

## Darstellung von einigen bakterizidisch wirksamen : Glutaminsäure-Derivaten

Kuwano, Eiichi

Institut für Pflanzenschutz-Chemie der landwirtschaftlichen Fakultät, Kyushu Universität

Maekawa, Kazuyuki

Institut für Pflanzenschutz-Chemie der landwirtschaftlichen Fakultät, Kyushu Universität

Saruno, Rinjiro

Institut für Angewandte Mikrobiologie der landwirtschaftlichen Fakultät, Saga Universität

<https://doi.org/10.5109/22871>

---

出版情報：九州大学大学院農学研究院紀要. 19 (2/3), pp.83-90, 1975-03. Kyushu University

バージョン：

権利関係：



## Darstellung von einigen bakterizidisch wirksamen Glutaminsäure-Derivaten

Eiichi Kuwano, Kazuyuki Maekawa und Rinjiro Saruno\*

Institut für Pflanzenschutz-Chemie der landwirtschaftlichen Fakultät, Kyushu  
Universität, Fukuoka, und \*Institut für Angewandte Mikrobiologie  
der landwirtschaftlichen Fakultät, Saga Universität, Saga

(Eingegangen am 19. November 1974)

In order to scrutinize antimicrobial activities of amino acid derivatives,  $\gamma$ -(or  $\alpha$ -)butyl esters of glutamic acid  $\alpha$ -(or  $\gamma$ -)alkylamide were prepared. These compounds were antibiologically effective against not only bacteria, but also some fungi and yeasts. However, the  $\gamma$ -butyl ester cyclized spontaneously to form microbially inactive  $\gamma$ -lactam.

Anschliessend an andere Forschung wurde es gefunden, dass ein gewisses Glutaminsäure-Derivat bakterizide Aktivität hatte, insbesondere dass bestimmte Lipophilizität besitzende Glutaminsäureester stärkere Aktivität zeigten (Saruno *et al.*, 1972). Hierauf stellten die Verfasser die verwandten Verbindungen her und prüften ihre bakterizide Wirkung.

Darunter wurde die Darstellung von  $\gamma$ -Butylestern des L-Glutaminsäure- $\alpha$ -Alkylamid folgendermassen durchgeführt. Nachdem man die Aminogruppe von Glutaminsäure- $\gamma$ -Methylester (Boissonnas *et al.*, 1955) mit der Carbobenzoxy-Gruppe schützte, liess man es in Gegenwart von 1-Hydroxybenzotriazol und DCC mit Alkylamid reagieren, um  $\gamma$ -Methylester von N-Z-L-Glutaminsäure- $\alpha$ -Alkylamid zu gewinnen (König und Geiger, 1970). Dies wurde in n-Butanol unter Verwendung von weniger Toluolsulfonsäure durch Erhitzung zu  $\gamma$ -Butylester umesteriert (Sandler und Karo, 1968). Die Gruppe Z wurde nach gewöhnlicher Weise durch katalytische Reduktion mittels Pd-Schwarz entfernt. Indem man n-Lauryl-, n-Octyl-, und sek. Octylamin anwendete, erhielt man entsprechende Verbindungen mit guter Ausbeute.

Andererseits wurde die Synthese von  $\gamma$ -Laurylamid folgenderweise durchgeführt. Z-Glutaminsäureanhydrid, das durch die Reaktion von Z-Glu und DCC erhalten worden war (Gibian und Klieger, 1961), wurde in Gegenwart von Dicyclohexylamin in methanolischer Lösung bei Raumtemperatur behandelt. Nachdem das dabei erhaltene DCHA-Salz von N-Z-Glutaminsäure- $\alpha$ -Methylester durch Zusatz von Säure freigesetzt wurde, liess man es zunächst mit n-Laurylamin in Existenz von 1-BT und DCC reagieren, dann wurde es der Umesterung, und schliesslich der hydrierten Spaltung von der Schutz-Gruppe unterworfen (Abb 1).

