

Paul Rambacher

Weitere einfache Cystin-Synthesen aus α -Acetamino-acrylsäure oder Serin und Thioharnstoff

Aus dem Forschungslaboratorium des Werkes Pharmazell der Aschaffenburger Zellstoffwerke AG, Redenfelden/Obb.

(Eingegangen am 26. April 1968)

Das aus α -Acetamino-acrylsäure (**4**) oder Serin (**8**) oder α,α -Diacetamino-propionsäure (**7**) mit Thioharnstoff gebildete isolierbare Azlacton **5** wandelt sich durch Behandlung mit Ammoniak, Salzsäure und H_2O_2 in Cystin (**6**) um. Umsetzung von **5** mit NH_4OH/O_2 führt zum isolierbaren Diacetylcystindiamid **9**, das mit Salzsäure ebenfalls Cystin gibt.

Vor kurzem wurde von uns über eine Cystin-Synthese berichtet, die auf der Anlagerung von Thioessigsäure an das in statu nascendi befindliche Azlacton der α -Acetamino-acrylsäure beruht¹⁾. Nun wurde versucht, durch Anlagerung von Thioharnstoff auf ähnlichem Weg zu Cystin zu gelangen.

Die Anlagerung von Thioharnstoff an ungesättigte Mono- und Dicarbonsäuren wurde verschiedentlich untersucht^{2–4)}. Thioharnstoff kann sich dabei, je nach den Reaktionsbedingungen und der Struktur der Säure, zuerst mit der Aminogruppe oder mit der SH-Gruppe in der Isoform anlagern. Ein nachträglicher Austausch des Halogens gegen Ammoniak bei Verwendung ungesättigter Halogencarbonsäuren ist nicht möglich. Dies kann lediglich auf dem Weg über eine Ringschlußreaktion zur 2-Imino-DL-thiazolidin-carbonsäure-(4) geschehen. Wir versuchten daher, aus der α -Acetamino-acrylsäure das Thioharnstoffderivat **2** zu erhalten. Dies gelang weder mit Thioharnstoff noch mit seinem Hydrochlorid. Die Klärung der Struktur der erhaltenen Verbindung steht noch aus. Mit großer Wahrscheinlichkeit erfolgt zuerst die Anlagerung der Aminogruppe unter Bildung eines Thiopyrimidins. Setzt man dagegen α -Acetamino-acrylsäure (**4**) mit Thioharnstoff in Eisessig bei Gegenwart von Acetanhydrid um, so erhält man in sehr guter Ausbeute das Azlacton **5**. Vor der Anlagerung erfolgt offenbar erst der Azlactonringschluß und anschließend die Acetylierung der Aminogruppe des Isothioharnstoffderivates. Das gleiche Azlacton erhält man aus Serin (**8**) und Thioharnstoff in Acetanhydrid. Als Zwischenprodukt muß man das Azlacton der α -Acetamino-acrylsäure annehmen, das durch Wasserabspaltung aus Serin nach erfolgter Acetylierung gebildet wird.

¹⁾ P. Rambacher, Chem. Ber. 101, 2595 (1968).

²⁾ H. Erlenmeyer und F. Heitz, Helv. chim. Acta 25, 832 (1942).

³⁾ R. Andreasch, Mh. Chem. 16, 789 (1895); 18, 56 (1897).

⁴⁾ H. Behringer und P. Zillikens, Liebigs Ann. Chem. 574, 140 (1951).

Zur Herstellung der Acetaminoacrylsäure **4** benötigt man nach *Bergmann* und *Grafe*⁵⁾ α,α -Diacetamino-propionsäure (**7**), die aus Brenztraubensäure und Acetamid zugänglich ist. Wie wir feststellten, hängt das Gelingen der Kondensation von der Dimensionierung des Rückflußkühlers ab, der so bemessen sein soll, daß beim Kochen im Vakuum zwar die Brenztraubensäure kondensiert wird, das gebildete Wasser aber entweichen kann. Deshalb ist auch das Arbeiten mit einem großen Überschuß an Brenztraubensäure notwendig. Zweckmäßiger ist, das Reaktionswasser ohne Vakuum mit Toluol als Schlepptmittel azeotrop zu entfernen und nur äquimolare Mengen Brenztraubensäure und Acetamid einzusetzen. Die Ausbeute beträgt dann 82–83 %.

