

STEFAN GOLDSCHMIDT, WALTER LAUTENSCHLAGER, BRUNO KOLB und GERHARD ZUMACH

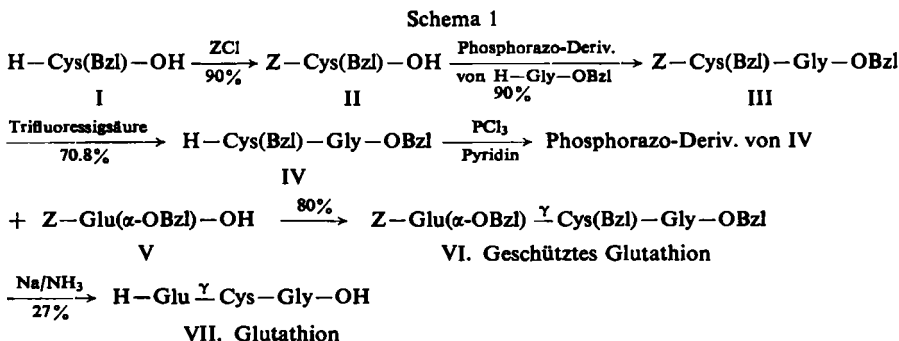
Zur Synthese von Glutathion

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule München
(Eingegangen am 27. Februar 1964)

Die früher beschriebene Synthese von Glutathion¹⁾ läßt sich um eine Stufe verkürzen, wenn man anstelle der Methylester die Benzylester der eingesetzten Aminosäuren verwendet, da dann mit Natrium in flüssigem Ammoniak die gesamten Schutzgruppen abgespalten werden. Eine neue Glutathion-Synthese führt vom Z-Glutaminsäure- α -benzylester^{*)} und Cystin in drei Schritten zum geschützten S-S-Glutathion (X). Nach Umsetzung mit Na/NH₃ erhält man durch Reinigung mit Dowex 50 kristallisiertes Glutathion in einer Ausbeute von 53.3% d. Th.

Seit der Isolierung und Strukturaufklärung des natürlichen Tripeptids Glutathion (VII) durch F. G. HOPKINS²⁾ wurden viele Synthesen beschrieben³⁾. Wir haben VII vor längerer Zeit ebenfalls synthetisiert und kristallisiert erhalten¹⁾. Jetzt haben wir uns erneut mit der Synthese von VII beschäftigt mit dem Ziel, die Zahl der Reaktionsstufen zu vermindern und die Ausbeuten zu erhöhen.

Wir folgten zunächst dem von GOLDSCHMIDT und JUTZ angegebenen Weg¹⁾, nur wurden Glycin und Glutaminsäure als Benzylester eingesetzt. Der Gang der Synthese ist in Schema 1 veranschaulicht.



*) Folgende Abkürzungen werden verwendet: Z = Benzylloxycarbonyl, Bzl = Benzyl, DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid. Das Präfix L- wurde überall weggelassen, da stets die opt. reinen L-Aminosäuren verwendet wurden.

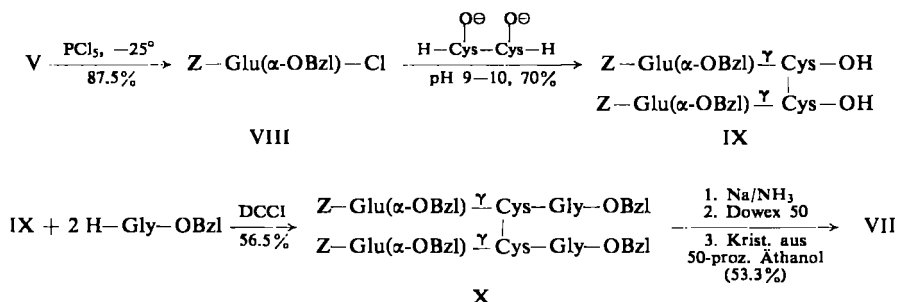
1) St. GOLDSCHMIDT und Ch. JUTZ, Chem. Ber. 86, 1116 [1953].

