

Mitteilung aus der Abteilung für Proteinchemie des Instituts für  
Experimentalmedizin (W. I. E. M.) zu Moskau  
(Leiter: Prof. Dr. N. J. Gawrilow)

## Zur Frage der Lactam-Lactim-Tautomerie

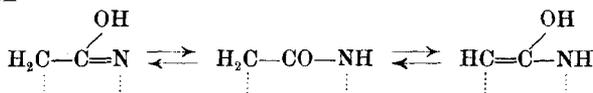
I. Mitteilung:

### Oxydation der Doppelbindung zwischen Kohlenstoff- Stickstoff durch Perbenzoesäure

Von M. M. Botwinnik und N. J. Gawrilow

(Eingegangen am 12. Februar 1937)

In einer ganzen Reihe von Umwandlungen der Peptidbindung, in Peptiden sowohl wie auch in Diketopiperazinen und Eiweißstoffen, hängen nach der Meinung verschiedener Autoren, die funktionalen Eigenschaften der Gruppe NH—CO von der Möglichkeit ihrer Existenz in den drei isomeren Formen



ab. So haben Kossel und Weiß<sup>1)</sup> beobachtet, daß bei längerem Stehen von Clupein und Gelatine mit 2/n-NaOH die optische Aktivität des Eiweißes abnimmt. Dakin<sup>2)</sup> erklärt diese Erscheinung durch Enolisation der Peptidbindung zwischen Kohlenstoff-Kohlenstoff und durch Verschwinden des asymmetrischen Kohlenstoffatoms, was bei der Hydrolyse zu optisch inaktiven Aminosäuren führt. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Levene und Bass<sup>3)</sup> an Gelatine gemacht. Die Arbeiten von Levene und Pfaltz<sup>4)</sup> zeigten, daß die Diketopiperazine dabei der Racemisation als erste unterliegen. Für die entsprechenden Di-, Tri- und Tetrapeptide war eine höhere Laugenkonzentration und eine viel längere Einwirkungsdauer erforderlich. Diese Ergebnisse weisen darauf, daß zwischen

dem Verhalten der CO—NH-Gruppe in einer Kette und in einem Ring ein wesentlicher Unterschied besteht.

Auch das physiko-chemische Verhalten des Eiweißes wurde von vielen Autoren durch vorangehende Enolbildung erklärt. Groh und Hanäk<sup>5)</sup> konstatierten eine Zunahme der selektiven Eiweißadsorption beim Alkalisieren und nach der Einwirkung von Enzymen. Gawrilow und Simskaja<sup>6)</sup> beobachteten nach Trypsinwirkung eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes beim Kollagen von  $p_H = 4,7$  auf  $p_H = 3,4$ . A. P. Konnikow<sup>7)</sup> zeigte mit Hilfe einer potentiometrischen Titriermethode, daß Gelatine nach der Einwirkung von Alkali in den Grenzen zwischen  $p_H = 10$ — $12$  saure Gruppen aufweist.

1934 formulierten Bergmann, Zervas, Salzmann und Schleich<sup>8)</sup> eine Hypothese über die Wirkung der Dipeptidase: als Grundlage der für die Reaktion notwendigen Gruppierungen nehmen die Autoren eine nach Stickstoff enolisierte Peptidbindung im Dipeptid an. Man könnte noch eine ganze Reihe von Beispielen anführen, bei denen man die verschiedenen Reaktionen des Eiweißes durch Enolbildung erklären kann.

Abderhalden und Schwab, Abderhalden und Rossner, Abderhalden und Göbelein<sup>9)</sup> haben für die konkrete Untersuchung des Enolisationsprozesses und der gegenseitigen Beziehungen der tautomeren Formen mehrere Darstellungsmethoden von enolisierten Anhydriden ausgearbeitet. Der Strukturbeweis der erhaltenen Anhydride hatte aber hauptsächlich qualitativen Charakter. Nur im Falle von Leucylglycinanhydrid wurden von Abderhalden und Schwab die Ozonierungsprodukte des Anhydrids isoliert und auf diese Weise die Anwesenheit einer Enolform tatsächlich bewiesen. Die erhaltenen Anhydride ließen sich außerdem durch Alkali leichter als die nichtenolisierten spalten.

Die konkreten Angaben über die Enolisation der C—C-Bindung in Eiweißstoffen und den ihnen verwandten Verbindungen beschränken sich auf die bereits angeführten Untersuchungen. Noch weniger Material haben wir auf dem Gebiet der tatsächlichen Beweisführung einer Lactam-lactim-tautomerie.

Karrer und Gränacher<sup>10)</sup> erhielten das O,O-Dibenzyl-derivat von Glycinanhydrid. Diese Verbindung gab keine

Anhydridreaktion und entfärbte nicht  $\text{KMnO}_4$ . Im Gegensatz zu den von Abderhalden dargestellten enolisierten Anhydriden war sie gegen Alkali verhältnismäßig beständig, ließ sich aber leicht durch Säuren zu Glykokoll und Benzylalkohol spalten. Karrer und Gränacher behaupten auf Grund ihrer Untersuchungen, daß die Enolbildung des Anhydrids sich am Stickstoff vollzogen hätte. In unserer Arbeit kamen wir zu dem gleichen Schluß.

Das Fehlen endgültiger Beweise für die Enolbildung am Stickstoff-Kohlenstoff in den Proteinen ist eine Folge des ungenügenden Studiums dieser Frage in der organischen Chemie. Bis jetzt gelang es nicht, die Verbindungen, die die  $\text{NH-CO}$ -Gruppen enthalten, als zwei Desmotrope zu isolieren. Deshalb gründet sich der Beweis der Tautomerie dieser Stoffe auf der Darstellung ihrer Derivate und auf der Erforschung ihrer physiko-chemischen Eigenschaften.

Die Derivate der Säureamide sind schon längst in zwei Formen bekannt: als N-gebundene Alkyl- und Arylderivate und als O'-gebundene Imidester. Viele Untersuchungen sind der Darstellung von Metallderivaten<sup>11)</sup> dieser Verbindungen und dem Studium ihrer Eigenschaften gewidmet worden. Es wurden Ag, Na und Hg-Salze der Säureamide dargestellt. Doch blieb die Frage über die Struktur dieser Metallderivate wegen ihrer leichten Umsetzungsfähigkeit bis jetzt ungelöst.

