

b) Durch Destillation über Palladiumkohle: 100 mg V werden bei 230—240° und 130 Torr im H₂-Strom (2 Blasen pro Sek.) während 10 Std. über 1 g 5-proz. Pd-Kohle, auf 360° geheizt, sublimiert. Es ergeben sich 55 mg gelbes, kristallines Sublimat vom Smp. 125—130°. Dieses wird wie unter a) gereinigt: farblose Nadeln vom Smp. 140—142°, ohne Depression mit dem Produkt aus a).

6,040 mg Subst. gaben 20,890 mg CO₂ und 3,120 mg H₂O
 C₂₀H₁₄ (254,3) Ber. C 94,45 H 5,55% Gef. C 94,38 H 5,78%

Herrn Prof. Dr. *H. de Diesbach* möchte ich für die Grosszügigkeit bestens danken, die mir gestattete, diese Untersuchungen in seinen Laboratorien auszuführen. Ebenso bin ich Herrn Prof. Dr. *L. Chardonens* zu grossem Dank für sein stetes Interesse an den gesamten Arbeiten verpflichtet.

Zusammenfassung.

Es wird die Darstellung eines Kohlenwasserstoffs C₂₀H₁₄ aus Dibenzyl-tetrahydro-phthalsäureanhydrid (V) beschrieben, der als exocis-Fluorenaphen (Indeno-(2',1':3,4)-fluoren, VII) angesprochen wird.

Chemisches Institut der Universität Freiburg (Schweiz).

223. Spaltung von DL-3,4-Dioxyphenylalanin in die optischen Antipoden

von K. Vogler und H. Baumgartner.

(28. VI. 52.)

L-3,4-Dioxyphenylalanin (DOPA) ist 1913 von *Torquato Torquati*¹⁾ in den sog. „Saubohnen“ (*Vicia faba*) entdeckt und im gleichen Jahre von *M. Guggenheim*²⁾ in seiner Konstitution aufgeklärt worden.

Das künstlich hergestellte, optisch inaktive Produkt lag zur Zeit der Entdeckung der Aminosäure bereits vor³⁾ und ist seither nach verschiedenen Methoden synthetisiert worden⁴⁾.

Für die präparative Darstellung der optisch aktiven Aminosäure sind bis jetzt in der Literatur keine wirklich ergiebigen Methoden beschrieben worden.

Die Isolierung von L-3,4-Dioxyphenylalanin aus *Vicia faba* nach *H. Carter*⁵⁾ ist infolge der grossen Luftempfindlichkeit der freien Aminosäure und des unterschiedlichen

¹⁾ Arch. di farmacol. sperimentale **15**, 308 (1913).

²⁾ Z. physiol. Ch. **88**, 276 (1913).

³⁾ C. Funk, Soc. **99**, 554 (1911).

⁴⁾ Fromherz & Hermanns, Z. physiol. Ch. **91**, 194 (1914); K. Hirai, Bioch. Z. **114**, 67 (1921); Harington & McCarteney, Biochem. J. **21**, 852 (1927); R. H. Barry, A. M. Matlocks & W. H. Hartung, Am. Soc. **70**, 693 (1948).

⁵⁾ Biochem. Prep. Vol. **1**, 25 (1949).

Gehaltes der verwendeten Bohnen an DOPA sehr unzuverlässig. Auch die Einführung einer zweiten Oxygruppe in L-Tyrosin zur Gewinnung von L-3,4-Dioxyphenylalanin nach Waser & Lewandowsky¹⁾ erwies sich bei der Nacharbeitung als für die Darstellung grösserer Mengen nicht sehr geeignet.

Die von Harington & Randall²⁾ erstmals durchgeführte Spaltung des Racemates bzw. dessen N-Acetylverbindung mittels Brucin ergibt nur schlechte Ausbeuten und lässt sich präparativ kaum verwerten.

Wir haben uns nun die Aufgabe gestellt, ein neues, ergiebigeres Verfahren zur Spaltung von DL-3,4-Dioxyphenylalanin in die optischen Antipoden auszuarbeiten, über welches im folgenden berichtet wird.

Als besonders günstiges Ausgangsmaterial erwies sich dabei ein Zwischenprodukt der Synthese von DL-3,4-Dioxyphenylalanin, nämlich die schon von V. Deulofeu & O. Repetto³⁾ beschriebene DL- β -(3-Oxy-4-methoxyphenyl)- α -benzoylaminopropionsäure. Das Verfahren besteht darin, dass man deren Cinchoninsalz aus Aceton fraktioniert kristallisiert, die entstandenen diastereomeren Salze in die Komponenten zerlegt, die erhaltenen optisch aktiven Benzoylaminosäuren mit Bromwasserstoffsäure unter gleichzeitiger Ätherspaltung entacyliert und die optisch aktiven Aminosäurehydrobromide zu den freien, optisch aktiven Aminosäuren aufarbeitet.

