

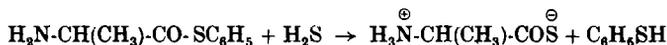
175. Theodor Wieland, Dorothe Sieber und Wilhelm Bartmann Über Aminothiosäuren II. Mitteil.*): S-Analoga einiger α -Aminosäuren

[Aus dem Institut für organische Chemie der Universität Frankfurt a. M.]

(Eingegangen am 28. Mai 1954)

Durch Reaktion von α -Amino-acyl-thiophenolen mit Schwefelwasserstoff entstehen die den α -Aminosäuren analogen α -Amino-thiosäuren. Die kristallisierten Analoga des Glycins, Alanins, Valins, Isoleucins und Methionins sind Zwitterionen mit charakteristischen UV-Spektren. Die höheren α -Amino-thiosäuren vermögen mit ihren schwefelfreien Stammsubstanzen Mischkristalle zu bilden.

Vor einiger Zeit konnten wir über die Synthese von *d,l*- α -Amino-thiopropionsäure, des ersten Vertreters der Aminothiosäuren**) berichten*). Dieses Thio- α -alanin entstand durch Thiohydrolyse beim Einleiten von Schwefelwasserstoff in eine alkalische wäßrige Lösung von Alanyl-thiophenol-hydrochlorid:



Im Papierchromatogramm zeigte es sich damals, daß der unaufbereitete Reaktionsansatz neben der neuen Verbindung noch nennenswerte Mengen der schwefelfreien Aminosäure enthielt, die durch eine gleichzeitig ablaufende Hydrolyse entstanden sein mußte. Zur Verbesserung der Ausbeute an der Aminothiosäure, deren Eigenschaften im folgenden näher beschrieben werden, wurde daraufhin in einigen Versuchen das Lösungsmittel variiert, um in einem möglichst wasserarmen Medium zum Ziel zu gelangen. Zwar lösen sich die Hydrochloride der Aminoacyl-thiophenole nur in Wasser und Alkoholen, wobei die Gefahr der Esterbildung durch Alkoholyse besteht, doch gelingt es leicht, die diesen Salzen zugrunde liegenden Basen in vielen organischen Lösungsmitteln aufzulösen. Beim Thio- α -alanin fiel unsere Wahl auf Äther, in dem die in Wasser aus dem Hydrochlorid mit Natriumacetat freigemachte Base durch Ausschütteln aufgenommen wurde. Beim Einleiten eines Schwefelwasserstoff-Stroms fiel bald die gesuchte Verbindung in feinen Kristallen aus; sie wurde aus wenig Wasser umkristallisiert und konnte so in einer Ausbeute von 65% gewonnen werden.

Zum Beweis ihrer Konstitution, die bisher nur aus den analytischen Daten und einigen Umsetzungen abgeleitet war, wurde die Aminothiosäure nach Schotten-Baumann an der Aminogruppe benzyliert. Die hierbei entstandene *N*-Benzoyl- α -amino-thiopropionsäure konnte dann mit einer Probe der auf anderem, bekanntem Wege synthetisierten Verbindung verglichen werden; *N*-Acyl-aminosäuren lassen sich nämlich nach der „Anhydrid“-Methode¹⁾ mit

*) I. Mitteil.: Th. Wieland u. D. Sieber, Naturwissenschaften **40**, 242, 300 [1953].

**) Den in der I. Mitteil.*) gemachten Nomenklaturvorschlag „Thioaminosäuren“ möchten wir nunmehr in „Aminothiosäuren“ umändern. Das Präfix *d,l*- wurde im folgenden weggelassen.

¹⁾ Th. Wieland u. R. Sehring, Liebigs Ann. Chem. **569**, 117 [1950]; Th. Wieland u. H. Bernhard, Liebigs Ann. Chem. **572**, 190 [1951].

Schwefelwasserstoff in die entsprechenden Thiosäuren verwandeln²⁾. So wurde *N*-Benzoyl-alanin über das gemischte Anhydrid mit Äthylkohlenensäure durch Reaktion mit Schwefelwasserstoff in *N*-Benzoyl-thio-alanin verwandelt, das den gleichen Schmelzpunkt hatte wie unser Benzoylierungsprodukt und mit ihm keine Erniedrigung gab.