Abkürzungen ; 1-BT : 1-Hydroxybenzotriazol, DCC : Dicyclohexylcarbodiimid, DCHA : Dicyclohexylamin, DCU : Dicyclohexylharnstoff, Z : Carbobenzoxy

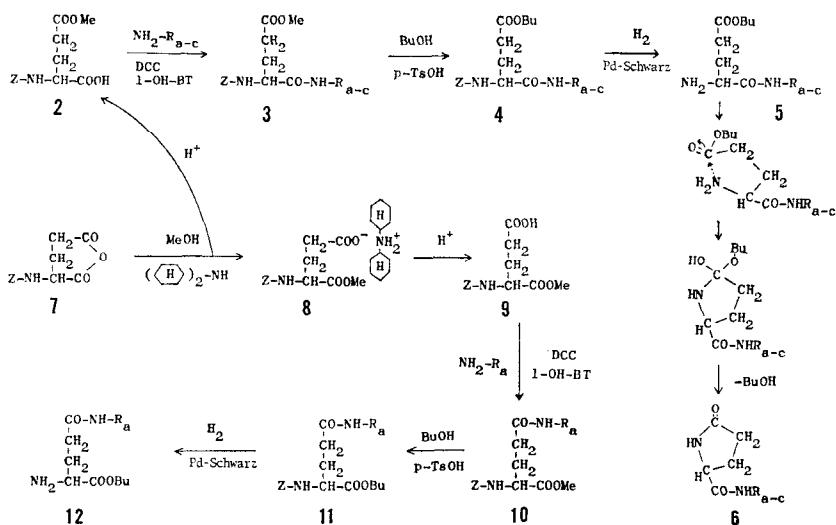


Abb. I. Darstellung von r-Butyl (bzw.  $\alpha$ -Butyl)ester von Glutaminsäure- $\alpha$ -Alkyl (bzw.  $\gamma$ -Alkyl) amid.  $R_a = -CH_2-(CH_2)_{10}-CH_3$ ,  $R_b = -CH_2(-CH_2)_6-CH_3$ ,  $R_c = CH_3-CH-(CH_2)_5-CH_3$ .

Hinsichtlich der bakeriziden Wirkung war  $\gamma$ -Butylester von Glutaminsäure- $\alpha$ -Laurylamid die wirkungsvollste.  $\gamma$ -Laurylamid von Glutaminsäure- $\alpha$ -Butylester war auch ziemlich wirksam. Das an der Stelle von  $\alpha$ -n-Octylamid bzw. sek. Octylamid verknüpfte Glutaminsäure- $\gamma$ -Butylester war auch wirkungsvoll. Diese Verbindungen waren auch wirksam als Antibiotiken gegen Schimmelpilzarten und Hefen. Das Ergebnis wurde kürzlich in Tabelle 1 gezeigt, aber wurde es an andere Stelle durchführlich mitgeteilt.

Tabelle 1. Antimikrobiologische Wirkung von Verbindung 5a.

Mikroorganismen	Minimale Inhibitions-Konzentration (fig/ml)
<i>Aspergillus oryzae</i>	30
<i>Aspergillus niger</i>	45
<i>Staphylococcus aureus</i>	20
<i>Xanthomonas citri</i>	20
<i>Xanthomonas oryzae</i>	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	180
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	40
<i>Cladosporium jiiilvum</i>	40
<i>Pichia membranaefaciens</i>	15

Wenn diese Verbindungen (5a, b und c) bei Raumtemperatur stehen gelassen wurden, verloren sie nach einiger Stunden ihre bakterizide Wirkung vollständig. Gleichzeitig lagerte die Verbindung zu einem Laktam (6) unter Abspaltung von  $\gamma$ -Butyl-Rest um. Bei  $\gamma$ -Laurylester im Gegensatz zu  $\gamma$ -Butylester fand keine

