

Untersuchungen zur Synthese und biologischen Bedeutung von Glutaminsäure-1-semialdehyd als Vorstufe der Chlorophylle

Investigations on the Synthesis and Biological Significance of Glutamic-1-semialdehyde as a Precursor of the Chlorophylls

Hans-Ulrich Meisch und Raimund Maus

Fachrichtung Biochemie der Universität des Saarlandes, D-6600 Saarbrücken 11

Z. Naturforsch. **38c**, 563–570 (1983); received March 4, 1983

Glutamic Semialdehyde, Synthesis, Reactivity, Glutamic Acid, Derivatives

Glutamic-1-semialdehyde which is discussed to be involved in the early steps of chlorophyll biosynthesis, has been synthesized from glutamic acid by reduction of several N-protected carboxylic acid derivatives like the N-CB₆-glutamic acid-1-dimethyl amide or methylanilide, the pyroglutamic acid imidazolidine and the acid chlorides of N-phthaloyl-glutamic acid-5-methyl ester or 5-benzylester. The α -aminoaldehyde could only be generated in solution, where it is polymerized rapidly. Due to its instability, it is suggested that glutamic semialdehyde plays no role as a free metabolite in green plants.

1. Einführung

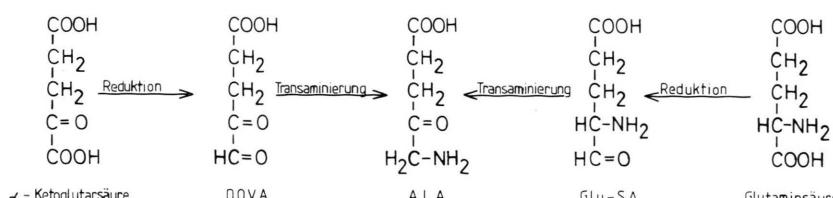
Die natürlichen Tetrapyrrole, zu denen auch die Chlorophylle gehören, leiten sich biogenetisch von der Aminosäure 5-Aminolävulinsäure ab, die über eine Reihe von Zwischenstufen zu dem Makrozyklus des Porphyrins verknüpft wird [1]. Bereits auf der Stufe der Aminolävulinsäure (ALA) bereitet die Interpretation der Biosynthese erhebliche Schwierigkeiten, die bis heute nicht vollständig gelöst sind [2]. Neben der aus Tieren und Mikroorganismen bekannten ALA-Bildung aus Succinyl-CoA und Glycin („Shemin-Weg“) [3] wird vor allem für Algen und höhere Pflanzen ein zweiter

Weg zu ALA diskutiert, der die Verwendung des intakten Kohlenstoff-Gerüsts von α -Ketoglutaräure bzw. Glutaminsäure einschließt [3]. Dieser „C-5-Weg“ lässt sich theoretisch von beiden genannten Vorstufen ableiten, wobei über eine primäre Reduktion an der jeweiligen C-1-Position die Aldehydstufen (4,5-Dioxovaleriansäure, DOVA, bzw. Glutaminsäure-1-semialdehyd, Glu-SA) entstehen sollten, die dann durch Transaminierung in ALA verwandelt werden (Schema 1). Die Umsetzung von α -Ketoglutarat über DOVA zu ALA wird als sehr wahrscheinlich erachtet [4], obwohl der direkte Beweis *in vitro* noch aussteht. Für die Theorie der Transformation von Glutaminsäure in den Semialdehyd mit nachfolgender Isomerisierung gibt es einen Anhaltspunkt durch die Arbeit von Kannangara und Gough [5], die sowohl von einer Synthese des Glu-SA als auch von dessen *in vitro*-Umwandlung in ALA mit einer Proteinfraktion aus Gerste berichten. Allerdings wurde Glu-SA nicht in Substanz hergestellt, sondern nur eine Aldehyd enthal-

Sonderdruckanforderungen an Dr. H.-U. Meisch.

Abkürzungen: ALA, 5-Aminolävulinsäure; DOVA, 4,5-Dioxovaleriansäure; Glu-SA, L-Glutaminsäure-1-semialdehyd; MBTH, 3-Methylbenzthiazolin-2-on-hydrazone; DAN, 2,3-Diaminonaphthalin.

0341-0382/83/0700-0563 \$ 01.30/0



Schema 1. Biosynthese von ALA auf dem „C-5-Weg“



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

tende wäßrige Lösung direkt für die enzymatischen Tests verwendet. Weiterhin fehlen Angaben zur eindeutigen Charakterisierung von Glu-SA, so daß diese Arbeit die Signifikanz von Glu-SA als potentielle Vorstufe der ALA bisher nicht eindeutig beweist. Die vorliegende Arbeit befaßt sich daher mit Methoden zur synthetischen Zugänglichkeit von Glu-SA mit dem angestrebten Ziel der Gewinnung eines Standardpräparates als Substrat für biochemisch-enzymatische Tests.

