

Reinigung: a) (9.8 g) wurde in Hydrogencarbonatlösung gelöst, mit $2n$ HCl ausgefällt, abgesaugt und kurz auf Ton getrocknet. Nach Auflösen in 10 ccm Methanol wurde filtriert und mit dem 4fachen Volumen Wasser versetzt. Nach kurzer Zeit fiel die Säure X in glänzenden Nadeln aus. Schmp. 153° (Zers.). Ausb. 8.5 g.

$C_{14}H_{16}O_6NS$ (309.3) Ber. C 54.36 H 4.98 N 4.53 S 10.36

Gef. C 54.18 H 5.34 N 4.38 S 10.54

b) (5.9 g) wurde wie a) behandelt, dabei resultierten 5.2 g der C_{13} -Säure in glänzenden Blättchen. Schmp. 143° (Zers.). Ausb. 5.2 g.

$C_{13}H_{15}O_4NS$ (281.3) Ber. C 55.49 H 5.37 N 4.98 S 11.39

Gef. C 55.52 H 5.38 N 4.54 S 10.95

c) wurde mehrfach aus Alkohol umkristallisiert, dabei resultierten 5.3 g Acetanilid, das durch Misch-Schmelzpunkt identifiziert wurde.

9. Alkalische Spaltung der C_{14} -Säure (X): 2 g der C_{14} -Säure (X) wurden mit 7 ccm $2n$ NaOH 6 Stdn. bei 37° stehengelassen, dann erst bei p_H 3.5 und darnach bei p_H 2 ausgeäthert. Die erste Fraktion ergab beim Abdunsten des Äthers nur wenige Tropfen eines scharf riechenden Öles (Thioessigsäure?). Bei der zweiten Fraktion hinterblieben gelbliche Kristalle, die getrocknet, mit Petroläther gewaschen und aus Methanol bis zur Farblosigkeit umkristallisiert wurden. Ihre Nitroprussidreaktion war positiv. Schmp. 175° (Zers.). Ausb. 1.1 g.

$C_{12}H_{13}O_4NS$ (267.3) Ber. C 53.92 H 4.90 N 5.24 S 11.99

Gef. C 53.87 H 5.21 N 5.20 S 11.45

97. Theodor Wieland, Joachim Franz*) und Gerhard Pfeleiderer: Über die Bildung von Aminosäuren aus α -Keto-aldehyden

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

(Eingegangen am 11. Februar 1955)

α -Keto-aldehyde verwandeln sich in α -Aminosäuren, wenn man sie in Gegenwart von Ammoniumsalzen zusammen mit Mercaptanen einige Stunden bei Zimmertemperatur in wäbr. Lösung vom p_H ca. 7 aufbewahrt. Die Umsetzungsprodukte aus Glyoxal, Methylglyoxal und Oxymethylglyoxal (Redukton) konnten als Dinitrophenylderivate des Glycins, Alanins und Serins isoliert, *C*-Phenylglycin (aus Phenylglyoxal), Phenylalanin (aus Benzylglyoxal) und Leucin (aus Isobutylglyoxal) papierchromatographisch nachgewiesen werden. Primäre Amine werden wie Ammoniak eingebaut, sekundäre reagieren nicht, ebensowenig wie 1.2 Diketone mit Ammoniak. Über den Mechanismus dieser vielleicht auch biologisch möglichen Reaktion kann auf Grund der Versuchsergebnisse einiges ausgeagt werden.

Beim Behandeln mit Alkali erleiden α -Keto-aldehyde eine innermolekulare Wasserstoffverschiebung, als deren Ergebnis α -Oxy-carbonsäuren entstehen. Eine ähnliche Reaktion tritt auch in Gegenwart der Enzyme Glyoxalase I und II ein, die Methylglyoxal in Milchsäure verwandeln¹⁾. Als Coenzym der Glyoxalase II ist Glutathion erkannt worden²⁾, an dessen S-Atom sich die geschilderte Reaktion abspielt. Die erste durch Glyoxalase I katalysierte Stufe besteht in der Vereinigung des Keto-aldehyds mit der SH-Gruppe des

*) Dissertat. Universität Frankfurt a. M., 1955.

