

ELISABETH DANE und TONI DOCKNER

$\beta$ -Dicarbonylverbindungen als Aminoschutzgruppen bei Peptidsynthesen, III<sup>1)</sup>

## Synthese von 6-[D- $\alpha$ -Amino-phenylacetyl-amino]-penicillansäure unter Verwendung von $\beta$ -Dicarbonylverbindungen als Aminoschutzgruppen

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität München

(Eingegangen am 27. August 1964)

Die aus den Kaliumsalzen der *N*-[1-Methyl-2-äthoxycarbonyl-vinyl]- (Ic) und der *N*-[1-Methyl-2-(*o*-methoxy-phenylcarbonyl)-vinyl]-D- $\alpha$ -amino-phenylelessigsäure (Id) mit Pivaloylchlorid gebildeten Anhydride wurden mit dem Triäthylammoniumsalz der 6-Amino-penicillansäure (IIIb) umgesetzt. Aus den nicht isolierten Reaktionsprodukten ließen sich die Aminoschutzgruppen durch schwache Säuren abspalten, wobei 6-[D- $\alpha$ -Amino-phenylacetyl-amino]-penicillansäure (IVa) erhalten wurde.

$\beta$ -Dicarbonylverbindungen lassen sich, wie kurz mitgeteilt wurde<sup>2)</sup>, als Aminoschutzgruppen bei Peptidsynthesen verwenden. Diese — inzwischen an einem ausgedehnten Versuchsmaterial überprüfte — Methode kann Vorteile haben, wenn die Abspaltung von anderen Aminoschutzgruppen mit Schwierigkeiten verbunden ist, z. B. bei *S*-haltigen Peptiden und bei solchen, die gegen Säuren oder Basen empfindlich sind.

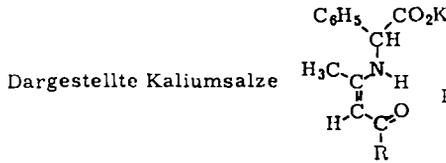
Es lag daher nahe, zu untersuchen, ob 6-[D- $\alpha$ -Amino-phenylacetyl-amino]-penicillansäure („Ampicillin“; IVa) unter Verwendung von  $\beta$ -Dicarbonylverbindungen als Aminoschutzgruppe dargestellt werden kann<sup>1)</sup>. F. P. DOYLE und Mitarbb.<sup>3)</sup> haben die Synthese dieser Verbindung beschrieben. Sie setzten das aus *N*-Benzyloxycarbonyl-D- $\alpha$ -amino-phenylelessigsäure und Chlorameisensäure-äthylester gebildete Anhydrid mit dem Natriumsalz der 6-Amino-penicillansäure (IIIa) um; die Aminoschutzgruppe wurde durch katalytische Hydrierung entfernt.

Der Verlauf der Umsetzung von  $\beta$ -Dicarbonylverbindungen mit Aminosäuren in methanolischer Kalilauge sowie die Eigenschaften der erhaltenen Derivate sind von den Komponenten abhängig. Um die für D- $\alpha$ -Amino-phenylelessigsäure geeigneten Aminoschutzgruppen zu finden, wurden die in der Tab. aufgeführten Kaliumsalze dargestellt. Diese liegen aufgrund von IR- und NMR-Spektren vollständig oder weitgehend in der Enaminform  $\ddagger$  vor.

<sup>1)</sup> II. Mittell.: E. DANE und T. DOCKNER, *Angew. Chem.* **76**, 342 [1964]; *Angew. Chem. internat. Edit.* **3**, 439 [1964].

<sup>2)</sup> E. DANE, F. DREES, P. KONRAD und T. DOCKNER, *Angew. Chem.* **74**, 873 [1962]; *Angew. Chem. internat. Edit.* **1**, 658 [1962].

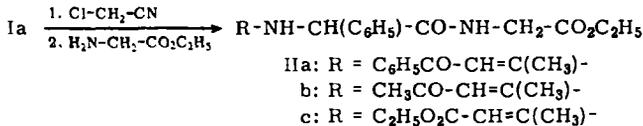
<sup>3)</sup> F. P. DOYLE, G. R. FOSKER, J. H. C. NAYLER und H. SMITH, *J. chem. Soc. [London]* **1962**, 1440.



