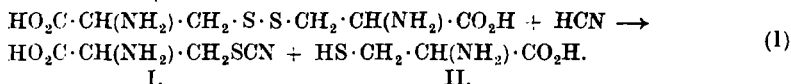


32. Alfons Schöberl und Reiner Hamm: Über die α -Amino- β -rhodan-propionsäure und über die Umsetzung zwischen Cystin und Kaliumcyanid*).

(Eingegangen aus Würzburg am 25. November 1947.)

Es werden die Bedingungen der Umsetzung zwischen Cystin und Kaliumcyanid, die zu Cystein und α -Amino- β -rhodan-propionsäure führt, näher untersucht. Auch das Cystein läßt sich dabei präparativ abtrennen. Mit Wasserstoffperoxyd als Oxydationsmittel, das das primär entstandene Cystein oxydiert, gelingt es bei dieser Umsetzung das Cystin quantitativ in die α -Amino- β -rhodan-propionsäure umzuwandeln. Die Rhodangruppe läßt sich in der α -Amino- β -rhodan-propionsäure durch Behandlung mit Säuren oder naszierendem Wasserstoff nicht durch die SH-Gruppe ersetzen. Mit Alkalien gelingt die Hydrolyse zum Thiol, jedoch reagiert das Cystein dabei sofort weiter mit der gleichzeitig entstehenden Cyansäure unter Bildung einer Ureidosäure, die als Cystein- bzw. Cystinhydantoin festgelegt wird.

Die α -Amino- β -rhodan-propionsäure (I) läßt sich nach J. Mauthner¹⁾ durch Sprengung der S-S-Gruppe im Cystin mittels Kaliumcyanids darstellen. Die Umsetzung, die Cystin in einer Ausbeute von 50% in die Rhodanverbindung überführt, vollzieht sich nach Mauthner im Sinne folgender Gleichung:



Die Untersuchung von Mauthner ließ noch ein paar Fragen offen. Mit der Beantwortung dieser Unklarheiten wurde zugleich auch der endgültige Beweis für die angegebene Reaktionsgleichung angestrebt. Dem Reaktionstyp kommt in der Eiweiß- und Fermentchemie Bedeutung zu.

Zunächst war auffallend, daß nach Mauthner die maximale Ausbeute an α -Amino- β -rhodan-propionsäure erst nach einer Reaktionszeit von mindestens 8 Wochen zu erhalten sein soll. Diese Angabe widerspricht Erfahrungen, die man bei den bekannten Cystinbestimmungen mit Nitroprussidnatrium²⁾ und nach dem Verfahren von M. X. Sullivan³⁾ machte, bei denen die Umsetzung von Cyanid und Cystin schon nach 10 bis 30 Minuten beendet sein soll. Die Arbeit von Mauthner enthält ferner keinen Beweis für die Entstehung des angenommenen zweiten Reaktionsprodukts, des Cysteins (II).

In Versuchsansätzen aus Cystin und Kaliumcyanid konnten merkwürdigerweise nach zwei Monaten nur mehr wenig SH-Gruppen nachgewiesen werden. Daraus und aus der Bildung von Polysulfid und Ammoniak geht hervor, daß bei längerem Stehenlassen die von Mauthner angenommene Reaktion noch von anderen Umsetzungen überlagert wird, die das entstandene Cystein weiter verändern. Bricht man jedoch die Umsetzung schon nach 60 Minuten ab, so kann man durch präparative Aufarbeitung die Richtigkeit der Mauthnerschen Gleichung beweisen. Denn es läßt sich in diesem Falle Cystein als schwerlösliches Bleimercaptid in der theoretischen Menge abtrennen und auch die Ausbeute an α -Amino- β -rhodan-propionsäure, die als Kupfersalz quantitativ bestimmt werden kann, entspricht den Erwartungen. Die langen Versuchszeiten von Mauthner sind also unnötig und unzweckmäßig. Will man die Rhodanverbindung allein gewinnen, so ist die vorherige Abtrennung des Cysteins nicht unbedingt notwendig.

