

248. L-Asparaginsäure- β -*t*-butylester und Derivatevon **R. Schwyzer** und **H. Dietrich**

(4. X. 61)

Die synthetische Herstellung von Peptiden, welche Asparaginsäure enthalten, ist ein Problem, welches immer noch nicht ganz gelöst ist¹⁾. Besonderes Interesse beanspruchen diejenigen Methoden, welche ein Asparaginsäure-Derivat benützen, das eine freie α -Carboxylgruppe enthält, bei dem aber die β -Carboxylgruppe durch Veresterung oder durch Amidbildung «geschützt» ist. Solche Derivate erlauben die Synthese reiner α -Peptide, bei denen also nur die α -Carboxylgruppe an der Peptidbindung beteiligt ist.

β -Amid-Derivate des Asparagins erfüllen die gestellten Bedingungen einigermaßen; ihre Kondensation mit Aminosäuren oder Peptiden führt aber oft zu Nebenprodukten, wovon nur die Nitrile²⁾ und substituierten α -Aminosuccinimide^{1) 3)} erwähnt seien. Am Schlusse der Synthese lassen sich die β -Amidgruppen mit wässriger Trichloressigsäure⁴⁾ oder Salzsäure⁵⁾ ziemlich selektiv verseifen. Die Verwendung von Asparaginsäure- β -benzylestern ist dadurch beschränkt, dass die Entfernung der Estergruppe durch katalytische Hydrogenolyse in Gegenwart von Cystein (Cystin) oder von Methionin nicht durchführbar ist. Die alternative alkalische Verseifung dürfte, wie im Falle der β -Methyl- oder Äthylester, zu schwerwiegenden Nebenreaktionen führen ($\alpha \rightarrow \beta$ Transpeptidierung und Bildungen von substituierten Succinimiden)⁶⁾.

Diese Sachlage bewog uns, wie im Falle der Glutaminsäure^{7) 8)}, die *t*-Butylestergruppe^{9) 10)} zum Schutze der Carboxylgruppe in der Seitenkette zu verwenden. Diese Gruppe ist säurekatalytisch auf sehr milde Weise abspaltbar; sie widersteht der alkalischen Verseifung genügend, um die selektive Hydrolyse oder Hydrazinolyse von gleichzeitig vorhandenen *n*-Alkylestergruppen zu ermöglichen⁷⁾.

1) Für eine zusammenfassende und kritische Behandlung des Problems vgl. ELISABETH SURBECK-WEGMANN: «Synthese von Asparaginyll- und Glutaminyllpeptiden. Synthese des offenkettigen Dekapeptids von Tyrocidin A», Inauguraldissertation, Universität Zürich, 1961.

2) D. T. GISH, P. G. KATSOYANNIS, P. HESS & R. J. STEDMAN, J. Amer. chem. Soc. 78, 5954 (1956); P. G. KATSOYANNIS, D. T. GISH, P. HESS & V. DU VIGNEAUD, *ibid.* 80, 2558 (1958); CHARLOTTE RESSLER, *ibid.* 78, 5956 (1956). – Vgl. auch M. ZAORAL & J. RUDINGER, Coll. Czech. chem. Comm. 24, 1993 (1959).

3) R. SCHWYZER, E. SURBECK-WEGMANN & H. DIETRICH, *Chimia* 14, 366 (1960).

4) A. MILLER, A. NEIDLE & H. WAELSCH, Arch. Biochemistry Biophysics 56, 11 (1955).

5) R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Chimia* 11, 335 (1957).

6) A. R. BATTERSBY & J. C. ROBINSON, J. chem. Soc. 1955, 259; 1956, 2076.

7) H. KAPPELER & R. SCHWYZER, *Helv.* 44, 1136 (1961); R. SCHWYZER & H. KAPPELER, *Helv.* 44, 1991 (1961).

