

Kurze Mitteilungen

Maximalumfang: 6 Schreibmaschinenseiten (alles inbegriffen). Bis zum 5. des Monats bei der Redaktion eingehende Manuskripte können günstigenfalls am 15. des folgenden Monats veröffentlicht werden.

Structure of 2'-Deoxymugineic Acid, A Novel Amino Acid Possessing an Iron-Chelating Activity*

Kyosuke Nomoto^a, Himeko Yoshioka^a, Masazumi Arima^a, Shinji Fushiya^b, Sei'ichi Takagi^c, and Tsunematsu Takemoto^{a**}

^a *Suntory Institute for Bioorganic Research, Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618, Japan*

^b *Pharmaceutical Institute, Tohoku University, Aobayama, Sendai 980, Japan*

^c *Department of Agricultural Chemistry, Iwate University, Ueda, Morioka 020, Japan*

This paper is dedicated to Professor C.H. Eugster, Institute of Organic Chemistry, University of Zürich, on his 60th birthday.

Abstract

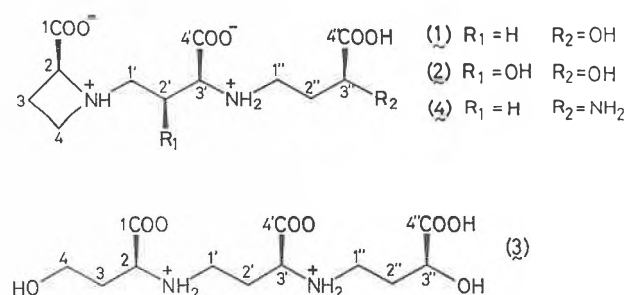
A novel amino acid possessing an iron-chelating activity, 2'-deoxymugineic acid, has been isolated from root washings of water-cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) under iron deficient media, and shown to have structure (1) by chemical and physico-chemical studies.

Iron is an essential element for the biosynthesis of chlorophyll and iron-deficiency results in iron-chlorosis [1]. It has been reported that some amphoteric iron-chelating agents have been detected in root washings of water-cultured oats and rice under iron deficient conditions [2]. In a previous paper, we reported isolation of mugineic acid (2), which plays a role in iron uptake and transport in higher plants, from barley (*Hordeum vulgare* L. var. Minorimugi) [3] and avenic acid A (3) from oats (*Avena sativa* L.) [4]. It has been shown that addition of either (2) or (3) to nutrient solution of water-cultured rice at pH 7 increases the chlorophyll content [5]. Further studies concerning the iron chelating substances in some species of Gramineous plants has resulted in the isolation of another novel amino acid, named 2'-deoxymugineic acid, from root washings of water-cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) under iron deficient conditions. In the present communication, we wish to provide evidence leading to the expression (1) for 2'-deoxymugineic acid.

After cultivation of wheat (ca 3600 plants) as previously described [3, 4], the pure crystals of (1) (800mg) were obtained by the same method used for the isolation of (2) [3].

Compound (1), m.p. 198.4–200.5°C, $[\alpha]_D^{23} - 70.5^\circ$ (c 1.08, H₂O), C₁₂H₂₀O₇N₂ [6], m/e 286 (M⁺ - 18),

Scheme 1:



shows positive ninhydrin reaction and behaves like an acidic amino acid on paper electrophoresis. The i. r. spectrum of (1) (KBr), exhibiting absorptions at 3450 (OH and NH), 1715 (COOH), 1610 and 1395 cm⁻¹ (COO⁻) is very similar to that of (2). The ¹H and ¹³C n.m.r. spectral data for (1) were displayed in Table 1 together with those of reference compounds (2) and (4). These indicated the presence of three CH₂-CH₂-CH₂-systems in the molecule. Thus, upon irradiation at a broad methylene signal (2.17), two methylene signals (3.27 and 3.45) appeared as a broad singlet, and two methine signals (3.84 and 4.36) changed to a singlet, respectively. Furthermore the irradiation at a methylene signal (2.62) made changes of a methine signal (4.75) to a singlet and simplified methylene signal (4.04).

A detailed comparison of the ¹H and ¹³C n.m.r. spectra of (1) with those of (2) afforded evidence for the presence of C₍₁₎, C₍₄₎ (azetidine-2-carboxylic group) and C_(1'')-C_(4'') (3-hydroxy-3-carboxypropylamino group) moieties of (2) in (1) (Table 1). In addition, comparison of the ¹H n.m.r. spectra of (1) with that of nicotian-

* Received April 28, 1981.