*) Auszug aus der Dissertat. von R. Hamm, Marburg, 1946.

1) Ztschr. physiol. Chem. 78, 28 [1912].

2) Vergl. A. Schöberl u. E. Ludwig, B. 70, 2431 [1937].

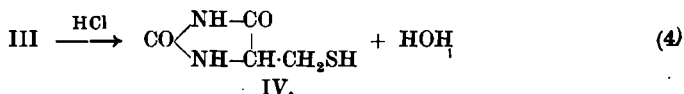
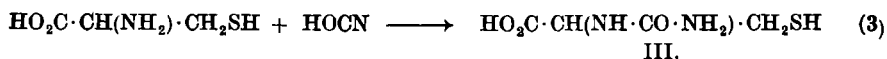
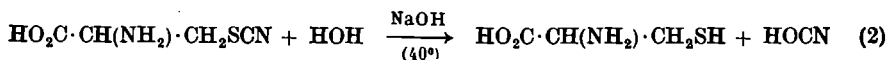
3) Vergl. R. Hamm, Diplomarbeit Würzburg, 1944.

Eine wesentliche Verbesserung für die Darstellung von α -Amino- β -rhodan-propionsäure fanden wir dadurch, daß wir das Kaliumcyanid auf Cystin in Gegenwart eines Oxydationsmittels einwirken ließen. Die Überlegung dabei war die, das primär entstandene Cystein immer wieder zu Cystin zu oxydieren und damit erneut der Cyanidspaltung zugänglich zu machen. Diesen Zweck erfüllte Wasserstoffperoxyd⁴⁾. Die Ausbeute an Rhodanverbindung ließ sich damit ohne weiteres auf 90% steigern. Sauerstoff war auch in Gegenwart von Metallkatalysatoren als Oxydationsmittel ungeeignet⁵⁾.

Die Reaktion zwischen Cystin und Kaliumcyanid ist eine Zeitreaktion. Daraus folgt, daß das Wasserstoffperoxyd den Reaktionsansätzen zur Oxydation der SH-Gruppen langsam zugesetzt werden muß. Bei schneller Zugabe von überschüssigem Hydroperoxyd wird das Cyanid unter starker Wärmetönung zu Cyanat oxydiert.

Durch Verwendung von Wasserstoffperoxyd war es auch ohne weiteres möglich, Cystein (II) bei Gegenwart von Kaliumcyanid quantitativ in die α -Amino- β -rhodan-propionsäure überzuführen. Es ist somit gleichgültig, ob man von Thiol oder Disulfid ausgeht.

Während beispielsweise Rhodanessigsäure und Rhodanpropionsäure schon in der Kälte sofort von Alkali angegriffen und zu Thiolen umgesetzt werden, reagierte die α -Amino- β -rhodan-propionsäure mit 30-proz. Natronlauge in der Kälte auch nach Tagen nicht. Erst bei 40° erfolgte in ein paar Stunden Umsetzung und Thiolbildung. Wir mußten hier die Entstehung von Cystein erwarten. Die Aufarbeitung solcher Reaktionsansätze zeigte aber eine interessante Reaktionsfolge. Nach der Durchhydrolyse der alkalischen Lösungen mit Salzsäure und Oxydation der vorhandenen Thiolverbindung mit Jodlösung ließ sich nämlich Cystinhydantoin isolieren. Die sich dabei abspielenden Reaktionen können durch die Gleichungen 2 — 4 wiedergegeben werden:



Das primär gebildete Cystein setzt sich mit der gleichzeitig entstandenen Cyansäure zu einer Ureidosäure (III) um, die in salzsaurer Lösung Ringschluß zum Cysteinhydantoin (IV) erleidet. Die Ureidosäure kann als Bleimercaptid abgetrennt werden. Präparativ erwies sich die Oxydation des Cysteinhydantoin mit Jodlösung zu dem schwerlöslichen Cystinhydantoin als zweckmäßig. Die Behandlung von I mit alkoholischer Kalilauge in der Siedehitze lieferte das gleiche Bild.