Bei der fraktionierten Kristallisation der Cinchoninsalze aus Aceton erhält man nach 24–48stündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank als 1. Fraktion meist ca. 90% des Cinchoninsalzes von L- β -(3-Oxy-4-methoxyphenyl)- α -benzoylaminopropionsäure (kurz L-Salz genannt). Dieses besitzt nach ca. 2stündigem Trocknen unter Wasserstrahlvakuum bei 90° einen Drehwert von $[\alpha]_D^{21} = +133^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1$ in Methanol) und einen Zersp. von 136 bis 138°. Ein völlig acetonefreies Produkt erhält man nur nach 24stündigem Trocknen im Hochvakuum bei ca. 80°. Für das optisch reine L-Salz, welches mehrfach umkristallisiert wurde, fanden wir einen Zersp. von 138° und $[\alpha]_D^{22} = +145^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,5$ in Methanol). Das Cinchoninsalz von D- β -(3-Oxy-4-methoxyphenyl)- α -benzoylaminopropionsäure (kurz D-Salz genannt) konnte bis jetzt noch nicht in kristallinem Zustand erhalten werden.

Für die Weiterverarbeitung des L-Salzes ist es nicht unbedingt nötig, dieses bis zur völligen optischen Reinheit umzukristallisieren. Man zerlegt das Salz vielmehr, um Verluste zu vermeiden, ohne weitere Reinigung in die Komponenten und erhält nach Ätherspaltung und Entacylierung mit konstant siedender HBr durch Kristallisation aus Wasser optisch reines L-3,4-Dioxyphenylalanin.

¹⁾ Helv. 4, 657 (1921); R. R. Sealock, J. Biol. Chem. 166, 1 (1946).

²⁾ Biochem. J. 25, 1028 (1931).

³⁾ Anales soc. españ. fis. quim. 32, 159 (1934); C. 1934, II, 2824.

Wie im experimentellen Teil gezeigt wird, ist nämlich optisch aktives Dioxyphenylalanin in Wasser bei ca. 27° schwerer löslich als die entsprechende DL-Komponente, was zur Folge hat, dass eventuell im Rohprodukt vorhandene kleinere Mengen des Racemates nach Kristallisation aus Wasser in der Mutterlauge verbleiben.

Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit dem höheren Schmelzpunkt der optisch aktiven Komponente (275° uncorr., Gasentwicklung) gegenüber der DL-Form (269° uncorr., Gasentwicklung). Die Beobachtung stammt ursprünglich von *P. Walden*¹⁾, welcher erstmals feststellte, dass bei Vergleich eines Antipoden und des zugehörigen Racemates diejenige Verbindung die geringere Löslichkeit besitzt, welche im kristallisierten Zustand die grössere Dichte und den höheren Schmelzpunkt aufweist. Kürzlich wurden diese thermodynamischen Zusammenhänge auf den Fall diastereomerer Salze übertragen, wobei auch die Verbrennungswärmen in den Kreis der Betrachtungen mit einbezogen wurden²⁾.

Die nach der vorliegenden Methode erhaltenen, optisch aktiven Dioxyphenylalanine weisen Drehwerte von $[\alpha]_D^{20} = -11,5^\circ$ resp. $+11,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 3$ in 4-proz. Salzsäure) für die L- resp. D-Komponente auf. Sie wurden noch durch ihre gut kristallisierten Methylesterhydrochloride charakterisiert.

Experimenteller Teil.

1. Cinchoninsalz von L- β -(3-Oxy-4-methoxyphenyl)- α -benzoylamino-propionsäure. 31,5 g DL- β -(3-Oxy-4-methoxyphenyl)- α -benzoylamino-propionsäure³⁾ (Mol.-Gew. 315,3) und 29,4 g Cinchonin (Mol.-Gew. 294,3) wurden in einem Erlenmeyerkolben mit ca. 150 cm³ Methanol gelöst und durch ein Faltenfilter in einen 1-Liter-Rundkolben gegossen. Dann wurde das Methanol auf dem Dampfbad unter Wasserstrahlvakuum entfernt und das sirupöse Salzgemisch noch warm mit 250 cm³ heissem Aceton unter tüchtigem Schütteln auf dem Dampfbad möglichst rasch gelöst und kurz aufgeköcht. Sehr bald tritt Kristallisation ein. Der Kolben wurde bei Zimmertemperatur stehengelassen und anschliessend 24 Std. in den Eisschrank gestellt. Dann wurde das L-Salz abgesaugt, 3mal mit je 20 cm³ Aceton gewaschen, bei 90° unter Wasserstrahlvakuum ca. 1 Std. getrocknet, im Mörtel verrieben und nochmals 1 Std. unter gleichen Bedingungen getrocknet. Ausbeute: 28,6 g (90% d. Th.). Smp. 136–138°. $[\alpha]_D^{20} = +133^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1$ in Methanol). Dieses Rohprodukt kann ohne weiteres weiterverarbeitet werden; es enthält noch Reste von Aceton. Die Mutterlauge enthält das D-Salz und wurde beiseite gestellt.

