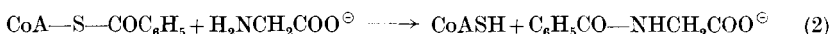


18. Coenzym A: Modellreaktionen zur enzymatischen Aktivierung von Acylderivaten des Coenzym A¹⁾

von R. Schwyzer und Ch. Hürlimann.

(12. XII. 53.)

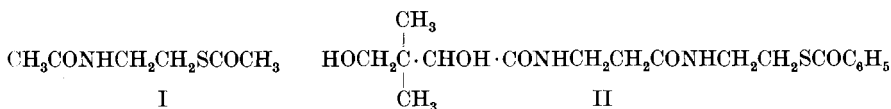
Die letzte Stufe im Prozesse der biologischen Acylierung mittels Coenzym A besteht nach *Lynen*²⁾ in der Übertragung des Acylrestes vom Schwefel des Coenzym auf das Substrat. Als Beispiele mögen die enzymatische Acetylierung von aromatischen Aminen³⁾ und die Benzoylierung des Glycins in der biologischen Hippursäuresynthese⁴⁾ dienen (Gleichungen (1) und (2)):



Die Stabilität von Acylderivaten des Coenzym A gegen Hydrolyse in der Gegend des Neutralpunktes und die Möglichkeit der spezifischen Aktivierung durch Enzyme sind wesentliche Voraussetzungen für ihre Verwendbarkeit in der Zelle.

Die Beschleunigung der Reaktionen (1) und (2) durch Aminacylasen ist in ihrem Wesen noch ungeklärt. Ein Mechanismus, dessen sich der lebende Organismus bedienen könnte, hat sich im Modellversuch als gangbar erwiesen und sei im folgenden beschrieben.

Verbindungen vom Typus der Acylderivate des Coenzym A, wie z. B. N,S-Diacetyl-Cysteamin (I)⁵⁾ und (+)-S-Benzoyl-pantethein(II)⁶⁾ sind relativ wenig reaktionsfähige Thioester.



¹⁾ Vgl. Kurzvortrag von R. Schwyzer am „Chemiker-Treffen, Innsbruck, 1953“, referiert in: *Angew. Ch.* **65**, 267 (1953), und *Österr. Ch. Ztg.* **54**, 155 (1953).

²⁾ F. Lynen & E. Reichert, *Angew. Ch.* **63**, 47 (1951); F. Lynen, E. Reichert & L. Rueff, *A.* **574**, 1 (1951).

³⁾ F. Lipmann, *J. Biol. Chem.* **160**, 173 (1945); N. O. Kaplan & F. Lipmann, *J. Biol. Chem.* **174**, 37 (1948); H. Tabor, A. H. Mehler & E. R. Stadtman, *J. Biol. Chem.* **204**, 127 (1953).

⁴⁾ H. Chantrenne, *J. Biol. Chem.* **189**, 227 (1951); vgl. H. Nielsen & F. Leuthardt, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **7**, C 53 (1949); R. W. McGilvery & P. P. Cohen, *J. Biol. Chem.* **183**, 179 (1950); D. Schachter & J. V. Taggart, *J. Biol. Chem.* **203**, 925 (1953).

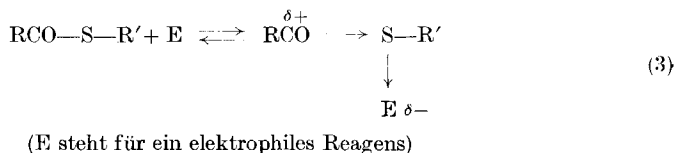
⁵⁾ R. Kuhn & G. Quadbeck, *B.* **84**, 844 (1951).

⁶⁾ R. Schwyzer, *Helv.* **35**, 1903 (1952).

Sie erfüllen daher wohl die Bedingung der Hydrolysebeständigkeit, zeigen aber in verdünnt wässriger Lösung eine nur sehr geringe Affinität zu Aminen^{1) 2)}. Thioester anderer Konstitutionen sind dagegen wesentlich reaktionsfähiger¹⁾. Besonders „elektronenanziehende“ Substituenten in der Mercaptankomponente bewirken eine starke Zunahme der Ausbeuten an acylierten Aminen.

Diese Beobachtungen führten zur Annahme, Enzyme könnten auf ähnliche Weise wie „elektronenanziehende“ Substituenten, jedoch von ausserhalb der Molekel her, einen aktivierenden Einfluss auf Acyl-derivate des Coenzym A ausüben.

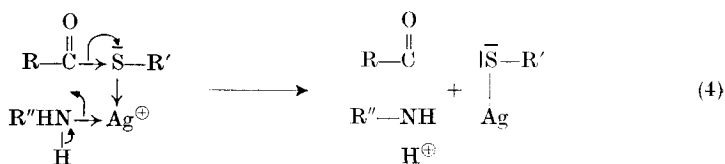
Die dazu erforderliche Polarisierung der CO-S-Bindung sollte sich im Modellversuch voraussichtlich durch Beanspruchung der 3p-Elektronen des Schwefels durch elektrophile Partikel erreichen lassen (Gleichung (3)³⁾:



Tatsächlich wurde *in vitro* eine starke Aktivität der Ionen von Silber, Quecksilber, Blei und Kupfer gefunden, welche sich ähnlich wie *in vivo* die Aminacylasen verhalten, indem sie die Aminolyse von Thioestern spezifisch erleichtern, ohne indessen die Hydrolyse in störender Weise zu beschleunigen. Insbesondere ist es uns gelungen, die biologische Hippursäuresynthese und die Acylierung aromatischer Amine modellmässig nachzuahmen.