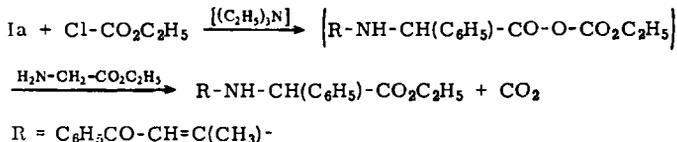
K-Salz	R	Aminoschutzgruppe
Ia	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	1-Methyl-2-benzoyl-vinyl-
Ib	CH <sub>3</sub>	1-Methyl-2-acetyl-vinyl-
Ic	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	1-Methyl-2-äthoxycarbonyl-vinyl-
Id	NH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OCH <sub>3</sub> ( <i>o</i> )	1-Methyl-2-[ <i>o</i> -methoxy-phenyl-carbamoyl]-vinyl-
Ie	NH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OCH <sub>3</sub> ( <i>p</i> )	1-Methyl-2-[ <i>p</i> -methoxy-phenyl-carbamoyl]-vinyl-

Zur Darstellung der Benzoylvinyl- und Acetylvinyl-Derivate Ia und Ib mußte einige Zeit erwärmt werden, wobei Ia teilweise racemisierte. Acetessigsäure-äthylester und Acetessigsäure-anilide reagieren erheblich schneller zu den Kaliumsalzen Ic–Ie. Die Schutzgruppen lassen sich durch schwache Säuren bei Raumtemperatur abspalten. Für die Geschwindigkeit der Abspaltung gilt qualitativ die umgekehrte Reihenfolge wie bei der Bildung der *N*-geschützten Kaliumsalze.

Das gegenüber Säuren am wenigsten empfindliche Kaliumsalz Ia benutzten wir zu Modellreaktionen für Peptidverknüpfungen. Der aus Ia erhaltene Cyanmethylester reagierte mit Glycin-äthylester zum Dipeptidester IIa; jedoch war bei der Darstellung des Cyanmethylesters vollständige Racemisierung eingetreten.



Versuche, Ia oder die daraus erhaltene Säure nach der Chlorameisensäureester-Methode in einen *N*-geschützten Peptidester zu überführen, verliefen erfolglos; unter verschiedenen Bedingungen wurde nur der *N*-geschützte  $\alpha$ -Amino-phenylessigsäure-äthylester erhalten:

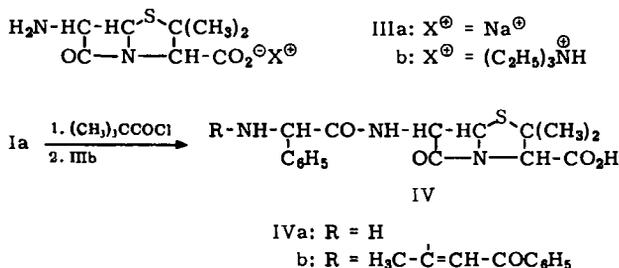


Diese intramolekulare Ausweichreaktion haben wir bisher nur bei der  $\alpha$ -Amino-phenylessigsäure beobachtet.

Der optisch aktive Dipeptidester IIa wurde erhalten, als man das Kaliumsalz Ia mit Pivaloylchlorid ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CCOCl) und das gebildete Anhydrid mit Glycin-äthylester umsetzte. Analog reagierten die Kaliumsalze Ib und Ic.

Zur Synthese des „Ampicillins“ wurde das Triäthylammoniumsalz der 6-Aminopenicillansäure (III b) eingesetzt, das im Reaktionsmedium Tetrahydrofuran löslich ist. Es zeigte sich, daß der aus Ia erhaltene Cyanmethylester nicht genügend reaktionsfähig ist, um sich bei Raumtemperatur mit III b umzusetzen.

Bei Umsetzung von Ia mit Pivaloylchlorid und anschließend mit III b wurde das Benzoylvinyl-Derivat IV b isoliert; die Aminoschutzgruppe ließ sich durch Kohlensäure abspalten. Jedoch zeigte die erhaltene 6-[ $\alpha$ -Amino-phenylacetyl-amino]-penicillansäure (IV a) im mikrobiologischen Test nur geringe Wirksamkeit.