Zur Analyse wurde 3mal aus Methanol/Aceton umkristallisiert und 24 Std. bei ca. 80° im Hochvakuum getrocknet. Smp. 138°. $[\alpha]_D^{20} = +145^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,5$ in Methanol).

$C_{38}H_{39}O_6N_3$	Ber. C	70,90	H	6,45	N	6,90%
(609,71)	Gef. „	71,33	„	6,90	„	6,68%

¹⁾ B. 29, 1692 (1896); *W. Meyerhoffer*, Gleichgewichte der Stereomeren, S. 27, Teubner, Berlin 1906.

²⁾ *W. Kuhn & K. Vogler*, Z. f. Naturforsch. 6b, 233 (1951).

³⁾ *V. Deulofeu & O. Repetto*, loc. cit.

2. L-3,4-Dioxyphenylalanin. 27 g des rohen L-Salzes, $[\alpha]_D^{20} = +133^\circ$, wurden in einem Scheidetrichter mit ca. 100 cm³ dest. Wasser übergossen, mit 100 cm³ Essigester überschichtet, mit ca. 10 cm³ konz. HCl kongosauer gestellt und tüchtig ausgeschüttelt. Dann wurde die Essigesterschicht, welche die L- β -(3-Oxy-4-methoxyphenyl)- α -benzoylaminopropionsäure enthält, abgetrennt und die wässrige Phase noch 3mal mit je 40 cm³ Essigester ausgezogen. Die vereinigten Essigesterlösungen wurden über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck so gut als möglich eingedampft. Die völlige Befreiung des Benzoylderivates vom Lösungsmittel gelingt nur schwer.

Zur Entacylierung und Ätherspaltung wurde der Kolbenrückstand (ca. 17 g) mit 80 cm³ konstant siedender Bromwasserstoffsäure 3½ Std. am Rückfluss gekocht. Dabei sublimiert die Benzoesäure teilweise in den Kühler hinauf. Anschliessend wurde abgekühlt und der Rest der Benzoesäure durch Filtration abgetrennt. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft, mit ca. 20 cm³ Wasser versetzt und erneut eingedampft. Sodann wurde der Kolbenrückstand mit ca. 60 cm³ 10-proz. methanolischem Natriumacetat (10 g geschmolzenes Natriumacetat pro 100 cm³ 10-proz. wässriges Methanol) versetzt, wobei die Aminosäure nach gelindem Kratzen auszufallen begann. Nach Stehenlassen über Nacht im Eisschrank wurde abgenutscht. Rohausbeute 6,5 g (75% d. Th., berechnet auf eingesetztes L-Salz).

Das rohe, grünstichig gefärbte L-Dioxyphenylalanin wurde aus ca. 210 cm³ siedendem Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle, welche mit SO₂ vorbehandelt war, umkristallisiert. Auf diese Weise wurde das L-3,4-Dioxyphenylalanin farblos und optisch rein erhalten. Das Umkristallisieren ist besonders in kleinen Ansätzen etwas verlustreich (Mutterlaugen aufarbeiten!). Reinausbeute ca. 60% berechnet auf eingesetztes Cinchoninsalz.

Zur Analyse wurde 2mal aus Wasser umkristallisiert und 16 Std. bei 80° über Phosphorpentoxyd im Hochvakuum getrocknet. L-3,4-Dioxyphenylalanin wird bei ca. 220° langsam braun und zersetzt sich bei 275° unter Gasentwicklung, während die zugehörige DL-Komponente bei 269° unter gleichen Bedingungen Zersetzung erleidet. $[\alpha]_D^{20} = -11,5^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 3 in 4-proz. Salzsäure). $[\alpha]_D^{20} = -7,45^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 3 in 20-proz. Salzsäure).

