九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

# Darstellung von einigen bakterizidisch wirksamen : Glutaminsäure-Derivaten

Kuwano, Eiichi
Institut fiir Pflanzenschutz-Chemie der landwirtschaftlichen Fakultät, Kyushu Universität

Maekawa, Kazuyuki
Institut fiir Pflanzenschutz-Chemie der landwirtschaftlichen Fakultät, Kyushu Universität

Saruno, Rinjiro
Institutfür 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：

KYUSHU UNIVERSITY

J. Fac. Agr., Kyushu Univ., 19, 83-90 (1975)

# Darstellung von einigen bakterizidisch wirksamen Glutaminsäure-Derivaten

**Eiichi Kuwano, Kazuyuki Maekawa uud Rinjiro Saruno***

Institut fiir 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 a-)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* Glutaminsaure-Derivat bakterizide Aktivitat hatte, insbesondere dass bestimmte Lipophilizitat besitzende Glutaminsaureester stärkere Aktivitat zeigten (Saruno *et al.*, 1972). Hierauf stellten die Verfasser die verwandten Verbindungen her und priiften ihre bakterizide Wirkung.

Darunter wurde die Darstellung von y-Butylestern des L-Glutaminsäure-$\alpha$-Alkylamid folgendermassen durchgefiihrt. Nachdem man die Aminogruppe von Glutaminsäure-$\gamma$-Methylester (Boissonnas *et al.*, 1955) mit der Carbobenzoxy-Gruppe schiitzte, liess man es in Gegenwart von 1-Hydroxybenzotriazol und DCC mit Alkylamid reagieren, urn $\gamma$-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 als Alkylamin anwendete, erhielt man entsprechende Verbindungen mit guter Ausbeute.

Andererseits wurde die Synthese von $\gamma$-Laurylamid folgenderweise durchgeführt. Z-Glutaminsaureanhydrid, 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-Glutaminsaure-a-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 ;** l-BT : 1-Hydroxybenzotriazol, DCC : Dicyclohexylcarbodiimid, DCHA : Dicyclohexylamin, DCU : Dicyclohexylharnstoff, Z : Carbobenzoxy

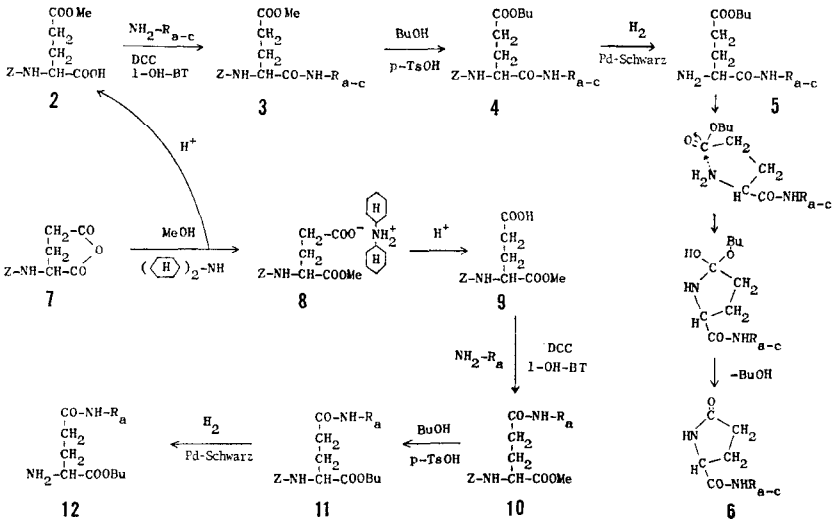


**Abb.** I. Darstellung von r-Butyl (bzw.$\alpha$-Butyl)ester von Glutaminsäure-$\alpha$-Alkyl (bzw. $\gamma$-Alkyl) amid. $R_a$ =-$CH_2$-$(CH_2)_{10}$-$CH_3$, $R_b$=-$CH_2$ (-$CH_2)_6$-$CH_3$, $R_c$=$CH_3$-CH -$(CH_2)_5$-$CH_3$.