Man kann das Azlacton **5** auch vom Cystein aus aufbauen. *Andreasch*⁶⁾ hatte gezeigt, daß Thioglykolsäure mit Cyanamid auch in wäßriger Lösung unter Bildung des *S*-Carboxymethyl-isothioharnstoffs reagiert. Wir erhielten aus *N*-Acetyl-cystein (**1**) mit Dinatriumcyanamid in wäßr. Lösung im pH-Bereich zwischen 7 und 9 das Isothioharnstoffderivat **2**, das man wohl am besten als inneres Isothiuroniumsalz formuliert. Beim Behandeln mit Acetanhydrid geht es in das Azlacton **5** über.

Eine weitere Möglichkeit der Herstellung des Azlactons **5** bot die Umsetzung von α,α -Diacetamino-propionsäure (**7**) mit Thioharnstoff in Eisessig und Acetanhydrid. Auch diese Reaktion dürfte intermediär über die Acetaminoacrylsäure **4** ablaufen.

Der Azlactonring der Verbindung **5** kann mit $2n$ HCl in der Kälte geöffnet werden, wobei gleichzeitig die Acetylgruppe an der Aminogruppe des Isothioharnstoffs abgespalten wird. Man erhält das Isothiuroniumsalz **2**.

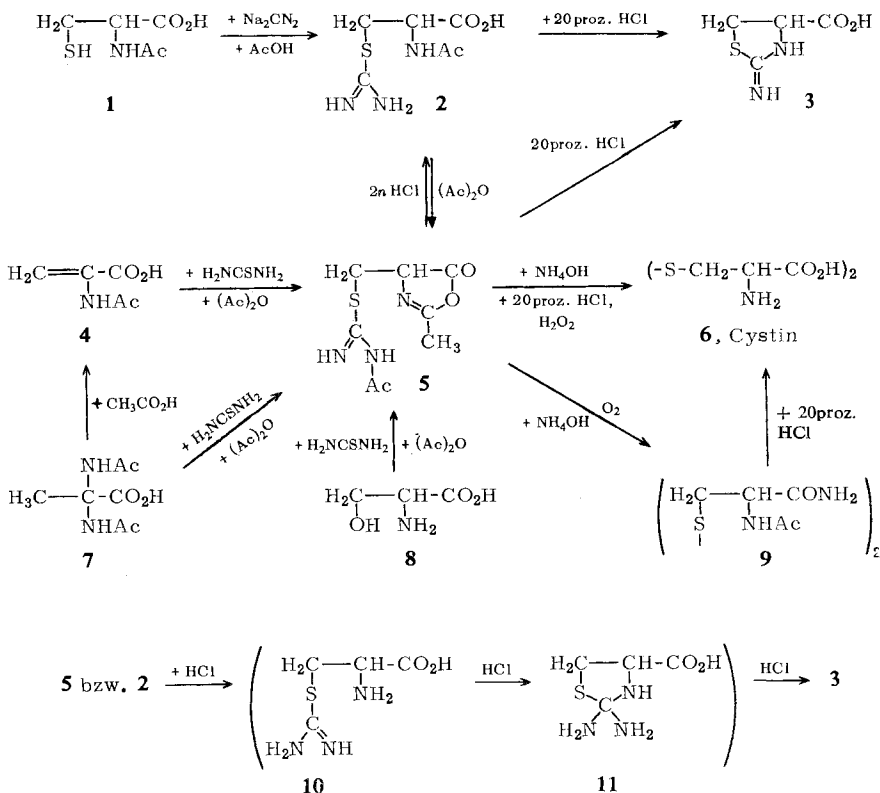
Kocht man dagegen das Azlacton **5** oder das Isothiuroniumsalz **2** mit 20proz. Salzsäure unter Rückfluß, so erhält man 2-Imino-thiazolidin-carbonsäure-(4) (**3**). *Doherty*⁷⁾ hat für die Umlagerung des *S*-[β -Amino-äthyl]-isothioharnstoffs in das 2-Imino-thiazolidin das Auftreten des 2,2-Diamino-thiazolidins als Zwischenprodukt diskutiert. Wir nehmen an, daß in unserem Fall das Azlacton **5** oder Isothiuroniumsalz **2** zunächst völlig zum Isothioharnstoffderivat **10** entacetyliert wird. Durch intramolekulare Addition entsteht aus **10** intermediär die 2,2-Diamino-DL-thiazolidin-carbonsäure-(4) (**11**), aus der durch Ammoniakabspaltung die Thiazolidinsäure **3** gebildet wird. Die benachbarte Carboxylgruppe behindert also die Ringschlußreaktion und die Ammoniakabspaltung nicht.