2) Biochem. J. 15, 286 [1921]; J. biol. Chemistry 84, 269 [1930].

3) Ältere Synthese s. l. c.¹⁾, neuere z. B. a) F. E. KING, J. W. CLARK-LEWIS und R. WADE, J. chem. Soc. [London] 1957, 880; b) J. ARENS, Amer. Pat. 2793204, C. A. 51, 16522i [1957]; c) F. WEYGAND und R. GEIGER, Chem. Ber. 90, 634 [1957]; d) J. RUDINGER und F. ŠORM, Collect. czechoslov. chem. Commun. 16, 214 [1951]; e) G. AMIARD, R. HEYMÈS und L. VELLUZ, Bull. Soc. chim. France 23, 693 [1956]; f) C. BERSE, R. BOUCHER und L. PICHE, Canad. J. Chem. 37, 1733 [1959]; g) W. RIED und G. FRANZ, Liebigs Ann. Chem. 644, 141 [1961].

Wir versuchten ferner die Synthese von VII zu verkürzen. Dies sollte z. B. durch Einsatz von *Cystin* möglich sein, vorausgesetzt, daß im Verlauf der Synthese die S—S-Brücke erhalten bleibt. Wir schlugen schließlich folgenden Weg ein: Das Chlorid VIII des Z-Glutaminsäure- α -benzylesters (V) wird bei niedriger Temperatur und pH 9—10 mit Cystin zu IX umgesetzt, das nach der DCCI-Methode⁴⁾ mit Glycin-benzylester zum geschützten S-S-Glutathion X verknüpft wird⁵⁾.

Schema 2



Für die Entfernung der Schutzgruppen aus X und die Aufspaltung der S—S-Brücke verwendeten wir, wie üblich, Natrium in flüssigem Ammoniak, wobei keinerlei Spaltstücke von VII auftraten (im Papier- oder Dünnschichtchromatogramm nur ein Fleck, R_F -Wert identisch mit authent. VII). Dagegen mußten wir bei Versuchen, die Reinigung des rohen Glutathions nach V. DU VIGNEAUD und G. L. MILLER⁶⁾ über die Quecksilber- und Kupfer(I)-mercaptide durchzuführen, feststellen, daß — wohl wegen des stark sauren Milieus — die γ -Peptidbindung der Glutaminsäure unter Bildung von Cysteinylglycin teilweise gespalten wird, dessen Anwesenheit sich selbst nach der Reinigung noch nachweisen läßt (2 Flecke im Papierchromatogramm). Zunächst versuchten wir deshalb, VII mit einem SH-spezifischen Austauscher⁷⁾ abzutrennen. Dies erwies sich als möglich, aber die Kapazität des Austauschers war für präparative Versuche viel zu niedrig⁸⁾. Wir behandelten dann rohes VII mit Amberlite XE 64, erreichten damit aber nur pH 4. Die Aufarbeitung ergab, daß das saure Ammoniumsalz von VII vorlag (Äquiv.-Gew., Nachweis von NH_3 , Analyse). Eine Reinigung gelang schließlich durch Behandeln der Lösung von rohem VII mit Dowex 50 (H^\ominus -Form), wenn dessen Menge so bemessen war, daß pH 2.5—2.8 (pH von VII) erreicht wurde. Durch Elution des Austauschers mit O_2 -freiem Wasser erhielt man ein Eluat, das nach Gefrier-trocknen aus 50-proz. Äthanol kristallisiertes Glutathion mit 53.3% Ausbeute lieferte (bez. auf X).

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT sowie dem FONDS DER CHEMISCHEN INDUSTRIE sind wir für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

4) J. C. SHEEHAN und G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 [1955].

5) Die gleiche Reaktion läßt sich auch nach der Phosphorazo-Methode durchführen, aber X ist dann unreiner und die Ausbeuten liegen niedriger (27%).

6) Biochemical Preparations 2, 74 [1952].

