

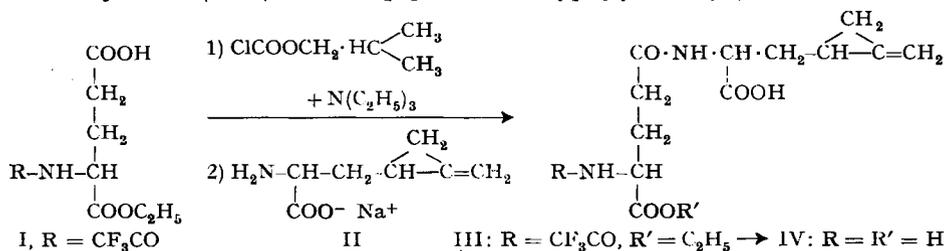
77. Synthese von  $\gamma$ -L-Glutamyl-hypoglycin A (Hypoglycin B)

von A. Jöhl und W. G. Stoll

Herrn Prof. Dr. P. KARRER zum 70. Geburtstag gewidmet

(27. II. 59)

v. HOLT und Mitarbeiter<sup>1)</sup> zeigten, dass das Dipeptid Hypoglycin B, erstmals von HASSALL & REYLE<sup>2)</sup> aus den unreifen Früchten der Sapindacee *Blighia sapida* isoliert, bei der Hydrolyse in 50-proz. Ameisensäure Glutaminsäure und Hypoglycin A liefert. In einer vorhergehenden Arbeit erbrachten wir den Beweis, dass es sich bei Hypoglycin B um  $\gamma$ -L-Glutamyl-hypoglycin A (IV) handelt<sup>3)</sup>. Nachfolgend wird über die Synthese (I–IV) dieses Dipeptides aus Hypoglycin A (II) berichtet.



Der von WEYGAND und Mitarbeitern<sup>4)5)</sup> erstmals hergestellte N-TFA-L-Glutaminsäure- $\alpha$ -äthylester (I)<sup>6)</sup> wurde mit Hypoglycin A (II) nach der Gemischten-Anhydrid-Methode<sup>7)</sup> mit Chlorameisensäure-isobutylester<sup>8)</sup> gekuppelt. Der resultierende N-TFA- $\gamma$ -L-Glutamyl-hypoglycin-A- $\alpha$ -äthylester (III) konnte kristallisiert in einer Ausbeute von 35% erhalten werden.

Nachdem WEYGAND & GEIGER<sup>5)</sup> N-TFA-Glutathion-diäthylester in Glutathion überführen konnten, ohne dass die empfindliche  $\gamma$ -Glutamylbindung gespalten und ohne dass bei der alkalischen Verseifung des Diesters und Entfernung der Trifluoracetyl-Schutzgruppe eine wesentliche Umlagerung<sup>9)</sup> zum Isoglutathion festgestellt wurde, konnte angenommen werden, dass sich III bei vorsichtigem Behandeln mit Alkali zum  $\gamma$ -L-Glutamyl-hypoglycin A (IV) hydrolysieren lassen würde.

Die Verseifung des  $\alpha$ -Esters und die Abspaltung der Trifluoracetylgruppe des geschützten Dipeptides III gelang analog der Verseifung des N-TFA-Glutathion-di-

<sup>1)</sup> C. v. HOLT, W. LEPLA, B. KRÖNER & L. v. HOLT, Naturwiss. **43**, 279 (1956); C. v. HOLT & W. LEPLA, Z. physiol. Chem. **313**, 276 (1958).

<sup>2)</sup> C. H. HASSALL, K. REYLE & P. FENG, Nature **173**, 356 (1954); C. H. HASSALL & K. REYLE Biochem. J. **60**, 334 (1955).

<sup>3)</sup> A. JÖHL & W. G. STOLL, Helv. **42**, 156 (1959).

<sup>4)</sup> F. WEYGAND & M. REIHER, Chem. Ber. **88**, 26 (1955).

<sup>5)</sup> F. WEYGAND & R. GEIGER, Chem. Ber. **90**, 634 (1957).

<sup>6)</sup> TFA =  $\text{CF}_3\text{CO}$ - (Trifluoracetyl-).

<sup>7)</sup> Methode: R. A. BOISSONNAS, Helv. **34**, 874 (1951); Th. WIELAND & H. BERNHARD, Liebig's Ann. Chem. **572**, 190 (1951); J. R. VAUGHAN, J. Amer. chem. Soc. **73**, 3547 (1951).

