

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. Escher & R. Schwyzer, FEBS Letters 46, 347 (1974); E. Escher, Dissertation Nr. 5363, ETH-Z (1974).
- [2] H. R. Bosshard & A. Berger, Biochemistry 13, 266 (1974); H. R. Bosshard, FEBS Letters 38, 139 (1974).
- [3] R. Schwyzer & M. Caviezel, Helv. 54, 1395 (1971); T. Wieland, A. V. Dungen & C. Birr, Liebigs Ann. Chem. 752, 109 (1971).
- [4] T. A. Steitz, R. E. Henderson & D. M. Blow, J. mol. Biol. 46, 337 (1969).
- [5] E. Escher, R. Jost, H. Zuber & R. Schwyzer, Israel J. Chemistry 12, 129 (1974).
- [6] F. Bergel & J. A. Stock, J. chem. Soc. 1959, 90.
- [7] F. Fahrenholz & G. Schimmack, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 356, 469 (1975).

## 158. Herstellung von DL-N-Benzoyloxycarbonyl- $\gamma$ -carboxy-glutaminsäure- $\gamma, \gamma'$ -di-*t*-butyl- $\alpha$ -methyl-ester, einem für die Peptidsynthese geeigneten Derivat der neuen Aminotricarbonsäure aus Prothrombin

von Walter Märki und Robert Schwyzer<sup>1)</sup>

Institut für Molekularbiologie und Biophysik,  
Eidgenössische Technische Hochschule, CH-8049 Zürich  
(6. VI. 75)

*Summary.* The first synthesis of a selectively, fully protected derivative of the new aminotricarboxylic acid found in prothrombin and other homologous blood-clotting factors,  $\gamma$ -carboxy-glutamic acid (Gla), is described. The compound DL-N-benzoyloxycarbonyl- $\gamma$ -carboxy-glutamic acid  $\gamma, \gamma'$ -di-*t*-butyl- $\alpha$ -methyl-ester is potentially useful for peptide synthesis. The free amino-acid (DL-Gla) and DL-pyro- $\gamma$ -carboxy-glutamic acid dimethyl-ester were also prepared.

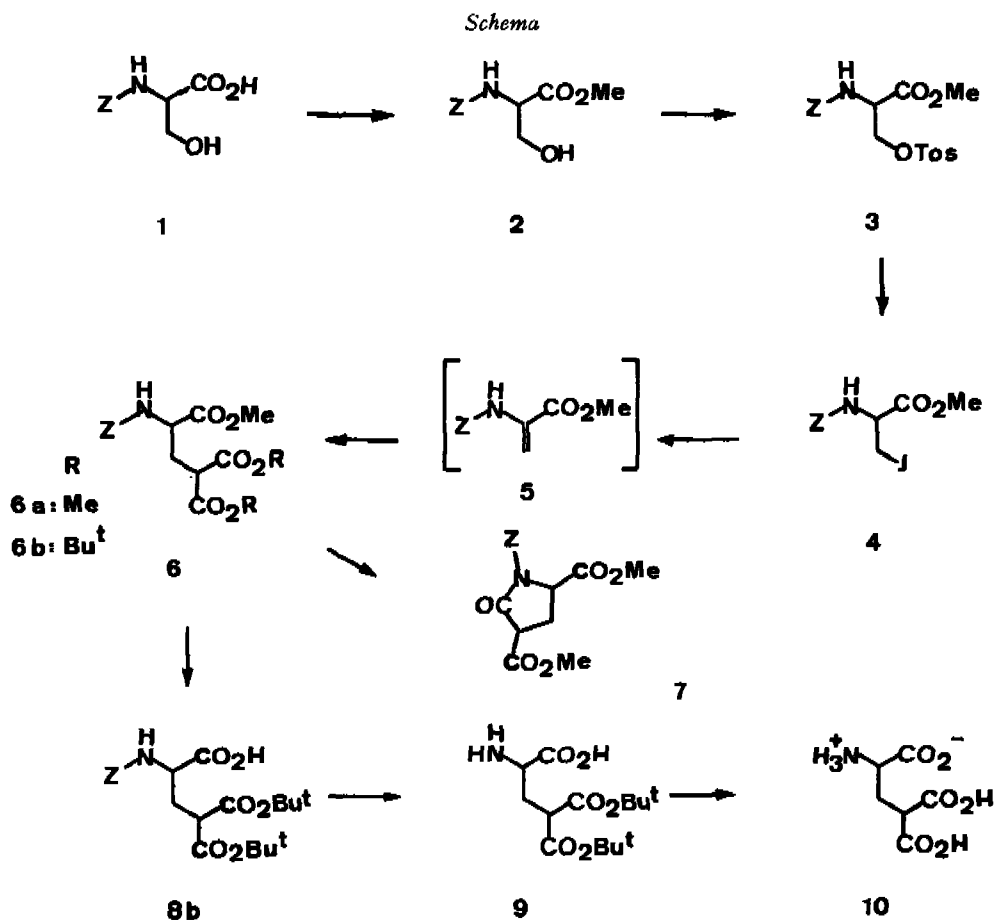
Kürzlich wurde die Struktur einer neuen Aminosäure im N-terminalen Teil des (Vitamin K)-abhängigen Blutgerinnungsfaktors Prothrombin vorgeschlagen [1] [2] und durch Synthese bestätigt [3]. Sie wurde im N-terminalen Polypeptid (1–42) den Stellungen 7 und 8 [1] [2], sowie 15, 17, 20, 21, 26, 27, 30 und 33 [1] zugeordnet. Diese ungewöhnliche  $\gamma$ -Carboxy-glutaminsäure (Gla) findet man auch in der 'light chain' von Bovine Factor X<sub>1</sub> (Stuart Factor) [4]. Factor II (Prothrombin) und Factor X besitzen homologe Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstellen [4] [5], mit Bindungskonstanten von log  $K_{ass} = 3,5$  für 6 Bindungsstellen im Prothrombin-Aktivierungsfragment ( $M_r = 23000$ ) [7]. Ein Modell für die Koordination eines Calcium-Ions mit den Carboxylgruppen von zwei  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäureresten als Calciumbindungsstelle wird in [4] vorgeschlagen. Durch Einbau von mit <sup>14</sup>C radioaktiv markiertem CO<sub>2</sub> in Prothrombin *in vivo* konnte biosynthetisch gezeigt werden, dass im (Vitamin K)-abhängigen Schritt Glutaminsäurereste carboxyliert werden [6]. Nach enzymatischem Abbau des Proteins wurde die Radioaktivität in einer einzelnen, sauren Aminosäure (Gla) gefunden, welche durch die übliche saure Totalhydrolyse zu Glutaminsäure decarboxyliert wurde [1] [2].