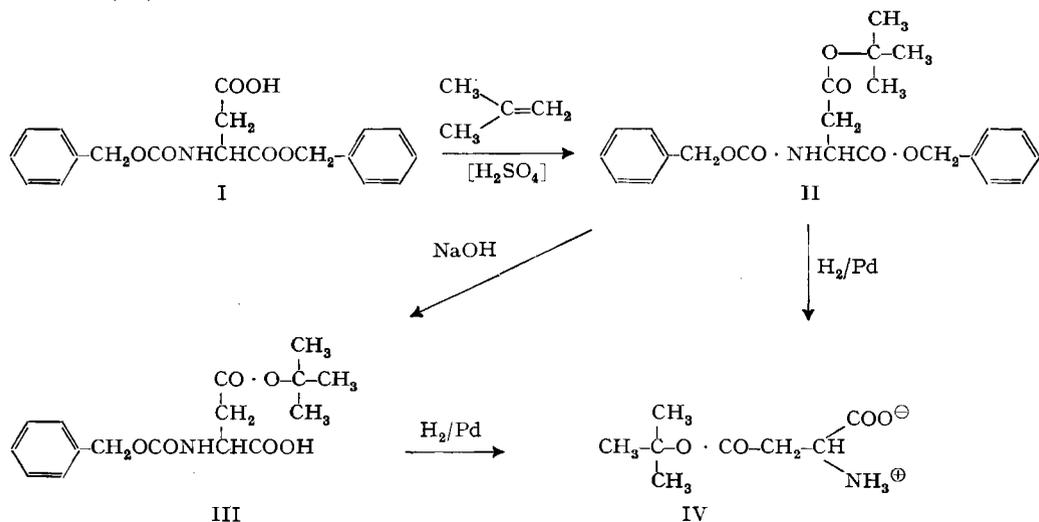
8) Wir benützten für unsere Synthesen Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- γ -*t*-butylester⁷⁾; R. W. ROESKE⁹⁾ hatte das Hydrochlorid des L-Glutaminsäure- γ -*t*-butyl- α -benzylesters dargestellt.

9) R. W. ROESKE, *Chemistry & Ind.* 1959, 1121.

10) G. W. ANDERSON & F. M. CALLAHAN, J. Amer. chem. Soc. 82, 3359 (1960); E. TASCHNER, B. LIBERCK, C. WASIELEWSKI & J. BIERNAT, *Angew. Chemie* 71, 743 (1959).

Hier wird nun die Synthese von Carbobenzoxy-L-asparaginsäure- β -*t*-butylester (III) und von L-Asparaginsäure- β -*t*-butylester (IV) beschrieben. Diese Derivate dürften für die Synthese von Peptiden mit Asparaginsäure besonders geeignet sein.

Als Ausgangsmaterial für unsere Synthesen diente Carbobenzoxy-L-asparaginsäure- α -benzylester (I)¹¹⁾, der nach YOUNG und Mitarbeitern¹²⁾ hergestellt worden war. Dieser wurde mit Isobutylen und Schwefelsäure zum kristallisierten Carbobenzoxy-L-asparaginsäure- β -*t*-butyl- α -benzylester (II) umgesetzt, dessen partielle alkalische Verseifung Carbobenzoxy-L-asparaginsäure- β -*t*-butylester (III) lieferte. Diese Verbindung konnte nicht kristallisiert werden; zur Reinigung und Aufbewahrung eignet sich ihr vorzüglich kristallisiertes Salz mit Dicyclohexylamin. Hydrogenolyse der Verbindungen (II) und (III) lieferte L-Asparaginsäure- β -*t*-butylester (IV).



Experimenteller Teil

Smp. wurden in der offenen Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert. Papierchromatogramme wurden auf WHATMAN-Papier Nr. 1, Dünnschichtchromatogramme auf einer Silikagelschicht nach STAHL¹³⁾ ausgeführt.

*Carbobenzoxy-L-asparaginsäure- α -benzyl- β -*t*-butylester (II)*: Die auf 0° abgekühlte Lösung von 4,92 g (13,76 mMol) Carbobenzoxy-L-asparaginsäure- α -benzylester in 28 ml Methylenchlorid wird mit 15 ml über Natrium getrocknetem Isobutylen und 0,14 ml 35,5 N Schwefelsäure (2,47 mMol) versetzt und 65 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Reaktionsgemisch

¹¹⁾ M. BERGMANN, L. ZERVAS & L. SALZMANN, Ber. deutsch. chem. Ges. 66, 1288 (1933), gewannen die Verbindung durch Umsatz von Carbobenzoxy-L-asparaginsäure-anhydrid mit Benzylalkohol; die Methode wurde von G. L. MILLER, O. K. BEHRENS & V. DU VIGNEAUD, J. biol. Chemistry 140, 411 (1941), modifiziert.

¹²⁾ P. M. BRYANT, R. H. MOORE, P. J. PIMLOTT & G. T. YOUNG, J. chem. Soc. 1959, 3868, setzten L-Asparaginsäure-dibenzylester [A. BERGER & E. KATCHALSKY, J. Amer. chem. Soc. 73, 4084 (1951)] mit Jodwasserstoffsäure zum reinen L-Asparaginsäure- α -benzylester um, welchen sie darauf carbobenzoxyliert haben. Die Methode soll ein besonders reines Isomeres liefern.