2. Ergebnisse

Syntheseplanung

Viele gängige Verfahren zur Darstellung von Aldehyden benutzen als Ausgangsverbindungen die entsprechenden Carbonsäuren [6]. Da letztere der Reduktion zum Aldehyd im allgemeinen nicht direkt zugänglich sind, wird die Carboxylgruppe zuerst derivatisiert. Im Falle des Glu-SA wurde daher von der Glutaminsäure ausgegangen. Zwei grundsätzliche Verfahrensweisen zur weiteren Umsetzung bieten sich an:

- 1) Reduktion von Säureamiden mittels komplexer Hydride [7].
- 2) Katalytische Reduktion von Säurechloriden nach Rosenmund [8].

Im ersten Falle gibt es Erfahrungen bei der Reduktion von Carbonsäuredimethylamiden mittels $\text{Li}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3\text{AlH}$ [9], N-Methylanilide wurden von Weygand *et al.* [10] mittels LiAlH_4 zu den Aldehyden reduziert, während sich Staab und Bräunling [11] der Imidazole bedienten. Nach der zweiten Methode wurden bereits Aldehydderivate der Aminosäuren Alanin, Cystein und Tyrosin dargestellt [12], die jedoch an der Aminogruppe durch einen Phthaloylrest geschützt waren. Kannangara und Gough [5] reduzierten bei ihrer Synthese des Glu-SA N-Benzoyloxycarbonyl-Glutaminsäure-1-chlorid-5-benzylester mittels H_2 am Palladiumkontakt, wobei auch die übrigen funktionellen Gruppen der Glutaminsäure freigelegt wurden. Der hier vorgelegte Syntheseplan beinhaltet daher die folgenden Stufen:

- a) Genereller Schutz der α -Aminogruppe der Glutaminsäure und gegebenenfalls der 5-Carboxylgruppe;

- b) Derivatisierung der 1-Carboxylgruppe (Säurechlorid, -amide);
- c) Reduktion (H_2 , komplexe Hydride);
- d) Abspaltung der Schutzgruppen.

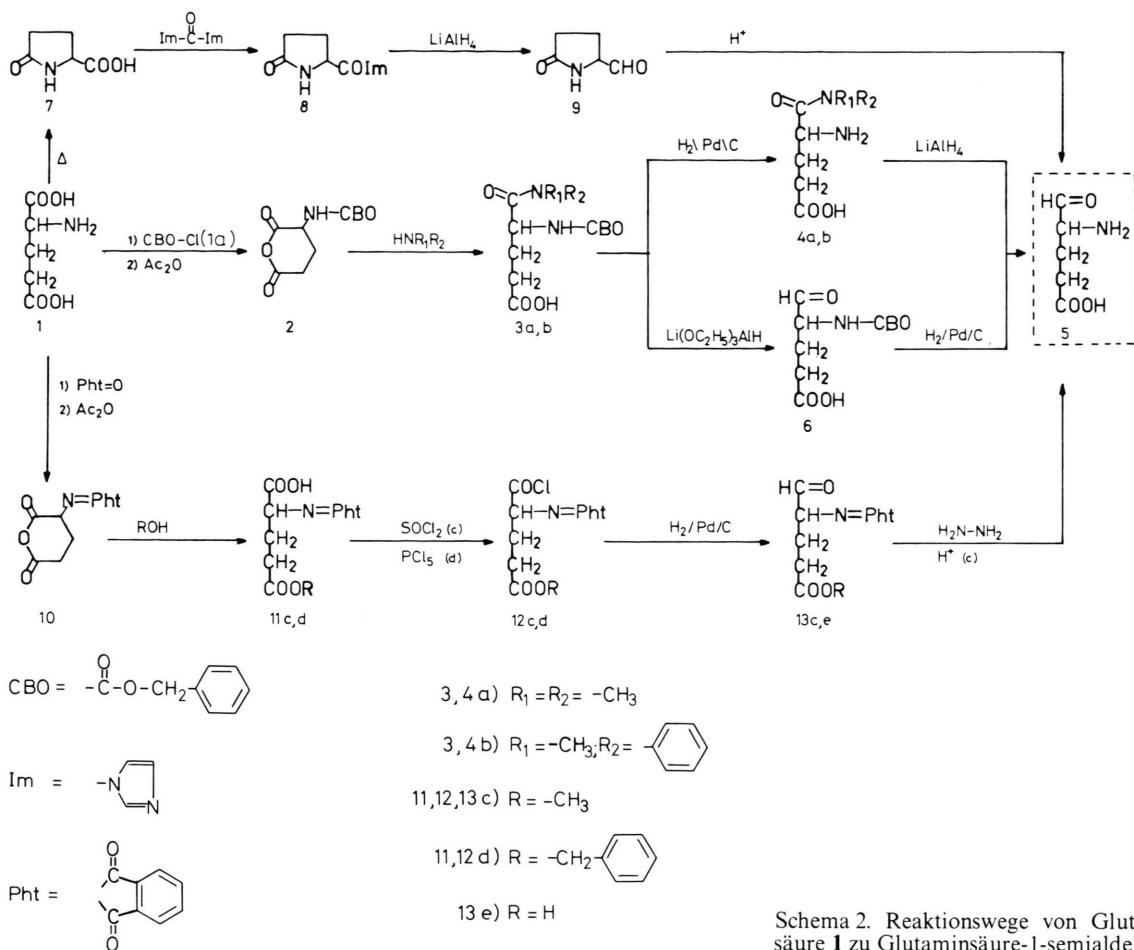
Diese Synthesestrategie eröffnet mehrere parallele Möglichkeiten zur Darstellung von Glu-SA (Schema 2).

