

108. Über die Synthese der *Pilocarpus*-Alkaloide Isopilosin und Pilocarpin, sowie die absolute Konfiguration des (+)-Isopilosins

von H. Link und Karl Bernauer

Chemische Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel

(21. 1. 72)

Summary. A novel synthesis for *rac*-pilosinine (**6** *rac*) and transformation of (+)-pilosinine (**6**) into the *pilocarpus* alkaloids (+)-isopilosine (**9**) and (+)-pilocarpine (**18**) are described. By correlation *via* **6** with **18** the absolute configuration of (+)-isopilosine (**9**) is established.

Von den fünf aus *Pilocarpus*-Arten isolierten Imidazol-Alkaloiden¹⁾, die teils der *cis*-Reihe, teils der thermodynamisch stabileren *trans*- (= iso-)²⁾-Reihe angehören, ist das Hauptalkaloid Pilocarpin seiner ausgeprägten physiologischen Wirkung halber am meisten bearbeitet worden. Seine absolute Konfiguration ist bekannt [3]. Es wurde auch mehrfach synthetisiert [4] [5] [6]; zwecks pharmakologischer Prüfung hat man Strukturvarianten hergestellt [5] [6] [7] [8] [9]. Eine Synthese des Isopilosins (**9**) ist noch nicht bekannt. Lediglich das Retraldol-Produkt Pilosinin ist von einer russischen und einer indischen Gruppe auf verschiedenen Wegen als Racemat (**6** *rac*)³⁾ synthetisiert worden. Die Ausbeuten sind – soweit bekannt – nicht gut [6] [8] [10]. Man hat hierbei durchwegs zuerst den Butyrolacton-Ring und dann erst den Imidazol-Ring aufgebaut. Bei unserer nachfolgend beschriebenen Synthese gewinnen wir das Pilosinin (**6** *rac*) auf dem umgekehrten Wege. Aus (+)-Pilosinin (**6**) lassen sich nach gleichem Prinzip sowohl (+)-Isopilosin (**9**) wie (+)-Pilocarpin (**18**) darstellen, wodurch beide Alkaloide sterisch korreliert werden können. Die relative Konfiguration des Isopilosins hat Oberhänsli [11] geklärt, wobei vor allem die räumliche Anordnung der benzyliischen Hydroxylgruppe interessierte.

Unsere fünfstufige Synthese des *rac*-Pilosinins (**6** *rac*) geht von dem nach [12] leicht zugänglichen 1-Methylimidazol-5-carbonsäure-methylester (**1**) aus. – Die Vorstufe N-Formyl-N-methyl-glycinmethylester gewinnen wir allerdings aus Sarcosin durch Veresterung mit Methanol/Thionylchlorid und anschließende Formylierung des Esters mit Ameisensäure/Natriumformiat/Essigsäureanhydrid. – Der Ester **1** wird mit Diisobutylaluminiumhydrid in Heptan/Benzol oder mit *in situ* erzeugtem Lithiumborhydrid in Tetrahydrofuran zu dem Carbinol **2** reduziert (90 bzw. 76%). Durch

¹⁾ Zusammenfassungen: [1].

²⁾ Bezüglich der «Iso-Nomenklatur» halten wir uns an die Vorschläge von Voigtländer & Rosenberg [2].

³⁾ Im Schema sind für chirale Verbindungen die absoluten Konfigurationen angegeben. Sie werden mit arabischen Ziffern (**6** usw.) bezeichnet. Die entsprechenden Racemate werden im Schema nicht besonders aufgeführt; im Text erhalten ihre Ziffern den Zusatz «*rac*» (z. B. **6** *rac* für *rac*-Pilosinin).

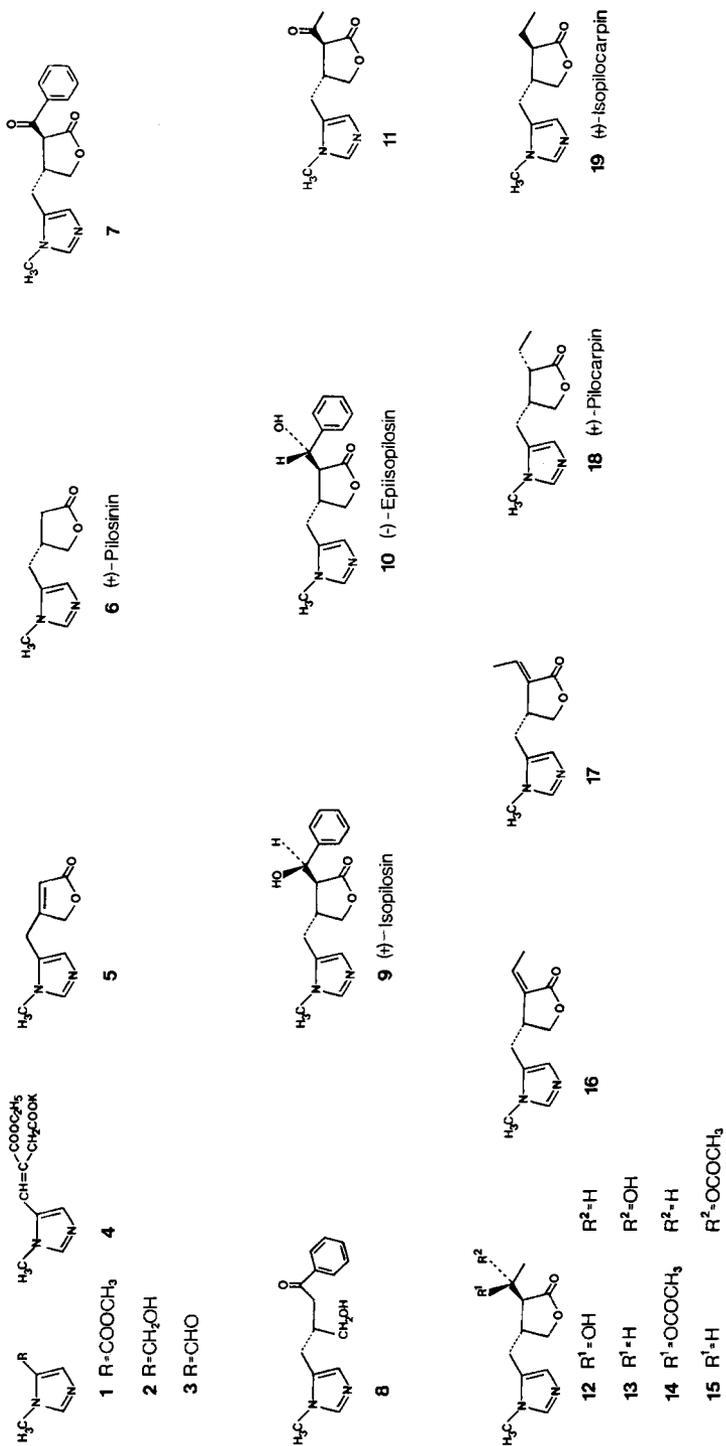
Dehydrieren mit aktivem Mangandioxid entsteht daraus der Aldehyd **3** (90%)⁴⁾. *Stobbe*-Kondensation von **3** mit Bernsteinsäure-diäthylester, wobei Kalium-*t*-butylat als Base dient, liefert das Kaliumsalz **4**, welches sogleich in Dimethoxyäthan-Lösung mit Lithiumborhydrid reduziert wird. Durch Salzsäurezusatz zerstört man nach 53stdg. Rückflusskochen den Überschuss an Hydrid und lactonisiert zugleich die entstandenen Hydroxysäuren. Kontinuierliche Extraktion aus wässriger Lösung bei pH 5–6 und Chromatographie an Kieselgel zur Entfernung der Borsäure liefert dann ein Öl, das gemäss MS.- und IR.-Daten ein Gemisch von *rac*-Pilosinin (**6 rac**) und Dehydropilosinin (**5**) ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben **5** auch noch die isomere Verbindung mit exocyclischer Doppelbindung vorliegt. Beim Hydrieren dieses Gemisches mit Platinkatalysator in Äthanol resultiert *rac*-Pilosinin (**6 rac**) (53%), das aus Essigsäure-äthylester als Base (Smp. 69,5–70,5°) kristallisiert (NMR.-Daten s. Tab.). Die Trennung des *rac*-Pilosinins (**6 rac**) in seine Antipoden ist in der Literatur nicht beschrieben und bereitet wegen der Zersetzlichkeit der Verbindung grosse Schwierigkeiten. Nach zahlreichen Versuchen gelang es, über ein Salz mit (–)-Di-O, O'-*p*-toluoyl-L-weinsäure (+)-Pilosinin (**6**) [Smp. 79–79,5°; $[\alpha]_D^{20} = +13,4^\circ \pm 2$ (Äthanol)] zu gewinnen. Die Ausbeute beträgt aber nur 2%. Da uns natürliches (+)-Isopilosin (**9**) in grösseren Mengen zur Verfügung stand, haben wir für die folgenden Stufen (+)-Pilosinin (**6**) aus diesem durch Retraldolspaltung dargestellt (66%, Durchschnitt von fünf Versuchen).

