

Über O-Acylderivate einiger biogener Oxyaminoverbindungen mit primären Aminogruppen.

(O-Essig- und Propionsäureester des Aneurinchloridhydrochlorids, O-Essigester des Tyrosin- und Glycyltyrosinhydrochlorids.)

Von

H. Bretschneider und K. Biemann.

Aus dem Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Innsbruck.

(Eingelangt am 2. Dez. 1949. Vorgelegt in der Sitzung am 8. Dez. 1949.)

In einer vorhergehenden Arbeitsreihe beschäftigten wir uns aus präparativen Gründen mit dem Problem der selektiven Acetylierung bzw. Acylierung von Oxyaminoverbindungen, deren Oxygruppen aliphatischer oder aromatischer Natur und deren Aminogruppen sekundärer oder primärer Natur waren. *Aminogruppen* reagieren so rasch, daß es in einer Verbindung mit Phenol-, Carbinolhydroxyl und Methylaminogruppe wie dem Adrianol in Eisessig-Essigsäureanhydrid gelingt, eine *selektive Acetylierung* an der Aminogruppe zu erzielen¹. Aber auch in alkalischer Lösung von Phenolbasen gelingt es durch dosierte Acylchloridzugabe leicht, die N-Acetylgruppe selektiv zu erfassen².

Für die *selektive Acetylierung der Hydroxylgruppen* in Oxyaminoverbindungen mit nichttertiärer Aminogruppe wurde in dem Verfahren der *Salzacylierung* ein Weg gezeigt, der sich an zahlreichen Abkömmlingen der Phenylalkanolamine bewährte³. Es erschien uns wert, den Geltungsbereich dieses Verfahrens an ganz anderen Verbindungsklassen zu prüfen.

Als erste Verbindung wählten wir das *Aneurin* (Vitamin B₁) (Formel Ia), dessen O-Acetylderivat (Formel Ib) auch von physiologischer Be-

¹ H. Bretschneider, 7. Mittlg. über Studien auf dem Gebiete der Phenylalkanolamine, Mh. Chem. 80, 517 (1949).

² H. Bretschneider, 4. Mittlg., Mh. Chem. 78, 71 (1948).

³ H. Bretschneider, 2. Mittlg., Mh. Chem. 76, 368 (1947).

deutung zu sein scheint und auf den isolierten Darm nach *Birkhäuser*⁴ im Gegensatz zum nichtacetylierten Vitamin eine dem Acetylcholin ähnliche Wirkung aufweist. Das O-Acetylderivat wurde unter anderem von *R. Kuhn*⁵ durch Zusammenfügen des O-acetylierten Thiazolringes (4-Methyl-5-acetoxyäthylthiazol) mit dem Pyrimidinteil (2-Methyl-4-amino-5-brommethyl-pyrimidinsalz) erhalten. Dieselbe Verbindung synthetisierte auch *Todd*⁶.

Wird Aneurinchloridhydrochlorid der besonders schonenden Ausführung der Salzacylierung unterworfen, welche sich flüssigen Schwefeldioxyds als Lösungsmittel bedient, so wird durch Einwirkung von Acetylchlorid das oben erwähnte O-Acetylaneurin und durch Einwirkung von Propionylchlorid das Propionat (Ic) in fast quantitativer Ausbeute erhalten. Die sichere Feststellung des Vorliegens von O-Acetylaneurin begegnete gewissen Schwierigkeiten. Der von uns gefundene Zersetzungspunkt (231 bis 233°) lag um einiges höher als der von *Bergel* und *Todd* (205 bis 207°) angegebene, eine Differenz, die auch unter Berücksichtigung des Vorliegens von Zersetzungspunkten uns zu groß erschien. Den Schmp. des Pikrats des O-Acetylaneurins fanden wir hingegen so hoch wie von den englischen Autoren angegeben. N- und Cl-Analysen sprachen für das Vorliegen eines Dihydrats, die Acetylbestimmung versagte. Das noch nicht beschriebene Propionat des Aneurinchloridhydrochlorids erhielten wir in gutkristalliner Form vom Zersp. 216 bis 218,5°, der bei der Mischprobe mit dem Ausgangsmaterial wohl keine Depression ergab, doch stimmten N-, S- und Cl-Wert gut für die angenommene Formel. Um über den Sitz der Acylreste in beiden Estern eine sichere Aussage machen zu können, unterwarfen wir beide Ester der Sulfitspaltung nach *Williams*⁷ parallel mit der Spaltung des Aneurins selbst. Aus allen 3 Verbindungen wurde ein und dasselbe saure Spaltstück, die 2-Methyl-4-aminopyrimidin-5-methylensulfosäure (II) erhalten. Das Vorliegen einer Acylgruppe am N dieses Molekülteils ist durch die Analyse ausgeschlossen. Das basische Spaltstück ist im Falle des O-Acetylaneurins das ölige 4-Methyl-5-acetoxyäthyl-thiazol (IIIb), im Falle des Propionsäureesters der ebenfalls ölige Propionsäureester des 4-Methyl-5-oxyäthylthiazols (IIIc). Dies wurde durch Mischprobe der aus den öligen Estern erhaltenen, sehr gut kristallisierenden Pikrate bewiesen. Die Vergleichssubstanzen erhielt man durch Acetylierung bzw. Propionylierung von aus Aneurin erhaltenem 4-Methyl-5-oxyäthylthiazol (IIIa) und anschließende Überführung der öligen Ester in die Pikrate. Damit ist

⁴ *H. Birkhäuser*, Schweiz. med. Wschr. **69**, 648 (1939); **70**, 34 (1940).

