

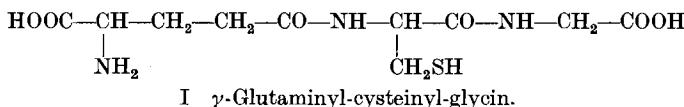
105. Über eine neue Synthese von Glutathion (γ -Glutamyl-cysteinyl-glycin)

von B. Hegedüs¹⁾.

(10. III. 48.)

a) Frühere Arbeiten.

Im Jahre 1921 isolierte *Hopkins*²⁾ aus Hefe, Blut und Säugetierleber eine Substanz, die er Glutathion nannte. Sie gab eine positive Nitroprussidreaktion und verriet dadurch eine freie SH-Gruppe in der Moleköl. Die Konstitution der Substanz, die zuerst für ein Dipeptid aus Glutaminsäure und Cystein angesehen wurde, wurde erst in den Jahren 1929 und 1930 von *Hopkins*, *Pirie* und *McKenzie*³⁾ sichergestellt. Darnach stellt das Glutathion (I) ein Tripeptid, bestehend aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin dar und hat folgende Konstitution:



Bevor die Konstitution des Glutathions sicher feststand, wurde von *Stewart* und *Tunnicliffe*⁴⁾ eine Synthese veröffentlicht, die zum vermeintlichen Glutathion führte. Es handelte sich hierbei um die Darstellung des Di- γ -glutamyl-cystins. Interessant ist in der Arbeit die Blockierung der α -ständigen Carboxylgruppe der Glutaminsäure, unter Ausbildung eines Hydantoinringes mit der α -ständigen Aminogruppe durch Einwirkung von Cyansäure; eine Reaktion, die zuerst durch *Dakin*⁵⁾ Anwendung fand. Die Aufspaltung des Hydantoinringes (mit Kalk oder Baryt) gibt aber nur sehr schlechte Ausbeuten.

Obwohl die Konstitution des Glutathions schon 1930 feststand, wurde erst 1935 die erste Synthese von *Harington* und *Mead*⁶⁾ veröffentlicht. Bis dahin konnte nämlich das in der Zwischenzeit bekannt gewordene Carbobenzoxy-Verfahren zur Darstellung von Dipeptiden von *Bergmann* und *Zervas*⁷⁾ für die Synthese des Glutathions nicht angewandt werden, da die Abhydrierung der Carbobenzoxygruppe in Verbindungen mit 2-wertigem Schwefel nicht gelang. *Harington* und *Mead* fanden im Phosphoniumjodid ein Reagens, das die Carbobenzoxygruppe in Eisessiglösung reduktiv aufspaltete, wobei auch die S-S-Bindung des Cystins hydrogenolierte wird. Ausgehend von Dicarbobenzoxy-cystin stellten sie über das Säurechlorid den Cysteinylglycinäthylester dar, der in Form seines Hydrojodids isoliert wurde. Zur Darstellung des geeigneten Glutaminsäurederivates wurde von der von *Bergmann* und *Zervas*⁸⁾ bei der Synthese des L(+)-Glutamins ge-

¹⁾ Vortrag gehalten an der Wintertagung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft in Lausanne am 29. Februar 1948.

²⁾ Hopkins, Biochem. J. 15, 286 (1921).

³⁾ Hopkins, J. Biol. Chem. **84**, 269 (1929), Pirie und Pinhey, J. Biol. Chem. **84**, 321 (1929); McKenzie und Mason, J. Biol. Chem. **87**, 55; **88**, 409 (1930).

⁴⁾ Stewart and Tunnicliffe, Biochem. J. **19**, 207 (1925).

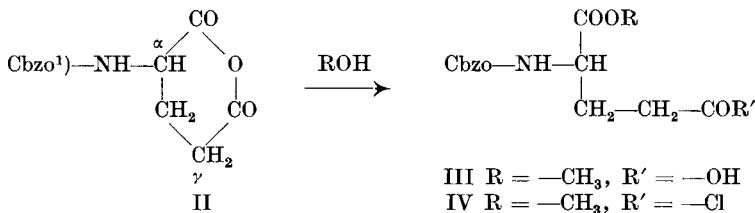
⁵⁾ Dakin, Am. **44**, 48 (1910); Biochem. J. **13**, 398 (1919).

⁶⁾ Harrington und Mead, Biochem. J. 29, 1602 (1935).

7) Beramann und Zervas, B. 65, 1192 (1932).

⁸⁾ Bergmann und Zervas, B. 65, 1192 (1932).

machten Beobachtung Gebrauch gemacht, dass die Alkoholyse des Carbobenzoxy-glutaminsäure-anhydrids (II) hauptsächlich Glutamin- α -ester- γ -säure (III) liefert:



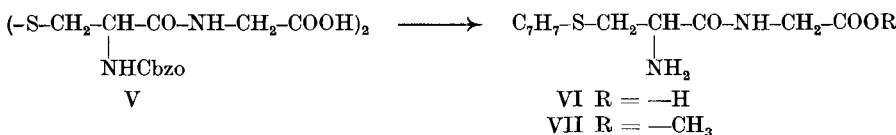
Die Aufspaltung von II mit Natriummethylat ergab den Halbester III. Die γ -Carboxylgruppe dieser Verbindung wurde chloriert und das Säurechlorid IV mit Cysteinyl-glycin-äthylester gekuppelt. Durch Verseifung und Reduktion des Kupplungsproduktes mit Phosphoniumjodid wurde Glutathion erhalten. Die Ausbeute betrug in der letzten Stufe 11% der Theorie.

Ungefähr zur gleichen Zeit fand *White*²⁾, dass Carbobenzoxygruppen in schwefelhaltigen Verbindungen mit konz. Salzsäure bei 60° auch hydrolytisch entfernt werden können. Das so erhaltene Dipeptid (Cystinyl-diglycin) war indessen amorph, zeigte aber korrekte Analysenwerte.