<sup>1)</sup> Diese Arbeit ist ein Teil der Dissertation von W. Märki. Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für die gewährte Unterstützung. Nomenklatur und Abkürzungen entsprechen den in der Peptid- und Proteinchemie üblichen Normen, vgl. E. Wünsch: «Synthese von Peptiden», Bd. 15 von «Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie», E. Müller, Herausgeber, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.

Wir beschreiben erstmals die Herstellung eines für die Peptidsynthese geeigneten Derivates der  $\gamma$ -Carboxy-glutaminsäure, des DL-N-Benzyloxycarbonyl- $\gamma$ -carboxy-glutaminsäure- $\gamma\gamma'$ -di-*t*-butyl- $\alpha$ -methyl-esters (**6**) (s. *Schema*). Die Methylestergruppe lässt sich leicht verseifen, so dass die  $\alpha$ -Carboxylgruppe für Peptid-Kondensationen selektiv frei wird (Hydrazinolyse und Azidkupplung nach *Curtius* dürften ebenfalls möglich sein). Ferner lässt sich die Benzyloxycarbonylgruppe durch katalytische Hydrierung selektiv entfernen; die freie  $\alpha$ -Aminogruppe (z. B. in **9**) kann für die Herstellung von Peptidbindungen oder von andern N-geschützten Derivaten des  $\gamma$ -Carboxy-glutaminsäure- $\gamma\gamma'$ -di-*t*-butylesters (**9**) (oder aber seines  $\alpha$ -methylesters) herangezogen werden.

Andererseits sind die *t*-Butylester-Gruppen sauer spaltbar, stabil bei der katalytischen Hydrierung und weitgehend unempfindlich gegen alkalische Hydrolyse oder Hydrazinolyse; **6** erscheint deshalb als geeignetes Ausgangsmaterial sowohl für die Racematspaltung als auch für die Peptidsynthese.

