

# CHEMISCHE BERICHTE

Fortsetzung der  
BERICHTE DER DEUTSCHEN CHEMISCHEN  
GESELLSCHAFT

91. Jahrg. Nr. 7

S. 1359—1566

HELMUT ZAHN und LUDWIG ZÜRN

## DL-Hydroxylysin und DL-Allohydroxylysin und ihre Lactone<sup>1)</sup>

Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg und dem  
Deutschen Wollforschungsinstitut an der Technischen Hochschule Aachen  
(Eingegangen am 18. Januar 1958)

1. Ein Zwischenprodukt der Hydroxylysin-synthese nach G. VAN ZYL wurde rein dargestellt und im Gegensatz zur Literatur als  $N_\alpha$ -Acetyl- $\alpha$ -carbäthoxy-hydroxylysin- $\delta$ -lacton erkannt. Dessen Verseifung liefert direkt reines Hydroxylysin. 2. Synthetisches Hydroxylysin wurde in Dicarbobenzoxo-hydroxylysin- $\delta$ -lacton übergeführt und die beiden Diastereomeren (*threo*- und *erythro*-Form) durch fraktionierte Kristallisation getrennt. Aus ihnen konnten die bisher noch nicht bekannten Diastereomeren DL-Hydroxylysin und DL-Allohydroxylysin als Monohydrochloride dargestellt und charakterisiert werden. Durch MOORE-STEIN-Analyse wurde eine der beiden Aminosäuren als zum natürlich vorkommenden L-Hydroxylysin gehörig identifiziert: DL-Hydroxylysin-monohydrochlorid. Die andere Aminosäure ist demnach DL-Allohydroxylysin-monohydrochlorid.

In einer früheren Arbeit<sup>2)</sup> wurde Hydroxylysin nach G. VAN ZYL, E. E. VAN TAMELEN und G. D. ZUIDEMA<sup>3)</sup> synthetisiert. Das synthetisch dargestellte Produkt setzt sich aus zwei Racematen, dem DL-Hydroxylysin (die L-Form kommt in der Natur vor) und dem DL-Allohydroxylysin zusammen. Die bisher ausgeführten Arbeiten sind insofern unbefriedigend, als alle Derivate entweder Gemische der beiden Diastereomeren oder Verbindungen unbekannter Zuordnung sind.

Inzwischen haben P. B. HAMILTON und R. A. ANDERSON<sup>4)</sup> mittels Ionenaustauscherchromatographie eine Trennung erreicht und festgestellt, daß synthetisches Hydroxylysin aus etwa 40% DL-Hydroxylysin und 60% DL-Allohydroxylysin besteht.

W. S. FONES<sup>5)</sup> gelang die Auftrennung in die optischen Antipoden auf biochemischem Wege über rund sieben zum Teil wenig ergebnisreiche Stufen. Außerdem erfordert diese Methode zwei verschiedene Fermente und eignet sich daher nicht zur Darstellung größerer Mengen.

<sup>1)</sup> Teil der Diplomarbeit und Dissertat. L. ZÜRN, Univ. Heidelberg, 1955 und 1957.

<sup>2)</sup> H. ZAHN und E. UMLAUF, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **297**, 127 [1954].

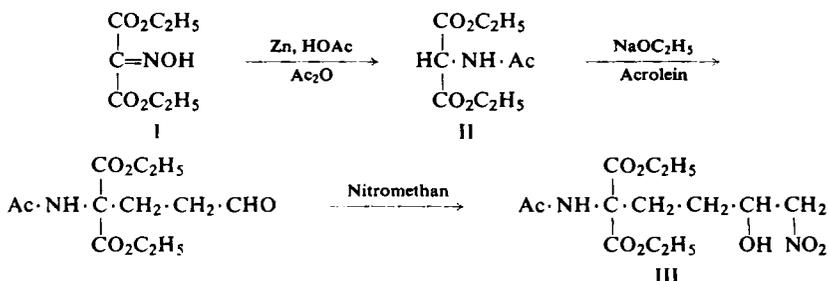
<sup>3)</sup> J. Amer. chem. Soc. **73**, 1765 [1951]. <sup>4)</sup> J. biol. Chemistry **213**, 249 [1955].

<sup>5)</sup> J. Amer. chem. Soc. **75**, 4865 [1953].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine einfache Trennung von synthetischem Hydroxylysin ausgearbeitet und DL-Hydroxylysin und DL-Allohydroxylysin erstmalig präparativ dargestellt.

ÜBER DIE HYDROXYLYSINSYNTHESE NACH G. VAN ZYL UND MITARBB.<sup>3)</sup>

Malonsäure-diäthylester wurde nach C. E. REDEMAN und M. S. DUNN<sup>6)</sup> sowie H. R. SNYDER und C. W. SMITH<sup>7)</sup> in Isonitroso-malonsäure-diäthylester (I) übergeführt, der zur Darstellung von Acetamino-malonsäure-diäthylester (II) diente<sup>7)</sup>. Diese Verbindung wurde nach D. T. WARNER und O. A. MOE<sup>8)</sup> in absol. Äthanol bei Temperaturen zwischen 0 und  $-5^{\circ}$  unter dem Einfluß katalytischer Mengen Natriumäthylat an Acrolein angelagert zum  $\gamma$ -Acetamino- $\gamma,\gamma$ -dicarbäthoxy-butyraldehyd, an den sich Nitromethan unter sorgfältigstem Feuchtigkeitsausschluß<sup>2)</sup> zum Acetamino- $[\delta$ -nitro- $\gamma$ -hydroxy-n-butyl]-malonsäure-diäthylester (III) aldolartig addieren ließ.



Die Schwierigkeit der Hydroxylysinsynthese liegt in der Überführung der Nitrogruppe in III in eine Aminogruppe. Bei der katalytischen Hydrierung mit  $\text{PtO}_2$  entsteht eine amorphe Masse, die sich nicht reinigen läßt<sup>2,3)</sup>. Die anschließende Verseifung und Decarboxylierung zum Hydroxylysin liefert Glutaminsäure, Asparaginsäure, Hydroxylamin und eine Hydroxamsäure als Nebenprodukte aus nicht oder nur unvollständig reduziertem Nitroalkohol<sup>2)</sup>, die sich nur unter großen Verlusten entfernen lassen. Es wurde daher eine Vorschrift zur Hydrierung mit Raney-Nickel unter einem Wasserstoffdruck von 150 at und Temp. von  $20-50^{\circ}$  ausgearbeitet.

Hydrierte man bei höherer Temperatur, so blieben die oben genannten Nebenprodukte zwar völlig aus; chromatographisch wurde aber nachgewiesen, daß dann ein noch nicht identifiziertes Nebenprodukt stärker in Erscheinung trat. Dieses hat in SBA \*) einen kleineren  $R_F$ -Wert als Hydroxylysin ( $R_{\text{Gly}}$  0.05; Hydroxylysin:  $R_{\text{Gly}}$  0.26). Da es bei Hydrierung in größerer Verdünnung oder bei Anwesenheit von Ammoniak stark zurückgedrängt wird, liegt wahrscheinlich ein sek. Amin, entstanden aus 2 Moll. Nitroalkohol (III) vor.