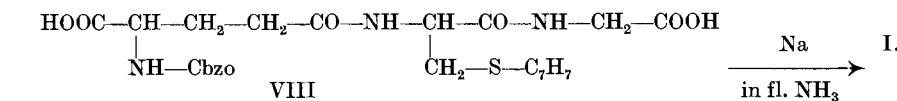
Die Darstellung des kristallisierten Cystinyl-diglycins und einiger ähnlicher Verbindungen gelang erst *du Vigneaud* und seiner Schule³⁾, als sie zur Hydrogenolyse der Carbobenzoxygruppe Natrium in flüssigem Ammoniak verwendeten.

Das Auffinden dieser Reaktion und ferner die Möglichkeit, SH-Gruppen in flüssigem Ammoniak zu benzylieren, wobei NH_2 -Gruppen intakt bleiben⁴⁾, führte *du Vigneaud* und *Miller*⁵⁾ zu einer neuen Glutathionsynthese, in der aber das gleiche Glutaminsäurederivat wie bei der Harington'schen Synthese verwendet wurde.

Zuerst wurde Dicarbobenzoxy-cystyl-dichlorid mit Glykocollester gekuppelt und dann zu Dicarbobenzoxy-cystyl-diglycin (V) verseift. Durch Einwirkung von Natrium in flüssigem Ammoniak werden die beiden Carbobenzoxygruppen abgespalten, gleichzeitig die S-S-Bindung hydrogenolysiert und die so entstandenen SH-Gruppen durch Einwirkung von Benzylchlorid erneut blockiert. Man erhält so S-Benzyl-cysteinyl-glycin (VI):



S-Benzyl-cysteinylglycin (VI) wurde dann in seinen Methylester VII verwandelt und dieser mit dem Chlorid IV gekuppelt. Nach Verseifung wurde S-Benzyl-N-carbo-benzoxy-glutathion (VIII) erhalten, das bei der Reduktion mit Natrium in flüssigem Ammoniak in Glutathion übergeht:



¹⁾ Cbz- bedeutet den Rest des Kohlensaure-mono-benzylesters: $C_7H_7O \cdot CO-$.

²⁾ White, J. Biol. Chem. **106**, 141 (1934).

³) du Vigneaud und Loring, J. Biol. Chem. 111, 385, (1935); du Vigneaud und Patterson, J. Biol. Chem. 111, 393 (1935).

⁴⁾ Über eine einzige bis jetzt bekannte Ausnahme siehe: *du Vigneaud* und *Behrens*, J. Biol. Chem., **117**, 27 (1937).

⁵) *du Vigneaud und Miller, J. Biol. Chem.*, **116**, 469 (1936).

b) Die neue Synthese des Glutathions.

Die neue Synthese des Glutathions wurde in 3 Etappen durchgeführt. Als leitendes Prinzip diente die Tatsache, dass im Glutathion die γ -Glutaminylbinding die labilste ist, welche somit zuletzt in die Molekel eingebaut wurde, um sie möglichst wenig der Einwirkung verschiedener Reagenzien zu unterwerfen. Bis zur letzten Stufe wurde ebenfalls die SH-Gruppe durch Verätherung mit dem Benzylrest blockiert. Ferner wurde im Laufe der ganzen Synthese die Darstellung der Säurechloride vermieden und der Weg über die Säureazide gewählt, die gut aus den entsprechenden Säurehydraziden mit salpetriger Säure zugänglich sind.

1. Synthese des S-Benzyl-L-cysteinyl-glycins (VI).

Diese bereits von *du Vigneaud*¹⁾ hergestellte Verbindung wurde auf einem anderen, einfacheren Wege aufgebaut, indem ohne Isolierung der verschiedenen Zwischenstufen gearbeitet werden konnte.

Zuerst wurde S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cysteinyl-hydrazid (XIII) dargestellt. Diese Verbindung wurde schon von *Harington* und *Rivers*²⁾ auf einem etwas anderen Wege erhalten.

Als Ausgangsmaterial diente das S-Benzyl-L-cystein (X)³⁾, für dessen Darstellung in grösseren Mengen L-Cystein-hydrochlorid (IX) dem L-Cystin vorzuziehen ist. Man benötigt für die Neutralisation der Salzsäure 1 Atom Natrium mehr. Das so erhaltene S-Benzyl-L-cystein hatte eine etwas höhere spez. Drehung als von *du Vigneaud* angegeben ($[\alpha]_D = +29^\circ$ ($c = 2$ in n. NaOH)⁴⁾.

Im weiteren Verlaufe der Arbeit hat es sich gezeigt, dass es nicht nötig ist, S-Benzyl-L-cystein zuerst zu verestern und dann zu carbobenzoxylieren, da S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cystein (XI) durch Kochen mit Methanol und konz. Schwefelsäure gut verestert werden kann. Ersatz der Schwefelsäure durch Salzsäure bewirkte Zersetzung unter Bildung von Benzylchlorid.

S-Benzyl-L-cystein wurde also zuerst in das bekannte S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cystein (XI)⁵⁾ übergeführt, dieses ohne weitere Reinigung mit Methanol und Schwefelsäure zu S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cystein-methylester (XII) verestert, der ebenfalls ohne weitere Reinigung mit Hydrazinhydrat zu S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cysteinyl-hydrazid (XIII) umgesetzt wurde. Die Ausbeute an XIII beträgt auf S-Benzyl-L-cystein berechnet, 72% der Theorie.

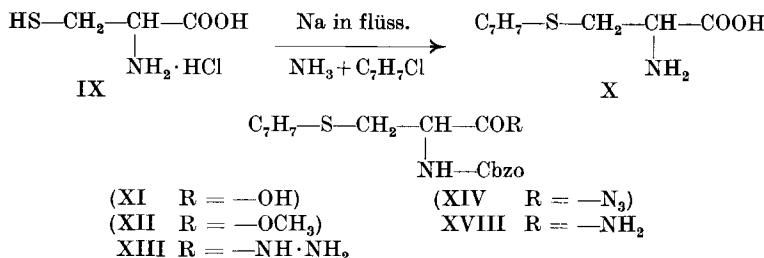
¹⁾ *du Vigneaud* und *Loring*, J. Biol. Chem. **111**, 385 (1935).

²⁾ *Harington* und *Rivers*, Biochem. J. **38**, 417 (1944).

³⁾ *Clarke* und *Inouye*, J. Biol. Chem. **94**, 541 (1931); *du Vigneaud* und *Wood*, J. Biol. Chem. **130**, 110 (1939).