Die Spezifität der elektrophilen Partikel scheint stark zu variieren: z. B. aktiviert Jod vor allem die Hydrolyse von Hippurylthioglykolsäure, während unter den Metallsalzen besonders Silber spezifisch die Aminolyse befördert.

Folgender (vorläufig rein hypothetischer) Mechanismus dürfte die besondere Spezifität des Silberions erklären (Gleichung (4)):



1) R. Schwyzer, *Helv.* **36**, 414 (1953).

2) P. J. Hawkins & D. S. Tarbell, *Am. Soc.* **75**, 2982 (1953).

3) Auf ähnliche Weise sind wohl auch die schon früher zufällig gemachten Beobachtungen über die Beschleunigung der Hydrolyse von Acetyl-glykolsäure durch Kupfersalze (*Br. Holmberg*, *B.* **60**, 2185 (1927)) und von Thiolessigsäure-äthylester durch Mercurisalze (*G. Sachs*, *B.* **54**, 1849 (1921)) zu deuten.

Durch zusätzliche Komplexierung mit dem Silberion würde das reagierende Amin nahe an das elektrophile Zentrum der Thiocarboxylgruppe gebracht, worauf durch Bindungsverschiebung das Amid in bevorzugter Weise entstände. Die verschiedene Spezifität der Metalle unter sich und die reine Aktivierung der Hydrolyse durch Jod fänden ihre Erklärung in der verschieden starken Bindung desamins durch das Zentralatom.

Modell für die Acylierung aromatischer Amine.

Als Modellsubstanz für Acylderivate des Coenzym A wurde (+)-S-Benzoyl-pantethein gewählt.

Bei der Umsetzung dieser Verbindung mit Anilin in verdünnt wässriger Lösung lässt sich der Effekt elektrophiler Partikel besonders gut demonstrieren (Fig. 1).

Wird (+)-S-Benzoyl-pantethein in wässriger Lösung ($c = ca. 0,1\text{-}m.$, 20% Dimethylformamid als Lösungsvermittler) zusammen mit Anilin ($c = ca. 0,2\text{-}m.$) bei einem pH von etwa 7,5 24 Std. bei 40° aufbewahrt, so lässt sich kein Benzanilid isolieren; in dieser Zeit ist auch keine merkliche Hydrolyse eingetreten. Wird der gleiche Versuch bei einem pH von 9 durchgeführt, so lässt sich wieder kein Benzanilid fassen, d.h. ein katalytischer Effekt der OH^\ominus auf die Aminolysegeschwindigkeit¹⁾ kommt nicht zur Geltung. Dagegen sind nun die Verluste an Benzoylpantethein durch Hydrolyse empfindlich: in diesem Versuche liessen sich 44% Benzoesäure isolieren.

Setzt man zu einer ähnlichen Lösung bei pH = 7,5 1,1 Mol Silbernitrat (auf Benzoylpantethein bezogen) zu, so beginnt schon nach kurzer Zeit die Kristallisation von Benzanilid. Nach 24 Std. konnte diese Verbindung in einer Ausbeute von 94% gefasst werden. Hydrolyse liess sich in diesem Versuche keine nachweisen. Kaliumcyanid, im Überschuss zugesetzt, hebt die Wirkung des Silbersalzes auf.

Um den Einfluss der Silberionen auf die Hydrolyse zu erfahren, wurde ein ähnlicher Versuch, aber ohne Anilin, angesetzt. Nach 24 Std. konnten nur 4% Benzoesäure isoliert werden. Rechnet man die Verluste bei der Isolierung sehr hoch (zu etwa 100%) ein, so betragen die Verluste an durch Silber aktiviertem Benzoylpantethein durch Hydrolyse höchstens 8%.

Der Einfluss von Kupfer(II)- und Quecksilber(II)-Ionen ist geringer (Fig. 1): nach Zugabe von Kupfer(II)-acetat (1,2 Mol) wurden 4% Benzanilid gefasst (was wegen der besondern Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung in diesem Falle ein Minimum von etwa höchstens 50% des wirklichen Wertes darstellt); nach Zugabe von Quecksilber(II)-acetat stieg die Ausbeute an Benzanilid auf 42%, daneben liessen sich etwa 2% Benzoesäure fassen.

¹⁾ P. J. Hawkins & D. S. Tarbell, Am. Soc. 75, 2982 (1953).

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Verwendung von Benzoylthiophenol als „aktivierte Benzoesäure“ (Fig. 2). Diese Verbindung liefert in 90-proz. Alkohol ($c = \text{ca. } 0,1\text{-m.}$) mit Anilin, unter sonst ähnlichen Bedingungen umgesetzt, etwa 7% Benzanilid. Bei Zusatz von Bleiacetat steigt die Ausbeute an Benzanilid auf 24%, mit Cu^{++} auf 32%, mit Hg^{++} auf 71% und mit Ag^+ auf 93%. An Hand der Menge des zurückgewonnenen Benzoylthiophenols konnten maximale Werte für die Summe der durch Alkohololyse und Hydrolyse entstandenen Verluste angenähert ermittelt werden. Betragen sie ohne Zusatz von Metallsalzen etwa 12%, so steigen sie bei Verwendung von Blei auf 31%, und bei der Verwendung von Quecksilber auf 26% an. Bei den Versuchen mit Silber konnte kein Benzoylthiophenol mehr isoliert werden, d.h. die Verluste durch Hydrolyse und Alkohololyse betragen 7%.