Zum Ziel führte die Umsetzung der Kaliumsalze Ic und Id mit III b nach der Pivaloylchlorid-Methode. In diesen Synthesen wurde das *N*-geschützte „Ampicillin“ nicht isoliert; die Schutzgruppen wurden während der Aufarbeitung durch Ansäuern abgespalten. Das aus Ic und Id erhaltene „Ampicillin“-Präparat zeigte die angegebene optische Drehung und die erwartete Wirksamkeit im mikrobiologischen Test.

Dem FONDS DER CHEMISCHEN INDUSTRIE und der FARBENFABRIKEN BAYER AG danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Lösungsmittel wurden über basischem Aluminiumoxyd (Akt.-St. I; Woelm) getrocknet, Tetrahydrofuran über Natrium. Bei den Aufarbeitungen wurden die Lösungsmittel im Rotationsverdampfer im Wasserstrahl-Vakuum abgezogen. Schmelzpunkte sind im Mikroschmelzpunkt-Apparat (KOFLER) bestimmt und nicht korrigiert. Die Reinheit der Verbindungen wurde meist im Dünnschichtchromatogramm (auf Silicagel G, Merck) kontrolliert; Indikatoren: Eisen(III)-chlorid, Jod. Eisen(III)-chloridreaktionen führte man in Äthanol oder Äthanol/Wasser durch. Analysen-Präparate wurden i. Hochvak. über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet, die Kalium- und Bariumsalze mit  $\text{WO}_3$ -Zuschlag verbrannt. Die optischen Drehungen wurden mit dem lichtelektrischen Polarimeter der Firma Zeiss (LEP-A 2) gemessen.

I a) Kaliumsalz der *N*-[1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]- $\alpha$ -amino-phenylelessigsäure (Ia): Zu einer unter Rückfluß siedenden Lösung von 3.84 g (23.7 mMol) Benzoylacetone in 25 cm<sup>3</sup> Methanol tropfte man innerhalb von 4 Stdn. 3.26 g (21.6 mMol) *D*- $\alpha$ -Amino-phenylelessigsäure, gelöst in 20 cm<sup>3</sup> methanol. KOH. Während des Zutropfens fiel aus der orange-farbenen Lösung von Zeit zu Zeit Aminosäure aus, die jeweils nach wenigen Min. wieder in Lösung ging. Nach Einengen der filtrierten Lösung verblieb ein ölig-kristalliner, orange-

farbener Rückstand, der beim Verreiben mit Essigester in Nadeln (7.05 g, 98%) kristallisierte. Der Zers.-P. lag nach Umkristallisieren aus Essigester unter Zusatz von wenig Äthanol bei 231—234°. *Ia* ist leicht löslich in Wasser, Methanol und Äthanol, schwer löslich in Essigester, Aceton sowie Tetrahydrofuran und gibt mit Eisen(III)-chlorid eine Grünfärbung, in sehr konzentrierter Lösung eine Blaufärbung.

$KC_{18}H_{16}NO_3$  (333.4) Ber. C 64.84 H 4.84 N 4.20 Gef. C 64.67 H 5.11 N 4.17

Zur sauren Spaltung wurde eine Lösung von 0.594 g *Ia* (1.78 mMol) in 10 ccm Methanol mit 2.1 ccm 1 *n* HCl versetzt. Nach 2 Stdn. begann *D-α-Amino-phenylelessigsäure* sich abzuscheiden; nach 17 Stdn. wurden 0.139 g (52%) abfiltriert.  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-156.1^\circ$  ( $c = 1$  in 1 *n* HCl) (Drehwert der bei der Darstellung des Kaliumsalzes verwendeten Verbindung  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-150.8^\circ$ ,  $c = 1$  in 1 *n* HCl).

b) *Bariumsalz der N-[1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-α-amino-phenylelessigsäure (Ia, 1/2 Ba statt K)*: Das Bariumsalz fällt aus, wenn man eine wäbr. Lösung von *Ia* mit Bariumchlorid-Lösung versetzt (Ausb. etwa 75%). Es ist löslich in Methanol, Äthanol, Chloroform, Aceton, Essigester und Benzol. Aus 96-proz. Äthanol Zers.-P. der farblosen Nadeln 204—206°. Eisen(II)-chloridreaktion: blaugrün.