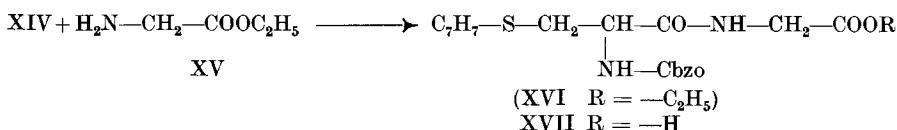
⁴⁾ *du Vigneaud* und *Wood* (l. c.) geben $[\alpha]_D = +23,8^\circ$ ($c = 1$ in n. NaOH) an.

⁵⁾ *Harington* und *Mead*, Biochem. J. **29**, 1602 (1935).

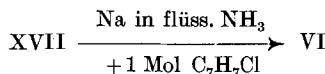


Die in Klammern befindlichen Verbindungen werden im Laufe der Synthese nicht isoliert.

Durch Einwirkung von salpetriger Säure auf XIII erhält man das entsprechende Säureazid XIV, das in Essigesterlösung mit Glykokoll-äthylester (XV)¹⁾ zu S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cysteinyl-glycin-äthylester (XVI) gekuppelt wurde. Der Ester wird ohne Isolierung verseift und so S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cysteinyl-glycin (XVII) erhalten. Daneben entstehen durch Zersetzung des Säureazids XIV erhebliche Mengen von S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cysteinylamid (XVIII)²⁾.



Die Verbindung XVII wird in flüssigem Ammoniak gelöst, mit Natrium bis zur Blaufärbung versetzt und gleich darauf 1 Mol Benzylchlorid zugetropft. Unter „Rebenzylierung“ der intermediär freigegebenen SH-Gruppe erhält man so S-Benzyl-L-cysteinylglycin (VI):



II. Synthese des Carbobenzoxy-L-glutamin- α -säure- γ -säurehydrazids (XXI).

Während im 1. Teil der Synthese eine bereits bekannte Verbindung auf neuem Wege dargestellt wurde, wurde zum Zwecke der Darstellung eines geeigneten Glutaminsäurederivates eine bis jetzt nicht beschriebene Verbindung: das Carbobenzoxy-L-glutamin- α -säure- γ -säurehydrazid (XXI) synthetisiert.

Ausgangspunkt zur Synthese von XXI bildete der schon von *Habermann*³⁾ dargestellte Halbester der L(+)-Glutaminsäure, der aber

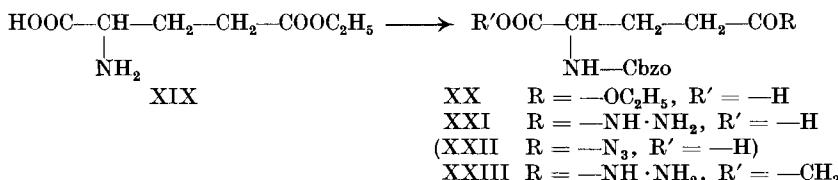
¹⁾ Für die Darstellung des freien Esters aus dem Hydrochlorid erwies sich die Methode von *Hillmann* (Z. f. Naturforschg. I, 682 [1946]) als sehr geeignet.

²⁾ Siehe hierzu die Bildung des Dicarbobenzoxy-L-lysylamids bei einer analogen Reaktion: *Prelog* und *Wieland*, Helv. 29, 1128 (1946).

³⁾ *Habermann*, A. 179, 254 (1875).

erst von *Bergmann* und *Zervas*¹⁾ richtigerweise als L(+)-Glutaminsäure- γ -äthylester (XIX) erkannt wurde. Diese Substanz wurde als Esterhydrochlorid in den ebenfalls bekannten Carbobenzoxy-L(+)-glutaminsäure- γ -äthylester (XX)²⁾ übergeführt.

Der Umsatz des Halbesters XX mit Hydrazinhydrat bereitete zunächst Schwierigkeiten. Durch Kochen mit der berechneten Menge Hydrazinhydrat in Alkohol wurde keine Umsetzung erzielt, während Übergiessen mit überschüssigem Hydrazinhydrat, nachheriges Verdünnen mit Wasser und Neutralisieren, fast kein Material lieferte. Nach weiteren Versuchen stellte es sich heraus, dass sich beim Umsatz mit Hydrazinhydrat das Hydrazinsalz der Hydrazidsäure XXI bildet, das sich erst in kongosaurem Medium zersetzt. Nach der im experimentellen Teil beschriebenen Arbeitsweise konnte dann die Verbindung XXI ohne Schwierigkeiten isoliert werden.



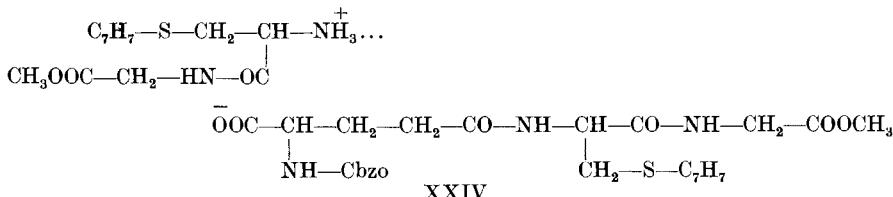
Die Darstellung des Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- α -methyl-ester- γ -hydrazids (XXIII) aus XXI gelang nicht, da die Veresterung der α -ständigen Carboxylgruppe ohne gleichzeitige Abspaltung des Hydrazidrestes am γ -Carboxyl nicht bewerkstelligt werden konnte. Beim Stehenlassen von XXI mit Methanol und konz. Schwefelsäure scheidet sich in kurzer Zeit Hydrazinsulfat aus.

III. Kupplung von Carbobenzoxy-L-glutamin- α -säure- γ -azid (XXII) mit S-Benzyl-L-cysteinyl-glycin-methyl-ester (VII). Synthese des Glutathions.