Für die Struktur des Thio- α -alanins als Zwitterion bildet schon der relativ hohe Zersetzungspunkt (250°) einen deutlichen Hinweis. Diesem konnten wir in der I. Mitteil. durch Aufnahme der UV-Absorptionsspektren einen weiteren Beweis hinzufügen, indem wir in neutraler und alkalischer Lösung ein Maximum bei 250 $m\mu$ fanden, dem die Gruppierung $\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{S} \end{array} \right]^-$ zugeordnet werden muß. Die der Thiolcarbonsäure $\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{SH} \end{array}$ entsprechende Absorption mit einem Maximum bei 230–240 $m\mu$ zeigt sich hingegen nur in saurer Lösung. Zu diesen Indizien kommt noch die recht große Beständigkeit gegen alkalische Hydrolyse und Aminolyse hinzu. Während nämlich Ester von Thiosäuren, in denen die Gruppierung -CO-S-R vorliegt, gegen Alkali recht unbeständig sind und Hydrolyse erleiden, zeigt unser Zwitterion in alkalischer Lösung sogar eine größere Stabilität als in saurer Lösung. Beim Erhitzen auf 80° mit *n* HCl war die Thiosäure bereits nach 20 Min. zu Alanin und Schwefelwasserstoff hydrolysiert, während in 1 *n* wäbr. NaOH bei derselben Temperatur nach 3 Stdn. erst die Hälfte zersetzt war. Auch das stärker nucleophile NH₃ greift die -COS[⊖]-Gruppe nicht an, so daß verständlicherweise auch Erhitzen mit der alkalischen Lösung einer zweiten Aminosäure nicht zur Peptidverknüpfung führt. Auch das Erhitzen der trockenen Substanz auf 100° bringt keine Veränderung; bei 150° in Glykol bildet sich unter geringer Schwefelwasserstoff-Entwicklung wenig Diketopiperazin. Lediglich mit Hydroxylamin gelingt ein erfolgreicher Angriff auf die stabile Ionenstruktur, wobei die Hydroxamsäure des α -Alanins gebildet wird, die sich im Papierchromatogramm nachweisen läßt.

Es schien uns weiterhin von Interesse, noch einige weitere Vertreter der Aminothiosäuren kennenzulernen. Bei den Versuchen zu ihrer Darstellung konnte im Prinzip das oben beschriebene Verfahren beibehalten werden, wobei sich eine Variation des Lösungsmittels in einigen Fällen als Verbesserung herausstellte. So haben wir gefunden, daß das Schwefel-Analoge des Glykokolls, Thio-glycin, vorteilhaft in Benzol aus Glycyl-thiophenol und Schwefelwasserstoff erhalten wird, da die Verbindung in Wasser sehr leicht löslich und daraus schwer abzuscheiden ist. Die aus Benzol in ziemlicher Reinheit und guter Ausbeute anfallenden Kristalle sind in Äthanol schwer, in Methanol recht leicht löslich. Durch ihren hohen Schmelzpunkt verraten sie sich erwartungsgemäß ebenfalls als Zwitterionen, die auch alle anderen am Thio- α -alanin geschilderten Eigenschaften dieser Klasse besitzen. Wie in der Reihe der schwefelfreien Stammsubstanzen, so nimmt auch bei den Thio-Analogen die

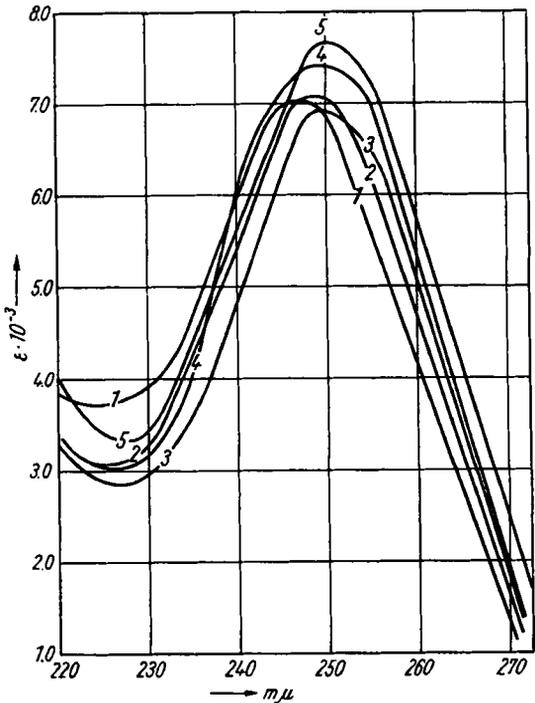
²⁾ M. W. Cronyn u. J. Jiu, J. Amer. chem. Soc. 47, 4726 [1952]; J. C. Sheehan u. D. A. Johnson, J. Amer. chem. Soc. 47, 4726 [1952].