Darstellung der reduktionsfähigen Glutaminsäurederivate

Zur Einführung der Amidgruppe in Glutaminsäure **1** über deren Säureanhydrid muß die α -Aminogruppe blockiert werden. Hierfür bietet sich eine Schutzgruppe vom Urethanotyp (z.B. Benzoyloxycarbonyl-, CBO) an, die bei der Aminolyse des N-geschützten Glutaminsäureanhydrids die Aminogruppe in Position 1 dirigiert, wobei nicht das Glutamin- sondern das Isoglutaminderivat entsteht [13]. **1** wurde daher in Gegenwart von MgO mit Benzoyloxycarbonylchlorid umgesetzt [13]. Dabei entsteht die CBO-Glutaminsäure **1a**, die mit Acetanhydrid in guter Ausbeute das Anhydrid **2** liefert. Aminolyse mit Dimethylamin im wasserfreien Medium ergibt das Amid **3a**, das aus Aceton/5 M HCl kristallisierte. Das ungeschützte Dimethylamid **4a** wird gewonnen, indem man **3a** in Methanol löst und in Gegenwart von Palladium-Aktivkohle hydriert. Analog **3a** bildet sich das CBO-geschützte N-Methylanilid **3b** aus **2** durch Aminolyse mit N-Methylanilin. **3b** fiel als ölige Substanz an und wurde durch Umwandlung in das ungeschützte Anilid **4b** mittels katalytischer Hydrierung indirekt charakterisiert. **4b** bildet farblose Kristalle aus Methanol/Diethylether vom Schmelzpunkt 232 °C.

Die Pyroglutaminsäure **7** scheint ebenfalls für die Darstellung von Glu-SA gewisse Vorteile aufzuweisen: Auf das Einführen von Schutzgruppen kann hier verzichtet werden, da sowohl die Aminogruppe als auch die 5-Carboxylgruppe bereits durch Lactambildung blockiert sind. Somit erfaßt die zur Reduktion notwendige Derivatisierung nur die vorgesehene freie 1-Carboxylgruppe. Zudem ist **7** leicht aus **1** zugänglich, und der Pyrrolidonring kann hydrolytisch wieder gespalten werden.

Glutaminsäure **1** wird durch Erhitzen auf 190 °C in **7** überführt [14]. Die nachfolgende Umwandlung der freien Carboxylgruppe von **7** in das Imidazolid wurde zunächst auf dem klassischen Weg über das Säurechlorid versucht; jedoch bildete sich schon in

Schema 2. Reaktionswege von Glutaminsäure **1** zu Glutaminsäure-1-semialdehyd **5**.

der Kälte aus **7** und Thionylchlorid ein rotes Harz. Daher wurde auf das Verfahren von Staab *et al.* [15] zurückgegriffen, wonach durch direkte Einwirkung von Carbonyldiimidazol auf Carbonsäuren deren Imidazolide gebildet werden. Danach lässt sich **8** aus **7** in 65-prozentiger Ausbeute als farblose Substanz gewinnen. Nach Rosenmund [8] sind Aldehyde durch Reduktion der entsprechenden Säurechloride zugänglich. Im Falle der Glutaminsäure waren zur eindeutigen Bildung des Säurechlorids am C-Atom 1 sowohl die Amino- als auch die 5-Carboxylgruppe zu schützen. Erstere wurde durch den Phthaloylrest geschützt, letztere über das Anhydrid **10** mit Methanol verestert. Damit erhielt man den N-Phthaloyl-Glutaminsäure-5-methylester **11c**, der sich mit Thionylchlorid in das gewünschte Säurechlorid **12c** überführen lässt. Verestert man mit Benzylalkohol anstelle von Methanol, so erhält man den Benzylester **11d**, der sich mit PCl₅ in das Säure-

chlorid **12d** verwandeln lässt. Beide Säurechloride fielen als ölige Produkte an.

Reduktion der Glutaminsäurederivate

Die Reduktion des Glutaminsäure-1-dimethylamids **4a** wurde zunächst mit Hilfe des komplexen Hydrids Li(OC₂H₅)₃AlH durchgeführt, das aus LiAlH₄ und Essigsäureethylester *in situ* hergestellt wurde [9]. Reaktionsmedium ist üblicherweise Diethylether oder THF. Da **4a** in beiden Lösungsmitteln nahezu unlöslich ist, wurde die Reduktion in Suspension versucht [10]. Zunächst ließ man die äquimolare Menge an Hydrid in Diethylether bei 0 °C einwirken, wobei jedoch das gesamte Hydrid unter H₂-Entwicklung verbraucht wurde. Daher wurde die Zugabe an Li(OC₂H₅)₃AlH so weit erhöht, bis dessen unzersetzter Anteil die vorgelegte molare Menge an **4a** um etwa 10% übertraf. Nach