In der letzten Stufe der Synthese wird das aus XXI durch Einwirkung von salpetriger Säure zugängliche Carbobenzoxy-L-glutamin- α -säure- γ -azid (XXII) mit S-Benzyl-L-cysteinylglycin-methylester (VII) gekuppelt. Da die Verbindung XXII im α -Carboxyl ein ionogenes Wasserstoffatom enthält, müssen auf 1 Mol Säureazid XXII 2 Mol Esterbase VII angewandt werden. Wird die Kupplung in absolutem Äther vorgenommen, so fällt beim Zusammengießen der Komponenten eine ölige, allmählich fest werdende Substanz aus, in der das Salz des S-Benzyl-L-cysteinyl-glycin-methylesters mit S-Benzyl-N-carbobenzoxy-glutathion-monomethylester (XXIV) vorliegen muss und das folgende Formel besitzt:

¹⁾ *Bergmann* und *Zervas*, Z. physiol. Ch. **221**, 51 (1933).

²⁾ *Abderhalden* und *Nienburg*, Z. physiol. Ch. **219**, 157 (1933); *Nienburg*, B. **68**, 2232 (1938).



Diese Verbindung wird dann mit verdünnter Natronlauge zerstellt, wobei unter Spaltung der salzartigen Verbindung XXIV und Verseifung der Carbomethoxy-Gruppe das von *du Vigneaud*¹⁾ bereits beschriebene S-Benzyl-N-carbobenzoxy-glutathion erhalten wird. Dieses liefert beim Umsatz mit Natrium in flüssigem Ammoniak unter Spaltung der Carbobenzoxy- und der Benzyläthergruppe Glutathion. Das über seine Quecksilber(II)-sulfatverbindung und über sein Kupfer(I)-salz gereinigte Glutathion erwies sich als identisch mit dem Naturprodukt.

Experimenteller Teil.

(Alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert.)

S-Benzyl-L-cystein (X).

Ein 3-Liter-Dreihalskolben, der mit Rührer und Natronkalkrohr versehen und dessen dritte Öffnung mit einem Korkstopfen verschlossen ist, wird mit ca. 1,5 Liter flüssigem Ammoniak beschickt. Man setzt nun den Rührer in Gang und trägt portionenweise 100 g L-Cystein-hydrochlorid ein. Der Kolben wird zur Isolierung in ein leeres Emailbecken gestellt. Eine Kühlung ist nicht notwendig. Durch die Verdunstungswärme des Ammoniaks kühlt sich der Kolben selbst. Verdampfendes Ammoniak wird von Zeit zu Zeit nachgefüllt.

Ist alles L-Cystein-hydrochlorid eingetragen, so beginnt man mit dem Eintragen des Natriums in kleinen Stücken, bis zur bleibenden Blaufärbung. Man benötigt hierzu 45—45,5 g Natrium (ber. für 3 Atome: 46,7 g). Zum Eintragen des Natriums braucht man 2—2½ Stunden. Mit Ammoniumchlorid wird die Blaufärbung zum Verschwinden gebracht und dann in 10—15 Minuten 80 cm³ Benzylchlorid zugetropft. Nach beendeten Zutropfen lässt man das Ammoniak verdampfen. Um dies zu beschleunigen, stellt man den Kolben in kaltes Wasser und entfernt den Korkstopfen. Der Rührer wird abgestellt. Zum Schluss wird 30—40 Minuten bei 40—50° evakuiert, um möglichst alles Ammoniak zu entfernen.

Der zurückbleibende, schwach graue Rückstand wird in 750 cm³ Wasser gelöst und durch Ausschütteln mit Äther die ölichen Verunreinigungen entfernt. Durch kurzes Evakuieren der wässrigen Schicht wird der Äther verdampft; dann wird die Lösung mit Kohle filtriert, auf ca. 3 Liter mit Wasser verdünnt und das S-Benzyl-L-cystein durch Einstellen der wässrigen Lösung mit Salzsäure auf pH = 5—6 ausgefällt. Nach Stehen über Nacht im Eisschrank wird abgenutscht und mit Wasser bis zur Entfernung der Chlorionen gewaschen. Das so erhaltene S-Benzyl-L-cystein ist zum Weiterverarbeiten genügend rein. Ausbeute: 110 g, d. s. 82% der Theorie. Smp. 208—211°; [α]_D = +29° (c = 2 in n. NaOH).

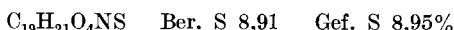
S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cysteinyl-hydrazid (XIII).

60 g S-Benzyl-L-cystein werden in 800 cm³ 2-n. Natronlauge gelöst und unter Eiskühlung und Rühren tropfenweise mit 58 g Carbobenzoxychlorid versetzt. Nach dem

¹⁾ *du Vigneaud* und *Miller*, J. Biol. Chem. **116**, 469 (1936).

Zutropfen wird noch $\frac{1}{4}$ Stunde gerührt, dann bringt man durch Zugabe von Wasser eventuell ölig ausgeschiedenes Natriumsalz wieder in Lösung und äthert zur Entfernung von Verunreinigungen die alkalische Lösung aus. Man macht mit Salzsäure kongosauer und nimmt das ausfallende Öl in 700—800 cm³ Essigester auf. Die getrocknete Essigesterlösung hinterlässt das S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cystein¹⁾ als bald erstarrendes Öl (ca. 80—82 g), das ohne Isolierung sofort der Veresterung unterworfen wird.

Man löst in 1 Liter Methylalkohol, gibt 20 cm³ konz. Schwefelsäure hinzu und kocht unter Chlorcalciumrohrverschluss 3 Stunden am Rückfluss. Man dampft im Vakuum ein, verdünnt mit Wasser, äthert aus und entsäuerst den Äther durch Waschen mit 2-n. Soda-Lösung. Nach Abdampfen des Äthers hinterbleiben 88—90 g S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cystein-methylester (XII) als sofort erstarrendes Öl. Er ist zum Weiterarbeiten genügend rein. Eine Probe wird zur Analyse aus Benzol-Petroläther umkristallisiert und schmilzt dann bei 66—67°.



Die Hauptmenge wird in 200 cm³ Alkohol gelöst, mit 17 cm³ Hydrazinhydrat versetzt und 24 Stunden stehen gelassen. Bald beginnt die Abscheidung des Hydrazids in langen Nadeln. Nach dem Abnutzen wird mit wenig Alkohol und viel Äther gewaschen. Smp. 133—135°²⁾; $[\alpha]_D = -14,3^\circ$ (c = 1 in Feinsprit).