Unser Syntheseweg ist im *Schema* dargestellt. N-Benzyloxycarbonyl-serin (**1**) wurde mit Diazomethan quantitativ zum Methylester **2** umgesetzt. Dessen O-Toluolsulfonyl-Derivat **3** wurde durch Umsatz von **2** mit Toluolsulfochlorid in Pyridin



erhalten. Kaliumjodid in Aceton führte **3** in **4** (N-Benzoyloxycarbonyl- $\beta$ -jod-alanin-methylester) über [10] [11]. Tosyl- und Jodidreste von **4** begünstigen als gute Abgangsgruppen die  $\beta$ -Eliminierung [10]; deshalb entstehen bei der Kondensation von **4** mit den Carbanionen des Malonsäure-dimethylesters oder -di-*t*-butylesters rac.-**6a**, bzw. rac.- **6b**. Als Zwischenprodukt der Reaktion **4**  $\rightarrow$  **6** wurde N-Benzoyloxycarbonyl-dehydro-alanin-methylester isoliert. Das Carbanion der geschützten Malonsäure wurde nach einer abgeänderten Vorschrift von *Ducep* [12] in 1,2-Dimethoxyäthan mit *n*-Butyllithium erzeugt. Da tertiäre Amine durch Komplexbildung die kovalente Kohlenstoff-Lithium-Bindung schwächen und damit die Basizität der organometallischen Verbindung erhöhen, wurde dem Reaktionsgemisch 1 Äquivalent Tetramethyl-äthylendiamin (TMEDA) beigegeben. Die NMR.-Spektren von **6b** und N-Benzoyloxycarbonyl-glutaminsäure- $\gamma$ -*t*-butyl- $\alpha$ -methyl-ester (**11**) sind praktisch identisch – mit Ausnahme des Triplets bei 3,3 ppm, welches einem Proton ( $\gamma$ -H) entspricht, und dem Integral bei ca. 1,5 ppm, welches im Verhältnis von 2:1 oder 18:9 Protonen mit dem einfachen Glutaminsäurederivat **11** steht (Fig. 1 und 2).



Fig. 1. Vergleich der 60 MHz Protonenresonanzspektren in Deuteriochloroform von **6b** und **11**

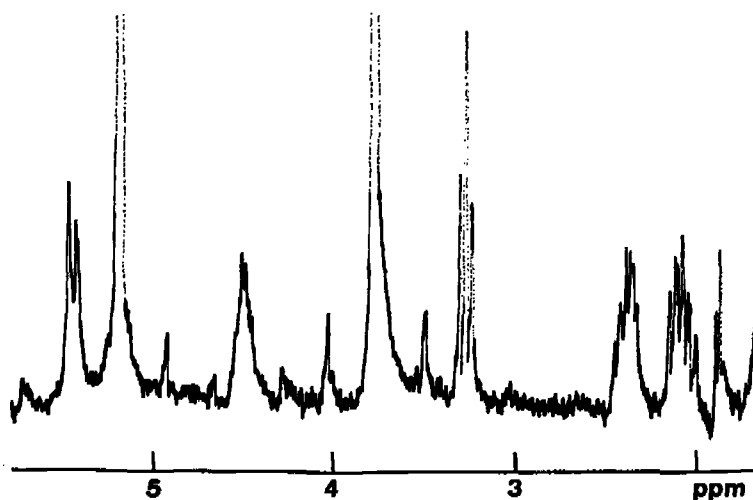


Fig. 2. 220 MHz Protonenresonanzspektrum in Deuteriochloroform von **6b** im Bereich 2–6 ppm

Die Modellverbindung **6a** wurde während der Aufarbeitung im stark alkalischen Milieu durch leichte Erwärmung lactamisiert, worauf der neue *pyro-γ*-Carboxyglutaminsäure-dimethylester (**7**) isoliert werden konnte (Fig. 3). Vermutlich wegen sterischer Hinderung konnte die entsprechende Reaktion bei **6b** nicht beobachtet werden.

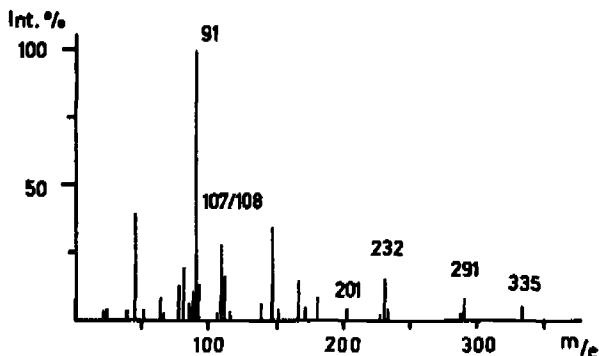


Fig. 3. Massenspektrum von *N*-Benzoyloxycarbonyl-pyru- $\gamma$ -carboxyglutaminsäure-dimethylester (**7**)

Milde alkalische Verseifung der Modellverbindung **6a** in 0,1N äthanolischer Kalilauge bei 0° führte zu einem Produkt mit Rf 0,24 (CME), welches in Übereinstimmung mit analogen Beobachtungen von *Berger & Bosshard* [13] während der Aufarbeitung decarboxyliert wurde. Das neu entstandene Produkt ist dünnschichtchromatographisch identisch mit *N*-Benzoyloxycarbonyl-glutaminsäure.