¹³⁾ E. STAHL, Pharmazeutische Rundschau 2, 1 (1959); Pharmazie 17, 633 (1956); vgl. M. BRENNER, A. NIEDERWIESER & G. PATAKI, Experientia 17, 145 (1961).

wird auf 0° gekühlt und vorsichtig mit 25 ml Wasser, welches 4 ml 2N Natriumcarbonat-Lösung enthält (auf 0° vorgekühlt), versetzt. Der Überschuss an Isobutylen wird i. V. entfernt. Dann wird das Ganze mit Methylenchlorid unter Kühlung extrahiert, wobei starke Emulsionen auftreten, die mit Essigester und gesättigter Natriumsulfat-Lösung behoben werden. Zum Schluss wird mit Wasser neutral gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. V. bei 40° zur Trockne eingedampft. Trocknen 2 Std. bei 40°/10⁻³ Torr. Das Öl (5,5 g; 98%) wird in Essigester aufgenommen, mit kalter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, i. V. zur Trockne verdampft und aus Essigester-Petroläther kristallisiert, Smp. 45–47,5°. Zur Analyse 4 Std. bei 35°/10⁻³ Torr getrocknet. Das Silicagel-Dünnschicht-Chromatogramm zeigt eine einheitliche Substanz, Rf-Wert: 0,85 (Methanol).

C₂₃H₂₇O₆N (413,45) Ber. C 66,81 H 6,58 N 3,39% Gef. C 67,18 H 6,77 N 3,35%

Carbobenzoxy-L-asparaginsäure-β-t-butylester-dicyclohexylamin: Die Lösung von 1,1 g (2,66 mMol) Carbobenzoxy-L-asparaginsäure-α-benzyl-β-t-butylester in 5 ml Äthanol und 1 ml Wasser wird mit 3,1 ml 1N NaOH (3 mMol) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 15 Min. Verseifung gibt man 3,4 ml 1N HCl und 10 ml Wasser zu und extrahiert mit 3mal 25 ml Äther (817 mg Öl; 95%). Das Öl wird in 20 ml Äther gelöst und mit 0,7 ml Dicyclohexylamin versetzt. Nach 4 Std. wird i. V. eingedampft. Das zurückbleibende Öl kristallisiert durch. Die Kristalle werden unter Zugabe von Äther abfiltriert (1,15 g; 86%). Zur Analyse wird aus Wasser umkristallisiert, Smp. 125–126,5°. Trocknen 4 Std. bei 50°/10⁻³ Torr. $[\alpha]_D^{25} + 5,5^\circ \pm 1^\circ$ (in 90-proz. AcOH, $c = 1,72$). Silicagel-Dünnschicht-Chromatogramm: Rf-Wert: 0,10 (Methanol); Rf-Wert: 0,12 (95-proz. EtOH; H₂O 60: 35 v/v).

C₂₈H₄₄O₆N₂ (504,64) Ber. C 66,63 H 8,79 N 5,55% Gef. C 66,59 H 8,92 N 5,46%

Carbobenzoxy-L-asparaginsäure-β-t-butylester (III): Die Lösung von 504 mg (1 mMol) Carbobenzoxy-L-asparaginsäure-β-t-butylester-dicyclohexylamin-Salz in 12 ml 50-proz. Äthanol wird mit 1 ml Dowex 50 X-5 versetzt, 30 Min. bei Zimmertemperatur geschüttelt, abfiltriert und eingedampft. Der Rückstand wird in Äther aufgenommen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. V. eingedampft (323 mg Öl; 100%).

L-Asparaginsäure-β-t-butylester (IV, aus III): 323 mg (1 mMol) Carbobenzoxy-L-asparaginsäure-β-t-butylester wurden in 16 ml Methanol gelöst und mit 32 mg Pd-Kohle (10-proz.) versetzt. Während 3 Std. wurde unter Wasserstoff gerührt, der Katalysator dann abfiltriert und das Lösungsmittel verdampft. Das zurückbleibende Öl wurde in Methanol aufgenommen und mit Äther versetzt, worauf IV gelartig ausfällt (151 mg; 80%), Smp. 189–190°. Zur Analyse wurden 18 mg auf einer Silicagel-Dünnschicht-Chromatogramm-Platte im System *n*-PrOH-H₂O (2:1) gereinigt. Die gelöste Substanz wurde an der Startlinie als 15 cm langer Strich aufgetragen. Die Lage der Substanz wurde vorher anhand eines Dünnschicht-Chromatogramms festgestellt. Die Zone, in der sich die Substanz befinden musste, wurde von der Platte entfernt und mit Methanol eluiert. Die filtrierte methanolische Lösung wurde i. V. eingedampft, das zurückbleibende Öl in Methanol aufgenommen und mit Äther versetzt. Die entstandenen Kristalle wurden abgenutscht und 2 Std. bei 80°/10⁻³ Torr getrocknet: Smp. 189–190°, papier- und dünnschichtchromatographisch rein. $[\alpha]_D^{25} = +8,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,02$ in 90% AcOH). Rf-Werte: 0,55 (System: *n*-BuOH: AcOH: H₂O 4:1:1); 0,71 (System: *n*-PrOH: H₂O 2:1). Silicagel-Dünnschicht-Chromatogramm: Rf-Werte: 0,55 (*n*-PrOH: H₂O, 2:1, v/v); 0,70 (95-proz. EtOH: H₂O, 60:35, v/v).