Das nach dieser Arbeitsweise erhaltene hydrierte Produkt konnte zur Kristallisation gebracht und durch Umlösen aus Äthanol/Chloroform analysenrein erhalten werden. Die Analysenwerte stimmten jedoch nicht mit der Formel IV überein, die bisher für dieses Zwischenprodukt der Hydroxylysinsynthese angenommen wurde<sup>2,3)</sup>.

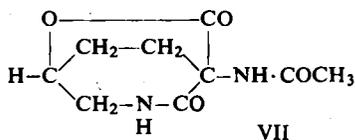
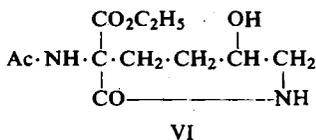
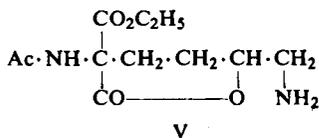
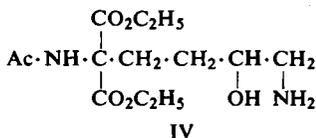
Nach den Analysenzahlen war vielmehr bei der Hydrierung 1 Mol. Äthanol abgespalten worden. Die Entscheidung, ob aus IV das entsprechende  $\delta$ -Lacton (V) oder

6) J. biol. Chemistry **130**, 341 [1939].      7) J. Amer. chem. Soc. **66**, 350 [1944].

8) J. Amer. chem. Soc. **70**, 3918 [1948].

\*) SBA: sek. Butanol/90-proz. Ameisensäure/Wasser (75:15:10).

das  $\epsilon$ -Lactam (VI) als Zwischenprodukt der Hydroxylysin synthese gebildet worden war, wurde durch Bestimmung des Aminostickstoffs nach van Slyke und Synthese einiger Derivate<sup>9)</sup> zugunsten von  $N_\alpha$ -Acetyl- $\alpha$ -carbäthoxy- $\delta$ -hydroxy-lysin- $\delta$ -lacton (V) gefällt.



In geringer Ausbeute wurde beim Umkristallisieren der Verbindung V eine Substanz mit noch höherem Stickstoffgehalt isoliert, die beim Verseifen ebenfalls Hydroxylysin lieferte. Nach der Elementaranalyse liegt  $N_\alpha$ -Acetyl- $\alpha$ -carboxy- $\delta$ -hydroxy-lysin- $\delta$ -lacton- $\epsilon$ -lactam (VII) vor. Der  $R_F$ -Wert in SBA beträgt 0.82. Man kann das Lactam nach dem Chlorverfahren anfärben<sup>10)</sup>, wenn man die Chloreinwirkung auf 15 Min. ausdehnt.

VII hat zwei asymmetrische C-Atome und sollte demnach 4 optisch aktive Formen und zwei Racemate bilden. Da sich die Esterbrücke über den Caprolactamring nur bei *cis*-Stellung der Hydroxy- und Carboxygruppen ausbilden kann, erniedrigt sich die Zahl der möglichen Isomeren auf die Hälfte: eine D-, eine L-Form und das Racemat, welches hier vorliegt. Nimmt man nun an, daß bei der Verseifung mit Salzsäure der Lactonring leichter gespalten und decarboxyliert wird als der Lactamring, so könnte man erhoffen, auf definierte Weise zu demjenigen Hydroxylysin zu gelangen, bei dem die beiden Asymmetriezentren ungleich konfiguriert sind. Da aber bei der Decarboxylierung Racemisierung eintritt, wie J. KENYON und W. A. ROSS<sup>11)</sup> zeigten, erhält man aus VII ein Gemisch von DL-Hydroxylysin und DL-Allohydroxylysin.

Mit den beiden in Substanz isolierten Verbindungen V und VII wurden 91.6% des eingesetzten Nitroalkohols III erfaßt. In den Mutterlaugen wurden papierchromatographisch neben noch vorhandenem V und VII eine weitere chlorpositive und 5 ninhydrinpositive Substanzen mit den  $R_F$ -Werten 0.14, 0.23, 0.35, 0.43, 0.51 und 0.61 in SBA gefunden.

Verseifung und Decarboxylierung des Aminosäure-lactons V erfolgte mit 6 *n* HCl in 12 Std. Das hierbei erhaltene Hydroxylysin-dihydrochlorid war außerordentlich hygroskopisch und wurde in das Monohydrochlorid übergeführt. Die Chlorionen wurden entweder mit Silberoxyd oder mit dem basischen Ionenaustauscher Amberlite IR-4B entfernt und die Lösung bis  $p_H$  6.5 angesäuert. Eine Methode der Aufarbeitung von Gelatinehydrolysaten<sup>4)</sup>, wobei die überschüssige Salzsäure mit Lithiumcarbonat

<sup>9)</sup> H. ZAHN und L. ZÜRN, Biochem. Z., im Druck.

<sup>10)</sup> H. ZAHN und E. REXROTH, Z. analyt. Chem. 148, 181 [1955].

<sup>11)</sup> J. chem. Soc. [London] 1951, 3407.

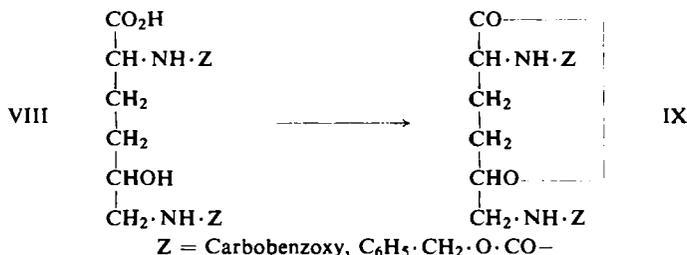
entfernt und das entstandene Lithiumchlorid mit Äther extrahiert wurde, hat sich nicht bewährt, da die Aminosäure hiernach nie ganz salzfrei zu gewinnen ist. Die Ausbeute an chromatographisch reiner Aminosäure betrug 73.8% d. Th., bez. auf V.

TRENNUNG VON DL-HYDROXYLYSIN UND DL-ALLOHYDROXYLYSIN\*)

*N,N'*-Dicarbobenzoxy-DL-hydroxylysin- $\delta$ -lacton und -allohydroxylysin- $\delta$ -lacton

Die Trennung des synthetischen Hydroxylysin in die Diastereomeren gelang durch fraktionierte Kristallisation nicht. Daher stellten wir als leicht zugängliche, gut kristallisierende Verbindung das Dicarbobenzoxy-hydroxylysin (VIII) her. Der  $p_H$ -Wert wurde in Anlehnung an die Darstellung von *N*-Carbobenzoxy-serin<sup>12)</sup> zwischen 9.0 und 9.5 gehalten.