Wasserlöslichkeit mit steigender Kohlenstoffzahl ab. Infolgedessen ist es nicht schwer, z.B. Thio-valin aus der soda-alkalischen wäßrigen Emulsion des entsprechenden Thiophenylesters durch Einwirkung von Schwefelwasserstoff abzuscheiden.

Das hierbei ausfallende, einheitlich aussehende Kristallisat erwies sich jedoch im Papierchromatogramm als ein Gemisch aus Thio-valin und Valin, das durch Hydrolyse nebenbei entstanden war. Die Erwartungen auf eine Trennung beider Komponenten beim Umkristallisieren aus Methanol oder Wasser erfüllten sich nicht, hingegen enthielt das wohl ausgeprägte Kristallisat auch nach mehrfachen derartigen Reinigungsversuchen stets schwefelhaltige und schwefelfreie Komponenten im gleichen Verhältnis. Diese Erscheinung, die auch am Thio-isoleucin und Thio-methionin, nicht aber am Thio-glycin und Thio-alanin beobachtet wurde, wurde dann etwas eingehender studiert. Vorher bemühten wir uns jedoch, valinfreies Thiovalin in die Hand zu bekommen, was nur durch Variation des Lösungsmittels erfolgversprechend erschien. Hierbei erwies sich der Übergang von Wasser auf Äther als günstig. Darin wurde das feingepulverte Valyl-thiophenol-hydrochlorid mit der äquivalenten Menge Triäthylamin bei 0° geschüttelt, das Hydrochlorid der *tert.* Base rasch abgesaugt und beim Einleiten von Schwefelwasserstoff ein Kristallisat erhalten, welches von vornherein keine unabtrennbare schwefelfreie Verbindung enthält.

So gelang es uns, ganz reines Thio-valin sowie Thio-isoleucin und Thio-methionin aus den entsprechenden Thiophenylverbindungen darzustellen.

Die Absorptionsspektren der neu dargestellten α -Amino-thiosäuren haben wir in neutraler, alkalischer und saurer wäßr. Lösung mit den bereits bekannten des Thio- α -alanins verglichen. Aus Abbild. 1 geht hervor, daß hierbei keine Überraschungen auftraten: Alle α -Amino-thiosäuren zeigen in neutraler Lösung das Maximum der Absorption bei etwa 250 $m\mu$, außer Thio-



Abbild. 1. UV-Absorption einiger Aminothiosäuren in neutralem Wasser. 1 = Thio-glycin, 2 = Thio-alanin, 3 = Thio-valin, 4 = Thio-isoleucin, 5 = Thio-methionin

glycin, das in etwas kurzwelligerem Gebiet absorbiert (Kurve 1). Die molare Extinktion ϵ ist innerhalb der Meßgenauigkeit bei allen α -Amino-thiosäuren dieselbe, nämlich etwa 7×10^3 . In n NaOH steigt sie durchweg um etwa 10% an, ohne daß es zu einer Verschiebung des Maximums käme. In n HCl verschiebt sich das Maximum in einen kürzeren Wellenbereich, ϵ sinkt etwa auf die Hälfte ab. Dieser Effekt ist am ausgeprägtesten beim Thio-glycin zu beobachten ($\lambda_{\max} = 224 \text{ m}\mu$), darauf beim Thio-alanin ($\lambda_{\max} = 230$), sodann folgen Thio-valin (243 $\text{m}\mu$) und Thio-methionin (246 $\text{m}\mu$), bei dem, wie man sieht, die Blauverschiebung nur wenige $\text{m}\mu$ beträgt.

In Tafel I sind die Schmelzpunkte und R_F -Werte der Thio- α -aminosäuren (in sek. Butanol-Wasser $^{100}/_{25}$) zusammengestellt.

Tafel I

	Schmp. (Zers.)	R_F
Thio-glycin	150	0.15
Thio-alanin	250	0.25
Thio-valin	200	0.40
Thio-isoleucin	235	0.53
Thio-methionin	180	0.42