Die Ausbeute beträgt 74 g S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cysteinyl-hydrazid, d. s. 72% der Theorie auf S-Benzyl-L-cystein berechnet.

Kupplung von S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cysteinyl-azid (XIV) mit Glykokolläthylester (XV), Darstellung von S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cysteinyl-glycin (XVII).

Darstellung von freiem Glykokoll-äthylester³⁾.

60 g Glykokoll-äthylester-hydrochlorid werden in 200 cm³ Chloroform suspendiert und die Suspension unter Eiskühlung und Schütteln langsam mit 350 g 2½-proz. Ammoniak-Chloroformlösung⁴⁾ versetzt. Nach der Zugabe muss Ammoniakgeruch deutlich wahrnehmbar sein. Nach 10 Minuten wird das Ammoniumchlorid abgenutscht und das Filtrat im Vakuum bei Zimmertemperatur vom Chloroform befreit. Glykokoll-äthylester (XV) hinterbleibt als kaum gefärbtes Öl, das ohne weitere Reinigung zur Umsetzung verwendet werden kann. Die Ausbeute beträgt 37 g, d. s. 80% der Theorie.

Kupplung.

In einem 2-Liter-Scheidetrichter werden ca. 5—600 g Eis mit 85 cm³ konz. Salzsäure und 85 cm³ Eisessig vermischt. Man überschichtet mit 500 cm³ Essigester und trägt hierauf 70 g S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cysteinyl-hydrazid ein. Beim Umrühren erfolgt Auflösung. Dann werden in 3—4 Anteilen 23 g Natriumnitrit in 60 cm³ Wasser gelöst zugegeben, wobei nach jeder Zugabe durchgeschüttelt wird, um das gebildete Säureazid XIV sofort in den Essigester zu treiben⁵⁾. Nach Zugabe der Nitritlösung lässt man die wässrige Schicht sofort ab⁶⁾ und wäscht die Essigesterlösung 2mal mit je 100 cm³ Eiswasser aus. Nach 10 Minuten langem Trocknen mit Natriumsulfat unter Eiskühlung filtriert man die Säureazidlösung in einen 2-Liter-Dreihalskolben, der mit Rührer, Tropftrichter und Chlorcalciumrohr versehen ist und in Eiswasser gekühlt wird. Unter Rühren lässt man die oben dargestellte Glykokollester-

¹⁾ Harington und Mead, Biochem. J. **30**, 1602 (1935).

²⁾ Harington, Biochem. J. **38**, 419 (1944), gibt den Smp. 135° an.

³⁾ Hillmann, Z. f. Naturforschg. **1**, 682 (1946).

⁴⁾ In 1 kg Chloroform wird unter Eiskühlung trockenes Ammoniakgas bis zu einer Gewichtszunahme von 25 g eingeleitet.

⁵⁾ Man achte darauf, daß während der Umsetzung mit der salpetrigen Säure immer überschüssiges Eis vorhanden ist.

⁶⁾ Die stark saure wässrige Schicht wirkt zersetzend auf das Säureazid.

base, gelöst in 150 cm³ Essigester, in 15—20 Minuten zutropfen. Nach weiterem, 1-stündigem Röhren stellt man den Kolben über Nacht in den Eisschrank, überführt dann den Inhalt in einen Scheidetrichter und lässt die untere ölige Schicht ab, die verworfen wird. Die Essigesterlösung wird mit 200 cm³ 1,5-n. Salzsäure, 200 cm³ gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 500 cm³ Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wird der Essigester im Vakuum bei 30—40° verdampft, der Rückstand in 200 cm³ Dioxan gelöst und mit 90 cm³ 3-n. Natronlauge versetzt. Nach 10 Minuten gibt man weitere 150 cm³ Wasser hinzu, um ausgeschiedenes öliges Natriumsalz in Lösung zu bringen. Nach insgesamt 1-stündigem Stehen wird mit verdünnter Salzsäure auf pH = 5 eingestellt und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird mit 500 cm³ Essigester und etwas Wasser in einen Scheidetrichter übergeführt und zuerst mit einer Mischung von 125 cm³ 2-n. Sodalösung und 125 cm³ Wasser durchgeschüttelt. Hierbei bilden sich 3 Schichten aus: Essigesterlösung, öliges Natriumsalz und Sodalösung. Man lässt die Sodalösung ab und bringt das ölige Natriumsalz mittels Durchschütteln mit 2 × 250 cm³ Wasser in Lösung (Aufarbeitung der Essigesterlösung siehe weiter unten). Die wässrige, sodaalkalische Lösung wird zur Entfernung von mitgerissenem Essigester kurze Zeit bei 30° evakuiert¹⁾. Nach Zugabe von Eis wird die Lösung mit konz. Salzsäure kongosauer gestellt. Das S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cysteinyl-glycin fällt zuerst ölig aus und erstarrt nach kurzer Zeit zu einer klumpigen Masse. Nach Stehen über Nacht im Eisschrank wird abgenutscht und mit 1 Liter Wasser gewaschen. Die Rohausbeute beträgt 37 g. Zur Reinigung wird in 200 cm³ kochendem Essigester gelöst, mit Kohle filtriert und mit 400 cm³ Petroläther gefällt. Man erhält so 32 g weisses, undeutlich krystallines Pulver vom Smp. 80—82°.

C₂₀H₂₂O₅N₂S Ber. N 6,96 S 7,96%
 Gef. „, 6,70 „, 7,93%

[α]_D = -35° (c = 2 in Feinsprit).

Aufarbeitung der Essigesterlösung: Die entsäuerte Essigesterlösung wird mit Natriumsulfat getrocknet, auf 100 cm³ eingedampft und mit 200 cm³ Petroläther gefällt. Nach Abkühlen wird abgenutscht. Man erhält 14 g weiße Krystalle vom Smp. 132°. Zur Analyse wird aus Benzol umkristallisiert. Der Schmelzpunkt steigt hierbei auf 134°. Es liegt das S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cysteinyl-amid (XVIII) vor. Mit dem Hydrazid XIII tritt in der Mischprobe Depression ein.

C₁₈H₂₀O₃N₂S Ber. N 8,14% Gef. N 7,99%
 [α]_D = -28° (c = 1 in Feinsprit).