*N,N'*-Dicarbobenzoxy-hydroxylysin (VIII) wandelte sich zum größten Teil in das in gut ausgebildeten rhombischen Plättchen kristallisierende Lacton IX um, wie durch Elementaranalyse und Verseifungszahl sichergestellt wurde.



Diese leichte Lactonbildung ist möglicherweise der Grund, daß bisher noch keine Ester von Hydroxylysin erhalten werden konnten.

Die fraktionierte Kristallisation gelang mit Essigester. Hierbei traten folgende Schwierigkeiten auf:

a) Die beiden Fraktionen haben verschiedene Kristallisationsgeschwindigkeiten; ungünstigerweise kristallisiert die leichter lösliche Form häufig schneller aus.

b) In geringer Menge liegen im Gemisch auch die ringoffenen Formen vor, die in Essigester noch etwas schwerer löslich sind als die beiden Lactone. Eine Form mit dem Schmp. 129° konnte gefaßt werden. Durch MOORE-STEIN-Analyse wurde ihre Zugehörigkeit zur Allo-Reihe festgelegt, es handelt sich also um *N,N'*-Dicarbobenzoxy-DL-allohydroxylysin (VIII).

Die Trennung der Hauptmenge ergab folgende Endfraktionen: Fraktion A (schwerer löslich): Dicarbobenzoxy-DL-allohydroxylysin- $\delta$ -lacton. Schmp. 154–155.5°. Löslichkeit in Essigester bei 18°: 0.50 g/100 ccm.

Fraktion B (leichter löslich): Dicarbobenzoxy-DL-hydroxylysin- $\delta$ -lacton, Schmp. 137–141°. Löslichkeit in Essigester bei 18°: 0.85 g/100 ccm.

Ein Gemisch der beiden Fraktionen schmilzt bei 120–125°.

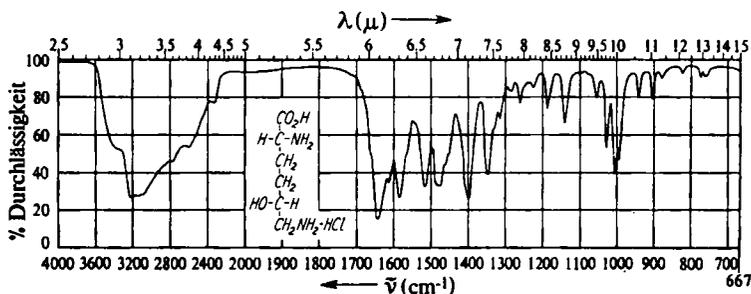
\*) Zur Zuordnung der Diastereomeren vgl. S. 1364.

<sup>12)</sup> J. A. MOORE, J. R. DICE, E. D. NICOLAIDES, R. D. WESTLAND und E. L. WITTE, J. Amer. chem. Soc. 76, 2884 [1954].

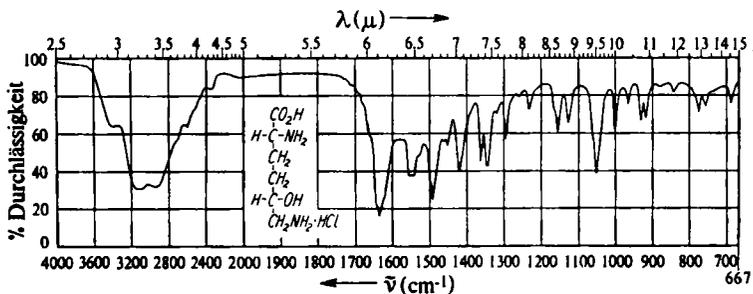
Die Infrarotspektren der beiden Diastereomeren sind außerordentlich ähnlich. Größere Unterschiede treten nur im Gebiet von  $1000-1300\text{ cm}^{-1}$  auf. Beide Diastereomeren zeigen zwei Carbonylbanden. Für gesättigte  $\delta$ -Lactone werden in der Literatur Werte von  $1735$  bis  $1750\text{ cm}^{-1}$  angegeben<sup>13)</sup>, hier findet sich in beiden Fällen  $1735\text{ cm}^{-1}$ . In Übereinstimmung mit RANDALL u. a.<sup>14)</sup>, die für die Amid-I-Bande in Urethanen Werte von  $1700-1735\text{ cm}^{-1}$  angeben, finden wir hierfür bei der normalen Form  $1712\text{ cm}^{-1}$  bzw. bei der Allo-Form  $1702\text{ cm}^{-1}$ . Die Amid-II-Bande (Literatur<sup>15)</sup> bei  $1550\text{ cm}^{-1}$ ) tritt in beiden bei  $1545\text{ cm}^{-1}$  als ausgeprägte Bande auf.

*DL-Hydroxylysin-monohydrochlorid und DL-Allohydroxylysin-monohydrochlorid*

Durch Hydrogenolyse erhielten wir aus den Diastereomeren von VIII zwei verschiedene Hydroxylysine (A und B), die in die Monohydrochloride übergeführt wurden: DL-Allohydroxylysin-monohydrochlorid, Schmp.  $239-241^\circ$ , und DL-Hydroxylysin-monohydrochlorid, Schmp.  $223-227^\circ$ .



Abbild. 1. IR-Spektrum von DL-Allohydroxylysin-monohydrochlorid (KBr-Preßling)



Abbild. 2. IR-Spektrum von DL-Hydroxylysin-monohydrochlorid (KBr-Preßling)

Die beiden Spektren zeigen im ganzen Bereich mehr oder weniger große Unterschiede, lediglich die CO-Banden liegen bei beiden Diastereomeren bei  $1640\text{ cm}^{-1}$ . Bei normalen Aminosäuren werden hierfür in der Literatur<sup>14,16)</sup> Werte von  $1560-1600\text{ cm}^{-1}$  angegeben,

<sup>13)</sup> H. W. THOMPSON, R. R. BRATTAIN, H. M. RANDALL und R. S. RASMUSSEN, in *The Chemistry of Penicillin*, Princeton, University Press, Princeton N. J. 1949, S. 404.

<sup>14)</sup> H. M. RANDALL, R. G. FOWLER, J. R. DANGLE und N. FUSON, *Infrared Determination of Organic Structure*, D. Van Nostrand Co., New York 1948.

<sup>15)</sup> L. J. BELLAMY, *Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution*, Steinkopf-Verlag, Darmstadt 1955.

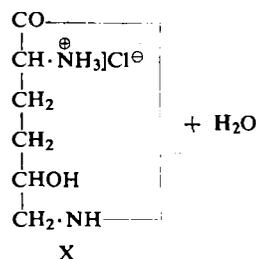
<sup>16)</sup> N. FUSON, M.-L. JOSIEN und R. L. POWELL, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 1 [1952].

doch findet man auch vereinzelt höhere Wellenzahlen, so z. B. beim Sarkosin  $1616\text{ cm}^{-1}$ , oder bei Glutamin und Asparagin, die M. DAVIES und J. C. EVANS<sup>17)</sup> der  $\text{COO}^\ominus$ -Schwingung zuordnen.