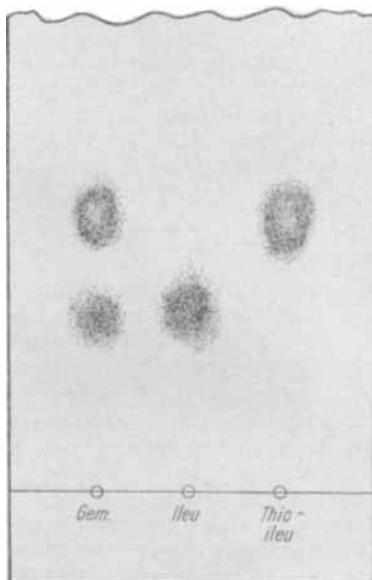
Am Thio-isoleucin und Thio-methionin wurde das oben erwähnte hartnäckige Anhängen der schwefelfreien Analogen in systematischen Untersuchungen aufgeklärt. Bekanntlich ist Isoleucin in Methanol nur sehr schlecht, Methionin darin nahezu unlöslich. Die zugehörigen Thiosäuren zeigen, was einen charakteristischen Unterschied bedeutet, hierin jedoch besonders in der Wärme recht gute Löslichkeit. Erwärmt man nun Thio-isoleucin oder -methionin mit etwa derselben Menge der entsprechenden schwefelfreien Verbindung in Methanol, so geht alles in Lösung und beim Erkalten scheidet sich ein im Mikroskop einheitlich aussehendes Kristallisat ab. Im Papierchromatogramm erweist sich dieses aber jeweils als ein Gemisch aus den beiden Komponenten. Die röntgenographische Untersuchung offenbarte in beiden Fällen, daß die Kristallform der Mischkristalle mit der der reinen Thioverbindung völlig identisch, von der der schwefelfreien Substanz aber verschieden ist (s. Abbild. 2),



Abbild. 2. Debye-Scherrer-Diagramme von Thio-isoleucin und einem Mischkristallisat von Thio-isoleucin und Isoleucin (1:1)

während die papierchromatographische Analyse deutlich die Komponenten der Mischkristalle verriet (Abbild. 3). Daraus ergibt sich, daß in das wohl weiträumigere Kristallgitter der Thiosäuren die schwefelfreien Muttersubstan-

zen ohne Störung eingelagert werden. Ob den Aminothiosäuren eine ähnliche Fähigkeit zur Bildung von Einschlußverbindungen wie dem Thioharnstoff³⁾ zukommt, bleibt noch zu untersuchen.



Abbild. 3. Papierchromatogramm von Thio-isoleucin (rechts), Isoleucin (Mitte) und einem Gemisch aus beiden (links)

In Anbetracht der strukturellen Ähnlichkeit von schwefelfreier und schwefelhaltiger Verbindung erschien es uns auch prüfenswert, ob bei biologischen Reaktionen ein Antagonismus aufzufinden sei. Unter den zahlreichen hier denkbaren Experimenten wurden vorerst von E. F. Möller, Max-Planck-Institut für med. Forschung, Heidelberg, nur einige Bakterienhemmversuche angestellt. An *Streptobact. plant.* 10 S erwies sich *d,l*-Thio-methionin mit 2×10^{-4} g/ccm als Antagonist des Methionins, von dem auch überoptimale Dosen kein Wachstum erzeugten. Nach 24 Stdn. war jedoch die hemmende Wirkung der Thioverbindung, wohl als Erfolg einer enzymatischen Hydrolyse zu Methionin, überwunden.

Beschreibung der Versuche

Thio-glycin: 750 mg Glycin-thiophenol-hydrochlorid wurden fein gepulvert in 30 ccm absol. Benzol mit 0.55 ccm Triäthylamin 15 Min. kräftig geschüttelt. In die vom Triäthylammonium-hydrochlorid abfiltrierte Lösung wurde sodann 2 Stdn. lang Schwefelwasserstoff eingeleitet. Das in Kristallen abgeschiedene Rohprodukt wurde nach dem Absaugen in 5 ccm Methanol heiß suspendiert und durch vorsichtigen Wasserzusatz eben gelöst. Nach dem Abkühlen erhielt man 170 mg (50% d. Th.) derbe Prismen vom Schmp. (Zers.) ab 147° . R_F (in sek. Butanol-Wasser 100/25) = 0.15.

C_2H_5ONS (91.13) Ber. C 26.36 H 5.53 N 15.37 S 35.2

Gef. C 26.41 H 5.58 N 15.49 S 35.8

Mit Kupferacetat entstand eine schwarze kolloide Lösung, mit Silbernitrat ein weißer Niederschlag.

³⁾ W. Schlenk jr., Liebigs Ann. Chem. 578, 142 [1951].

Thio-alanin: 2 g Alanyl-thiophenol-hydrochlorid wurden in 5 ccm Wasser gelöst und bei 0° mit 25 ccm einer ebenfalls gekühlten 5-proz. Natriumacetatlösung versetzt. Man ätherte nun möglichst rasch mit kleinen Portionen aus und begann sofort in die ersten Extrakte unter Eiskühlung Schwefelwasserstoff einzuleiten, während die wäßr. Phase noch mehrmals, im ganzen 6mal nachgeäthert wurde. Jeden Extrakt fügte man sofort dem Versuchsgefäß zu und setzte nach der letzten Zugabe das Einleiten von Schwefelwasserstoff noch 30 Min. fort. Das Rohprodukt wurde abgesaugt, mehrmals mit Äther gewaschen und dann aus möglichst wenig Wasser bei 80° umkristallisiert. Ausb. 650 mg (65% d.Th.), schuppige Kristalle vom Schmp. (u. Zers.) ab 250°; $R_F = 0.25$.