Die Darstellung der Alkyl- und Arylderivate der Säureamide konnte auch keine erschöpfende Antwort geben, weil während der Alkylierung und Arylierung intramolekulare Umsetzungen stattfinden können<sup>12)</sup>. So verwandeln sich die Methoxylverbindungen der Cyanursäure beim Erhitzen leicht in N-methylderivate. Unter allen Alkylierungsmethoden verdient die Diazomethanreaktion besondere Aufmerksamkeit<sup>13)</sup>; sie vollzieht sich bei Raumtemperatur in beliebigen Konzentrationen. Außerdem wird das Methylradikal im Reaktionsprozeß selbst gebildet, folglich zeigt die Stellung der Methylgruppe tatsächlich den Platz des beweglichen Wasserstoffs an. Mit Hilfe der Diazomethanreaktion gelang es Biltz und Max<sup>14)</sup>, die Struktur der Methylderivate der Harnsäure zu beweisen. Bei der Einwirkung des Diazomethans auf Säureamide erhielten Arndt u. Scholz<sup>15)</sup> und Labruno<sup>16)</sup> anscheinend nur N-Derivate.

Auch die physiko-chemischen Untersuchungen haben keine endgültigen Resultate gegeben. Auf Grund von kryoskopischen Untersuchungen zog Auwers<sup>17)</sup> den Schluß, daß die Säureamide sich in der Lactamform befinden. Hantzsch<sup>18)</sup> fand, daß das elektrische Leitungsvermögen der Amide (auch der aromatischen) verschwindend klein sei. Aber die Untersuchung der Adsorptionsspektren im Ultraviolett und ein Vergleich der Schmelz- und Siedepunkte von Säureamiden veranlaßte Hantzsch im Jahre 1931 an eine Assoziation dieser Verbindungen zu denken, die über die Imidform des letzteren, sogar im festen Zustand entsteht.

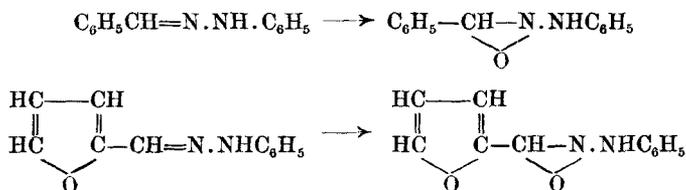
Man muß noch auf die ersten Versuche hinweisen, die Enolbildung der Amidgruppe mit Hilfe des Ramaneffektes zu verfolgen. Im Jahre 1934 fanden Kohlrausch und Pongratz<sup>19)</sup> bei der Untersuchung von Acetamid und Propionamid eine neue Linie, die vermutlich der Doppelbindung zwischen Kohlenstoff-Stickstoff zuzuschreiben ist.

Eine bestimmte Antwort auf die Frage über die Lactim-lactam-tautomerie könnte freilich durch Isolierung der entsprechenden Desmotropen oder wenigstens durch Entdeckung solcher Bestimmungsmethoden, die für die Keto- oder Imin-gruppierung streng spezifisch sind, erbracht werden. Von allen besprochenen Methoden verdienen besondere Aufmerksamkeit diejenigen, die auf den Eigenschaften der spezifischen Doppelbindung  $C=N$  gegründet sind, nämlich die Absorptionsmethode und der Ramaneffekt. Das elektrische Leitungsvermögen, die potentiometrische Titration und die Darstellung von Metallderivaten sind mit einer Wasserstoffionisation verbunden. Letztere kann sich wie am Stickstoff so auch am Sauerstoff vollziehen. Deshalb können diese Methoden keine erschöpfende Antwort über die Struktur der Amide geben.

Wir hielten den Nachweis der Doppelbindung zwischen Kohlenstoff und Stickstoff für die geeignetste Methode zur Lösung des Problems, da diese Bindung nur für die Lactim-gruppierung spezifisch ist. Leider gibt es aber sogar für die unbewegliche Doppelbindung zwischen Kohlenstoff-Stickstoff keine vertrauenswerten qualitativen und quantitativen Bestimmungsmethoden.

In unserer Arbeit haben wir zur Untersuchung der Doppelbindung zwischen Kohlenstoff–Stickstoff die Reaktion von Prilejajev<sup>20)</sup> — Oxydation der Doppelbindung mit Hilfe von Perbenzoesäure — angewandt. Die Oxydation der Doppelbindung zwischen Kohlenstoff–Kohlenstoff durch Perbenzoesäure ist ein weit verbreitetes Verfahren für den Nachweis dieser Bindung — es entsteht ein Oxyd. Für uns war es sehr wichtig, daß Perbenzoesäure auch mit der Enoldoppelbindung reagieren kann. So zeigte Bodendorf<sup>21)</sup>, daß Acetessigester und Benzyl-aceton von Perbenzoesäure oxydiert werden. Nametkin und Brüssowa<sup>22)</sup> sowie Nametkin und Abakumowskaja<sup>23)</sup> arbeiteten auf Grund des angesammelten experimentellen Materials eine quantitative Methode zur Bestimmung der Doppeläthylenbindung aus. Dieses Verfahren gründet sich darauf, daß der zu untersuchende Stoff mit einer Perbenzoesäurelösung behandelt wird, worauf nach einem bestimmten Zeitabschnitt die nicht in Reaktion getretene Säure jodometrisch titriert wird.

Viel weniger ist über die Wirkung der Perbenzoesäure auf stickstoffhaltige Verbindungen bekannt. Im Jahre 1900 zeigten Baeyer und Villiger, daß Perbenzoesäure mit Anilin reagiert<sup>24)</sup>. Bergmann, Ulpts und Witte<sup>25)</sup> studierten ihre Wirkung auf Benzal-phenylhydrazon und Furfurol-phenylhydrazon. Der Oxydationsprozeß blieb in dem Stadium der Monosauerstoffverbindung stehen. Letztere war sehr stabil und zerfiel nur bei hoher Temperatur. Die Autoren geben für die Reaktion folgendes Schema:



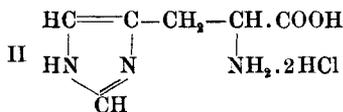
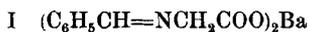
Benzal-anilin reagierte dagegen mit Perbenzoesäure sehr stürmisch; als Produkte wurden Nitrobenzol und Benzaldehyd vorgefunden. Meisenheimer<sup>26)</sup> zeigte, daß Methyl-allyl-anilin mit Perbenzoesäure unter Bildung von Stickstoffoxyverbindungen reagiert.