Die Ausbeute an S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cysteinyl-glycin beträgt 50% auf das zur Kupplung verbrauchte Hydrazid XIII berechnet. (14 g Amid XVIII entsprechen 14,5 g Hydrazid XIII.)

S-Benzyl-L-cysteinyl-glycin (VI).

In ca. 1 Liter flüssigem Ammoniak werden 94 g S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cysteinyl-glycin gelöst und unter Röhren Natrium in kleinen Stücken bis zur bleibenden Blaufärbung eingetragen. Verbraucht wurden 23 g Natrium, entsprechend ca. 4 Atomen. Nachdem die Blaufärbung mit Ammoniumchlorid zum Verschwinden gebracht wurde, werden 28 cm³ Benzylechlorid zwecks „Rebenzylierung“ der SH-Gruppe zugetropft. Nach Verdampfen des Ammoniaks wird der Rückstand in 800 cm³ Wasser gelöst, Toluol und Dibenzyl durch Äthers entfernt, die wässrige Schicht zur Entfernung des Äthers kurze Zeit evakuiert und nach dem Filtrieren mit Kohle mit Salzsäure auf pH = 4,5 gestellt²⁾. Über Nacht krystallisieren im Eisschrank 27 g S-Benzyl-L-cysteinyl-glycin aus.

¹⁾ Die vollständige Entfernung des Essigesters ist wichtig, da sonst mit Salzsäure nur eine unvollständige Fällung erzielt wird.

²⁾ Stellt man die Lösung auf pH = 5 ein, so krystallisiert in kleinen Mengen eine Substanz vom Smp. 182° aus, die isomer mit S-Benzyl-L-cysteinyl-glycin ist. Sie wurde nicht weiter untersucht.

Durch Einengen der Mutterlauge auf 250 cm³ erhält man weitere 7 g. Die Gesamtausbeute beträgt somit 34 g (71% der Theorie). Der Schmelzpunkt liegt bei 165°¹⁾.

C₁₂H₁₆O₃N₂S Ber. S 11,94% Gef. S 11,75%
[α]_D = +27° (c = 2 in n. NaOH).

L-Glutaminsäure-γ-äthylester (XIX).

Die in der Literatur beschriebene Vorschrift²⁾ wurde für etwas grossere Mengen wie folgt abgeändert:

30 g L-Glutaminsäure werden in 300 cm³ absolutem Alkohol, der 18 g Chlorwasserstoffgas gelöst enthält, suspendiert und 2 Stunden lang auf der Maschine geschüttelt. Nach dieser Zeit ist alles in Lösung. Man dampft bei 40° Badtemperatur im Vakuum ein, nimmt den Rückstand in 50 cm³ heissem Alkohol auf³⁾, filtriert von Verunreinigungen ab und versetzt das Filtrat mit 300 cm³ absolutem Äther. Das Hydrochlorid des Halbesters fällt sofort⁴⁾ krystallin aus. Man lässt über Nacht im Eisschrank krystallisieren, nutscht ab, wäscht mit Äther und trocknet im Vakuumexsikkator über Natronkalk. Ausbeute: 31 g L-Glutaminsäure-γ-äthylester-hydrochlorid (85% der Theorie). Der Schmelzpunkt liegt scharf bei 134—135°. Das Hydrochlorid wird so weiterverarbeitet. Die freie Base erhält man durch Auflösen des Hydrochlorids in Alkohol und Fällen mit Pyridin. Schmelzpunkt von XIX: 192°. [α]_D = +14° (c = 1 in Wasser).

Carbobenzoxy-L-glutaminsäure-γ-äthylester (XX).

28 g L-Glutaminsäure-γ-äthylester-hydrochlorid (entsprechend 23,2 g Base) werden in 174 cm³ Wasser gelöst und durch tropfenweise Zugabe von 3-n. Natronlauge auf pH = 5 gestellt. Dann gibt man 11,6 g Natriumhydrogencarbonat hinzu und, wenn dieses gelöst ist, 10 g Magnesiumoxyd. Unter kräftigem Rühren und Aussenkühlung mit Eiswasser werden im Laufe von 15—20 Minuten 40 g Carbobenzoxychlorid zugetropft. Man röhrt dann noch 10 Minuten weiter⁵⁾, nutscht auf einer grossen Nutsche ab und schüttelt das Filtrat zwecks Entfernung von Verunreinigungen mit 200 cm³ Äther aus. Die wässrige Schicht wird kongosauer gestellt und das ausfallende Öl mit 2mal 200 cm³ Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wird mit 50 cm³ Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Es hinterbleiben 28 g Öl, das im Vakuum über Phosphorpentoxyd in kurzer Zeit erstarrt. Zur Reinigung löst man in siedendem Essigester (40 bis 50 cm³), versetzt mit Petroläther bis zur beginnenden Trübung und gibt, wenn die Krystallisation eingesetzt hat, insgesamt 200 cm³ Petroläther hinzu. Ausbeute: 23 g Carbobenzoxy-L-glutaminsäure-γ-äthylester (56% der Theorie). Smp. 76—78°.

Carbobenzoxy-L-glutamin-α-säure-γ-hydrazid (XXI).

20 g Carbobenzoxy-L-glutaminsäure-γ-äthylester werden auf einmal mit 20 cm³ Hydrazinhydrat übergossen und ohne Rücksicht auf die hierbei auftretende Selbst erwärmung 10—15 Minuten auf dem Dampfbad erhitzt. Es entsteht eine klare, gelbe Flüssigkeit. Man giesst in 500 cm³ Eiswasser und macht mit konz. Schwefelsäure vorsichtig kongosauer. Nach 15 Minuten wird das ausgeschiedene Hydrazinsulfat abgenutscht, mit wenig Wasser gewaschen, das Filtrat mit Natronlauge auf pH = 5 gestellt und im Vakuum bei 50° bis zu Sirupdicke eingedampft. Der Rückstand wird in 300 cm³ Wasser gelöst und mit Salzsäure auf pH = 3,8 gestellt. Beim Kratzen unter Eiskühlung tritt reichliche

¹⁾ du Vigneaud, J. Biol. Chem. 111, 385 (1935).