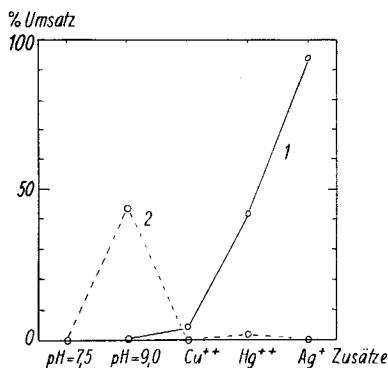


Fig. 1.

Benzoylpantethein und Anilin
(pH = 7,5—8,0)

1. Aminolyse
2. Hydrolyse

Reaktionsdauer: 24 Std. bei 40°
Konzentrationen: $c < 2\%$.

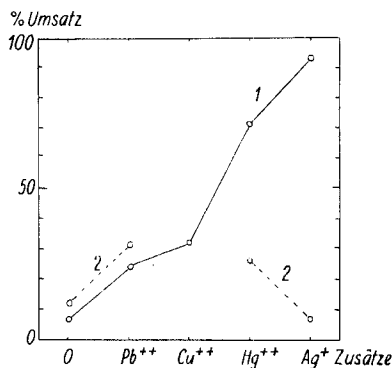


Fig. 2.

Benzoylthiophenol und Anilin
(in 90-proz. Alkohol)

1. Aminolyse
2. Alkohololyse + Hydrolyse

Reaktionsdauer: 63 Std. bei 40°
(24 Std. beim Ag^+)
Konzentrationen: $c < 2\%$.

Wie diese allerdings nur angenähert richtigen Zahlen zeigen, scheinen die Metallionen in bezug auf Aminolyse und Hydrolyse einen spezifischen Einfluss auszuüben. Indem die Beträge der Hydrolyse-Alkohololyse und der Aminolyse sich nicht gleichsinnig verändern beim Übergang von einem Metallion auf das andere, spiegeln die beschriebenen Tatsachen nicht einfach den Übergang von „energieärmeren“ in „energiereichere“ Zustände im Sinne von *Lipmann*¹⁾ wieder, sondern die Aktivierungsenergien der betreffenden Reaktionen werden offenbar unabhängig voneinander variiert²⁾.

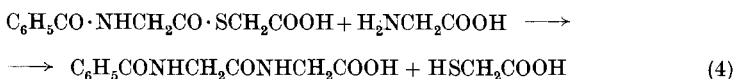
¹⁾ *F. Lipmann*, Adv. Enzymology **1**, 99 (1941).

²⁾ Vgl. dazu *R. J. Gillespie*, *G. A. Maw & C. A. Vernon*, Nature **171**, 1147 (1953).

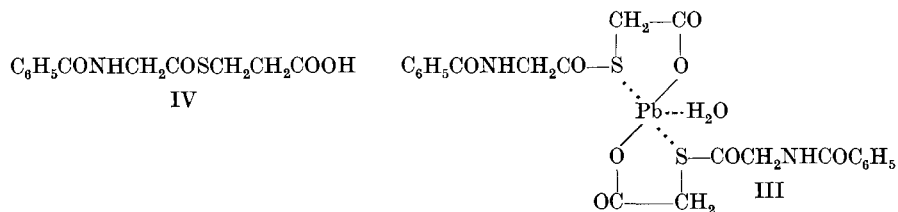
Modell der Hippursäuresynthese.

Wird (+)-S-Benzoyl-pantethein unter ähnlichen Bedingungen anstatt mit Anilin mit etwas mehr als der äquivalenten Menge Glycin in verdünnt wässriger Lösung aufbewahrt, so ist auch nach mehreren Tagen bei 40° und bei verschiedenen pH-Werten kein Umsatz zu Hippursäure zu beobachten. Bei Zusatz von Silbernitrat konnten nach 4 Tagen (im Minimum) 41% Hippursäure isoliert werden. Auch hier ist Kupfer etwas weniger wirksam, immerhin entstanden minimal 25% Hippursäure. Quecksilber- und Bleisalze erwiesen sich in diesen Versuchen bisher als unwirksam (Fig. 3).

Bei der Übertragung des Hippurylrestes von der Thioglykolsäure auf Glycin nach Gleichung (4):



wurden ähnliche Verhältnisse angetroffen (Fig. 3): in 0,1-m. wässriger Lösung ist bei verschiedenen pH-Werten ausser Hydrolyse keine Reaktion zu beobachten, erst in 1-m. Lösung tritt Umsatz zu etwa 46% ein. Wird unter Zusatz von Silbernitrat gearbeitet, so erfolgt eine rasche Synthese von Hippurylglycin. Die maximale Ausbeute (73% im Minimum) wird bei pH = 6 erreicht (auch mit Quecksilbersalzen). Bei der Verwendung von Blei ist das Ausbeutemaximum ins alkalische Gebiet verschoben: Blei liefert bei pH = 8,0 40% Hippurylglycin. In allen diesen Versuchen mit Hippurylthioglykolsäure spielt sich die Reaktion an der festen Phase der ausgeschiedenen Metallsalze (oder Metallkomplexsalze) ab, welche sich dabei meist sichtbar verändern (siehe im experimentellen Teil). Das Bleisalz der Hippurylthioglykolsäure erwies sich als verhältnismässig stabil und liess sich analysieren. Beim Versuch, es unter Erwärmen umzukristallisieren, zersetzte es sich jedoch. Die Verbindung schmilzt bei 108–111° und kristallisiert mit 1 Mol Wasser; sie besitzt vielleicht Formel III, welche die vergrösserte Reaktionsfähigkeit der CO–S-Bindung erklären würde.



