. bei 15°, sodann gab man 3 Äquivv. 2*n* HJ zu, dampfte i. Vak. ein, fällte mit Aceton, in dem NaJ leicht löslich ist, und kristallisierte ein- bis zweimal aus Wasser + Äthanol um. Ausb. 35% d. Th.; aus den Mutterlaugen konnten über das Quecksilber(II)- und Kupfer(I)-Salz¹⁰ noch ca. 5% Glutathion isoliert werden.

Als wir die Gesamtmenge über Hg^{II}- und Cu^I-Salz isolierten, erhielten wir nur eine Ausb. von 29%.

Wir haben auch die Möglichkeit untersucht, den Cysteinyl-glycin-äthylester über *N*-TFA-Verbindungen herzustellen. Aus Bis-*N*-TFA-L-cystin¹¹) erhält man mit Phosphorpentachlorid in Äther bei 0° das Säurechlorid, das ohne Isolierung nach Entfernung des Phosphoroxychlorids mit Glycin-äthylester in 77-proz. Ausb. den Bis-*N*-TFA-cystin-bis-glycin-äthylester lieferte. Jedoch ist uns dessen Verwandlung in den Cysteinyl-glycin-äthylester noch nicht glatt gelungen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. *N*-Trifluoracetyl-*L*-glutaminsäure-1-äthylester-5-dicyclohexylaminsalz: Die Lösung von 2.25 g *N*-TFA-*L*-Glutaminsäure-anhydrid (10 mMol)⁹) in 10 ccm absol. Alkohol wurde 2 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen und 10 Min. unter Rückfluß erhitzt. Nach Abdestillieren des Alkohols wurde der Rückstand in 10 ccm Benzol aufgenommen. Auf Zugabe von 2.34 ccm (12 mMol) *Dicyclohexylamin* kristallisierte die Hauptmenge des Salzes aus. Es wurde abgesaugt und mit Benzol und Petroläther gewaschen. Die eingeeengte Mutterlauge lieferte eine zweite Fraktion, die aus Wasser umkrist. wurde. Ausb. 2.9 g (64% d. Th.). Nadeln vom Schmp. und Misch-Schmp. 189°⁹). $[\alpha]_D^{20}$: -28.3° (*c* = 2, in absol. Äthanol).

2. *N*-Trifluoracetyl-*L*-glutaminsäure-5-äthylester-1-dicyclohexylaminsalz: Beim Eindampfen der benzolischen Mutterlauge und Versetzen mit reichlich Petroläther fiel ein Niederschlag aus, der aus Wasser umkristallisiert wurde. Kubische Kristalle vom Schmp. 140–141°. Ausb. 1.19 g (27% d. Th.). $[\alpha]_D^{20}$: +9.5° (*c* = 2, in absol. Äthanol).

C₉H₁₂O₅NF₃ · C₁₂H₂₃N (452.5) Ber. C 55.74 H 7.82 N 6.20 Gef. C 55.70 H 7.93 N 6.22

3. Darstellung von *N*-Trifluoracetyl-*L*-glutaminsäure-1-äthylester-5-dicyclohexylaminsalz und *N*-Trifluoracetyl-*L*-glutaminsäure-5-äthylester-1-dicyclohexylaminsalz aus *L*-Glutaminsäure ohne Isolierung von *N*-TFA-*L*-Glutaminsäure-anhydrid: 5 g trockene *L*-Glutaminsäure (34 mMol) wurden mit 13 ccm *Trifluoacetanhydrid* (88.5 mMol) übergossen und 30 Min. unter Rückfluß erhitzt. Aus der klaren Lösung wurden die gebildete Trifluoessigsäure und der Überschuß an Trifluoacetanhydrid in eine mit Trockeneis-Aceton gekühlte Vorlage, zuletzt bei einer Badtemperatur von 50° i. Vak. abdestilliert. Nach dem Erkalten übergieß man den Rückstand mit 30 ccm absol. Alkohol, beließ 2 Stdn. bei Zimmertemperatur, erhitzte 10 Min. zum Sieden und arbeitete, wie unter 1. und 2. beschrieben, auf.