$BaC_{36}H_{32}N_2O_6 \cdot 1 H_2O$  (744.0) Ber. C 58.11 H 4.60 N 3.77 Gef. C 57.52 H 4.60 N 3.93

c) *N-[1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-α-amino-phenylelessigsäure (Ia, H statt K)*: Versetzt man unter Rühren eine konzentrierte wäbr. Lösung von *Ia* mit 1 Äquiv. 2 *n*  $CH_3CO_2H$ , so fällt die freie Säure zunächst als feinverteilter farbloser Niederschlag aus, der sich nach wenigen Minuten zusammenballt. Man saugt sofort ab, wäscht mehrmals mit Wasser und nach Trocknung mit Äther. Die feinen Nadeln (75%) hatten einen Zers.-P. von 142—145° und gaben eine grüne Eisen(III)-chloridreaktion. Die Säure zersetzt sich beim Erhitzen in Benzol oder Wasser.

2) *Kaliumsalz der N-[1-Methyl-2-acetyl-vinyl]-D-α-amino-phenylelessigsäure (Ib)*: Eine Lösung von *D-α-Amino-phenylelessigsäure* in methanol. Kalilauge wurde mit Acetylaceton, gelöst in Methanol, versetzt (Molverhältnisse und Konzentrationen wie unter 1 a)). Die zunächst ausgefallene *D-α-Amino-phenylelessigsäure* ging beim Erhitzen innerhalb von 80 Min. oder bei Raumtemperatur (Rühren!) innerhalb von 26 Stdn. in Lösung. Nach Einengen verblieb ein blaßgelber kristalliner Rückstand, aus dem nach Verreiben mit Aceton farblose Nadeln (90%) vom Zers.-P. 222—224° erhalten wurden. Aus feuchtem Aceton Zers.-P. 232—233°. *Ib* ist in heißem Aceton und Tetrahydrofuran löslich. Eisen(III)-chloridreaktion: rot-violett.

$KC_{13}H_{14}NO_3$  (271.3) Ber. C 57.54 H 5.20 N 5.16 Gef. C 56.85 H 5.68 N 5.10

Bei der sauren Spaltung von *Ib* wie unter 1 a) begann die Abscheidung von *D-α-Amino-phenylelessigsäure* nach 25 Min. Nach 12 Stdn. wurden 80% isoliert;  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-162.8^\circ$  ( $c = 1$  in 1 *n* HCl).

3) *Kaliumsalz der N-[1-Methyl-2-äthoxycarbonyl-vinyl]-D-α-amino-phenylelessigsäure (Ic)*: Zu einer heißen Lösung von 5.28 g (35.0 mMol) *D-α-Amino-phenylelessigsäure* in 40 ccm 0.88 *n* methanol. Kalilauge fügte man eine Lösung von 5.00 g (38.5 mMol) *Acetessigsäure-äthylester* in 20 ccm Methanol und erhitzte 10 Min. zum Sieden. Die abgekühlte, fast farblose Lösung wurde von wenig ausgefallenen Flocken abgetrennt und eingengt. Beim Verreiben des kristallinen Rückstands mit absol. Äthanol verblieben 8.83 g (81.5%) farblose Nadeln vom Zers.-P. 229—233°. Beim Umkristallisieren aus absol. Äthanol änderte sich der Zers.-P. nicht. *Ic* löst sich in Tetrahydrofuran und gibt mit Eisen(III)-chlorid eine rotbraune Färbung.

$KC_{14}H_{16}NO_4 \cdot 1/2 H_2O$  (310.4) Ber. C 54.17 H 5.52 N 4.51 Gef. C 54.34 H 6.28 N 4.41

Bei der sauren Spaltung von *Ic* wie unter 1 a) fiel augenblicklich *D*- $\alpha$ -Amino-phenylessigsäure aus, nach 1 Stde. 70%.  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-157.8^\circ$  ( $c = 1$  in 1 *n* HCl).