C₈H₁₅O₄N (189,21) Ber. C 50,78 H 7,99 N 7,40% Gef. C 50,95 H 7,92 N 7,40%

L-Asparaginsäure-β-t-butylester (IV, aus II): 414 mg (1 mMol) Carbobenzoxy-L-asparaginsäure-α-benzyl-β-t-butylester wurden in 17 ml Methanol gelöst und mit 42 mg Pd-Kohle (10-proz.) versetzt. Während 3 Std. wurde unter Wasserstoff gerührt und dann der Katalysator abfiltriert. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wurde in Methanol aufgenommen, mit Äther versetzt, wobei sich die Substanz gelartig ausschied, abgenutscht und getrocknet: Smp. 189–190°. Zur Analyse wurde auf einer Silicagel-Dünnschicht-Platte, wie oben beschrieben, gereinigt. Die Rf-Werte der Papier- und Dünnschichtchromatogramme stimmen mit denjenigen des aus III gewonnenen Produktes überein.

C₈H₁₅O₄N (189,21) Ber. N 7,40% Gef. N 7,34%

Die Mikroanalysen wurden unter der Leitung von Herrn H. FROHOFER im mikroanalytischen Laboratorium ausgeführt. Der CIBA AG. in Basel möchten wir für die Unterstützung dieser Arbeit bestens danken.

SUMMARY

The synthesis of carbobenzoxy-L-aspartic acid β -*t*-butyl ester (III) and of L-aspartic acid β -*t*-butylester (IV), new intermediates for synthetic work in the peptide field, is described.

Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich

**249. Alkaloide aus *Diplorrhynchus condylocarpon* (MUELL. ARG.)
PICHON ssp. mossambicensis (BENTH.) DUVIGN.¹⁾**

von D. Stauffacher

(4. X. 61)

Von den Eingeborenen Westafrikas wird ein Dekokt aus der Rinde von *Diplorrhynchus condylocarpon* (MUELL. ARG.) PICHON *ssp. mossambicensis* (BENTH.) DUVIGN. als Emeticum und Diureticum, sowie gegen Kopf- und Magenschmerzen verwendet. Da Vorversuche in unseren Laboratorien zeigten, dass einige Alkaloidfraktionen dieser bisher noch nicht untersuchten Apocynaceae²⁾ *in vitro* eine deutliche Cytostase an embryonalen Hühnerfibroblasten³⁾ bewirken, haben wir die basisch reagierenden Inhaltsstoffe einer eingehenden chemischen Bearbeitung unterworfen.

Für unsere Untersuchungen standen uns Wurzel- und Stammrinde von *Diplorrhynchus condylocarpon ssp. mossambicensis* zur Verfügung, die im November 1959 in Angola gesammelt worden waren. Je nach dem Standort des baumartigen Strauches, der in einigen eingeborenen Dialekten auch «Tomboza» genannt wird, enthält die Rinde zwischen 0,3–0,5% schwach basische und ca. 0,1% stark basische Alkaloide, deren Zusammensetzung stark variieren kann.

Aus dem recht kompliziert zusammengesetzten Alkaloidgemisch konnten wir bisher aus der schwach basischen Fraktion sieben Alkaloide in reiner Form isolieren. Zur Abtrennung der einzelnen Alkaloide wurde die mit Ammoniak fällbare Basenfraktion einer Gegenstromverteilung in 10 Scheidetrichtern zwischen 1N wässriger Salzsäure und Chloroform als mobiler Phase unterworfen. Dabei zeigte sich, dass in der wässrigen Phase vor allem Indolalkaloide verblieben, während sich im Chloroform Alkaloide mit dem Ringgerüst des α -Methylenindolins anreicherten.

1) Auszugsweise vorgetragen an der Winterversammlung der Schweiz. Chem. Ges. vom 11. Februar 1961 in Fribourg. Referat in *Chimia* 15, 322 (1961).

2) In der Literatur findet sich als einzige Angabe die Anmerkung, dass die Rinde von *Diplorrhynchus mossambicensis* BENTH. Alkaloide und gebundene Zucker enthalte. In den Samen wurden indessen nur Spuren von Alkaloiden festgestellt [E. ABISCH & T. REICHSTEIN, *Helv.* 43, 1844 (1960)].

3) Die pharmakologischen Prüfungen wurden in unseren pharmakologischen Laboratorien (Leitung Dr. A. CERLETTI) ausgeführt.