¹⁾ C. Neuberg, Biochem. Z. 49, 502 [1913].

²⁾ K. Lohmann, Biochem. Z. 254, 332 [1932].

Peptids und sofortiger Umlagerung zu *S*-Lactoyl-glutathion³⁾, das vom zweiten Enzym hydrolytisch in Milchsäure und das Coenzym aufgespalten wird⁴⁾. Bei Modellversuchen, die zum Zweck der Aufklärung des Reaktionsmechanismus von Stufe I angestellt wurden, beobachteten wir, daß aus Methylglyoxal und NH_4^{\oplus} in wäßriger Lösung leicht Alanin entsteht, wenn Glutathion zugegen ist⁵⁾. Wir haben daraufhin unsere Beobachtungen auf weitere α -Ketoaldehyde, Mercaptane und Amine ausgedehnt und versucht, über den Mechanismus dieser neuen Bildungsweise von α -Aminosäuren etwas Näheres zu erfahren.

Wie in der vorausgegangenen Mitteilung⁵⁾ bereits kurz erwähnt wurde, ist man beim Studium der Reaktion nicht auf das kostspielige Glutathion angewiesen, da Thiophenol und Thioglykolat denselben Effekt bewirken. Die folgenden Versuche wurden deshalb aus-

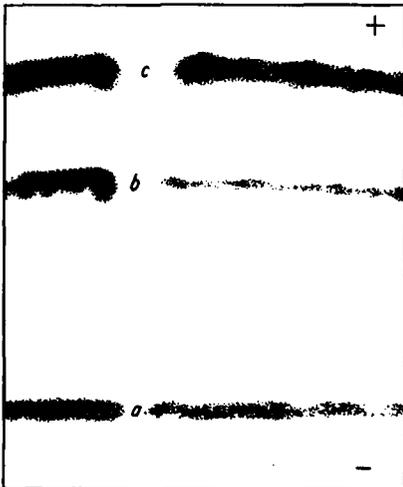


Abb. 1. Papier-elektropherogramm eines Ansatzes von Methylglyoxal, NH_4^{\oplus} und Thiophenol in Methanol-Wasser (rechts), ausgeführt bei p_{H} 6.5; a (am Start): Alanin; b (zur Kathode): *S*-Alanyl-thiophenol; c (zur Kathode): Alanin-methylester. Links Vergleichssubstanzen

nahmslos mit den billigeren Mercaptanen durchgeführt. Von diesen wählten wir zuerst das Thiophenol, dessen Schwerlöslichkeit in Wasser allerdings störte. Um ihr zu begegnen, wurde den Ansätzen Methanol zugefügt; in solchen Fällen zeigte die Papier-elektrophorese des Reaktionsansatzes, der mehrere Stunden bei Raumtemperatur gestanden hatte, neben Alanin (a) das Vorliegen zweier stark basischer, ninhydrin-positiver Komponenten (s. Abbild. 1). Die rascher wandernde (c) erwies sich als Alanin-methylester, wie durch papier-elektrophoretischen und chromatographischen Vergleich festgestellt und durch Isolierung aus einem präparativen Ansatz bewiesen werden konnte. Die langsamere wandernde Substanz (b) konnte aus den Ansätzen nicht isoliert und auch aus den Pherogrammen nicht unverändert gewonnen werden, da sie sich leicht unter Alanin-Abspaltung zersetzte.

Die Reaktion mit Jod-Azid zeigte auf dem Papier deutlich die Anwesenheit von Schwefel an, und der naheliegende Schluß, daß es sich dabei um *S*-Alanyl-thiophenol handelte, konnte durch papier-elektrophoretischen Vergleich mit andersartig bereitetem *S*-Alanyl-thiophenol⁴⁾ eindeutig erbracht werden. Somit wissen wir, daß bei der Aminosäurebildung eine *S*-Aminoacyl-Verbindung als Zwischenprodukt entsteht, die mit Methanol unter Alkoholyse zum Amino-

³⁾ E. Racker, J. biol. Chemistry **190**, 685 [1951].

