

nach der Ausfällung des Melibiosazons sind in folgenden Versuchen angeführt:

6 g Nitril werden abgebaut, der Rückstand in Wasser gelöst und halbiert. Die eine Hälfte wurde ohne weiteres der Furfurol-Destillationsmethode unterworfen und lieferte 0.2320 g Furfurol-phloroglucid, entsprechend 0.520 g *d*-Arabinose, auf die Gesamtmenge von 6 g Nitril umgerechnet. Die zweite Hälfte der Lösung wurde nach Zusatz von 1 g salzsaurem Phenyl-hydrazin der Osazonprobe unterworfen, dann nach Abscheidung des Melibiosazons das Filtrat mit Benzaldehyd behandelt, mit Tierkohle geklärt und in der Hälfte der Lösung, also  $\frac{1}{4}$  der ursprünglichen Lösung, das Furfurol als Phloroglucid bestimmt. Erhalten 0.0750 g Phloroglucid, entsprechend 0.3544 g *d*-Arabinose, berechnet für die 6 g Nitril, das sind 68.2 % der vor der Abscheidung des Osazons vorhandenen Arabinose-Menge. Zieht man aber in Betracht, daß nach der Osazonprobe, wie dies viele Versuche bestätigt haben, nur 0.42—0.44 g Zucker, als Glykose berechnet, anwesend sind, so bedeutet obige Zahl, daß trotz der Verluste noch rund 85 % der ursprünglichen Arabinose-Menge vorhanden sind.

6 g Nitril werden abgebaut, der Rückstand in 50 ccm Wasser gelöst, 1.5 g salzsaures Phenyl-hydrazin zugesetzt und der Osazonprobe unterworfen. Erhalten 0.7 g Melibiosazon. Nach der Behandlung des Filtrats mit Benzaldehyd und Ausäthern wurde die Lösung auf 80 ccm eingengt und die Hälfte einer erneuten Osazonprobe mit 0.5 g salzsaurem Phenyl-hydrazin und 1 g Natriumacetat unterworfen; hierbei wurden durch weitere Umwandlung des Oxims nochmals 0.14 g Melibiosazon erhalten. Die andere Hälfte der ersten Osazon-Mutterlauge diente zur Ermittlung der vorhandenen *d*-Arabinose als Furfurol-phloroglucid. Berechnet 0.3460 g *d*-Arabinose, also eine Menge, die mit dem im vorigen Versuch ermittelten Wert von 0.3544 g sehr gut übereinstimmt.

Läßt man das Reaktionsgemisch nach der Osazonprobe eine Nacht im geschlossenen Gefäß stehen, so ergibt eine zweite Osazonprobe im Filtrat nur unwägbare Ausscheidungen.

Bei der Ausführung der obigen Versuche erfreute ich mich der geschickten Hilfe des Hrn. Ing.-Chem. Dionys Kiss, für welche ich ihm meinen besten Dank aussage.

Die Untersuchungen wurden mit materieller Unterstützung der Ungarischen Naturwissenschaftlichen Stiftung ausgeführt<sup>13)</sup>.

### 161. Wolfgang Langenbeck:

#### Über organische Katalysatoren, I.: Isatin und seine Derivate als Katalysatoren der Dehydrierung von Amino-säuren.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Münster i. W.]

(Eingegangen am 28. Februar 1927.)

Die Untersuchungen von R. Willstätter und seinen Schülern haben zu einer weitgehenden Reinigung und Trennung der Enzyme geführt. Auch die Kinetik der enzymatischen Reaktionen ist von verschiedenen Seiten eingehend studiert worden. Dagegen wissen wir über den feineren chemischen Mechanismus der Enzym-Reaktionen nichts, schon deshalb nicht, weil wir von dem chemischen Bau der Enzyme keine Kenntnis haben.

Nun haben in der letzten Zeit Versuche mit einfachen chemischen Modellen — besonders in der Hand von M. Bergmann — zu interessanten Ergebnissen in der Chemie der Proteine und Kohlenhydrate geführt. Es

<sup>13)</sup> Nachschrift: In der I. Abhandlung ist B. 59, 1265 [1926] ein Druckfehler stehen geblieben, der zu Mißverständnissen Anlaß geben könnte: Zeile 21 von oben lies 66.8 % statt 16.8 %.

wäre denkbar, daß auch in der Enzym-Chemie derartige Modellversuche neue Aufschlüsse bringen könnten. Die Aufgabe besteht, ganz allgemein gefaßt, darin, nach synthetischen organischen Stoffen zu suchen, die möglichst starke katalytische Wirkungen ausüben.

