

44. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

74. Mitteilung [1]

Synthese des Ferrichroms, 1. Teil: (*S*)- α -Amino- δ -nitro-valeriansäure (δ -Nitro-L-norvalin)

von B. Maurer und W. Keller-Schierlein

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

(8. I. 69)

Summary. (*S*)- α -Amino- δ -nitropentanoic acid (δ -nitro-L-norvaline), an intermediate of the total synthesis of ferrichrome, was synthesized starting from diethyl oxalate and γ -butyrolactone.

Der am einfachsten gebaute Vertreter der Sideramine aus Pilzen [2] ist das *Ferrichrom*, der Eisen(III)-Komplex eines Cyclohexapeptids, das sich aus drei Resten Glycin und drei Resten δ -N-Acetyl- δ -N-hydroxy-L-ornithin (**1**) aufbaut [3]. Es wurde zuerst von NEILANDS [4] aus Kulturen eines Stammes von *Ustilago sphaerogena* isoliert und war das erste in der Natur aufgefundene Sideramin. Später wurde es als Stoffwechselprodukt mehrerer anderer Pilzstämme nachgewiesen [5], und verschiedene ähnlich gebaute Sideramine wurden aus zahlreichen Pilzen isoliert und ihre Konstitution aufgeklärt [2] [5] [6].

Da sowohl die Hydroxylamino- wie auch die Hydroxamsäure-Gruppen empfindlich sind gegen Reagenzien, die in der Polypeptidsynthese gebraucht werden, und zur Zeit noch keine bewährten Schutzgruppen für diese Funktionen zur Verfügung stehen, schien es uns ratsam, den synthetischen Aufbau des Cyclohexapeptids mit der entsprechenden Nitro-aminosäure (**2**) durchzuführen. Aliphatisch gebundene Nitrogruppen lassen sich relativ einfach in die Hydroxylaminogruppen und Acethydroxamsäuregruppen überführen. Wir haben daher als Zwischenprodukt der Ferrichromsynthese das δ -Nitro-L-norvalin (**2**) hergestellt, worüber in dieser Abhandlung berichtet wird. Den Aufbau des Cyclohexapeptids und dessen Überführung in Ferrichrom beschreiben wir in der nachfolgenden Mitteilung dieser Reihe [7].

Bereits 1963 haben ROGERS & NEILANDS [8] das Hydantoin **3** des δ -Nitro-DL-norvalins synthetisiert, das sie durch Reduktion und anschliessende Hydrolyse in das δ -N-Hydroxyornithin (**4**), den Grundbaustein aller Sideramine aus Pilzen, überführten. Für die Herstellung der freien Nitro-aminosäure **2** erwies sich das Hydantoin **3** als ungeeignetes Ausgangsmaterial, da unter den Bedingungen, die für die Spaltung des Hydantoinringes notwendig sind, rascher ein Angriff an der Nitrogruppe erfolgte. Sowohl bei der alkalischen als auch bei der sauren Hydrolyse des Hydantoins **3** konnten wir als einzige Produkte die Glutaminsäure und deren Hydantoin nachweisen. Andererseits liess sich das Hydantoin **3** nicht mit befriedigender Ausbeute gewinnen, da bei der Umsetzung des entsprechenden Bromhydantoins [8] mit Silbernitrit oder Natriumnitrit ein beträchtlicher Anteil zu Prolinhydantoin cyclisiert wurde.

Wir mussten daher für den Aufbau des δ -Nitro-L-norvalins einen neuen Weg suchen. Als Ausgangsmaterial diente das δ -Hydroxy-DL-norvalin (**5**), das nach PLIE-

NINGER [9] aus Oxalsäure-Diäthylester und γ -Butyrolacton über mehrere Stufen leicht zugänglich ist. Durch Umsetzung mit Essigsäureanhydrid bildete sich das acetylierte Lacton **6** in guter Ausbeute. Die Öffnung des Lactonrings mit Bromwasserstoff in Methanol direkt zum Methyl ester **8** gelang nicht befriedigend. Das schwer auftrennbare Reaktionsgemisch bestand vorwiegend aus ninhydrin-positiven Verbindungen. Hingegen führte die Behandlung mit Bromwasserstoff in Eisessig zur Säure **7**, die anschliessend mit Methanol verestert wurde.

Die Umsetzung des Bromesters **8** mit Silbernitrit führte unter verschiedenen Bedingungen zu einem Gemisch aus dem Nitroester **10**, dem entsprechenden Salpetrigsäureester (**11**) und N-Acetyl-DL-prolin-methylester. Das gleiche Gemisch wurde auch erhalten, wenn anstelle des Bromesters **8** die entsprechende Jodverbindung **9** eingesetzt wurde.

Einheitlicher verlief die Reaktion mit Natriumnitrit in Dimethylformamid, sofern ein Angriff in α -Stellung zur Nitrogruppe durch Zugabe von Phloroglucin vermieden wurde [10]. Bei Abwesenheit von Phloroglucin wurde die Ausbeute an der Nitroverbindung durch eine von KORNBLUM u. Mitarb. [11] näher untersuchte Nebenreaktion verringert. Die Bildung der δ -Nitro- δ -oximinoverbindung konnte mit der für Nitrolsäuren charakteristischen roten Farbreaktion mit Natronlauge nachgewiesen werden [12].