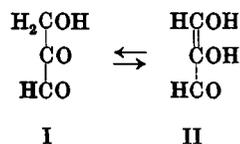
⁴⁾ Th. Wieland u. H. Köppe, Liebigs Ann. Chem. **581**, 1 [1953].

⁵⁾ Th. Wieland, G. Pfeleiderer u. J. Franz, Angew. Chem. **66**, 297 [1954].

säureester, mit Wasser unter hydrolytischer Spaltung zur Aminosäure + Mercaptan reagiert. Eine weitere basische ninhydrin-positive Verbindung, die auch in Abwesenheit von Alkohol bei stärker alkalischem p_H auftrat, konnte als Alanin-amid identifiziert werden.

Bei der Variation der N -haltigen Komponente interessierte nur, ob außer NH_3 auch Amine in Reaktion treten. Wir fanden, daß aus Methylglyoxal und Methylamin in Gegenwart von Thioglykolat (oder Thiophenol) N -Methyl-alanin, mit Colamin eine im Papierchromatogramm langsamer wandernde Verbindung, wohl N - β -Oxymethyl-alanin, gebildet wird. Dimethylamin vermag nicht zu reagieren, so daß der Schluß erlaubt ist, daß die Fixierung des Stickstoffs an den α -Kohlenstoff des Keto-aldehyds in einer Ketiminbildung besteht.

Die Bildungsreaktion von α -Aminosäuren konnte dann auch mit anderen α -Keto-aldehyden beobachtet werden. Da einige dieser Glyoxale in Wasser schlecht löslich sind, mußte mit organischen Lösungsmitteln verdünnt werden, die den Ablauf der Reaktion nicht stören. An Stelle von Methanol, das zur Veresterung führt, bewährte sich Isopropanol, das als sek. Alkohol bedeutend langsamer mit der intermediären aktiven S -Aminoacyl-Verbindung reagiert, oder Pyridin, in dessen Gegenwart gleichzeitig das für die Reaktion günstige p_H von etwa 7 erhalten bleibt. Als Thiol verwendeten wir in diesen Versuchen Thioglykolsäure. Es wurden so depolymerisiertes Glyoxal, Phenylglyoxal, Benzylglyoxal und Isobutylglyoxal unter den beschriebenen milden Bedingungen der Reaktion mit Ammoniumacetat ausgesetzt und in guten Ausbeuten Glycin, Phenylglycin, Phenylalanin und Leucin nachgewiesen. Weiterhin stellten wir Oxymethylglyoxal (I) durch Oxydation von Glycerinaldehyd mit Kupfer(II)-acetat¹¹⁾ und das tautomere Redukton (II) durch alkalische Spaltung von Glucose⁶⁾ dar.



Beide Aldehyde ergaben unter den geschilderten Bedingungen Serin.

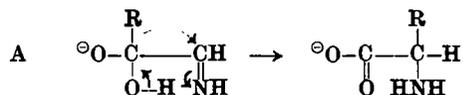
Die Umsätze sind in allen Fällen so gut, daß es mit ihrer Hilfe leicht möglich ist, α -Keto-aldehyde empfindlich als Aminosäuren papierchromatographisch nachzuweisen. Um die Spezifität dieser analytischen Reaktion abzutasten, wurde auch Diacetyl als 1.2-Diketon der Reaktion unterzogen, ohne daß ein ninhydrin-positives Umsetzungsprodukt erhalten werden konnte. Dagegen war es leicht möglich, aus etwas größeren Ansätzen die Aminosäuren der Ketoaldehyd-Reaktion, zum Beispiel Glycin, Alanin und Serin, in Form ihrer analysenreinen N -Dinitrophenyl-Derivate zu isolieren. Bei den anderen erfolgte der Nachweis durch Papierchromatographie, die besonders gut nach papierelektrophoretischer Entsalzung gelang.