2 Std. im Eisbad wurde mit 2,5 M H₂SO₄ zersetzt, wobei H₂-Entwicklung auftrat. Mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin konnte kein Aldehyd nachgewiesen werden. Eine negative Reaktion erbrachte auch das sehr viel empfindlichere 3-Methylbenzthiazolin-2-on-hydrazone (MBTH), das mit FeCl₃ und Aldehyden einen blauen Chromophor bildet [16]. Im Reaktionsgemisch nach Zersetzung ließ sich mittels DC neben dem Ausgangsprodukt **4a** nur noch etwas **1** nachweisen. Die Verwendung von THF als Solvens, Temperaturerhöhung und Ausdehnung der Reaktionszeit auf über 24 Std. sowie der Einsatz von LiAlH₄ zur Reduktion ließen ebenfalls keinen Aldehyd entstehen.

N-CBO-Glutaminsäure-1-dimethylamid **3a** wurde nach Brown und Tsukamoto [9] mittels eines 2,5molaren Überschusses von Li(OC₂H₅)₃AlH in THF reduziert. Nach 60 min bei -10 °C erhielt man eine maximale Ausbeute an Aldehyd **6**, der in Form des isolierten 2,4-Dinitrophenylhydrazons mit 14% d.Th. bestimmt wurde. Die Isolierung des CBO-Aldehyds **6** gelang nur in öliger Form. Versuche zur Reinigung über das Bisulfit-Additionsprodukt bzw. über die Bisulfit-Form von Anionenaustauschern (z.B. Amberlite IRA-400) [17] schlugen fehl. Im folgenden wurde daher wie voranstehend reduziert und die Reaktionsprodukte mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurde in Methanol aufgenommen und der N-CBO-Glutaminsäure-1-semialdehyd **6** am Palladiumkontakt hydriert, um die CBO-Gruppe abzuspalten. Die Untersuchung des Reduktionsergebnisses mittels DC ergab neben **1** und **4a** eine Ninhydrin-positive Zone am Start. Mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin oder MBTH ließen sich dagegen auf der Dünnenschicht keine Zonen anfärben, obwohl der Aldehydnachweis mit MBTH in Lösung positiv ausfiel. Aufarbeitung des Reaktionsgemisches mit Isopropanol ergab einen weißen Niederschlag, der sich innerhalb weniger Minuten von gelb über rot nach braun verfärbte. Einrotieren der Lösung ergab lediglich eine rote, polymere Masse, aus der sich kein Aldehyd gewinnen ließ. Versuchte man, den Reaktionsansatz nach Kannangara und Gough [5] über Säulenchromatographie an Kationenaustauschern aufzutrennen, so fand man neben einer irreversibel fixierten roten Zone am oberen Säulenrand im Eluat lediglich Glutaminsäure und deren 1-Dimethylamid sowie ein Ninhydrin-positives Substanzgemisch ohne Aldehydcharakter.

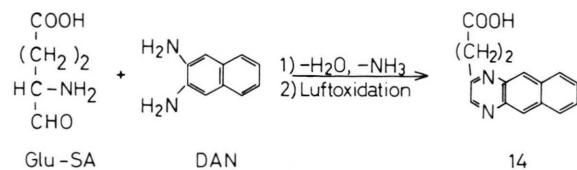
Das Pyroglutaminsäureimidazolid **8** wurde in THF suspendiert und bei -10 °C mit LiAlH₄ in THF versetzt. Nach 30 min Reduktionszeit erbrachte der Test mit MBTH zunächst keinen Aldehydnachweis, der jedoch positiv ausfiel, wenn man die Reaktionstemperatur für weitere 30 min auf 40 °C steigerte. Mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin ließen sich gelbe Kristalle vom Schmelzpunkt 154 °C isolieren, die als 2,4-Dinitrophenylhydrazone des Pyroglutaminsäurealdehyds **9** identifiziert wurden. Aus **9** sollte nun durch Hydrolyse mit konz. HCl der freie Glu-SA entstehen. Man erhielt jedoch nur eine rote Lösung, in der kein Aldehyd mehr nachgewiesen werden konnte.

Der in Toluol gelöste Benzylester **12d** wurde bei 0 °C am Pd-Kontakt bis zum Ende der HCl-Entwicklung hydriert. Danach konnte jedoch mit MBTH kein Aldehyd nachgewiesen werden. Nach Hydrazinolyse der Phthaloylgruppe fand man nur Glutaminsäure. Auch die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 80 °C erbrachte kein anderes Ergebnis.

Der Methylester **12c** wurde zunächst bei Raumtemperatur wie voranstehend hydriert. Selbst nach mehreren Stunden konnte weder HCl-Entwicklung beobachtet noch Aldehyd im Reaktionsgemisch gefunden werden. Erst eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 80–90 °C führte zur Freisetzung von HCl, nach deren Beendigung (ca. 5 Std.) mit MBTH Aldehyd angezeigt wurde. Mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin erhielt man eine orangefarbene Abscheidung, die nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Zur Abtrennung des Aldehyds wurde das nach Abziehen des Toluols erhaltene Öl mit ges. NaHCO₃-Lösung behandelt, die wäßrige Phase abgetrennt und der ölige Rückstand nach Aufnahme in Ethanol der Hydrazinolyse unterworfen. Bereits nach kurzer Zeit fiel Phthalsäureanhydrid aus, und die Lösung färbte sich tiefrot. Nach Filtration und Abziehen des Lösungsmittels blieb ein rotes, wasserlösliches Harz zurück, in welchem kein Aldehyd mehr nachweisbar war.