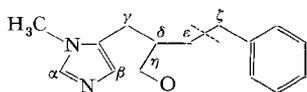
(+)-Pilosinin (**6**) bzw. *rac*-Pilosinin (**6 rac**) lassen sich mit Benzoesäure-methylester in Gegenwart von K-*t*-Butylat in *t*-Butanol zu (+)-2-Benzoyl-3-[(1-methylimidazol-5-yl)-methyl]-4-butanolid (**7**) [Smp. 148–150°; $[\alpha]_D^{20} = +53,0^\circ \pm 3^\circ$ (Äthanol)] (63%) bzw. zu der entsprechenden racemischen Verbindung **7 rac.**, Smp. 119–121°, (Ausbeute an Kristallinat 45%, Gesamtausbeute 69%) kondensieren. Es ist mit Sicherheit anzunehmen, dass in den Ketonen **7** und **7 rac** wie in der thermodynamisch stabileren Isoreihe der *Pilocarpus*-Alkaloide die Substituenten am Butanolidring *trans*-ständig sind. Die spektroskopischen Daten der Verbindungen **7** und **7 rac** sind mit der angegebenen Struktur in Einklang, die durch die unten beschriebene Überführung von **7** in (+)-Isopilosin (**9**) bewiesen wird. Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten sind für **7** in der Tabelle zusammengestellt. Die zwei Doppeldublette der Protonen an C(η) und das Dublett des Protons an C(ϵ) sind klar getrennt (je 1H). Die Protonen an C(γ) liefern ein dublettartiges Signal mit breiter Basis (2H). Das komplizierte Signal des Protons an C(δ) fällt teilweise mit dem N-Methyl-Signal zusammen.

Keton **7** kann bei 25° mit verd. Salzsäure in sein Hydrochlorid, Smp. 191–192° (Zers.), übergeführt werden, aus welchem sich die Base wieder freisetzen lässt. Erhitzt man aber eine salzsaure Lösung von **7** auf dem Dampfbad, dann entsteht (–)-3-(Hydroxymethyl)-4-(1-methylimidazol-5-yl)-butyrophenon (**8**), Smp. 117–118° (74%). Aus dem *rac*-Ketolacton **7 rac** erhält man das *rac*-Butyrophenon **8 rac**, Smp. 94–95° (81%). Es ist anzunehmen, dass die Ketolactone **7** und **7 rac** mit den entsprechenden Hydroxy-ketosäuren im Gleichgewicht stehen, und dass letztere decarboxyliert werden. – Das IR.-Spektrum von **8 rac** (CHCl₃) zeigt die Arylketonbande bei 1684 cm⁻¹

4) Das in der Literatur [13] beschriebene Verfahren zur Umwandlung von **1** in **3** ist weniger ergebnisreich und nach unserer Erfahrung für grosse Ansätze nicht geeignet.

Schema 3)





NMR.-Daten der Verbindungen **6 rac**, **7**, **8 rac**, **9** und **10**
 (δ -Werte in ppm; bei Multipletten ist die Mitte des Musters
 angegeben; J in Hz)

Protonen an	<i>rac</i> -Pilosinin (6 rac) (CDCl ₃ , 60 MHz)	(+)-Keto- lacton 7 (CDCl ₃ , 100 MHz)	<i>rac</i> -Hydroxy- keton 8 rac (CDCl ₃ , 100 MHz)	(+)-Isopilo- sin (9) (SO(CD ₃) ₂ , 100 MHz)	(-)-Epiisopilo- sin (10) (SO(CD ₃) ₂ , 100 MHz)
C(α)	7,42 \sim s	7,34 \sim s	7,32 \sim s	7,48 \sim s	\sim 7,3
C(β)	6,78 \sim s	6,73 \sim s	6,71 \sim s	6,68 \sim s	6,49 d; $J \leq 1$
C(γ)	\sim 1,9–3,2	2,78 \sim d	2,3–2,8	2,45–2,95	1,8–2,9
C(δ)		\sim 3,40 m			
C(ϵ)		4,37 d $J_{\delta\epsilon} = 6,7$	2,97 dd; $J_{\delta\epsilon} = 6,5$ 3,25 dd; $J_{\delta\epsilon'} = 5,5$ $J_{gem} = 17$		
C(ζ)	–	–	–	4,97 m nach D ₂ O- Zusatz: d; $J = 3,5$	5,28 dd $J = 4,5$; $J = 2$ nach D ₂ O- Zusatz: d; $J = 2$
C(η)	4,03 \sim dd; $J_{\delta\eta} \sim 4,5$ 4,45 dd; $J_{\delta\eta'} \sim 6$ $J_{gem} = 9,5$	4,11 dd; $J_{\delta\eta'} = 6$ 4,56 dd; $J_{\delta\eta} = 7,2$ $J_{gem} = 9$	\sim 3,62 m	3,81 dd; $J_{\delta\eta} = 5,5$ 4,04 dd; $J_{\delta\eta'} = 6,5$ $J_{gem} = 9$	3,85 dd; $J_{\delta\eta} = 5$ 4,29 dd; $J_{\delta\eta'} = 7$ $J_{gem} = 9$
Phenyl	–	\sim 7,35–7,60 und 7,83–7,95	\sim 7,3–7,65 und 7,85–8,0	7,15–7,40	7,15–7,40
N–CH ₃	3,58 s	3,52 s	3,58 s	3,48 s	3,08 s
OH	–	–	an C(η) 4,3	an C(ζ) 5,80	an C(ζ) 6,01 d; $J = 4,5$