In ähnlicher Weise wie Hippurylthioglykolsäure reagiert auch die homologe Hippuryl-β-mercaptopropionsäure (IV) mit Glycin auf Zusatz von Silbersalzen.

Mit diesen Reaktionen ist eine spezifische Synthese der Peptidbindung (amidartige Verknüpfung zweier Aminosäurereste) in verdünnt wässriger Lösung verwirklicht.

Wird als elektrophile Partikel an Stelle dieser Metallsalze Jod verwendet, so entsteht kein Hippurylglycin, sondern es wird unter hydrolytischer Sprengung der CO-S-Bindung Jod sehr schnell in einer Menge verbraucht, welche der Oxydation der Thioglykolsäure zum Disulfid entspricht. Nach $\frac{1}{2}$ Std. bei 20° und $\text{pH} = 7$ wurden 97% Hippursäure isoliert; ohne Jod wird Hippurylthioglykolsäure bei diesem pH und bei einer Temperatur von 30° nach zwei Tagen erst zu ca. 60% verseift.

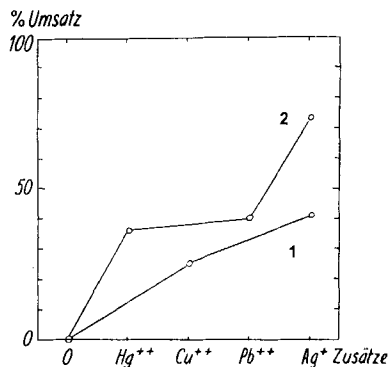


Fig. 3.

Acylierung von Glycin in ca. 0,1-m. wässriger Lösung.

1. Hippursäuresynthese mit Benzoylpantethein.
2. Synthese von Hippurylglycin mit Hippurylthioglykolsäure.

Vergleich mit den enzymatischen Verhältnissen.

Verschiedene Parallelen drängen sich auf beim Vergleich der Aktivierung der Thioester durch elektrophile Partikel mit der Aktivierung von Acylderivaten des Coenzym A durch Acylasen. In beiden Fällen entsteht zuerst ein „Coenzym-Enzym“- oder „Thioester-Aktivator“-Komplex, welcher im Modell besonders bei der Verwendung von Derivaten der Thioglykolsäure und der β -Mercaptopropionsäure augenfällig ist (Ausfällung). Ebenso dürfte der Reaktionspartner (Amin¹), Glycin²), α -Glycerophosphat³), Acetat⁴), Oxalacetat⁵), Cholin⁶), Glucosamin⁷), Histamin⁸) oder Imidazol⁹)) sowohl durch das Enzym wie

¹) L. c., S. 155, Anmerkung 3.

²) L. c., S. 155, Anmerkung 4.

³) A. Kornberg & W. E. Pricer, J. Biol. Chem. **204**, 329 (1953).

⁴) M. Soodak & F. Lipmann, J. Biol. Chem. **175**, 999 (1948).

⁵) J. R. Stern, S. Ochoa & F. Lynen, J. Biol. Chem. **198**, 313 (1952).

⁶) D. Nachmansohn & A. L. Machado, J. Neurophysiology **6**, 397 (1943).

⁷) T. C. Chou & M. Soodak, J. Biol. Chem. **196**, 105 (1952).

⁸) R. C. Millican, S. Rosental & H. Tabor, J. Pharmacol. & Exp. Therapy **97**, 4 (1949).

⁹) E. R. Stadman & F. H. White, Am. Soc. **75**, 2022 (1953).

auch durch den Modellaktivator in sterisch günstige Lage zum Thioester gebracht werden, wodurch die Spezifität des Vorganges erhöht wird.

Wesentliche Voraussetzung aber für einen Reaktionsmechanismus, wie er hier beschrieben worden ist, ist das Vorhandensein, im aktivierenden Enzym, eines elektrophilen Zentrums mit besonderer Affinität für den Schwefel. Dieses Zentrum kann voraussichtlich ein Metallion oder aber sonst ein positiver Pol sein.

Experimenteller Teil.

Reaktionen zwischen (+)-S-Benzoylpantethein und Anilin.

1. Je Ansatz wurden 100 mg Benzoylpantethein und 200 mg Anilin in 2,5 ml Dimethylformamid und 5 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 1 ml 2-n. Essigsäure wurde mittels Natronlauge das pH auf 7,5 bis 8 gestellt und die Zusätze, in 1 ml Wasser gelöst, zugegeben, worauf mit Essigsäure und Natronlauge das pH wieder einreguliert wurde. Die einzelnen Lösungen wurden auf ca. 12 ml aufgefüllt (Wasser). Zur Reaktion wurden die Proben 24 Std. bei 40° belassen. Dann wurden die Lösungen mit 2-n. Salpetersäure angesäuert und mehrmals mit Essigester extrahiert. Die Essigesterextrakte wurden mit Hydrogencarbonatlösung gewaschen; aus diesen Auszügen wurde durch Ansäuern die entstandene Benzoesäure freigesetzt. Die gewaschenen Essigesterextrakte wurden getrocknet und zur Trockne verdampft. Aus diesen Rückständen liess sich entstandenes Benzanilid mit Äther extrahieren. Es wurde aus Methanol mit Zusatz von wenig Wasser umkristallisiert. Der in Äther unlösliche Anteil ergab bei der Kristallisation aus Essigester unumgesetztes Benzoylpantethein.

