

Hydrogénation directe de l'eucarvone en tétrahydro-eucarvone. 9,0 g d'eucarvone, 25 cm³ d'alcool, 1 g de nickel de *Raney*, agités dans l'hydrogène à 20° et sous 729 mm, ont absorbé en 105 minutes 2980 cm³ H₂ (calculé 2950 cm³) dont 50% en 48 min.; 75% en 72 min. et 90% en 96 minutes. Le produit, distillé, était homogène et possédait sensiblement les mêmes caractères physiques que la préparation précédente:

$$E_{1,3} = 44-45^{\circ}; d_4^{20} = 0,9064; n_D^{20} = 1,4556.$$

RÉSUMÉ.

L'hydrogénation de l'eucarvone, en solution alcoolique, à 20° et à la pression atmosphérique, au contact du nickel de *Raney*, conduit, dans une première étape, à la cétone α -éthénique: la β -dihydro-eucarvone de *Wallach*. L'hydrogénation se poursuit, après l'accomplissement de cette première étape et dans les mêmes conditions, sans différence sensible de la vitesse de réaction, et livre la tétrahydro-eucarvone.

Laboratoires de Recherches de *L. Givaudan & Cie, S. A.*
Vernier-Genève.

45. Eine einfache enzymatische Methode zur Herstellung von D- und L-Methionin

von *M. Brenner* und *V. Kocher*.

(27. XII. 48.)

Die L-Komponente des DL-Methionin-isopropylesters wird durch Pankreatinpräparate teils verseift und teils in schwerlösliche Kondensationsprodukte umgewandelt¹⁾. Der mengenmässige Anteil der letzteren am Gesamtreaktionsprodukt hängt von der Qualität des angewandten Fermentes ab. Er lässt sich zugunsten der Bildung von freiem L-Methionin auf ein Minimum reduzieren. Die D-Komponente des Esters wird durch das Ferment nicht merklich verändert. Sie lässt sich leicht vom L-Methionin abtrennen und zum D-Methionin verseifen.

Wir haben diese Reaktion zur präparativen Herstellung von D- und L-Methionin herangezogen. Sie liefert die Antipoden in Rohausbeuten von 80–90% (bezogen auf angewandten racemischen Ester). Der Racemisierungsgrad der Rohprodukte beträgt etwa 10%. Ihre Reinigung erfolgt nach der beim Tryptophan erprobten „Nasylat-

¹⁾ *M. Brenner* und *V. Kocher*, Exper. 4, 73 (1948).

methode¹⁾. Man erhält die reinen Antipoden in Ausbeuten von 40—50% (bezogen auf angewandtes DL-Methionin).

Das verwendete Fermentpräparat ist ein technisches Pankreas-Enzym der Firma *J. R. Geigy AG.*, Basel²⁾. Es kann durch „*Difco-Trypsin* 1 : 250“³⁾, „*Difco-Pangestin* 1 : 75“³⁾, „Pankreatin Hochkonzentrat, roh“ (*Schweiz. Ferment AG.*, Basel) und andere Handelsprodukte ersetzt werden, welche sich in ihrer Wirkung auf die Verseifung des L-Esters beschränken. Die günstigsten Reaktionsbedingungen sind jeweils durch Vorversuche zu ermitteln.

An Stelle des Isopropylesters können auch andere Ester, z. B. der n-Butyl-, i-Butyl-, n-Propyl- oder Äthylester der fermentativen Verseifung unterworfen werden. Wir haben den Isopropylester gewählt, weil er weniger zu spontanen Veränderungen neigt als die Ester der primären niedermolekularen Alkohole⁴⁾ und eine hervorragende Affinität zum Ferment besitzt.

Die vorliegende Methode liefert D- und L-Methionin in ungefähr gleichen Mengen. Die „unnatürliche“ D-Form interessiert aber im allgemeinen weniger als die „natürliche“ L-Form. Es gelang nun, den bei der Gewinnung von L-Methionin anfallenden D-Ester mit guter Ausbeute vollständig zu racemisieren und auf diese Weise wieder verwendungsfähig zu machen. Die Racemisierung erfolgt bei 100—130° in Gegenwart katalytischer Mengen von Natriumisopropylat und CO₂ (evtl. auch CS₂). Es ist hierbei notwendig, dass das Natrium in bezug auf das CO₂ in einem stöchiometrischen Überschuss vorhanden ist. Versuche zur Abklärung dieser interessanten Reaktion sind im Gange⁵⁾.

Wir danken der *J. R. Geigy AG.* in Basel für die Unterstützung dieser Arbeit und Herrn *H. R. Rickenbacher* für seine Hilfe bei der Durchführung einiger Versuche.