Aus den vorliegenden Versuchsergebnissen lassen sich gewisse Aussagen über den Mechanismus der beschriebenen Reaktion machen: Das Problem ist verwandt mit dem der Bildung von α -Oxysäuren aus α -Keto-aldehyden⁷⁾,

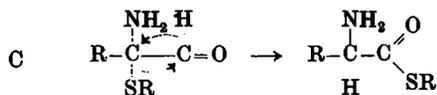
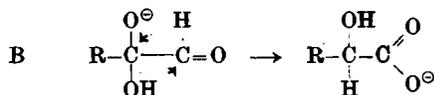
⁶⁾ H. v. Euler u. C. Martius, Liebigs Ann. Chem. 505, 83 [1933].

⁷⁾ H. Müller u. H. v. Pechmann, Ber. dtsh. chem. Ges. 22, 2557 [1889]; H. v. Pechmann, ebenda 20, 2904 [1887].

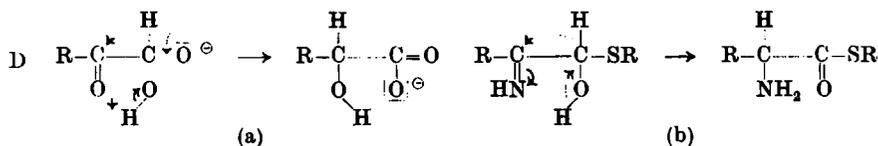
das am Beispiel des Phenylglyoxals (\rightarrow Mandelsäure) in letzter Zeit auch unter Verwendung von Isotopen studiert worden ist⁸⁾. Dabei konnte eine Benzilsäureumlagerung (A) ausgeschlossen werden,



die wohl auch in unserem Fall – am Aldehydimin denkbar – nicht in Frage kommt. Auch eine andere, in diesem Zusammenhang nicht diskutierte Möglichkeit, Platztausch des Hydridwasserstoffs der Aldehydgruppe mit dem OH der hydratisierten Ketogruppe (B), in unserem Fall der Mercaptidgruppe, nach vorausgegangenem Ersatz der anderen Oxygruppe am hydratisierten Keton durch NH_2 (C), möchten wir ausschließen.



Man muß eher den auch für die Mandelsäurebildung formulierten Prozeß in Betracht ziehen, bei dem die intramolekulare Wanderung eines Hydridions maßgebend ist, da hierbei in D_2O kein D stabil eingebaut wird⁹⁾ (D a, b) (Cannizzaro-Typ).

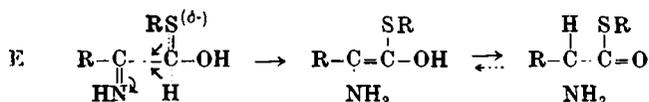


Das bedeutet für den Fall eines Halbmercaptals (D, b), daß unter dem Einfluß des Schwefels der am benachbarten Kohlenstoff gebundene Wasserstoff leicht, auch in neutraler Lösung, wie sie hier immer vorliegt, als Hydridion abgelöst wird. Diese Vorstellung ist wohl für den durch Alkali hydratisierten Aldehyd (D, a) plausibel, wo das $\text{C}-\text{O}^{\ominus}$ ein Elektronenpaar bereitwillig zur weiteren Bindung hergibt und damit das H^{\ominus} im Zug einer Elektronenumgruppierung in einem 6-Ring-Zwischenzustand in die α -Stellung abschiebt, ähnlich wie den anionoiden C-Rest bei der Benzilsäureumlagerung. Beim S-Analogiefall (B, d) begegnet sie aber dem theoretischen Widerspruch, daß das S-Atom eher geneigt ist, unter Aufnahme von Elektronen ein Decett zu versammeln⁹⁾.

⁸⁾ W. v. E. Doering, T. I. Taylor u. E. F. Schoenewaldt, J. Amer. chem. Soc. 70, 455 [1948]; O. K. Neville, ebenda 70, 3499 [1948].

⁹⁾ G. Cilento u. W. F. Walter, J. Amer. chem. Soc. 76, 4469 [1954].

Dann müßte aber, im Gegensatz zu D, die intramolekulare Wasserstoffverschiebung in Form der Wanderung eines Protons ablaufen (E), wie wir es in der vorigen Mitteilung⁵⁾ ohne experimentelle Unterlagen angedeutet haben.