C ₉ H ₁₁ O ₄ N	Ber. C 54,80	H 5,60	N 7,11%
(197,19)	Gef. „ 54,59	„ 5,66	„ 7,15%

3. L-3,4-Dioxyphenylalanin-methylester-hydrochlorid. Die Suspension von 7,5 g L-3,4-Dioxyphenylalanin in 80 cm³ Methanol wurde mit trockener HCl gesättigt, wobei Lösung eintrat. Dann wurde 1 Std. am Rückfluss gekocht und zur Trockne eingedampft. Diese Operation wurde nochmals wiederholt, der Rückstand in 20 cm³ warmem Äthanol gelöst und mit ca. 15 cm³ Äther versetzt, wobei Kristallisation eintrat. Rohausbeute: 8,1 g. Zur Analyse wurde eine Probe 2mal aus Alkohol-Äther umkristallisiert und 16 Std. bei ca. 70° über Phosphorpentoxyd im Hochvakuum getrocknet. Smp. 170°–171°. $[\alpha]_D^{20} = +11,0^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1 in Methanol).

C ₁₀ H ₁₄ O ₄ NCl	Ber. C 48,40	H 5,70	N 5,66%
(247,70)	Gef. „ 48,37	„ 5,79	„ 5,42%

4. D-3,4-Dioxyphenylalanin. Die Acetonmutterlauge, aus welcher gemäss 1. das Cinchoninsalz von L- β -(3-Oxy-4-methoxyphenyl)- α -benzoylaminopropionsäure durch Kristallisation gewonnen worden war, wurde so gut als möglich durch Eindampfen vom Aceton befreit und analog, wie unter 2. beschrieben, zur Gewinnung von D-3,4-Dioxyphenylalanin weiterverarbeitet. Die Ausbeute entspricht ungefähr derjenigen der L-Komponente. Zersp. 274–275°. $[\alpha]_D^{20} = +11,5^\circ \pm 5^\circ$ (c = 3 in 4-proz. Salzsäure).

C ₉ H ₁₁ O ₄ N	Ber. C 54,80	H 5,60	N 7,11%
(197,19)	Gef. „ 54,28	„ 5,85	„ 7,16%

5. D-3,4-Dioxyphenylalanin-methylester-hydrochlorid wurde nach der für die L-Komponente gegebenen Vorschrift bereitet. Smp. 170° . $[\alpha]_D^{22} = -11,1^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ($c = 1$ in Methanol).

$C_{10}H_{14}O_4NCl$	Ber. C 48,40	H 5,70	N 5,66%
(247,70)	Gef. „ 48,44	„ 5,83	„ 5,74%

6. Trennung von optisch aktivem und von inaktivem 3,4-Dioxyphenylalanin. 400 mg D-3,4-Dioxyphenylalanin, $[\alpha]_D^{20} = +11,0^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 2$ in 1-n. Salzsäure), und 400 mg DL-3,4-Dioxyphenylalanin wurden in ca. 30 cm³ siedendem Wasser gelöst, filtriert, mit wenig D-3,4-Dioxyphenylalanin angeimpft und 20 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wurde abgesaugt und getrocknet: 1. Fraktion 430 mg, $[\alpha]_D^{20} = +9,4^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 4,2$ in 4-proz. Salzsäure).

Die Mutterlauge wurde zur Trockne verdampft, wobei die 2. Fraktion 300 mg, $[\alpha]_D^{20} = +1,5^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 2$ in 4-proz. Salzsäure), erhalten wurde. Damit ist gezeigt, dass eine optische Reinigung von teilweise racemisiertem 3,4-Dioxyphenylalanin gut durchgeführt werden kann, da im Falle von halbracemischem 3,4-Dioxyphenylalanin durch eine einzige Kristallisation aus Wasser eine beinahe völlige Trennung in die aktive und die inaktive Form erreicht wird.

Eine orientierende Bestimmung bei ca. 27° ergab für optisch aktives 3,4-Dioxyphenylalanin in Wasser eine Löslichkeit von 66 mg pro 40 cm³ Lösung, für die DL-Form jedoch 144 mg pro 40 cm³ Lösung.

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

SUMMARY.

By a new procedure the resolution of DL-3,4-dihydroxyphenylalanine into its optical antipodes is effected in good yield by means of fractional crystallization of the cinchonine salts of DL- β -(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)- α -benzoylaminopropionic acid. The well crystallized methylester-hydrochlorides of D- and L-3,4-dihydroxyphenylalanine are described. Partially racemized 3,4-dihydroxyphenylalanine can be separated into its optically active and inactive form by simple crystallization from water. The optically active form crystallizes first. It follows that the preparation of optically pure L- and D-3,4-dihydroxyphenylalanine can be carried out without difficulty.

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