Experimenteller Teil.

Die Schmelzpunkte wurden auf dem *Kofler-Block* bestimmt und sind korrigiert. Fehlergrenze $\pm 2^\circ$.

I. DL-Methionin-isopropylester.

Man sättigt ein Gemisch von 100 g DL-Methionin und 500 cm³ absolutem Isopropylalkohol mit trockenem HCl-Gas, kocht 30 Minuten am Rückfluss und entfernt den Alkohol im Vakuum (Bad 50—60°). Der Prozess wird nach Zusatz von 500 cm³ frischem Isopropylalkohol wiederholt. Der Rückstand wird mit einem Spatel aufgelockert, mit 200 cm³ Wasser und 500 cm³ Äther übergossen, das Gemisch auf -10° abgekühlt und unter kräftigem Rühren und ständiger Kühlung mit 25-proz. wässrigem Ammoniak eben schwach phenolphthaleinalkalisch gestellt. Eine entstandene Fällung wird abfiltriert, mit Äther gewaschen und verworfen. Man trennt das Filtrat im Scheidetrichter, extrahiert die wässrige Phase nach Sättigung mit NaCl mehrmals mit frischem Äther, trocknet die

1) *M. Brenner, E. Säiler und V. Kocher, Helv. 31, 1908 (1948).*

2) „Enzymhochkonzentrat“ mit einer Aktivität von ca. 35000 „*Geigy-Einheiten*“ pro kg. Das Produkt ist uns von der Firma *Geigy* in freundlicher Weise zur Verfügung gestellt worden.

3) *Difco Laboratories, Inc., Detroit, Michigan.*

4) Versuche der Herren *K. Menzi* und *W. Thommen* im hiesigen Laboratorium; vgl. ferner *Aberhalden* und *Suzuki, Z. physiol. Ch. 176, 101 (1928).*

5) Vgl. eine spätere Abhandlung.

vereinigten Ätherlösungen und destilliert. Ausbeute 112 g Ester (87%), Kp. $_{11\text{ mm}}$ 127—129°. Eine Probe wurde ein zweites Mal destilliert und die Mittelfraktion analysiert:

4,142 mg Subst. gaben 7,690 mg CO₂ und 3,378 mg H₂O
 C₈H₁₇O₂NS (191,28) Ber. C 50,23 H 8,96% Gef. C 50,66 H 9,13%
 Dichte: $\rho_{18^\circ} = 1,0289$

II. Charakterisierung der Methionin-Nasylate.

Die Salze kristallisieren aus der heissen Lösung von 1 mMol Methionin und 1,2 mMol Naphtalin- β -sulfosäure in 1,2 cm³ 1-n. Salzsäure (kratzen!). Reinigung durch Umkristallisieren aus der drei- bis vier-fachen Menge Wasser. Zur Analyse wird im Hochvakuum bei 60—80° getrocknet.

- DL-Salz: Schmelzpunkt von intakten Krystallen: 187—190°
 Schmelzpunkt von zerriebenen Krystallen: 176—185°
 3,779 mg Subst. gaben 6,953 mg CO₂ und 1,852 mg H₂O
 C₁₅H₁₉O₅NS₂ (357,43) Ber. C 50,40 H 5,36% Gef. C 50,21 H 5,48%
- D-Salz: Schmelzpunkt von intakten Krystallen: 203—205°
 Schmelzpunkt von zerriebenen Krystallen: 181—191°
 Mischprobe mit DL-Salz (zerrieben): 150—176°
 4,014 mg Subst. gaben 7,369 mg CO₂ und 1,920 mg H₂O
 C₁₅H₁₉O₅NS₂ (357,43) Ber. C 50,40 H 5,36% Gef. C 50,10 H 5,35%
 $[\alpha]_D^{19,5} = -15,60 \pm 0,20$ ($c = 5$ in trockenem Methylcellosolve)
- L-Salz: Es zeigt dieselben Schmelzpunkte wie das D-Salz und denselben Drehwert mit umgekehrtem Vorzeichen.

III. Herstellung von D- und L-Methionin.

Das erwähnte technische Pankreasenzym der Firma *J. R. Geigy AG.*, mit dem die vorliegenden Versuche durchgeführt worden sind, kann direkt, d. h. in Substanz oder in Form eines wässrigen Auszuges, verwendet werden. Eine Reinigung durch Umfällen mit Ammonsulfat ist jedoch empfehlenswert. 30 g „Enzymhochkonzentrat“ werden während einiger Stunden mit 150 cm³ kaltem Wasser digeriert und der Extrakt durch Filtration oder auf der Zentrifuge geklärt. Man versetzt die Lösung (140 cm³) portionenweise unter Rühren mit insgesamt 95 g Ammonsulfat, dekantiert die resultierende Ferment-suspension von ungelöstem Ammonsulfat ab und filtriert durch eine grosse Nutsche. Das zurückbleibende Ferment wird zweimal mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, scharf abgesaugt, im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet und gemahlen. Ausbeute 4 g. Das gereinigte Produkt wird im folgenden kurz als „Ferment“ bezeichnet. Es ist monatelang haltbar.