Das Ziel, Glu-SA als Reinsubstanz zu erhalten, ließ sich nach den voranstehenden Synthesen nicht realisieren. Es wurde daher nach einem reduzierfähigen Glutaminsäurederivat mit besserer Löslichkeit in THF gesucht. Dazu schien das N-Methylanilid **4b** geeignet. Dieses wurde zunächst als CBO-Derivat **3b** mit LiAlH₄ in THF bei -10 °C reduziert. Nach Aufarbeitung wie zuvor beim Dimethyl-

amid **3a** beschrieben, erhielt man mit Dinitrophenylhydrazin ein Hydrazon, welches sich mit demjenigen als identisch erwies, das aus **3a** dargestellt worden war. Mit MBTH färbte sich die Lösung jedoch statt blau intensiv blauviolett. Es wurde gefunden, daß N-Methylanilin mit MBTH einen violetten Chromophor bildet, der bei $\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$ einen molaren Absorptionskoeffizienten $\varepsilon = 19\,000$ besitzt und die von der Aldehydreaktion herrührende Farbe ($\lambda_{\text{max}} = 625$ und 660 nm [16]) überlagert. Da die Farbe mit N-Methylanilin über längere Zeit stabil bleibt, wurde die Reaktion zur Verfolgung der Reduktion von **4b** angewandt, wobei das entstandene N-Methylanilin mit Diethylether abgetrennt wurde. Zum Vergleich wurde die Bildung des Glu-SA über die Aldehydreaktion mit MBTH bei 660 nm aufgezeichnet (Abb. 1). Anhand der Kinetik fand man, daß man aus **4b** und der 3,5fachen molaren Menge an Hydridionen aus LiAlH_4 nach einer Stunde bei 0°C eine max. Ausbeute an Aldehyd erzielte, während der Anteil an freigesetztem N-Methylanilin noch weiter anstieg (bis auf 50% der eingesetzten molaren Menge an **4b**). Zog man nach der Reduktion das THF ab, ohne den Reaktionsansatz zu zersetzen, so hinterblieb ein weißes, übelriechendes Pulver, welches sich unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluß aufbewahren ließ. Bei Kontakt mit Wasser färbte es sich gelb. Jeder weitere Versuch, den Glu-SA aus der Lösung zu isolieren, endete in der schon vorher beobachteten Umwandlung in ein rotes Polymerisat.



Schema 3

Die intermediäre Bildung von Glu-SA wurde jedoch durch eine Afsangreaktion mit 2,3-Diaminonaphthalin (DAN) bewiesen, die analog der bekannten Umsetzung mit α -Ketoaldehyden [18] zu dem Benzochinoxalin **14** führt (Schema 3).

14 läßt sich zum Vergleich leicht aus 4,5-Dioxo-valeriansäure und DAN darstellen [18]. Das Auftreten von **14** im Reduktionsansatz von **4a** und **4b** konnte nach Einwirken von DAN und nach Trennung mittels HPLC durch Fluoreszenzdetektion [19] sichergestellt werden.

3. Diskussion

Die vorliegenden Versuche zur Darstellung von Glutaminsäure-1-semialdehyd haben ergeben, daß der α -Aminoaldehyd offensichtlich in Substanz nicht stabil ist und sich damit der Isolierung in reiner Form entzieht. Damit stellt sich allgemein die Frage, ob α -Aminoaldehyde überhaupt in freier Form gewonnen werden können. Über die Darstellung einiger N-geschützter Aminoaldehyde bzw. Acetale von α -Aminoaldehyden wird im Falle von Alanin, Cystein, Phenylalanin und Tyrosin berichtet [12, 20–22], aber aus keinem dieser Derivate konnten die freien Aminoaldehyde gewonnen werden. Fischer und Kametaka [23] berichten über die gelungene Hydrolyse des α -Aminopropionaldehydiethylacetals, die zum freien Aldehyd geführt haben soll, den sie jedoch nicht als Reinsubstanz fassen konnten. Auch andere Methoden, wie z.B. die Oxidation von α -Aminoalkoholen mit Pyridiniumdichromat [22] oder deren enzymatische Oxidation durch Alkoholdehydrogenasen [24] ergaben nur dann stabile Produkte, wenn eine Schutzgruppe eingeführt [22] bzw. der gebildete Aldehyd sofort als Semicarbazone abgefangen wurde [24]. Im Falle von Glu-SA deutet die rasche Rotfärbung nachweislich aldehydhaltiger Reduktionsansätze darauf hin, daß der freie Aminoaldehyd sofort polymerisiert. Es scheint daher wenig aussichtsreich, Glu-SA als Reinsubstanz zu erhalten und charakterisieren zu können. Nach unseren Erfahrungen ist