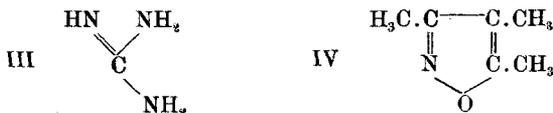
1928 studierten endlich Prilejajev, Weretschuk und Tir<sup>27)</sup> die Oxydation der aromatischen Amine durch Perbenzoesäure. Die Oxydation wurde in ätherischer Lösung durchgeführt. Es wurden ortho-, meta- und para-Toluidin, ortho-, meta- und para-Chloranilin und Nitrotoluidin oxydiert. In allen Fällen ging die Oxydation nicht bis zu den Nitroverbindungen: bei den o-Derivaten erhielt man eine kleine Menge von Nitrosoverbindungen; die m- und p-Derivate lieferten in den meisten Fällen Azoxykörper; Anilin gab Azoverbindungen. Damit sind die Arbeiten über die Beziehungen zwischen stickstoffhaltigen Verbindungen und Perbenzoesäure erschöpft.

Wir stellten uns das Ziel, die Reaktion von Prilejajev<sup>27)</sup> in der von Nametkin und Brüssowa<sup>22)</sup> für die quantitative Analyse abgeänderten Form bei der Bestimmung der Tautomerie der Amidbildung zu verwenden. Hierfür war es notwendig: 1. Die Angaben Bergmanns über das Verhalten der Kohlenstoff-Stickstoff Doppelbindung zur Perbenzoesäure in den verschiedenen Klassen der organischen Verbindungen zu ergänzen; 2. das Verhalten anderer stickstoffhaltiger Gruppierungen, besonders der Amino-, Amid- und Imingruppen zur Perbenzoesäure aufzuklären. 3. Im Falle von positiven Resultaten die Oxydation der Enolbindung am Stickstoff durchzuführen.

Die Wiederholung der Versuche von Bodendorf<sup>21)</sup> über Oxydation der Enolbindung im Acetessigester und Benzoyl-aceton bestätigte seine Befunde. Die Oxydation verlief leicht, der Verbrauch an Perbenzoesäure nahm zu, als mit der Zeit das Gleichgewicht verschoben wurde. Ebenso verhielt sich das bis jetzt noch nicht untersuchte Dimethyl-dihydroresorcin.

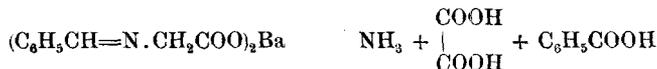
Für die Untersuchung der Wirkung von Perbenzoesäure auf die unbewegliche Doppelbindung zwischen Kohlenstoff-Stickstoff wurden Verbindungen aus verschiedenen Klassen gewählt. Der Oxydation wurden unterworfen: 1. das Ba-Salz des Benzylidenglykokolls; 2. Histidindichlorhydrat; 3. kohlen-saures Guanidin; 4. Trimethyloxazol.





Alle Verbindungen reagierten leicht mit Perbenzoesäure. Die Reaktion blieb aber nicht auf dem Stadium der Mono- oder Disauerstoffverbindung stehen; parallel mit der Sauerstoffbindung ließ sich eine Ammoniakbildung oder ein Übergang des Stickstoffs in eine oxydierte, nach Kjeldahl nicht bestimm- bare Form feststellen. Diese Erscheinungen werden allem An- schein nach in geringerem Maße durch die Wirkungsdauer oder durch einen Überschuß an Oxydationsmittel (1:3) als durch die gleich großen Oxydationsgeschwindigkeiten der Doppel- bindung zwischen Kohlenstoff–Stickstoff und der sich bei der Reaktion bildenden Zwischenverbindungen hervorgerufen. Dies ist aus den Resultaten der Imidazolydation sichtbar\*).

Bei der Oxydation des Bariumsalzes von Benzyliden- glykokoll gelang es uns zu zeigen, daß diese Verbindung in Ammoniak, Oxalsäure und Benzoesäure zerfällt.



Die Aminogruppe des Histidins wurde nach van Slyke bestimmt. Sie ließ sich nur nach starker und andauernder Ein- wirkung oxydieren. Die Iminogruppe des Histidins müßte bei der Oxydation zu oxydierten Stickstoff-formen führen, die aber nicht nachgewiesen wurden. Der ganze Stickstoff ließ sich nach Kjeldahl bestimmen (die Ergebnisse sind in Tab. 1 angeführt).

Aus diesen Resultaten und den folgenden Versuchen mit enolisierten Verbindungen folgt, daß die Oxydation der Doppel- bindung zwischen Kohlenstoff–Stickstoff durch Perbenzoesäure von tiefen Molekülveränderungen begleitet wird.

Die Amino- und Iminogruppen reagieren mit Per- benzoesäure in der gleichen Weise wie es von Bamberger<sup>23)</sup> bezüglich Peressig- und Perschwefelsäure beobachtet wurde. Äthylamin und Diäthylamin reagierten sehr stürmisch. Unter den Oxydationsprodukten wurde kein Ammoniak vorgefunden.

\*) Botwinnik u. Prokofjew, Oxydation des Imidazols und seiner Derivate durch Perbenzoesäure, vgl. die 2. Mitteilung.

Die Stickstoffbestimmung zeigte, daß ein Teil des Stickstoffs in oxydierte Formen übergegangen war.