7) E. R. STADTMAN und W. W. KIELLY, J. Amer. chem. Soc. 76, 404 [1954].

8) Dissertat. B. KOLB, Techn. Hochschule München 1960, S. 37.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Isocyanatoessigsäure-benzylester: In die Suspension von 10.0 g sorgfältig getrocknetem *Glycin-benzylester-hydrochlorid*⁹⁾ in Toluol wurde unter Rühren und Rückflußkochen solange *Phosgen* eingeleitet, bis die HCl-Entwicklung aufhörte (2–3 Stdn.). Nach Entfernen des Toluols i. Vak. wurde der Rückstand destilliert. Sdp._{0.02} 100°, Ausb. 2.56 g. Im Kolben verblieben ziemlich viel nichtflüchtige Anteile, die nicht weiter untersucht wurden.

Bis-Z-cystinyl-bis-[glycin-benzylester]: Die Lösung von 1.31 g (2.58 mMol) *Bis-Z-Cystin*¹⁰⁾ in 10 ccm Tetrahydrofuran wurde unter kräftigem Rühren mit 983 mg (5.15 mMol) *Isocyanatoessigsäure-benzylester*, 0.05 ccm absol. Pyridin und 3 ccm absol. Äther versetzt. Als sich das Reaktionsprodukt abzuscheiden begann (1 Stde., Raumtemp.), wurde die Mischung 3 Stdn. zum Sieden erhitzt, dann der dicke Kristallbrei abgesaugt und mit Äther gewaschen. Der trockene Kristallkuchen wurde in Essigester gelöst, die Lösung 3 mal mit je 10 ccm 10-proz. Natriumcarbonatlösung, dann mit Wasser durchgeschüttelt, getrocknet und eingeeengt. Durch allmähliche Zugabe von Petroläther wurde das geschützte Peptid zur Kristallisation gebracht. Ausb. 1.83 g (91%), Schmp. 166–167°.

C₄₀H₄₂N₄O₁₀S₂ (802.9) Ber. C 59.84 H 5.26 N 6.96 Gef. C 59.71 H 5.20 N 6.66

Z-S-Benzyl-cysteinyl-glycin-benzylester (III): 12 g *Z-S-Benzyl-cystein* (II) wurden mit der Phosphorazoverbindung aus 7 g *Glycin-benzylester-hydrochlorid* und 1.5 ccm Pyridin, wie wiederholt beschrieben, umgesetzt und die Reaktionsmischung aufgearbeitet. Ausb. 15 g (90%) III, Schmp. 130–131.5° (aus Essigester/Petroläther). III verpufft beim Erhitzen im Rohr.

C₂₇H₂₈N₂O₅S (492.6) Ber. C 65.83 H 5.73 N 5.69 Gef. C 65.78 H 5.56 N 5.49

S-Benzyl-cysteinyl-glycin-benzylester (IV): In Anlehnung an die Vorschrift von F. WEYGAND und W. STEGLICH¹¹⁾ erhielten wir durch Abspaltung von Z aus III (3.35 g) mit *Trifluoressigsäure* ein gelbliches, nicht kristallisierendes Öl. Ausb. 1.7 g (70.8%).

Z-S-Benzyl-glutathion-dibenzylester (VI): 875 mg (2.36 mMol) *Z-Glutaminsäure-α-benzylester* (V) wurden mit der Phosphorazoverbindung von IV (aus 845 mg IV und 0.187 ccm PCl₃ in Pyridin) umgesetzt. Der nach Abdestillieren des Pyridins verbliebene Rückstand wurde in Essigester aufgenommen und die Lösung mit *n* HCl, gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser durchgeschüttelt. Nach Trocknen und Einengen der Essigesterschicht i. Vak. wurde VI durch Zugabe von Petroläther gefällt. Ausb. 1.50 g (88%) eines amorphen, gelblichen Pulvers vom Schmp. 145–149°, das durch Umlösen aus Essigester feine Kristalldrusen vom Schmp. 152–153° (Sintern ab 148°) lieferte. Reinausb. 1.35 g (80%), [α]_D²⁰: –29.7° (*c* = 6.9, in Dioxan).