Anfänge in dieser Arbeitsrichtung liegen schon vor. Der erste, der mit Erfolg organische Verbindungen bekannter Konstitution zum Studium von enzymatischen Reaktionen heranzog, war wohl G. Bredig<sup>1)</sup>. Er konnte die stereochemische Spezifität der Enzyme mit optisch-aktiven organischen Basen nachahmen. In den letzten Jahren haben W. Biedermann<sup>2)</sup>, ferner H. Haehn und H. Berentzen<sup>3)</sup> Amylase-Modelle aus Neutralsalzen, Amino-säuren und Peptonen hergestellt. Nach H. Haehn und A. Pülz<sup>4)</sup> gibt eine Kombination von Amino-säuren und Phosphaten eine ähnliche Reaktion, wie das Schardingersche Milch-Enzym. R. Kuhn und L. Brann<sup>5)</sup> untersuchten die katalytische Wirkung des Eisens in organischer Bindung, K. Kunz und A. J. Kress<sup>6)</sup> stellten in einer Eisen-Indigo-Verbindung ein Atmungsmodell her.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der katalytischen Dehydrierung von Amino-säuren. Als organische Katalysatoren dienten Isatin, *N*-Methyl-isatin und Isatin-5-sulfonsäure, als Wasserstoff-Acceptoren Sauerstoff und Methylenblau.

Ein Teil dieser Reaktion war schon bekannt. W. Traube<sup>7)</sup> hatte gefunden, daß Amino-säuren in Analogie zu der Streckerschen Reaktion<sup>8)</sup> auch von Isatin zu dem nächst niedrigeren Aldehyd, Ammoniak und Kohlendioxyd abgebaut werden. Dieser Vorgang möge hier die Strecker-Traube-sche Reaktion genannt werden. Nach H. Wieland und F. Bergel<sup>9)</sup> hat man sich den Reaktionsmechanismus wohl so vorzustellen, daß von der Amino-säure zwei Wasserstoffatome abgespalten werden, die das Dehydrierungsmittel, in diesem Falle das Isatin, aufnimmt. Dabei geht die Amino-säure in die entsprechende Imino-säure über, die sofort in Aldehyd, Ammoniak und Kohlendioxyd zerfällt (vergl. das Schema auf S. 932). Welches Reduktionsprodukt des Isatins dabei entsteht, war bisher nicht aufgeklärt worden. Traube berichtet, daß im Reaktionsgefäß ein stark gefärbter Niederschlag entstand. Diese Angabe fand ich bestätigt. Arbeitet man aber, statt in wäßriger, in stark essigsaurer Lösung, so entsteht kein amorpher Niederschlag, und nach dem Erkalten krystallisiert allmählich Isatyd aus. Die Reduktion geht auch nicht weiter, da man selbst bei einem Überschuß von Amino-säure immer nur Isatyd erhält. Es gelang nie, etwa Dioxindol zu isolieren.

Nach dieser Feststellung war es eigentlich selbstverständlich, daß man mit einer kleinen Menge Isatin bei Gegenwart von Sauerstoff eine beliebige Menge von Amino-säure würde abbauen können. Es ist ja seit langem bekannt, daß Isatyd sich an der Luft leicht wieder zu Isatin oxydiert. Tatsächlich kann man bei Luft-Zutritt leicht mehrere Mol. Amino-säure mit 1 Mol. Isatin verbrennen, während bei Ausschluß von Luft 2 Mol. Isatin nur 1 Mol. Amino-säure abbauen. Die katalytische Wirksamkeit ist aller-

<sup>1)</sup> G. Bredig und K. Fajans, B. **41**, 752 [1908]; K. Fajans, Ztschr. physikal. Chem. **73**, 25 [1910]; G. Bredig und P. S. Fiske, Biochem. Ztschr. **46**, 7 [1912].

<sup>2)</sup> Ztschr. angew. Chem. **37**, 71 [1924].

<sup>3)</sup> Chemie d. Zelle u. Gewebe **12**, 286 [1925].

<sup>4)</sup> Chemie d. Zelle u. Gewebe **12**, 65 [1924].      <sup>5)</sup> B. **59**, 2370 [1926].