Zusatz	Benzoylpantethein	Benzoessäure	Benzanilid
Kein Zusatz	49 mg (49%) Smp. 115°	—	—
NaOH bis pH = 9	—	14 mg (44%) Smp. 118°	—
53 mg Silbernitrat	—	—	49 mg (94%) Smp. 160°
100 mg Quecksilberacetat .	—	Spur	22 mg (42%) Smp. 160°
62 mg Kupferacetat, 1H ₂ O	40 mg (40%) Smp. 115°	—	2 mg (4%) Smp. 160°

Vergleichbar sind wegen Verlusten bei der Aufarbeitung des Benzoylpantetheins nur die Ausbeuten an Benzanilid und Benzoessäure.

Beim Versuch mit Kupfer entstanden ausser den genannten Reaktionsprodukten beim Ansäuern mit Salpetersäure nicht näher untersuchte rote Verbindungen. Diese Erscheinung, welche die Aufarbeitung erschwerte, konnte durch Verwendung von Salzsäure z. T. vermieden werden.

Andere Metallzusätze erwiesen sich unter den genannten Bedingungen als unfähig, die Bildung von Benzanilid herbeizuführen. Versuchte Zusätze: 119 mg Bleiacetat, 3H₂O; 43 mg Zinkchlorid; 41 mg Kobalt(II)-chlorid; 47 mg Eisen(II)-sulfat; 50 mg Eisen(III)-chlorid.

2. Ein gleicher Versuch mit Zusatz von 100 mg Kaliumcyanid und 60 mg Silbernitrat lieferte unter gleichen Bedingungen kein Benzanilid.

3. Ein gleicher Versuch mit 53 mg Silbernitrat, aber ohne Zusatz von Anilin lieferte bei pH = 7,5 nach 24 Std. bei 40° nach der üblichen Aufarbeitung 1,5 mg Benzoesäure (Smp. 121° nach Sublimation). Ausbeute 4%.

Reaktionen zwischen Benzoyl-thiophenol und Anilin.

4. Je Ansatz wurden 200 mg Benzoylthiophenol und 400 mg Anilin in 10 ml absolutem Äthanol gelöst und mit 2 ml Wasser, welches die jeweiligen Zusätze enthielt, versetzt. Die Proben wurden 24 Std. bei 40° belassen, danach vom Niederschlag abfiltriert und im Vakuum zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen, angesäuert und mit Essigester extrahiert. Die Essigesterextrakte hinterliessen nach dem Waschen mit Hydrogencarbonatlösung, Trocknen und Verdampfen die Neutralteile, aus welchen mittels Petroläther unumgesetztes Benzoylthiophenol und Benzoesäure-äthylester entfernt werden konnten. Der unlösliche Anteil ergab beim Umkristallisieren das Reaktionsprodukt, Benzanilid; aus der Hydrogencarbonatlösung wurde das Hydrolyseprodukt Benzoesäure durch Ansäuern ausgeschieden. Das Produkt der Alkoholylse, Benzoesäure-äthylester, wurde nicht isoliert.

Die Versuche ergaben folgendes:

Zusatz	Benzoyl-thiophenol	Benzoesäure	Benzanilid
Kein Zusatz	164 mg (82%) Smp. 55—56°	—	15 mg (8%) Smp. 160—161°
238 mg AgNO ₃	—	—	172 mg (93%) Smp. 160—161°

Bei einer Reaktionsdauer von 63 Std. wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Zusatz	Benzoyl-thiophenol	Benzoesäure	Benzanilid
Kein Zusatz.	151 mg (75%) Smp. 55—56°	7 mg (6%) Smp. 117—118°	13 mg (7%) Smp. 146—147°
532 mg Bleiacetat, 3H ₂ O	63 mg (31%) Smp. 55—56°	5 mg (4%) Smp. 116—118°	45 mg (24%) Smp. 157°
280 mg Kupferacetat, 1H ₂ O	120 mg (60%) ölig, stark ver- unreinigt	14 mg (12%) Smp. 117—118°	58 mg (32%) Smp. 159°
447 mg Quecksilber- acetat	10 mg (5%) Smp. 55—56°	9 mg (8%) Smp. 105—110°	130 mg (71%) Smp. 150—153°

Reaktionen zwischen (+)-S-Benzoyl-pantethein und Glycin.

5. 380 mg (+)-S-Benzoyl-pantethein wurden in 2 ml Dimethylformamid gelöst und mit einer Lösung von 100 mg Glycin in 8 ml eines ca. 0,5-n. Puffers nach *Theorell* vom gewünschten pH versetzt. Es wurden Ansätze bei pH 5, 6, 7, 8 und 9 gemacht; sie wurden 5 Tage lang bei 40° aufbewahrt. Am Ende dieser Zeit wurden sie mit HCl angesäuert und zur Trockne verdampft. Die Rückstände wurden mit Essigester extrahiert und die Essigesterlösungen mit kleinen Portionen von Hydrogencarbonatlösung gewaschen. Die Hydrogencarbonatauszüge wurden im Vakuum eingengt, angesäuert und wieder mit Essigester extrahiert. Eine weitere Extraktion dieser Extrakte mit Hydrogencarbonat lieferte eine stark gereinigte Säurefraktion. Die Auszüge wurden auf ein kleines Volumen ein-

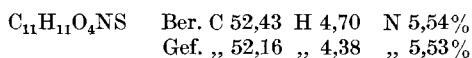
gedampft, angesäuert und in Eis gekühlt. Aus keinem Ansätze konnte Hippursäure isoliert werden; aus dem Ansätze bei $\text{pH} = 9$ wurde Benzoesäure erhalten.