Durch milde alkalische Verseifung von **6b** mit 0,5N äthanolischer Kalilauge entstand **8b**; katalytische Hydrierung in Gegenwart von 10proz. Pd/C lieferte **9**; Acidolyse von **9** mit 90proz. Trifluoressigsäure bzw. 0,1N Salzsäure in Ameisensäure ergab die freie DL- $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure (**10**). Die elektrophoretische Mobilität von **10** bezüglich Asparagin beträgt 1,38 bei pH 6,4.

### Experimenteller Teil

*Allgemeines.* Physikalische Daten wurden wie folgt bestimmt: *Smp.* (unkorrigiert) auf einem Apparat FP1 der Firma *Mettler & Co.* Die Messung erfolgte in im Hochvakuum (HV.) abgeschlossenen Glaskapillaren. *Optische Drehungen* auf einem *Perkin-Elmer* Polarimeter 141. *UV.-Spektren* ( $\lambda_{\text{max}}$ ,  $\epsilon$ ): *Beckman Acta V* Spektrophotometer. *IR.-Spektren* ( $\text{cm}^{-1}$ ): *Beckman IR-33*, Lösungsmittel: Chloroform; Absorptionsmaxima in  $\text{cm}^{-1}$ . *NMR.-Spektren*: *Varian T-60* (60 MHz), bzw. *Varian HR 220* Spektrometer bei 220 MHz mit Tetramethylsilan als internem Standard. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm, die Kopplungskonstanten *J* in Hertz ausgedrückt. Lösungsmittel: Deuteriochloroform. *Massenspektren*: *Hitachi-Perkin-Elmer RMU 6D*. Es werden nur die wichtigsten Pike angegeben, vgl. Fig. 3. *Reagentien* und *Lösungsmittel* stammten von der *Fluka AG*, Buchs. *Dünnschichtchromatographie* (DC.) und *Elektrophorese*: Chromatogramme auf Kieselgel (DC.-Fertigplatten 60 F<sub>254</sub> von *Merck*, Darmstadt). *Zusammensetzung der Fließmittel* (Volumenteile): CM 1: Chloroform/Methanol 19:1; HE 1: Hexan/Essigester 8:2; HE 2: Hexan/Essigester 5:4; CME: Chloroform/Methanol/Eisessig 95:5:3; BEW 1: 2-Butanol/Essigsäure/Wasser 100:15:35; BPEW 1: 1-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser 50:12:12:25.

Die Platten wurden mit Jod, HBr/Eisessig und Ninhydrin-Reagens angefärbt. Elektrophorese auf Cellulose F Fertigplatten (*Merck*, Darmstadt) in einer Apparatur der Firma *Camag* (Muttenz) bei einem Potential von 40 V/cm während 40 Min. bei pH 6,4; Elektrolyt: AcOH/Pyridin/Wasser 4:100:900. Die Mobilität wird relativ zu Asp (1,0) ausgedrückt. *Säulenchromatographie* mit MN-Kieselgel 70–325 mesh (*Macherey-Nagel & Co.* Düren). *Analysenpräparate* wurden bei Raumtemperatur (RT.) und 0,001 Torr 5–15 Std. getrocknet. Flüssige Reagentien und Lö-

sungsmittel wurden meist mittels einer Spritze durch eine Scrumkappe zugegeben oder über ein geeignetes Trocknungsmittel direkt ins Reaktionsgefäß destilliert. Diazomethanherstellung: siehe *De Boer & Bacher* [8].

Unter normaler Aufarbeitung versteht man folgendes: Extraktion des auf Wasser oder Eis gegessenen Reaktionsgemisches mit Essigester oder dem angegebenen Lösungsmittel; falls nötig Trennung in saure, basische, neutrale Anteile. Waschen der organischen Phase mit ges. NaCl-Lösung und Wasser, trocknen mit wasserfreiem Magnesiumsulfat und eindampfen im Rotationsverdampfer (RV.) unter Vakuum ohne 40° zu überschreiten. Alle Ausbeuten werden in Molprozenten des Edukts angegeben.

*Z · Ser · OMe* (2). 633 mg (2,64 mmol) N-Benzylloxycarbonyl-serin (1) wurden in 10 ml Methanol/Wasser 9:1 gelöst und auf 10° abgekühlt. Zu dieser Lösung wurde azeotrop Diazomethan in Äther destilliert, bis eine schwache gelbe Färbung bestehen blieb. Das überschüssige Diazomethan wurde mit Stickstoff entfernt, die Lösung mehrmals mit Benzol eingedampft und 5 Std. im HV. getrocknet: 668 mg (100%) **2**, viskos, Rf 0,30 (CME) 0,44 (CM 1), vgl. *Hassall & Thomas* [9]. – NMR.: 7,4 (s, 5 H); 5,9–5,7 (br. d, 1 H); 5,1 (s, 2 H); 4,6, 4,3 (m, 1 H); 3,95 (d, J = 4, 2 H); 3,85 (s, 3 H). – IR.: 3420 m, 1740 (Schulter), 1720 s, 1500 m. Es wurden 10,38 g **2** hergestellt.