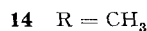
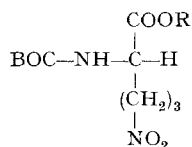
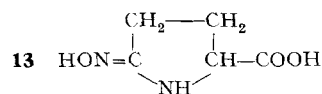
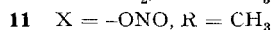
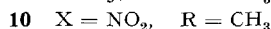
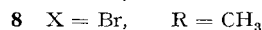
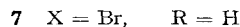
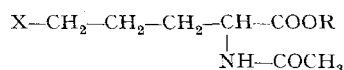
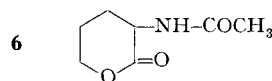
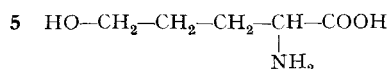
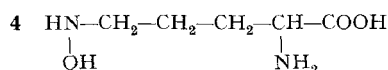
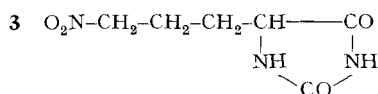
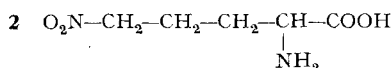
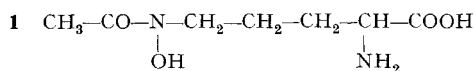
Der in 50-proz. Ausbeute isolierbare Nitroester **10** wurde mit wässriger Natriumcarbonatlösung verseift und die N-Acetyl-DL-aminosäure **12** mit dem Enzym Acylase I aus Schweinenieren [13]¹⁾ behandelt. Die enzymatische Desacetylierung verlief stereospezifisch und vollständig und führte in guter Ausbeute zum δ -Nitro-L-norvalin (**2**), das sich durch Kristallisation aus Alkohol vom leichtlöslichen N-Acetyl- δ -nitro-D-norvalin abtrennen liess.

Gewisse Schwierigkeiten bot anfänglich die Umkristallisation grösserer Mengen der neuen Aminosäure. Nach längerem Erhitzen mit Wasser kristallisierte auf Zusatz von Alkohol eine Verbindung aus, die sich in der Zusammensetzung und in den Absorptionsspektren stark von der Nitro-aminosäure **2** unterschied. Die Bruttoformel, $C_5H_8N_2O_3$, zeigt, dass eine Molekel Wasser verlorengegangen ist. Da das Umsetzungsprodukt noch immer eine saure und eine basische Gruppe enthält (pK_{MCS}^* 4,0 und 6,72) und mit methanolischer Salzsäure ein kristallines Methyl ester-hydrochlorid bildet, kann sich die Carboxylgruppe an der Umsetzung nicht beteiligt haben. Im IR.-Absorptionsspektrum der Säure und des Methyl esters fehlen die für Nitrogruppen charakteristischen Banden, dagegen tritt ein neues Absorptionsmaximum bei 1680 cm^{-1} auf, das u. a. für Oximinogruppen charakteristisch ist. Im NMR.-Spektrum (D_2O) erkennt man eine Signalgruppe zwischen δ 1,8 und 3,1 ppm, deren komplexe Aufspaltung ähnlich ist derjenigen von Prolinderivaten, und deren Integral 4 Protonen entspricht. Als einziges weiteres Signal findet man ein komplexes Multiplett (Integral 1 H), dessen chemische Verschiebung (δ 4,4 ppm) derjenigen von α -ständigen Wasserstoffen bei Aminosäuren entspricht. Diese Befunde sprechen für die Struktur **13**, die durch Hydrolyse des Umwandlungsproduktes zu Glutaminsäure und Hydroxylamin bestätigt werden konnte.

¹⁾ SIGMA CHEM. CO., St. Louis, Missouri.

Die Umkristallisation der Nitro-aminosäure **2** gelang dagegen ohne nennenswerte Verluste, wenn man die feingepulverte Säure rasch in heissem Wasser auflöste und sofort durch Abkühlen und Zufügen von Alkohol die Kristallisation einleitete. Das optisch aktive δ -Nitro-L-norvalin fiel dabei in glänzenden Blättchen mit Smp. 170° (Zers.) an, die die erwarteten analytischen und spektroskopischen Eigenschaften besaßen (s. exper. Teil).

Als Ausgangsmaterial für die Polypeptid-Synthese wurde das *t*-Butyloxycarbonyl- δ -nitro-L-norvalin (BOC- δ -NO₂-Norval, **15**) hergestellt, das im exper. Teil charakterisiert wird. Dabei gelang die Einführung der Butyloxycarbonyl-(BOC-)Gruppe nach den Methoden von SCHWYZER [14] bzw. SCHNABEL [15] bei Verwendung der freien Aminosäure nicht; hingegen führte die Umsetzung des Aminosäure-methylesters mit Azidoameisensäure-*t*-butylester in Pyridin zum Ziel [16]. Durch Chromatographie an Kieselgel liess sich der Methylester **14** gut von den Nebenprodukten abtrennen und in 60-proz. Ausbeute rein herstellen. Die Verseifung zur N-geschützten Aminosäure **15** erfolgte vorteilhaft mit wässrig-methanolischer Natriumcarbonatlösung. Bei der Verwendung von verd. Natronlauge waren erhebliche Mengen von Nebenprodukten dünnschichtchromatographisch nachweisbar. Die Einführung der BOC-Gruppe er-



folgte ohne erkennbare Racemisierung, was daraus hervorgeht, dass die katalytische Hydrierung der Nitrogruppe und anschliessende saure Hydrolyse zu optisch reinem L-Ornithin führte.

Das nach der enzymatischen Spaltung der N-Acetyl-DL-aminosäure anfallende N-Acetyl- δ -nitro-D-norvalin erwies sich als optisch weitgehend rein, da ein aus der L-Aminosäure hergestelltes N-Acetylderivat (Smp. 116,5–117,5°; $[\alpha]_{405} = +0,6^\circ$ in Äthanol), abgesehen von der entgegengesetzten optischen Drehung die gleichen Eigenschaften aufwies, während das Racemat einen unscharfen Smp. von 94–100° zeigte.