4) Kaliumsalz der *N*-[1-Methyl-2-(*o*-methoxy-phenylcarbamoyl)-vinyl]-*D*- $\alpha$ -amino-phenylessigsäure (*Id*): Darstellung wie unter 3), Acetessigsäure-[*o*-methoxy-anilid] statt Acetessigsäure-äthylester. Aus der 10 Min. erhitzten Reaktionslösung kristallisierte bei Raumtemperatur allmählich *Id* in farblosen Nadeln (95%). Aus 90-proz. Äthanol Zers.-P. 201–204°.

$\text{KC}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4$  (378.5) Ber. C 60.30 H 5.06 N 7.40 Gef. C 60.14 H 5.45 N 7.47

5) Kaliumsalz der *N*-[1-Methyl-2-(*p*-methoxy-phenylcarbamoyl)-vinyl]-*D*- $\alpha$ -amino-phenylessigsäure (*Ie*): Ansatz wie unter 3), Acetessigsäure-[*p*-methoxy-anilid] statt Acetessigsäure-äthylester. Die zunächst ausgefallene  $\alpha$ -Amino-phenylessigsäure ging nach kurzem Erhitzen und 2stdg. Rühren bei Raumtemperatur in Lösung. Nach Abziehen des Methanols erhielt man ein blaßgelbes Öl, das bei Behandeln mit 99-proz. Äthanol in feinen Nadeln (Zers.-P. 150–153°, 77%) kristallisierte. Aus 99-proz. Äthanol Zers.-P. 165–167°. Eisen(II)-chloridreaktion: Grünfärbung, die augenblicklich nach Violett umschlägt.

$\text{KC}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4$  (378.5) Ber. C 60.30 H 5.06 N 7.40 Gef. C 60.11 H 5.55 N 7.22

### Modellreaktionen zur Peptidverknüpfung

#### Cyanmethylester-Methode

6a) *N*-[1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-DL- $\alpha$ -amino-phenylessigsäure-cyanmethylester (*Ia*,  $\text{CH}_2\text{CN}$  statt *K*): Eine Suspension von 3.33 g (10.0 mMol) *Ia* in 50 ccm Essigester und 10 ccm frisch dest. Chloroacetonitril wurde 13 Stdn. unter Rückfluß erhitzt; das Kaliumsalz löste sich sehr langsam. Nach Einengen der vom Kaliumchlorid abgetrennten Lösung verblieb ein gelbes, dünnflüssiges Öl, das beim Behandeln mit absol. Äther zu blaßgelben Quadern erstarrte (2.35 g, 70%, Schmp. 105–107°). Aus Äthanol/Wasser Schmp. 106–108°. Mit Eisen(III)-chlorid gibt die Verbindung erst nach längerem Stehenlassen eine Grünfärbung.  $[\alpha]_D^{25}$ :  $0^\circ$  ( $c = 1$  in 96-proz. Äthanol).

$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$  (334.4) Ber. C 71.84 H 5.43 N 8.38 Gef. C 71.87 H 5.61 N 8.62

b) *N*-[1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]-DL- $\alpha$ -amino-phenylacetyl-glycin-äthylester (*IIa*): Man löste 3.24 g (10.0 mMol) des vorstehenden Cyanmethylesters in der Wärme in 20 ccm Essigester und fügte bei Raumtemperatur 1.03 g (10.0 mMol) Glycin-äthylester hinzu. Nach 4 Stdn. hatten sich 3.07 g (81%) Dipeptidester in Balken vom Schmp. 164–167° abgeschieden. Aus Äthanol (96%) Schmp. 174–175°. Mit Eisen(II)-chlorid gibt die Verbindung nach einigen Sekunden eine Grünfärbung.

