

Die Synthese von Glutaminsäure ($^{14}\text{COOH}$)

Von J. FAŁECKI und R. PLEJEWSKI

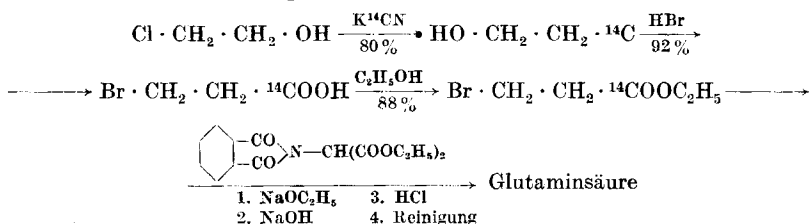
Mit 6 Abbildungen

Inhaltsübersicht

In dieser Arbeit wird die Synthese von Glutaminsäure- $(^{14}\text{COOH})$, ausgehend von Kaliumcyanid ^{14}C , beschrieben.

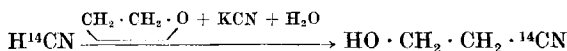
Einleitung

SPEER und Mitarb.¹⁾ haben einen Syntheseweg geschrieben, wie ihn das folgende Formelschema zeigt:



Man erhält im 9 g-Maßstab in 35proz. Ausbeute ein verunreinigtes Produkt.

Bei dem Verfahren von RAMBAUD²⁾ wird Äthylenoxyd in schwach alkalischer Lösung mit Blausäure in guter Ausbeute zu β -Oxypropionitril kondensiert:



Wir haben zur Synthese der Glutaminsäure- $(^{14}\text{COOH})$ eine kombinierte RAMBAUD-SPEER-Methode angewandt. Das durch Kondensation von Äthylenoxyd mit Natrium- oder Kaliumcyanid erhaltene Cyanhydrin wurde zu β -Brompropionsäuremethylester umgesetzt. Die Veresterung erfolgte mit Diazomethan³⁾. Die Kondensation des Esters mit Phthalimidomalonsäure-

¹⁾ R. J. SPEER, A. ROBERTS, M. MALONEY u. H. R. MAKLER, J. Amer. chem. Soc. **74**, 2444 (1952).

²⁾ E. RAMBAUD, Bull. Soc. chim. France **3**, [5] 138 (1936).

³⁾ F. ARNDT, Org. Synth. Coll. vol. II, 461 (1943).

diäthylester erfolgte in Gegenwart von Natriumalkoholat⁴⁾. Die Hydrolyse des Kondensationsprodukts ergibt Glutaminsäure-5-¹⁴C. In einer Reihe von Testversuchen wurden die günstigsten Reaktionsbedingungen ermittelt (vgl. Tab. 1).

Tabelle 1

Zusammenstellung der Ergebnisse, die bei der Kondensationsreaktion von Natriumcyanid mit Äthylenoxyd in wasseralkoholischem Medium erhalten wurden

| Natrium- cyanid berechnet an reinem NaCN mMol | Äthy- len- oxyd mMol | Kondensations- bedingungen | | Hydrolyse- bedingungen | | Brom- propion- säure (rohe) % | Brom- propion- säureme- thylester (rein) % | Bemer- kungen |
|--|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|---|---|----------------------|
| | | Zeit h | Tempera- tur °C | Zeit h | Tempera- tur °C | | | |
| 2,9 | 5,6 | 1 | 0 | 50 | 18 | 38 | | |
| 3,5 | 5,6 | 4 | 0 | 50 | 18 | 52 | | |
| 2,9 | 5,6 | 20 | -20 | 18 und 3 | 18 Sdp. | 74 | 86 ⁵⁾ | Säure leicht gelb |
| 3,6 | 5,6 | 20 | 18 | 21 und 3 | 18 Sdp. | 77 | 84 ⁵⁾ | |
| 4,7 | 11,3 | 20 | 18 ⁶⁾ | 21 und 3 | 18 Sdp. | 74 | 78 ⁵⁾ | Sehr reine Säure |

Die Darstellung der β -Propionsäure und des Esters erfolgten in einer speziellen Glasapparatur im 3–20 mMol-Maßstab. Die Ausbeute an β -Brompropionsäure-¹⁴C beträgt durchschnittlich 85%, die Ausbeute an Ester-¹⁴C –80%, bezogen auf Kaliumcyanid-¹⁴C.