Tabelle 1

Einwirkung von Perbenzoesäure auf die Doppelbindung zwischen Kohlenstoff-Stickstoff

Substanz	Menge des verbrauchten Sauerstoffs in %		Gesamt-N in %		Ammoniak-N in %		Amino-N in %		Wirkungsdauer in Stdn.
	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	
Ba-Salz des Benzylidenglykokolls	6,94	14,42	5,38	—	0	3,12	0	2,81	72
		12,49		—	0	2,63	—	3,30	72
		22,77		—	—	3,72	—	1,48	140
		21,2		—	—	3,48	—	1,85	140
Kohlensaures Guanidin	17,7	39,2	46,6	28,37	0	0	—	—	48
		37,0		27,41	0	0	—	—	48
		—		21,07	0	0	—	—	96
Histidindichlorhydrat	13,97	16,5	18,32	18,36	0	4,08	—	—	48
		17,9		18,34	—	3,95	—	—	48
		26,67		18,24	—	4,26	6,10	6,23	70
		27,25		18,30	—	4,28	6,10	6,23	70
3,4,5-Trime-thyloxazol	28,8	31,86	12,52	8,55	0	1,03	—	—	70
		32,81		8,60	0	1,00	—	—	70

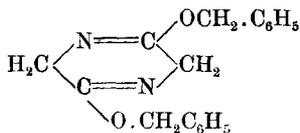
Es sei hervorgehoben, daß unter denselben Verhältnissen salzsaures Methylamin nicht in Reaktion trat. Einen bedeutenden Einfluß übte auf die Oxydation der Amino- und Iminogruppen die Anwesenheit von Carbonylen und Carboxylen aus. So werden Glykokoll und Alanin nicht oxydiert. Ebenso verhalten sich die Amid- und Imidgruppen: Harnstoff, Oxamid, Hippursäure und deren Ester reagieren nicht mit Perbenzoesäure. Sogar umgekehrt konnte man in einigen Fällen beobachten, daß die Perbenzoesäure sich in ihrer Gegenwart langsamer zersetzte. Z. B. war bei der Oxydation von Glycinanhydrid und Glykokoll die Menge des zum Titrieren verbrauchten Hyposulfit kleiner als beim Titrieren der Kontrollversuche. Daraus folgt, daß unter den von uns gewählten Verhältnissen die Aminosäuren ebenso wie die Amid- und Imidgruppierungen mit Perbenzoesäure nicht reagieren. Auf Grund dieser Ergebnisse konnte man zur Untersuchung der beweglichen Doppelbindung zwischen Kohlenstoff-Stickstoff übergehen.

Wir wandten uns zuerst den von Abderhalden und Schwab<sup>9)</sup> enolisierten Anhydriden zu. Wie schon früher bemerkt wurde, waren die von diesen Forschern erhaltenen Anhydride verhältnismäßig stabil und gingen nicht in Chloroformlösung in die Ketoform über. Dennoch lieferten die in unserer Arbeit durchgeführten Versuche zur Darstellung und Oxydation enolisierter Anhydride negative Resultate. Glycinanhydrid wurde durch Erhitzen mit Anilin in die Enolform übergeführt; Alanilglycinanhydrid erhielt man aus dem entsprechenden Dipeptid durch Erwärmen mit Diphenylamin. Beide Verbindungen entfärbten Soda-Permanganatlösung verhältnismäßig langsam. Mit Perbenzoesäure reagierten sie nicht.

Darauf wurden Harnsäure und Isoleucyl-hydantoin untersucht. Es ist bekannt, daß Harnsäure schwach saure Eigenschaften besitzt, di- und monobasische Salze und Derivate am Stickstoff sowie am Sauerstoff bilden kann. Biltz und Max<sup>23)</sup> zeigten, daß Harnsäure zwei bewegliche Wasserstoffatome in der Stellung 3:7 besitzt. In der Tat bildeten sich bei der Einwirkung von Diazomethan auf Dimethylharnsäure Methoxylderivate im Falle, wenn die Wasserstoffe am dritten und siebenten Stickstoff frei waren.

Die sauren Eigenschaften des Isoleucylhydantoin wurden von Konnikov<sup>29)</sup> durch potentiometrische Titrierung nachgewiesen. Doch reagierte die Perbenzoesäure weder mit Harnsäure noch mit Isoleucylhydantoin. Diese negativen Resultate konnten durch eine von den drei folgenden Ursachen hervorgerufen werden: 1. keine von diesen Verbindungen gibt Enolformen: 2. unter den von uns gewählten Bedingungen ist das Gleichgewicht nach der Seite der Ketoform verschoben: 3. aus unbekanntem Gründen reagiert die Perbenzoesäure mit der Doppelbindung solcher Heterocyklen nicht.

Da für die Harnsäure Derivate am Sauerstoff bekannt sind, fällt die erste Ursache weg. Zur Entscheidung, welche von den zwei übrigen richtig ist, wurden entsprechende Enol-derivate dargestellt, nämlich das Kaliumsalz der Harnsäure nach Gudzent<sup>30)</sup> und das o,o-Dibenzylglycinanhydrid nach Karrer und Gränacher<sup>10)</sup>, dem die Autoren folgende Struktur zuschreiben:



Wie man voraussetzen konnte, reagierten beide Verbindungen mit Perbenzoesäure ganz analog den früher beschriebenen Verbindungen, die unbewegliche Doppelbindungen besaßen (vgl. Tab. 2).

Tabelle 2

Wirkung von Perbenzoesäure auf Kalium-monoureat und den o, o-Dibenzyläther des Glycinanhydrids

Substanz	Substanzmenge	Wirkungsdauer in Stdn.	Gebundene O <sub>2</sub> -Menge in %		Gesamt-N in %		Ammoniak-N in %
			ber.	gef.	ber.	gef.	gef.
K-Monoureat	0,6086	60	15,53	7,68	26,25	3,47	0
	0,5229			9,4		7,2	0
	0,3080			10,7		6,48	0
	0,8112			10,9		7,07	0
o, o-Dibenzyläther des Glycinaldehyds	0,0748	48	21,4	11,37	9,53	9,42	3,15
	0,0470			9,94			
	0,1134			13,0			
	0,1872	10,3	3,20				
	0,1786	60	16,75	9,48			
0,0513		14,3					

Die Wirkung der Perbenzoesäure beginnt also sogleich, nachdem die Doppelbindung zwischen Kohlenstoff-Stickstoff immobilisiert ist. Das vor der Befestigung der Doppelbindung erhaltene negative Resultat zeigt, daß das Gleichgewicht zur Seite der Ketoform verschoben war. Da der Nachweis der sich im Gleichgewicht (labilen) befindenden Doppelbindung zwischen Kohlenstoff-Stickstoff dennoch sehr wesentlich erschien, wurde ein Versuch gemacht, das Gleichgewicht zur Enolseite durch Alkalisierung der Lösung mit etwas Magnesiumoxyd zu verschieben. Dieser Zusatz führte aber zu einem ganz unerwarteten Resultat: nicht nur Harnsäure und Isoleucylhydantoin, sondern auch Glykokoll bekamen die Fähigkeit, mit Perbenzoesäure zu reagieren. Es wurde angenommen, daß Perbenzoesäure in Anwesenheit von Magnesiumoxyd ein nach

Baeyer sehr unstabiles, mit Spuren von Feuchtigkeit unter Bildung von Wasserstoffperoxyd zerfallendes Magnesiumsalz bildet. Das entstandene Superoxyd oxydiert dann die Aminogruppen in üblicher Weise. Zur Prüfung dieser Annahme wurde der  $H_2O_2$ -Gehalt in einer Chloroformlösung von Perbenzoesäure mit Zusatz von MgO nach Clover und Houghton<sup>31)</sup> bestimmt. Es wurde aber kein Wasserstoffsperoxyd nachgewiesen. Also verliert die Perbenzoesäure in Anwesenheit von Magnesiumoxyd ihre Spezifität. Der positive Ausfall der Reaktion mit Glykokoll zwingt zu der Annahme, daß unter diesen Bedingungen die Ketoformen der Harnsäure und des Isoleucyl-hydantoinis auch reagieren könnten.