Völlig anders verläuft die Einwirkung von konz. wäßr. Ammoniak auf das Azlacton **5**. Unter Öffnung des Azlactonrings und unter gleichzeitiger Abspaltung des Cyanamidrestes wird nach Dehydrierung das Amid **9** gebildet. Dies kann dann durch saure Hydrolyse in inaktives Cystin (**6**) übergeführt werden. Man kann natürlich auch auf die Isolierung des Amids **9** verzichten und das Azlacton **5** nacheinander mit wäßr. Ammoniak und 20proz. Salzsäure behandeln, um dann zu **6** zu dehydrieren. Auch das Isothiuroniumsalz **2** gibt, einer solchen Behandlung unterworfen, wieder Cystin. Das auf diese Weise erhaltene inaktive Cystin zeigt alle dafür charakteristischen Reaktionen und kann in die früher beschriebenen Derivate übergeführt werden¹⁾.

5) *M. Bergmann* und *K. Grafe*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **187**, 183 (1930).

6) *R. Andreasch*, Ber. dtsh. chem. Ges. **13**, 1421 (1880).

7) *D. G. Doherty*, *R. Shapira* und *W. T. Burnett jr.*, J. Amer. chem. Soc. **79**, 5667 (1957).



Die Elementaranalysen wurden vom Lab. Ilse Beetz, Kronach, ausgeführt, die übrigen analytischen Arbeiten durch Frau *M. Krause* und Frau *E. Stranzinger*, wofür hier gedankt sei.

Beschreibung der Versuche

1) Azlacton **5** des *S*-[β -Acetamino- β -carboxy-äthyl]-*N*-acetyl-isothioharnstoffs

a) Aus α -Acetamino-acrylsäure (**4**) und Thioharnstoff: 10.0 g **4** und 5.9 g Thioharnstoff werden in einer Mischung von 30 ccm Eisessig und 15 ccm Acetanhydrid unter Zusatz von einigen Tropfen Pyridin auf 80–90° erwärmt. Bereits in der Hitze scheiden sich nadelförmige Kristalle ab. Nach 3 stdg. Nachreaktion beträgt die Ausb. 11.4 g (72%). Schmp. 222.5–223.5° (Zers.).

b) Aus Serin (**8**) und Thioharnstoff: 106 g (1 Mol) *DL*-Serin werden zusammen mit 76.5 g Thioharnstoff in 500 ccm Acetanhydrid suspendiert und unter Zusatz einiger Tropfen Pyridin auf 75° erwärmt. Die einsetzende exotherme Reaktion wird bei 80° 3 Stdn. lang gehalten. Bereits in der Wärme scheiden sich nadelförmige Kristalle ab. Man verdünnt mit Wasser und trennt von den ausgeschiedenen Kristallen ab, die mit Wasser und Aceton gewaschen werden, Ausb. 76.5 g (33.4%). Schmp. 216–218.5° (Zers.).

c) Aus Isothioharnstoff **2**: 10 g **2** werden mit 40 ccm Acetanhydrid im Wasserbad auf 60° erwärmt und über Nacht stehengelassen. Dann wird auf eine Mischung von 30 g Eis und 100 ccm Wasser gegossen und 1 Stde. nachgerührt. Man erhält nadelförmige Kristalle. Ausb. 10 g (89.6%). Schmp. 221–222.5° (Zers.).

d) *Aus a.a-Diacetamino-propionsäure (7) und Thioharnstoff*: 9.5 g **7** werden zusammen mit 3.8 g *Thioharnstoff* in 20 ccm *Eisessig* und 15 ccm *Acetanhydrid* unter Zusatz einiger Tropfen *Pyridin* ca. 10 Min. auf 110—120° erhitzt. Nach längerem Stehenlassen und Reiben mit dem Glasstab erhält man zu Büscheln vereinigte Nadeln, die nach Verdünnen mit 100 ccm Wasser abtrennen und gewaschen werden. Ausb. 2.9 g (24.8%). Schmp. 218—221° (Zers.).