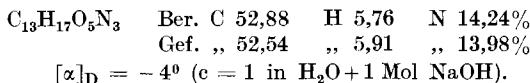
²⁾ Bergmann und Zervas, Z. physiol. Ch. 221, 51 (1933); Nienburg, B. 68, 2232 (1938).

³⁾ Der Alkohol muß vorgewärmt sein. Allzu langes Erwärmen der Substanz mit Alkohol bewirkt weitere Veresterung und somit Absinken der Ausbeute an Halbester.

⁴⁾ Es muss sofort eine krystallinische Fällung entstehen. Ist dies nicht der Fall, so ist die Veresterung zu weit fortgeschritten und der Versuch missglückt.

⁵⁾ Rasches Arbeiten begünstigt die Ausbeute.

Krystallisation ein. Nach 1 Stunde wird abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen. Die Rohausbeute beträgt 10,5 g vom unscharfen Smp. 155—165°. Zur Reinigung übergießt man das Rohprodukt mit 250 cm³ kochendem Wasser, kocht kurz auf bis alles gelöst ist und filtriert mit Kohle. Beim Erkalten krystallisieren 8,8 g lange, weisse Nadeln (44% der Theorie). Smp. 170—172°.



Beim Übergießen von XXI mit absolutem Methanol und Zugabe von 3—4 Tropfen konz. Schwefelsäure tritt nach 5—10 Minuten Abscheidung von Hydrazinsulfat ein, was auf eine Versifung des Hydrazids hindeutet.

Kupplung von Carbobenzoxy-L-glutamin- α -säure- γ -azid (XXII) mit S-Benzyl-L-cysteinyl-glycin-methylester (VII). Darstellung von S-Benzyl-N-carbobenzoxy-glutathion (VIII).

Darstellung von S-Benzyl-L-cysteinyl-glycin-methylester-base:

10 g S-Benzyl-L-cysteinyl-glycin werden in 200 cm³ Methylalkohol suspendiert und 3 Stunden lang in der Siedehitze trockenes Chlorwasserstoffgas eingeleitet. Man dampft zu Sirupdicke ein, löst in 200 cm³ Methylalkohol und sättigt erneut 3 Stunden lang mit Chlorwasserstoff. Nach erneutem Eindampfen im Vakuum zu Sirupdicke wird das sirupöse Esterhydrochlorid in 150 cm³ Chloroform gelöst. Die Lösung wird auf 0° gekühlt und mit 100 g 2½-proz. Ammoniak-Chloroformlösung¹⁾ versetzt. Das ausgeschiedene Ammoniumchlorid wird über einer mit Kohle gedichteten Nutsche filtriert und das Filtrat bei Raumtemperatur eingedampft. Es hinterbleiben 7,37 g Esterbase als gelbes, viskoses Öl (75% der Theorie). Die Esterbase lässt sich nicht destillieren und wird ohne weitere Reinigung zur Kupplung verwendet.

Kupplung.

2,7 g Carbobenzoxy-L-glutamin- α -säure- γ -hydrazid (XXI) werden in einer Mischung von 6 cm³ konz. Salzsäure + 6 cm³ Eisessig + 100 cm³ Eiswasser gelöst, mit 100 cm³ Äther überschichtet und eine Lösung von 0,8 g Natriumnitrit in 5 cm³ Wasser in 3—4 Anteilen zugegeben. Das ausscheidende ölige Azid (XXII) wird durch sofortiges Durchschütteln in den Äther getrieben. Die ätherische Lösung wird mit 20 cm³ Wasser gewaschen, in Eiswasser 4—5 Minuten mit Natriumsulfat getrocknet und in einen 250 cm³ Dreihalskolben, der in Eiswasser gekühlt wird, filtriert. Unter starkem Rühren lässt man die Lösung von 7,37 g Esterbase VII in 50 cm³ absolutem Äther innert 10—12 Minuten zutropfen. Es tritt augenblicklich eine ölige Abscheidung ein, die nach ½-stündigem, kräftigem Rühren erstarrt. Nach Stehenlassen über Nacht im Eisschrank wird abgenutscht und mit absolutem Äther gewaschen. Nach dem Trocknen über Nacht über Phosphorpentooxyd erhält man 7,4 g eines salzartigen Produktes XXIV, das wie folgt gespalten wird:

Man übergießt mit einer Mischung von 15 cm³ 3-n. Natronlauge + 15 cm³ Alkohol + 30 cm³ Wasser und lässt 1 Stunde stehen. Hierbei geht alles in Lösung. Man verdünnt mit Wasser, äthert aus und macht dann die wässrige Schicht kongosauer. Das ausfallende Öl wird in 100 cm³ Essigester aufgenommen, die Essigesterlösung mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung ausgezogen, aus der Natriumhydrogencarbonatlösung der Essigester durch kurzes Evakuieren entfernt und mit Salzsäure gefällt. Das ausfallende, weiße Harz wird mit Wasser 3—4mal dekantierend gewaschen und über Phosphorpentooxyd im Vakuum getrocknet. Eine weitere Reinigung war nicht möglich²⁾. Die

¹⁾ Hillmann, Z. f. Naturforschg. I, 682 (1946).

²⁾ du Vigneaud, J. Biol. Chem. 116, 469 (1936), konnte das S-Benzyl-N-carbobenzoxy-glutathion ebenfalls nicht reinigen.

Substanz liess sich zu einem weissen Pulver verreiben, war aber amorph und schmolz unscharf zwischen 78—82°. Die Analyse ergab:

$C_{25}H_{29}O_8N_3S$	Ber. N 7,9	S 6,03%
	Gef. „ 6,9	„ 5,41%
$[\alpha]_D = -23^\circ$ (c = 1 in Feinsprit).		

Die Analyse zeigt, dass bereits sehr reines S-Benzyl-N-carbobenzoxy-glutathion vorliegt. Das daraus erhaltene Glutathion zeigte korrekte Analysenzahlen, nur die Drehung war etwas zu niedrig.

Glutathion (I).