Der CIBA-AKTIENGESellschaft, Basel, danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Die UV.-Absorptionsspektren wurden mit einem PERKIN-ELMER-Spektrophotometer, Modell 137, die IR.-Absorptionsspektren mit einem PERKIN-ELMER-Spektrometer, Modell Infracord, und die Massenspektren mit einem HITACHI-PERKIN-ELMER-Spektrometer, Modell RMU-6A aufgenommen. Die NMR.-Spektren wurden mit einem VARIAN-Spektrometer, Modell A-60 gemessen. Chemische Verschiebungen gegenüber Tetramethylsilan sind in δ -Werten, Kopplungskonstanten (J) in cps angegeben. Es bedeuten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, m = Multiplett, b = breiter, nicht aufgelöster Signalhaufen, k = komplex aufgespaltene Signalgruppe.

Zur Analyse wurden alle Verbindungen 3 Tage im Hochvakuum getrocknet und im Schweinechen über Phosphorpentoxid nachgetrocknet. Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Fertigplatten F 254 (MERCK) und für die Papierchromatographie WHATMAN-Papier Nr. 1 verwendet. Die Dünnschichtchromatogramme wurden im allgemeinen mit Joddampf entwickelt. Für freie Aminosäuren diente als Sprühreagens eine 0,1-proz. Lösung von Ninhydrin in Chloroform unter Zusatz von 0,1% 2,6-Lutidin. Die Smp. wurden in offener Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert.

(R,S)-5-(γ -Nitropropyl)-hydantoin (**3**) [8]. Harnstoff und feingepulvertes Natriumnitrit wurden 16 Std. bei 100° getrocknet, Dimethylformamid wurde über Calciumhydrid bei 12 Torr destilliert.

2,8 g (12,68 mMol) (R,S)-5-(γ -Bromopropyl)-hydantoin [8], 1,5 g Harnstoff und 1,5 g (21,8 mMol) Natriumnitrit in 20 ml Dimethylformamid wurden 5 Std. im Dunkeln bei Zimmertemperatur gerührt. Das mit 160 ml Wasser verdünnte Reaktionsgemisch wurde sechsmal mit Äthylacetat ausgezogen, die mit Natriumsulfat getrockneten Extrakte im Vakuum eingedampft und zur Entfernung von Dimethylformamid im Hochvakuum auf 90° erhitzt. Aus dem öligen Rückstand konnte mit Methanol-Äther-Petroläther ein noch stark verunreinigtes Kristallisat gewonnen werden, welches durch Chromatographie an der hundertfachen Menge Kieselgel mit Äthylacetat als Elutionsmittel weiter gereinigt wurde. Durch Umkristallisieren aus Methanol-Äther gab die Hauptfraktion 720 mg (30% der Theorie) Nitrohydantoin (**3**) als farblose Kristalle mit Smp. 156–158°. UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol-Wasser 1:1: λ_{max} 270 nm, $\log \epsilon$ 1,57. IR.-Absorptionsspektrum in Nujol: ν_{max} 1780, 1740, 1575, 1545 cm^{-1} . NMR.-Spektrum in CF_3COO : δ 1,90–2,65 ppm (k, 4 H), 4,42–4,82 (k, 3 H), 7,44 (s, 1 H), 9,47 (s, 1 H).

$\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_4$ Ber. C 38,50 H 4,85 N 22,45% Gef. C 38,60 H 4,93 N 22,41%

Alkalische Hydrolyse des Hydantoins 3. 374 mg (2 mMol) (R,S)-5-(γ -Nitropropyl)-hydantoin (**3**) wurden mit 5 ml 2N Bariumhydroxidlösung 16 Std. im Bombenrohr auf 140° erhitzt. Die Lösung wurde mit 20 ml Wasser verdünnt, mit Kohlendioxid bis zur schwach sauren Reaktion gesättigt und 10 Min. zum Sieden erhitzt. Die vom Bariumcarbonat abfiltrierte Lösung wurde eingedampft, und der kristalline Rückstand (280 mg, 95% d. Th.) erwies sich gemäss IR.-Absorptionsspektrum und Dünnschichtchromatogramm (*n*-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1) als DL-Glutaminsäure.

Saure Hydrolyse des Hydantoins 3. 770 mg (4,12 mMol) **3** wurden mit 17 ml 6N Salzsäure 24 Std. im Bombenrohr auf 125° erhitzt. Nach dem Eindampfen wurde der Rückstand in 10 ml Wasser gelöst und 10 Min. mit 6 g Silbercarbonat geschüttelt. Der harzartige Eindampfrückstand

zeigte im Dünnschicht- und Papierchromatogramm den gleichen Rf-Wert und das gleiche NMR.-Spektrum wie DL-Glutaminsäure. Zur weiteren Charakterisierung wurden 200 mg des Produktes mit 6N absolut-methanolischem Chlorwasserstoff 2 Tage stehengelassen und die Lösung eingedampft. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol-Äther erwiesen sich die Kristalle mit Smp. 146° nach Misch-Smp., Rf-Wert, IR.- und NMR.-Spektrum als DL-Glutaminsäure-dimethylester-hydrochlorid.

Je 5 mg des Hydantoins **3** und 0,5 ml 6N Salzsäure wurden im Bombenrohr auf 125° erhitzt und die Produktzusammensetzung in Abhängigkeit der Zeit durch Dünnschichtchromatographie ermittelt. Nach 15 Min. lag ein Gemisch von etwa gleichen Teilen Ausgangsmaterial und Hydantoin der Glutaminsäure neben Spuren von Glutaminsäure vor. Nach 4 Std. war kein Ausgangsmaterial mehr vorhanden, es wurden etwa gleiche Teile von Glutaminsäure und deren Hydantoin nachgewiesen.