$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$  (380.4) Ber. C 69.45 H 6.36 N 7.37 Gef. C 68.97 H 6.61 N 6.99

#### Chlorameisensäureester-Methode

7a) *N*-[1-Methyl-2-benzoyl-vinyl]- $\alpha$ -amino-phenylessigsäure-äthylester (*Ia*,  $\text{C}_2\text{H}_5$  statt *K*) aus der Säure *Ia* (*H* statt *K*): Eine Lösung von 1.48 g (5.00 mMol) *Ia* (*H* statt *K*) und 0.50 g (5.00 mMol) Triäthylamin in 30 ccm Methylenchlorid wurde bei  $-28^\circ$  mit 0.70 g (6.45 mMol) Chlorameisensäure-äthylester, gelöst in 6 ccm Methylenchlorid, versetzt. Nachdem man die nun gelbe Lösung 1 Stde. bei  $-20^\circ$  bis  $-30^\circ$  gerührt hatte, tropfte man 0.51 g (5.00 mMol) Glycin-äthylester hinzu. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur engte man ein, nahm den Rückstand in Benzol auf, trennte vom Triäthylammoniumchlorid ab und engte wieder ein. Beim Verreiben des orangefarbenen Rückstands mit Äther wurden 1.03 g (64%) farblose Nadeln erhalten; aus Äthanol Schmp. 100–101°. Die Verbindung hatte die Zusammensetzung von *Ia*,  $\text{C}_2\text{H}_5$  statt *K*.

$\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_3$  (323.4) Ber. C 74.28 H 6.54 N 4.33 Gef. C 73.88 H 6.44 N 4.48

b) Aus Ia: Ia wurde in Tetrahydrofuran — in Gegenwart von katalyt. Mengen von Triäthylamin — bei  $-4$  bis  $-8^\circ$  umgesetzt und die Reaktionszeit zur Bildung des gemischten Anhydrids auf 35 Min. verkürzt. Man isolierte wieder den Ester Ia,  $C_2H_5$  statt K.

Ib und Ic reagierten mit Chlorameisensäure-äthylester in Tetrahydrofuran — in Abwesenheit von Triäthylamin — nicht zum gemischten Anhydrid.

#### Pivaloylchlorid-Methode

8a) *Optisch aktiver Dipeptidester IIa*: Zu einer Suspension von 1.67 g (5.00 mMol) Ia in 20 ccm Tetrahydrofuran gab man bei  $-6^\circ$  unter Rühren 0.60 g (5.00 mMol) Pivaloylchlorid, gelöst in 10 ccm Tetrahydrofuran. Nach 30 Min. tropfte man bei  $-6^\circ$  unter Rühren eine Lösung von 0.51 g (5.00 mMol) Glycin-äthylester in 10 ccm Tetrahydrofuran zu. Nachdem die Reaktionslösung 1 Stde. bei  $-5^\circ$  und 12 Stdn. bei Raumtemperatur gestanden hatte, wurde filtriert und eingeengt. Der gelbe ölige Rückstand kristallisierte mit wenig Äthanol in feinen, langen Nadeln (1.24 g, 65%) vom Schmp.  $108-110^\circ$ . Aus Äthanol/Wasser Schmp.  $126-128^\circ$ . IIa gibt eine grüne Eisen(III)-chloridreaktion und hatte im Dünnschichtchromatogramm (Chloroform/Essigester 3:1) den gleichen  $R_F$ -Wert wie der nach 6b) dargestellte optisch inaktive Ester.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+108.9^\circ$  ( $c = 1$  in 96-proz. Äthanol).

$C_{22}H_{24}N_2O_4$  (380.4) Ber. C 69.45 H 6.36 N 7.37 Gef. C 69.38 H 6.74 N 7.58

b) *Dipeptidester IIb*: Wie vorstehend wurde Ib mit Pivaloylchlorid und das gebildete Anhydrid mit Glycin-äthylester umgesetzt. Der nach Einengen erhaltene Rückstand kristallisierte in feinen Nadeln (61%) vom Schmp.  $155-161^\circ$ . Aus Äthanol/Wasser Schmp.  $162-164^\circ$ . Mit Eisen(III)-chlorid rotviolette Färbung.

