

SYNTHESE DES D,L-2-AMINO-6-TRIMETHYLAMMONIO- KAPRONSÄURE-BETAINS (» ϵ -N-TRIMETHYL-LYSIN«-S)

Von

J. PUSKÁS und E. TYIHÁK

Lehrstuhl für Organische Chemie, Technische Universität, Budapest, und
Institut für Heilpflanzenforschung, Budapest

(Eingegangen am 27. September 1968)

Vorgelegt von Prof. Dr. K. LEMPERT

In letzter Zeit berichteten mehrere Forscher über die biochemische Bedeutung der ϵ -N-methylierten Lysin-Derivate [1—4]. Der Nachweis dieser Aminosäurederivate gelang in erster Reihe in den basischen Proteinen des tierischen Organismus, vor allem aber in den argininreichen Histonen. Die synthetische Herstellung der mono- und dimethylierten Produkte und damit der Nachweis ihrer Struktur wurden schon früher gelöst, neuerdings wurden sogar die optisch aktiven L-Antipoden hergestellt [1, 5, 6].

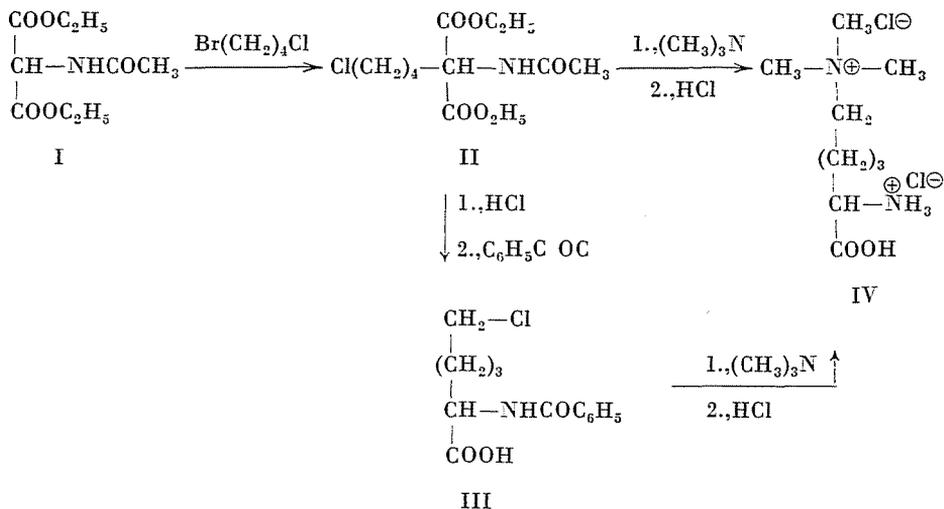
» ϵ -N-Trimethyl-Lysin« (im weiteren nur ϵ -TML) wurde zuerst durch KAPFHAMMER in Form von bis-Tetrachlor-aurat nach Fütterung mit dem Hydrolysat eines methylierten Caseins, in dem Urin von Hunden nachgewiesen [7]. Diese Verbindung erwies sich mit dem bis-Tetrachlor-aurat des durch Methylierung der 6-Amino-2-benzamido-kapronsäure gewonnenen Produktes identisch (ENGER u. HALLE). Enger und Halle führten die Methylierung in Anwesenheit von Bariumhydroxyd mit Dimethylsulphat durch.

Neuerdings erwähnen HEMPEL und Mitarbeiter [4, 9] die Verbindung ϵ -TML als eine neue Aminosäure, welche in den argininreichen Histonen vorhanden ist; sie behaupten gleichzeitig, auch deren Synthese gelöst zu haben, worüber in einer besonderen Mitteilung berichtet werden soll; diese ist aber bis jetzt noch nicht erschienen.

In der gegenwärtigen Mitteilung soll über die neue Totalsynthese des ϵ -TML berichtet werden.

Als Ausgangsverbindung diente der Azetamido-malonsäure-diäthylester (I). Mit 1-Brom-4-chlor-butan wurde in einer etwa 70%-igen Ausbeute Azetamido-(4-chlor-butyl)-malonsäure-diäthylester (II) erhalten. Nachdem letztere Verbindung mit alkoholischem Trimethylamin im Einschmelzrohr reagieren gelassen, dann die so erhaltene Verbindung mit Salzsäure hydrolysiert und dekarboxyliert wurde, ergab sich ϵ -TML-dihydrochlorid (IV).