(R, S)- α -Acetamido- δ -valerolacton (**6**). 10 g (75,2 mMol) δ -Hydroxy-DL-norvalin (**5**) [9] wurden in 100 ml Eisessig unter Erwärmen gelöst, mit 50 ml Essigsäureanhydrid vermischt und 50 Min. unter Rückfluss gekocht. Nach dem Eindampfen im Vakuum blieben 11,8 g farbloses Öl zurück, das nicht kristallisiert werden konnte. IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform: $\nu_{\max}$ 3400, 1740, 1670, 1500 und 1150 cm^{-1} . Das Rohprodukt wurde direkt weiter verarbeitet.

(R, S)- α -Acetamido- δ -bromovaleriansäure (**7**). 11,8 g rohes Lacton **6** wurden in 100 ml 33-proz. Bromwasserstoffsäure in Eisessig 6 Tage bei Zimmertemperatur im Dunkeln gerührt. Nach dem Eindampfen im Vakuum blieb ein braunes Öl zurück, welches für die nächste Stufe als Rohprodukt eingesetzt wurde.

Zur Charakterisierung wurde eine Probe davon in Essigester gelöst und mehrmals mit gesättigter Kochsalzlösung ausgeschüttelt. Die getrocknete organische Phase gab beim Eindampfen einen Rückstand, der viermal aus Chloroform-Petroläther umkristallisiert wurde. Man erhielt farblose Blättchen mit Smp. 107–108°. IR.-Absorptionsspektrum in Nujol: $\nu_{\max}$ 3300–2100 (breit), 1700, 1580, 1540 cm^{-1} . NMR.-Spektrum in D_2O : δ 1,83–2,20 ppm (*k*, 4 H), 2,05 (*s*, 3 H), 3,54 (*k*, 2 H), 4,42 (*k*, 1 H).

$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{BrNO}_3$	Ber. C 35,31	H 5,08	N 5,88	Br 33,57%
	Gef. „ 35,14	„ 5,25	„ 5,76	„ 33,49%

(R, S)- α -Acetamido- δ -bromovaleriansäure-methylester (**8**). Die rohe Säure **7** aus dem obigen Ansatz wurde mit 500 ml abs. Methanol, in das man 50 g Chlorwasserstoff eingeleitet hatte, 24 Std. bei 20° stehengelassen. Nach dem Eindampfen im Vakuum wurde der Rückstand in 250 ml Chloroform und 15 ml Methanol gelöst und mehrmals mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Nach dem Trocknen und Eindampfen erhielt man einen blassbraunen kristallinen Rückstand, der aus Chloroform-Petroläther umkristallisiert, 14,0 g Methylester **8** gab (73% bezogen auf die Hydroxyaminosäure **5**). Zur Analyse wurde eine Probe dreimal aus Chloroform-Petroläther umkristallisiert, Smp. 67–68°. Massenspektrum: *m/e* 253 (1,1%, *M* + 2), 251 (1,1%, *M*) (Intensitäten in % des Basispekts bei *m/e* 150). IR.-Absorptionsspektrum in Chlf.: $\nu_{\max}$ 3400, 1730, 1670, 1500 cm^{-1} . NMR.-Spektrum in CDCl_3 : δ 1,75–2,15 ppm (*k*, 4 H), 2,02 (*s*, 3 H), 3,42 (*k*, 2 H), 3,77 (*s*, 3 H), 4,50–4,83 (*b*, 1 H), 6,05–6,40 (*b*, 1 H).

$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{BrNO}_3$	Ber. C 38,11	H 5,60	Br 31,70%	Gef. C 38,59	H 5,84	Br 32,46%
--	--------------	--------	-----------	--------------	--------	-----------

(R, S)- α -Acetamido- δ -jodvaleriansäure-methylester (**9**). 1,26 g (5 mMol) Bromester **8** und 1,15 g (7,5 mMol) Natriumjodid wurden mit 12 ml Aceton unter Feuchtigkeitsausschluss über Nacht unter Rückfluss gekocht. Der Niederschlag von Natriumbromid wurde abfiltriert, das Filtrat eingedampft und der Rückstand in 50 ml Äthylacetat gelöst. Das überschüssige Reagens und Spuren von ausgeschiedenem Jod wurden durch Waschen mit Kochsalzlösung, die etwas Natriumthiosulfat enthielt, entfernt, die Lösung getrocknet und eingedampft. Der kristalline Rückstand von 1,40 g (88%) wurde zur Analyse dreimal aus Aceton-Petroläther umkristallisiert: blassgelbliche Blättchen, Smp. 81–82°. Im IR.-Absorptionsspektrum sind die gleichen charakteristischen Banden zu erkennen wie beim Bromester **8**; Im NMR.-Spektrum liegt das Multipllett der J-CH_2 -Gruppe bei δ 3,20 ppm bei sonst weitgehender Übereinstimmung mit dem Spektrum von **8**.

$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{JNO}_3$	Ber. C 32,11	H 4,72	N 4,68	J 42,42%
	Gef. „ 32,22	„ 4,89	„ 4,59	„ 42,08%

Umsetzung des Bromesters **8** mit Silbernitrit. 8 g (31,8 mMol) Bromester **8** und 12 g (78 mMol) frisch hergestelltes Silbernitrit [17] in 50 ml abs. Benzol wurden im Dunkeln bei Zimmertempera-

tur 3 Tage gerührt. Nach dem Filtrieren und Auswaschen der Silbersalze mit Äther wurde eingedampft. Der ölige Rückstand (6 g) zeigte im Dünnschichtchromatogramm (Äthylacetat) drei etwa gleich intensive Flecke mit den Rf-Werten 0,21, 0,32 und 0,44. Die präparative Auftrennung erfolgte durch eine CRAIG-Verteilung über 195 Stufen im System Wasser-Methanol-Äthylacetat-Petroläther 4:1:4:1.