und eine breite Hydroxylbande bei 3210 cm⁻¹. Im NMR.-Spektrum (100 MHz, CDCl₃, s. Tab.) ist ein Multiplett bei ca. 3,62 ppm (2H) den Protonen an C(η) zuzuordnen. Die Protonen an C(ϵ) liefern, wie zu erwarten, zwei Doppeldublette. Infolge teilweiser Überlappung mit den Multipletten der Protonen an C(δ) und C(γ), die sich über den Bereich von 2,3 bis 2,8 ppm erstrecken, ist das Integral nicht auswertbar. Das Signal der OH-Gruppe erscheint bei 4,3 ppm.

Bei der Hydrierung des (+)-Ketolactons **7** über Platin in Äthanol entstehen zu etwa gleichen Teilen (+)-Isopilosin (**9**) und (–)-Epiisopilosin (**10**). Durch Überführen des Hydrierungsproduktes ins Oxalat, fraktionierte Kristallisation dieses Salzes und anschliessendes Freisetzen der Base kann (+)-Isopilosin (**9**) in 19proz. Ausbeute er-

halten werden. Die Verbindung ist in allen physikalischen Daten identisch mit dem Naturprodukt, dessen im Schema angegebene absolute Konfiguration weiter unten abgeleitet wird. Aus den Oxalat-Mutterlaugen wird das Basengemisch freigesetzt. Durch fraktionierte Kristallisation aus Acetonitril lässt sich (–)-Epiisopilosin (**10**) (Smp. 179–180°, $[\alpha]_D^{20} = -44^\circ \pm 3^\circ$ (Äthanol)] isolieren (25%).

Zur Überführung in (+)-Pilocarpin (**18**) bzw. (+)-Isopilocarpin (**19**) wird (+)-Pilosinin (**6**) mit Essigsäure-äthylester und Kalium-*t*-butylat in *t*-Butanol zu (+)-3-Acetyl-4-[(1-methylimidazol-5-yl)-methyl]-2-tetrahydrofuranon (**11**) (Rohausbeute 72,5%) umgesetzt. Die Reinsubstanz [Smp. 114–114,5°; $[\alpha]_D^{20} = +14^\circ \pm 2^\circ$ (Äthanol)] wird in 49% Ausbeute erhalten. Auch in dieser Verbindung kann für die Substituenten am Tetrahydrofuranonring *trans*-Anordnung angenommen werden⁵). Für die Hydrierung mit Platinkatalysator in Methanol, die ein Gemisch der epimeren Alkohole **12** und **13** (Hydrochlorid, Smp. 203–204°) liefert, kann das rohe **11** verwendet werden (Ausbeute ~100%). Das Epimerengemisch **12** + **13** geht beim Erwärmen mit Acetanhydrid in Eisessig auf 70° in ein Gemisch der Acetate **14** und **15** über. Erhöht man die Reaktionstemperatur auf 130°, so entstehen durch Pyrolyse der Acetate die Olefine **16** und **17** (73%). Beim Stehen im Eisschrank kristallisiert eines der Olefine aus. Da das NMR.-Signal von dessen olefinischem Proton bei sehr tiefem Feld erscheint (~6,88 ppm), muss es sich um die *seqtrans*-Verbindung **17** handeln (entschirmender Effekt der Lacton-CO-Gruppe). Zur Überführung in (+)-Pilocarpin (**18**) hydriert man das Olefingemisch **16** + **17** mit Platinkatalysator in Methanol bei 20° und 50 Atm. Aus dem Produkt isoliert man (+)-Pilocarpin als Nitrat, Smp. 166–166,5° (Zers.) (22,7%). Die aus diesem Präparat in Freiheit gesetzte Base besteht nach gas-chromatographischer Analyse zu $93,2 \pm 1\%$ aus (+)-Pilocarpin (**18**) und zu $6,8 \pm 1\%$ aus (+)-Isopilocarpin (**19**).

Mit der Synthese von (+)-Pilocarpin (**18**) und (+)-Isopilocarpin (**19**) aus (+)-Pilosinin (**6**), dem Retradolprodukt von (+)-Isopilosin (**9**), ist bewiesen, dass (+)-Isopilosin – und damit auch (+)-Pilosin – an C-3 des Butyrolactonrings die gleiche absolute Konfiguration wie (+)-Pilocarpin (**18**) und (+)-Isopilocarpin (**19**) besitzt. Damit sind die im Schema für die Verbindungen **6** bis **17** angegebenen absoluten Konfigurationen sichergestellt.

Die Verfasser danken den Herren *O. List* und *D. Schenckenberg* für die Ausführung der Versuche, *Frl. Dr. M. Grosjean* und den Herren *Dres. L. Chopard*, *W. Arnold*, *G. Englert* und *W. Vetter* für die Aufnahme und Interpretation der IR-, NMR.- und Massenspektren, *Herrn Dr. A. Dirscherl* für die Mikroanalysen und *Herrn Dr. M. Vecchi* für die gas-chromatographischen Analysen, *Herrn Dr. W. Hofheinz* für seine Hilfe bei Planung und Vorversuchen zur vorliegenden Arbeit.

Experimenteller Teil

Analysensubstanzen wurden im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet. Die Smp. wurden mit dem Smp.-Apparat nach *Tottoli* bestimmt und sind korrigiert. Dünnschichtchromatogramme (DC.) auf Platten aus Kieselgel F_{254} (*Merck*). NMR.-Spektren: alle 60 MHz.