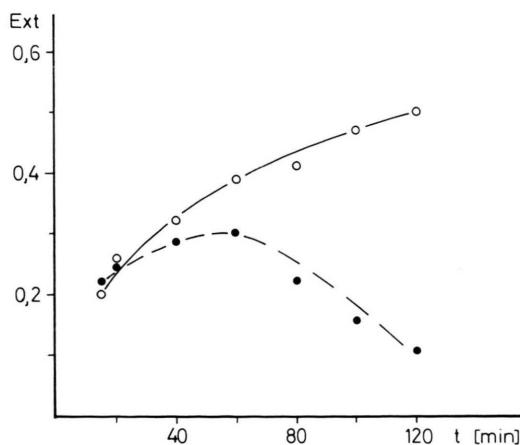


Abb. 1. Spektroskopische Verfolgung der Reduktion von Glutaminsäure-1-(N-methyl)anilid **4b** mit LiAlH_4 . Detektion des gebildeten Aldehyds bei 660 nm (●—●) und des abgespaltenen N-Methylanilins bei 580 nm (○—○) jeweils nach Reaktion mit MBTH.

daher die Arbeit von Kannangara und Gough [5] nicht nachvollziehbar, da Glu-SA, selbst wenn er in Lösung entstanden wäre, eine Abtrennung über Ionenaustauscher nicht übersteht. Gegen die gelungene Synthese der Autoren sprechen zudem Beobachtungen aus dem Reaktionsablauf selbst: Bei der Rosenmund-Reduktion der Säurechloride **12c** und **12d** wird im Falle des Methylesters **12c** bei Raumtemperatur keine HCl-Entwicklung beobachtet, während bei 80 °C HCl freigesetzt und mit MBTH Aldehyd nachgewiesen wurde. Dies deutet auf eine zu niedrige Reaktionstemperatur bei der früheren Synthese [5] hin. Der Benzylester **12d** dagegen entwickelt bei 0 °C bereits HCl, ohne daß dabei Aldehyd entsteht. Es wird vielmehr nur die Benzylgruppe abhydriert, so daß mit dem Säurechlorid und der freigelegten 5-Carboxylgruppe unter HCl-Austritt das zyklische Anhydrid gebildet wird. Nach Aufarbeitung und Hydrazinolyse findet man lediglich Glutaminsäure. Bei Kannangara und Gough [5] wurde aber zusätzlich auch die Aminoschutzgruppe abhydriert, so daß Nebenreaktionen ablaufen konnten, die möglicherweise zu Di-(poly)-peptiden führten, welche mit Ninhydrin eine Gelbfärbung erzeugen. Nach diesen Befunden über den Reaktionsablauf und die Stabilität des Glu-SA können die Autoren keinen Aminoaldehyd als Substrat für eine enzymatische Umsetzung zu ALA zur Verfügung gehabt haben, so daß der von ihnen vorgeschlagene neue Weg von Glutaminsäure zu ALA hypothetisch bleibt. Die hier gewonnenen Erkenntnisse über die Reaktivität und die damit verbundene Instabilität des α -Aminoaldehyds lassen die Annahme zu, daß Glu-SA als freier Metabolit in der Zelle sicher keine Rolle spielt. Es wäre allenfalls eine enzymgebundene Form denkbar, die sich aus den tautomeren Grenzstrukturen der Schiff-Basen mit Pyridoxal-/Pyridoxaminphosphat und 4,5-Dioxovalerianäure (s. Schema 1) im Transaminasegleichgewicht ableiten ließe, jedoch bleibt die Frage nach der Relevanz solcher Strukturen offen, solange man nicht über den Mechanismus der Enzymreaktion genauer informiert ist.

4. Experimentelles

UV: Zeiss PMQ II; NMR: Varian A 60, TMS als innerer Standard, δ in ppm. Schmelzpunkte: Leitz Mikroskopheiztisch 350.

HPLC: Waters 6000 A Pumpe, Perkin-Elmer 650/10 LC Fluoreszenz-Detektor; Chromatographie an Umkehrphasen, Waters RPC-18 Säule (25 cm × 4 mm), Träger: Hypersil C-18 (10 μm); Elutionsmittel: Methanol/Wasser 2:1 mit 0,75% Eisessig.

Aldehyd wurde mit 3-Methylbenzthiazolin-2-onhydrazon (MBTH) und FeCl₃ nachgewiesen [16]. Glu-SA bzw. DOVA wurden mit 2,3-Diaminonaphthalin bei pH 8,3 nach Porra und Klein [25] kondensiert, das Benzochinoxalin **14** bei pH 6,0 ausgeethert, nach Abziehen des Ethers in Methanol gelöst und mittels HPLC detektiert.