Der Beweis für die geschilderte Reaktionsfolge wurde dadurch geführt, daß diese mit der Additionsreaktion 3 begonnen wurde. In der gleichen Weise

⁴⁾ Vergl. A. Schöberl, B. **65**, 1224 [1932]; Ztschr. physiol. Chem. **209**, 231 [1932].

⁵⁾ Das Cyanid wirkt als Katalysatorgift.

wie im Spaltungsversuch kann man auch aus Cystein mit Kaliumcyanat zum Cysteinhydantoin (IV) gelangen.

Die Rhodangruppe in der α -Amino- β -rhodan-propionsäure ist auch gegen Säuren überraschend beständig. Sie wird durch mehrstündiges Kochen mit Salzsäure beispielsweise nicht angegriffen⁶⁾. Alkyrhodanide und Rhodancarbonsäuren dagegen sind gegen Säuren sehr unbeständig und zerfallen damit in Cyansäure und Thiole. Man kann die α -Amino- β -rhodan-propionsäure mit naszierendem Wasserstoff auch nicht zu Cystein (und Methylamin) reduzieren, während dies bekanntlich mit Alkyrhodaniden und Rhodancarbonsäuren ohne weiteres gelingt⁷⁾.

Beschreibung der Versuche.

1.) Gewinnung von α -Amino- β -rhodan-propionsäure nach 1-stdg. Einwirkung von Kaliumcyanid auf Cystin: 16.2 g Kaliumcyanid und 10.0 g Cystin wurden in 4.00 ccm Wasser gelöst und 1 Stde. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann säuerte man mit Essigsäure an (pH 5–6) und engte i. Vak. bis auf etwa 50 ccm ein. Die Lösung wurde mit verd. Natronlauge neutralisiert und mit Bleiacetatlösung versetzt, wobei ein voluminöser, blaßgelblicher Niederschlag ausfiel. Er wurde abfiltriert und das Filtrat, das mit Nitroprussidnatrium keine SH-Reaktion mehr gab, mit Kupferacetatlösung⁸⁾ versetzt. Die leuchtend blaugrüne Fällung saugte man ab, löste sie in warmer verd. Salzsäure und fällte durch Abstumpfen mit Natriumacetat nochmals das Kupfersalz aus. Das gründlich mit heißem Wasser gewaschene Kupfersalz wurde dann in Wasser verteilt, mit Schwefelwasserstoff in üblicher Weise zersetzt und das kupferfreie Filtrat der Kupfersulfid-Fällung auf dem Wasserbad eingeengt, bis die α -Amino- β -rhodan-propionsäure auszukristallisieren begann. Die Reinigung erfolgte durch mehrfaches Umkristallisieren aus Wasser. Ausb. 4.9 g = 35.8% d.Th.; kurze Prismen neben sechseckigen Plättchen.

$C_4H_6O_2N_2S + H_2O$ (164.1) Ber. S 19.53 H_2O 10.37 Gef. S 19.37 H_2O 10.95.

$(C_4H_5O_2N_2S)_2Cu + H_2O$ (371.8) Ber. Cu 17.09 Gef. Cu 17.05, 17.07⁹⁾.

2.) Nachweis und Abtrennung des Cysteins: Genau 1 g Cystin wurde mit Kalilauge neutralisiert, mit 1.62 g Kaliumcyanid versetzt und alles in etwa 40 ccm Wasser gelöst. Nach einer Reaktionsdauer von 45 Min. wurde mit Essigsäure auf etwa pH 5 angesäuert, i. Vak. auf etwa 10 ccm eingeengt und nach dem Neutralisieren mit Natronlauge durch Bleiacetatlösung gefällt. Den Niederschlag filtrierte man ab und bewahrte ihn für die Aufarbeitung auf Cystein auf. Aus dem Filtrat wurde das Kupfersalz der α -Amino- β -rhodan-propionsäure wie oben abgeschieden und aus Salzsäure umgefällt; Ausb. an bei 110° getr. Kupfersalz 0.5719 g = 39% d.Theorie.