Die Kondensation des β -Brompropionsäuremethylester-¹⁴C mit Phthalimidomalonsäurediäthylester und die Darstellung der Glutaminsäure wurde im 20-, 10-, und 3–4 mMol-Maßstab bearbeitet. Die Zugabe des Esters erfolgte bei der Synthese im 3–4 mMol-Maßstab stufenweise. Zum Schluß wurde inaktiver Ester zugegeben. Es konnte festgestellt werden, daß ein geringer Überschuß an Ester die Ausbeute erhöht.

Die Reinigung der Endprodukte erfolgte an Amberlite IR –45 bei pH \sim 3,4 und Glutaminsäure wurde in durchschnittlich 25% Ausbeute erhalten.

⁴⁾ C. S. MARVEL u. M. P. STODDARD, J. org. Chem. **3**, 198 (1938).

⁵⁾ Durchschnittlich aus 4 Synthesen.

⁶⁾ Verkohlten Ansatz.

Beschreibung der Versuche

Äthylenoxyd. 10 ml 99proz. Äthylenchlorhydrin (BDH) wurden bei -20°C zu 20 ml 50proz. Kaliumhydroxylösung zugegeben. Abb. 1 zeigt die Apparatur. Die Schiffe waren mit Siliconefett geschmiert. Im Laufe von 24 Stunden bringt man die Reaktionsmischung auf Zimmertemperatur. Die Kühlfalle wird mit Trockeneis/Isopropanol gekühlt. Das nach 12 Stunden entstandene Äthylenoxyd wird in eine zweite Kühlfalle umdestilliert (Abb. 2).

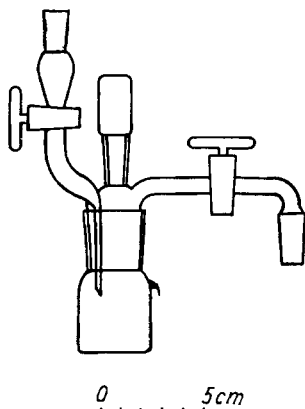


Abb. 1. Generator des Äthylenoxyds

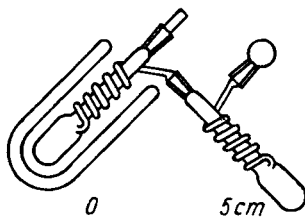


Abb. 2. Apparatur zur Destillation des Äthylenoxyds

Das erhaltene Äthylenoxyd wird mit einer abgekühlten Pipette in die vorgekühlten Ampullen übergeführt und die Ampullen geschmolzen. Jede Ampulle enthielt etwa 15 mMol Äthylenoxyd (0,6 ml). Die Gesamtausbeute an Äthylenoxyd betrug 4 ml.

β -Brompropionsäure- ($^{14}\text{COOH}$) in 4–10 mMol Maßstab. 0,3789 g (7,45 mMol) Natriumcyanid wurden in das Reaktionsgefäß (Abb. 3a) gegeben und in 1 ml Wasser gelöst. Zu der Lösung fügt man 2,0 ml Äthanol und kühlt das Gemisch auf 0°C . Die Natriumcyanidlösung wird mit 0,6 ml (15 mMol) destilliertem Äthylenoxyd versetzt und der Reaktionskolben verschlossen. Das Reaktionsgemisch wird 2 Stunden bei 0°C und 3 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Danach wird der Alkohol im Vakuum (Wasserstrahlpumpe) abgedampft. Der Rückstand wird in einem Trockeneisbad abgekühlt und die rauchende Bromwasserstoffsäure hineingegossen. Die erhaltene Lösung wird 3 Stunden unter Rückfluß erhitzt und etwa auf das 8fache Volumen mit Wasser verdünnt.

In den Destillationskolben des Extraktors (Abb. 3b) werden etwa 0,2 g wasserfreies Natriumsulfat gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 10 Stunden kontinuierlich mit wasserfreiem Äther (1 Tropfen/s.) extrahiert (Abb. 3), der Äther extrakt filtriert und auf dem Wasserbad abdestilliert. Nach der Kristallisation wird das Produkt bei 1 Torr getrocknet.

Die Ausbeute an β -Brompropionsäure betrug 84–91%. Das erhaltene Produkt wird zweimal im Vakuum sublimiert (Abb. 4, Badtemp. $55-65$ bzw. $55-58^\circ\text{C}$). Vom Kühlfinger (Trockeneis-Isopropanol) wird das Produkt mit Äther abgelöst und nach dem Verdampfen getrocknet (Fp. $61-62^\circ\text{C}$)⁷⁾. Die Ausbeute betrug 74–80%.

Aus Benzol umkristallisiert, ist das Präparat einige Monate haltbar.

⁷⁾ W. A. JACOBS u. M. HEIDELBERGER, J. Amef. chem. Soc. **39**, 1465 (1917).