## Experimenteller Teil

### Untersuchungsmethoden

#### Darstellung von Perbenzoesäure

20 g Benzoylperoxyd wurden in 200 ccm Chloroform gelöst und zu der bis auf  $-5^\circ$  abgekühlten Lösung aus einem Tropftrichter bei starkem Rühren Natriumalkoholat (2 g Na + 80 ccm Alkohol) im Laufe von 4—6 Minuten zugegeben. Das ausgefallene Natriumsalz der Perbenzoesäure wurde in 400 ccm Eiswasser gelöst und nach der Entfernung der Chloroformschicht der Benzoyläthylester aus der wäßrigen Lösung durch zweimaliges Ausziehen mit Äther entfernt. Darauf wurde das Natriumsalz der Perbenzoesäure in wäßriger Lösung unter Kühlen und Rühren mit 10%iger Schwefelsäure zerlegt, die ausgeschiedene Perbenzoesäure in Chloroform aufgenommen und der Auszug 2 Tage lang mit wasserfreiem  $Na_2SO_4$  getrocknet. Die Ausbeute an Perbenzoesäure erreichte 75—80%. Ihre Konzentration in der Chloroformlösung wurde jodometrisch bestimmt. Gewöhnlich schwankte sie zwischen 0,2—0,3 N.

#### Oxydation der organischen stickstoffhaltigen Verbindungen

Eine abgewogene Substanzmenge der betreffenden Verbindung wurde in einem Erlenmeyer-Kolben mit eingeschlifftem Stöpsel mit Perbenzoesäure behandelt. Das Verhältnis des untersuchten Stoffes zur Perbenzoesäure war gleich 1:3. Neben jedem Versuch wurde auch eine Kontrolle angestellt. Nach

einem bestimmten Zeitabschnitt wurde die ganze Lösung oder ein Teil davon und von der Kontrollösung jodometrisch titriert. Aus der Differenz zwischen der Kontrolle und dem Versuch wurde die Menge des bei der Oxydation verbrauchten Sauerstoffes berechnet. Nach der Titration machte man die Lösung mit Alkali schwach sauer und bestimmte darin die folgenden Stickstoffformen: Ammoniakstickstoff nach Longi, Amidstickstoff durch Kochen mit 15%iger HCl und nachfolgende Destillation des Ammoniaks nach Longi, Gesamtstickstoff nach Kjeldahl und durch Erhitzen mit Zinkstaub und Phenolschwefelsäure\*), Aminostickstoff nach van Slyke. In einigen Fällen wurde auch die Oxalsäure durch Fällern als Calciumsalz und Titrieren mit  $n/20 \cdot \text{KMnO}_4$  bestimmt.

#### Bestimmung der Keto-enol-doppelbindung in Acetessigester, Benzoylacetone und Dimethyldihydroresorcin

Bestimmte Mengen von Acetessigester, Benzoylacetone und Dimethyldihydroresorcin wurden in Chloroformlösung mit Perbenzoesäure im Verhältnis 1:3 versetzt. Nach den in Tab. 3 angegebenen Zeitabschnitten wurden die Lösungen und die Kontrollversuche jodometrisch titriert.

Tabelle 3  
Wirkung der Perbenzoesäure auf die Verbindungen  
mit einer Doppelbindung zwischen Kohlenstoff-Kohlenstoff

Substanz	Versuchsdauer	Substanzmenge	Menge des verbr. Sauerstoffs in %	
			berechnet	gefunden
Acetessigester . . .	3 Min.	1,4961	0,898	0
	1 $\frac{1}{2}$ Stdn.	1,6925		0,37
	36 "	1,6279		1,57
	36 "	1,896		1,41
	48 "	2,4141		3,08
	48 "	2,1772		2,75
Benzoylacetone . . .	48 "	0,1849	11,94	25,42
	48 "	0,1815		24,47
Dimethyldihydroresorcin	72 "	0,1430	27	23,8
	72 "	0,1344		25,0
	8 Tage	0,1403		40
		0,1301		38,2

\*) Stickstoffbestimmung nach Jodlbauer, Ztschr. analyt. Chem. 26, 92 (1887).

## Einwirkung von Perbenzoesäure auf Verbindungen mit einer Doppelbindung zwischen Kohlenstoff-Stickstoff

*Oxydation des Bariumsalses des Benzyliden-glykokolls<sup>22)</sup>  
durch Perbenzoesäure*

Zu einer abgewogenen Menge des Bariumsalses von Benzyliden-glykokoll wurde eine Chloroformlösung der Perbenzoesäure zugesetzt. Nach einer bestimmten, in Tab. 4 angegebenen Zeit wurden die Lösungen jodometrisch titriert und zur Bestimmung von Ammoniak, Aminostickstoff nach Mikro-van-Slyke und von Oxalsäure verwandt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengestellt.

Tabelle 4  
Oxydation des Bariumsalses von Benzyliden-glykokoll

Substanz	Substanzmenge	Zeitdauer in Stdn.	Menge des verbr. Sauerstoffs in %		Ammoniak-N in %		Amino-N in %		Oxalsäure in %
			ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	
Ba-Salz des Benzyliden-glykokolls	0,2330	72	6,94	14,42	0	3,12	0	2,81	
	0,2028	72		12,49	0	2,63	0	3,30	
	0,2115	140		22,77	0	3,72	0	1,48	
	0,2160	140		21,2	0	3,48	0	1,85	

Die Anwesenheit von Aminostickstoff ist wie es scheint dadurch bedingt, daß ein Teil des ungelöst gebliebenen Benzyliden-glykokollsalses sich nach dem Ansäuern in der wäßrigen Schicht auflöste und zu Glykokoll und Benzaldehyd zerfiel.