C₃₉H₄₁N₃O₈S (711.9) Ber. C 65.19 H 5.80 N 5.90 Gef. C 65.28 H 5.73 N 5.95

Z-Glutaminsäure-α-benzylester (V): 120 g frisch bereitetes *Z-Glutaminsäureanhydrid*¹²⁾ wurden mit 160 ccm frisch dest. *Benzylalkohol* 2 Stdn. auf 100° erwärmt und dann mit 89 g *Dicyclohexylamin* versetzt. Das alsbald kristallisierende Gemisch verrührte man nach 1 Stde. (0°) mit 600 ccm Isopropyläther und saugte ab. Das Rohprodukt (195 g) gab aus Methanol/Isopropyläther 121 g (48%) reines *Dicyclohexylaminsalz* von V, Schmp. 161–162° (Sintern bei 157°(Z.)*, 164–165°(K.)**).

*1) ZUMACH.

**2) KOLB.

9) J. D. CIPERA und R. V. V. NICHOLLS, Chem. and Ind. 1955, 16; i.c.⁸⁾, S. 25.

10) J. L. WOOD und V. DU VIGNEAUD, J. biol. Chemistry 130, 110 [1939].

11) Z. Naturforsch. 14b, 472 [1959].

12) J. LE QUESNE und G. T. YOUNG, J. chem. Soc. [London] 1950, 1957.

116 g des vorstehenden Salzes wurden in einem Gemisch von 1600 ccm Aceton und 1400 ccm H₂O gelöst und mit etwa 400 ccm Dowex 50 (H[®]-Form) 20 Min. geschüttelt. Dann wurde der Austauscher abgesaugt und mit dem Aceton/H₂O-Gemisch gewaschen. Nach Eindampfen der vereinigten Filtrate i. Vak. bei 40° wurde der Rückstand 2mal aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Ausb. 69.5 g (89%) *V* vom Schmp. 97–99° (Lit.¹³⁾: 95°).

C₂₀H₂₁NO₆ (371.4) Ber. C 64.70 H 5.66 N 3.77 Gef. C 64.61 H 5.98 N 3.62
Äquiv.-Gew. 371.0 (acidimetr. in Aceton/H₂O)

Z-Glutaminsäure- α -benzylester- γ -chlorid (*VIII*): Die Lösung von 48.3 g (130 mMol) *V* in 800 ccm Tetrahydrofuran wurde bei –20° mit 80 g fein gepulvertem PCl₅ versetzt und 30 Min. bei gleicher Temp. gerührt. Dann wurde ungelöstes PCl₅ abgesaugt und das Filtrat bei Raumtemp. i. Vak. eingeeengt. Nach Zugabe von 700 ccm auf –50 gekühltem, niedrig siedendem Petroläther saugte man den entstandenen Niederschlag *sofort* *) ab, wusch mehrmals mit gekühltem Petroläther und setzte *VIII* nach Trocknen i. Vak. *direkt* *) weiter um. Ausb. 44.3 g *VIII* (87.5%) vom Schmp. 63–64° (Zers. unter Abspaltung von HCl und Bildung von *Z*-Pyrrolidon-(5)-carbonsäure-(2)-benzylester vom Schmp. 108°).