*N-Benzoyloxycarbonyl-L-Glutaminsäure **1a*** (modifiziert nach [13])

Zu 41,2 g L-Glutaminsäure in 500 ml Wasser gab man 28,0 g feingepulvertes MgO. Die Suspension wurde bei 0 °C mit 120 ml Diethylether überschichtet. Unter Eiskühlung und starkem Rühren wurden 94,8 g (80 ml) Benzoyloxycarbonylchlorid in 10 Portionen innerhalb 30 min eingetragen. Nach 4 Std. wurde filtriert, die Lösung dreimal mit je 100 ml Diethylether extrahiert und die Etherextrakte verworfen. Nach Ansäuern mit konz. HCl schied sich **1a** als Öl ab, das in 100 ml Essigsäureethylester aufgenommen und von der wäßrigen Phase abgetrennt wurde. Letztere wurde noch viermal mit je 100 ml Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten Extrakte nach Waschen mit verd. HCl über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurde in 80 ml CHCl₃ aufgenommen und bis zur beginnenden Trübung mit Diethylether versetzt. Nach Einsetzen der Kristallisation fügte man weitere 200 ml Ether hinzu und beließ 24 Std. im Kühlschrank. Man erhielt 55,6 g (68%) farblose Kristalle vom Schmp. 119 °C [13].

*N-Benzoyloxycarbonyl-L-Glutaminsäureanhydrid **2***

40 g (0,138 mol) **1a** wurden in 200 ml frisch destilliertem Acetanhydrid bei 60 °C gelöst. Nach Einrotieren wurde der Rückstand in 20 ml trockenem CHCl₃ aufgenommen und mit der gleichen Menge an Diethylether versetzt. Nach beginnender Kristallisation wurde **2** durch Zugabe von 100 ml Diethylether gefällt. Man erhielt 34 g (95%) farblose Kristalle vom Schmp. 93 °C.

¹H-NMR (DMSO) δ = 7,7–7,5 (d; breit; 1 H, NH), 7,43 (s; 5 H, Aromaten – H), 5,15 (s; 2 H, OCH₂), 4,85–4,45 (m; 1 H, CH), 3,1–2,8 (m; 2 H, CH₂), 2,2–1,8 (m; 2 H, CH₂).

N-Benzylloxycarbonyl-L-Glutaminsäure-1-dimethylamid 3a

30,0 g (0,11 mol) **2** wurden in 100 ml trockenem CHCl₃ gelöst und bei 0 °C trockenes Dimethylamin eingeleitet. Nach ca. 3 Std. wurde einrotiert, das zurückbleibende Öl (40 g) in 33 ml Aceton aufgenommen und vorsichtig mit 27 ml 4 M HCl versetzt. Nach Abkühlen auf 4 °C erhielt man 19,3 g (54%) **3a** in farblosen Kristallen vom Schmp. 122 °C.



Ber. C 58,4 H 6,40 N 9,09

Gef. C 58,3 H 6,54 N 9,20.

L-Glutaminsäure-1-dimethylamid 4a

3,0 g (17 mmol) **3a** wurden in 60 ml Methanol gelöst und mit 2 ml Eisessig versetzt. Nach Zugabe von 0,5 g Pd-Aktivkohle (10% Pd) leitete man bei Raumtemperatur 1 Std. Wasserstoff ein. Nach Filtration wurde einrotiert und der ölige Rückstand in Isopropanol aufgenommen. **4a** scheidet sich dabei kristallin ab.

Weiteres Produkt erhält man durch Zugabe von Diethylether. Man erhielt 1,58 g (94%) farblose Kristalle vom Schmp. 230 °C (Zers.).



Ber. C 48,2 H 8,04 N 16,09

Gef. C 48,3 H 8,11 N 16,03.

N-Benzylloxycarbonyl-L-Glutaminsäure-1-(N-methyl)anilid 3b und L-Glutaminsäure-1-(N-methyl)anilid 4b

Zu 5,22 g (20 mmol) **2** in 50 ml THF wurden 2,14 g frisch dest. N-Methylanilin in 20 ml THF innerhalb 30 min unter Röhren zugetropft. Nach 24 Std. hat sich das N-Methylanilin vollständig umgesetzt. Kristallisierungsversuche des nach Abziehen des Lösungsmittels erhaltenen ölichen Produkts scheiterten. Die Charakterisierung erfolgte über **4b**, das durch Abhydrieren der Schutzgruppe (s. bei **5**) erhalten wurde. Man gewann 4,2 g **4b** (91% bez. auf **2**) in Form farbloser Kristalle vom Schmp. 232 °C.



Ber. C 61,0 H 6,77 N 11,86

Gef. C 61,3 H 6,98 N 11,77.

Pyroglutaminsäure 7 und Pyroglutaminsäureimidazolid 8

7 wurde nach Brenner und Rickenbacher [14] aus Glutaminsäure dargestellt. 5,0 g (38 mmol) **7** wurden in THF suspendiert und mit 6,2 g (38 mmol) Carbonyldiimidazol geführt. Nach beendeter CO₂-Entwicklung (ca. 20 Std.) wurde erwärmt und das Imidazolid abgesaugt. Waschen mit 2 × 25 ml heißem THF hinterließ reines Produkt **8**. Ausbeute 4,5 g (66%), Schmp. 162 °C.



Ber. C 53,55 H 5,55 N 23,33

Gef. C 53,10 H 5,83 N 23,07.