<sup>6)</sup> B. **60**, 367 [1927].      <sup>7)</sup> B. **44**, 3145 [1911].

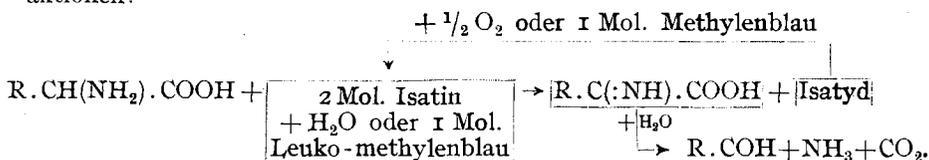
<sup>8)</sup> A. Strecker, A. **123**, 363 [1862].      <sup>9)</sup> A. **439**, 196 [1924].

dings verhältnismäßig schwach, sie wird erst bei 70–100° deutlich. Als Maß für die Reaktion diente die Bestimmung der entstandenen Ammoniak-Menge, in einem Falle auch die der Aldehyd-Menge. Jedem Mol. Ammoniak oder Aldehyd entspricht 1 Mol. zersetzter Amino-säure.

Von Derivaten des Isatins bot *N*-Methyl-isatin nichts Besonderes, nur verharzt es weniger leicht als Isatin. Dagegen hat isatin-5-sulfonsaures Kalium wegen seiner Löslichkeit den Vorzug, daß man eine wäßrige Lösung anwenden kann.

Besonders bemerkenswert war nun die Beobachtung, daß man die Reaktion auch bei Ausschluß von Sauerstoff mit Methylenblau als Wasserstoff-Acceptor ausführen kann. Das beruht auf der bisher unbekanntem Tatsache, daß Isatyd — ebenso Dioxindol — Methylenblau zur Leukoverbindung hydrieren kann. Dabei wird das Isatyd zum Isatin dehydriert.

Das folgende Schema gibt eine Übersicht über die ausgeführten Reaktionen:



An dem homogenen System: Glykokoll, isatin-sulfonsaures Kalium und Methylenblau wurden einige orientierende kinetische Messungen vorgenommen, die zeigten, daß die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Konzentration des Katalysators parallel geht.

Die Wielandsche Dehydrierungs-Theorie wird durch die mitgeteilten Versuche von einer neuen Seite beleuchtet. Es zeigt sich, daß der Wasserstoff organischer Verbindungen auch dadurch aktiviert werden kann, daß er in eine neue organische Bindung übergeht<sup>10)</sup>. In unserem Falle ist der Wasserstoff in der Amino-säure nicht aktiv genug, um Methylenblau zu hydrieren. Erst dadurch, daß er auf das Isatin übergeht und Isatyd bildet, wird er hierzu befähigt. Dieser experimentelle Befund dürfte für die Theorie der enzymatischen Dehydrierung wertvoll sein.

### Beschreibung der Versuche.

#### I. Die Strecker-Traubesche Reaktion.

Isolierung von Isatyd: 1 g Isatin, 0.4 g *d,l*-Alanin und 40 ccm 50-proz. Essigsäure wurden im Kolben am Rückflußkühler  $\frac{3}{4}$  Stdn. gekocht (2 Mol. Isatin auf 1.3 Mol. Alanin). Dabei wurde ein mäßiger Strom von Kohlendioxyd hindurchgeleitet. Zuerst war stets eine dunkle Rotfärbung zu beobachten, die sich gegen Ende der Reaktion aufhellte. Sie rührt wahrscheinlich von einer Zwischenverbindung des Isatins mit der Amino-säure her. Leider konnte diese noch nicht isoliert werden. Die Lösung wurde filtriert und verschlossen unter Kohlendioxyd eine Woche aufbewahrt.

<sup>10)</sup> Es ist noch nicht ausgeschlossen, daß Spuren anorganischer Verbindungen bei dieser Katalyse eine Rolle spielen. Sicher ist aber, daß das Isatin dabei unentbehrlich ist.

Nach dieser Zeit waren 0.6 g Isatyd auskrystallisiert. Die Krystalle wurden mit Alkohol gewaschen und getrocknet. Schmp. gegen 240°.

3.035 mg Sbst.: 0.250 ccm N (22°, 763 mm). —  $C_{16}H_{12}O_4N_2$ . Ber. N 9.46. Gef. N 9.57.