*DL-Hydroxylysin- $\epsilon$ -lactam-hydrochlorid-hydrat*

Wie die Darstellung von DL-Hydroxylysin und DL-Allohydroxylysin aus den entsprechenden Dicarbobenzoxy-lactonen zeigt, öffnet sich beim Abhydrieren der Carbobenzoxygruppen in wasserhaltigen Lösungsmitteln der Lactonring. Die Öffnungsgeschwindigkeiten der normalen und der Allo-Form weisen jedoch erhebliche Unterschiede auf. So konnte aus Dicarbobenzoxy-DL-allohydroxylysin- $\delta$ -lacton nur DL-Allohydroxylysin erhalten werden, dagegen entstand aus Dicarbobenzoxy-DL-hydroxylysin- $\delta$ -lacton eine Substanz, die auf dem Papierchromatogramm in SBA etwa dreimal so schnell wandert wie Hydroxylysin. Durch Ausfällen aus wenig eiskaltem Wasser mit Äthanol konnte sie rein erhalten werden. Sie zeigte auf Grund der Analysenergebnisse die gleiche Zusammensetzung wie DL-Hydroxylysin-monohydrochlorid, von dem sie sich jedoch durch einen größeren  $R_F$ -Wert, unterschiedliche Debye-Scherrer-Diagramme und IR-Spektren unterscheidet. Durch van Slyke-Analyse wurde festgestellt, daß nur eine Aminogruppe in freier Form vorliegt. Es kann sich somit nur um ein Hydrat von DL-Hydroxylysin- $\epsilon$ -lactam-hydrochlorid (X) handeln.

In wäßriger Lösung, besonders bei erhöhter Temperatur, ließ sich papyrographisch eine rasche Umwandlung in DL-Hydroxylysin feststellen.



Die ausgeprägte Bande von  $1640\text{ cm}^{-1}$  bei DL-Hydroxylysin-monohydrochlorid ist hier nach  $1675\text{ cm}^{-1}$  verschoben. Ein  $\delta$ -Lacton müßte zwischen  $1735$  und  $1750\text{ cm}^{-1}$  absorbieren; für  $\epsilon$ -Lactame werden dagegen Absorptionen zwischen  $1630$  und  $1680\text{ cm}^{-1}$  angegeben.

Die Bildung des Lactams läßt sich dadurch erklären, daß beim Abhydrieren der Carbobenzoxygruppen primär DL-Hydroxylysin- $\delta$ -lacton entsteht, welches recht beständig ist und nicht wie im Falle von DL-Allohydroxylysin- $\delta$ -lacton sofort in die Aminosäure übergeht. Das Monohydrochlorid von DL-Hydroxylysin- $\delta$ -lacton, welches *basisch* reagiert, wandelt sich durch Acylwanderung vom Sauerstoff zum Stickstoff in das neutral reagierende Hydrochlorid des DL-Hydroxylysin- $\epsilon$ -lactams um.

Zur Sicherung der Formel wurde aus X das Pikrat dargestellt; es kristallisiert in gelben, wasserfreien Nadeln.

ZUORDNUNG DER BEIDEN AMINOSÄUREN ZUR NORMALEN UND ALLO-FORM

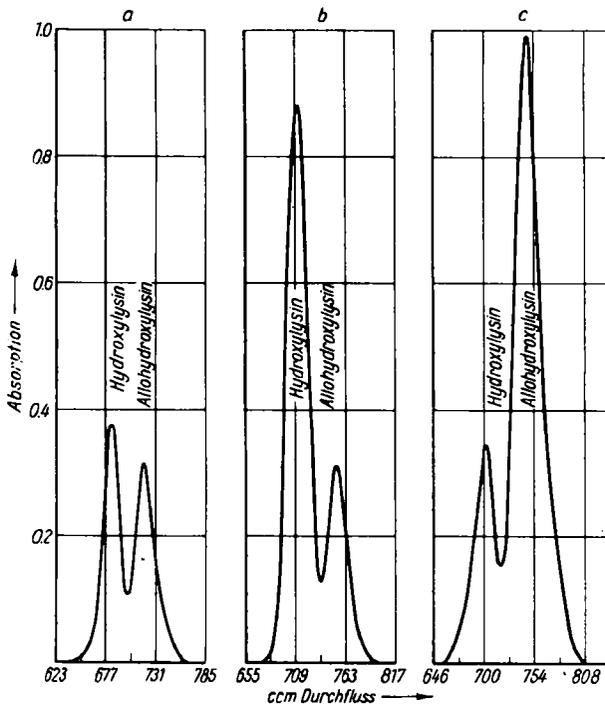
Nach der Trennung des synthetischen Hydroxylysin war noch die Frage zu klären, welche der beiden Substanzen das natürlich vorkommende und welche das Allohydroxylysin ist. Da bisher weder DL-Hydroxylysin noch DL-Allohydroxylysin dargestellt worden waren, konnte ein Vergleich durch Schmelzpunkt, Debye-Scherrer-Diagramm oder IR-Spektrum nicht herangezogen werden. Als Ausweg blieb die Aminosäuretrennung nach MOORE und STEIN.

<sup>17)</sup> J. chem. Soc. [London] 1953, 480.

Man hatte schon mehrfach versucht, derartige Methoden zur Säulentrennung von Hydroxylysin und Allohydroxylysin in Proteinhydrolysaten heranzuziehen. K. A. PIEZ<sup>18)</sup> untersuchte mittels Ionenaustauscherchromatographie ein Gelatinehydrolysat und schloß aus dem asymmetrischen Abfall des Hydroxylysinpeaks auf eine teilweise Trennung der beiden Diastereomeren. Die völlige Trennung, also die Ausbildung zweier Hydroxylysinpeaks, gelang P. B. HAMILTON und R. A. ANDERSON<sup>4)</sup> mit dem Ionenaustauscher Dowex-50 im Milligramm-Maßstab.

Die Analyse einer einzigen reinen Hydroxylysin-Form erwies sich als unzweckmäßig, denn dabei erhielt man nur einen einzigen peak, aus dessen Lage wegen des sehr großen Vorlaufs von über 600 ccm eine exakte Zuordnung zu einer der beiden Formen kaum möglich war. Deshalb wurde als „Leitsubstanz“ synthetisches Hydroxylysin verwendet, dessen Kurve Abbild. 3a zeigt. Ausplanimetrieren der Flächen ergab, daß das hier verwendete Hydroxylysin zu 51% aus normalem und zu 49% aus Allohydroxylysin besteht.