derartige Umlagerung statt.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

#### (I) Darstellung von $\gamma$ -Butylester des L-Glutaminsäure- $\alpha$ -n-Laurylamid

##### 1) Carbobenzoxylierung von Glutaminsäure- $\gamma$ -Monoester (2)

Ein Gemisch von 1.7 g  $\gamma$ -Methylester der L-Glutaminsäure (kommerziell), 1.2 g MgO und 3 ml Z-Cl in 20 ml Wasser und 10 ml Äther wurde bei 0°C 6-7 Stunden lang umgerührt. Nachdem überschüssiges MgO, dann atherisches Lösungsmittel nacheinander entfernt worden war, wurde die wässrige Lösung nach zweimaligem Waschen mit Äther zur pH 3.5 mit konz. HCl angesäuert, um ein öliges Produkt zu erhalten. Das rohe Produkt wurde mit Benzol extrahiert und der Auszug wurde nach Waschen mit Wasser zur Trocknung eingedampft. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung zur Synthese gebraucht. Ausbeute 1.8 g.

##### 2) $\gamma$ -Methylester von N-Z-Glutaminsäure- $\alpha$ -Laurylamid (3)

THF-Lösung von 1.5 g (2), 0.7 g I-BT und 1 g Laurylamin wurde bei 0°C mit 1.1 g DCC unter Umrührung versetzt. Danach wurde es über Nacht weiter umgerührt. Nachdem entstandener DCU abfiltriert worden war, wurde das Filtrat eingeengt und mit Äthanol behandelt. Erhaltene Kristalle wurden aus Äthanol umkristallisiert. Schmelzpt. 109-110°C. Ausbeute 1 g.



	C	H	N
Ber.	67.50	9.15	6.06
Gef.	67.44	9.36	5.96

Diese Verknüpfungsreaktion war ohne Zusatz von I-BT schwer durchführbar.

##### 3) $\gamma$ -Butylester von N-Z-Glutaminsäure- $\alpha$ -n-Laurylamid (4)

In 20 ml n-Butanol wurden 1.5 g (3) und 0.05 g *p*-Toluolsulfinsäure aufgelöst. Die butanolische Lösung wurde in einem Wasserbad bei 80-90°C 5 Stunden lang erwärmt, danach wurde es beinahe 7 Stunden lang unter verminderter Druck mittels Aspirators weiter erhitzt, unter gelegentlicher Prüfung von TLC. Nachdem das erhitzte Reaktionsgemisch mit Äthylacetat verdünnt, dann mit konz. NaHCO<sub>3</sub> Lösung, schliesslich mit Wasser nacheinander gewaschen worden war, wurde es unter verminderter Druck eingeengt. Der Rückstand wurde aus Hexan umkristallisiert. Schmelzpt. 77-78°C. Ausbeute 1.1 g.



	C	H	N
Ber.	69.05	9.52	5.56
Gef.	69.01	9.53	5.58

##### 4) Entfernung von Z-Gruppe (Pd-Reduktion) (5)

Die 1 g von (4) enthaltende methanolische Lösung wurde in Gegenwart von 0.2 g Pd-Schwarz katalytisch hydriert. Nach 3 stündiger Fortsetzung wurde Pd-Schwarz beseitigt und das Filtrat wurde i. Vak. eingeengt. Ausbeute 0.9 g.

Schmelzpt. 28°C.

5) *Entstehung von Laktam (6)*

Wenn man (5) bei Raumtemperatur einige Stunden lang stehen liess, so erhielt man das in Hexan unlösliche Produkt. Diese Umlagerung fand sogar bei Bewahrung im Eisschrank langsam statt. Das Produkt war Kristalle von Schmelzpt. 97-98°C und zeigte keine Ninhydrin-Reaktion, aber Laktam-Bande bei 1700 cm<sup>-1</sup>, 1660 cm<sup>-1</sup> (Abb. 3).

(II) **Darstellung von  $\gamma$ -Butylester des L-Glutaminsäure- $\alpha$ -n-Octylamid bzw. sek. Octylamid.**

(A) Glu ( $\gamma$ -Butylester,  $\alpha$ -n-Octylamid)

1) *Z-Glu ( $\gamma$ -Methylester,  $\alpha$ -n-Octylamid) (3 ; R,)*

Die Reaktion wurde mit 5.7 g Z-Glutaminsäure- $\gamma$ -Methylester, 3 g 1-BT, 4.2 g DCC und 2.7 g Octylamin auf die oben genannte Weise durchgeführt. Ausbeute, 4.5 g (58%). Schmelzpt. 98-99°C (aus Isopropyläther).