** Prof. T. Takemoto, author to whom correspondence may be addressed.

Table 1: ^1H and ^{13}C n.m.r. spectral data (in D_2O)

Compound No.	(1)	(2)	(4)	(1)	(2)	(4)
C-1				174.7 s	174.9 s	175.1 s
C-2	4.75 t,9.5	4.85 t,9.5	4.76 t,9.5	68.7 d	69.7 d	68.9 d
C-3	2.62 m	2.57 m	2.62 m	23.0 t	23.8 t	23.0 t
C-4	4.04 m	4.01 m	4.02 m	53.2 t	53.1 t	53.0 t
C-1'	3.45 m	3.45 m	3.41 m	52.6 t	58.0 t	52.5 t
C-2'	2.17 m	4.42 m	2.22 m	26.4 t	66.6 d	26.7 t
C-3'	3.84 dd,6,8	3.82 d,3.5	3.80 dd,6,8	61.3 d	66.6 d	61.4 d
C-4'				173.6 s	171.0 s	173.8 s
C-1''	3.27 t,7.5	3.22 m	3.27 t,7.5	45.8 t	46.9 t	46.0 t
C-2''	2.17 m	2.12 m	2.22 m	31.7 t	31.6 t	29.0 t
C-3''	4.36 dd,5,7.5	4.33 dd,5,7.5	3.89 dd,4,7.5	70.4 d	71.0 d	54.6 d
C-4''				178.9 s	179.5 s	175.0 s

Chemical shifts were expressed by ppm downfield from TSP used as an external standard and coupling constants by Hz. Abbreviations: s = singlet, d = doublet, dd = doublet of doublets, t = triplet, m = multiplet.

amine (4), a similar amino acid isolated from the leaves of *Nicotiana tabacum* L. [7] and from the seeds of *Fagus silvatica* L. [8, 9], revealed that the chemical shifts and splitting patterns were quite similar except for the signal due to $\text{C}_{(3'')}$ (Table 1). On the basis of the above spectral analysis, formula (1) is assumed to be the most probable structure for 2'-deoxymugineic acid. The structure (1) was also supported by chemical degradation. Oxidation of (1) with KMnO_4 afforded azetidine-2-carboxylic acid $[[\alpha]_D^{22} - 129.3^\circ (c\ 0.13, \text{H}_2\text{O})]$, a slight amount of aspartic acid $[\text{CD}(\text{H}_2\text{O})]$, a positive cotton effect at 205 nm [10], and N-[3-amino-3-carboxypropyl]azetidine-2-carboxylic acid $[[\alpha]_D^{22}$

$-72.5^\circ (c\ 0.60, \text{H}_2\text{O})]$. These amino acids obtained by KMnO_4 oxidation were identical in all respects (m.p., i.r., ^1H and ^{13}C n.m.r., paper chromatography) with those of authentic specimens including optical rotations, indicating that the absolute configurations at C-2 and C-3' in (1) are S, respectively.

Therefore, the structure including the stereochemistry of C-2 and C-3' of 2'-deoxymugineic acid is represented by formula (1). The configuration at C-3'' remains to be determined [11]. Addition of (1) to the medium of water-cultured rice plants at pH 7 showed also an increase of chlorophyll content [12]. (1) was also isolated from another Gramineous plants, *Avena sativa* L. and *Hordeum vulgare* L. var. *Rikuzenmugi*.

We thank Mr. J. Gohda, Faculty of Science, Osaka City University for microanalysis.