β -Brompropionsäuremethylester- $(^{14}\text{COOR})$ im 4–10 mMol-Maßstab. Frisch sublimierte β -Brompropionsäure (500 mg) wird in 2 ml alkoholfreiem absolutem Äther gelöst und bei 0 °C eine frisch destillierte ätherische Diazomethanlösung vorsichtig hinzugegeben. (Das Diazomethan wurde aus 2 g Nitrosomethylharnstoff entwickelt.) Nach 5stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wird die überschüssige Diazomethanlösung ab-

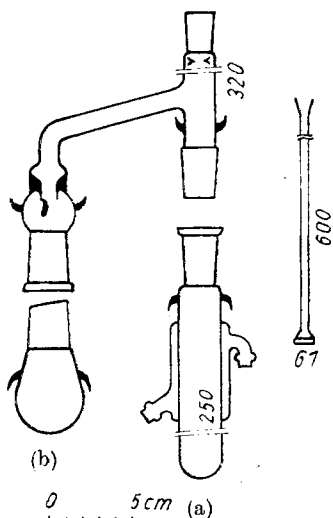


Abb. 3. Apparatur zur Extraktion der β -Brompropionsäure

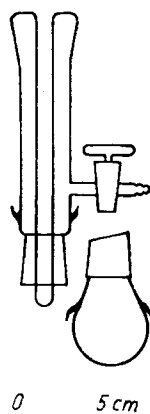


Abb. 4. Sublimator zur Reinigung der β -Brompropionsäure

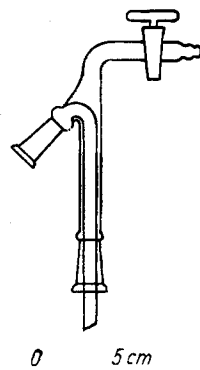


Abb. 5. Apparat zur Destillation des Methylesters der β -Brompropionsäure

destilliert und das erhaltene Produkt 20 Minuten bei 100 °C getrocknet. Die Ausbeute betrug 95% d. Th. (0,5179 g), der Brechungsindex $n_D^{20} = 1,45867$ ⁸⁾. Nach nochmaliger Destillation (Abb. 5) war der Brechungsindex $n_D^{20} = 1,4568-1,4573$.

Spuren des Äthers stören die weitere Verarbeitung nicht, so daß die Vakuumdestillation sich erübrigt.

Für Testversuche wurde inaktiver β -Brompropionsäuremethylester aus β -Brompropionsäure und Methanol unter der katalytischen Wirkung von p-Nitrobenzoesulfonsäure hergestellt. Der Ester wurde in Ampullen zu je 3,0 ml aufbewahrt.

Glutaminsäure- $(^{14}\text{COOH})$ im 20 mMol-Maßstab. 6,1 g (20 mMol) Phthalamido-malonsäurediäthylester (Fp. 73–74 °C) werden in einem 100-ml-Kolben unter Erwärmen in 20 ml absolutem Äthanol gelöst. Die Mischung wird in ein Wasserbad gebracht und unter Rühren mit 5,4 ml einer 10proz. Natriummethylatlösung (aus 40 ml absolutem Methanol und 5,0 g Natrium) versetzt. Zu der erhaltenen klaren Lösung werden 5 ml absolutes Äthanol und danach 2,8 ml (20 mMol) β -Brompropionsäuremethylester hinzugefügt. Das Gemisch wird im Glycerinbad 10 Stunden unter Rückfluß erhitzt.

Nach dem Abkühlen wird die Lösung vom ausgefallenen Natriumbromid filtriert und mit 5 ml absolutem Alkohol gewaschen. Die Lösung wird im Vakuum (50 Torr) bei 50–60 °C eingedunstet, die zurückbleibende weiße Masse in einen 100-ml-Kolben übergeführt

⁸⁾ B. K. CAMPBELL u. K. N. CAMPBELL, H. Amer. chem. Soc. **60**, 1374 (1938).

und bei 50°C mit 4 ml 96% Alkohol und 23 ml 5 n Kaliumhydroxydlösung behandelt. Nachdem die Lösung homogen geworden ist, wird sie noch 30 Minuten erwärmt.

Unter Kühlung auf -10 bis -5°C (Trockeneis-Isopropanol) wird das Reaktionsgemisch vorsichtig mit 45 ml konz. Salzsäure angesäuert und das ausgefallene Produkt mit einer G 3-Fritte filtriert und bei 40°C getrocknet. Der Rückstand wird vorsichtig gemahlen und in einem 100-ml-Kolben dreimal (50, 25 und 10 ml) mit absolutem Äthanol bei 70°C extrahiert. Beim Kühlen bis zum -20°C kristallisiert Kaliumchlorid aus. Die filtrierte Lösung wird bei 60°C im Vakuum (1 Torr) verdampft. Es wurden 3,3 g des Kondensationsproduktes erhalten (Fp. 123 – 124°C).