*Z · Ser(Tos) · OMe* (3). Eine Lösung von 5,8 g (22,9 mmol) N-Benzylloxycarbonyl-serinmethylester (2) in 12 g trockenem Pyridin wurden auf 5° gekühlt und während 30 Min. portionenweise mit 5,37 g (28,1 mmol) Toluolsulfochlorid versetzt. Die tieforange gefärbte Lösung wurde über Nacht im Kühlraum bei 4° gerührt. Ein amorpher Niederschlag (3) wurde abfiltriert, die Mutterlauge mit 50 ml Methanol verdünnt, zur Trockene eingedampft und der Rückstand aus heissem Isopropylalkohol umkristallisiert. 5,63 g farblose Nadeln von **3** (60%), Smp. 117°–118°,  $[\alpha]_D^{25} = -10,27^\circ$  (c = 1,1, Dimethylformamid), Rf 0,78 (CME), 0,72 (CM1). – UV. (Methanol): 263 (1219), 224 (15590), vgl. *Photaki* [10]. – NMR.- und IR.-Spektren entsprechen der Erwartung.

$C_{19}H_{21}NO_7S$  (407,43) Ber. C 56,00 H 5,20 N 3,44% Gef. C 55,68 H 5,25 N 3,59%

*Z · Ala(J) · OMe* (4). Eine Lösung von 2,6 g (6,38 mmol) N-Benzylloxycarbonyl-O-tosyl-serinmethylester (4) in 30 ml trockenem Aceton wurde nach Zugabe von 3,2 g (19,16 mmol) Kaliumjodid unter Lichtausschluss 100 Std. bei Raumtemperatur (RT.) gerührt. Hierauf wurde der farblose Niederschlag des Kaliumsalzes der *p*-Toluolsulfonsäure abfiltriert, das Filtrat eingedampft, der Rückstand in 50 ml Äther aufgenommen und von einer braunen Schmiere abdekantiert. Nun dampfte man erneut zur Trockene ein und kristallisierte den Rückstand 2mal aus siedendem Pentan um (s. [11]). 1,983 g (5,46 mmol) farbloses, kristallines **4** (86%), Smp. 67°–68°,  $[\alpha]_D^{25} = 19,9^\circ$  (c = 0,8, Dimethylformamid), Rf 0,22 (HE1), 0,45 (HE2). – NMR.: 7,3 (s, 5 H); 5,6–5,4 (br. Bande, 1 H); 5,15 (s, 2 H); 4,6–4,4 (t,  $J_{AB} = 4$ , 1 H); 3,8 (s, 3 H); 3,6 (d,  $J_{AB} = 4$ , 2 H).

$C_{12}H_{14}JNO_4$  Ber. C 39,68 H 3,89 N 3,86 J 34,95%  
(363,13) Gef. „ 39,68 „ 3,96 „ 3,79 „ 34,66%

*Z · Ala(dehydro) · OMe* (5).  $\beta$ -Eliminierung: In mehreren Experimenten, bei denen mit den Produkten **3** bzw. **4** unter basischen Bedingungen gearbeitet wurde, konnte das Nebenprodukt **5** isoliert werden. Es wurde jeweils mit Äther extrahiert und an der 50fachen Menge Kieselgel chromatographiert, wobei **5** mit Hexan/Essigester 8:2 eluiert wurde. 270 mg **5**, Smp. 33–35°  $[\alpha]_D^{25} = 0^\circ$  (c = 0,8, Dimethylformamid), Rf 0,40 (HE1), 0,52 (HE2). – UV. (Methanol/Wasser 4:1):  $\lambda_{max}$  240 nm vgl. *Photaki* [10]. – NMR.: 7,4 (s, 5 H); 6,3 (s, 1 H); 5,8 (d, J = 1, 1 H); 5,1 (s, 2 H); 3,83 (s, 3 H).