<sup>8)</sup> J. R. VAUGHAN & J. A. EICHLER, J. Amer. chem. Soc. **75**, 5556 (1953).

<sup>9)</sup> Vgl. hierzu: E. SONDHEIMER & R. W. HOLLEY, J. Amer. chem. Soc. **79**, 3767 (1957), und V. BRUCKNER, M. KAJTÁR, J. KOVÁCS, H. NAGY & J. WEIN, Tetrahedron **2**, 211 (1958).

äthylesters mit 1-n. Natronlauge in Dioxan bei 15°. Das Reaktionsgemisch wurde an einer Dowex-1-Säule (Acetat-Form) entsalzt und das freie Dipeptid IV mit 2-n. Essigsäure eluiert. Das Eluat wurde in 3 Fraktionen à 100 ml aufgefangen, die getrennt lyophilisiert wurden. Papierchromatographische Untersuchungen zeigten, dass die erste Fraktion einheitlich war, während die beiden anderen Fraktionen neben dem Hauptprodukt Spuren eines nicht näher untersuchten, Ninhydrin-positiven Nebenproduktes, vermutlich  $\alpha$ -L-Glutamyl-hypoglycin A, enthielten. Der Rückstand der ersten Fraktion kristallisiert aus Wasser-Aceton und wenig Essigsäure in feinen Nadelchen, die genau den gleichen doppelten Schmelz- bzw. Zers.-Punkt von 192–194° und 205–210° zeigen wie unser natürliches Hypoglycin B. Das synthetische  $\gamma$ -L-Glutamyl-hypoglycin A besitzt die optische Aktivität  $[\alpha]_D^{23} = +7,4^\circ (\pm 2^\circ)$  ( $c = 1,52$ ; Wasser). Für das natürliche Dipeptid fanden wir  $[\alpha]_D^{25} = +8,6^\circ (\pm 2^\circ)$  ( $c = 2,03$ ; Wasser)<sup>3)</sup>. Papierchromatographisch zeigte sich das synthetische Produkt in 3 Lösungsmittelsystemen als einheitlich und besass einzeln und im Gemisch mit natürlichem Hypoglycin B dieselben Rf-Werte. Die elektrophoretische Mobilität des synthetischen Dipeptides bei pH 5,5 und 2,6 war der des natürlichen Materials gleich.

Die Übereinstimmung der Eigenschaften des natürlichen Hypoglycins B und des synthetischen  $\gamma$ -L-Glutamyl-hypoglycins A dürfte die Identität der beiden beweisen.

#### Experimenteller Teil<sup>10)</sup>

*N-TFA-L-Glutaminsäure- $\alpha$ -äthylester (I)*. Der als Ausgangsmaterial verwendete N-TFA-L-Glutaminsäure- $\alpha$ -äthylester wurde hergestellt nach dem Verfahren von WREYDAND und Mitarbeitern<sup>4)8)</sup>; Smp. 75–76°;  $[\alpha]_D^{25} = -42,4^\circ (\pm 2^\circ)$  ( $c = 2$ ; abs. Äthanol); [Lit.: Smp. 76–77°;  $[\alpha]_D^{20} = -42,9^\circ (\pm 2^\circ)$  ( $c = 2$ ; abs. Äthanol)].

*Gewinnung von reinem Hypoglycin A (II)*. 3 g Hypoglycin B, gelöst in 40 ml 50-proz. Ameisensäure, werden im geschlossenen Rohr 10 Std. auf 110° erhitzt. Das Hydrolysat wird im Hochvakuum zur Trockene eingedampft, der Rückstand in wenig Wasser gelöst und auf eine Austauschersäule Amberlite IR-4 B (OH'-Form, 44 × 2 cm) gebracht. Hypoglycin A wird als neutrale Aminosäure mit H<sub>2</sub>O eluiert, bis die Ninhydrinreaktion des Eluates negativ ausfällt. Das Filtrat wird im Hochvakuum zur Trockene eingedampft. Der Rückstand (Hypoglycin A) wird aus H<sub>2</sub>O-Methanol umkristallisiert. Ausbeute 0,62 g (40%);  $[\alpha]_D^{26} = +9,9^\circ (\pm 2^\circ)$  ( $c = 1$ ; H<sub>2</sub>O);  $[\alpha]_D^{25} = +46,6^\circ (\pm 2^\circ)$  ( $c = 1$ ; 2-n. HCl); [Lit.<sup>11)</sup>:  $[\alpha]_D^{26} = +11^\circ (\pm 1^\circ)$  ( $c = 1$ ; H<sub>2</sub>O);  $[\alpha]_D^{26} = +49^\circ (\pm 1^\circ)$  ( $c = 1$ ; H<sub>2</sub>O bei pH 2)]. Rf 0,55 im PARTRIDGE-System<sup>12)</sup> [n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)]. Spuren von 2 mit Ninhydrin gelb reagierenden Substanzen (vgl. <sup>3)</sup>) konnten im Rohprodukt nachgewiesen werden. Sie wurden aber bei der Kristallisation aus H<sub>2</sub>O-Methanol vollständig entfernt.