2,4-Dinitrophenylhydrazone von N-CBO-Glutaminsäure-1-semialdehyd 6 und Pyroglutaminsäure-1-aldehyd 9

Zu 307 mg (1 mmol) **3a** in 10 ml THF wurden bei –10 °C 3,65 ml Li(OC₂H₅)₃AlH-Lösung (2,5 mmol H[–] in THF) innerhalb 10 min zugetropft. Nach 60 min wurde unter Eiskühlung mit 2,5 M H₂SO₄ hydrolysiert und anschließend der größte Teil des THF im Vakuum abgezogen. Der gebildete Aldehyd **6** wurde mit 10 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung (0,4 g in 2 ml konz. H₂SO₄ und 13 ml 60prozentigem Ethanol) als das entsprechende Hydrazon ausgefällt und aus Wasser/Methanol umkristallisiert. Ausbeute 53 mg (14%) gelbe Kristalle vom Schmp. 116 °C.



Ber. C 51,23 H 4,27 N 15,73

Gef. C 51,20 H 4,52 N 15,80.

Analog erhielt man aus 1,13 g **8** nach Reduktion mit LiAlH₄ in THF (10 mmol H[–]) und Ausfällen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin 0,27 g (18%) des 2,4-Dinitrophenylhydrazons von **9** als gelbe Kristalle vom Schmp. 154 °C.



Ber. C 54,05 H 3,75 N 23,8

Gef. C 54,82 H 3,81 N 23,4.

N-Phthaloyl-L-Glutaminsäure-5-methylester **11c** und 5-benzylester **11d** sowie die jeweiligen Säurechloride **12c** und **12d** wurden nach King *et al.* [26, 27] dargestellt.

Dank

Wir danken Herrn Prof. Dr. Th. Eicher, Saarbrücken, für hilfreiche Diskussionen und für die

Durchsicht des Manuskripts; der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für finanzielle Unterstützung im Projekt Me 245/4-1.

- [1] S. I. Beale, Phil. Trans. R. Soc. Lond. **B 273**, 99 (1976).
- [2] R. J. Porra und L. H. Grimmie, Int. J. Biochem. **9**, 883 (1978).
- [3] S. Granick und S. I. Beale, Adv. Enzymol. **46**, 33 (1978).
- [4] D. Dörnemann und H. Senger, Biochim. Biophys. Acta **628**, 35 (1980).
- [5] C. G. Kannangara und S. P. Gough, Carlsberg Res. Comm. **43**, 185 (1978).
- [6] O. Bayer, in Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl) (E. Müller, Hrsg.), Bd. VII/1, S. 276, Thieme Verlag, Stuttgart 1954.
- [7] E. Winterfeld, Synthesis **1975**, 617.
- [8] K. W. Rosenmund, Ber. Dtsch. Chem. Ges. **52**, 1927 (1919).
- [9] H. C. Brown und A. Tsukamoto, J. Am. Chem. Soc. **86**, 1089 (1964).
- [10] F. Weygand, G. Eberhardt, H. Linden, F. Schäfer und I. Eigem, Angew. Chem. **65**, 525 (1953).
- [11] H. A. Staab und H. Bräunling, Liebigs Ann. Chem. **654**, 119 (1962).
- [12] K. Balenovic, N. Bregant, D. Cesar, D. Fles und I. Jambresic, J. Org. Chem. **18**, 297 (1953).
- [13] Z. Bergmann und L. Zervas, Ber. Dtsch. Chem. Ges. **65**, 1192 (1932).
- [14] M. Brenner und H. R. Rickenbacher, Helv. Chim. Acta **21**, 181 (1957).
- [15] H. A. Staab, M. Lüking und F. H. Dürr, Chem. Ber. **95**, 1275 (1962).
- [16] E. Sawicki, T. R. Hauser, T. W. Stanley und W. Elbert, Anal. Chem. **33**, 93 (1961).
- [17] G. Gabrielson und O. Samuelson, Svensk. Chem. Tidskr. **64**, 150 (1952).
- [18] H. J. Kissel und J. L. Heilmeyer, Biochim. Biophys. Acta **177**, 78 (1968).
- [19] H.-U. Meisch, H. Hoffmann und W. Reinle, Biochim. Biophys. Acta **743**, 281 (1983).
- [20] E. Radde, Ber. Dtsch. Chem. Ges. **54**, 3174 (1921).
- [21] E. Adams, J. Biol. Chem. **217**, 317 (1955).
- [22] C. F. Stanfield, J. E. Parker und P. Kanellis, J. Org. Chem. **46**, 4797 (1981).
- [23] E. Fischer und T. Kametaka, Liebigs Ann. Chem. **364**, 7 (1909).
- [24] L. Andersson und R. Wolfenden, Anal. Biochem. **124**, 150 (1982).
- [25] R. J. Porra und O. Klein, Anal. Biochem. **116**, 511 (1981).
- [26] F. E. King, B. S. Jackson und D. A. A. Kidd, J. Chem. Soc. **1951**, 243.
- [27] F. E. King, J. W. Clarke-Lewis und R. Wade, J. Chem. Soc. **1957**, 886.