Ausb. 6.93 g *N*-TFA-*L*-Glutaminsäure-1-äthylester-5-dicyclohexylaminsalz (45% d. Th.) und 3.3 g *N*-TFA-*L*-Glutaminsäure-5-äthylester-1-dicyclohexylaminsalz (21% d. Th.).

4. *N*-Trifluoracetyl-*L*-glutaminsäure-1-äthylester: 1.0 g des *Dicyclohexylaminsalzes* (2.2 mMol) wurden in 15 ccm 60-proz. Äthanol gelöst und mit ca. 10 g Dowex 50 in der H⁺-Form 10 Min. geschüttelt. Der beim Eindampfen der Lösung i. Vak. hinterbliebene Sirup kristalli-

¹¹) F. WEYGAND und R. GEIGER, Chem. Ber. 89, 647 [1956].

sierte beim Anreiben vollständig. Zur Analyse wurde eine Probe aus Benzol umkristallisiert. Schmp. 76–77°. $[\alpha]_D^{20}$: -42.9° ($c = 2$, in absol. Äthanol).

$C_9H_{12}O_5NF_3$ (271.3) Ber. C 39.86 H 4.46 N 5.17 Gef. C 40.13 H 4.52 N 5.25

5. *N-Trifluoracetyl-L-glutaminsäure-1-äthylester-5-chlorid*

a) *aus der freien Säure*: 0.27 g der Säure (1 mMol) wurden in 10 ccm Benzol gelöst und mit 0.5 ccm (6.5 mMol) *Thionylchlorid* 15 Min. erhitzt. Nach dem Eindampfen i. Vak. wurden zweimal je 10 ccm Benzol nachdestilliert, um alles Thionylchlorid zu entfernen. Ausb. 0.27 g (92% d. Th.). Zur Analyse wurde die Verbindung unter 0.05 Torr bei 90° Badtemperatur sublimiert. Schmp. 89–90°. $[\alpha]_D^{20}$: -15.2° ($c = 1.393$, in Eisessig).

$C_9H_{11}O_4NCIF_3$ (289.6) Ber. C 37.35 H 3.83 N 4.84 Gef. C 37.51 H 3.90 N 5.20

b) *aus dem Dicyclohexylaminsalz*: 1.375 des *Dicyclohexylaminsalzes* (3.0 mMol) wurden in 30 ccm Benzol mit 3.0 ccm *Thionylchlorid* 45 Min. zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 0° und 1 stdg. Stehenlassen bei dieser Temperatur filtrierte man das gebildete Dicyclohexylammoniumchlorid ab (0.644 g = 91% d. Th.). Das Filtrat wurde i. Vak. zur Trockne gebracht. Den Rückstand löste man zweimal in Benzol und verdampfte dieses wieder i. Vak.; Ausb. 0.865 g (99% d. Th.), nach Reinigung durch Sublimation i. Hochvak. 0.760 g (87% d. Th.), Schmp. 88–89°.

6. *L-Cysteinyl-glycin-äthylester-hydrojodid*²⁾

a) *Bis-carbobenzoxy-L-cystin*^{10,12)}: Aus 10 g *L-Cystin* wurden mit 27.5 g *Carbobenzoxychlorid* (ca. 80-proz.) und 285 ccm 1 n NaOH nach dem Ansäuern der Reaktionslösung, Aufnehmen des resultierenden Öls in Essigester und Krist. aus Chloroform 17.4 g (82% d. Th.) *Bis-carbobenzoxy-L-cystin* vom Schmp. 108–110° gewonnen. Durch Umkristallisieren aus Essigester-Chloroform stieg der Schmp. auf 113–114° (Lit.: 113–115°¹⁰⁾, 123°, korr.¹²⁾).