References

- 1 J.C. Brown: Annu. Rev. Plant Physiol. 7 (1956) 171.
- 2 S. Takagi: Soil Sci. Plant Nutr. 22 (1976) 423.
- 3 T. Takemoto, K. Nomoto, S. Fushiya, R. Ouchi, G. Kusano, H. Hikino, S. Takagi, Y. Matsuura and M. Kakudo: Pro. Japan Acad. 54 (1978) ser. B, 469.
- 4 S. Fushiya, Y. Sato, S. Nozoe, K. Nomoto, T. Takemoto and S. Takagi: Tetrahedron Letters (1980) 3071.
- 5 S. Takagi: to be published.
- 6 Satisfactory elemental analysis was obtained for (1), found: C, 46.30; H, 6.49; N, 9.16%; $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_7\text{N}_2 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$, requires: C, 46.00; H, 6.76; N, 8.9%.
- 7 M. Noma, M. Noguchi and E. Tamaki: Tetrahedron Letters (1971) 2017.
- 8 I. Kristensen, P.O. Larsen and H. Sørensen: Phytochem. 13 (1974) 2803.
- 9 I. Kristensen and P.O. Larsen: Phytochem. 13 (1974) 2791.
- 10 J.C. Craig and S.K. Roy: Tetrahedron 21 (1965) 1847; *Idem* *ibid.*, 21 (1965) 391.
- 11 Y. Ohfune, M. Tomita and K. Nomoto: Total synthesis of 2'-deoxymugineic acid, J. Am. Chem. Soc., in press. The total synthesis of (1) was achieved by combining the three optically active units, L- α -hydroxy- γ -butyrolactone (available from L-malic acid), L-homoserine, and L-azetidine-2-carboxylic acid. Thus it is concluded that 2'-deoxymugineic acid is 2(S), 3'(S), 3''(S)-N-[3-(3-hydroxy-3-carboxypropyl-amino)-3-carboxypropyl]azetidine-2-carboxylic acid.
- 12 The chlorophyll content was about 2.4 times higher than that of the control.

Synthese und NMR-spektroskopisches Verhalten von 4-Isopropenyl-1,3,3,5,5-pentamethyl-cyclohexen. Ein einfacher Zugang zu substituierten Terpenen*

André Escher**, Beat Übersax und Markus Neuenschwander***

Institut für organische Chemie, Universität Bern, Freiestrasse 3, CH-3012 Bern.

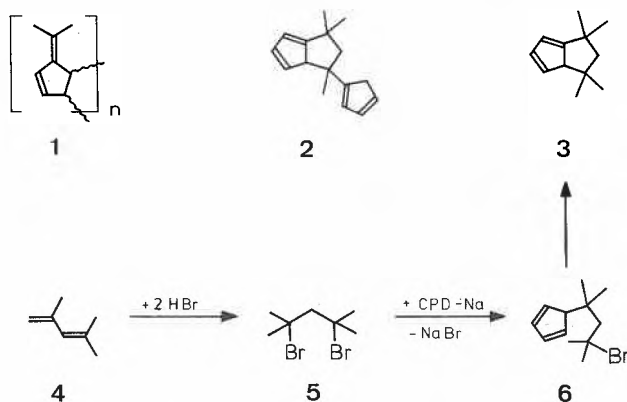
Abstract

The application of 2,4-dibromo-2,4-dimethyl-pentane **5** has been tested with respect to the attempted synthesis of 1,1,3,3-tetramethyl-tetrahydropentalene **3**. Addition of aqueous hydrobromic acid to a solution of 2,4-dimethyl-1,3-pentadiene **4** in ether gives 4-isopropenyl-1,3,3,5,5-pentamethyl-cyclohexene **10** in an excellent yield and in high GC-purity. The temperature-dependent ¹³C-NMR-spectra of compound **10** are discussed.

Einleitung

Bei der kationischen Polymerisation von 6,6-Dimethylfulven entstehen Hochpolymere **1** mit 1,2-Dihydrofulven-Strukturelementen [1]. Andererseits führt die anionische Polymerisation desselben Fulvens überraschenderweise zu einem Oligomerenmisch des Typs (Fulven)_n, aus welchem mit rund 67% Ausbeute das Dimere **2** abgetrennt werden kann [2]. Wegen der leicht eintretenden 1,5-H-Verschiebungen besteht 1-Cyclopentadienyl-1,3,3-trimethyl-tetrahydropentalen **2** aus einem komplexen Tautomerengemisch. Zur Vereinfachung der NMR-Spektren sowie zur Abschätzung der Lage des Tautomeren-Gleichgewichts war 1,1,3,3-Tetramethyl-tetrahydropentalen **3** von Interesse. Ein einfacher Synthesepan von **3** besteht in einer zweifachen HBr-Addition an 2,4-Dimethyl-1,3-pentadien **4** (das seinerseits aus Mesityloxid leicht zugänglich ist [3, 4]). Die nachfolgende Umsetzung des Dibromides **5**

Schema 1: Synthesepan von **3***



* **2** und **3** und **6** liegen bei Raumtemperatur als Tautomerengemisch vor.

* Eingegangen am 7. Mai 1981.

