

Aus dem anwendungstechnischen Laboratorium der Farbenfabriken Bayer AG,
Krefeld-Uerdingen

Zur Kenntnis des Pyrokohlensäurediäthylesters

II. Darstellung und Eigenschaften der Carbäthoxyderivate von Aminosäuren, Peptiden, Flavanon- und Flavonolglykosiden

Von W. PAULUS

Mit 1 Tabelle

(Eingegangen am 26. August 1967)

Von den im 1. Teil dieser Mitteilung angeführten Carbäthoxyverbindungen wurden folgende Substanzen neu synthetisiert:

L- α -N-Carbäthoxy-leucin
L- α -N-Carbäthoxy-isoleucin
L- α -N-Carbäthoxy-phenylalanin
L- α -N-Carbäthoxy-glutamin
L- α -N-Carbäthoxy-serin
L-N-Carbäthoxy-hydroxy-prolin
L-N,O-Dicarbäthoxy-tyrosin
L-N,N'-Dicarbäthoxy-ornithin
L-N-Carbäthoxy-histidin
L- α -N-Carbäthoxy-tryptophan
L-N,N'-Dicarbäthoxy-cystin
N-Carbäthoxyglycyl-L-leucin
L- α -N-Carbäthoxyalanyl-glycyl-glycin
3'-O-Carbäthoxy-hesperidin
4'-O-Carbäthoxy-naringin
7,3',4'-O-Tricarbäthoxy-rutin

Die Substanzen wurden dünnschichtchromatographisch auf Einheitlichkeit geprüft und auf Grund ihres chromatographischen Verhaltens und der Elementaranalyse identifiziert.

Experimenteller Teil

I. Aminosäuren: Wenn nicht anders angegeben, wurden die Aminosäuren in 50%igem Aceton in Form ihrer Triäthylammoniumsalze mit PKE umgesetzt. Der Fortgang der Carbäthoxylierung wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach beendeter Umsetzung wurde das Aceton i. V. entfernt, die wäßrige Reaktionslösung zur Entfernung von evtl. überschüssigem PKE mit Äther extrahiert, die carbäthoxylierte Aminosäure mit der berechneten Menge HCl freigesetzt und anschließend mit Äther oder Essigester extrahiert.

II. Peptide: N-Carbäthoxyglycyl-L-leucin. Eine wäßrige Lösung des Kaliumsalzes von Glycyl-L-leucin wird mit 1,2 Moläquivalenten PKE, gelöst in wenig Aceton, umgesetzt. Nach Entfernung des PKE-Überschusses mittels Ätherextraktion fällt man die K^+ -ionen in der Kälte mit $HClO_4$ und filtriert. Das Filtrat wird i. V. zur Trockne eingengt. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung des Rückstandes (farbloses Öl) zeigt, daß neben der Ninhydrin-negativen N-Carbäthoxysäure geringe Anteile einer nicht sauer

Tabelle 1. Zusammensetzung u. R_f-Werte der Carbäthoxyamino-säuren

Substanz	Extraktionsmittel	Smp. °C	R _f ¹⁾	LM I	LM II	berechnet			gefunden		
						%C	%H	%N	%C	%H	%N
L-α-N-Carbäthoxy-leucin	Essigester	Öl	0,76			53,20	8,41	6,89	52,10	8,29	6,36
L-α-N-Carbäthoxy-isoleucin	Essigester	Öl	0,68	0,52		53,20	8,41	6,89	53,15	8,40	6,44
L-α-N-Carbäthoxy-phenylalanin	Essigester	83	0,67	0,55		61,00	5,97	5,93	61,01	6,12	6,12
L-α-N-Carbäthoxy-glutamin	Essigester	Öl	0,63	0,10		44,10	6,43		43,56	6,47	
L-α-N-Carbäthoxy-Serin	Essigester	Öl	0,61	0,26							
L-N-Carbäthoxy-hydroxyprolin	Essigester	Öl	0,69	0,17		47,30	6,42	6,90	46,61	6,81	6,22
L-N,O-Dicarbäthoxy-tyrosin	Äther	Öl	0,60	0,44		55,50	5,88	4,32	56,11	5,86	4,80
L-N,N'-Dicarbäthoxy-ornithin	Äther	Öl	0,70	0,31		47,70	7,65	10,10	48,16	7,58	10,11
L-N-Carbäthoxy-histidin · HCl ²⁾		Öl	0,71	0,04		41,00	5,34		40,40	5,54	
L-N,N'-Dicarbäthoxy-histidin ²⁾	Äther	Öl	0,83	0,40							
L-α-N-Carbäthoxy-tryptophan	Äther	85	0,73	0,46		60,95	5,81	10,10	61,44	5,41	9,48
L-N,N'-Dicarbäthoxy-cystin	Äther	Öl				37,50	5,25	7,30	38,31	5,45	6,57