1. *1-Methyl-5-imidazol-carbonsäuremethylester* (**1**). Bei einer Temperatur unter -5° werden nacheinander 237 ml (3,3 Mol) Thionylchlorid und 267 g (3,0 Mol) Sarcosin in 900 ml Methanol eingerührt. Das Gemisch wird dann langsam auf 40° erwärmt, 2 Std. bei dieser Temperatur gerührt

⁵) In $CDCl_3$ -Lösung liegt **11** praktisch vollständig als Ketolacton vor (NMR.-Spektrum siehe exp. Teil).

(alles löst sich), dann i. V. bei 50 bis 60° eingedampft und das verbleibende Salz, Sarcosinmethyl-ester-hydrochlorid, ohne weitere Reinigung in 4 Stufen nach Jones [12] in 195,6 g (46%) der Verbindung **1**, Sdp. 115–117°/8 Torr, Smp. 60–61°⁶⁾, übergeführt.

2. *1-Methyl-5-hydroxymethyl-imidazol* (**2**). – a) In eine Lösung von 84 g (0,6 Mol) **1** in 1,2 l abs. Benzol werden unter Argon 940 ml (1,44 Mol) einer 21,7proz. Lösung von Diisobutylaluminiumhydrid in Heptan während 1 Std. eingeführt. Nach 3stdg. Rühren bei 50–60° werden bei ca. 10° vorsichtig nacheinander Methanol und Wasser zugetropft, bis die heftige Gasentwicklung beendet ist. Es wird vom ausgefallenen Aluminiumhydroxid filtriert und der Filtrerrückstand mit siedendem Methanol ausgewaschen. Filtrat und Waschlösung werden i. V. eingedampft, und der Rückstand 2mal mit abs. Äthanol versetzt und eingedampft. Er wird aus Aceton kristallisiert: 60,5 g (90%) **2**, Smp. 113–114°.

b) Ein Gemisch von 7,6 g (141 mMol) Kaliumborhydrid und 9,1 g (215 mMol) Lithiumchlorid in 100 ml abs. Tetrahydrofuran wird ca. 20 Std. unter Stickstoff gerührt. Eine Lösung von 10,0 g (71 mMol) **1** in 50 ml abs. Tetrahydrofuran wird zugetropft und das Gemisch 3 Std. gekocht. Anschließend werden 75 ml Tetrahydrofuran abdestilliert und 35 ml Methanol zugegeben. Nach halbstündigem Kochen tropft man bei 0° 50 ml HCl (1:1) zu, kocht wiederum eine halbe Stunde, engt das saure Gemisch i. V. ein und nimmt den Rückstand in wenig Wasser auf. Ungelöste anorganische Salze werden abgesaugt und mit etwas Wasser gewaschen. Filtrat und Waschlösung werden vereinigt, mit Soda auf pH 8 gebracht und nach Abtrennen der ausgefallenen Salze 24 Std. mit Chloroform im Perforator extrahiert. Nach Trocknen und Eindampfen des Extraktes verbleiben 7,3 g (91%) Kristalle, Smp. 105–107°; aus Aceton 6,2 g (76%) Verbindung **2**, Smp. 113–114°.

3. *1-Methylimidazol-5-carboxaldehyd* (**3**). 65,3 g (0,58 Mol) **2** werden in 650 ml Chloroform angeschlëmmt, portionsweise mit 340 g aktivem Mangandioxid (*Merck*) versetzt und unter Rühren gekocht. Das aus dem Kühler rückfliessende Chloroform wird in einem *Soxhlet*-Aufsatz mit Natriumsulfat getrocknet. Die Reaktion wird mit DC. verfolgt [System: Chloroform/Methanol 87:13 (g/g); Rf von **2** 0,5; Rf von **3** 0,7. Entwicklung mit Joddampf]; sie ist nach 24 Std. beendet. Nach Filtration der Suspension durch Speedex und Eindampfen der Lösung verbleiben 58 g (90%) weisse Kristalle von **3**, Smp. 54–56°.

4. *rac-Pilosinin* (**6 rac**). In eine siedende Lösung von 26 g (0,66 Mol) Kalium in 900 ml abs. *t*-Butanol wird unter Argon eine warme Lösung von 66 g (0,60 Mol) **3** in 120 ml (0,72 Mol) Bernsteinsäure-diäthylester während 15 Min. getropft. Nach 4stdg. Kochen unter Rühren – im DC. (Ausführung siehe unter **3**) ist kein **3** mehr zu erkennen – wird das Gemisch i. V. unter Feuchtigkeitsausschluss eingedampft und der Rückstand i. H. V. während 2 Std. bei 50° getrocknet. Das hygroskopische Salz **4** wird in gleichen Kolben in 1,5 l abs. 1,2-Dimethoxyäthan suspendiert, portionsweise mit 44 g (2,0 Mol) Lithiumborhydrid versetzt und die Suspension unter Rühren 53 Std. unter Argon gekocht. Der Überschuss an Lithiumborhydrid wird hierauf bei 0° durch tropfenweise Zugabe von 500 ml Salzsäure (1:1) zersetzt und die Lösung i. V. eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Wasser aufgenommen. Ungelöste Salze inklusiv Borsäure werden abgetrennt. Die Lösung wird mit 60 g Na₂CO₃·10 H₂O versetzt und mit Wasser auf 500 ml gebracht (pH 5,5). Die Lösung wird nun kontinuierlich mit Methylenechlorid extrahiert und der pH-Wert durch Zusätze von Na₂CO₃·10 H₂O zwischen 5 und 6 gehalten⁷⁾. Total werden 36,2 g gebraucht. Auf diese Weise erhält man 61,6 g öligen Rohextrakt. Die wässrige Lösung wird mit 37,5 ml konz. Salzsäure angesäuert (pH 0), mit 62,5 g Na₂CO₃·10 H₂O versetzt (pH 5,5) und wieder mit Methylenechlorid extrahiert: 5,0 g Rohextrakt. Die beiden Rohextrakte (66,6 g) werden zur Entfernung der Borsäure an 125 g Kieselgel (0,2–0,5 mm, *Merck*) chromatographiert. Das Produkt wird mit Methylenechlorid/Methanol 19:1 (*v/v*) eluiert und das Eluat eingedampft: 57,1 g (53%) gereinigtes Produkt (**5**+**6 rac**) [M.S.: Molekularpiks bei 178 und 180 *m/e*. IR.-Spektrum (Film): Lactoncarbonyl-Banden bei 1748 und 1775 cm⁻¹]. Dieses wird sogleich über 5,7 g Platinoxid und 5,7 g Aktivkohle (Norit Supra) in 500 ml Äthanol hydriert. Mit weiteren 5,7 g Platinoxid wird nachhydriert. Das Ende der Hydrierung lässt sich mit DC. feststellen. Mit dem System Chloroform/Methanol 87:13 (g/g) laufen die nicht-hydrierte Verbindung **5** und Pilosinin (**6 rac**) gleich

⁶⁾ Smp. nach [12] 56–57°.