	C	H	N
Ber.	65.00	8.43	6.89
Gef.	65.27	8.64	7.12

2) *Z-Glu ( $\gamma$ -Butylester,  $\alpha$ -Octylamid) (4 ; R,)*

Z-Glu ( $\gamma$ -Methylester, n-Octylamid) 3.9 g wurde in Butanol der Umesterung unterworfen. Um beigemischte Methylester zu beseitigen, wurde eine Säule-Chromatographie von Kieselgel angewendet. Das erzielte Produkt wurde mit Benzol innerhalb anfänglich 150 ml eluiert. Ausbeute 2.6 g (44%). Schmelzpt. 65-66°C (aus Hexan).



	C	H	N
Ber.	66.93	8.99	6.25
Gef.	67.22	9.14	6.17

3) *Glu ( $\gamma$ -Butylester,  $\alpha$ -Octylamid) (5 ; R,)*

Die Reduktionsspaltung der Z-Gruppe wurde nach schon erwähnter Weise ausgeführt. Ausbeute 92%. Siedept. 38-40°C/0.06 mmHg.

(B) Glu ( $\gamma$ -Butylester,  $\alpha$ -sek. Octylamid)

1) *Z-Glu ( $\gamma$ -Methylester,  $\alpha$ -sek. Octylamid) (3; R,)*

Die Verknüpfungsreaktion wurde aus 3 g Z-Glu ( $\gamma$ -Methylester) und 1.3 g sek. Octylamin unter Anwendung von 1-BT (1.5 g) und DCC (2.1 g) durchgeführt. Ausbeute 2.3 g (56%). Schmelzpt. 91-92°C (aus Isopropyläther).



	C	H	N
Ber.	65.00	8.43	6.89
Gef.	65.17	8.44	6.98

## 2) Z-Glu ( $\gamma$ -Butylester, $\alpha$ -sek. Octylamid) (4 ; R.)

Z-Glu ( $\gamma$ -Methylester,  $\alpha$ -sek. Octylamin) wurde in butanolischer Lösung in Gegenwart von Toluolsulfonsäure umesteriert. Weil die Beimischung von Methylester erkennbar war, wurde das Reaktionsgemisch unter Anwendung von Säule-Chromatographie (27 x 110 mm) von Kieselgel gereinigt. Nachdem 50 ml Benzol durchlief, wurde das erzielte Produkt mit Benzol-Äther (8: 1) eluiert. Das rohe Produkt wurde aus Hexan umkristallisiert. Schmelzpt. 7879°C. Ausbeute 1.4 g (64 %).



	C	H	N
Ber.	66.93	8.99	6.26
Gef.	66.89	8.93	6.19

## 3) Glu ( $\gamma$ -Butylester, $\alpha$ -sek. Octylamid) (5; R.)

Die Schutz-Gruppe wurde nach schon erwähnter Weise mittels katalytischer Hydrierung entfernt. Ausbeute 0.7 g (85 %), Siedept. 41-43°C/0.06 mm Hg.