Bis-[*Z*- γ -glutamyl- α -benzylester]-cystin (*IX*): 28.8 g (120 mMol) *Cystin* wurden in 120 ccm 2*n* NaOH gelöst und mit 120 ccm Tetrahydrofuran gemischt. Nach Kühlung auf 0° ließ man gleichzeitig die Lösung von 46.8 g *VIII* (120 mMol) in 240 ccm Tetrahydrofuran und 60 ccm 2*n* NaOH so zutropfen, daß der pH-Wert der Lösung am Umschlagspunkt von Phenolphthalein verblieb. Dann wurde das Eisbad entfernt und noch 30 Min. bei Raumtemp. gerührt. Man dampfte das Tetrahydrofuran bei 40° i. Vak. ab, überschichtete den wäbr. Rückstand mit 1/ Essigester und säuerte unter kräftigem Rühren durch schnelle Zugabe von 180 ccm 4*n* HCl an, wobei das milchig sich ausscheidende *IX* sofort vom Essigester aufgenommen wurde. Die Wasserschicht wurde nochmals mit Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte wurden mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und bei 40° i. Vak. eingedampft. Das dabei in zunehmendem Maße sich abscheidende Öl wurde durch Hinzufügen von 400 ccm Benzol vermehrt. Dann dampfte man i. Vak. zur Trockne. Ausb. 48.1 g (84.7%) Rohprodukt vom Schmp. 126–129° (Sintern bei 115°). Nach 2maligem Lösen in Aceton und Fällen mit der 20fachen Menge Essigester erhielt man *IX* als amorphes, farbloses Pulver vom Schmp. 130–133° (Sintern bei 125°). $[\alpha]_D^{25}$: –14.6° (*c* = 2.390, in Dioxan), Ausb. 39.8 g (70%).

C₄₆H₅₀N₄O₁₄S₂ (947.0) Ber. C 58.34 H 5.40 N 5.92 Gef. C 57.57 H 5.46 N 5.79

Aus der Mutterlauge von *IX* kristallisierte bei längerem Stehenlassen etwas *Z*-Pyrrolidon-(5)-carbonsäure-(2)-benzylester, Schmp. 108–109°.

Bis-*Z*-*S*-*S*-Glutathion-tetrabenzylester (*X*): 26.9 g (28.4 mMol) *IX* wurden mit 800 ccm trockenem Methylenchlorid, 10.4 ccm Triäthylamin (75 mMol) und 13.7 g (68.2 mMol; 20% Überschuß) *Glycin*-benzylester-hydrochlorid bis zur klaren Lösung gerührt (–15°). Dann rührte man nach Zugabe von 14.4 g (68.2 mMol) *DCCI* in 20 ccm Methylenchlorid bei gleicher Temp. 5 Stdn. und bei 0° nochmals 5 Stdn. Man ließ über Nacht bei Raumtemp. stehen, versetzte mit 1 ccm Eisessig und saugte den ausgefallenen Harnstoff ab. Das Filtrat wurde i. Vak. möglichst vollständig eingedampft, der ölige Rückstand in 800 ccm Essigester aufgenommen, nach Filtrieren die Lösung zur Hälfte eingedampft und über Nacht stehengelassen. Man erhielt 26.2 g rohes *X* (74.4%) vom Schmp. 166–171° (Sintern bei 155°). Zur Reinigung wurde in 200 ccm Tetrahydrofuran heiß gelöst, nach mehreren Stdn. bei 0° der ausgefallene

*) Bei längerem Stehenlassen tritt Abspaltung von Benzylchlorid unter Bildung von Pyrrolidon-(5)-carbonsäure-(2)-benzylester ein.

¹³⁾ H. SACHS und E. BRAND, J. Amer. chem. Soc. 75, 4610 [1953].

Dicyclohexylharnstoff abgetrennt, das Filtrat auf ein kleines Vol. gebracht und der Rückstand erneut gleich behandelt. Die letzte Essigesterlösung wurde eingengt und gegebenenfalls X durch allmähliche Zugabe von Petroläther abgeschieden. Nach Absaugen, Waschen mit etwas Essigester und Trocknen an der Luft erhielt man 19.9 g X (56.5%) vom Schmp. 171–175° (Sintern bei 160°, $[\alpha]_D^{25}$: -4.9° ($c = 3.253$, in absol. Dioxan) (Z.), Schmp. 170–173° (Sintern bei 164°, $[\alpha]_D^{25}$: -6.7° ($c = 2.6$, in Dioxan) (K.).