Hinsichtlich der bakeriziden Wirkung war $\gamma$-Butylester von Glutaminsäure-$\alpha$-Laurylamid die wirkungsvollste. $\gamma$-Laurylamid von Glutaminsaure-a-Butylester war auch ziemlich wirksam. Das an der Stelle von a-n-Octylamid bzw. sek. Octylamid verknüpfte Glutaminsaure-y-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) |
|---|---|
| ***Aspergillus oryzae*** | 30 |
| ***Aspergillus niger*** | 45 |
| ***Staphylococcus aureus*** | 20 |
| ***Xanthomonas citri*** | 20 |
| ***Xanthomonas oryzae*** | 20 |
| ***Pseudomonas aeruginosa*** | 180 |
| ***Schizosaccharomyces octosporus*** | 15 |
| ***Saccharomyces cerevisiae*** | 40 |
| ***Saccharomyces ellipsoideus*** | 40 |
| ***Cladosporium jiilvum*** | 40 |
| ***Pichia membranaefaciens*** | 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 y-Butyl-Rest urn. Bei $\gamma$-Laurylester im Gegensatz zu $\gamma$-Butylester fand keine

derartige Umlagerung statt.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

### (I) Darstellung von γ-Butylester des L-Glutaminsäure-α-n-Laurylamid

1) ***Carbobenzoxylierung von Glutaminsäure-γ-Monoester (2)***

Ein Gemisch von 1.7 g γ-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 umgeriihrt. Nachdem iiberschiissiges MgO, dann atherisches Lösungsmittel nacheinander entfernt worden war, wurde die wasserige Lösung nach zweimali gem Waschen mit iither zur pH 3.5 mit konz. HCl angesauert, urn 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) ***γ-Methylester von N-Z-Glutaminsäure-α-Laurylamid (3)***

THF-Lösung von I.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.

$C_{26}H_{42}O_5N_2$ (462)

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

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

3) ***γ-Butylester von N-Z-Glutaminsiiure-a-n-Laurylamid (4)***

In 20 ml n-Butanol wurden 1.5 g (3) und 0.05 g *p*-Toluolsulfonsäure aufgelöst. Die butanolische Ldsung wurde in einem Wasserbad bei 80-90°C 5 Stunden lang erwarmt, danach wurde es beinahe 7 Stunden lang unter vermindertem Druck mittels Aspirators weiter erhitzt, unter gelegentlicher Prüfung von TLC, Nachdem das erhitzte Reaktionsgemisch mit Äthylacetat verdiinnt, dann mit konz. $NaHCO_3$ Lösung, schliesslich mit Wasser nacheinander gewaschen worden war, wurde es unter vermindertem Druck eingeengt. Der Rückstand wurde aus Hexan umkristallisiert. Schmelzpt. 77-78°C. Ausbeute 1.1 g.

$C_{29}H_{48}O_5N_2$ (504)

| | 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 stiindiger 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 Eisschranke langsam statt. Das Produkt war Kristalle von Schmelzpt. 97–98°C und zeigte keine Ninhydrin-Reaktion, aber Laktam-Bande bei 1700 $cm^{-1}$, 1660 cm-' (Abb. 3).

(II) **Darstellung von γ-Butylester des L-Glutaminsäure-α-n-Octylamid bzw. sek. Octylamid.**

(A) Glu (y-Butylester, α-n-Octylamid)

*1) Z-Glu (γ-Methylester, a-n-Octylamd) (3 ; R,)*

Die Reaktion wurde mit 5.7 g Z-Glutaminsäure-γ-Methylester, 3g l-BT, 4.2 g DCC und 2.7 g Octylamin auf die oben genannte Weise durchgefiihrt. Ausbeute, **4.5 g (58** %). Schmelzpt. 98–99°C (aus Isopropyläther).

$C_{22}H_{34}O_5N_2$ (406)

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

**2) Z-Glu** *(γ-Butylester, α-Octylamid) (4 ; R,)*

Z-Glu (y-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).