6. 380 mg (+)-S-Benzoyl-pantethein wurden in 2 ml Dimethylformamid gelöst und mit einer Lösung von 75 mg Glycin in 3 ml Wasser versetzt. Mit einigen Tropfen 2-n. Essigsäure und 1-n. Natronlauge wurde der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Nun wurden 3 ml einer 0,4-n. Lösung von Silbernitrat in Wasser gleichzeitig mit 1-n. Natronlauge derart eingetropft, dass der pH-Wert bei 7,5 blieb. Dabei entstand eine gelbe Lösung. Diese wurde 4 Tage lang bei 40° aufbewahrt, wobei von Zeit zu Zeit der pH-Wert mit etwas Natronlauge korrigiert wurde. Dann wurde die Lösung mit H_2S behandelt, im Vakuum eingedampft und der Rückstand mit Wasser und ein wenig Kaliumcarbonat aufgenommen. Diese Lösung wurde unter Zusatz von Kohle vom Silbersulfid abfiltriert, auf ein kleines Volumen eingedampft, mit Essigester extrahiert und schliesslich mit HCl angesäuert. Darauf wurde die saure, wässrige Lösung im Vakuum zur Trockne gebracht und mit Essigester ausgezogen. Aus dem Essigester wurden die sauren Anteile mit wenig Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert, worauf sie durch Ansäuern freigesetzt wurden. Nach Einengen und Kühlen kristallisierten insgesamt 70 mg (41%) Hippursäure vom Smp. 190° , welche mit einem authentischen Präparat (Smp. $191-192^{\circ}$) gemischt keine Smp.-Erniedrigung gab.

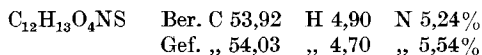
7. Ein gleicher Versuch, bei $\text{pH} = 7$ ausgeführt, ergab eine Ausbeute von insgesamt 145 mg Hippursäure (80% der Theorie). Bisher konnte der Grund dieser Diskrepanz noch nicht festgestellt werden; z. T. beruht sie wohl auf Verlusten bei der Aufarbeitung.

8. Ein gleicher Versuch, welchem aber an Stelle des Silbernitrats 70 mg Kupfer(II)-acetat, $1\text{H}_2\text{O}$ zugesetzt worden waren, ergab bei gleicher Aufarbeitung 12 mg Hippursäure vom Smp. 190° , was einer Ausbeute von 25% entspricht.

9. Hippuryl-thioglykolsäure: 1,8 g Hippursäure wurden in 5 ml trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 25 ml Essigester und 1,01 g Triäthylamin versetzt. Bei -5° wurden 1,08 g Chlorameisensäure-äthylester zugetropft. Der Umsatz zum gemischten Anhydrid und Triäthylammoniumchlorid war nach 10 Min. beendet¹⁾. Der Ansatz wurde darauf in eine Lösung von 0,9 g Thioglykolsäure und 1,1 g Triäthylamin in 20 ml Essigester gegossen. Die Mischung wurde $\frac{1}{2}$ Std. bei Zimmertemperatur und $\frac{1}{2}$ Std. bei 50° stehengelassen. Nach Ausschütteln der Lösung mit verdünnter Salzsäure und Wasser wurde die Essigesterschicht mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum verdampft. Sie hinterliess einen kristallisierten Rückstand, der aus Äther und aus Wasser umkristallisiert wurde. Die Hippuryl-thioglykolsäure wurde in Form farbloser, stäbchenförmiger Kristalle vom Smp. $142,5^{\circ}$ in einer Ausbeute von 80% erhalten. Trocknen 3 Std. bei 90° im Hochvakuum.



10. S-Hippuryl- β -mercaptopropionsäure: Diese Verbindung wurde in genau gleicher Weise, wie für Hippuryl-thioglykolsäure beschrieben, nach der „gemischten Anhydrid“-Methode dargestellt. Anstelle der Thioglykolsäure wurde die äquivalente Menge β -Mercaptopropionsäure verwendet. Die S-Hippuryl- β -mercaptopropionsäure schmolz nach der Kristallisation aus Essigester und aus Äther bei $113-114,5^{\circ}$; zu Rosetten vereinigte, farblose Stäbchen. Trocknen 2 Std. bei 90° im Hochvakuum.



Reaktionen zwischen Hippuryl-thioglykolsäure und Glycin ohne Metallsalze.

11. In ca. 1-n. wässriger Lösung: 253 mg Hippuryl-thioglykolsäure und 75 mg Glycin wurden vermischt und mit 1 ml 2-n. NaOH übergossen. Dabei trat vollständige Lösung ein, und das pH betrug ungefähr 9. Die Mischung wurde 4 Tage bei 40° aufbewahrt, dann wurde sie mit 2 ml 1-n. HCl angesäuert und im Vakuum zur Trockne

¹⁾ Vgl. dazu *R. A. Boissonas, Helv. 34, 874 (1951)*.

verdampft. Der Rückstand wurde getrocknet, mit 2 ml abs. Alkohol aufgenommen und das Ungelöste abgetrennt und mit Alkohol gewaschen. Dieser Anteil, bestehend aus Kochsalz und Hippurylglycin, wurde nach dem Trocknen aus wenig Wasser umkristallisiert. Es schieden sich dabei 110 mg farblose Kristalle vom Smp. 206—206,5 aus, Misch-Smp. mit einem authentischen Präparat ebenso. Ausbeute 46% der Theorie.