Eine längere und gewissermaßen kompliziertere Ausführungsform des dargelegten Herstellungsverfahrens ist jene, wo — ähnlich der Lysin-Synthese von SZARVASI [10, 11] — aus Azetamido-(4-chlor-butyl)-malonsäure-diäthylester (II) durch Hydrolyse und Dekarboxylierung ein Produkt gewonnen



wird, um es durch Benzoylierung in D,L-2-Benzamido-6-chlor-kapronsäure (III) überzuführen. Hieraus wird durch die schon oben beschriebene Quaternierung und darauffolgende Hydrolyse ebenfalls ϵ -TML-dihydrochlorid erhalten.

Das Rohprodukt wurde in wäßr.-methanolischer Lösung (1 : 4) auf Kieselgel H (Merck) Säule chromatographisch gereinigt. Dieses Fließ- und Elutionsmittel wurde früher von TYIHÁK bei der dünn-schichtchromatographischen Trennung des Cholin und Betains verwendet [12]. Dasselbe System ist auch für die dünn-schichtchromatographische Trennung des ϵ -TML-dihydrochlorids geeignet.

Die Struktur des gewonnenen Produktes kann — außer dessen analytischen Daten — auf Grund folgender Beobachtungen als bestätigt betrachtet werden: 1. Das IR-Spektrum ist dem Spektrum des Lysin-dihydrochlorides sehr ähnlich; 2. es ergibt eine positive Ninhydrinreaktion (α -NH₂); 3. ähnlich anderen quaternären Ammoniumverbindungen ergibt es auch mit Dragendorff-Reagens* eine positive Farbreaktion (ϵ -N[⊕](CH₃)₃); 4. es verhielt sich auf dem Dünnschichtchromatogramm, auch in mehreren Systemen, auf die gleiche Weise und ergab die gleichen Farbreaktionen, wie das nach der Methode von KAPFFHAMMER [7] isolierte Produkt bzw. das nach der Methode von ENGER und HALLE hergestellte Produkt [13].

Der Vorteil der geschilderten Methode besteht gegenüber der von ENGER und HALLE [8] darin, daß sich dadurch die Herstellung der auf der α -Aminogruppe selektiv azylierten und ziemlich schwer zugänglichen Lysinderivate

* Nicht quaternäre Aminosäure-Derivate ergeben mit dem Dragendorff-Reagens keine Farbreaktion.

erübrigt. Unsere Methode kann gleichzeitig sowohl bei der Herstellung des ϵ -N-mono- und ϵ -N-Dimethyl-lysins, als auch bei der Herstellung der auf dem δ -N-Atom selektiv alkylierten Ornithinderivate als Modell dienen.

Versuche

*Azetamido-(4-chlor-butyl)-malonsäure-diäthylester (II)**

Zu einer aus 2,3 g (10 mMol) metallischem Natrium und 100 ml trockenem Äthanol hergestellten Natrium-äthylat-Lösung wurde bei Raumtemperatur unter Umrührung die Mischung von 1,7 g (10 mMol) 1-Brom-4-chlor-butan [14] und 2,1 g (10 mMol) Azetamido-malonsäure-diäthylester zugegeben und das Reaktionsgemisch 4 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Von den ausgeschiedenen Natriumchlorid-Kristallen wurde abfiltriert und etwa zwei Drittel des Lösungsmittels wurden i. Vak. abdestilliert. Der Rest wurde mit 100 ml Eiswasser verrührt. Die ausgeschiedene ölige Substanz wurde mit 30 ml Chloroform aufgenommen, die chloroformische Lösung auf Magnesiumsulphat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Die so zurückgebliebene ölige Substanz stockt schnell während der Umrührung und Kühlung zu einer kristallinen Masse. Die ausgeschiedenen Kristalle wurden abfiltriert und mit wenig Petroläther gewaschen.

Ausbeute: 2,0 g (69,2%), Schmp.: 52—53° C (aus Äther-Benzin), Lit. [10, 11]: 53 °C; C=O: 1740 und 1650 cm^{-1} (KBr-Preßling).