** Teil der Diplomarbeit, Bern (1980).

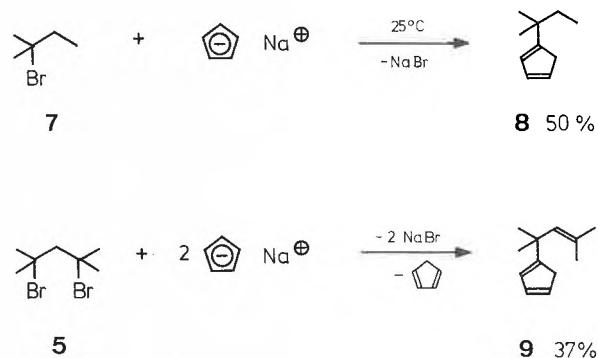
*** Korrespondenzadresse: Prof. Dr. M. Neuenschwander, Institut für organische Chemie, Freiestrasse 3, CH-3012 Bern.

mit Na-Cyclopentadienid sowie eine baseninduzierte Zyklisierung würde die Zielverbindung **3** ergeben.

Syntheseversuch von **3**

Beim Einleiten von gasförmigem HBr in reines 2,4-Dimethyl-1,3-pentadien **4** entsteht das gewünschte Dibromid **5** mit praktisch quantitativer Ausbeute. Die Verbindung ist jedoch thermisch sehr instabil und eliminiert leicht HBr. Obwohl die Bedingungen für die Substitution von tertiärem Brom durch Cyclopentadienid am Beispiel von 2-Brom-2-methylbutan **7** → **8** optimiert wurden, führte die Umsetzung des Dibromids **5** mit Natrium-cyclopentadienid trotz Variation der Reaktionsparameter stets zu 2-Cyclopentadienyl-2,4-dimethyl-3-penten **9** (Schema 2). Spekulativ kann vermutet werden, dass aus **5** in Gegenwart von Cyclopentadienid zunächst HBr eliminiert wird, wonach sich das gebildete 2-Brom-2,4-dimethyl-penten mit weiterem Cyclopentadienid im Sinne einer S_N'-Reaktion umsetzt.

Schema 2: Reaktion der tert. Bromide **7** und **5** mit Natrium-cyclopentadienid.



Umsetzung von **4** mit wässrigem HBr

Der Verlauf der Umsetzung von 2,4-Dimethyl-1,3-pentadien **4** mit HBr ist sehr stark von den Reaktionsbedingungen abhängig: Versetzt man **4** mit einem Überschuss an wässrigem HBr, so isoliert man mit über 95% Ausbeute in hoher Reinheit* ein Dimeres von **4**, welchem nach spektroskopischen Untersuchungen die Struktur **10** zukommt. Ein plausibler Reaktionsweg, welcher über stabilisierte Allyl-Kationen verläuft, ist in Schema 3 wiedergegeben.