C_3H_7ONS (105.2) Ber. C 34.26 H 6.71 N 13.32 S 30.49

Gef. C 34.65 H 6.71 N 13.25 S 29.73

Mit Kupferacetat entstand ein violetter Niederschlag, mit Silbernitrat und Bleiacetat weiße Fällungen.

N-Benzoyl-thioalanin

a) Nach Schotten-Baumann: 100 mg Thioalanin wurden in 2 ccm $2nNa_2CO_3$ unter Eiskühlung benzoilyliert. Nach Verschwinden des Geruchs von Benzoylchlorid wurde mit $2nHCl$ vorsichtig angesäuert, die ölige Vorfällung verworfen und bei p_{H3} ein fester Niederschlag erhalten, der aus Aceton-Wasser umkristallisiert, bei 93–94° schmolz.

b) Nach der Anhydrid-Methode: 1.9 g N-Benzoyl-alanin wurden zusammen mit 1.4 ccm Triäthylamin in 10 ccm absol. Tetrahydrofuran aufgelöst. In die auf –10° abgekühlte Lösung ließ man 1 ccm Chlorameisen-äthylester eintropfen und saugte nach kurzem Stehenlassen das ausgeschiedene Hydrochlorid ab. Das Filtrat wurde mit weiteren 1.4 ccm Triäthylamin versetzt und dann bei Zimmertemperatur mit Schwefelwasserstoff gesättigt. Am nächsten Tag wurde das Lösungsmittel i.Vak. abgedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und wie oben mit $2nHCl$ vorsichtig angesäuert. Umkristallisieren aus Aceton-Wasser lieferte ebenfalls Kristalle vom Schmp. 93–94°. Der Misch-Schmp. beider Proben war ohne Erniedrigung.

$C_{10}H_{11}O_2NS$ 209.3 Ber. N 6.69 Gef. N 6.7

Thio-valin: 1.62 g Valyl-thiophenol-hydrochlorid wurden feinst gepulvert in 30 ccm absol. Äther suspendiert und mit 1 ccm Triäthylamin versetzt. Nach 15 Min. langem kräftigem Schütteln filtrierte man das Triäthylammonium-hydrochlorid ab und leitete bei 0° 2 Stdn. lang Schwefelwasserstoff ein. Das hierbei ausgefallene Rohprodukt wurde abfiltriert und mehrfach mit Äther gewaschen. Aus trockenem Methanol umkristallisiert, wurden 320 mg (37% d.Th.) mattglänzende Schuppen vom Schmp. (u. Zers.) ab 200° gewonnen; $R_F = 0.40$.

$C_5H_{11}ONS$ (133.2) Ber. C 45.09 H 8.33 N 10.51 S 24.05

Gef. C 45.45 H 8.32 N 10.62 S 24.7

Mit Kupferacetat bildete sich eine rot-violette Fällung, mit Silber-, Quecksilber- und Bleisalzen weiße Niederschläge, die beim Erhitzen schwarzes Metallsulfid abspalteten.

Thio-isoleucin: Analog der Darstellung des Thio-valins wurde die Substanz aus der entsprechenden Thiophenylverbindung mit 66% Ausbeute erhalten. Sie kristallisierte in Schuppen, die sich von 235° ab zersetzten. $R_F = 0.53$.

$C_6H_{13}ONS$ (147.2) Ber. C 48.94 H 8.9 N 9.52 S 21.78

Gef. C 49.33 H 9.33 N 9.66 S 21.20

Schwermetallsalze wie oben.

Thio-methionin wurde wie obige Verbindung dargestellt und kristallisierte in glänzenden Blättchen vom Schmp. 178° (unt. Zers.); Ausb. 48% d.Th.; $R_F = 0.42$.

$C_5H_{11}ONS_2$ (165.3) Ber. C 36.34 H 6.71 N 8.48 S 38.79

Gef. C 36.48 H 6.97 N 8.82 S 38.70

Das Kupfersalz fiel in grün-blauen voluminösen Flocken, Silber-, Quecksilber- und Bleisalz als weiße Pulver.

Thio-tryptophan

ist bisher papierchromatographisch nachgewiesen, jedoch noch nicht in ganz reiner Form erhalten worden; $R_F = 0.43$.