12. In ca. 0,1-n. wässriger Lösung: 253 mg Hippuryl-thioglykolsäure (10^{-3} Mole) wurden in 2 ml Äthanol gelöst und mit einer Lösung von 100 mg Glycin ($1,3 \cdot 10^{-3}$ Mole) in 8 ml einer verdünnten Pufferlösung nach *Theorell* versetzt. Die verschiedenen Ansätze von pH 2,5, 4,0, 6,0, 7,0, 8,0 und 9,0 wurden mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt und 6 Tage an der Luft bei 40° aufbewahrt. Die Lösungen wurden einzeln im Vakuum verdampft und die Rückstände angesäuert und noch feucht mit heissem Methanol ausgezogen. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wurden die Rückstände der alkoholischen Extrakte aus Wasser (nach Ansäuern mit HCl) umkristallisiert. Die Kristallisate bestanden aus Mischungen von Hippuryl-thioglykolsäure und Hippursäure und waren nach dem Trocknen in kaltem, absolutem Äthanol vollkommen löslich. In den Versuchen bei pH 6 bis 9 war Hippursäure besonders reichlich vorhanden. Hippurylglycin konnte in keinem Ansätze auf diese Weise nachgewiesen werden.

Reaktionen zwischen Hippuryl-thioglykolsäure und Glycin
in Gegenwart von Metallsalzen.

13. Mit Silbernitrat: 300 mg Hippurylthioglykolsäure und 150 mg Glycin (1,7-molare Menge) wurden mit 3 ml Wasser und 1 ml 2-n. Essigsäure übergossen. Nun wurde unter Rühren und bei gleichzeitiger potentiometrischer Messung des pH-Wertes (Glas-elektrode) langsam 1-n. NaOH zugesetzt, bis das gewünschte pH erreicht und alles in Lösung gegangen war. Dann wurden aus zwei Mikrobüretten 3,0 ml 0,4-n. Silbernitratlösung und 1-n. Natronlauge abwechselungsweise in kleinen Portionen derart zugesetzt, dass der pH-Wert innerhalb etwa 0,2 Einheiten konstant blieb. Die Ansätze wurden darauf mit Wasser auf 15 ml aufgefüllt, was einer 0,08-n. Lösung von Hippuryl-thioglykolat entspricht. In allen Gefässen hatte sich ein voluminöser, gelber Niederschlag gebildet, der sich im Verlaufe der weiteren Reaktion in einen dichterem, farblosen Niederschlag von Silberthioglykolat umwandelte. Zur Reaktion wurden die Ansätze 20 Std. bei 40° aufbewahrt; im Verlaufe dieser Zeit änderten sich die pH-Werte der Lösungen wie in der Tab. angegeben. Zur Beendigung der Reaktion wurde Schwefelwasserstoff eingeleitet, bis sich der Niederschlag in Silbersulfid verwandelt hatte. Nach Einstellen des pH auf 2,5 mittels HCl wurde filtriert, das Filtrat im Vakuum zur Trockne verdampft und der Rückstand zweimal mit einer Mischung von Äthanol-Methanol (2:1) ausgekocht. Nach der Filtration von ungelöstem Kochsalz wurden die Extrakte im Vakuum verdampft und die Rückstände getrocknet. Das kristallisierte Gemisch wurde mittels siedendem Essigester von Hippursäure und Hippuryl-thioglykolsäure befreit. Der unlösliche Rückstand wurde aus wenig Wasser umkristallisiert, wobei Hippurylglycin vom Smp. 206° anfiel. Zur Analyse wurden die verschiedenen Fraktionen vereinigt und bei 100° im Hochvakuum 2 Std. getrocknet.

$C_{11}H_{12}O_4N_2$	Ber. C 55,93	H 5,12	N 11,86%
	Gef. „ 55,74	„ 4,94	„ 11,90%

Die Ausbeuten sind aus der folgenden Tab. zu entnehmen:

Anfangs-pH	5,0	6,0	7,0	8,0
End-pH	4,8	5,4	5,8	5,9
mg Hippurylglycin	148	205	177	165
Ausbeute in Prozenten . .	53	73,3	63,3	59

14. Mit Quecksilberacetat: Die verschiedenen Ansätze wurden genau gleich hergestellt, wie für den vorhergehenden Versuch mit Silbernitrat beschrieben, nur wurde an Stelle der Silbersalzlösung 3,0 ml einer 0,4-n. Lösung von Quecksilberacetat verwendet. Der anfangs farblose, reichliche Niederschlag verringerte sich im Verlaufe der Reaktion, und an seine Stelle trat ein geringer, schwarzer Niederschlag.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

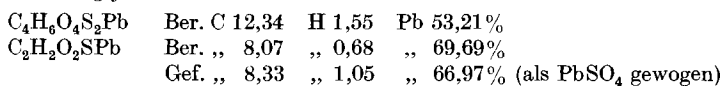
Anfangs-pH . . .	5,0	6,0	7,0	8,0
End-pH	4,5	5,2	5,4	5,4
Nebenprodukte .	Hippursäure + Hippuryl-thioglykolsäure	Hippur-säure	Hippur-säure	Hippur-säure
mg Hippurylglycin	82	104	91	84
Smp.	205–207°	206–207°	205–207°	205–207°
Ausbeute	30%	36%	33%	32%