*D,L-2-Benzamido-6-chlor-kapronsäure (III)***

3,0 g (10 mMol) (II) und 500 ml 20%-ige Salzsäure wurden fünfzehn Stunden lang gekocht und die Lösung wurde i. Vak. trocken destilliert. Den gewonnenen Kristallen (D,L-2-Amino-6-chlor-kapronsäure-hydrochlorid) wurden 2 g Kaliumkarbonat in 50 ml Wasser gelöst zugegeben und unter Umrührung und Kühlung 1,1 ml (1,4 g; 10 mMol) Benzoylchlorid zugetropft. Das Gemisch wurde dann bis auf Kongorot sauer gemacht, die ausgeschiedene kristallinische Substanz abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und schließlich getrocknet.

Ausbeute: 2,0 g (78,6%), Schmp.: 143 °C (aus Chloroform-Petroläther), Lit. [10, 11]: 143—144 °C, C=O: 1735 und 1650 cm^{-1} (KBr-Preßling).

* Die angegebene Methode ist eine modifizierte Form der in der Literatur veröffentlichten [11].

** Die angegebene Methode ist eine modifizierte Form der in der Literatur veröffentlichten [11].

D,L-2-Amino-6-trimethylammonio-kapronsäure-betain
(ϵ -TML) Dihydrochlorid (IV)

a) Eine Mischung von 3,0 g (10 mMol) (II) und 30 ml etwa 15% Trimethylamin enthaltendem, trockenem Alkohol wurde 10 Stunden lang bei 70 °C im Einschmelzrohr reagieren gelassen. Zwecks Entfernung des Lösungsmittel- und Trimethylamin-Überschusses wurde das Gemisch i. Vak. trocken destilliert. Die zurückgebliebene (gegen Feuchtigkeit empfindliche) kristalline Substanz* wurde mit 40 ml 20%-iger Salzsäure 15 Stunden lang gekocht, dann i. Vak. trocken destilliert. Der weiße kristalline Rest wurde mit wenig kaltem, trockenem Alkohol zerrieben, abgezogen und über Phosphorpentoxyd im Vakuumexsikkator zwei Wochen lang getrocknet.

Ausbeute: 1,9 g (73,3%).

b) 2,6 g (10 mMol) (III) wurde mit Trimethylamin unter den unter a) angegebenen Verhältnissen reagieren gelassen. Nach der Hydrolyse mit Salzsäure und darauffolgender Trockendestillation wurde ein rohes kristallines Produkt erhalten, das mit 20 ml trockenem Äther zerrieben, abgedampft wurde; sodann wurden die Kristalle mit wenig kaltem, trockenem Alkohol gewaschen und zuletzt über Phosphorpentoxyd im Vakuumexsikkator zwei Wochen lang getrocknet. Ausbeute: 2,1 g (81,1%).

Säulenchromatographische Reinigung des ϵ -TML-dihydrochlorides

Es wurde 1 g rohes ϵ -TML-dihydrochlorid in einem Methanol-Wasser-Gemisch (1 : 4) gelöst. Die Substanz wurde auf eine Säule aufgetragen, die aus 200 g Kieselgel H (Merck) hergestellt und ebenfalls mit einer Methanol-Wasser-Mischung (1 : 4) befeuchtet war. Auch als Eluens wurde dasselbe Lösungsmittelgemisch verwendet. Die Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch untersucht, die ϵ -TML enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, 1 ml konz. Salzsäure beigemischt und i. Vak. trocken destilliert. Das Material wurde über Phosphorpentoxyd in der Vakuumpistole 20 Stunden lang bei 80 °C getrocknet. Ausbeute: 0,61 g; Schmp.: 246—248 °C, Lit. [16]: 240 °C (sintert von 225 °C an).

$C_9H_{22}Cl_2N_2O_2$ (261,1) Berechnet: C: 41,38; H: 8,49; N: 10,72%

Gefunden: C: 41,12; H: 8,35; N: 10,56%

C=O: 1735 cm^{-1} (KBr-Preßling).