7,4 g S-Benzyl-N-carbobenzoxy-glutathion werden in 500 cm³ flüssigem Ammoniak gelöst und Natrium bis zur bleibenden Blaufärbung in kleinen Stücken eingetragen. Verbraucht wurden 1,5 g Natrium. Dann gibt man 4,6 g Ammoniumsulfat hinzu und lässt das Ammoniak zum Schluss im Vakuum vollständig verdampfen. Der Rückstand wird in 125 cm³ 0,5-n. Schwefelsäure gelöst (CO_2 -Entwicklung), ausgeäthert, die wässerige Lösung im Vakuum vom Äther befreit und mit Kohle filtriert. Die vollkommen klare, farblose Lösung wird mit 300 cm³ sauerstofffreiem Wasser verdünnt und dann mit 30 cm³ *Denigès*-Reagens (schwefelsaures Quecksilbersulfat) gefällt. Der weisse Niederschlag wird in der Zentrifuge 5 mal mit sauerstofffreiem Wasser ausgewaschen, dann wird mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Quecksilbersulfid abfiltriert und das Filtrat im Hochvakuum bei 15—20° auf ca. 100 cm³ eingedampft. Man erwärmt die Lösung auf 35° und trägt langsam frisch gefälltes Kupfer(I)-oxyd ein. Das weisse Kupfer(I)-glutathion beginnt bald auszufallen¹⁾. Es wird abzentrifugiert und in der Zentrifuge 10 mal mit Wasser gewaschen, bis das Wasser vollkommen frei von Sulfationen ist. Das Kupfersalz wird in 50 cm³ Wasser suspendiert und durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat wird durch Einleiten von Wasserstoff vom Schwefelwasserstoff befreit und unter Zugabe von Alkohol in einem mit Wasserstoffgas gefüllten Exsikkator über P_2O_5 langsam eingedunstet. Das zurückbleibende krystallinische Glutathion wird mit 75-proz. Alkohol verrieben und abgenutscht. Der Schmelzpunkt liegt bei raschem Erhitzen bei 190—192²⁾.

$C_{10}H_{17}O_8N_3S$	Ber. N 13,72	S 10,13%
	Gef. „ 13,34	„ 10,38%
$[\alpha]_D = -16^\circ \pm 1,5^\circ$ (c = 1 in Wasser) ³⁾		

Die Ausbeute beträgt 970 mg Glutathion. Die Substanz gibt alle Reaktionen des Naturproduktes.

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung Dr. *H. Waldmann*) ausgeführt.

Zusammenfassung.

Es wird über eine neue Synthese von Glutathion (γ -Glutamyl-L-cysteinyl-glycin) berichtet. Ausgehend von Cystein und Glycin

¹⁾ Die Ausfällung des Glutathions mittels Kupfer(I)-oxyd bedarf einer gewissen Übung (*Hopkins, J. Biol. Chem.* **84**, 269 [1929]), da bei Zugabe von zu viel Kupfer(I)-oxyd sich das Kupfersalz wieder auflöst. Das Optimum der Fällung ist erreicht, wenn sich das Kupfersalz sofort absetzt und sich darüber eine grüngelbe Flüssigkeit befindet.

²⁾ Der Schmelzpunkt des Glutathions ist sehr von der Geschwindigkeit des Erhitzens abhängig. Bei sehr langsamem Erhitzen schmilzt es zwischen 175 und 180°. Auch das natürliche Glutathion verhält sich so.

³⁾ Natürliches Glutathion hat ein $[\alpha]_D = -21^\circ$ (c = 2 in Wasser). Die zu niedrige Drehung beruht wahrscheinlich auf der nicht vollständigen Reinheit des S-Benzyl-N-carbobenzoxy-glutathions.

wird nach Blockierung der SH-Gruppe und der NH₂-Gruppe des Cysteins S-Benzyl-N-carbobenzoxy-cysteinyl-glycin aufgebaut. Durch Abspaltung der Carbobenzoxygruppe und Veresterung erhält man S-Benzylcysteinyl-glycin-methylester, der mit Carbobenzoxy-L-glutamin- α -säure- γ -azid gekuppelt wird. Nach Verseifung entsteht S-Benzyl-N-carbobenzoxy-glutathion, das durch Reduktion mit Natrium in flüssigem Ammoniak in Glutathion übergeführt wird.

Wissenschaftliche Laboratorien der *F. Hoffmann-La Roche & Co., Aktiengesellschaft, Basel.*

106. Über die Konstitution des Eugenons

von H. Schmid und Th. M. Meijer.

(11. III. 48.)

Wild wachsende Gewürznelken (*Eugenia caryophyllata* Thung.), die aus verschiedenen Regionen der Molukken stammen, enthalten, wie der eine von uns (*Th. M. M.*) kürzlich berichtete¹), zwei neue krystallisierte Verbindungen, die Eugenin und Eugenon benannt wurden. Eugenol, ein Hauptinhaltsstoff von kultivierten Gewürznelken, war dagegen in den wild wachsenden Varietäten nicht enthalten.

Dem Eugenon wurde die Summenformel C₁₀H₁₂O₄ und die Konstitution des 2,6-Dimethoxy-4-oxy-acetophenons zugeschrieben¹). Eine Verbindung der angegebenen Struktur ist aber schon früher von *F. W. Carter, F. H. Curd* und *A. Robertson*²) synthetisiert worden. Sie unterscheidet sich durch einen viel höheren Schmelzpunkt und das Fehlen einer Farbreaktion mit Eisen(III)-chlorid—Eugenon gibt mit diesem Reagens eine weinrote Farbreaktion — charakteristisch von letzterem, dessen Konstitutionsformel daher einer neuerlichen Überprüfung bedarf. Im Folgenden berichten wir über Versuche mit dem Naturstoff, die zur Abklärung dieses Problems führen.

Zunächst überzeugten wir uns, dass im Eugenon ein reiner Stoff vorliegt. Sein etwas unscharfer Schmelzpunkt von 97—98° wurde weder durch Chromatographie der Verbindung an neutralem Aluminiumoxyd, noch durch Ausschütteln mit Sodalösung, worin sich das Eugenon langsam löste, noch auch durch fraktionierte Krystallisation aus verschiedenen Lösungsmitteln geändert. An seiner Einheitlichkeit kann daher nicht gezweifelt werden.

¹⁾ R. 65, 843 (1946).

²⁾ Soc. 1931, 1245.