(R, S)- α -Acetamido- δ -nitro-valeriansäure-methylester (**10**). Die Fraktionen 65–100 der CRAIG-Verteilung (Rf 0,32) gaben beim Eindampfen 2,07 g (30%) farbloses einheitliches Öl, das nach einigem Stehen erstarrte. Die Kristalle wurden dreimal aus Essigester-Äther-Petroläther umgelöst: farblose Nadeln, Smp. 58°. Massenspektrum: M^+ 218. UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: $\lambda_{\max}$ 278 nm, $\log \epsilon$ 1,36. IR.-Absorptionsspektrum in Chlf.: $\nu_{\max}$ 3400, 1735, 1675, 1550, 1500 cm^{-1} . NMR.-Spektrum in CDCl_3 : δ 1,60–2,35 ppm (k , 4 H), 2,05 (s , 3 H), 3,78 (s , 3 H), 4,45 (k , 2 H), 4,70 (b , 1 H), 6,26–6,60 (b , 1 H).

$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$ Ber. C 44,03 H 6,47 N 12,84% Gef. C 43,93 H 6,38 N 12,80%

(R, S)- α -Acetamido- δ -nitrito-valeriansäure-methylester (**11**). Beim Eindampfen der Fraktionen 121–145 der CRAIG-Verteilung (Rf 0,44) wurden 894 mg (13%) einheitlicher Rückstand erhalten, der nach viermaligem Umkristallisieren aus Äthylacetat-Äther-Petroläther 580 mg farblose lange Nadeln mit Smp. 41–43° gab, die auf Grund der Analyse ca. 1 Mol. Kristallwasser enthielten. Getrocknet wurde 7 Tage bei 20° im Hochvakuum. Massenspektrum: auffallende Signale bei m/e 187 ($M-31$), 144, 128, 86, 59, 43, 30. UV.-Absorptionsspektrum: kein Maximum oberhalb 210 nm. IR.-Absorptionsspektrum in Chlf.: $\nu_{\max}$ 3450, 1735, 1675, 1630, 1500, 1260, 860 cm^{-1} . NMR.-Spektrum in CDCl_3 : δ 1,55–2,16 ppm (k , 4 H), 2,03 (s , 3 H), 3,77 (s , 3 H), 4,48 (k , 2 H), 4,50–4,85 (k , 1 H), 6,10–6,55 (b , 1 H).

$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Ber. C 40,67 H 6,83 N 11,86% Gef. C 41,04 H 6,71 N 12,22%

N-Acetyl-DL-prolin-methylester. Aus den Stufen 25–40 der CRAIG-Verteilung wurden 764 mg (14%) eines farblosen Öls (Rf 0,21) erhalten, das durch Dünnschichtchromatographie und durch das IR.-Absorptionsspektrum mit einem synthetischen Präparat von *N*-Acetyl-DL-prolin-methylester identifiziert wurde.

Bei der Umsetzung des Jodids **9** mit Silbernitrit unter den gleichen Bedingungen wurden dieselben drei Produkte erhalten, und zwar 23% der Theorie Nitroverbindung, 21% Nitrit und 20% Acetylprolin-methylester.

Reaktion des Bromesters 8 mit Natriumnitrit. Natriumnitrit, Harnstoff und Phloroglucin wurden 3 Tage bei 120° getrocknet. Dimethylformamid wurde bei 12 Torr über Calciumhydrid destilliert.

137 g (0,544 Mol) Bromester **8**, 48 g Harnstoff, 68 g Phloroglucin und 62 g (0,90 Mol) Natriumnitrit in 700 ml Dimethylformamid wurden im Dunkeln bei 20° 16 Std. gerührt, dann wurden bei 80°/12 Torr 500 ml Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde in 2500 ml Wasser gelöst, die Lösung mit Ammoniumchlorid gesättigt und siebenmal mit total 11 l Äthylacetat ausgeschüttelt. Die Extrakte wurden zweimal mit Kochsalzlösung gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand (185 g) wurde in 1500 ml abs. Chloroform aufgenommen, vom ungelösten Phloroglucin abfiltriert und nach dem Eindampfen mit Äthylacetat als Elutionsmittel an 2 kg Kieselgel chromatographiert. Die dünnenschichtchromatographisch einheitlichen Fraktionen gaben nach zweimaligem Umkristallisieren aus Chloroform-Äther-Petroläther 46,8 g farblose Nadeln mit Smp. 58°, die mit der oben beschriebenen Nitroverbindung **10** identisch waren. Aus phloroglucinhaltigen Übergangsfractionen und aus den Mutterlaugen konnten nach erneuter Chromatographie weitere 11,5 g kristalliner Nitroester erhalten werden. Gesamtausbeute 50% der Theorie.

Im Rohprodukt liessen sich durch Dünnschichtchromatographie weder das Nitrit **11** noch *N*-Acetylprolin-methylester nachweisen.