Präparative, dünnschichtchromatographische Reinigung des ϵ -TML-dihydrochlorids

Aus Kieselgel H (Merck) wurde mit dem Desaga-Streichgerät auf eine Glaspalette von 20 × 20 cm eine 2 mm dicke Schicht gestrichen und eine Stunde

* Das Produkt wurde rein nicht hergestellt; das IR-Spektrum des Rohrproduktes stimmt mit seiner Struktur überein (C=O: 1740 und 1650 cm^{-1} , in KBr-Preßling).

lang bei 100 °C aktiviert. Auf diese Platte trugen wir 20 mg rohes ϵ -TML-dihydrochlorid auf, das in wäßrigem Alkohol gelöst wurde. Als Fließmittel wurde eine Methanol-Wasser-Mischung (1 : 4) verwendet. Am Rand des Chromatogrammes wurde die Stelle des ϵ -TML-dihydrochlorides mit Dragendorff-Reagens nachgewiesen. Das Produkt wurde vom entsprechenden Streifen des Sorptionsmittels durch wäßrige Exterktion erhalten. Weitere Arbeitsmethoden siehe bei der Beschreibung der säulenchromatographischen Reinigung. Ausbeute: 15 mg.

Dünnschichtchromatographische Untersuchung des ϵ -TML-dihydrochlorides

Aus MN-Zellulosepulver 300 wurde mit dem Desaga-Streichgerät eine 250 μ dicke Schicht gestrichen und nachtsüber trocknen gelassen. Es wurden 1—5 μ g ϵ -TML-dihydrochlorid aufgetropft. Als Fließmittel wurde die Mischung einer Lösung, die im Verhältnis von 4 : 4 : 1 Chloroform, Methanol und 25%-igen Salmiakgeist enthielt, verwendet. Als Sprühreagens wurden Ninhydrin-Reagens (0,5% Ninhydrin in Azeton + 0,05% CdCl₂) und Dragendorff-Reagens mit 1%-iger schwefelsäuren Sensibilisierung [12, 15] verwendet.

An dieser Stelle möchten wir Frau Z. Szirányi und Frau H. Karsai für die Aufnahme der IR-Spektren sowie Frau J. Viszt und Fräulein K. Ófalvi für die Durchführung der mikroanalytischen Untersuchungen danken.

Zusammenfassung

Von Verfassern wurde eine neue, auch zum Strukturnachweis geeignete Methode zur Herstellung des D,L-2-Amino-6-trimethylammonio-kapronsäure-betains (ϵ -N-Trimethyl-lysin(s)) ausgearbeitet. Ausgangsstoff der Synthese ist der Azetamid-malonsäure-diäthylester, von dem man nach zwei Verfahren bei guter Ausbeute zu dem ϵ -N-Trimethyl-lysin-dihydrochlorid gelangen kann.

Literatur

1. BENOITON, L.: *Ch. J. Chem.* **42**, 2043 (1964).
2. MURRAY, K.: *Biochemistry* **3**, 10 (1964).
3. PAIK, K. W.—KIM, S.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **27**, 479 (1967).
4. HEMPEL, K.—LANGE, H. W.: *Z. Physiol. Chem.* **349**, 603 (1968).
5. NEUBERGER, E.—SANGER, F.: *Biochem. J.* **38**, 125 (1944).
6. PODUSKA, K.: *Coll. Czech. Chem. Comm.* **24**, 1025 (1959).
7. KAPFFHAMMER, J.: *Z. Physiol. Chem.* **191**, 111 (1930).
8. ENGER, R.—HALLE, F.: *Z. Physiol. Chem.* **191**, 103 (1930).
9. HEMPEL, K.—LANGE, H. W.—BIRKOFER, L.: *Naturwiss.* **55**, 37 (1968).
10. SZARVASI, E.: *Compt. Rend.* **238**, 1595 (1954).
11. L'AIR liquide, *Engl. Pat.* 758 895 (vom 10.10.1956); *Chem. Abstr.* **51**, 9679 (1957).
12. TYIHÁK, E.: *Naturwiss.* **51**, 315 (1964).
13. TYIHÁK, E. u. Mitarbeiter: in Vorbereitung (1968).
14. STARR, D.—HIXON, R. M.: *J. Amer. Chem. Soc.* **56**, 1595 (1934).
15. VÁCUJFALVI, D.: *Planta Med.* **13**, 79 (1965).
16. UCLAF, *Franz. Pat.* 1,176, 117 (vom 7.4.1959); *Chem. Abstr.* **55**, 19 865 (1961).

Ernő TYIHÁK, Budapest XII., Dániel út 38—42, Ungarn.