$C_{25}H_{40}O_5N_2$ (448)

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

3) *Glu (γ-Butylester, α-Octylamid) (5 ; R,)*

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

(B) Glu (γ-Butylester, α-sek. Octylamid)

*I) Z-Glu (γ-Methylester, α-sek. Octylamid) (3; R,)*

Die Verkntipfungsreaktion wurde aus 3 g Z-Glu (γ-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).

$C_{22}H_{34}O_5N_2$ (406)

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

***2) Z-Glu (γ-Butylester, a-sek. Octylamid) (4 ; R,)***

Z-Glu (γ-Methylester, α-sek. Octylamin) wurde in butanolischer Lösung in Gegenwart von Toluolsulfonsaure 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 %).

$C_{25}H_{40}O_5N_2$ ***(448)***

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

***3) Glu (γ-Butylester, a-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 γ-Laurylamid des Glutaminslure-a-Butylester.**

**I)** ***Z-Glu (a-Methylester, γ-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) aufgelbst. Hierzu wurde die 4 ml Cyclohexylamin enthaltende ätherlische Lösung (15 ml) zugesetzt. Nach Umrührung iiber 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 (α-Methylester)-DCHA-Salz (1.2g) wurde in einer 1 ml 6 N HCl enthaltenden Essigester Lösung **(20** ml) **2** Stunden lang beibehalten. Danach wurde das Reaktionsgemisch abtiltriert und das Filtrat wurdc mit Äthylacetat gewaschen. Nachdem die Xthylacetat-Schicht mit Wasser gewaschen, dann mittels $Na_2SO_4$ getrocknet worden war, wurde sie eingeengt. Das erhaltene rohe Z-Glu (γ-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 Riickstand wurde aus Äther umkristallisiert. Ausbeute 1 g (91%). Schmelzpt. 73-5°C.

$C_{26}H_{42}O_5N_2$ (462)

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

2) ***Z-Glu (a-Butylester, γ-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 vermindertem Druck erhitzt. Nachdem das erhitzte Reaktionsgemisch mit **30** ml Äthyl-

acetat verdünnt, dann mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung, schliesslich mit Wasser nacheinander gewaschen worden war, wurde es unter vermindertem Druck eingeengt. Der Riickstand wurde in wenig Benzol aufgelöst und mittels Säule-Chromatographie (27 x 120 mm) von Kieselgel gereinigt. Nachdem 50 ml Benzol durchgelaufen waren, wurde das bezweckte 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 %).

$C_{29}H_{48}O_5N_2$ (504)

| | 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 Zusammensetung, 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 a-Lauryl-Verbindungen besteht darin, dass diese bei 720 $cm^{-1}$~780$cm^{-1}$ starke Absorption zeigt. Falls das Laktam entstand, zeigte die IR Absorption bei 1720 cm-l-1655 $cm^{-1}$ (CO) verschiedene Gestalt an (Abb. 2 und 3).