Das Azlacton ist unlöslich in kaltem und schwerlöslich in heißem Wasser. In den gebräuchlichen org. Lösungsmitteln ist es extrem schwerlöslich. In konz. Salzsäure ist es löslich, kann jedoch nicht wieder durch Neutralisation abgeschieden werden. In konz. wäßr. Ammoniak löst es sich verzögert. Die Lösung zeigt stark positive SH-Reaktion.

$C_8H_{11}N_3O_3S$ (229.3) Ber. C 41.91 H 4.84 N 18.33 S 13.98
Gef. C 41.75 H 4.62 N 18.29 S 13.70

2) *DL-S-[\beta-Acetamino-\beta-carboxy-äthyl]-isothioharnstoff (2)*

a) *Aus DL-N-Acetyl-cystein (1)*: Zu 32.6 g **1** in einer Mischung von 150 ccm Wasser und 20 ccm *Eisessig* gibt man bei ca. 0° portionsweise 20 g *Dinatriumcyanamid*. Die Temp. wird auf 10° gehalten. Sobald alles Dinatriumcyanamid gelöst ist, wird mit wenig konz. *Natronlauge* auf pH 8 eingestellt. Bei der nun einsetzenden Anlagerungsreaktion wird Alkali frei, das laufend mit *Eisessig*, unter Beibehaltung von pH 8, abgefangen wird. Die anfänglich schwach rote Färbung der Lösung verschwindet. Nach kurzer Zeit scheiden sich abgestumpfte Nadeln in großer Menge ab. Sie werden mit wenig Wasser und Aceton gewaschen. Ausb. 38 g (92%).

b) *Aus Azlacton 5*: 20 g **5** werden in 80 ccm 2*n HCl* suspendiert und kalt gerührt. Nach 3—4 Stdn. tritt Lösung ein. Nach Rühren über Nacht wird i. Vak. eingedampft, der Rückstand mit 20 ccm Wasser aufgenommen und mit konz. wäßr. *Ammoniak* auf pH 4.5—5 gestellt. Nach mehrstdg. Stehenlassen im Eisschrank erhält man 5.6 g (31.9%) stumpfe, prismatische Nadeln.

Das Isothioharnstoffderivat **2** kommt aus der 40fachen Menge Wasser in groben, prismenförmigen Nadeln, die bei 192—193° (Zers.) schmelzen, unlöslich in Äthanol und Aceton sowie den meisten org. Lösungsmitteln.

$C_6H_{11}N_3O_3S$ (205.2) Ber. C 35.11 H 5.40 N 20.47 S 15.62
Gef. C 34.95 H 5.37 N 20.13 S 15.50

3) *2-Imino-DL-thiazolidin-carbonsäure-(4) (3)*

a) *Aus dem Isothioharnstoffderivat 2*: 20 g **2** werden mit 40 ccm 20proz. *Salzsäure* 1 Stde. unter Rückfluß gekocht, die Lösung i. Vak. eingedampft und der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen. Nach Einstellen auf pH 5 mit *Ammoniak* kristallisieren feine, rechteckige Blättchen mit abgeschrägten Ecken aus, charakteristisch für **3**. Über Nacht fallen 11 g **3** mit einem Kristallwassergehalt von 26.8 % (= 3 Moläquivv.). Schmp. der wasserfreien Verbindung 208—211° (Zers.). Aus der Mutterlauge lassen sich durch *Kupferacetat* bei pH 5 noch weitere 2.5 g des *Kupfersalzes* von **3** abscheiden.

b) *Aus Azlacton 5*: 11.4 g **5** werden in 20 ccm 20proz. *Salzsäure* 1 Stde. unter Rückfluß gekocht. Die eingedampfte Lösung wird mit wenig Wasser aufgenommen, mit *Ammoniak* auf pH 5 gebracht, wobei die für **3** charakteristischen feinen Blättchen abgeschieden werden. Wassergehalt 26.8 % (3 Moläquivv. Kristallwasser). Ausb. 6.1 g; wasserfreie Subst.: Schmp. 209—210° (Zers.). Aus der Mutterlauge lassen sich weitere 1.3 g als *Kupfersalz* abscheiden.