**Oxydation von 3,4,5-Trimethyloxazol, Guanidin  
und Histidinchlorhydrat durch Perbenzoesäure**

Zu bestimmten Mengen der bezeichneten Verbindungen wurde eine Chloroformlösung von Perbenzoesäure zugesetzt. Nach den in der Tab. 5 gezeigten Zeitabschnitten wurden die Versuchs- und die Kontrollösungen jodometrisch titriert. Wie es aus den Werten der Tab. 5 folgt, werden diese Verbindungen ziemlich stark oxydiert, obwohl kohlen-saures Guanidin und Histidinchlorhydrat in Chloroform unlöslich sind. Die Oxydation führt zum Zerfall der Moleküle unter Ammoniakeliminierung oder zu einem Übergang des Stickstoffes in solche Formen, die nach Kjeldahl nicht bestimmt werden. Dabei reagiert die

Histidinaminogruppe nur bei dauerndem Einwirken der Perbenzoesäure.

Tabelle 5

Einwirkung von Perbenzoesäure auf 3,4,5-Trimethyloxazol, Kohlensaures Guanidin und Histidin-dichlorhydrat

Substanz	Substanz- menge	Zeitdauer in Stdn.	Menge des verbrauchten Sauerstoffs in %		Gesamt-N in %		Ammo- niak-N in %		Amino-N in %	
			ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.
Guanidin- carb.	0,103	48	17,7	39,2	46,6	28,33	0	0	—	—
	0,1013	48		37,0		27,41		0		—
	0,2255	96		—		21,07		0		—
Trimethyl- oxazol-3,4,5	0,3894	48	28,8	31,86	12,52	8,55	0	1,03	—	—
	0,2077	48		32,81		8,60		1,00		—
Histidin- 2 HCl	0,1857	48	13,97	16,5	18,32	18,36	0	4,08		—
	0,1856	48		17,9		18,34		3,95		—
	0,1602	70		26,27		18,24		4,26	6,10	6,23
	0,1602	70		27,25		18,30		4,28	6,10	6,28
	0,5238	240		—		18,24	10,02		8,22	6,10

### Wirkung der Perbenzoesäure auf stickstoffhaltige Verbindungen ohne Doppelbindung

A. Amine. Die Oxydation der Amine wurde ebenso wie in den vorigen Serien durchgeführt. Die Lösungen wurden nach dem Titrieren mit Thiosulfat, im Vakuum auf 100 ccm eingedampft und in aliquoten Teilen davon der Stickstoff nach Kjeldahl und mit Phenolschwefelsäure und Zinkstaub bestimmt. Die Abwesenheit von Ammoniak wurde qualitativ mit Hilfe von François-Reagens festgestellt. Es wurden auf diese Weise Diäthylamin, Äthylamin in Chloroformlösung und salzsaures Äthylamin untersucht. Die Resultate sind auf der Tab. 6 gegeben. Sie zeigen, daß Perbenzoesäure mit den aliphatischen Aminen reagiert, aber mit dem Aminsalt nicht in Reaktion tritt.

B. Aminosäuren und Säureamide reagieren mit Perbenzoesäure nicht.

Glykokoll: Einwaagen von 0,2054; 0,3041; 0,1886 g, standen mit einer Chloroformlösung von Perbenzoesäure während 90 Stunden. Es fand kein Sauerstoffverbrauch statt.

Tabelle 6  
Wirkung der Perbenzoesäure auf aliphatische Amine

Substanz	Substanz- menge	Zeitdauer in Stdn.	Menge des verbrauchten Sauerstoffs in %		Gesamt-N nach Kjeldahl		Gesamt-N (mit Phenol- schwefel- säure)	
			ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.
Diäthylamin	0,6906	48	0	6,21	19,72	12,58	19,72	19,69
	0,7836	48		5,47		14,23		19,72
Äthylamin	0,0355	40	0	15,77	31,11	15,51	31,11	22,25
	0,0355	40		15,67		15,51		22,25
Äthylamin- chlorhydrat	0,0991	72	0	0				
	0,1080	72	0	0				

Alanin: 0,0983; 0,1986 g mit einer Chloroformlösung von Perbenzoesäure während 72 Stunden. Kein Sauerstoffverbrauch.

Oxamid: 0,2019; 0,2016 g mit einer Chloroformlösung von Perbenzoesäure im Laufe von 48 Stunden. Kein Sauerstoffverbrauch.

Harnstoff: 0,2005; 0,2011 g mit einer Chloroformlösung von Perbenzoesäure im Laufe von 48 Stunden. Kein Sauerstoffverbrauch.

Es muß bemerkt werden, daß man in manchen Fällen eine Hemmung des Perbenzoesäurezerfalls beobachten konnte. So wurden beim Titrieren einer Glykokoll enthaltenden Chloroformlösung der Perbenzoesäure 31,2 und 31,25 ccm Thiosulfat verbraucht und beim Titrieren der Kontrollversuche 25,7 und 25,3 ccm.

### Wirkung der Perbenzoesäure auf die Verbindungen mit einer beweglichen Doppelbindung zwischen Kohlenstoff-Stickstoff

*Darstellung der enolisierten Anhydride:  
Glycinanhydrid nach Abderhalden und Schwab*

4,5 g Glycinanhydrid wurden im Stickstoffstrom während einer Stunde auf einem Ölbad von 205—210° mit Anilin erwärmt, das über Natrium getrocknet und im Vakuum destilliert war. Der Niederschlag wurde vom Anilin mit Äther gründlich ausgewaschen und auf sein Verhalten gegen Permanganat in Sodalösung geprüft. Eine Entfärbung trat nur langsam ein.

Eine andere Portion des Anhydrids wurde auf einem Ölbad bei 205—210° unter Rühren aber ohne Stickstoffstrom während einer Stunde mit Anilin behandelt. Der größte Teil des Anhydrids ging dabei in Lösung, die sich dunkel färbte. Nach dem Entfernen des Anilins verhielt sich das Anhydrid ebenso wie im ersten Fall.