Zu einer Analyse wurden 0.6 mg synthet. Hydroxylysin benötigt. Fügt man nun noch 0.6 mg eines getrennten Hydroxylysin hinzu, vergrößerte man also die Konzentration jeweils einer Komponente auf das Dreifache, so wurde auch bei der Ana-



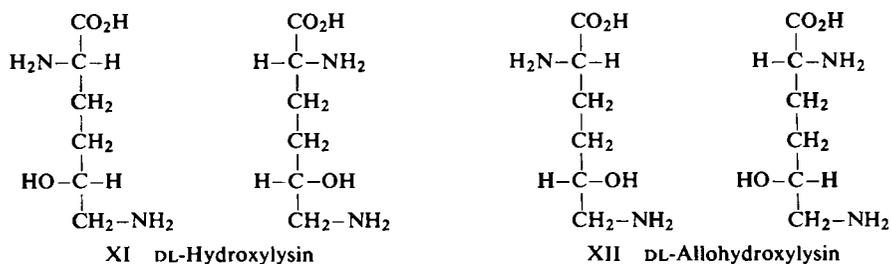
Abbild. 3. Graphische Auswertung der MOORE-STEIN-Analysen von a) Synthet. Hydroxylysin; b) Synthet. Hydroxylysin + DL-Hydroxylysin; c) Synthet. Hydroxylysin + DL-Allohydroxylysin

<sup>18)</sup> J. biol. Chemistry 207, 77 [1954].

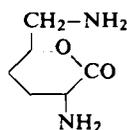
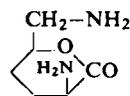
lysenauswertung die Fläche jeweils eines peaks verdreifacht. DL-Hydroxylysin-mono-hydrochlorid mit dem Schmp. 223–227° ergab eine Vergrößerung des ersten peaks und ist daher nach P. B. HAMILTON und R. A. ANDERSON<sup>4)</sup> dem natürlich vorkommen- den L-Hydroxylysin zuzuordnen (Abbild. 3b). Die Form mit dem Schmp. 239–241° erbrachte eine Vergrößerung des zweiten peaks und ist daher als DL-Allohydroxy- lysin-mono-hydrochlorid identifiziert (Abbild. 3c).

Mit diesem Verfahren hat man nun die Möglichkeit, bei allen Hydroxylysinderiva- ten, die sich durch eine nicht epimerisierende Methode (z. B. saure Hydrolyse, Ab- hydrieren von Carbobenzoxygruppen usw.) in die freie Aminosäure überführen lassen, die Zugehörigkeit zur normalen oder Allo-Form festzulegen oder deren Mischungsverhältnis anzugeben. So wurde das ringoffene Dicarbenzoxo-Derivat VIII (Schmp. 129°), welches mit 6 *n* HCl leicht in die Aminosäure übergeht, als *N,N'*- Dicarbenzoxo-allohydroxylysin identifiziert.

Die Benennung Hydroxylysin ist willkürlich gewählt, indem die natürlich vorkom- mende Aminosäure zum Unterschied von Allohydroxylysin als Hydroxylysin be- zeichnet wird. Über die Konfiguration des  $\delta$ -C-Atoms in Bezug auf das  $\alpha$ -C-Atom ist damit nichts ausgesagt. Vor kurzem konnte B. WITKOP<sup>19)</sup> durch Anwendung der Hudsonschen Lactonregel hierzu einen Beitrag leisten. Die Drehung von aus natür- lichem L-Hydroxylysin dargestelltem Dibenzoyl-L-hydroxylysin- $\delta$ -lacton<sup>20)</sup> schlägt bei alkalischer Ringöffnung von rechts nach links um. Demnach ist für natürlich vorkommendes Hydroxylysin die *erythro*-Konfiguration und somit für Allohy- droxylysin die *threo*-Konfiguration anzunehmen.



Ein chemischer Beweis steht noch aus. Eine Stütze erfährt die Witkopsche Annah- me durch unseren Befund, daß das bei der Hydrierung von Dicarbenzoxo-DL-hy- droxylysin- $\delta$ -lacton entstehende DL-Hydroxylysin- $\delta$ -lacton (XIII) durch Wasser sehr viel langsamer zum offenen DL-Hydroxylysin (XI) hydrolysiert wird als das ent- sprechende DL-Allohydroxylysin- $\delta$ -lacton (XIV). Ersteres wandelt sich durch Acyl-

XIII Hydroxylysin- $\delta$ -lactonXIV Allohydroxylysin- $\delta$ -lacton (instabil)

<sup>19)</sup> Experientia [Basel] 12, 372 [1956].

<sup>20)</sup> J. R. WEISGER, J. biol. Chemistry 186, 591 [1950].

wanderung erst in DL-Hydroxylysin- $\epsilon$ -lactam um, welches in Substanz gefaßt und dessen Struktur durch die Synthese eines Derivates sichergestellt wurde. Das Auftreten von DL-Allohydroxylysin- $\epsilon$ -lactam konnte dagegen nicht beobachtet werden. Seine offensichtliche Unbeständigkeit läßt sich durch einen *cis*-substituierten Lactonring XIV deuten, bei dem das  $\alpha$ - und  $\delta$ -C-Atom ungleich konfiguriert sein müssen, wie es B. Witkop postuliert.

#### MONO- UND DIPIKRATE VON DL-HYDROXYLYSIN UND DL-ALLOHYDROXYLYSIN

Pikrate von Hydroxylysin fanden schon mehrfach Verwendung zur Isolierung und Reindarstellung der Aminosäure aus synthetischen Ansätzen. Es konnte aber bis jetzt nicht geklärt werden, ob hierbei die normale oder die Allo-Form bevorzugt auskristallisierte. Die in der Literatur angegebenen Schmelzpunkte variieren stark und sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Zusammensetzung	Schmp.	Zitat
Monopikrat	224–226° (Zers.)	O. TOUSTER <sup>21)</sup>
Monopikrat	227° (Zers.)	J. C. SHEEHAN und W. A. BOLHOFFER <sup>22)</sup>
Monopikrat	235° (Zers.)	H. ZAHN und E. UMLAUF <sup>2)</sup>
Dipikrat	115–130°	J. C. SHEEHAN und W. A. BOLHOFFER <sup>23)</sup>
Dipikrat	123–125°	O. TOUSTER <sup>21)</sup>
Dipikrat	145–150° (Zers.)	J. C. SHEEHAN und W. A. BOLHOFFER <sup>23)</sup> G. VAN ZYL und Mitarbb. <sup>3)</sup>
Dipikrat	195° (Zers.)	J. C. SHEEHAN und W. A. BOLHOFFER <sup>22)</sup>

Um eindeutige Aussagen über die Zugehörigkeit zur normalen oder Allo-Form machen zu können, wurden von DL-Hydroxylysin und DL-Allohydroxylysin jeweils die Mono- und Dipikrate dargestellt, deren Schmelzpunkte aus der folgenden Tabelle ersichtlich sind.