### (III) Darstellung von $\gamma$ -Laurylamid des Glutaminslure-a-Butylester.

#### I) Z-Glu ( $\alpha$ -Methylester, $\gamma$ -Laurylamid) (10)

Beinahe 11.2 g Z-Glu-anhydrid (Gibian und Klieger, 1961), das aus Z-Glu und DCC erhalten wurde, wurde in einer gemischten Lösung von Äther (180 ml) und absolutem Methanol (5 ml) aufgelöst. Hierzu wurde die 4 ml Cyclohexylamin enthaltende ätherlische Lösung (15 ml) zugesetzt. Nach Umrührung über Nacht bei Raumtemperatur wurde entstandenes DCHA-Salz gesammelt und mit Äther gewaschen, dann getrocknet. Ausbeute 4 g (28 %). Schmelzpt. 171-2°C (Klieger und Gibian, 1962). Das so erhaltene Z-Glu( $\alpha$ -Methylester)-DCHA-Salz (1.2 g) wurde in einer 1 ml 6 N HCl enthaltenden Essigester Lösung (20 ml) 2 Stunden lang beibehalten. Danach wurde das Reaktionsgemisch abfiltriert und das Filtrat wurde mit Äthylacetat gewaschen. Nachdem die Xthylacetat-Schicht mit Wasser gewaschen, dann mittels  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet worden war, wurde sie eingeengt. Das erhaltene rohe Z-Glu ( $\gamma$ -Methylester) 1.2 g wurde in 20 ml THF aufgelöst und in Gegenwart von 1-BT (0.4 g) und Laurylamin (0.5 g) bei 0°C mit 0.6 g DCC versetzt. Es wurde anfangs bei 0°C 2 Stunden lang, dann bei Raumtemperatur über Nacht umgerührt. Nachdem entstandener DCU durch Filtration beseitigt worden war, wurde das Filtrat eingeengt. Der Rückstand wurde aus Äther umkristallisiert. Ausbeute 1 g (91%). Schmelzpt. 73-5°C.



	C	H	N
Ber.	67.50	9.15	6.06
Gef.	67.75	9.30	6.25

#### 2) Z-Glu ( $\alpha$ -Butylester, $\gamma$ -Laurylamid) (11)

In 30 ml n-Butanol wurden 0.9 g (10) und 0.05 g *p*-Toluolsulfonsäure aufgelöst. Die butanolische Lösung wurde in einem Wasserbad bei 80-90°C 8 Stunden lang erwärmt, danach wurde es weiter beinahe 16 Stunden lang unter leicht verminderterem Druck erhitzt. Nachdem das erhitzte Reaktionsgemisch mit 30 ml Äthyl-

acetat verdünnt, dann mit 5 %iger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung, schliesslich mit Wasser nacheinander gewaschen worden war, wurde es unter verminderter Druck eingeengt. Der Rückstand wurde in wenig Benzol aufgelöst und mittels Säule-Chromatographie (27 x 120 mm) von Kieselgel gereinigt. Nachdem 50 ml Benzol durchgelaufen waren, wurde das bezeichnete Produkt mit 100 ml Benzol-Äther (3 : 1) eluiert. Das rohe Produkt wurde aus Hexan umkristallisiert. Schmelzpt. 81-82°C. Ausbeute 0.6 g (61 %).



	C	H	N
Ber.	69.05	9.52	5.56
Gef.	69.04	9.54	5.44

### 3) Entfernung von Schutz-Gruppe (12)

Die 0.5 g (11) enthaltende methanolische Lösung (30 ml) wurde in Gegenwart von 0.1 g Pd-Schwarz katalytisch hydriert. Nach 4 stündiger Fortsetzung wurde Pd-Schwarz beseitigt und das Filtrat wurde i. Vak. eingeengt. Der Rückstand wurde aus Hexan umkristallisiert. Ausbeute 0.2 g (54 %), Schmelzpt. 37-8°C.

### (IV) Eigenschaften und Bakterizide Aktivität

Die Zusammensetzung, physikalische Eigenschaften und bakterizide Wirkung von erhaltenen Verbindungen wurden in Tabelle 2 zusammengestellt. Die IR Spektren wurden in Abb. 2-a und -b gegeben. Ein spektrometrischer Unterschied zwischen  $\gamma$ -Lauryl- und  $\alpha$ -Lauryl-Verbindungen besteht darin, dass diese bei  $720 \text{ cm}^{-1} \sim 780 \text{ cm}^{-1}$  starke Absorption zeigt. Falls das Laktam entstand, zeigte die IR Absorption bei  $1720 \text{ cm}^{-1}$ - $1655 \text{ cm}^{-1}$  (CO) verschiedene Gestalt an (Abb. 2 und 3).