### Glycyl-alanin-anhydrid

2 g Glycyl-alanin wurden langsam mit 2 g Diphenylamin erwärmt. Die Reaktion begann bei 150°. Mit steigender Temperatur verlief sie immer schneller und hörte bei 220° auf. Um das Diphenylamin zu entfernen, wurde das erhaltene Produkt im Soxhletapparat bis zum Verschwinden der Reaktion mit Salpetersäure auf Diphenylamin durch Äther extrahiert. Das erhaltene Anhydrid zeigte eine positive Pikrin- und Xantoproteinreaktion; die Ninhydrinreaktion war negativ. Permanganat-Sodalösung entfärbte es allmählich.

### Wirkung von Perbenzoesäure auf enolisierte Anhydride, Harnsäure, Hippursäure, deren Äthylester und Leucyl-hydantoin

Die Versuche wurden ebenso wie in den vorigen Serien durchgeführt. Wie man aus dem weiter angeführten Material sehen kann, reagierte keine der Verbindungen mit Perbenzoesäure.

Glycinanhydrid enolisiert. Einwaagen zu 0,0504, 0,0584, 0,0551 g. Nach 7 Tagen mit einer Chloroformlösung von Perbenzoesäure ließ sich kein Sauerstoffverbrauch feststellen.

Glycyl-alanin-anhydrid enolisiert. Einwaagen zu 0,0977, 0,1006 g; 48 Stunden mit einer Chloroformlösung der Perbenzoesäure.

Einwaagen zu 0,0992, 0,3116 g; 72 Stunden mit einer Chloroformlösung von Perbenzoesäure. Sauerstoff wurde nicht gebunden.

Hippursäure. 0,1691, 0,1891 g; nach 48 Stunden mit einer Chloroformlösung der Perbenzoesäure. Kein Sauerstoffverbrauch.

Äthylester der Hippursäure. 0,0995, 0,0934 g.

Isoleucyl-hydantoin. 0,1000, 0,1007 g. Nach 48 Stunden mit einer Chloroformlösung der Perbenzoesäure war in beiden Fällen kein Sauerstoff verbraucht.

Da es bei diesen Versuchen nicht gelungen war, die Doppelbindung nachzuweisen, wurden solche Präparate dargestellt, in denen diese Doppelbindung immobilisiert war, nämlich: das Kaliumsalz der Harnsäure und der Dibenzyläther von Glycinanhydrid.

Das K-Salz der Harnsäure wurde nach Gudzent dargestellt.

Das *o,o*-Dibenzyläther von Glycinanhydrid wurde nach Karrer und Gränacher dargestellt. Dabei wurden folgende Abänderungen gemacht.

10 g Glycinanhydrid wurden in heißem Wasser gelöst, mit einer doppelten Menge Silbernitrat vermischt und dann vorsichtig mit Ammoniak versetzt. Sofort fiel das schwerlösliche Silbersalz des Glycinanhydrids aus. Es wurde schnell abfiltriert und mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen. 5 g dieses Silbersalzes wurden mit 8 g frisch destillierten Benzylchlorids auf einem Wasserbad während 6 Stunden erwärmt, wonach man die Benzylchloridlösung abgöß und den Niederschlag im Soxhletapparat mit Chloroform extrahierte. Der Chloroformextrakt wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand zusammen mit dem aus der Benzylchloridlösung abgeschiedenen Produkt aus wäbrigem Alkohol umkrystallisiert.

Stickstoffgehalt: berechnet — 9,53; gefunden — 9,48. Kaliummonourat und Glycinanhydrid-dibenzyläther wurden von Perbenzoesäure oxydiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 angeführt.

#### Wirkung der Perbenzoesäure auf stickstoffhaltige Verbindungen in Gegenwart von Magnesiumoxyd

Die Versuche wurden wie in den vorigen Reihen durchgeführt, nur wurden zu den Chloroformlösungen 0,5 g Magnesiumoxyd beigefügt. Der Zusatz von MgO beeinflusst die Zersetzungsgeschwindigkeit der Perbenzoesäure selbst und hebt die Spezifität ihrer Wirkung auf. Der Oxydation wurden Glykokoll, Glycinanhydrid, Histidindichlorhydrat und Harnsäure unterworfen. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 zusammengestellt.

Tabelle 7

 Wirkung der Perbenzoesäure auf Kalium-monoureat  
 und den o,o-Dibenzyläther des Glycinanhydrids

Substanz	Substanzmenge	Wirkungsdauer in Stdn.	Menge des verbrauchten Sauerstoffs in %		Gesamt-N in %		Ammoniak-N in %	
			ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.
K-Monoureat	0,6086	60	15,53	7,68	26,25	3,47	0	0
	0,5229			9,4		7,2		0
	0,3080			10,7		6,48		0
	0,3112			10,9		7,07		0
o,o-Dibenzyläther des Glycinanhydrids	0,0748	48	21,4	11,37	9,53	—	0	
	0,0470			9,94				
	0,1134			13,0				
	0,1872	10,3	9,57	3,20				
	0,1786	60	16,75	9,48	3,20			
0,0513	14,3							

Tabelle 8

Wirkung von Perbenzoesäure in Gegenwart von MgO

Substanz	Substanzmenge	Wirkungsdauer in Stdn.	Menge des verbrauchten Sauerstoffs in %		Ammoniak-N in %	
			ber.	gef.	ber.	gef.
Glykokoll	0,1337	24	0	14,85	0	1,88
	0,2140	26		11,80		
Glycinanhydrid	0,2102	26	0	0,965		
	0,2080	26		1,02		
Histidin-dichlorhydrat	0,1273	24	13,97	9,92	0	4,34
	0,1252			8,48		4,10
Harnsäure	0,3145	26	38,9	7,67		
	0,3168	26		7,58		

### Bestimmung des Gehaltes an Wasserstoffperoxyd in Lösungen der Perbenzoesäure

Nach den Angaben von Clover und Houghton<sup>31)</sup> reduziert Peressigsäure nicht Permanganat und oxydiert nicht in verdünnten Lösungen  $MnSO_4$  und  $MnO_2$ . Dieses Verhalten erlaubt es in ein und denselben Lösungen den Gehalt an Peressigsäure und Wasserstoffperoxyd zu bestimmen. Wir

wandten das gleiche Verfahren zum Nachweis von Wasserstoffperoxyd in Anwesenheit von Perbenzoesäure an.