¹⁾ R_f-Werte nach Dünnschichtchromatographie an Kieselgel-G-Schichten; LM I: Äthanol 96% ig/NH₃, 25% ig (67 : 33 v/v); LM II: Benzol/Aceton/Methanol/Eisessig (70 : 5 : 20 : 5 v/v/v/v). Lokalisierung mit Bromkresolpurpur oder mit 3% igem KMnO₄ in H₂SO₄c.

²⁾ Infolge seines salzartigen Charakters ist L-N-Carbäthoxy-histidin nicht extrahierbar; daher wird das K-Salz dargestellt u. nach Entfernung der K⁺-Ionen mit HClO₄ und Ansäuern mit HCl aus der wäßrigen Reaktionslösung L-N-Carbäthoxy-histidin als Hydrochlorid isoliert. Vor der KClO₄-Fällung läßt sich mit Äther L-N,N'-Dicarbäthoxy-histidin (farbloses Öl) extrahieren, das sich jedoch schon beim Trocknen i. V. unter Aufschäumen in eine pseudokristalline in Äther und Aceton unlösliche, in Wasser gut lösliche Substanz (Smp. 53 °C) umwandelt; das Umwandlungsprodukt ist chromatographisch identisch mit L-N-Carbäthoxy-histidin.

reagierenden und weniger polaren Substanz (s. R_f -Werte) vorhanden ist, bei der es sich offenbar um den Äthylester der N-Carbäthoxysäure handelt, denn die Verseifung des Rückstandes (2 h Rkf. in 2 n NaOH) verläuft quantitativ und liefert als Hydrolysenprodukte nur Glycin und Leucin.

L- α -N-Carbäthoxylalanyl-glycyl-glycin. L-Alanyl-glycyl-glycin wird wie oben beschrieben ebenfalls als Kaliumsalz in wäßriger Lösung mit ca. 1,5 Moläquivalenten PKE umgesetzt. Aus der vom $KClO_4$ befreiten Lösung kristallisiert beim Einengen i. V. das Reaktionsprodukt aus. Smp. 176 °C.

Ber.: C = 43,60%, H = 6,21%, N = 15,29% ;

gef.: C = 43,72%, H = 6,19%, N = 15,25%.

R_f -Werte nach Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G-Schichten: LM II = Benzol/Aceton/Methanol/Eisessig = 70 : 5 : 20 : 5 (v/v/v/v); LM III = Butanol/Eisessig/ NH_3 , 5%ig = 5,5 : 3 : 1,5 (v/v/v).

Substanz	LM II	LM III	Lokalisierung mit
Glycyl-L-Leucin	0,04	0,41	Ninhydrin
N-Carbäthoxyglycyl-L-leucin	0,20	0,79	Bromkresolpurpur
N-Carbäthoxyglycyl-L-leucinäthylester	0,36	Front	$KMnO_4$ i. H_2SO_{4c}
L-Alanyl-glycyl-glycin		0,21	Ninhydrin
L- α -N-Carbäthoxylalanyl-glycyl-glycin		0,70	Bromkresolpurpur