$C_{12}H_{13}NO_4$  (235,22) Ber. C 61,27 H 5,57 N 5,96% Gef. C 61,17 H 5,62 N 5,78%

*Z · Glu(OMe)<sub>2</sub> · OMe* (6a). Eine Lösung von 273 mg (2,06 mmol) Malonsäuredimethylester und 262 mg (2,25 mmol) TMEDA in 10 ml trockenem 1,2-Dimethoxyäthan wurde bei 0° unter Stickstoff mit 1,24 ml 1,78 M *n*-Butyllithium in Hexan versetzt. Nach  $\frac{1}{2}$  Std. kühlte man kontinuierlich auf –30° ab. Hierauf gab man eine Lösung von 652 mg (1,8 mmol) **4** in 4 ml trockenem 1,2-Dimethoxyäthan dazu und liess über Nacht reagieren. Die kalte Lösung wurde tropfenweise auf eine Mischung von zerstossenem Eis/K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/KHSO<sub>4</sub> (pH2) gegeben und 2mal mit 50 ml Chloroform extrahiert. Es wurde normal weiter aufgearbeitet. Den viskosen Rückstand digerierte man mehrmals mit Pentan und reinigte ihn hierauf durch Chromatographie an Kieselgel. Es wurde mit Hexan/Essigester 5:4 eluiert. 376 mg **6a** (57%),  $[\alpha]_D^{25} = +2,6^\circ$  (c = 0,9, Dimethylformamid), Rf 0,34 (HE2). – NMR.: 7,35 (s, 5 H); 5,5–5,3 (br. Bande, 1 H); 5,15 (s, 2 H); 4,65–4,35 (sextett,  $J_{\alpha\beta} = 4$ , 1 H); 3,75 (3 s, 9 H); 3,55 (t,  $J_{\beta\gamma} = 7$ ,  $J_{\alpha\beta} = 4$ , 1 H); 2,6–2,3 (m,  $J_{\beta\gamma} = 7$ , 2 H). – IR.:

3410 *w*, 1725 *s*, 1500 *m*, 1240 *s*, 1040 *m*. – MS.: 367 (4,2, *M*<sup>+</sup>), 308 (16,1), 264 (16,1), 232 (18,1), 200 (15,3), 108 (14,2), Basis 91.

$C_{17}H_{21}NO_8$  (367,35) Ber. C 55,53 H 5,76 N 3,81% Gef. C 55,39 H 5,76 N 3,70%

*DL-Z · Gla(OBu<sup>t</sup>)<sub>2</sub> · OMe* (**6b**). Zu einer Lösung von 215 mg (1 mmol) Malonsäure-di-*t*-butylester und 131 mg (1,1 mmol) TMEDA in 5 ml trockenem 1,2-Dimethoxyäthan wurde unter Stickstoff 0,6 ml 1,78 *M* *n*-Butyllithium in Hexan gegeben. Hierauf wurde während 60 Min. kontinuierlich mit dem Kryostat auf – 32° abgekühlt. Nach Zutropfen von 344 mg (0,95 mmol) **5** in 3 ml trockenem 1,2-Dimethoxyäthan wurde eine Nacht bei dieser Temperatur stehen gelassen. Anschliessend liess man die Lösung 3 Tage im Kühlschrank (4°) weiter reagieren. Nach saurer Extraktion mit Chloroform wurde normal aufgearbeitet und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt, wobei mit Hexan/Essigester 8:2 eluiert wurde. 309 mg öliges **6b** (72%),  $[\alpha]_D^{25} = 0^\circ$  ( $c = 1,09$ , Dimethylformamid, Rf 0,63 (CME), 0,15 (HE1)). – NMR. (220 MHz): 7,4 (*s*, 5, H); 5,3 (*d*,  $J_{\alpha-NH} = 7,1$  II); 5,1 (*s*, 2 H); 4,45 (*m*, 1 H); 3,75 (*s*, 3 H); 3,3 (*t*,  $J_{\beta\gamma} = 7,1$  II); 2,35 (*m*,  $J_{\beta\gamma} = 7,1$  H); 2,25 (*m*,  $J_{\beta\gamma} = 7,1$  H); 1,5 (2 *s*, 18 H). – IR.: 3400 *m*, 1720 *s*, 1490 *s*, 1230 *s*, 1030 *m*. – MS.: 451 (Spur, *M*<sup>+</sup>), 395 (3,5), 339 (18,4), 280 (21,9), 236 (12,3), 204 (13,2), 108/107 (15,1/10,7), 91 (100, Basis), 57 (41,2).