Es wurden je 0,5 g MgO in die Chloroformlösung der Perbenzoesäure gegeben und einige Zeit stehen gelassen. Darauf wurde ein Teil der Lösung jodometrisch analysiert, während der andere mit  $n/20$ -KMnO<sub>4</sub> titriert wurde. Die Werte der Tab. 9 zeigen, daß in den Chloroformlösungen der Perbenzoesäure, selbst in Gegenwart von MgO, kein Wasserstoffperoxyd gebildet wird. Dagegen entsteht es in wäßrigen angesäuerten Lösungen. Seine Bildung verläuft allmählich.

Tabelle 9

Titration der MgO enthaltenden Chloroformlösungen der Perbenzoesäure mit Permanganat und Thiosulfat

	Temperatur in °	Wirkungsdauer in Stdn.	Verbraucht $n/10$ - Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> in ccm	Verbraucht $n/20$ - KMnO <sub>4</sub> in ccm
10 ccm Chloroformlösung der Perbenzoesäure + 0,5 g MgO . . . .	20	24	31,3	0
desgl.	20	24	31,2	0
desgl.	- 2	24	41,2	0
10 ccm wäßrige Lösung der Perbenzoesäure + 0,5 g MgO . . . .	20	gleich nach Darstellung	28,0	1
desgl.	- 2	16	—	1,5
10 ccm Chloroformlösung der Perbenzoesäure + 0,5 g MgO . . . .	20	24	31,2	0
Die gleiche Lösung mit H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> angesäuert nach Stehen während .		4	—	5
		16 (12)	—	9,6
		18 (2)	—	2
		47 (23)	—	12

In der Kolonne „Wirkungsdauer“ ist in Klammern der Zeitabschnitt bis zur Titration angegeben.

### Schlußfolgerungen

1. Die Reaktion der Doppelbindung zwischen Kohlenstoff-Stickstoff mit Perbenzoesäure ist von einem tiefen Zerfall der Moleküle begleitet. Die Reaktion findet in verschiedenen Klassen der organischen Verbindungen statt.

2. Die Doppelbindung zwischen Kohlenstoff–Stickstoff, die infolge einer tautomeren Umlagerung gebildet wird, kann nach ihrer Festlegung nachgewiesen werden.

3. Die Amino- und Iminogruppen reagieren mit Perbenzoesäure, aber ihre Oxydationsgeschwindigkeit wird durch die Anwesenheit des Carboxyls beeinflusst (Versuche mit Alanin, Glykokoll, Histidin).

4. Die Amid- und Imidgruppen reagieren in den von uns gewählten Bedingungen mit Perbenzoesäure nicht.

5. Perbenzoesäure kann als qualitatives Reagens für den Nachweis der Doppelbindung zwischen Kohlenstoff–Stickstoff Verwendung finden.

### Literatur

1. Kossel u. Weiss, *Ztschr. physiol. Chem.* **59**, 492 (1909); **60**, 311 (1909); **68**, 165 (1910).
2. Dakin, *Journ. Biol. Chem. B* **13**, 357 (1912).
3. Levene u. Bass, *Journ. Biol. Chem.* **74**, 715 (1927).
4. Levene u. Pfaltz, *Journ. Biol. Chem.* **68**, 277 (1926); Levene u. Steiger, *Journ. Biol. Chem.* **76**, 299 (1928).
5. Groh u. Hanák, *Ztschr. physiol. Chem.* **190**, 168 (1930).
6. Gawrilow u. Simskaja, *Biochem. Ztschr.* **238**, 46 (1931).
7. Konnikow, Privatmitteilung.
8. Bergmann, Zervas, Salzmann u. Schleich, *Ztschr. physiol. Chem.* **224**, 17 (1931).
9. Abderhalden u. Schwab, *Ztschr. physiol. Chem.* **149**, 100, 288 (1925); **153**, 83 (1926); Abderhalden u. Rossner, *Ztschr. physiol. Chem.* **152**, 89 (1926); Abderhalden u. Gebelein, *Ztschr. physiol. Chem.* **163**, 145 (1927); **152**, 125 (1926).
10. Karrer u. Gränacher, *Helv. chim. Acta* **6**, 1108 (1923).
11. Baeyer u. Oekonomides, *Ber.* **15**, 2100 (1882); Titherley, *Journ. chem. Soc., London* **71**, 453 (1900); **72**, 391 (1901); Ley u. Schäfer, *Ber.* **35**, 1316 (1902); Ley u. Kissel, *Ber.* **32**, 1357 (1899); Blächer, *Ber.* **28**, 432 (1897); Tafel u. Enoch, *Ber.* **23**, 104 (1889).
12. W. Wislicenus, *Ann. Chem.* **312**, 55 (1900); *Ztschr. angew. Chem.* **34**, 257 (1921).
13. Arndt u. Martius, *Ann. Chem.* **499**, 228 (1932).
14. Biltz u. Max, *Ber.* **53**, 2327 (1930).
15. Arndt u. Scholz, *Ann. Chem.* **510**, 62 (1934).
16. Labruto, *Gazz. chim. ital.* **63**, 266 (1933).
17. Auwers, *Ztschr. physik. Chem.* **30**, 529 (1899).
18. Hantzsch, *Ann. Chem.* **296**, 84 (1897); *Ber.* **64**, 661 (1931).
19. Kohlrausch u. Pongratz, *Ber.* **67**, 982 (1934).
20. Prilejajev, *Organische Peroxyde* (1912).

21. Bodendorf, Arch. d. Pharm. u. Ber. d. deutsch. Pharm. Ges. **268**, 491 (1930).
22. Nametkin u. Brüssowa, dies. Journ. [2] **112**, 169 (1926).
23. Nametkin u. Abakumowskaja, Naphta Wirtsch. II, 58 (1926).
24. Baeyer u. Villiger, Ber. **33**, 1569 (1900).
25. Bergmann, Ulpts u. Witte, Ber. **56**, 679 (1923).
26. Meisenheimer, Ber. **52**, 1667 (1919).
27. Prilejajev, Weretschuk u. Tir, Ber. d. belorussisch. Akademie Nr. 17—18, I (1928).
28. Bamberger, Ber. **35**, 4293 (1902).
29. Konnikow, Privatmitteilung.
30. Gudzent, Ztschr. physiol. Chem. **56**, 150 (1908).
31. Clover u. Houghton, Journ. Amer. chem. Soc. **32**, 43 (1904).
32. Bergmann, Enslin u. Zervas, Ber. **58**, 1054 (1925).