III. Flavanon-, Flavonolglucoside: 3'-O-Carbäthoxyhesperidin \cdot 1 H_2O . 0,005 M (3,05 g) chromatographisch nicht ganz einheitliches Hesperidin (Smp. 249–253 °C Zers.) werden in 75 ml Dimethylformamid aufgenommen und gelinde erwärmt. Nach Filtration und Zugabe von 15 ml H_2O erfolgt unter Rühren langsam Zugabe von PKE, bis sich dünn-schichtchromatographisch kein Ausgangsprodukt mehr nachweisen läßt; dazu werden etwa 0,02 M (3,24 g) PKE benötigt. Hierauf wird die Reaktionslösung i. V. (1–2 mm Hg) bei 40 °C zur Trockne eingedampft, der ölige Rückstand in Aceton aufgenommen und mit Äther angerieben. Nach Filtration und Waschen mit Äther weist der Niederschlag einen Smp. von 106 °C Zers. auf. Ausbeute: 3,2 g = 90% bez. auf Hesperidin. Umkristallisiert aus Methanol nach Behandlung mit A Kohle durch Anreiben mit Äther: Smp. 108 °C Zers.

Ber.: C = 53,10%, H = 5,78% ;

gef.: C = 53,05%, H = 6,10%.

Die nach Verseifung bestimmbare CO_2 -Menge von durchschnittlich 7,2% entspricht ebenfalls einem Monocarbäthoxyhesperidin, obwohl Hesperidin über 2 enolische bzw. phenolische OH-Gruppen verfügt. Offenbar ist die OH-Gruppe in 5-Stellung durch Wasserstoffbrückenbindung zur CO-Gruppe in 4-Stellung einer Carbäthoxylierung oder Acylierung nicht ohne weiteres zugänglich.

4'-O-Carbäthoxy-naringin \cdot 1 H_2O . 0,01 M (5,81 g) chromatographisch nicht ganz einheitliches Naringin, gelöst in 100 ml Aceton, werden nach Filtration mit 20 ml H_2O und 10 Tropfen Triäthylamin versetzt. Hierauf wird unter Rühren PKE zugetropft (insgesamt ca. 5 g), bis dünn-schichtchromatographisch kein Naringin mehr nachweisbar ist. Die Reaktionslösung wird i. V. zur Trockne (1–2 mm Hg, 40 °C) eingengt, in Aceton aufgenommen und die Carbäthoxyverbindung unter Köhlen mit Äther gefällt. Smp. 97 °C Zers.

Ber.: C = 53,79%, H = 5,71% ;

gef.: C = 53,26%, H = 5,66%.

Die nach Verseifung bestimmbare CO_2 -Menge von durchschnittlich 8,64% entspricht

ebenfalls einem Monocarbäthoxynaringin; die OH-Gruppe in 5-Stellung wird auch hier, offenbar infolge von Wasserstoffbrückenbindung, nicht carbäthoxyliert.

7,3',4'-O-Tricarbäthoxy-rutin. 6,5 g (0,01 M) Rutin, gelöst in 50 ml Dimethylformamid, werden nach Zugabe von 20 ml H₂O und 10 Tropfen Triäthylamin so lange mit PKE, gelöst in Aceton, versetzt, bis dünnschichtchromatographisch kein Rutin mehr nachweisbar ist. Anschließend wird die Reaktionslösung i. V. zur Trockne (1–2 mg Hg, 40 °C) eingedampft und der Rückstand in Aceton aufgenommen. Nach Zugabe von Äther kristallisiert das Reaktionsprodukt aus (gelb). Smp. 125 °C Zers.

Ber.: C = 52,20%, H = 5,12%;

gef.: C = 51,61%, H = 5,10%.

Die nach Verseifung bestimmbare CO₂-Menge von ca. 16,5% entspricht ebenfalls einem Tricarbäthoxyrutin; offenbar bleibt unter den eingehaltenen Reaktionsbedingungen die OH-Gruppe in 5-Stellung einer Carbäthoxylierung verschlossen.