$C_{17}H_{22}N_2O_4$  (318.4) Ber. C 64.13 H 6.97 N 8.80 Gef. C 63.94 H 7.14 N 8.75

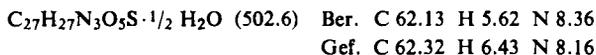
c) *Dipeptidester IIc*: Zu einer Lösung von 3.10 g (10.0 mMol) Ic in 50 ccm Tetrahydrofuran tropfte man bei  $-8^\circ$  eine Lösung von 1.20 g (10.0 mMol) Pivaloylchlorid in 10 ccm Tetrahydrofuran. Nach 10 Min. wurde bei  $-12^\circ$  langsam eine Lösung von 1.03 g (10.0 mMol) Glycin-äthylester in 10 ccm Tetrahydrofuran hinzugefügt. Die Reaktionslösung stand 1 Stde. bei  $-10^\circ$ , dann 12 Stdn. bei Raumtemperatur. Man filtrierte, engte ein und verrieb den kristallinen Rückstand mit Äther. Der in verfilzten Nadeln kristallisierende Ester IIc (3.05 g, 88%) schmolz bei  $104-108^\circ$ , aus Äthanol/Wasser bei  $125-127^\circ$ . Eisen(III)-chloridreaktion: nach einigen Min. blaßrot.

$C_{18}H_{24}N_2O_5$  (348.4) Ber. N 8.04 Gef. N 8.29

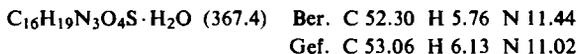
#### 9) 6-[ $\alpha$ -Amino-phenylacetylamino]-penicillansäure (IVa)

a) *Aus dem Kaliumsalz Ia*: Nach Vorschrift 8a) wurde aus 7.44 g (22.3 mMol) Ia und 2.69 g (22.3 mMol) Pivaloylchlorid das gemischte Anhydrid bereitet. Nachdem bis zur vollständigen Umsetzung 90 Min. bei  $-17^\circ$  bis  $-6^\circ$  gerührt worden war, tropfte man unter Rühren bei  $-10^\circ$  langsam eine vorgekühlte Lösung von 4.81 g (22.3 mMol) 6-Amino-penicillansäure und 3.03 g (30.0 mMol) Triäthylamin in 50 ccm Chloroform hinzu. Die blaßgelbe, trübe Lösung wurde noch 30 Min. bei  $-10^\circ$  gerührt und 12 Stdn. bei  $4^\circ$  belassen. Man engte die filtrierte Lösung ein und nahm den ölig-harzigen Rückstand in 300 ccm 3-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf. Die Lösung (pH 7.9) wurde unter schnellem Rühren tropfenweise (innerhalb von 45 Min.) mit 1 n HCl versetzt. Nachdem ein pH-Wert von 2.1 erreicht war, wurde die ausgefallene, feinkristalline, blaßgelbe Verbindung sofort abgesaugt, mit viel Wasser gewaschen und auf einem Tonteller an der Luft getrocknet. Man erhielt 8.27 g (74%) IVb vom Zers.-P.  $138-147^\circ$ . Die Verbindung zersetzt sich beim Trocknen über Blaugel,

löst sich in Chloroform, Methanol sowie Äthanol und gibt mit Eisen(III)-chlorid eine schmutzig-rotbraune Färbung.



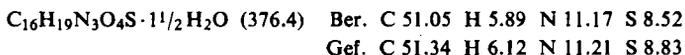
Eine Lösung von 2.46 g (4.90 mMol) *IVb* in 40 ccm Chloroform wurde mit 40 ccm Wasser unter geringem  $\text{CO}_2$ -Überdruck in einer Hydrierbirne  $7\frac{1}{2}$  Stdn. geschüttelt. Nach wiederholtem Ausschütteln der Chloroform-Lösung mit Wasser wurden die wäbr. Fraktionen eingengt. Als Rückstand verblieb ein glasartiger Film, der beim Behandeln mit Essigester in blaßgelben Blättchen (1.15 g, 64%) vom Zers.-P.  $193-200^\circ$  kristallisierte. Das Präparat ist in Wasser leichter löslich als die nach 9c) oder d) dargestellte Verbindung.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+166.4^\circ$  ( $c = 1$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ).



b) Als der vorstehende Versuch mit *Ib* ausgeführt wurde, ließ sich das Acetylvinyl-Derivat nicht isolieren; die Schutzgruppe wurde während der Aufarbeitung abgespalten. Man schüttelte die Lösung bei pH 2.15 zur Entfernung von Acetylaceton mit Äther aus und engte bei pH 5 ein.