Auf dieselbe Weise wurden aus 0.5 g Isatin und 0.23 g *l*-Asparagin 0.20 g Isatyd erhalten.

2.650 mg Sbst.: 0.220 ccm N (23°, 763 mm). — Ber. N 9.46. Gef. N 9.61.

0.5 g Isatin und 0.25 g Glutaminsäure lieferten 0.1 g Isatyd.

3.300 mg Sbst.: 0.265 ccm N (23°, 763 mm). — Ber. N 9.46. Gef. N 9.30.

Versuche zur Isolierung von Dioxindol: 0.5 g Isatin wurden mit 0.5 g Alanin wie oben behandelt (auf 1 Mol. Isatin 1.6 Mol. Alanin). Nach einigen Tagen waren trotz des Überschusses der Amino-säure 0.3 g Isatyd auskrystallisiert.

Bei einem zweiten Versuch wurden 0.5 g Isatin, 1 g Alanin und 20 ccm 50-proz. Essigsäure im offenen Bombenrohr unter Kohlendioxyd im siedenden Wasserbade erhitzt, bis die Flüssigkeit hellbraun geworden war. Dann wurde das Rohr zur Capillare ausgezogen, erneut mit Kohlendioxyd gefüllt und zugeschmolzen. Darauf wurde es noch 10 Stdn. im Wasserbade erhitzt. Nach zwei Tagen war etwas Isatyd auskrystallisiert. Die ganze Lösung wurde im Vakuum im Kohlendioxyd-Strom eingedampft und der Rückstand mit Benzol ausgekocht. Die benzolische Lösung hinterließ beim Abdampfen nur eine geringe Menge Harz, aus dem auch beim Animpfen kein Dioxindol auskrystallisierte. Der Rückstand der Benzol-Extraktion setzte beim Schütteln mit Wasser ein braunes Harz ab, das wahrscheinlich aus verunreinigtem Isatyd bestand.

## II. Dehydrierung mit Sauerstoff.

Isatin als Katalysator: 0.1004 g Isatin und 1 g Alanin wurden mit 50 ccm 50-proz. Essigsäure 10 Stdn. am Rückflußkühler gekocht. Dabei wurde ein Luftstrom hindurchgesaugt. Dieser strich zur Reinigung zuerst durch eine Waschflasche mit verd. Schwefelsäure, dann durch die Reaktionslösung, den Rückflußkühler und endlich durch zwei weitere Waschflaschen mit verd. Schwefelsäure zur Absorption des Ammoniaks. Um für alle Versuche einen Luftstrom von gleicher Geschwindigkeit zu haben, wurde ein Druckregler vorgeschaltet, der auf einen Unterdruck von 10 cm Wassersäule eingestellt wurde.

Nach 10 Stdn. wurde der Inhalt der beiden Waschflaschen mit der Reaktionslösung vereinigt, mit Natronlauge stark alkalisch gemacht und das Ammoniak in  $n_{/10}$ -Schwefelsäure überdestilliert. Verbraucht wurden 52.1 ccm  $n_{/10}$ -Schwefelsäure. Daraus berechnet sich, daß 1 Mol. Isatin 7.7 Mol. Alanin abgebaut hatte.

Bei einem zweiten Versuch wurden 0.1344 g Isatin und 2 g Alanin 22 Stdn. im Luftstrom gekocht. Verbraucht: 104.5 ccm Säure. 1 Mol. Isatin hatte danach 11.5 Mol. Alanin dehydriert.

In einem Blindversuch kochte eine Lösung von 1 g Alanin in 50 ccm 50-proz. Essigsäure 10 Stdn. im Luftstrom. Das Ammoniak wurde in der gleichen Weise bestimmt. Es wurden nur 0.8 ccm Säure verbraucht. Ohne Isatin ist die Oxydation der Aminosäure also nur geringfügig.

Bei dem folgenden Versuch wurde der Acetaldehyd quantitativ bestimmt. Dazu wurden die beiden Waschflaschen, statt mit Schwefelsäure, mit einer Lösung von 1 g *p*-Nitrophenylhydrazin in 40 ccm 50-proz. Essigsäure beschickt. Die Waschflaschen standen in Eis. 0.0810 g Isatin und 1 g Alanin gaben dabei im Laufe von 10 Stdn. 0.32 g Acetaldehyd-*p*-nitrophenylhydrazon vom Schmp. 128°. Danach bildete 1 Mol. Isatin aus dem Alanin 3.2 Mol. Acetaldehyd. Die Ausbeute an Aldehyd ist natürlich ge-

ringer, als die Ammoniak-Bestimmung erwarten läßt, da ein Teil des Aldehyds sich im Luftstrom autoxydiert.