In einem 100-ml-Kolben wird das Produkt in 20 ml Wasser gelöst, mit 5 ml konz. Salzsäure versetzt und 1,5 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wird die Phthalsäure abfiltriert und im Vakuum (1 Torr) bei 40°C eingeeengt. Der Rückstand wird mit 50 ml Wasser behandelt und nach erneuter Filtration wieder eingeeengt. Zur Reinigung wird der Rückstand in wenig Wasser gelöst und mit alkalischem Amberlite IR-45 auf pH von 3,5 eingestellt und im Vakuum eingedampft. Das erhaltene Endprodukt (0,75 g, 5,1 mMol, d. g. 25% d. Th.) wird in 5 ml Wasser bei 60°C gelöst, und die Aminosäure mit 7 ml heißen absolutem Alkohol gefällt. Nach zwei Tagen wird die reine Glutaminsäure- $5\text{-}^{14}\text{C}$ abfiltriert. Fp. 185 – 187°C unkor. uncharakteristisch.

Durch Vergleich mit Handelspräparaten (Chinoin-Budapest) durch pH-metrische Titrierung konnte der Gehalt unseres Produktes zu 98,5% Aminoglutarsäure bestimmt werden.

Analyse: für $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_4\text{N}$ ber.: C 40,8%; H 6,18%; N 9,26%;
gef.: C 40,3%; H 6,10%; N 9,29%.

Diese Ergebnisse entsprechen einem maximalen NaCl-Gehalt von 1,2%.

Glutaminsäure- $5\text{-}^{14}\text{C}$ im 3 mMol-Maßstab. Zu 2,3 mMol β -Brompropionsäure in einem 40-ml-Kolben (Abb. 6) wird eine ätherische Diazomethanlösung hinzugefügt und nach der Reaktion der Lösungsmittelüberschuß abdestilliert. 3,05 g Phthalimidomalonsäurediäthylester werden in 20 ml absolutem Äthanol gelöst und 2,7 ml 10proz. Natriummethylat hinzugefügt. Die Mischung wird mit Äthanol auf 20 ml aufgefüllt. 4,9 ml (2,45 mMol) der oben bereiteten alkalischen Lösung gibt man zu erhaltene β -Brompropionsäuremethylester und erhitzt das Reaktionsgemisch 10 Stunden Rückfluß und Ausschluß von Luftfeuchtigkeit. Gegen Ende der Reaktionszeit fügt man noch 0,7 g (5 mMol) reinem, inaktiven β -Brompropionsäuremethylester zu. Das Methanol wird im Vakuum abgedampft und das Kondensationsprodukt durch Erhitzen mit 1,4 ml 50proz. Kaliumhydroxydlösung und 1 ml Wasser hydrolysiert. Das Reaktionsgemisch wird in Trockeneis gekühlt und mit 5 ml konz. Salzsäure bei -10°C versetzt. Das ausgefallene Kaliumchlorid wird viermal mit 5 ml siedendem absolutem Äthanol extrahiert und die vereinigten Lösungen werden zur Trockne eingedampft. Das Reaktionsprodukt wird nochmals mit Alkohol extrahiert und der Extrakt im Vakuum (1 Torr) eingedampft.

Der Rückstand wird mit 2 ml Wasser und 0,5 ml konz. Salzsäure versetzt und 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen

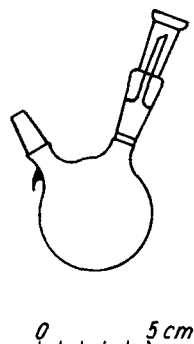


Abb. 6. Kolben zur Kondensation des β -Brompropionmethylesters mit Phthalimidomalonsäurediäthylester

des Reaktionsgemisches auf 0 °C wird die Phthalsäure abfiltriert und das Filtrat bei 60 °C in Vakuum eingedampft. Das Produkt wird abermals in 10 ml Wasser gelöst, filtriert und mit alkoholischem Amberlite IR-45 auf pH von 3,3 eingestellt. Die Lösung wird auf 2 ml eingeeengt und die Glutaminsäure mit 10 ml absolutem Äthanol ausgefällt.

Die Ausbeute betrug 0,098 g (0,67 mMol), d. h. 21% d. Th.

Warszawa, Institut für Atomkernforschung.

Bei der Redaktion eingegangen am 21. März 1964.