Zusammensetzung	Schmp.
DL-Hydroxylysin-monopikrat	237° (Zers.)
DL-Allohydroxylysin-monopikrat	208–209° (Zers.)
DL-Hydroxylysin-dipikrat	198° (Zers.)
DL-Allohydroxylysin-dipikrat	245–248° (Zers.)

Sowohl die Mono- als auch die Dipikrate der Literatur sind demnach in ihren reinsten Präparaten dem normalen DL-Hydroxylysin zuzuordnen.

Wir danken der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT und dem FONDS DER CHEMIE für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

<sup>21)</sup> J. Amer. chem. Soc. **73**, 491 [1951].

<sup>22)</sup> J. Amer. chem. Soc. **72**, 2472 [1950].

<sup>23)</sup> J. Amer. chem. Soc. **72**, 2469 [1950].

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. *Hydroxylysin*

a)  $N_{\alpha}$ -Acetyl- $\alpha$ -carbäthoxy- $\delta$ -hydroxy-lysin- $\delta$ -lacton (V): Die Lösung von 50 g Acetaminod-nitro- $\gamma$ -hydroxy-*n*-butyl]-malonsäure-diäthylester (III)<sup>2</sup> in 1200 ccm absoll., thiophenfreiem Alkohol wurde mit 1 g wasserfreiem Raney-Nickel versetzt und 12 Stdn. bei Zimmertemp. unter einem Druck von 150 at hydriert. Bei Druckabfall wurde jeweils wieder Wasserstoff nachgepreßt. Nach weiteren 12 Stdn. war die Hydrierung beendet. Die abfiltrierte farb- oder höchstens schwach gelbgrün gefärbte Lösung wurde erst i. Vak. der Wasserstrahlpumpe, dann der Ölpumpe soweit als möglich eingedampft. Die Verbindung erstarrte unter Aufschäumen zu einer glasartigen amorphen Masse. Beim Verreiben mit wenig Chloroform in der Wärme, wobei sich zunächst fast alles löste, schieden sich bald Kristalle ab. Beim Abkühlen erstarrte die Mischung zu einem dichten Kristallbrei, der abgesaugt und mit kaltem Chloroform gewaschen wurde. Schmp. 161° (aus Äthanol/Chloroform). Gut lösl. in Wasser, Alkohol, Aceton. Schwer lösl. in Chloroform, Äther, Petroläther. Ausb. 33,8 g (87,3 % d. Th.).

$C_{11}H_{18}N_2O_5$  (258,2) Ber. C 51,15 H 7,02 N 10,85 Amino-N 5,42  
Gef. C 51,40 H 7,16 N 10,96 Amino-N 5,37

$R_F$ -Wert in SBA aufsteigend 0,72 (Schleicher & Schüll 2043 b). Debye-Scherrer-Aufnahme: (Netzebenenabstände in Å, Intensitäten der Reflexe geschätzt) 10,27 (8); 7,43 (10); 5,27 (6); 4,60 (8); 4,16 (6); 3,81 (5); 3,51 (8); 3,20 (1); 2,97 (3); 2,84 (1); 2,69 (3); 2,61 (1); 2,50 (1); 2,40 (2); 2,31 (1); 2,27 (2); 2,10 (1); 2,04 (2); 1,91 (1); 1,83 (1); 1,68 (1); 1,61 (1); 1,54 (1); 1,51 (1); 1,40 (2); 1,36 (1); 1,30 (2); 1,15 (1).

b)  $N_{\alpha}$ -Acetyl- $\alpha$ -carboxy- $\delta$ -hydroxy-lysin- $\delta$ -lacton- $\epsilon$ -lactam (VII): Beim Umkristallisieren von V erhielt man eine Fraktion, die in Äthanol und Aceton schwerer löslich war als die Hauptmenge. Das aus Äthanol umkristallisierte Produkt sublimierte ab etwa 200° und schmolz bei 267° bei Atmosphärendruck.

$R_F$ -Wert in SBA aufsteigend 0,62 (Schleicher & Schüll 2043 b), entwickelt nach dem Chlorverfahren bei 10–15 min. Einleiten von Chlor. Ausb. 1,4 g (4,3 % d. Th.) (bez. auf III).

$C_9H_{12}N_2O_4$  (212,2) Ber. C 50,94 H 5,70 N 13,20 Amino-N 0  
Gef. C 51,11 H 5,79 N 13,24 Amino-N 0

Debye-Scherrer-Aufnahme: (Netzebenenabstände in Å, Intensitäten der Reflexe geschätzt) 7,90 (9); 6,55 (3); 5,71 (7); 5,00 (10); 4,62 (5); 4,25 (1); 3,89 (6); 3,57 (5); 3,38 (1); 3,20 (4); 3,06 (3); 2,95 (2); 2,65 (diffus); 2,54 (4); 2,46 (1); 2,27 (1); 2,21 (3); 2,10 (3); 2,01 (1); 1,94 (2); 1,86 (3); 1,71 (2); 1,66 (1); 1,58 (1); 1,50 (1); 1,42 (1); 1,38 (1); 1,34 (1); 1,30 (1); 1,25 (1); 1,22 (1); 1,21 (1); 1,19 (1); 1,15 (1); 1,13 (2).

c) *Hydroxylysin-monohydrochlorid (Gemisch)*: 25 g V wurden in 600 ccm 6*n* HCl 12 Stdn. auf siedendem Wasserbad verseift und decarboxyliert. Man ließ einen Tag über Aktivkohle stehen, filtrierte ab und engte i. Vak. bei 60° zum Sirup ein. Durch mehrmaliges Zugeben von Wasser und Abdestillieren i. Vak. wurde der Rückstand von überschüss. Salzsäure befreit, in 250 ccm Wasser gelöst und die Lösung mit frisch bereitetem Silberoxyd bis zu alkalischer Reaktion versetzt. Die nach dem Abfiltrieren des Silberniederschlags in Lösung bleibenden Silberionen wurden mit Schwefelwasserstoff bei 60° gefällt. Nach 1 stdg. Aufbewahren bei Zimmertemperatur über Aktivkohle wurde von Silbersulfid und Schwefel abfiltriert. Durch Einengen auf das halbe Vol. wurde die Lösung von Schwefelwasserstoff

befreit und nach einer weiteren Filtration von etwa gebildetem kolloidalem Schwefel mit verd. Salzsäure auf  $p_H$  6.5 gebracht. Meist schon beim Eindampfen zur Trockne, mit Sicherheit aber nach Zugabe von absol. Äthanol kristallisierte das Hydrochlorid aus und wurde 2mal aus Wasser/Äthanol umkristallisiert. Schmp. 220–222° (Zers.). Ausb. 14.6 g (73.8 % d. Th.) (Lit.<sup>2</sup>): 56.5 %). Aus den Mutterlauge n ließ sich durch Versetzen mit Aceton eine weitere, weniger reine Fraktion gewinnen.