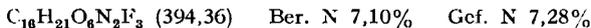
*N-TFA- $\gamma$ -L-Glutamyl-hypoglycin-A- $\alpha$ -äthylester (III)*. Zu einer auf –15° abgekühlten Lösung von 0,672 g N-TFA-L-Glutaminsäure- $\alpha$ -äthylester (2,47 mM) und 0,34 ml Triäthylamin (2,47 mM) in 12 ml frisch destilliertem, absolutem Tetrahydro-furan werden 0,325 ml Chlorameisensäure-isobutylester (2,47 mM) getropft. Das Reaktionsgemisch wird 7 Min. bei –15° gehalten und hierauf innerhalb von 45 Sek. mit einer auf 0° abgekühlten Lösung von 0,35 g reinem Hypoglycin A (2,47 mM) in 2,48 ml 1-n. NaOH versetzt. Schliesslich rührt man die Lösung noch 45 Min. bei –2 bis –5°. Das Reaktionsgemisch wird mit 12 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O verdünnt, mit 2-n. HCl auf pH ca. 2,5 angesäuert und das Tetrahydro-furan in der Kälte im Vakuum abdestilliert. Das als zähes, farbloses Öl abgeschiedene Reaktionsprodukt wird mit Äther ausgezogen, die ätherische Lösung mit H<sub>2</sub>O sechsmal gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels bleibt das Produkt als Öl zurück, welches nach Behandeln mit

<sup>10)</sup> Die Smp. sind unkorrt. Die Rf-Werte wurden in absteigenden Chromatogrammen auf WHATMAN-Papier Nr. 1 bestimmt. Elektrophoretische Analysen wurden auf WHATMAN-Papier Nr. 1 durchgeführt.

<sup>11)</sup> E. V. ELLINGTON, C. H. HASSALL, J. R. PLIMMER & C. E. SEAFORTH, J. chem. Soc. 1959, 80.

<sup>12)</sup> S. M. PARTRIDGE, Biochem. J. 42, 238 (1948).

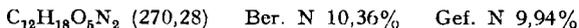
Äthanol, Benzol, Cyclohexan und Petroläther kristallisiert. Ausbeute 0,874 g (89%). Dieses Rohprodukt enthält noch geringe Mengen N-TFA-L-Glutaminsäure- $\alpha$ -äthylester, welcher wasserlöslich ist. Um das Ausgangsmaterial vollständig zu entfernen, wird das Rohprodukt nochmals in 120 ml Äther gelöst, zehnmal mit je 15–20 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird der feste Rückstand dreimal aus Äther-Petroläther umkristallisiert. Ausbeute 0,346 g (35%), Smp. 100–103°,  $[\alpha]_D^{27} = -15,6^\circ (\pm 2^\circ)$  ( $c = 1$ ; abs. Äthanol).



$\gamma$ -L-Glutamyl-hypoglycin A (IV). 0,350 g N-TFA- $\gamma$ -L-Glutamyl-hypoglycin-A- $\alpha$ -äthylester (0,88 mM) werden in 3,6 ml Dioxan gelöst und auf 12° abgekühlt. Dazu tropft man innerhalb von 10 Min. 2,67 ml 1-n. NaOH und lässt das Reaktionsgemisch 50 Min. bei 15° stehen. Darauf wird die Lösung mit Eisessig bis ca. pH 3 angesäuert und im Hochvakuum bei einer Badtemperatur von 25° zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in 10 ml H<sub>2</sub>O gelöst und auf eine Säule von Dowex-1 (Acetat-Form) (28 × 2 cm)<sup>13)</sup> gebracht. Die Salze werden mit 1200 ml H<sub>2</sub>O ausgewaschen (Durchlaufgeschwindigkeit: 130–135 ml pro Std.). Darauf wird das Dipeptid mit 2-n. Essigsäure eluiert. Nach einem Vorlauf von 105 ml erscheint das Ninhydrin-positive Produkt im Filtrat. Es wird in 3 Fraktionen à 100 ml aufgefangen.