N-Acetyl- δ -nitro-DL-norvalin (**12**). 46,8 g (0,214 Mol) Methylester **10** wurden in einer Lösung von 230 g Kristallsoda in 2,3 l Wasser 24 Std. bei 20° gerührt. Nach dem vorsichtigen Ansäuern mit 460 ml Eisessig wurde im Vakuum zur Trockene eingedampft und der Rückstand in drei Portionen mit insgesamt 2,5 l heissem Aceton ausgezogen, wobei die Hauptmenge des Natriumacetats

²⁾ Bei allen in dieser Arbeit beschriebenen und weiteren in diesem Zusammenhang hergestellten Nitriten wurden starke IR.-Absorptionsbanden bei 1630, 1260 und 860 cm^{-1} gefunden, die als für Alkylnitrite charakteristisch angesehen werden.

ungelöst blieb. Nach dem Abtreiben des Acetons wurde der Rückstand mit 300 ml Wasser auf eine Säule aus ca. 1000 ml DOWEX 50 W (H-Form) aufgetragen und mit Wasser eluiert. Es wurden 42 g farbloses, weitgehend kristallines Eluat erhalten, das aus Aceton-Petroläther farblose Kristalle mit Smp. 94–100° gab. IR.-Absorptionsspektrum in Nujol: $\nu_{\max}$ 3350, 2800–2200, 1700, 1615, 1560, 1545 cm^{-1} . NMR.-Spektrum in D_2O : δ 1,7–2,2 ppm (*k*, 4 H), 2,05 (*s*, 3 H), 4,25–4,70 (*k*, 3 H), letzteres teilweise überdeckt durch das HOD-Signal.

$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$ Ber. C 41,17 H 5,92 N 13,72% Gef. C 41,17 H 5,92 N 13,67%

δ -Nitro-L-norvalin (2). 42 g (0,206 Mol) der racemischen N-Acetylaminosäure **12** in 2 l Wasser wurden mit konz. Ammoniak auf pH 7,8 eingestellt und nach Zusatz von 420 mg Acylase I¹⁾ 40 Min. auf 45° erwärmt. Nach Zusatz von 50 ml Eisessig wurde zur Trockene eingedampft, der kristalline Rückstand zur Abtrennung der D-Acetylaminosäure mehrere Male mit heissem Äthylalkohol ausgezogen, mit Äther gewaschen, getrocknet und fein zerrieben. Das Pulver wurde in Portionen zu 5 g in je 80 ml siedendheisses Wasser eingetragen, worauf es innert 30 Sek. gelöst war. Die Lösung wurde sofort mit 400 ml Äthanol versetzt und 24 Std. im Kühlschrank aufbewahrt. Es fielen 12,5 g (75%) Aminosäure in weissen glänzenden Blättchen an. Zur Analyse wurde eine Probe zweimal aus Wasser-Äthanol umkristallisiert. Smp. ca. 170° (Zers.), $[\alpha]_{\text{D}} = +22,8^\circ$ (*c* = 0,56% in 2N Salzsäure). pK_{MCS}^* 9,41. UV.-Absorptionsspektrum in 2N HCl: $\lambda_{\max}$ 268 nm, $\log \epsilon = 1,46$. IR.-Absorptionsspektrum in Nujol: $\nu_{\max}$ 3500–2500, 1600, 1580, 1525, 890, 805, 765 cm^{-1} . NMR.-Spektrum in $\text{D}_2\text{O} + \text{CF}_3\text{COOD}$: δ 2,00–2,25 ppm (*k*, 4 H), 4,00–4,30 (*k*, 1 H), 4,50–4,70 (*k*, 2 H, teilweise vom HOD-Signal überdeckt).

$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$ Ber. C 37,03 H 6,22 N 17,28% Äq.-G. 162
Gef. „ 36,81 „ 6,02 „ 17,15% „ 161

N-Acetyl- δ -nitro-D-norvalin (12a). Der Alkohol-Auszug der Produkte der enzymatischen Deacetylierung wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in 150 ml Wasser gelöst und an einer Säule aus ca. 500 g DOWEX 50 W (H-Form) chromatographiert. Die mit Wasser erhaltenen Eluate gaben beim Eindampfen 11,2 g (53,4%) farblosen Rückstand, der rasch erstarrte. Die Analysenprobe wurde viermal aus Aceton-Petroläther umkristallisiert. Smp. 118–119°, $[\alpha]_{405} = -0,5^\circ$ (*c* = 0,6% in Alkohol).

$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$ Ber. C 41,17 H 5,92 N 13,72% Gef. C 41,02 H 5,75 N 13,41%

N-Acetyl- δ -nitro-L-norvalin (12b). 81 mg des optisch aktiven δ -Nitro-L-norvalins wurden in 10 ml 3N absolut-methanolischem Chlorwasserstoff über Nacht stehengelassen. Nach dem Eindampfen im Vakuum wurde der Rückstand in 1,5 ml Acetonitril gelöst und mit 33 mg (0,55 mMol) Eisessig und 51 mg (0,5 mMol) Triäthylamin versetzt. Zur auf -10° abgekühlten Lösung wurden 104 mg (0,5 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid in 1 ml Acetonitril gefügt und das Gemisch 5 Std. bei -10° und dann 20 Std. bei Zimmertemperatur gerührt. Vom ausgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert, die Lösung eingedampft und der Rückstand mit 10 ml Wasser und 1 g Kristallsoda über Nacht bei Zimmertemperatur hydrolysiert. Dann wurden 2 ml Eisessig zugesetzt, die Lösung zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit heissem Aceton ausgezogen. Der Rückstand nach dem Abtreiben des Acetons wurde mit Wasser durch eine Säule aus ca. 2 g DOWEX 50 W (H-Form) filtriert. Man erhielt nach dem Eindampfen 50 mg Produkt, das nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther-Petroläther bei 116,5–117,5° schmolz. $[\alpha]_{405} = +0,6^\circ$ (*c* = 0,6% in Alkohol). Das IR.-Absorptionsspektrum und der Rf-Wert stimmten mit denen des oben beschriebenen Enantiomeren überein.