$C_{23}H_{33}NO_8$  (451,53) Ber. C 61,18 H 7,37 N 3,10% Gef. C 61,49 H 7,49 N 2,99%

*Z · Glu(OBu) · OMe* (**11**). 3,45 g (10,3 mmol) *N*-Benzyloxycarbonyl-glutaminsäure- $\gamma$ -*t*-butylester wurden in 20 ml Methanol/Wasser 9:1 gelöst und bei 5° mit einem leichten Überschuss an Diazomethan versetzt (vgl. 1 → 2). Die Lösung wurde nun mehrmals sorgfältig mit Benzol eingedampft: 3,7 g farbloses Öl (**11**) (100%), Rf 0,60 (CME). – NMR.: 7,35 (*s*, 5 H); 5,6–5,3 (br. Bande, 1 H); 5,1 (*s*, 2 H); 4,5–4,2 (*m*, 1 H); 3,75 (*s*, 3 H); 2,5–1,9 (Signalhaufen, 4 H); 1,5 (*s*, 9 H).

*Z<sup>1</sup> Glu(OMe) · OMe* (**7**). 182 mg (0,5 mmol) **5** wurden analog zu 5 → **6a** mit 92 mg (0,7 mmol) Malonsäuredimethylester umgesetzt. Nach 15 Std. bei – 20° wurde die kalte Lösung auf RT. erwärmt und zur Trockene eingedampft. Den Rückstand digerierte man 5mal mit Hexan, dekantierte ab und arbeitete normal bei saurem pH auf: 133 mg **7** (73%), viskos,  $[\alpha]_D^{25} + 1,5^\circ$  ( $c = 0,7$ , Dimethylformamid, Rf 0,23 (HE2)). – NMR. (220 MHz): 7,4 (*s*, 5 H); 5,3 (*oc*, 2 H); 4,75 (*m*, 1 H); 3,8 (*s*, 3 H); 3,7 (*s*, 3 H); 2,7–2,4 (Signalhaufen, 3 H). – IR.: 1780 *s*, 1720 *s*, 1260 *s*, 1000 *s*. – MS.: 335 (2,6, *M*<sup>+</sup>), 291/290 (6,6/1,8), 232 (17,1), 201 (3,8), 108/107 (15,7/27,8), 91 (100, Basis).

$C_{16}H_{17}NO_7$  (335,32) Ber. C 57,31 H 5,11 N 4,18% Gef. C 57,49 H 5,48 N 4,01%

*DL-Z · Gla(OBu<sup>t</sup>)<sub>2</sub> · OH* (**8b**). 300 mg (0,66 mmol) **6b** wurden in 7,5 ml 0,47 *N* äthanolischem KOH gelöst und während 20 Min. bei RT. hydrolysiert. Anschliessend neutralisierte man die Lösung in der Kälte mit 1 *N* HCl und dampfte sie im Vakuum ein. Der Rückstand wurde normal aufgearbeitet und das Produkt **8b** an Kieselgel chromatographiert, wobei mit Chloroform/Methanol 9:1 eluiert wurde: 199 mg (69%) amorphes, dünnschichtchromatographisch einheitliches **8b**. Smp. 64–65°, Rf 0,28 (CME), 0,72 (BEW 1). – IR.: 3500–3050 *m* (OH-assoz.), 1710 *s*, 1580 *m*, 1500 *m*, 1220 *s*, 1040 *m*.

$C_{22}H_{31}NO_8$  (437,50) Ber. C 60,40 H 7,14 N 3,20% Gef. C 60,59 H 7,06 N 3,23%

*DL-H · Gla(OBu<sup>t</sup>)<sub>2</sub> · OH* (**9**). 180 mg (0,41 mmol) **8b** wurden in 12 ml Methanol/Essigsäure 95:5 gelöst und in Gegenwart von 18 mg 10proz. Pd/C 90 Min. bei RT. im Durchfluss hydriert. Nun wurde die Lösung durch ein Whatman GF/C Mikroporfilter filtriert und i. V. eingedampft. Der Rückstand wurde einmal aus Methanol/Äther umgefällt und 2mal mit Äther gewaschen. **9** kristallisierte aus heissem Wasser in farblosen Nadeln: 88 mg (71%) **9**, Smp. 159–161°, Rf 0,50 (BEW 1). Elektrophorese: Die Substanz wandert ca. 20 mm gegen die Kathode.

$C_{14}H_{25}NO_8 \cdot 1/2 H_2O$  Ber. C 53,83 H 8,39 N 4,43%  
(312,37) Gef. „ 53,52 „ 8,06 „ 4,39%

*DL-H · Gla · OH* (**10**). 13 mg (40  $\mu$ mol) **9** wurden in 0,5 ml 90proz. Trifluoressigsäure gelöst. Nach 140 Min. Stehen bei RT. wurde mit Äther im Überschuss gefällt. Die Fällung wurde abzentrifugiert, 2mal mit Äther gewaschen, in 0,5 ml Wasser gelöst und die Lösung erneut mit Isopropylalkohol gefällt und abzentrifugiert. 8 mg (66%) **10**, Rf 0,15 (BPEW 1). Elektrophorese: Die Substanz wandert ca. 32 mm (40'), 47 mm (50') gegen die Anode und ist einheitlich.  $M$  (Asp = 1,0) = 1,38,  $M$  (Glu = 1,0) ~ 2,00.