⁷⁾ Das pH wird mit einem pH-Meter (E 350 B, *Metrohm*) gemessen. Der Perforator ist mit einem seitlichen Ansatz versehen, durch welchen die Glaselektrode so eingeführt wird, dass sie gerade in die Flüssigkeit eintaucht.

(Rf = 0,6). **5** ist unter UV.-Bestrahlung (254 nm) sichtbar, **6 rac** aber nicht⁸⁾. Nach Abtrennen des Katalysators und Eindampfen der Lösung erhält man 57,5 g (53%) **6 rac** als gelbes Öl, das beim Stehen kristallisiert.

Eine kleine Probe wird aus Essigester umkristallisiert und 16 Std. bei 20° getrocknet, Smp. 69,5–70,5°. IR.-Spektrum (KBr): Lactoncarbonylbande bei 1778 cm⁻¹. MS.: Molekularpik bei *m/e* 180.

C₉H₁₂N₂O₂ (180,21) Ber. C 59,98 H 6,71 N 15,55% Gef. C 59,78 H 6,55 N 15,27%

5. (+)-*Pilosinin* (**6**) aus *rac-Pilosinin* (**6 rac**). Nach zahlreichen Vorversuchen⁹⁾ konnte **6** wie folgt aus **6 rac** erhalten werden: Heisse Lösungen von 48 g (266 mMol) **6 rac** und 51 g (133 mMol) (-)-Di-O, O'-*p*-toluoyl-L-weinsäure in je 1,5 l Äthanol wurden vereinigt. Das über Nacht ausgefallene Salz wurde abgenutscht, mit Äthanol, dann mit Äthanol/Äther 1:1 und zuletzt mit Äther gewaschen. Aus dem Salz (75 g) setzte man mit einer Lösung von 37,9 g Na₂CO₃ · 10 H₂O in 250 ml Wasser die Base frei (nach Extraktion mit CH₂Cl₂ 18 g gelbes Öl). Man wiederholte nun die Ausfällung des Salzes und Freisetzung der Base viermal in analoger Weise. Die am Ende freigesetzte Base liess sich aus Essigester kristallisieren (Ausbeute 0,5 g; 2%) und hatte folgende Charakteristika: Smp. 79–79,5°, [α]_D = +13,4° ± 2° (*c* = 3,51, Äthanol); sie ist mit dem aus *Isopilosin* (**9**) durch Abbau gewonnenen (+)-*Pilosinin* identisch.

6. (+)-2-Benzoyl-3-[(1-methylimidazol-5-yl)-methyl]-4-butanolid (**7**). Eine Lösung von 23,5 g (0,6 Mol) Kalium in 800 ml abs. *t*-Butanol wird mit 36 g (0,2 Mol) **6** und 50 ml (0,4 Mol) Benzoesäure-methylester in 200 ml abs. *t*-Butanol versetzt und unter N₂ 16 Std. unter Rückfluss gehalten. *t*-Butanol wird bei Normaldruck abdestilliert, und das verbleibende braune Öl in Eis/konz. Salzsäure (90 ml) eingeführt. Der Kolben wird mit Eis/konz. Salzsäure (15 ml) ausgespült, die vereinigte saure wässrige Lösung mit Methylchlorid gewaschen, bei 0–10° mit gesättigter Sodaauslösung auf pH 8 gebracht und mit Methylchlorid extrahiert. Nach Trocknen und Eindampfen der Extrakte verbleiben 51,4 g festes beiges Produkt. Aus Acetonitril kristallisieren 36 g (63%) **7** (Trocknung 16 Std. bei 70°), Smp. 148–150°; [α]_D²⁰ = +53,0° ± 3° (*c* = 1,44, Äthanol). IR.-Spektrum (KBr): Lactoncarbonylbande bei 1761 cm⁻¹, Ketocarbonylbande bei 1670 cm⁻¹. MS.: Starke Pike bei *m/e* 284 (M⁺), 179, 121, 105, 95, 77.

C₁₆H₁₆N₂O₃ (284,30) Ber. C 67,59 H 5,67 N 9,85% Gef. C 67,27 H 5,76 N 9,92%

7. (+)-2-Benzoyl-3-[(1-methylimidazol-5-yl)-methyl]-4-butanolid-hydrochlorid (**7-Hydrochlorid**). 5,0 g (17,6 mMol) **7** werden in 17,6 ml 1N HCl gelöst. Die Lösung wird bei 30° i. V. eingedampft, der Rückstand in Äthanol gelöst und die Lösung wieder eingedampft. Das Produkt wird wieder in Äthanol aufgenommen, die Lösung mit Kohle behandelt und bis zur Trübung mit Äther versetzt. Im Eisbad bilden sich 4,9 g (87%) farblose Kristalle von **7-Hydrochlorid**, Smp. 190–191°. Eine Probe wird zur Analyse aus Äthanol/Äther umkristallisiert und 15 Std. bei 60° getrocknet; Smp. 191–192°. [α]_D = +47° ± 3° (*c* = 1,058, Äthanol).

C₁₆H₁₆N₂O₃ · HCl Ber. C 59,91 H 5,34 N 8,73 Cl 11,05%
(320,78) Gef. „ 59,86 „ 5,33 „ 8,59 „ 11,36%

8. *rac*-2-Benzoyl-3-[(1-methylimidazol-5-yl)-methyl]-4-butanolid (**7 rac**). In eine siedende Lösung von 13,0 g (0,333 Mol) Kalium in 440 ml abs. *t*-Butanol wird eine Lösung von 20,0 g (0,111 Mol) **6 rac** und 27,7 ml (0,222 Mol) Benzoesäure-methylester in 110 ml abs. *t*-Butanol gegeben. Die Lösung wird 17 Std. unter Stickstoff gekocht. *t*-Butanol wird bei Normaldruck abdestilliert und das verbleibende Öl in eine Mischung von 830 g Eis und 61 ml konz. Salzsäure unter Eiskühlung einlaufen gelassen. Die saure wässrige Lösung wird mit Methylchlorid gewaschen, bei 0–10° mit fester Soda alkalisch (pH 8) gestellt und mit Methylchlorid extrahiert. Nach Trocknen und Eindampfen der Extrakte verbleiben 22,7 g festes braungelbes Produkt. Es wird an 200 g Kieselgel (0,2–0,5 mm, *Merck*) chromatographiert und mit Methylchlorid/Methanol 9:1 (*v/v*) eluiert: 21,6 g (69%) **7 rac**. Das Produkt

⁸⁾ Aus der H₂-Aufnahme lassen sich keine sicheren Schlüsse ziehen, da das Mengenverhältnis **5**:**6 rac** des eingesetzten Produktes nicht bekannt ist.