$C_{64}H_{68}N_6O_{16}S_2$ (1241.4) Ber. C 61.92 H 5.55 N 6.77 Gef. C 61.90 H 5.57 N 6.45

Glutathion (VII)

a) *Saures Ammoniumsalz von VII*: Die wie unter b) nach Abspaltung der Schutzgruppen verbliebene wäbr. Lösung von VII wurde gefriergetrocknet und der Rückstand (entsprechend 220 mg VII) unter Rühren mit 30 ccm Amberlite XE 64 und 50 ccm O₂-freiem Wasser versetzt. Man rührte, bis die CO₂ Entwicklung aufhörte, gegebenenfalls unter Zufügung von weiterem Amberlite. Nach 2 Stdn. füllte man das Gemisch in eine Säule, die bereits 30 ccm Amberlite enthielt, ließ im N₂-Gegenstrom die Flüssigkeit ablaufen und wusch mit O₂-freiem Wasser solange nach, bis die Nitroprussidnatrium-Reaktion im Filtrat negativ blieb (ca. 150 ccm). Durch Gefriertrocknen erhielt man 223 mg farbloses, amorphes Pulver. Ausb. 96.3 % (titrimetrisch). Chromatographie: Nur ein Fleck mit gleichem R_F wie authent. VII, Reaktion mit NESSLERS Reagens positiv. Die wäbr. Lösung zeigt pH \sim 4.5.

$NH_4[C_{10}H_{16}N_3O_6S]$ Äquiv.-Gew. Ber. 324.2 Gef. 326

b) *Glutathion (kristallisiert) (VII)*: 7.45 g (6.00 mMol) X wurden in ca. 150 ccm siedendem, trockenem, flüssigem Ammoniak mit soviel Natrium umgesetzt, daß die blaue Farbe etwa 30 Min. bestehen blieb (1.8 g). Dann wurde Ammoniumcarbonat zugegeben, bis gerade Entfärbung eintrat, das Ammoniak i. Vak. abgesaugt und der trockne Rückstand über Nacht i. Vak. über H₂SO₄ aufbewahrt. Die folgenden Arbeiten wurden in O₂-freiem N₂ durchgeführt.

Man überschichtete den Rückstand mit 40 ccm Dowex 50 (H⁺-Form), gab dann 30 ccm ausgekochtes, mit N₂ gesätt. Wasser zu und vorsichtig soviel Austauscher, daß das Gemisch pH 2.5–2.8 aufwies. Aus der in eine Säule übergeführten Masse wurde das Glutathion mit O₂-freiem Wasser in eine Essigester-Vorlage eluiert (etwa 450 ccm Eluat). Die wäbr. Phase lieferte nach Gefriertrocknung 3.18 g amorphes, farbloses Rohprodukt (86.6%). Thiolaktivität 80.1%; $[\alpha]_D^{25}$: -14.0° ($c = 5.073$, in Wasser). Zur Kristallisation wurde das Rohprodukt in möglichst wenig 50-proz. Äthanol heiß gelöst. Nach Abkühlen wurde die Lösung angeimpft, unter gelegentlichem Schütteln und Reiben mit dem Glasstab 5 Tage im Eisschrank aufbewahrt, der kristallisierte Niederschlag abgesaugt und mit etwas 50-proz. Äthanol und Aceton gewaschen. Fraktion I: Nach Trocknen i. Hochvak. bei 56° 1.19 g VII. Das Filtrat wurde mit 10 ccm 96-proz. Äthanol verdünnt und nochmals wie oben behandelt. Fraktion 2: 774 mg VII. Gesamtausb. an kristallisiertem VII 1.96 g (53.3% d. Th., bez. auf eingesetztes X), Schmp. 186–190° (Zers. unter Aufschäumen nach Sintern ab 180°). $[\alpha]_D^{25}$: -18.9° ($c = 4.653$, in Wasser) (Z.). $[\alpha]_D^{25}$: -21° ($c = 2.74$, in Wasser) (K.).