* GC-Reinheit > 98%

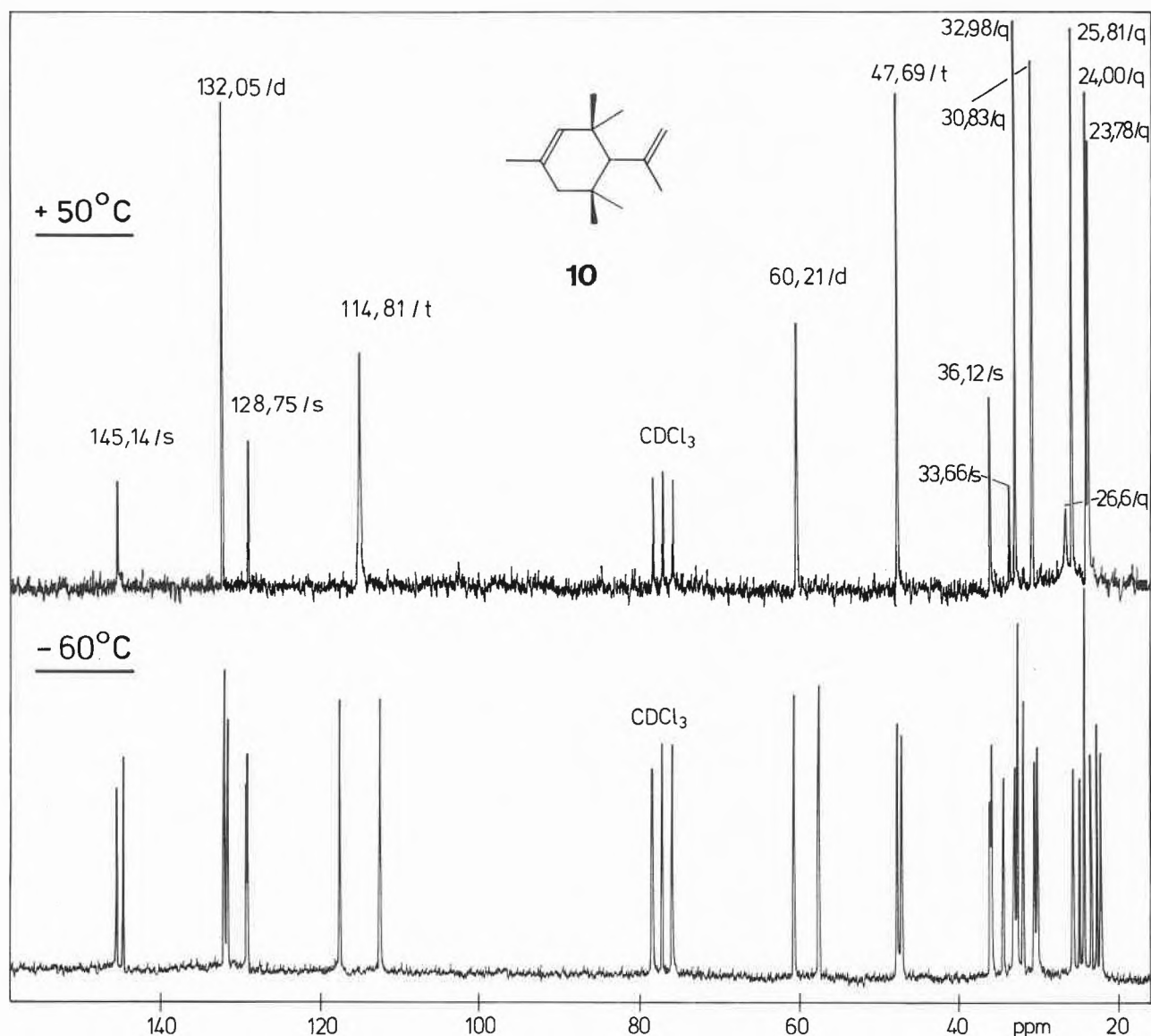
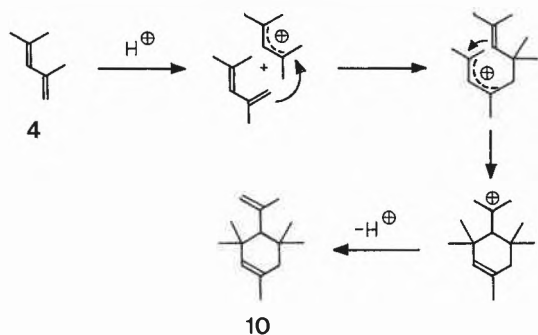


Abb. 1: ^{13}C -NMR-Spektrum (^1H -Bereich rauschentkoppelt) von 3,3,5,5-Tetramethyl-limonen **10** in CDCl_3 .
Oben: $+50^\circ\text{C}$; unten: -60°C .

Schema 3: Möglicher Bildungsmechanismus von **10**



Hinweise auf eine mögliche Dimerisierung des Typs $4 \rightarrow 10$ ergaben sich bereits bei Chlorierungsversuchen von Tetramethyl-allen, bei welchem **10** als Nebenprodukt beobachtet wurde [5]. Ferner berichteten Hoffmann et al. kürzlich [6], dass bei der Behandlung von 2,4-Dimethyl-3-penten-2-ol mit wässriger Sulfon-

säure/Pentan bei Raumtemperatur mit nahezu 80 % Ausbeute ein Gemisch von 3 Isomeren entsteht, das zu 92 % **10** als Hauptkomponente enthält.

Bei der Reaktion $4 \rightarrow 10$ wird womit in einer präparativ einfachen Eintopfreaktion 3,3,5,5-Tetramethyl-limonen zugänglich. Dasselbe Verfahren könnte zumindest für die einfache Synthese alkylierter Terpene von erheblichem Interesse sein. Versuche zur breiteren Anwendung dieser Methode sind zur Zeit im Gang.

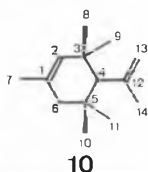
^{13}C -NMR-Spektren von **10**

Die Struktur der Verbindung **10** wird durch analytische und spektroskopische Daten bewiesen. Von besonderem Interesse ist das ^{13}C -NMR-Spektrum, in welchem bereits bei 20°C einzelne Linien verbreitert erscheinen. Bei $+50^\circ\text{C}$ sind im ^1H -rauschentkoppelten Spektrum alle 14 C-Resonanzen zu erkennen, wobei nur das

Signal einer Methylgruppe bei 26,6 ppm recht breit ist. Die Zuordnung der Signale (Tabelle 1) erfolgt nach den bekannten Inkrementenregeln [7, 8] sowie unter Berücksichtigung von Erfahrungswerten bei Cyclohexanen und durch off-Resonanz-Entkopplungen.