R_F-Werte nach Chromatographie an Kieselgel G-Schichten, die aus 0,3 m Natriumacetatlösung aufgebracht werden: LM IV = Äthylacetat/Methyläthylketon/Ameisensäure/Wasser = 5 : 3 : 1 : 1 (v/v/v/v); Lokalisierung im UV-Licht oder mit Joddampf.

Hesperidin	0,33
3'-O-Carbäthoxy-hesperidin	0,43
Naringin	0,39
4'-O-Carbäthoxy-naringin	0,49
Rutin	0,26
7,3',4'-O-Tricarbäthoxy-rutin	0,58

Ergebnisse

Im Anschluß an frühere Arbeiten (1–4) wurden weitere 11 Aminosäuren mit PKE umgesetzt, so daß jetzt die Reaktionsprodukte aller natürlich vorkommender Aminosäuren mit PKE synthetisiert sind. Erwartungsgemäß führt die Carbäthoxylierung von L-Serin und L-Hydroxyprolin zu den entsprechenden N-Carbäthoxyverbindungen, die Carbäthoxylierung von L-Tyrosin aber entsprechend der phenolischen Natur der Hydroxylgruppe zu L-N,O-Dicarbäthoxy-tyrosin. Aus L-Histidin entsteht eine instabile N,N'-Dicarbäthoxyverbindung, die unter Abspaltung von CO₂ und Äthanol in die Monocarbäthoxyverbindung übergeht. Stabile N,N'-Dicarbäthoxyverbindungen liefern L-Ornithin und L-Cystin.

Die Peptide Glycyl-L-Leucin und L-Alanyl-glycyl-glycin ließen sich ebenfalls glatt und weitgehend quantitativ mit PKE carbäthoxylieren.

Als Beispiele für Flavanonglucoside wurden Naringin und Hesperidin und als Beispiel für Flavonolglucoside Rutin mit PKE umgesetzt. Dabei zeigte sich, daß jeweils alle phenolischen OH-Gruppen bis auf die in 5-Stellung leicht carbäthoxyliert werden. Die Carbäthoxylierung der OH-Gruppe in 5-Stellung unterbleibt offenbar infolge Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung.

Zusammenfassung

Die Hydrolyse von Carbäthoxyverbindungen von Aminosäuren, Peptiden und Anthoxanthinen mit Hilfe von Enzymen aus Schweineorganen wurde untersucht. Es wurde gefunden, daß die Aminosäurederivate zum Teil sehr glatt, zum Teil relativ langsam zu den Aminosäuren gespalten werden, wobei dann Sekundärreaktionen beobachtet werden.

Carbäthoxypeptide werden ebenfalls hydrolysiert. Sehr rasch und vollständig wurden auch die O-Carbäthoxygruppen des Hesperidins, Naringins und Rutins abgespalten.

Die benötigten Carbäthoxyverbindungen wurden durch Einwirkung von Pyrokohlensäurediäthylester auf Aminosäuren, Peptide und Anthoxanthine erhalten.

Literatur

1. PAULI, O. und H. GENTH, Z. Lebensmitt.-Untersuch. **132**, 216 (1966). — 2. DUHM, B., W. MAUL, H. MERDENWALD, K. Patzschke und L. A. WEGNER, Z. Lebensmitt.-Untersuch. **132**, 200 (1966). — 3. PAULUS, W. und D. LORKE, Z. Lebensmitt.-Untersuch. **132**, 325 (1967). — 4.a. LANG, K., M. FINGERHUT, E. KRUG, W. REIMOLD und O. PAULI, Z. Ernährungswiss. **6**, 219 (1966); b. LANG, K., M. FINGERHUT, E. KRUG und W. REIMOLD, Z. Lebensmitt.-Untersuch. **132**, 333 (1967). — 5. ROSEN, H., Arch Biochem. Biophys. **67**, 10 (1957).

Anschrift des Verfassers:

Dr. W. PAULUS, Anwendungstechnisches Laboratorium der Farbenfabriken Bayer AG,
415 Krefeld-Uerdingen