15. Mit Bleiacetat: Es wurden gleiche Ansätze hergestellt wie für Quecksilberacetat beschrieben, nur unter Verwendung von 3,0 ml 0,4-n. Bleiacetatlösung. Bei den Ansätzen von pH 5, 6 und 7 entstand ein farbloser Niederschlag, welcher auch während der Reaktion unverändert blieb und dann mit H_2S in Bleisulfid und Hippurylthioglykolsäure zerlegt werden konnte. Beim Ansätze von pH = 8 wich dieser Niederschlag langsam einen kristallinen Fällung, welche aus dem Bleisalz der Thioglykolsäure bestand. Zur Aufarbeitung wurden diese Niederschläge abfiltriert, wobei die Filtrate fast frei von Blei waren. Die weitere Aufarbeitung erfolgte ohne Einleiten von H_2S , ähnlich wie für Silber beschrieben. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

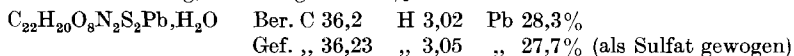
Anfangs-pH . . .	5,0	6,0	7,0	8,0
mg Hippurylglycin	12	5	10	112
Smp.	205–207°	205–207°	205–207°	206–207°
Ausbeute	4,3%	1,8%	3,6%	40%

Die Schwankungen der niedern Ausbeuten sind auf die Verluste beim Umkristallisieren zurückzuführen und sind nicht signifikant.

Das in der Reaktion bei pH = 8 entstandene kristalline Salz wurde mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Analyse zeigt, dass es sich hauptsächlich um die Verbindung von 1 Mol Thioglykolsäure mit 1 Bleiion handelt:



16. Bleisalz der Hippuryl-thioglykolsäure: 500 mg Hippuryl-thioglykolsäure wurden mit 1 ml 2-n. Essigsäure und 10 ml Wasser übergossen. Durch Zugabe von 1-n. Natronlauge bis zum pH = 6 wurde die Substanz in Lösung gebracht. Nun wurden 5 ml 0,4-n. Bleiacetatlösung zugegeben, worauf ein kristalliner, farbloser Niederschlag sich bildete. Nach einiger Zeit wurde dieser gesammelt, mit Wasser, Methanol, Aceton und Äther gewaschen und getrocknet (2 Std. im Hochvakuum bei Zimmertemperatur). Feine, zu Büscheln vereinigte Nadeln vom Smp. 108–111° (Schmelze erst bei 115° vollständig klar). Ausbeute: 600 mg, d. h. ungefähr 85%.



17. Reaktion zwischen S-Hippuryl- β -mercaptopropionsäure und Glycin mit Zusatz von Silbernitrat: 300 mg S-Hippuryl- β -mercaptopropionsäure und 150 mg Glycin wurden, genau wie für Hippuryl-thioglykolsäure im Beispiel 3 beschrieben, gelöst und mit Silbernitrat behandelt. Es wurde nur ein Versuch bei pH = 6 ausgeführt, wobei 150 mg Hippurylglycin vom Smp. 205–207° isoliert wurden (Ausbeute ca. 56%).

Die Analysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der CIBA Aktiengesellschaft unter der Leitung von Herrn Dr. H. Gysel durchgeführt.

SUMMARY.

The reactivity of esters of thiocarboxylic acids with amino compounds is strongly and specifically enhanced by metal ions possessing affinity for the sulfur atom. Model reactions of the enzymatic acylation of aromatic amines and of the biological synthesis of hippuric acid are described, using benzoyl pantetheine as a model compound for acyl derivatives of coenzyme A, and metal ions as models for the corresponding acetylases.

The synthesis of a dipeptide (hippuryl glycine) in dilute aqueous solution is described, using this technique of activation.

Chemisches Institut der Universität Zürich.

19. Über Aminoacetonitrile.

Dissoziationsregeln, 2. Mitteilung¹⁾

von A. Marxer.

(12. XII. 53.)

Bei unseren Versuchen zur Auffindung neuer Arzneimittel beschäftigten wir uns mit den vielseitig verwendbaren Aminoacetonitrilen. Im folgenden berichten wir über eine einfache Synthese und deren Verlauf (Teil A), sowie über Hydrierung und Dissoziationsregeln einiger Vertreter dieser Gruppe (Teil B).

A. Aromatische Aminoacetonitrile ($\text{Ar}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CN}$;
 $(\text{Ar})_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CN}$).

Anilinoacetonitrile lassen sich z. B. aus Anilin, Formaldehyd-bisulfid und Kaliumcyanid nach *Knoevenagel*²⁾ herstellen. In der Diphenylaminreihe verläuft diese Methode unbefriedigend, lässt sich aber hier, wie auch beim Anilin selbst, mit Erfolg durch ein von Dr. *Spillmann* in unseren Laboratorien für andere Verbindungen entwickeltes Verfahren ersetzen. Darnach wird das Amin in Eisessig mit Formaldehyd (Paraformaldehyd oder wässriger Lösung) versetzt und Kaliumcyanid-Lösung zutropft. Unbefriedigende Ausbeuten bei der

¹⁾ Siehe Teil B. 1. Mitteilung, *R. Rometsch, A. Marxer & K. Miescher*, *Helv.* **34**, 1611 (1951).

²⁾ *E. Knoevenagel*, *B.* **37**, 4073 (1904). Die Methode wurde aber kurz vorher von *H. Bucherer & A. Schwalbe*, D.R.P. 157 909 vom 14. 11. 1901, verwendet und in *B.* **39**, 2796 (1906), publiziert. Vor ihnen haben schon *F. Thiemann & K. Piest* nach *B.* **15**, 2028 (1882), Aminoacetonitrile hergestellt. Vgl. auch die Arbeiten der *B.A.S.F.*, die aus den D.R.P. 132 621 vom 13. 7. 1901, 156 760 sowie 158 718 vom 4. 4. 1903 hervorgehen.