## 2. Trennung des synthet. Hydroxylysin-Gemisches in DL-Hydroxylysin und DL-Allohydroxylysin

a) *N,N'*-Dicarbobenzoxy-hydroxylysin- $\delta$ -lacton (Gemisch): Die Lösung von 11.15 g synthetischem *Hydroxylysin-monohydrochlorid* in wenig Wasser wurde mit 2*n* NaOH auf  $p_H$  9.5 gebracht (Temperatur zwischen +5 und +8°). Unter kräftigem Rühren ließ man langsam *Chlorameisensäure-benzylester* zutropfen, wobei der  $p_H$ -Wert auf 9.0 sank. Durch abwechselnde Zugaben von 2*n* NaOH und insgesamt 30 g *Chlorameisensäure-benzylester* wurde der  $p_H$ -Wert zwischen 9.0 und 9.5 gehalten. Gegen Ende der Reaktion ließ man das  $p_H$  auf 10.0 steigen und rührte noch  $\frac{1}{2}$  Stde. bei +10°, um etwa gebildete *O*-Carbobenzoxy-Verbindungen zu hydrolysieren. Die milchig trübe Flüssigkeit (das Natriumsalz bildet ein Öl) wurde mit verd. Salzsäure auf  $p_H$  3 gebracht und mit Chloroform erschöpfend extrahiert. Beim Eindunsten im offenen Gefäß entstand ein schmieriger Kristallbrei. Aus Äthanol erhielt man weiße Plättchen vom Schmp. 129–130°. Ausb. 13.9 g (60.7 % d. Th.).

$C_{22}H_{24}N_2O_6$ (412.4)	Gef.	C 63.85	H 5.95	N 6.81	Verseif.-Z. 132
	Ber. für Lacton	C 64.06	H 5.87	N 6.79	Verseif.-Z. 136
	Ber. für Carbonsäure	C 61.38	H 6.09	N 6.51	Verseif.-Z. 0

b) *Fraktionierte Kristallisation aus Äthanol*: Es wurde jeweils die Mutterlauge zum Umkristallisieren des Niederschlages der nächsten leichter löslichen Fraktion verwendet, und man erhielt nach dem Dreieckschema schließlich 30 Fraktionen.

$\alpha$ ) *Schwerer lösliche Fraktion: Dicarbobenzoxy-DL-allohydroxylysin- $\delta$ -lacton*. Schmp. 154 bis 155.5°. Löslichkeit in Essigester bei 18°: 0.50 g/100 ccm.

$C_{22}H_{24}N_2O_6$ (412.4)	Ber.	C 64.05	H 5.87	N 6.79	Gef.	C 63.85	H 5.95	N 6.81
------------------------------	------	---------	--------	--------	------	---------	--------	--------

Debye-Scherrer-Aufnahme: (Netzebenenabstände in Å, Intensitäten der Reflexe geschätzt) 6.91 (2); 4.98 (3); 4.62 (2); 4.44–4.23 (10); 4.10 (1); 3.86 (2); 3.50 (6); 3.34 (1); 3.12 (1); 2.93 (0.5); 2.74 (3); 2.49 (2); 2.36 (1); 2.21 (3); 2.06 (1); 1.96 (3); 1.85 (1); 1.72 (2).

$\beta$ ) *Leichter lösliche Fraktion: Dicarbobenzoxy-DL-hydroxylysin- $\delta$ -lacton*. Schmp. 137 bis 141°. Löslichkeit in Essigester bei 18°: 0.85 g/100 ccm.

$C_{22}H_{24}N_2O_6$ (412.4)	Ber.	C 64.05	H 5.87	N 6.79	Gef.	C 64.12	H 6.05	N 6.96
------------------------------	------	---------	--------	--------	------	---------	--------	--------

Debye-Scherrer-Aufnahme: (Netzebenenabstände in Å, Intensitäten geschätzt) 8.05 (1); 7.12 (1); 6.60 (2); 5.97 (4); 5.27 (1); 4.82 (10); 4.25 (10); 3.83 (6); 3.50 (7); 3.32 (1); 3.23 (1); 3.10 (2); 2.95 (4); 2.80 (3); 2.71 (2); 2.57 (1); 2.48 (1); 2.28 (1); 1.99 (1); 1.87 (1); 1.63 (1); 1.59 (1).

$\gamma$ ) *N,N'*-Dicarbobenzoxy-DL-allohydroxylysin, ringoffene Form (VIII): In manchen Fällen konnte aus dem Gemisch eine Fraktion isoliert werden, deren Löslichkeit etwas geringer als die der schwerer löslichen Fraktion  $\alpha$ ) war. Verfilzte Nadeln aus wenig Chloroform. Schmp. 129°.

$C_{22}H_{26}N_2O_7$ (430.5)	Ber.	C 61.38	H 6.09	N 6.51	Gef.	C 61.35	H 6.23	N 6.69
------------------------------	------	---------	--------	--------	------	---------	--------	--------

$R_F$ -Wert in SBA 1, in SBN\*) als Monocarbonsäure 0.4—0.6 (entwickelt nach dem Chlorverfahren).

Debye-Scherrer-Aufnahme: (Netzebenenabstände in Å, Intensitäten der Reflexe geschätzt) 6.79 (1); 5.83 (4); 4.98 (10); 4.57 (3); 4.03 (1); 3.20 (1); 2.93 (2); 2.66 (3); 2.49 (1); 2.31 (1); 1.95 (2); 1.73 (1); 1.57 (1); 1.43 (1).

c) *DL-Hydroxylysin-monohydrochlorid* und *DL-Allohydroxylysin-monohydrochlorid*: 1.2 g *Dicarbobenzoxy-DL-hydroxylysin- $\delta$ -lacton* bzw. *Dicarbobenzoxy-DL-allohydroxylysin- $\delta$ -lacton* wurden in 50 ccm Methanol und 10 ccm Wasser unter Erwärmen gelöst und in Gegenwart von 0.5 g frisch vorbereitetem Palladiummohr etwa 4 Stdn. hydriert. Dann wurde vom Katalysator abfiltriert, mit verd. Salzsäure bis  $p_H$  6.5 angesäuert und die Lösung i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde zur Öffnung des Lactonringes mit 25 ccm Wasser 24 Stdn. bei 50° behandelt, eingedampft und aus Wasser/Äthanol umkristallisiert.

$\alpha$ ) *DL-Hydroxylysin-monohydrochlorid*. Schmp. 223—227° (Zers.).

$C_6H_{14}N_2O_3 \cdot HCl$  (198.6) Ber. C 36.27 H 7.61 Cl 17.87 N 14.13  
Gef. C 36.29 H 7.60 Cl 18.03 N 14.28

Debye-Scherrer-Aufnahme: (Netzebenenabstände in Å, Intensitäten geschätzt) 8.50 (4); 8.05 (7); 4.18 (7); 3.76 (10); 3.50 (1); 3.23 (4); 2.97 (3); 2.80 (8); 2.57 (1); 2.49 (6); 2.46 (2); 2.25 (2); 2.20 (1); 1.96 (1); 1.82 (1); 1.54 (1).