100 g DL-Methionin-isopropylester werden mit der Lösung von 2 g „Ferment“ in 100 cm³ Wasser versetzt und in einem mit Natronkalk-Rohr versehenen Gefäss unter langsamem Rühren bei 20° sich selbst überlassen. Das Reaktionsgemisch erstarrt im Verlauf einiger Stunden (Rührer abstellen). Nach insgesamt 48 Stunden — ein Kontrollversuch ohne Ferment bleibt während dieser Zeit unverändert — werden 260 cm³ Äther-Alkohol (1 : 1) zugesetzt und während 3—4 Stunden mit der Reaktionsmasse verührt. Man saugt durch eine geräumige Nutsche vorsichtig ab, deckt den Rückstand in mehreren Portionen mit insgesamt 130 cm³ Äther-Alkohol (1 : 1) und schliesslich mit 70 cm³ Äther. Das Produkt wird im Vakuum vom Äther befreit, gemahlen und im *Soxhlet*-Apparat nochmals über Nacht mit Äther extrahiert. Trockengewicht 36 g. Ausbeute an rohem L-Methionin nach Abzug von 2 g Fermentsubstanz: 34 g (87% der Theorie). Sämtliche

Alkohol-Äther- und Ätherlösungen werden vereinigt und im Vakuum eingeengt. Der ölige Rückstand enthält D-Ester, etwas Wasser und geringe Mengen noch nicht näher untersuchter Umwandlungsprodukte des L-Esters. Das Öl wird deshalb vor der Destillation nochmals in 250 cm³ Äther aufgenommen, von nunmehr ausfallenden Reaktionsprodukten abfiltriert, von abgeschiedenem Wasser abgetrennt und über Natriumsulfat getrocknet. Durch Destillation erhält man 40 g D-Ester, Kp._{11 mm} 126—128°, $[\alpha]_D^{18} = +7,64^{\circ}$ (unverdünnt)¹⁾.

D-Methionin.

60 g D-Methionin-isopropylester werden zur Verseifung mit 420 cm³ 2-n. Salzsäure 2 Stunden am Rückfluss gekocht. Zur heissen Lösung fügt man 90 g Naphtalin- β -sulfosäure-trihydrat, löst die Sulfosäure durch kurzes Aufkochen, impft möglichst heiss mit etwas reinem D-Methionin-nasylat an und lässt vor rascher Abkühlung geschützt über Nacht erkalten. Der resultierende Krystallkuchen wird auf einer Nutsche ausgepresst, so dass die Mutterlauge sofort abfliessen kann, und schliesslich mit Eiswasser gewaschen. Eine nochmalige Krystallisation aus der 3-fachen Menge Wasser (heiss impfen) liefert praktisch reines, konstant drehendes D-Methionin-nasylat. Ausbeute lufttrocken 73 g (65% bezogen auf verseiften D-Ester). Zur Gewinnung des freien Methionins werden 70 g Nasylat in einer Lösung von 26,5 cm³ Diäthylamin in 700 cm³ 96-proz. Alkohol suspendiert. Man rührt 3½ Stunden bei Zimmertemperatur und filtriert die freigesetzte, in Alkohol unlösliche Aminosäure ab. Sie wird auf der Nutsche mit Alkohol gewaschen und hierauf nochmals in 250 cm³ 96-proz. Alkohol suspendiert. Nach 3-stündigem Rühren wird wiederum abgesaugt, mit Alkohol gewaschen und getrocknet. Ausbeute fast quantitativ. Zur Analyse und Drehung wird das praktisch schon reine Produkt aus 66-proz. Alkohol umkrystallisiert und eine Probe während 2 Stunden bei 70° im Hochvakuum getrocknet. Ausbeute 22 g D-Methionin.