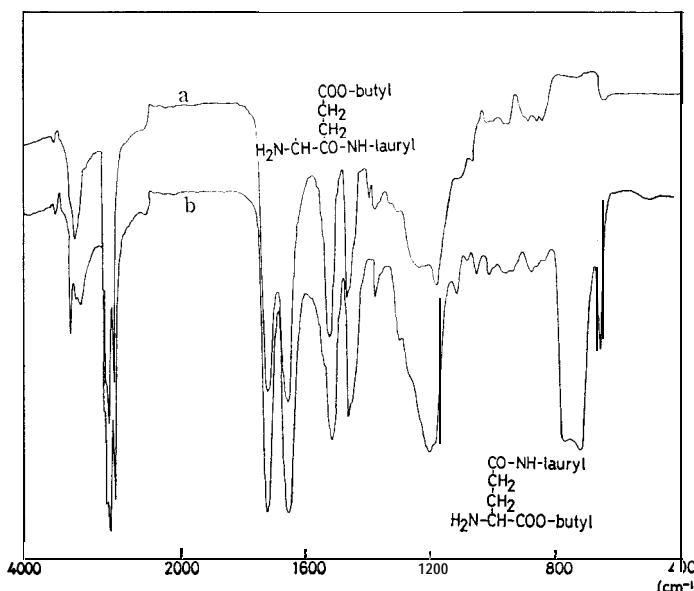


Abb. 2 IR-Spektren des  $\gamma$ - bzw.  $\alpha$ -Butylester von Glutaminsäure  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Lauryl-amid.

**Tabelle 2.**  $\gamma$ - bzw.  $\alpha$ -Butylester von Glutaminsäure a- bzw.  $\gamma$ -Alkylamid.

# Siedept. bei 0.06 mmHg.

In Bezug auf die bakterizide Wirkung wurde gefunden, dass  $\gamma$ -Butylester von Glutaminsäure- $\alpha$ -Laurylamid die wirksamste war,

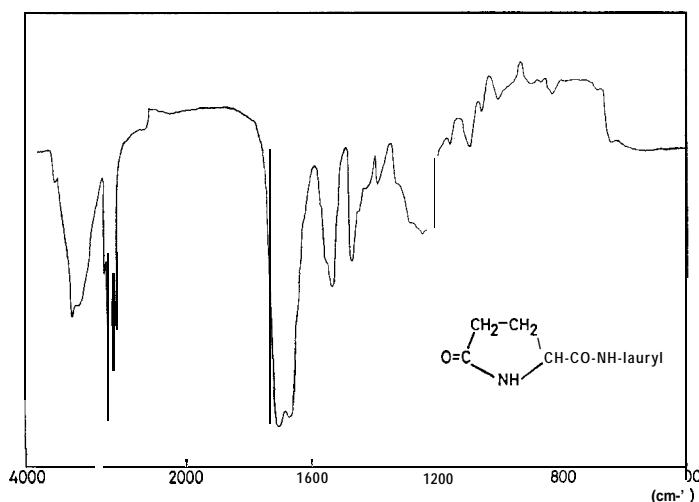


Abb. 3. IR-Spektrum des von  $\gamma$ -Butylester abgeleiteten Laktams.

## LITERATUR

- Boissonnas, R. A., St. Guttmann, P. A. Jaquenoud und J. P. Waller 1955 A new synthesis of oxytocin. *Helv. Chim. Acta*, **38**: 1491-1501
- Gibian, H., und E. Klieger 1961 Über Peptidsynthesen, I. Glutamylpeptide-Synthesen mit Carbobenzoxy-L-Pyroglyutaminsäure. *Ann. Chem.*, **640**: 145-156
- Klieger, E., und H. Gibian 1962 Über Peptidsynthesen, X. Vereinfachte Darstellung und Reaktionen von Carbobenzoxy-L-Glutaminsäure- $\alpha$ -Halbestern. *Ann. Chem.*, **655**: 195-210
- König, W., und R. Geiger 1970 Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen. *Chem. Ber.*, **103**: 788-798
- Sandler, S. R., und W. Karo 1968 *Organic Functional Group Preparation*. Academic Press, (USA), S. 254
- Saruno, R., A. Murata und K. Ishida 1972 Über antimikrobiologische Aktivität von Glutaminsäure-Derivaten. Auszug von 1972 Generalverein der Jap. Agr. Chem. Gesellschaft, S. 164.