Diese Reaktion beansprucht wegen der Glyoxalaserreaktion, die zu *S*-Lactoyl-glutathion führt, und wegen der möglichen Beteiligung von Glutathion auch an der enzymatischen Dehydrierung von Aldehyden (Phosphoglycerinaldehyd) zu „aktivierten“ Carbonsäuren¹⁰⁾ erhebliches biochemisches Interesse. Eine Entscheidung zwischen D und E mit Hilfe von Deuterium, das beim Umlagern in D₂O fest eingebaut werden müßte, wenn Mechanismus E der wahre ist, wird von uns zur Zeit herbeigeführt.

Beschreibung der Versuche

Darstellung der Glyoxale: Die im beschriebenen Versuchsansatz verwendeten Glyoxale stellten wir uns allgemein durch Oxydation der entsprechenden Methylketone*) mit SeO₂ dar**) (Beispiel: Org. Syntheses Coll. Vol. II (1948) S. 509). Redukton wurde nach H. v. Euler und C. Martius⁶⁾, Oxymethylglyoxal nach W. E. Evans, C. J. Carr und J. C. Krantz¹¹⁾ durch Oxydation von Dioxyaceton mit Kupfer(II)-acetat hergestellt. Glycerinaldehyd gibt nach unseren Befunden unter denselben Bedingungen dieselbe Verbindung.

Aminosäuresynthesen (Glycin, Serin, Alanin): Etwa 1 g des jeweiligen Glyoxals wurde in 10 ccm Wasser gelöst und zur Depolymerisierung einige Minuten aufgekocht. Bei in Wasser schwerlöslichen wurde Pyridin bis zur Homogenität zugesetzt. Dann gab man 1 g Thioglykolsäure und 1.5 g Ammoniumacetat zu, brachte mit 2*n* NaOH auf *p*_H 7 und ließ 12 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Darnach wurde mit methanolischer Jodlösung die nicht oxydierte Thioglykolsäure oxydiert, mit Hydrogencarbonatlösung alkalisch gemacht und mit 0.5 g Dinitrofluorbenzol 6 Stdn. geschüttelt. Das überschüssige Dinitrofluorbenzol und Dinitroanilin wurden mit Äther ausgeschüttelt, aus der wäßr. Lösung die Dinitrophenylaminosäure durch Salzsäure ausgeschieden und durch mehrmaliges Ausschütteln mit Essigester extrahiert. Nach dem Abdampfen hinterblieben die DNP-Aminosäuren, die aus Methanol-Wasser umkristallisiert wurden und die in der Literatur¹²⁾ angegebenen Schmelzpunkte sowie die stimmenden Stickstoff-Analysenwerte aufwiesen. Die Ausbeuten bewegten sich zwischen 20–40% der theoretischen.

Bei den anderen Aminosäuren (Phenylglycin, Phenylalanin, Leucin) begnügten wir uns mit dem papierchromatographischen Nachweis aus kleineren Ansätzen, die in analoger Weise zusammengestellt waren. Um sie von den beträchtlichen Salzmengen zu befreien, wurde von der Elektrophorese auf Filtrierpapier Gebrauch gemacht: Auf 20–30 cm breiten, 30 cm langen Papierbögen trug man nach Anfeuchten mit einem Puffer aus 100 ccm Pyridin, 10 ccm Eisessig und 890 ccm Wasser (*p*_H 6.5) in der Mitte quer einen Streifen

¹⁰⁾ E. Racker u. I. Krimsky, J. biol. Chemistry 198, 731 [1952].

*) Für die Überlassung einiger Methylketone haben wir Hrn. Professor Dr. W. Reppe von der Badischen Anilin- & Sodafabrik herzlich zu danken.

**) Einige der Glyoxale hat Herr Dipl.-Chem. H. Schleußner dargestellt und durch verschiedene kristallisierte Derivate charakterisiert.

¹¹⁾ J. Amer. chem. Soc. 60, 1628 [1938].