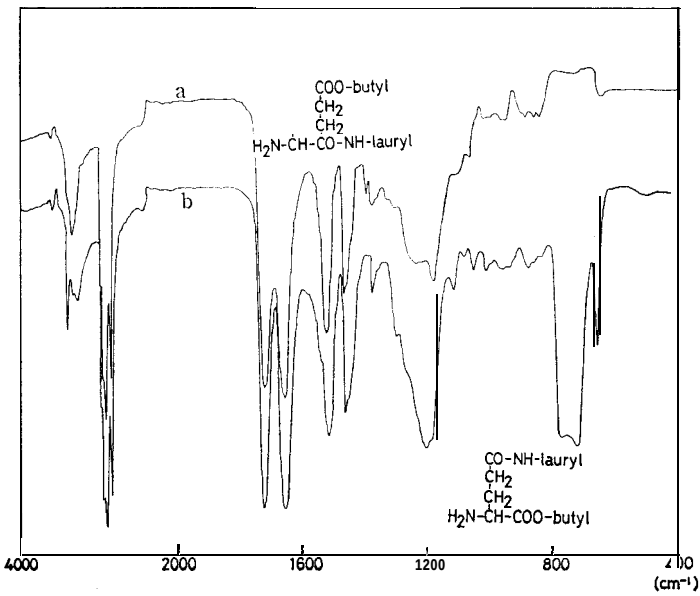


**Abb 2.** IR-Spektren des $\gamma$- bzw. $\alpha$-Butylester von Glutaminsäure $\alpha$- bzw. $\gamma$-Lauryl-amid.

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

| Nr | $H_2N-CH(CH_2-CH_2-C(=O)-R_1)-C(=O)-R_2$ | | Schmelzpt. (°C) | Analysenwert (Ber.) (Gef.) C | H | N | Formel | IR ($cm^{-1}$) | Bakterizide Aktivitat Minimale Inhibitions-Konzentration ($\mu$g/ml) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $R_1$ | $R_2$ | | | | | | | |
| 5a | BuO- | -NH-Lauryl | 28" | 68.06<br>67.11 | 11.42<br>11.21 | 7.56<br>7.68 | $C_{21}H_{42}O_3N_2$ | 1720, 1655, 1520, 1456<br>1375, 1235, 1175,<br>(Abb. 2-a) | *St. aureus* 20<br>*E. coli* 40<br>*Cladosporium fulvum* 40 |
| 5b | BuO- | -NH-n-Octyl | 38-40# | 64.93<br>64.98 | 10.90<br>10.96 | 8.91<br>8.65 | $C_{17}H_{34}O_3N_2$ | 1720, 1655, 1520, 1460<br>1365, 1220, 1165, | *St. aureus* 50<br>*E. coli* 50 |
| 5c | BuO- | NH-sek. Octyl | 41-43# | 64.93<br>63.84 | 10.90<br>10.87 | 8.91<br>8.92 | $C_{17}H_{34}O_3N_2$ | 1720, 1655, 1515, 1455<br>1365, 1225, 1165, 660 | *St. aureus* 50<br>*E. coli* 50 |
| 12 | Lauryl-NH- | -OBu | 37-8 | 68.06<br>67.77 | 11.42<br>11.47 | 7.56<br>7.36 | $C_{21}H_{42}O_3N_2$ | 1725, 1660, 1520, 1465<br>1380, 1210, 780, 725<br>665 (Abb. 2-b) | *St. aureus* 20<br>*E. croli* 50 |
| 6 | [Laktam]-NH-Lauryl | | 97-8 | 68.87<br>69.05 | 10.88<br>11.03 | 9.45<br>9.25 | $C_{17}H_{32}O_2N_2$ | 1700, 1663, 1525, 1460<br>1380, 1240, 1210<br>(Abb. 3) | |

# Siedept. bei 0.06 mmHg.

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

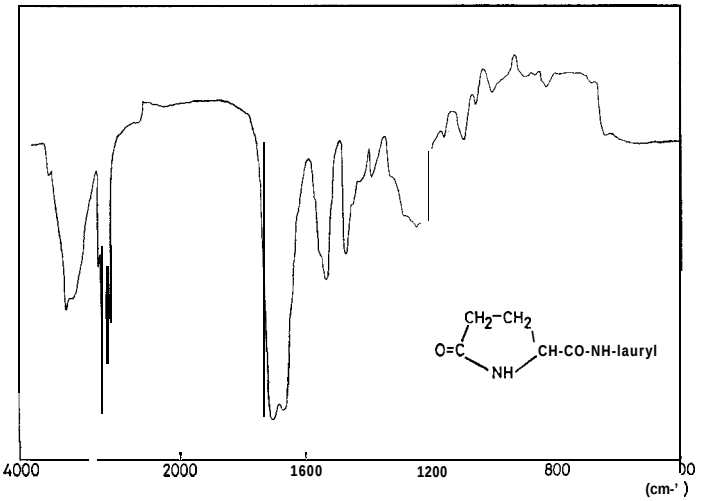


Abb 3. IR-Spektrum des von $\gamma$-Butylester abgeleiteten Laktams.

## 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-Pyroglutaminsäure. 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.