Die Fraktionen wurden einzeln lyophilisiert und papierchromatographisch untersucht. Fraktion I: 0,105 g; Fraktion II: 0,023 g; Fraktion III: 0,007 g; Ausbeute 0,135 g (56%). Fraktion I erwies sich papierchromatographisch als einheitlich. Rf 0,58 im PARTRIDGE-System<sup>12)</sup> [n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)]. Die Fraktionen II und III zeigten im Papierchromatogramm im gleichen System neben dem Hauptprodukt (Rf 0,58) Spuren eines Ninhydrin-positiven Materials mit dem Rf 0,80 ( $\alpha$ -L-Glutamyl-hypoglycin A?).

Das lyophilisierte Produkt von Fraktion I wird dreimal vorsichtig aus Wasser-Aceton und wenig Essigsäure umkristallisiert. Unter diesen Bedingungen scheidet sich das Dipeptid wie das natürliche Hypoglycin B in Form von feinen Nadelchen ab. Das gereinigte  $\gamma$ -L-Glutamyl-hypoglycin A schmilzt bei 192–194° unter Aufschäumen; der anscheinend feste Schaum schmilzt wiederum bei 205–210° unter Zersetzung. Unser natürliches Hypoglycin B zeigt, gleichzeitig mit dem synthetischen Dipeptid erhitzt, genau denselben doppelten Smp. [Lit. Hypoglycin B: Smp. 194–195°, 200–206°<sup>2)</sup> und 189–191°<sup>14)</sup>].  $[\alpha]_D^{23} = +7,4^\circ (\pm 2^\circ)$  ( $c = 1,52$ ; Wasser); [Lit. Hypoglycin B:  $[\alpha]_D^{25} = +8,6^\circ (\pm 2^\circ)$  ( $c = 2,03$ ; Wasser)<sup>3)</sup> und  $[\alpha]_D^{22} = +9,6^\circ (\pm 2^\circ)$  ( $c = 1,12$ ; Wasser)<sup>2)</sup>].



Das synthetische  $\gamma$ -L-Glutamyl-hypoglycin A zeigt einzeln und im Gemisch mit natürlichem Hypoglycin B in den Systemen PARTRIDGE<sup>12)</sup> [n-Butanol-Eisessig-Wasser-(4:1:5)], Pyridin-Amylalkohol-Wasser-(7:6:6) und n-Butanol, gesättigt mit Wasser, je dieselben Rf-Werte, nämlich 0,58, 0,22 und 0,04. Bei der Papierelektrophorese in einem Pyridin-Essigsäure-Puffer vom pH 5,5 wandern das synthetische Dipeptid und natürliches Hypoglycin B einzeln und im Gemisch als einheitliche Flecken zur Anode, während sie sich in ca. 5-proz. Essigsäure (pH 2,6) als einheitliche Flecken zur Kathode bewegen.

Die Mikroanalysen und Drehungsbestimmungen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium (Leitung Dr. H. WAGNER) ausgeführt.

#### SUMMARY

N-TFA- $\gamma$ -L-glutamyl-hypoglycin A  $\alpha$ -ethyl ester was prepared by coupling N-TFA-L-glutamic acid  $\alpha$ -ethyl ester with hypoglycin A according to the mixed anhydride method, using isobutyl chlorocarbonate. After removal of the protecting groups the resulting  $\gamma$ -L-glutamyl-hypoglycin A was found to be identical with natural hypoglycin B.

Wissenschaftliche Laboratorien der J. R. GEIGY AG., Basel

<sup>13)</sup> Dowex-1 wurde in der üblichen Art und Weise in die Acetat-Form übergeführt und darauf mit H<sub>2</sub>O so lange gewaschen, bis das Eluat ein pH von 4,8–5,0 zeigte.

<sup>14)</sup> K. K. CHEN, R. C. ANDERSON, M. C. McCOWEN & P. N. HARRIS, J. Pharmacol. exp. Therapeutics **121**, 272 (1957).