⁹⁾ Man setzte ohne Erfolg folgende optisch aktiven Säuren ein: (+)-Camphersäure, L-Ascorbinsäure, D-Chinasäure, N-Benzoyl-L-glutaminsäure, D-Mandelsäure, *p*-Nitrobenzoyl-L-glutaminsäure, D-Weinsäure. – Die Umkristallisation des Salzes mit (-)-Di-O, O'-*p*-toluoyl-L-weinsäure brachte keine nennenswerte Anreicherung eines Antipodens der Base, weshalb das beschriebene Verfahren der wiederholten Basenfreisetzung und Salzbildung verwendet wurde.

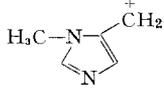
wird aus Aceton kristallisiert (Trocknung 3 Std. bei 20°): 14,0 g (45%) **7 rac**, Smp. 119–121°. IR.-Spektrum (KBr): Lactoncarbonylbande bei 1764 cm⁻¹, Ketocarbonylbande bei 1674 cm⁻¹. MS.: starke Pike bei *m/e* 284 (M⁺), 179, 121, 105, 95, 77.

C₁₆H₁₆N₂O₃ (284,30) Ber. C 67,59 H 5,67 N 9,85% Gef. C 67,50 H 5,59 N 9,79%

9. (–)-3-(Hydroxymethyl)-4-(1-methylimidazol-5-yl)-butyrophenon (**8**). Eine Lösung von 1,01 g (3,55 mMol) **7** in 50 ml 2N HCl wird 30 Min. auf dem Dampfbad erhitzt, dann unter Eiskühlung mit gesättigter Sodalösung alkalisch (pH 8) gestellt, mit NaCl gesättigt und wiederholt mit Methylenchlorid extrahiert. Die Extrakte werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Es verbleiben 0,91 g farblose Kristalle, die aus Aceton umgelöst werden. Man erhält nach dem Trocknen (16 Std. bei 60°) 0,67 g (74%) **8**, Smp. 117–118°. [α]_D²⁰ = –27,5° ± 2° (c = 1,075, Äthanol). IR.-Spektrum (KBr): Ketocarbonylbande bei 1679 cm⁻¹, O–H-Bande bei 3190 cm⁻¹. MS.: starke Pike bei *m/e* 258 (M⁺), 145, 139, 138, 96, 95, 82.

C₁₅H₁₈N₂O₂ (258,31) Ber. C 69,74 H 7,02 N 10,85% Gef. C 70,01 H 7,05 N 10,80%

10. rac-3-(Hydroxymethyl)-4-(1-methylimidazol-5-yl)-butyrophenon (**8 rac**). Eine Lösung von 20,0 g (70 mMol) **7 rac** in 120 ml 2N HCl wird 30 Min. auf dem Dampfbad erhitzt, anschließend mit gesättigter Sodalösung alkalisch (pH 8) gestellt, mit NaCl gesättigt und mit Methylenchlorid extrahiert. Nach Trocknen und Eindampfen der Extrakte verbleiben 19,5 g Öl. Das Öl wird in heissem Aceton gelöst. Beim Abkühlen kristallisieren 14,7 g (81%) **8 rac**, Trocknung 3 Std. bei 20°, Smp. 94–95°. IR.-Spektrum (KBr): OH-Bande bei 3190 cm⁻¹, Ketocarbonylbande bei 1680 cm⁻¹. MS.: *m/e* 258 (3,3%, C₁₅H₁₈N₂O₂, M), 240 (1,3%, C₁₅H₁₆N₂O, M – H₂O), 227 (2,1%, C₁₄H₁₅N₂O, M – CH₂OH), 145 (14%, C₁₀H₉O), 139 (49%, C₇H₁₁N₂O), 138 (78%, C₇H₁₀N₂O), 110 (17%,

C₆H₁₀N₂), 109 (36%, C₆H₉N₂), 105 (32%, C₆H₅–C⁺–O), 95 (100%, C₅H₇N₂, ) , 82 (50%), 77 (38%).

C₁₅H₁₈N₂O₂ (258,31) Ber. C 69,74 H 7,02 N 10,84% Gef. C 69,67 H 6,93 N 10,75%

11. (+)-Isopilosin (**9**) und (–)-Epiisopilosin (**10**). 8,5 g (29,9 mMol) **7** werden in 1000 ml Äthanol gelöst und über Platin hydriert. Vom Katalysator wird abfiltriert und eingedampft. Man erhält 8,6 g kristallines Gemisch von **9** und **10**. NMR.-Spektrum [(CD₃)₂SO]: Singulett bei 3,50 ppm (3 H an N-Methyl von **9**) und Singulett bei 3,13 ppm (3 H an N-Methyl von **10**) mit gleichem Integral. **9** und **10** liegen also im Verhältnis 1:1 vor. – Eine Lösung von 4,0 g (14 mMol) Reduktionsprodukt in 30 ml abs. Methanol wird mit einer Lösung von 1,4 g (15,5 mMol) Oxalsäure in 10 ml abs. Methanol vereinigt. Die Lösung wird mit Kohle (Norit Supra) behandelt und filtriert. Nach Zugabe von 10 ml abs. Äther bilden sich in der Kälte 2,7 g weisse Kristalle, Smp. 80–93°. Nach 4maligem Umkristallisieren aus Methanol werden 1,3 g (25%) **9**-Oxalat, Smp. 82–99°, erhalten.

Eine Lösung von 0,8 g (21,3 mMol) **9**-Oxalat in 5 ml Wasser wird mit Sodalösung alkalisch (pH 8) gestellt und mit Methylenchlorid extrahiert. Nach Trocknen und Eindampfen der Extrakte verbleiben 0,6 g weisses kristallines Produkt, das aus Acetonitril 0,45 g (18,5%) **9** vom Smp. 181–184°, [α]_D²⁰ = +31° ± 3° (c = 0,154, Äthanol) liefert. IR.-Spektrum (KBr): OH-Bande bei 3112 cm⁻¹, Lactoncarbonylbande bei 1761 cm⁻¹. MS.: starke Pike bei *m/e* 268, 180, 106, 105, 95, 77. Die vereinigten Oxalat-Mutterlaugen werden eingedampft. Der ölige Rückstand wird in wenig Wasser gelöst, die Lösung mit Sodalösung alkalisch (pH 8) gestellt und mit Methylenchlorid extrahiert. Nach Trocknen und Eindampfen der Extrakte verbleiben 2,5 g weisse kristalline Substanz. Nach 4maligem Umkristallisieren aus Acetonitril erhält man 1,0 g (25%) **10** (Trocknung 3 Std. bei 60°), Smp. 179–180°. [α]_D²⁰ = –44,3° ± 3° (c = 0,149, Äthanol). IR.-Spektrum (KBr): OH-Bande bei 3124 cm⁻¹, Lactoncarbonylbande bei 1755 cm⁻¹. MS.: starke Pike bei *m/e* 268, 180, 106, 105, 95, 77.