3,239 mg Subst. gaben 4,80 mg CO₂ und 2,20 mg H₂O

3,124 mg Subst. gaben 0,271 cm³ N₂ (28°, 743 mm)

C ₈ H ₁₁ O ₂ NS	Ber. C	40,23	H	7,43	N	9,39%
(149,15)	Gef. „	40,44	„	7,60	„	9,62%

$[\alpha]_D^{19,5} = -23,4^{\circ} \pm 0,4^{\circ}$ (c = 5 in 6-n. HCl)

$[\alpha]_D^{18} = -20,8^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ (c = 1,2 in 0,20-n. HCl)

Die höchste von uns gemessene spezifische Drehung beträgt

$[\alpha]_D^{17,5} = -23,8^{\circ} \pm 0,4^{\circ}$ (c = 5 in 6-n. HCl)

Das betreffende, aus 66-proz. Alkohol krystallisierte und im Hochvakuum bei 80° getrocknete, analysenreine Präparat war aus einem über mehrere Krystallisationen hinweg konstant drehenden Nasylat bereitet worden. *K. Vogler* und *F. Hunziker*²⁾ erhielten bei der Spaltung des DL-Methionins mit Brucia nach *Windus* und *Marvel*³⁾ D-Methionin mit der spezifischen Drehung

$[\alpha]_D^{15,5} = -24,1^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ (c = 2,304 in 6,3-n. HCl)

Windus und *Marvel* geben an³⁾)

$[\alpha]_D^{25} = -21,18^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ (c = 0,80 in 0,2001-n. HCl).

¹⁾ Die Drehung des Esters kann um mehr als 1° sinken, wenn er Spuren von Feuchtigkeit enthält. Zum Trocknen wird er in der 4-fachen Menge absolutem Äther gelöst, mit 25% gebranntem Kalk über Nacht auf der Maschine geschüttelt und destilliert.

²⁾ *Helv.* **30**, 2013 (1947).

³⁾ *Am. Soc.* **53**, 3490 (1931).

L-Methionin.

Man behandelt 36 g rohes L-Methionin mit 540 cm³ kochendem Wasser, filtriert heiss von unlöslichen Anteilen ab (3,6 g), versetzt das Filtrat mit dem gleichen Volumen konz. Salzsäure (d = 1,19), kocht zur Hydrolyse von vorhandenen Peptiden über Nacht am Rückfluss und verdampft im Vakuum zur Trockene. Der Rückstand wird in 100 cm³ Wasser gelöst, die dunkelgefärbte Lösung mit 7 g säurebehandelter Kohle während 10 Minuten kochend gerührt und heiss filtriert. Man verdünnt das nur noch schwach gefärbte Filtrat (+ Waschwasser) mit Wasser auf ein Volumen von 290 cm³, versetzt es heiss mit 58 g Naphtalin- β -sulfosäure-trihydrat, löst kochend und lässt nach erfolgtem Animpfen wie beim D-Methionin angegeben erkalten¹⁾. Ausbeute 50 g Nasylat (58% bezogen auf rohes L-Methionin). Zur weiteren Reinigung werden insgesamt 76 g Nasylat (aus 2 Ansätzen) ein zweites Mal aus der 3-fachen Menge Wasser umkrystallisiert (heiss impfen). Ausbeute 71 g (93%) praktisch reines L-Salz. Die Zerlegung des Salzes (vgl. oben) liefert 28 g L-Methionin. Eine Probe wird zur Analyse und Drehung aus 66-proz. Alkohol umkrystallisiert und bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

4,397 mg Subst. gaben 6,520 mg CO₂ und 2,870 mg H₂O

3,175 mg Subst. gaben 0,274 cm³ N₂ (27°, 743 mm)

C ₅ H ₁₁ O ₂ NS	Ber. C	40,23	H	7,43	N	9,39%
(149,15)	Gef. „	40,46	„	7,31	„	9,60%

$[\alpha]_D^{18} = +23,4^\circ \pm 0,4^\circ$ (c = 5 in 6-n. HCl)

$[\alpha]_D^{18,5} = +21,0^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 1,2 in 0,20-n. HCl)

Die Analysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium der Org.-chem. Anstalt der Universität Basel ausgeführt.

Zusammenfassung.

Racemischer Methionin-isopropylester wird durch geeignete proteinaschaltige Präparate aus dem Pankreas „asymmetrisch“ verseift. Es wird gezeigt, wie sich diese Reaktion unter Verwendung von technisch gebräuchlichen Pankreatinpräparaten zur Zerlegung des synthetischen Methionins in seine optisch aktiven Formen heranziehen lässt.

Universität Basel, Anstalt für organische Chemie.

¹⁾ Das folgende, einfachere Vorgehen führt oft zum selben Ziel: Rohmethionin mit 7-facher Menge 1-n. HCl aufkochen, erkaltete Suspension filtrieren, Filtrat heiss mit Naphtalin- β -sulfosäure versetzen und impfen.