Die Bleiacetatfällung wurde in etwa 100 ccm Wasser verteilt und über Nacht durch Schwefelwasserstoff unter Druck zerlegt. Der Bleisulfidniederschlag wurde gründlich gewaschen, Filtrat und Waschwasser i. Vak. eingeengt und dann auf 250 ccm aufgefüllt. 0.25 ccm dieser Lösung enthielten 0.420 mg Cystein (colorimetr. bestimmt); Gesamtausbeute an Cystein 0.420 g = 42% d. Theorie. Es wurde dann bis fast zur Trockne eingeengt, mit 20 ccm 0.2 n HCl aufgenommen und mit 0.4 ccm Perhydrol oxydiert¹⁰⁾. Nach kurzer Zeit

⁶⁾ Vergl. a. die Beständigkeit von Rhodan-dihydroureil (S. Gabriel, B. 38, 630 [1905]; 40, 2647 [1907]).

⁷⁾ C. Völckel, A. 48, 82 [1842]; H. P. Kaufmann, B. 57, 928 [1924].

⁸⁾ Herstellung dieser Lösung: 66 g Kupferacetat und 10 g Eisessig wurden mit Wasser auf 1 l aufgefüllt und auf der Schüttelmaschine bis zur völligen Auflösung geschüttelt.

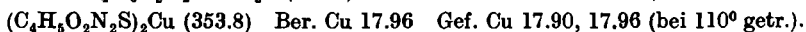
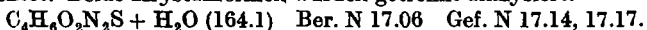
⁹⁾ Cu-Bestimmung (jodometrisch) nach E. Abderhalden und E. Schnitzler, Ztschr. physiol. Chem. 163, 94 [1927].

¹⁰⁾ Vergl. A. Schöberl, Ztschr. physiol. Chem. 209, 231 [1932].

war die Nitroprussidnatrium-Reaktion negativ. Beim Neutralisieren mit Natronlauge fiel Cystin in den charakteristischen 6-seitigen Plättchen aus. Man ließ über Nacht im Eisschrank stehen, saugte den rein weißen Niederschlag ab und wusch erst mit Methanol, dann mit Äther; Ausb. 0.3 g = 30% d.Theorie.

3.) Einwirkung von Kaliumcyanid auf Cystin in Gegenwart von Wasserstoffperoxyd: Ein Gemenge von 10.0 g Cystin mit 16.3 g Kaliumcyanid (6 Mol. Cyanid auf 1 Mol. Cystin) wird in 400 ccm Wasser gelöst (Abzug!). Die Lösung bleibt 1 Stde. bei Zimmertemperatur stehen; sie zeigt mit Nitroprussidnatrium stark positive SH-Reaktion (Tüpfelreaktion). Man versetzt solange tropfenweise mit 15-proz. Wasserstoffperoxydlösung, bis der SH-Test negativ ist. Dann wartet man, bis die Nitroprussidnatrium-Reaktion wieder stark positiv ist und oxydiert abermals langsam mit Wasserstoffperoxyd. Dies wird so oft wiederholt, bis auch nach längerem Stehenlassen der SH-Test negativ ausfällt; schließlich gibt man noch etwa $\frac{1}{3}$ der bereits zugesetzten Peroxydmenge zu. Insgesamt wird man kaum mehr als 30 ccm 15-proz. Wasserstoffperoxyd benötigen. Die Lösung hat sich inzwischen gelb gefärbt und auf 30–40° erwärmt. Man läßt sie 3 Stdn. stehen, säuert sie dann mit Eisessig bis zu pH 5–6 an (Abzug!), engt zur Entfernung der Blausäure i.Vak. bis auf etwa 100 ccm ein und fällt mit überschüss. Kupferacetatlösung. Es entsteht reichlich ein blauer bis blaugrüner feinkristalliner Niederschlag. Zur Vervollständigung der Fällung läßt man über Nacht stehen, filtriert das Kupfersalz der *α-Amino-β-rhodan-propionsäure* ab und wäscht es sorgfältig mit heißem Wasser; Ausb. etwa 90% d.Theorie.