C₁₆H₁₈N₂O₃ (286,32) Ber. C 67,12 H 6,34 N 9,78% Gef. C 67,39 H 6,25 N 10,04%

12. (+)-3-Acetyl-4-[(1-methylimidazol-5-yl)-methyl]-2-tetrahydrofuranon (**11**). 36,7 g (0,94 Mol) Kalium werden unter Stickstoff in 1100 ml abs. *t*-Butanol gelöst. Man lässt eine Lösung von 56,6 g (0,31 Mol) **6** und 55,4 g (0,63 Mol) Essigester in 310 ml abs. *t*-Butanol in die obige Lösung einlaufen, kocht 16 Std., destilliert das Lösungsmittel bei Normaldruck ab und gibt das verbleibende Öl zu einer Mischung von 250 g Eis und 174 ml konz. Salzsäure. Die saure braune Lösung wird 3mal mit je 160 ml Methylenchlorid gewaschen, auf 0° abgekühlt und mit Na₂CO₃·10 H₂O auf pH 7 gestellt.

Hierauf wird sie 20mal mit je 160 ml Methylenchlorid extrahiert. Nach Trocknen und Eindampfen der vereinigten Extrakte erhält man 50,3 g (72,5%) braunes Öl. Aus Methyläthylketon kristallisieren 34,1 g (49%) **11**, Smp. 111–112,5°. Eine Probe wird aus Aceton umkristallisiert und 5 Std. bei 50° getrocknet: Smp. 114,0–114,5°. $[\alpha]_D^{20} = +14^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,132$, Äthanol). UV.-Spektrum (Äthanol): Maximum bei 254 nm ($\log \epsilon = 3,32$), Minimum bei 240 nm ($\log \epsilon = 3,25$). IR.-Spektrum (CHCl_3): Lactoncarbonylbande bei 1781 cm^{-1} , Ketoncarbonylbande bei 1723 cm^{-1} . MS.: starke Pike bei m/e 222 (M^+), 179, 138, 121, 95, 43. NMR.-Spektrum (CDCl_3): Signale bei 7,42 ppm und 6,77 ppm (je ein $H_{\text{arom.}}$), Singulett bei 3,61 ppm (NCH_3), Singulette bei 2,35 ppm (COCH_3) und 1,82 ppm ($\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3$; ca. 5% Enol).

$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ (222,24) Ber. C 59,45 H 6,35 N 12,60% Gef. C 59,30 H 6,32 N 12,46%

13. *trans-3-(1- ξ -Hydroxyäthyl)-4-[(1-methylimidazol-5-yl)-methyl]-2-tetrahydrofuranon (12 + 13)*. 10,0 g (45 mMol) **11** werden in 300 ml abs. Methanol gelöst und bei Raumtemperatur unter 50 at über 2 g Platinoxid/Aktivkohle 1:1 hydriert. Nach ca. 17 Std. wird der Katalysator über Speedex abfiltriert und die Lösung eingedampft. Es verbleiben 10,5 g ($\sim 100\%$) öliges Gemisch der beiden Epimeren **12** und **13**.

14. *trans-3-(1- ξ -Hydroxyäthyl)-4-[(1-methylimidazol-5-yl)-methyl]-2-tetrahydrofuranon-hydrochlorid (12-Hydrochlorid und 13-Hydrochlorid)*. 5,0 g (22,3 mMol) **12 + 13** werden in Äthanol gelöst und mit äthanolischer Chlorwasserstofflösung sauer gestellt. Beim Zutropfen von Äther beginnt das Hydrochlorid auszufallen. Nach Beendigung der Kristallisation im Eisschrank wird das Salz abgenutscht, mit Äther gewaschen und aus Äthanol umkristallisiert: Nach dem Trocknen (7 Std. bei 50°) 5,5 g (95%) **12-Hydrochlorid** und **13-Hydrochlorid**, Smp. 203–204°. IR.-Spektrum (KBr): OH-Bande bei 3260 cm^{-1} , Lactoncarbonylbande bei 1760 cm^{-1} . NMR.-Spektrum $\text{SO}(\text{CD}_3)_2$: Dublette bei 1,21 ppm ($J \sim 6$ Hz) und 1,15 ppm ($J \sim 6$ Hz) (CH_3).

$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{HCl}$ Ber. C 50,68 H 6,57 N 10,74 Cl 13,60%
(260,72) Gef.¹⁰⁾ „ 50,36 „ 6,55 „ 10,60 „ 13,72%

15. *trans-3-(1- ξ -Acetoxyäthyl)-4-[(1-methylimidazol-5-yl)-methyl]-2-tetrahydrofuranon (14 + 15)*. Eine Lösung von 1,65 g (7,37 mMol) **12 + 13** in 5 ml Eisessig und 5 ml Essigsäureanhydrid wird 1½ Std. bei 70° gehalten. Die Lösung wird i. H. V. eingedampft und der Rückstand in wenig gesättigter Kochsalzlösung aufgenommen. Die Lösung wird mit fester Soda neutralisiert und mit Methylenchlorid extrahiert. Nach Trocknen und Eindampfen der Extrakte verbleiben 1,68 g (86%) **14 + 15** als gelbes Öl. Nach NMR.-Daten liegt ein Gemisch der beiden Acetate im Verhältnis 1:1 vor. NMR.-Spektrum (CDCl_3): Singulett bei 2,05 ppm bzw. 2,08 ppm ($\text{O}-\text{CH}_3$) und Dublett bei 1,35 ppm bzw. 1,43 ppm ($\text{C}-\text{CH}_3$).