$C_8H_9NO_8$  (191,15) Ber. C 37,70 H 4,75 N 7,33% Gef. C 37,07 H 4,95 N 7,05%

Die Abspaltung von Isobutylen aus 12 mg **9** in 0,5 ml 0,1 N HCl/Ameisensäure erfolgte analog in 120 Min. bei RT.: 6 mg (67%) **10**. Physikalische Daten wie oben.

Besonderer Dank gebührt den Herren Prof. Dr. *Josef Seibl* für die Aufnahme der Massenspektren, *W. Manser* vom Institut für organische Chemie der ETH-Zürich für die Ausführung der Elementaranalysen, *Hans Gremlich* und Prof. Dr. *K. Wüthrich* für die Aufnahme der 220 MHz Protonenresonanzspektren, sowie *Fräulein Christiane Maier* für die Ausführung der polarimetrischen Messungen und Aufnahme der UV.-Spektren.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *S. Magnusson, L. Sottrup-Jensen, T. F. Petersen, H. R. Morris & A. Dell*, FEBS Letters **44**, 189 (1974).
- [2] *J. Stenflo, P. Fernlund, W. Egan & P. Roepstorff*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **71**, 2730 (1974).
- [3] *H. R. Morris, R. Thompson & A. Dell*, Biochem. biophys. Res. Commun. **62**, 856 (1975).
- [4] *D. L. Enfield, L. H. Ericsson, K. A. Walsh, H. Neurath & K. Titani*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **72**, 16 (1975).
- [5] *J. B. Howard & G. L. Nelsestuen*, Federation Proc. **33**, 1473 (1974).
- [6] *J. Girardot, R. Delaney, B. C. Johnson*, Biochem. biophys. Res. Commun. **59**, 1197 (1974).
- [7] *S. Bajaj, R. Bulowski & K. G. Mann*, J. biol. Chemistry **250**, 2150 (1975).
- [8] *Th. J. de Boer & H. J. Bacher*, Org. Synthesis **36**, 16 (1956).
- [9] *C. H. Hassall & J. O. Thomas*, J. chem. Soc. (C) **1968**, 1495.
- [10] *J. Photaki*, J. Amer. chem. Soc. **85**, 1123 (1968).
- [11] *L. Zervas & I. Photaki*, Chimia **14**, 375 (1960).
- [12] *J. P. Ducep*, Thèse Strasbourg No. AO5292 (1971).
- [13] *A. Berger & H. R. Bosshard*, Helv. **56**, 1838 (1973).

## 159. Contribution à la phytochimie du genre *Gentiana*, XI<sup>1)</sup> Identification de nouveaux dérivés de l'iso-orientine extraits des feuilles de *Gentiana burseri* LAPEYR

par **André Jacot-Guillarmod, Luong Minh Duc et Kurt Hostettmann**

Institut de Chimie de l'Université, 51, avenue de Bellevaux, CH-2000 Neuchâtel

(20. V. 75)

*Summary.* Two new derivatives of iso-orientin have been isolated and identified from the leaves of *Gentiana burseri* LAPEYR. The structure of the new compounds were established as: *trans*-cafeoyl-2''-iso-orientin (**1**) and *p*- $\beta$ -D-glucosyl-*trans*-cafeoyl-2''-iso-orientin-4'-O- $\beta$ -D-glucoside (**2**).

**1. Introduction.** - Dans une précédente communication [1], consacrée à la phytochimie comparée de la section *Coelanthé*, nous avons signalé la présence dans les feuilles de *Gentiana burseri* LAPEYR, des C-glucosides iso-orientine et isovitexine ainsi que des 4'-O-glucosides correspondants. Nous avons mentionné par ailleurs l'existence, dans cette espèce, d'autres substances flavoniques non identifiées en raison de leur faible concentration.

Le présent travail a trait à la détermination de structure de deux nouveaux dérivés de l'iso-orientine (**1** et **2**), non décrits jusqu'à présent.

**2. Résultats.** 2.1. *Isolement des composés.* L'extraction a été réalisée comme décrit précédemment [2]. Les substances **1** et **2** ont été obtenues à partir de la fraction méthanolique traitée selon le schéma de séparation indiqué dans la figure.

<sup>1)</sup> Partie X. v. Helv. **58**, 130 (1975).