5-Oximino-L-prolin (13). 25 g δ -Nitro-L-norvalin (**2**) wurden durch 15 Min. Erhitzen mit 500 ml Wasser in Lösung gebracht und die heisse Lösung mit 1500 ml Äthanol verdünnt. Nach dem langsamen Abkühlen und Stehen bei 0° kristallisierten 7,5 g Ausgangsmaterial aus. Die Mutterlaugen wurden eingedampft, der Rückstand in möglichst wenig kaltem Wasser gelöst, die Lösung filtriert und bis zur beginnenden Trübung mit Alkohol versetzt. Das sich ausscheidende Kristallinat konnte durch sechsmaliges Umkristallisieren aus Wasser-Alkohol vollständig von der Aminosäure **2** befreit werden. Man erhielt 2 g farblose tafelige Kristalle, Smp. 125° (Zers.), $[\alpha]_{\text{D}} = -54^\circ$ (*c* = 0,6% in Wasser). Mikrotitration mit Tetramethylammoniumhydroxid: pK_{MCS}^* 6,72; mit HCl: pK_{MCS}^* ca. 4,0. UV.-Absorptionsspektrum in Wasser: Kein Maximum oberhalb 210 nm. IR.-

Absorptionsspektrum in Nujol: $\nu_{\max}$ 3300, 2800–2100, 1680, 1575 cm^{-1} , breite niedrige Bande 2000 bis 1750 cm^{-1} . NMR.-Spektrum in D_2O : δ 1,8–3,1 ppm (*k*, 4 H), 4,28–4,60 (*k*, 1 H).

$\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$	Ber.	C 41,55	H 5,59	N 19,44%	Δq -G. 144
	Gef.	„ 41,79	„ 5,66	„ 19,48%	„ 148

Der mit absolut-methanolischem Chlorwasserstoff bei 20° hergestellte Methylester kristallisierte als Hydrochlorid aus Methanol-Äther, Smp. 145–146°, $[\alpha]_{\text{D}} = -13^\circ$ ($c = 0,5\%$ in Methanol), pK_{MCS}^* 4,68. IR.-Absorptionsspektrum in Nujol: $\nu_{\max}$ 3100–2500, 1740, 1680 cm^{-1} .

$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_3$	Ber.	C 37,03	H 5,70	N 14,40	Cl 18,22%	Δq -G. 194
	Gef.	„ 37,09	„ 5,65	„ 14,34	„ 18,19%	„ 191

Hydrolyse des 5-Oximino-L-prolins (13). 10 mg **13** wurden während 40 Std. bei 120° mit 1 ml 6N Salzsäure im Bombenrohr hydrolysiert. Durch Papierchromatographie und Dünnschichtchromatographie (Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1) konnten durch direkten Vergleich mit authentischen Proben Glutaminsäure (Nachweis mit Ninhydrin) und Hydroxylamin (Nachweis nach CSAKY [18] bzw. mit Triphenyltetrazoliumchlorid) identifiziert werden.

BOC- δ -Nitro-L-norvalinmethylester (14). 3 g (18,5 mMol) δ -Nitro-L-norvalin (**2**) wurden in 200 ml 3N abs. methanolischem Chlorwasserstoff 2 Tage bei 20° verestert und der ölige Eindampfdruckstand unter Kühlung mit Eis mit 200 ml Chloroform, das bei 0° mit Ammoniak gesättigt war, 15 Min. geschüttelt. Mit Hilfe von Celit wurde vom Ammoniumchlorid abfiltriert, der Filtrerrückstand mehrmals mit Chloroform ausgezogen und die vereinigten Filtrate im Vakuum eingedampft. Der dickflüssige Rückstand (2,9 g) wurde mit 9 g *t*-Butoxycarbonylazid und 9 g Pyridin bei 45° 16 Std. gerührt [16], Pyridin und überschüssiges Reagens bei 80° im Vakuum abgetrieben und der rotbraune Rückstand in Äthylacetat gründlich mit 10-proz. Zitronensäure, Natriumhydrogencarbonat und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Der Eindampfdruckstand der mit Natriumsulfat getrockneten Lösung (4 g) wurde an 200 g Kieselgel mit Chloroform und anschliessend Chloroform-Äthylacetat 8:2 chromatographiert. Die dünnschichtchromatographisch einheitlichen Fraktionen gaben 3,1 g (61%) farblose, zähe Flüssigkeit, $[\alpha]_{\text{D}} = -24,1^\circ$ ($c = 1,0\%$ in Methanol). IR.-Absorptionsspektrum in Chlf.: $\nu_{\max}$ 3400, 1730, 1705, 1550 cm^{-1} . NMR.-Spektrum in CDCl_3 : δ 1,47 ppm (*s*, 9 H), 1,67–2,30 (*k*, 4 H), 3,78 (*s*, 3 H), 4,15–4,60 (*k*, 3 H), 5,00–5,33 (*b*, 1 H).

BOC- δ -Nitro-L-norvalin (15). 3,1 g (11,25 mMol) Methylester **14** in 20 ml Methanol wurden mit 10 g Kristallsoda in 80 ml Wasser zwei Tage gerührt und anschliessend mit 100 ml gesättigter Kochsalzlösung verdünnt. Die vorsichtig mit Zitronensäure angesäuerte Lösung wurde fünfmal mit je 150 ml Äthylacetat extrahiert, die Auszüge wurden mit wenig Kochsalzlösung zweimal gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand (2,9 g entspr. 98%) bildete eine farblose, dickflüssige Masse, die nicht kristallisiert werden konnte. $[\alpha]_{\text{D}} = -7,6^\circ$ ($c = 1,08\%$ in Methanol). IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform: $\nu_{\max}$ 3350, 3300–2300, 1705, 1700, 1550 cm^{-1} . NMR.-Spektrum in CDCl_3 : δ 1,47 ppm (*s*, 9 H), 1,65–2,40 (*b*, 4 H), 4,15–4,60 (*k*, 3 H), 5,00–5,60 (*b*, 1 H), 8,75 (*b*, 1 H).