¹²⁾ K. R. Rao u. H. A. Sober, J. Amer. chem. Soc. 76, 1328 [1954].

der incubierten Lösung auf und unterwarf ihn unter Solekühlung der Elektrophorese für 30 Min. bei 40 V/cm¹³). Die nicht gewanderten Aminosäuren wurden aus dem herausgeschnittenen Mittelstreifen mit dest. Wasser eluiert, die Eluate im Exsiccator getrocknet und, in wenig Wasser wiedergelöst, der Papierchromatographie in den üblichen Lösungsmitteln unterworfen. Dabei traten im Vergleich mit authent. Proben keine Abweichungen im R_F -Wert auf.

In derselben Weise ließen sich auch die kathodisch wandernden Komponenten (Alanin-methylester, Alanin-amid) rein darstellen und mit authent. Substanzproben identifizieren. Zur Sicherung der Ergebnisse wurden davon Hydrolysen mit Säure durchgeführt, wonach Alanin im Papierchromatogramm nachzuweisen war.

Isolierung von Alanin-methylester: 1.1 g Thiophenol und 0.7 g Methylglyoxal wurden, in 20 ccm absol. Alkohol gelöst, mit einem kleinen Überschuß von trockenem Ammoniumacetat versetzt. Die klare Lösung ließ man 12 Stdn. bei 20° stehen, setzte dann Triäthanolamin bis zur deutlich alkalischen Reaktion zu und destillierte das Lösungsmittel i. Vak. ab. Der sirupöse Rückstand lieferte bei der folgenden Destillation i. Vak. ein zwischen 50–70° übergehendes Destillat, das nach nochmaliger Destillation 0.1 g eines bei 60–65° übergehenden Öls gab. Dieses erwies sich im Papierchromatogramm und bei der Papierelektrophorese einheitlich als Alanin-methylester, nach Verseifung mit 2*n* HCl (100°, 5 Stdn.) als Alanin.

98. Muvaffak Seyhan: Notiz über einen Formazykomplex der Benzthiazol-Reihe

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Istanbul]

(Eingegangen am 16. Februar 1955)

Es wird eine neue Formazyilverbindung beschrieben, welche an der Formazan-Kette mit einer Benzthiazolyl-Gruppe substituiert ist und in *o*-Stellung zu dieser Kette eine Carboxy-Gruppe trägt. Die Verbindung liefert mit Uranylacetat einen tieffarbigen Komplex, bei dem eine Koordinationsstelle am Uran-Atom durch ein zweites Formazylmolekül besetzt ist.

Vor kurzem wurden drei Formazyilverbindungen der Pyridin- bzw. der Chinolin-Reihe beschrieben, die mit Uranylacetat tieffarbige Komplexe liefern. Während bei den Urankomplexen der Chinolin-Reihe, nämlich beim Uranyl-(*N*-phenyl-*N'*-[2-carboxy-phenyl]-*C*-[chinolyl-(2)]-formazan)¹) und beim Uranyl-(*N*-phenyl-*N'*-[2-carboxy-phenyl]-*C*-[5.6-benzochinolyl-(2)]-formazan)²), das Uran statt mit sechs nur mit fünf Liganden verknüpft und infolgedessen koordinativ ungesättigt ist, liefert die Formazyilverbindung der Pyridin-Reihe, nämlich das *N*-Phenyl-*N'*-[2-carboxy-phenyl]-*C*-[pyridyl-(2)]-formazan, mit Uranylacetat einen Komplex, bei dem das Uran die Koordinationszahl sechs betätigt, indem eine Koordinationsstelle am Uran-Atom durch ein zweites Formazylmolekül besetzt wird³). Da in allen diesen Formazyilverbindungen nur die am C-Atom der Formazan-Kette substituierte Gruppe verschieden ist, können die Unstimmigkeiten der Koordinationszahlen des

¹³) Th. Wieland u. G. Pfeleiderer, *Angew. Chem.* **67**, [1955], im Druck.

¹) M. Seyhan, *Chem. Ber.* **87**, 397 [1954].

²) M. Seyhan, *Chem. Ber.* **88**, 212 [1955].

³) M. Seyhan, *Chem. Ber.* **87**, 1124 [1954].