Nach dem Umfällen aus salzsaurer Lösung mit Natriumacetat wird das jetzt himmelblaue Kupfersalz in Wasser mit Schwefelwasserstoff unter Druck zerlegt. Zur Abscheidung von kolloidalem Schwefel läßt man nach dem Ansäuern mit Essigsäure einige Zeit auf dem Wasserbad stehen und filtriert dann ab. Das Filtrat wird auf dem Wasserbad eingeeengt, bis die *α-Amino-β-rhodan-propionsäure* in größeren Mengen auszukristallisieren beginnt. Man läßt in einer Kältemischung abkühlen, saugt ab und wäscht mit kaltem Äthanol. Die Substanz wird 1–2 mal aus Wasser umkristallisiert, bis sie rein weiß ist. Es werden zwei Krystallformen beobachtet, kurze Prismen neben sechseckigen Plättchen und Nadeln (Polymorphie oder Racemisierung?); Nadeln hat Mauthner nicht beobachtet. Beide Krystallformen wurden getrennt analysiert.



$$[\alpha]_{\text{D}}^{15}: -2.94^\circ \times 100/1 \times 3.308 = -88.75^\circ \quad (2\text{-proz. Salzsäure}).$$

4.) Die Umsetzung zwischen Cystein, Kaliumcyanid und Wasserstoffperoxyd: 2.5 g Cysteinhydrochlorid wurden in w enig Wasser mit Kalilauge neutralisiert und mit einer Lösung von 4.0 g Kaliumcyanid versetzt. Dann fügte man tropfenweise bis zum Verschwinden der SH-Reaktion 5 ccm etwa 8-proz. Wasserstoffperoxyd zu. Die Lösung erwärmte sich dabei auf 30–40° und nahm tiefgelbe Farbe an. Es wurden darauf noch 5 ccm der Wasserstoffperoxydlösung zugegeben. Nach 3-stdg. Stehenlassen war der SH-Test noch negativ. Die Mischung wurde dann mit Essigsäure bis pH 5 angesäuert und i.Vak. auf etwa 10 ccm eingeeengt. Eine Probe der Lösung gab nach der Neutralisation mit Bleiacetat keine Fällung. Beim Zusatz eines Überschusses von Kupferacetatlösung fiel das hellblaue Kupfersalz der *α-Amino-β-rhodan-propionsäure* aus. Nach dem Stehenlassen über Nacht wurde es auf einem Glasfrittenfilter gesammelt und bei 110° getrocknet; Ausb. 1.9879 g = 79% d.Theorie.

Das Kupfersalz wurde in der üblichen Weise auf die *α-Amino-β-rhodan-propionsäure* aufgearbeitet; Ausb. 1.2697 g = 54% d.Theorie.

5.) Behandlung von *α-Amino-β-rhodan-propionsäure* mit Natronlauge: 1.40 g *α-Amino-β-rhodan-propionsäure* ließ man in 50 ccm 30-proz. Natronlauge in einer Stickstoffatmosphäre 10 Stdn. bei 40° reagieren; die Nitroprussidnatrium-Reaktion der gelblichen Lösung war dann stark positiv. Nach dem Ansäuern unter Stickstoff mit konz. Salzsäure wurde der abgespaltene Schwefelwasserstoff in der Siedehitze in vorgelegte Cadmiumacetatlösung übergetrieben und jodometrisch bestimmt. Gefunden wurden

23.0 mg Schwefelwasserstoff entspr. 8% des eingesetzten Gesamt-Schwefels. Blausäure entstand beim Ansäuern nicht.