Bei -60°C dagegen sind im ^1H -rauschenkoppelten ^{13}C -NMR-Spektrum 27 Linien zu erkennen, wobei die relativen Intensitäten auf ein angenähertes 1:1-Verhältnis zweier Konformerer hinweisen (Abb. 1). Betrachtet man die Shift-Differenzen $\Delta\delta$ zwischen identischen C-Atomen der beiden Konformeren, so fällt auf, dass sich vor allem die Atome C_{14} (8,1 ppm), C_{13} (5,1 ppm) und C_4 (3,15 ppm) durch grosse $\Delta\delta$ -Werte auszeichnen. Mittlere Verschiebungen erfahren ferner die axialen Methylgruppen C_8 und C_{10} sowie C_5 (oder C_3), während die Atome C_1 , C_2 , C_6 und C_7 nur

Tabelle 1: ^{13}C -Absorptionslagen von 3,3,5,5-Tetramethyl-limonen **10** bei 50°C ; Aufspaltung $\Delta\delta$ (ppm) der C-Atome der beiden Konformeren bei -60°C .



C-Atom	δ (ppm); 50°C	$\Delta\delta$ (ppm); -60°C
C_1	128,75	0,12
C_2	132,05	0,40
C_3	36,12	0,15
C_5	33,66	1,75
C_4	60,21	3,15
C_6	47,69	0,52
C_7	24,00	0,00
C_8	23,78	1,28
C_{10}	25,81	0,74
C_9	30,83	0,36
C_{11}	32,98	0,35
C_{12}	145,14	0,83
C_{13}	114,81	5,06
C_{14}	26,6	8,14

sehr wenig beeinflusst werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Kauleszenzphänomene auf eine Rotationsbehinderung der Isopropenylgruppe zurückzuführen sind. In Übereinstimmung mit dieser Annahme erfährt C_{12} bei tiefer Temperatur nur eine kleine Aufspaltung von 0,8 ppm. – Mit weiteren NMR-spektroskopischen Untersuchungen von **10** sind wir zur Zeit beschäftigt.

Zusammenfassend stellen wir fest, dass die HBr-induzierte Zyklisierung von 2,4-Dimethyl-1,3-pentadien mit sehr hoher Ausbeute ($>95\%$) und hoher GC-Reinheit ($>98\%$) zu 3,3,5,5-Tetramethyl-limonen **10** führt. Die ^{13}C -NMR-Spektren dieser Verbindung weisen auf eine Rotationsbehinderung der Isopropenylgruppe hin.

Wir danken der Ciba-Geigy AG, Basel, für die grosszügige finanzielle Unterstützung.

Literatur

- 1 M. Neuenschwander, M. Slongo, C. Rentsch und S. Schönholzer: Makromol. Chem. 181 (1980) 19; 31; 37.
- 2 M. Slongo, P. Kronig und M. Neuenschwander: Makromol. Chem. 180 (1979) 259; P. Kronig, M. Slongo und M. Neuenschwander: ibidem 182 (1981), im Druck.
- 3 R. G. Kelso, K. W. Greenlee, J. M. Derfer und C. E. Boord: J. Amer. Chem. Soc. 77 (1955) 1751.
- 4 H. Waterman und W. J. C. de Kok: Recueil trav. chim. 52 (1933) 234.
- 5 M. L. Poutsma: J. Org. Chem. 33 (1968) 4080.
- 6 H. M. R. Hoffmann und H. Vathke-Ernst: Chem. Ber. 114 (1981) 1182.
- 7 D. K. Dalling und D. M. Grant: J. Amer. Chem. Soc. 94 (1972) 5318.
- 8 D. E. Dorman, M. Jautelat und J. D. Roberts: J. Org. Chem. 36 (1971) 2757.

Corrigendum

G. Calzaferri: Umwandlung von Lichtenergie in Chemische Energie. II. Experimente zu diesem Thema. CHIMIA 6 (1981) 209–220:

Zur Legende von Abb. 5 (S. 212) gehört die Graphik von Abb. 12 (S. 216) und zur Legende von Abb. 12 gehört die Graphik von Abb. 5.