Das kristallin erhaltene *IVa* (Zers.-P.  $201-204^\circ$ ;  $16-18\%$ ) sowie das aus *Ia* dargestellte Präparat hatten im Dünnschichtchromatogramm (Pyridin/Amylalkohol/Wasser 1 : 1 : 1) den gleichen  $R_F$ -Wert wie die in Versuch 9c) synthetisierte Verbindung. — Im mikrobiologischen Test zeigten beide Präparate gegen *E. coli* und gegen *B. subtilis* nur geringe Wirksamkeit.

c) *Aus der Äthoxycarbonylvinyl-Verbindung Ic*: Man stellte nach 8c) aus 7.13 g (23.0 mMol) *Ic* und 2.77 g (23.0 mMol) *Pivaloylchlorid* das gemischte Anhydrid her, gab dann bei  $-12^\circ$  eine gekühlte Lösung von 5.04 g (23.3 mMol) *6-Amino-penicillansäure* und 3.03 g (30.0 mMol) *Triäthylamin* in 50 ccm Chloroform in mehreren Portionen hinzu, und ließ 20 Min. bei  $-12^\circ$  und 12 Stdn. bei  $4^\circ$  stehen. Das nach Einengen der filtrierten Lösung erhaltene gelbe Öl (Eisen(III)-chloridreaktion blaß rotbraun) wurde in 112 ccm 3-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen. Zu dieser Lösung (pH 7.6) tropfte man unter Rühren innerhalb von 75 Min.  $1n$  HCl, bis ein pH-Wert von 2.7 erreicht war. Dann wurde mit Äther ausgeschüttelt, die wäbr. Lösung durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf pH 5 eingestellt und auf 30 ccm eingengt. Es schieden sich allmählich 2.12 g Nadeln vom Zers.-P.  $187-190^\circ$  ab, aus der weiter eingengten Mutterlauge noch 4.41 g kristallines, weniger reines *D-IVa* (77.5%). Zur Reinigung wurde in Wasser/Salzsäure (pH 2) gelöst und durch Einstellen auf pH 5 wieder ausgefällt; der Zers.-P. lag dann bei  $199-202^\circ$ .  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+283.1^\circ$  ( $c = 1$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ) (Lit.<sup>3)</sup>;  $[\alpha]_D^{25}$ :  $+281^\circ$ ,  $c = 1$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ).



Das Präparat hatte im Plattendiffusionstest etwa die gleiche Wirksamkeit wie die nachstehend dargestellte Verbindung.

d) *Aus Id*: Das Kaliumsalz *Id* wurde — in Suspension — mit *Pivaloylchlorid* nach 8c) innerhalb von etwa 30 Min. zum gemischten Anhydrid umgesetzt und dieses wie vorstehend mit einer Lösung von *6-Amino-penicillansäure* und *Triäthylamin* in Chloroform. Das nach Einengen der filtrierten Reaktionslösung erhaltene gelbe Öl (mit Eisen(III)-chlorid blaßgrüne Färbung, die nach wenigen Sek. nach Violett umschlägt) wurde wie vorstehend in Natriumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen. Man versetzte mit dem gleichen Vol. Wasser und

dem doppelten Vol. Chloroform und tropfte unter Rühren in 15 Min. 1 *n* HCl hinzu, bis pH 2 erreicht war. Ausgefallenes *o*-Methoxyphenylcarbamoyl-vinyl-Derivat ging beim Nachrühren innerhalb von einer Stde. in Lösung. Die nach Abtrennen vom Chloroform auf pH 5 eingestellte Lösung wurde eingeengt. Man erhielt etwa 60% *D-IVA*, das nach Reinigung (wie vorstehend) den Zers.-P. 199–202° hatte.  $[\alpha]_D^{25}$ : +287.9° ( $c = 1$  in H<sub>2</sub>O). Zur Analyse wurde i. Hochvak. bei Raumtemperatur zur Gewichtskonstanz getrocknet.

C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S (349.4) Ber. C 55.06 H 5.49 N 12.04 S 9.18

Gef. C 54.97 H 5.30 N 11.70 S 9.01

Die „minimale Hemmkonzentration“ des Präparats war gegen *E. coli* 0.9  $\gamma$ /ml, gegen *B. subtilis* 0.023  $\gamma$ /ml.