b) *Bis-carbobenzoxy-L-cystinyl-bis-glycin-äthylester*^{2,12)}: 4.5 g *Bis-carbobenzoxy-L-cystin* (9 mMol) wurden mit 21 mMol PCl_5 durch Schütteln in Äther bei -10° in das Säurechlorid übergeführt, dieses nach dem Absaugen auf einer Glasfritte und Waschen mit absol. Äther sofort mit 5.5 g (54 mMol, 50% Überschuß) *Glycin-äthylester* in Essigester bei 0° umgesetzt. Die Isolierung erfolgte durch Abfiltrieren des gebildeten Niederschlags, Extraktion mit Wasser (nach vorherigem Trocknen) und Umkristallisieren des Rückstandes aus n-Propanol. Ausb. 11.6 g (75% d. Th., bezogen auf *Bis-carbobenzoxy-L-cystin*), Schmp. 162–163° (Lit.: 166°, korr.²⁾).

c) *L-Cysteinyl-glycin-äthylester-hydrojodid*: 2.0 g *Bis-carbobenzoxy-L-cystinyl-bis-glycin-äthylester* (2.95 mMol) und 2.0 g *Phosphoniumjodid* (12.5 mMol) wurden in 20 ccm Eisessig $3\frac{1}{2}$ Stdn. bei 45–50° gehalten. Nach Filtration, Einengen i. Vak. und Animpfen erfolgte rasch Kristallisation (Impfkristalle wurden durch Verreiben einer Probe mit Äther erhalten). Ausb. 1.78 g (90% d. Th., Lit. 95%), Schmp. 111–113° (Lit.: 115°²⁾).

7. *N-Trifluoracetyl-glutathion-diäthylester*

a) 0.9 g *L-Cysteinyl-glycin-äthylester-hydrojodid* (2.68 mMol) wurden in 10 ccm absol., frisch dest. Tetrahydrofuran gelöst und unter Stickstoff mit 0.53 ccm Dicyclohexylamin (2.7 mMol) versetzt, wobei das Dicyclohexylammoniumjodid quantitativ ausfiel und abfiltriert wurde.

b) 0.782 g *N-TFA-L-Glutaminsäure-1-äthylester-5-chlorid* (2.7 mMol) wurden in 10 ccm frisch dest. absol. Tetrahydrofuran mit 0.7 g Dicyclohexylammoniumazid⁹⁾ (3.12 mMol) 1 Stde. geschüttelt. Dann filtrierte man das ausgefallene Dicyclohexylammoniumchlorid ab und verwendete das gebildete Säureazid in der vorliegenden Lösung.

¹²⁾ M. BERGMANN und L. ZERVAS, Ber. dtsch. chem. Ges. 65, 1192 [1932].

c) Die nach a) und b) erhaltenen Lösungen wurden vereinigt und über Nacht unter Stickstoff bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach dem Abdestillieren des Tetrahydrofurans sammelte man den krist. Rückstand auf einer Nutsche und wusch ihn mit wenig eiskaltem Äthanol (ausgekocht und unter Stickstoff erkalten gelassen). Ausb. 1.07 g (86% d. Th.), Schmp. 159–161°. Nach dem Umkristallisieren aus wenig Alkohol lagen 0.93 g (75% d. Th.) vom Schmp. 163° vor. Zur Analyse wurde nochmals aus Alkohol umkristallisiert; Schmp. 165.5°. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -41.7° ($c = 0.7$, in absol. Äthanol).

$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{N}_3\text{F}_3\text{S}$ (459.4) Ber. C 41.83 H 5.27 N 9.15 Gef. C 41.83 H 5.62 N 9.46