#### N-Methyl-isatin als Katalysator.

0.0960 g N-Methyl-isatin, dargestellt nach P. Friedländer<sup>11)</sup>, und 1 g Alanin 10 Stdn. wie oben behandelt. Verbraucht: 41.9 ccm Säure. 1 Mol. Methyl-isatin hatte 7 Mol. Alanin dehydriert. — 0.1015 g Methyl-isatin und 2 g Alanin, 23 Stdn. Verbraucht: 81.5 ccm Säure. 13 Mol. Aminosäure von 1 Mol. Methyl-isatin dehydriert.

#### Isatin-5-sulfonsaures Kalium als Katalysator.

Das isatin-5-sulfonsaure Kalium wurde im wesentlichen nach der Vorschrift von I. Martinet und O. Dornier<sup>12)</sup> dargestellt. 0.05 g davon, 0.6 g Alanin und 50 ccm Wasser wurden 3 Stdn. im Luftstrom gekocht. Verbraucht: 18.4 ccm Säure. 1 Mol. isatin-sulfonsaures Kalium hatte fast 10 Mol. Alanin dehydriert.

### III. Dehydrierung mit Methylenblau.

Die folgenden Versuche wurden mit isatin-5-sulfonsaurem Kalium und Glykokoll in wäßriger Lösung ausgeführt. Im Reagensglas-Versuch wurde aber festgestellt, daß auch Isatin selbst mit der Aminosäure in essigsaurer Lösung Methylenblau entfärbt, ferner, daß Methylenblau beim Kochen mit Isatyd in Essigsäure entfärbt wird.

0.5 g Glykokoll, 0.1 g Methylenblau und 50 ccm Wasser wurden in einem Kolben im Thermostaten auf 95° erhitzt, während ein langsamer Kohlendioxyd-Strom hindurchstrich. Dann wurden 5 ccm einer  $n/_{100}$ -Lösung von isatin-sulfonsaurem Kalium hinzugegeben. Nach 5 Stdn. war die Lösung entfärbt. 1 Mol. Isatin hatte 5.4 Mol. Methylenblau entfärbt. Es hatte sich Leuko-methylenblau in feinen, gelblichen Nadeln ausgeschieden<sup>13)</sup>. Schmp. 182°. Die freie Base war durch das entstandene Ammoniak gebildet worden. Während der Reaktion wurde Gasentwicklung (Kohlendioxyd) aus der Lösung beobachtet, die von dem Abbau der Aminosäure herstammte.

Die beiden letzten Versuche wurden unternommen, um die Abhängigkeit der Entfärbungs-Geschwindigkeit von der Konzentration des Katalysators festzustellen:

1. In zwei große Reagensgläser, I und II, wurden folgende Lösungen gegeben: I. 5 ccm  $n/_{100}$ -Methylenblau-Lösung, 5 ccm  $n/_{100}$ -Lösung von isatin-sulfonsaurem Kalium, 5 ccm Wasser, 5 ccm 2-proz. Glykokoll-Lösung. — II. 5 ccm  $n/_{100}$ -Methylenblau-Lösung, 10 ccm  $n/_{100}$ -Lösung von isatin-sulfonsaurem Kalium, 5 ccm 2-proz. Glykokoll-Lösung.

I und II wurden in dasselbe siedende Wasserbad gehängt und ein Kohlendioxyd-Strom hindurchgeleitet. II war nach 10 Min., I nach 18 Min. entfärbt.

2. I. 5 ccm  $n/_{100}$ -Methylenblau, 5 ccm  $n/_{100}$ -isatin-sulfonsaures Kalium, 5 ccm 2-proz. Glykokoll. — II. 5 ccm  $n/_{100}$ -Methylenblau, 5 ccm  $n/_{800}$ -isatin-sulfonsaures Kalium, 5 ccm 2-proz. Glykokoll.

I war nach 15 Min. entfärbt, II nach 58 Min.

<sup>11)</sup> B. **44**, 3101 [1911].      <sup>12)</sup> Compt. rend. Acad. Sciences **172**, 330 [1921].

<sup>13)</sup> A. Bernthsen, A. **230**, 146 [1885].