Bestimmung der optischen Reinheit. 46,3 mg des geschützten Aminosäureesters **14** wurden in 3 ml Feinsprit und 0,5 ml Eisessig in Gegenwart von 150 mg 10-proz. Palladiumkohle 5 Std. bei 20° hydriert. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators wurde eingedampft und der Rückstand mit 3 ml 6N Salzsäure über Nacht im Bombenrohr auf 115° erhitzt. Der Eindampfdruckstand (35 mg) erwies sich durch Dünnschichtchromatographie als reines Ornithin-dihydrochlorid: $[\alpha]_{\text{D}} = +18,6^\circ$ ($c = 0,7$ in 6N Salzsäure). Authentisches L-Ornithindihydrochlorid: $[\alpha]_{\text{D}} = +18,2^\circ$ ($c = 0,7\%$ in 6N Salzsäure).

Die Analysen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium (Leitung W. MANSER) ausgeführt. Die NMR.-Spektren verdanken wir unserer Abteilung für Instrumentalanalyse (Leitung Prof. W. SIMON), die Massenspektren Herrn Dr. J. SEIBL. Für ihre Mithilfe bei der Herstellung der Ausgangsmaterialien danken wir den Herren H. GROSSMANN und ANDRÉ MÜLLER.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 73. Mitteilung: W. KELLER-SCHIERLEIN, R. MUNTWYLER, W. PACHE & H. ZÄHNER, *Helv.* **52**, 127 (1969).
- [2] W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG & H. ZÄHNER, *Fortschr. der Chemie organischer Naturstoffe* (Ed. L. ZECHMEISTER) **22**, 279 (1964).

- [3] S. J. ROGERS, R. A. J. WARREN & J. B. NEILANDS, *Nature* **200**, 167 (1963).
- [4] J. B. NEILANDS, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 4846 (1952).
- [5] H. ZÄHNER, W. KELLER-SCHIERLEIN, R. HÜTTER, K. HESS-LEISINGER & A. DEÉR, *Arch. Mikrobiol.* **45**, 119 (1963).
- [6] W. KELLER-SCHIERLEIN & A. DEÉR, *Helv.* **46**, 1907 (1963); W. KELLER-SCHIERLEIN, *Helv.* **46**, 1920 (1963).
- [7] W. KELLER-SCHIERLEIN & B. MAURER, *Helv.* **52**, (1969) (im Druck).
- [8] S. J. ROGERS & J. B. NEILANDS, *Biochemistry* **2**, 6 (1963).
- [9] H. PLIENINGER, *Chem. Ber.* **83**, 271 (1950).
- [10] N. KORNBLUM, H. O. LARSON, R. K. BLACKWOOD, D. D. MOOBERRY, E. P. OLIVETO & G. E. GRAHAM, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 1497 (1956).
- [11] N. KORNBLUM, R. K. BLACKWOOD & D. D. MOOBERRY, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 1501 (1956).
- [12] V. MEYER, *Liebigs Ann. Chem.* **175**, 88 (1875).
- [13] S. M. BIRNBAUM, L. LEVINTOW, R. B. KINGSLEY & J. P. GREENSTEIN, *J. biol. Chemistry* **194**, 455 (1952).
- [14] R. SCHWYZER, P. SIEBER & H. KAPPELER, *Helv.* **42**, 2622 (1959).
- [15] E. SCHNABEL, *Liebigs Ann. Chem.* **702**, 188 (1967).
- [16] E. WÜNSCH, G. WENDLBERGER & J. JENTSCH, *Chem. Ber.* **97**, 3298 (1964).
- [17] N. KORNBLUM, B. TAUB & H. E. UNGNADE, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 3209 (1954).
- [18] I. M. HAIS & K. MACEK, *Handbuch der Papierchromatographie*, Band I, S. 750, Gustav Fischer Verlag, Jena 1958.

45. Photochemische Umwandlungen. XXVII [1]

Ein «stabiles» Benzoloxid

Vorläufige Mitteilung¹⁾

von H. Prinzbach und P. Vogel

Institut de Chimie organique, Université de Lausanne

(9. I. 69)

Summary. By thermal isomerization of the 3-oxa-6,7-diphenyl-tetracyclo[3.2.0.0^{2,7}.0^{4,6}]-heptane-1,5-dicarbomethoxylate (4) besides the oxanorbornadiene 3 and the hydroxy-fulvene 7, the 'stable' benzeneoxide 7-oxa-2,5-diphenyl-bicyclo[4.1.0]hepta-2,4-diene-3,4-dicarbomethoxylate (5) has been isolated. In the temperature range – 50 to 170°C no equilibration with the monocyclic oxepine 6 has been detected.

Das valenztautomere Gleichgewicht Oxepin $\rightleftharpoons$ Benzoloxid ($1 \rightleftharpoons 2$) [2] ist durch Variation der äusseren Parameter (Temp., Lösungsmittel) und durch Art der Substitution in weiten Grenzen variierbar [3] [4]. Eine Fixierung der bicyclischen Struktur gelang nur durch eine auch die Geometrie der Molekel stark verändernde Überbrückung der Positionen C-2, C-7 mit einer Methylenkette geeigneter Länge [2a] und durch zusätzliche Anellierung [5]. Mit dem 7-Oxa-2,5-diphenyl-bicyclo[4.1.0]heptadien-(2,4)-dicarbonsäure-(3,4)-dimethylester (5) haben wir ein Benzoloxid isoliert, für welches sich keine Gleichgewichtseinstellung mit dem monocyclischen Oxepin 6 nachweisen lässt.



¹⁾ Eine ausführliche Mitteilung, die in dieser Zeitschrift erscheinen soll, ist in Vorbereitung.