Nach dem Erkalten wurde die farblose Lösung¹¹⁾ mit $n/_{10}$ Jodlösung oxydiert. Sobald sich die erste Trübung zeigte, gab man langsam tropfenweise weitere Jodlösung zu, bis keine Entfärbung mehr erfolgte. Man unterbrach die Titration öfters, um eine gute Krystallisation des ausfallenden Cystinhydantoin zu erreichen. Zuerst schieden sich sehr kleine Krystalle ab, bei weiterer Jodzugabe jedoch wesentlich größere, schöne, rautenförmige Plättchen; Verbrauch an Jodlösung 65 ccm = 76% d. Theorie. Nach dem Stehenlassen im Eisschrank wurden die farblosen Krystalle abgesaugt und im Vak.-Exsiccator getrocknet; Ausb. 0.5971 g = 48% d. Theorie¹²⁾.

Es wurde aus Wasser umkrystallisiert (200 mg aus etwa 40–45 ccm Wasser). Die Verbindung zeigte alle Eigenschaften des Cystinhydantoin, besonders die charakteristische Alkali-Empfindlichkeit¹³⁾. Cystinhydantoin läßt sich nach der für Cystin entwickelten Arbeitsvorschrift¹⁴⁾ colorimetrisch mit Phosphorwolframsäure bestimmen.

$C_8H_{10}O_4N_4S_2$ (290.1) Ber. S 22.08 N 19.29 Gef. S 22.13, 21.83 N 19.25.

Die primär entstehende Ureidosäure des Cysteins (Gleichung 3) kann aus neutraler Lösung nach der Alkalibehandlung mit Bleiacetat ausgefällt werden. Das labile Mercaptid läßt sich in der Kälte weiter verarbeiten. Eine Reindarstellung des Thiols wurde nicht vorgenommen.

6.) Umsetzung zwischen Kaliumcyanat und Cystein: 0.7795 g Cysteinhydrochlorid wurden unter sauerstoff-freiem Stickstoff in wenig Wasser nach der Neutralisation mit Natronlauge zusammen mit 0.7 g Kaliumcyanat 30 Min. in einem Bad von 125° erhitzt. Dann setzte man etwa 10 ccm konz. Salzsäure zu und kochte nochmals etwa 2 Stunden. Die kalte, klare Lösung wurde mit Jodlösung oxydiert, wobei Cystinhydantoin in schönen, rautenförmigen Plättchen ausfiel; Verbrauch an $n/_{10}$ Jodlösung: 32.5 ccm = 73% d. Theorie.

$C_8H_{10}O_4N_4S_2$ (290.1) Ber. S 22.08 Gef. S 22.16.

7.) Behandlung von α -Amino- β -rhodan-propionsäure mit Salzsäure und mit naszierendem Wasserstoff: a) 0.50 g α -Amino- β -rhodan-propionsäure wurden mit 40 ccm 20-proz. Salzsäure etwa 6 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Dann wurde zur Entfernung der Salzsäure zur Trockne eingengt und mit Wasser aufgenommen. Über das Kupfersalz ließen sich 96% der Rhodanverbindung wiedergewinnen.

b) 1.0 g α -Amino- β -rhodan-propionsäure wurden, gelöst in 10 ccm Wasser, mit 1.5 g Zinn und 10 ccm konz. Salzsäure 1 Tag auf dem Wasserbad erhitzt. Die Nitroprussidnatrium-Reaktion der Lösung war negativ. Nach der Entfernung des Zinns mit Schwefelwasserstoff wurde in einer Kohlendioxid-Atmosphäre eingedampft. Es blieben 94% des Ausgangsmaterials zurück, das durch Herstellung des Kupfersalzes identifiziert wurde.

¹¹⁾ Bei unzureichendem Luftausschluß kann die Lösung getrübt sein; Schütteln an der Luft erzeugt einen weißen Niederschlag.

¹²⁾ Die Mutterlauge enthielt noch größere Mengen des Hydantoin.

¹³⁾ Vergl. A. Schöberl u. Th. Hornung, A. 534, 210 [1938]; A. Schöberl u. P. Rambacher, A. 538, 84 [1939].

¹⁴⁾ A. Schöberl u. P. Rambacher, Biochem. Ztschr. 295, 377 [1938].