$\beta$ ) *DL-Allohydroxylysin-monohydrochlorid*. Schmp. 239—241° (Zers.).

$C_6H_{14}N_2O_3 \cdot HCl$  (198.6) Ber. C 36.27 H 7.61 Cl 17.87 N 14.13  
Gef. C 36.18 H 7.82 Cl 17.61 N 14.06

Debye-Scherrer-Aufnahme: (Netzebenenabstände in Å, Intensitäten geschätzt) 7.12 (3); 6.19 (1); 5.47 (1); 5.27 (1); 4.62 (4); 3.96 (10); 3.72 (6); 3.47 (6); 3.17 (1); 3.01 (5); 2.86 (4); 2.55 (2); 2.48 (1); 2.36 (3); 2.24 (1); 2.09 (1).

$\gamma$ ) *DL-Hydroxylysin- $\epsilon$ -lactam-hydrochlorid-monohydrat (X)*: Unterläßt man nach der Hydrierung von *Dicarbobenzoxy-DL-hydroxylysin- $\delta$ -lacton* die 24 stdg. Behandlung mit Wasser bei 50° und kristallisiert statt dessen den Rückstand aus wenig eiskaltem Wasser durch Äthanolzugabe um, so erhält man eine in Nadeln kristallisierende, sehr wasserlösl. Substanz. Schmp. 222° (Zers.).

$C_6H_{12}N_2O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$  (198.7) Ber. C 36.27 H 7.61 Cl 17.87 N 14.13  
Gef. C 36.32 H 7.37 Cl 17.91 N 13.67

Amino-N 7.62 (van Slyke)

Debye-Scherrer-Aufnahme: (Netzebenenabstände in Å, Intensitäten der Reflexe geschätzt) 5.15 (4); 4.64 (7); 4.09 (7); 3.68 (7); 3.44 (10); 2.95 (10); 2.76 (3); 2.58 (3); 2.43 (2); 2.25 (2); 2.19 (1); 2.02 (2).

$R_{Hydroxylysin}$ -Wert in SBA (absteigend) 3.2.

*Pikrat*: Schmp. 223° (aus Wasser).

$C_6H_{12}N_2O_2 \cdot C_6H_3N_3O_7$  (373.3) Ber. C 38.61 H 4.05 N 18.76  
Gef. C 38.54 H 3.67 N 18.72

Debye-Scherrer-Aufnahme: (Netzebenenabstände in Å, Intensitäten der Reflexe geschätzt) 7.43 (1); 6.69 (1); 6.14 (7); 4.95 (1); 4.55 (8); 4.18 (8); 3.89 (1); 3.74 (3); 3.43 (10); 3.26 (2); 3.13 (2); 2.94 (3); 2.79 (2); 2.66 (2); 2.49 (2); 2.36 (1); 2.31 (1); 2.08 (1); 1.97 (2); 189 (1).

\*) SBN: sek. Butanol/10-proz. Ammoniak (85:15).

### 3. Moore-Stein-Analyse von DL-Hydroxylysin und DL-Allohydroxylysin

0.6 mg *Hydroxylysin-monohydrochlorid* (Gemisch) wurden in 1 ccm  $n/100$  HCl gelöst und auf eine Dowex-50-Säule  $1 \times 165$  cm von  $p_H$  3.5\*) aufgebracht. Wir eluierten die Substanz mit Phosphatpuffer von  $p_H$  7.5\*\*) bei einer Durchflußgeschwindigkeit von höchstens 5 ccm/Stde. Nach 600 ccm Vorlauf wurde das Eluat mit einem Fraktionssammler in einzelne Fraktionen aufgetrennt, die mittels eines Glassyphons auf ein konstantes Vol. von 2.7 ccm festgelegt waren. Die ersten 100 Fraktionen wurden mit je 2 ccm des Ninhydrinreagenzes nach MOORE und STEIN<sup>24)</sup> versetzt und 30 Min. gleichmäßig auf 100° erhitzt. Die Ausmessung der Ninhydrinfärbung mit dem Elko von ZEISS in 0.5-cm-Quarzküvetten erfolgte nach Abkühlung auf Zimmertemp. spätestens 2 Stdn. nach der Entwicklung. Einzelne Fraktionen, die für das Gerät eine zu große Absorption (800) zeigten, wurden mit 50-proz. Äthanol verdünnt. In den Abbildungen sind jedoch die Werte angegeben, die man ohne Verdünnung erhalten hätte.

### 4. Mono- und Dipikrate von DL-Hydroxylysin und DL-Allohydroxylysin

Darstellung durch Zusammengeben der in möglichst wenig warmem Wasser gelösten stöchiometrischen Mengen Aminosäure-monohydrochlorid und Pikrinsäure. Umkristallisieren aus Wasser oder 30-proz. Äthanol. Durchweg gelbe Nadeln.

Verbindung	Schmp.	Formel, Mol.-Gew.	C	H	N
DL-Hydroxylysin-monopikrat	237° (Zers.)	$C_6H_{14}N_2O_3 \cdot C_6H_3N_3O_7$ (391.3)	Ber. 36.83 Gef. 36.88	4.38 4.46	17.90 17.88
DL-Allohydroxylysin-monopikrat	208–209° (Zers.)	$C_6H_{14}N_2O_3 \cdot C_6H_3N_3O_7$ (391.3)	Ber. 36.83 Gef. 37.06	4.38 4.09	17.90 17.57
DL-Hydroxylysin-dipikrat	198° (Zers.)	$C_6H_{14}N_2O_3 \cdot 2C_6H_3N_3O_7$ (620.4)	Ber. 34.85 Gef. 34.97	3.25 3.45	18.06 18.16
DL-Allohydroxylysin-dipikrat	245–248° (Zers.)	$C_6H_{14}N_2O_3 \cdot 2C_6H_3N_3O_7$ (620.4)	Ber. 34.85 Gef. 34.49	3.25 3.41	

<sup>24)</sup> S. MOORE und W. H. STEIN, J. biol. Chemistry **211**, 907 [1954].

\*) Puffer  $p_H$  3.5: 21.008 g Citronensäure werden mit 200 ccm  $n$  NaOH gelöst und auf 500 ccm Wasser aufgefüllt. Hierzu kommen 110 ccm  $n$  HCl, 390 ccm Wasser und 0.5 ccm Thiodiglykol in weiteren 100 ccm Wasser gelöst.

\*\*) Puffer  $p_H$  7.5: 500 ccm 0.1  $m$   $Na_2HPO_4$  + 450 ccm 0.1  $m$   $NaH_2PO_4$  + 0.1 g Dinatriumversene (Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure) + 1.5 ccm Benzylalkohol auf 100 ccm Wasser aufgefüllt ergibt  $p_H$  6.8. Dieser Puffer wird mit 10-proz. Natronlauge auf  $p_H$  7.5 (Glaselektrode) gebracht.