$C_4H_6N_2O_2S \cdot 3H_2O$ (200.2) Ber. N 13.99 S 16.02 Gef. N 13.91 S 15.72

4) *N,N'*-Diacetyl-cystindiamid (9): 36.5 g *Azlacton 5* werden mit 350 ccm konz. wäbr. *Ammoniak* im unverschlossenen Gefäß gerührt. Nach kurzer Zeit tritt Lösung ein. Im Verlauf von 3 Tagen scheiden sich zu Büscheln vereinigte Blättchen ab, die mit Wasser und Aceton gewaschen werden. Sie sind praktisch unlöslich in Wasser, Aceton, Äthanol und den gebräuchlichen organ. Lösungsmitteln. Ausb. 12.8 g. Aus der Mutterlauge können nach Oxydation mit *Wasserstoffperoxid* bis zur negativen SH-Reaktion noch 1.5 g der gleichen Verbindung erhalten werden, Gesamtausb. 55.6%. Zur Reinigung werden 5 g Rohprodukt in 25 ccm konz. Salzsäure gelöst, 25 Min. gerührt und mit 160 ccm Wasser verdünnt. Nach Einstellen auf pH 3–4 mit festem Natriumacetat kristallisieren dünne, rautenförmige Blättchen, über Nacht 4.2 g 9, Schmp. 238–240° (Zers.). Mit alkalischer Plumbitlösung tritt bereits in der Kälte Schwarzfärbung ein. Mit Nitroprussidnatrium erhält man bei Gegenwart von Kaliumcyanid eine positive SH-Reaktion.

$C_{10}H_{18}N_4O_4S_2$ (322.4) Ber. C 37.25 H 5.63 N 17.38 S 19.89

Gef. C 37.10 H 5.76 N 17.07 S 19.64

5) *Inaktives Cystin* (6)

a) Aus *N,N'*-Diacetyl-cystindiamid (9): 5.0 g 9 werden in 50 ccm 20proz. *Salzsäure* 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht, die Lösung i. Vak. eingedampft und der Rückstand mit 50 ccm Wasser aufgenommen. Mit festem *Natriumacetat* wird auf pH 4.5 eingestellt. Schon während der *Natriumacetat*zugabe fällt *inaktives Cystin* in kugelförmigen Kristallen aus. Die Fällung wird durch Zusatz von Aceton und Rühren über Nacht vervollständigt. Ausb. 3.7 g (99.4%), uncharakteristische Zers. über 235°.

b) Aus *Azlacton 5*: 36.5 g 5 werden mit 350 ccm konz. wäbr. *Ammoniak* über Nacht gerührt und die Mischung anschließend i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wird in 500 ccm 20proz. *Salzsäure* aufgenommen, die Lösung 1 Stde. unter Rückfluß gekocht und erneut eingedampft. Nach Aufnahme in ca. 200 ccm Wasser wird mit *Wasserstoffperoxid* bis zur negativen SH-Reaktion versetzt. Durch *Natriumacetat*zusatz wird auf pH 4.5 gestellt. Ausb. 12.8 g (66.7%) *inaktives Cystin* in kugelförmigen Kristallen, uncharakteristische Zers. über 230°.

6) α,α -Diacetamino-propionsäure (7): 88.06 g (1 Mol) *Brenztraubensäure*, frisch dest., und 118 g (2 Mol) *Acetamid* werden in 250 ccm Toluol suspendiert und unter Rühren über einem Wasserabscheider unter Rückfluß gekocht. *Brenztraubensäure* und *Acetamid* bilden eine Schmelze, die im siedenden Toluol suspendiert ist. Bei 140–150° Badtemp. haben sich nach 3 Stdn. 18 ccm Wasser abgeschieden. Die Suspension scheidet reichlich Kristalle ab, von denen dekantiert wird. Der Rückstand wird mit Äthanol verrührt. Nach Stehenlassen über Nacht erhält man 107 g (82.8%) 7, Schmp. 191.2°, Äquiv.-Gew. ber. 188.2, gef. 186.8.

[171/68]