16. *seqcis- und seqtrans-3-Äthyliden-4-[(1-methylimidazol-5-yl)-methyl]-2-tetrahydrofuranon (16 + 17)*. Eine Lösung von 5,5 g (24,6 mMol) **12 + 13** in 20 ml Eisessig und 20 ml Essigsäureanhydrid wird unter Argon 42 Std. bei 130° gehalten. Die Lösung wird i. H. V. eingedampft, unter Eiskühlung mit gesättigter Sodalösung neutralisiert (pH 7,5) und mit Chloroform extrahiert. Nach Trocknen und Eindampfen der Extrakte verbleiben 3,7 g (73%) **16 + 17**. Nach den NMR.-Daten besteht das braune Öl aus ca. 75% *seqtrans*-(**17**) und 25% *seqcis*-Olefin (**16**); NMR.-Spektrum (CDCl_3): Doppeldublette bei 1,73 ppm ($J \sim 7$ und 1 Hz) und bei 2,18 ppm ($J \sim 7$ und 2 Hz) ($\text{C}-\text{CH}_3$); Integralverhältnis 3:1. 3,2 g (15,5 mMol) **16 + 17** lässt man im Eisschrank während ca. 2 Wochen kristallisieren. Der kristalline Brei wird in 20 ml Essigester/Petroläther (Sdp. 40–45°) 3:7 angeschlemmt und abgenutscht. Es wird nach dem Trocknen (15 Std. bei 20°) 1,0 g (23%) **17**, Smp. 88–89°, isoliert. IR.-Spektrum (KBr): Lactoncarbonylbande bei 1752 cm^{-1} , Olefinbande bei 1670 cm^{-1} . MS.: Molekularpik bei m/e 206. NMR.-Spektrum (CDCl_3): Signale bei 7,45 ppm und 6,38 ppm (2 aromatische Protonen), «Oktett» bei 6,88 ppm ($J \sim 2$ und 7,5 Hz) (olefinisches Proton), Singulett bei 3,59 ppm ($\text{N}-\text{CH}_3$), Doppeldublett bei 1,73 ppm ($J \sim 1$ und 7,5 Hz) ($\text{C}-\text{CH}_3$).

$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ (206,24) Ber. C 64,06 H 6,48 N 13,58% Gef. C 64,03 H 6,76 N 13,38%

17. *Pilocarpin (18) und Isopilocarpin (19)*. 614 mg (2,98 mMol) **16 + 17** werden über 60 mg Platinoxid in 20 ml Methanol unter 50 Atm. bei Raumtemperatur hydriert. Nach 20 Std. wird der Katalysator entfernt und die Lösung eingedampft. 600 mg (2,88 mMol) des verbleibenden Öls

¹⁰⁾ Analysesubstanz enthielt Kristallwasser. Analysenwerte auf wasserfreie Substanz umgerechnet.

[ursprünglich 610 mg (98%)] werden in 2 ml Äthanol gelöst und unter Eiskühlung mit 0,22 ml 65proz. Salpetersäure in 1 ml Äthanol versetzt. Das Nitrat kristallisiert sogleich aus. Nach 2 Std. Stehen im Eisschrank werden die Kristalle abgenutscht und getrocknet: 286 mg (36,6%) Nitrat, Smp. 152–155°; nach weiterem 2maligem Kristallisieren aus Äthanol 180 mg (22,7%), Smp. 166–166,5° (Zers.) [nach der 2. Kristallisation, Smp. 165–166° (Zers.)]. Gemäss der optischen Drehung ($[\alpha]_D = +76,8^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 1,022$, Wasser)) besteht das Salz aus 91% **18**-Nitrat und 9% **19**-Nitrat¹¹⁾. Die Substanz unterscheidet sich im NMR.-Spektrum nicht von reinem Pilocarpin-nitrat. Zur gas-chromatographischen Untersuchung¹²⁾ wird aus einer Probe die Base freigesetzt. Die Analyse ergibt $93,2 \pm 1\%$ **18** und $6,8 \pm 1\%$ **19**.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *A. R. Battersby & H. T. Openshaw*, in *R. H. F. Manske & H. I. Holmes*, «The Alkaloids», Vol. III, 201; New York 1953; *R. C. Elderfield*, «Heterocyclic Compounds», Vol. 5, 235; New York 1957; *H.-G. Boit*, «Ergebnisse der Alkaloid-Chemie bis 1960», Berlin 1961.
- [2] *H. W. Voigtländer & W. Rosenberg*, Arch. Pharm. 292, 579 (1959).
- [3] *R. K. Hill & S. Bawca*, Tetrahedron 22, 2889 (1966).
- [4] *N. A. Preobrashenski, A. N. Poljakowa & W. A. Preobrashenski*, Izv. Akad. Nauk SSSR 1936, 983 [Chem. Zbl. 1937 II, 998]; *A. N. Dey*, J. chem. Soc. 1937, 1057.
- [5] *A. G. Natradze & E. E. Mikhlina*, J. gen. Chemistry USSR 17, 1718 (1947) [Chem. Abstr. 42, 2967 (1948)].
- [6] *N. A. Preobrashenski, M. E. Maurit & G. V. Smirnova*, Doklady Akad. Nauk SSSR, 81, 613 (1951) [Chem. Abstr. 47, 4345 (1953)].
- [7] *G. V. Chelintsev & V. A. Fish*, J. gen. Chem. USSR, 11, 459 (1941) [Chem. Abstr. 35, 6591 (1941)]; *R. Burtles, F. L. Pyman & J. Roylance*, J. chem. Soc. 127, 581 (1925).
- [8] *J. K. Mehrota & A. N. Dey*, J. Indian chem. Soc. 38, 971 (1961).
- [9] *F. L. Pyman*, J. chem. Soc. 101, 530 (1912).
- [10] *A. M. Poljakowa, W. A. Preobrashenski & N. A. Preobrashenski*, J. gen. Chemistry USSR, 9, 1402 (1939) [Chem. Zbl. 1940 I, 869]; *N. A. Dryamova, S. I. Zav'yalov & N. A. Preobrashenski*, *ibid.* 18, 1733 (1948) [Chem. Abstr. 43, 2625 (1949)].
- [11] *W. Oberhänsli*, private Mitteilung.
- [12] *R. G. Jones*, J. Amer. chem. Soc. 71, 644 (1949).
- [13] *R. G. Jones & K. C. McLaughlin*, J. Amer. chem. Soc. 71, 2444 (1949).

¹¹⁾ Pilocarpinnitrat [aus reinem Pilocarpinhydrochlorid (*Siegsfried*) hergestellt]: Smp. 173,5–174,0° (Zers.); $[\alpha]_D = +81,0^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 1,618$, Wasser). Isopilocarpinnitrat (*Koch-Light*): Smp. 158–160°; $[\alpha]_D = +34,3^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 1,804$, Wasser).

¹²⁾ GC. mit *Perkin-Elmer* 900-Gerät ausgeführt (3% OV 17, Gas-Chrom. Q, 80/100 mesh, Länge 3 m, Durchmesser 2,2 mm).

109. Antigen Synthesis: The Preparation of Selected Dodecapeptide Carriers with Systematically Altered Structures by a Two-Phase Method

by **C. H. Schneider** and **W. Wirz**

Institute for Clinical Immunology, Inselspital, 3008 Bern

(28. 2. 72)

Summary. The synthesis of a series of dodecapeptide ethyl esters containing L-leucine, L-alanine, glycine and L-lysine is described. These peptides are suitable carriers for the preparation of haptenic conjugates to be used in antigenicity studies. The strategy for preparing intermediary hexapeptides has been called a two-phase approach since the elongation of the peptide chain is