8. *Glutathion*: 1.01 g *N-Trifluoracetyl-glutathion-diäthylester* (2.2 mMol) wurden in 10 ccm frisch dest. Dioxan gelöst und unter Stickstoff mit 8.8 ccm 1*n* NaOH 1 Stde. bei 15° aufbewahrt. Dann wurde mit 3.3 ccm 2*n* HJ (frisch bereitet und farblos) versetzt und i. Hochvak. bei maximal 30° Badtemperatur zum Sirup eingengt. Beim langsamen Zufügen von warmem, frisch dest. Aceton entstand ein flockiger Niederschlag, der tags darauf gut filtrierbar war. Er wurde unter CO₂-Druck abgesaugt und dreimal mit Aceton gewaschen. Ausb. 0.445 g noch leicht hygroskopisches Produkt (66% d. Th.), Schmp. ab 180° unter Aufschäumen. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -18.6° ($c = 1$, in Wasser). Nach dem Umkristallisieren aus Wasser-Äthanol lagen 0.237 g (35% d. Th.), Schmp. 188–190° (Zers.), vor. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -20.1° ($c = 0.95$, in Wasser), in Übereinstimmung mit der Literatur. Als Schmp. sind in der Lit. angegeben 190°²⁾ und 192°¹⁰⁾.

Aus den Waschwässern wurden über das Hg^{II}- und das Cu^I-Salz in üblicher Weise¹⁰⁾ weitere 0.036 g *Glutathion* vom Schmp. 189–190° (Zers.) gewonnen, so daß sich die Gesamtausbeute auf 40.5% d. Th. belief.

$\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_6\text{N}_3\text{S}$ (307.3) Ber. C 39.08 H 5.58 N 13.67

Gef. C 38.86 H 5.46 N 13.45 (direkt isoliert)

C 39.15 H 5.71 N 13.65 (über Cu-Salz isoliert)

Für die über das Cu^I-Salz isolierte Probe fanden wir $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -19° ($c = 1$, in Wasser).

Sollte während der Aufarbeitung teilweise Disulfidbildung eingetreten sein, so löst man in 2*n* H₂SO₄, schüttelt 10 Min. mit Zinkstaub, filtriert, fällt das *Glutathion* als Quecksilbersalz und isoliert es über das Kupfersalz.

9. *Bis-N-trifluoracetyl-glutathiondisulfid-tetraäthylester*: *N-TFA-Glutathion-diäthylester* wurde in Alkohol unter Erwärmen gelöst und die Lösung nach dem Abkühlen auf 0° solange mit einer Lösung von Jod in Chloroform versetzt, bis eine schwach gelbe Färbung bestehen blieb. Beim Einengen i. Vak. schied sich das Disulfid aus. Es wurde mit kaltem Alkohol und Äther gewaschen. Ausb. fast quantitativ, Schmp. 226°. Zur Analyse wurde aus Alkohol umkristallisiert. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -21.3° ($c = 0.475$, in Eisessig).

$\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{O}_{14}\text{N}_6\text{F}_6\text{S}_2$ (916.9) Ber. C 41.91 H 5.04 N 9.17 Gef. C 41.74 H 5.12 N 9.11

10. *Bis-N-trifluoracetyl-L-cystinyl-bis-glycin-äthylester*: 2.375 g *Bis-N-TFA-cystin*¹¹⁾ (5.5 mMol) wurden in 40 ccm absol. Äther bis zum annähernden Verbrauch mit 2.57 g PCl₅ bei 0° geschüttelt. Nach Filtration wurde der Äther i. Vak. und das entstandene Phosphorychlorid i. Hochvak. bei 0° Badtemperatur abdestilliert. Das nunmehr in 20 ccm absol. Tetrahydrofuran aufgenommene Säurechlorid wurde tropfenweise unter Rühren einer auf -15° abgekühlten Lösung von 2.27 g *Glycin-äthylester* (22 mMol) zugefügt. Danach wurde 10 Min. bei 0° und noch 2 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen, das ausgefallene Glycin-äthylester-hydrochlorid abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Aus Wasser-Äthanol umkrist., lagen 2.55 g (77% d. Th.) vom Schmp. 186–187° vor. Schmp. nach nochmaligem Umkrist. 190.5–191°. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -130° ($c = 2$, in Aceton).

$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_8\text{N}_4\text{F}_6\text{S}_2$ (602.5) Ber. C 35.86 H 4.02 N 9.32 Gef. C 36.03 H 4.22 N 9.65