⁵ *R. Kuhn*, *Th. Wieland* und *H. Huebschmann*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **259**, 48 (1939).

⁶ *F. Bergel* und *A. R. Todd*, J. chem. Soc. London **1938**, 27.

⁷ *R. Williams*, J. Amer. chem. Soc. **57**, 536 (1935).

bewiesen, daß die Salzacylierung auch an einem so komplizierten Molekül, wie dem Aneurin, zu einer selektiven Acylierung der Oxygruppe führt.

Im Hinblick auf manche geplante biochemische Fragestellung erschien es uns wichtig, als Modellsubstanzen die wichtige Aminosäure L-Tyrosin (Formel IV a), sowie ein einfaches Peptid derselben, das Glycyl-L-tyrosin (Formel V a), unserem Acetylierungsverfahren zu unterwerfen.

Während wir in der Literatur zunächst nur die Darstellung eines O,N-Diacetyl-L-tyrosins⁸ und eines N-Acetyl-L-tyrosins⁹ beschrieben fanden, erhielten wir infolge der Zeitumstände erst nach dem Abschluß dieser Arbeit Kenntnis, daß *Toennies* und Mitarbeiter¹⁰ auch die Darstellung des *O-Acetyl-L-tyrosins*, und zwar in Form der freien Aminosäure, beschrieben haben. *Toennis* acetylierte in Gegenwart von in Eisessig gelöster, überschüssiger Perchlorsäure mit überschüssigem Essigsäureanhydrid und fällte nach der Zerstörung des Essigsäureanhydridüberschusses durch Wasser und Bindung der Perchlorsäure an Amylamin das freie O-Acetyl-L-tyrosin mit einem Gemisch von Aceton und Äther.

L-Tyrosin gab nach dem Umsatz mit Acetylchlorid in HCl-gesättigtem Eisessig das schön kristallisierende O-Acetyl-L-tyrosinhydrochlorid (IV b) vom Zersp. 222 bis 223° (unkorr.) und der Drehung $[\alpha]_D^{20} = -11,0^\circ$ in Wasser. Außer den N- und Cl-Werten bestätigte auch die Acetylbestimmung das Vorliegen der gesuchten Verbindung. Die wäßrige Lösung des Hydrochlorids reagierte deutlich sauer. Von *Toennies* wurde das unserem Präparat entsprechende Hydrochlorid nicht dargestellt. Aus den von *Toennies* gemachten Drehungsangaben für die Base in Salzsäure läßt sich ein etwas niedrigerer Drehwert des Hydrochlorids berechnen ($[M]_D^{20} = -20,5^\circ$), als von uns gefunden wurde ($[M]_D^{20} = -28,5^\circ$). Trotzdem ist an dem Vorliegen des O-Acetylderivats IV b nicht zu zweifeln. Das von *Behr* und *Clarke*⁹ hergestellte N-Acetyltyrosin zeigt in n-HCl eine im Zahlenwert und Vorzeichen gänzlich verschiedene Drehung von $[M]_{546}^{22} = +103^\circ$. Ferner werden zwei auf das freie Phenolhydroxyl des Tyrosins ansprechende Farbreaktionen von IV b im Vergleich mit Tyrosin nicht gegeben: Es sind dies die *Folin*-Reaktion in der nach *Herriot*¹¹ modifizierten Ausführung bei pH 8 (positiver Ausfall bei pH 11 hingegen¹¹), ferner die Reaktion mit NaNO₂ in verd. Essigsäure.

Die Acetylierung des *Glycyl-L-tyrosins* (Formel V a) wurde zunächst in ähnlicher Art wie beim Tyrosin versucht. Man erhielt in einer Ausbeute von über 80% das schön kristallisierte Hydrochlorid des *O-Acetyl-*

⁸ *M. Bergmann* und *L. Zervas*, *Biochem. Z.* **203**, 280 (1928).

⁹ *L. D. Behr* und *H. T. Clarke*, *J. Amer. chem. Soc.* **54**, 1630 (1932). — *V. du Vigneaud* und *C. E. Meyer*, *J. biol. Chemistry* **98**, 295 (1932).

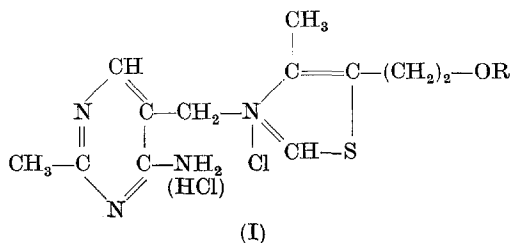
¹⁰ *G. Toennies* und Mitarbeiter, *J. biol. Chemistry* **144**, 203 (1942).

¹¹ *R. M. Herriott*, *J. gen. Physiol.* **19**, 298 (1935).

glycyl-tyrosins vom Schmp. 206° (unkorr. u. Zersp.) (Formel Vb). Die in Wasser viel leichter als das Ausgangsmaterial lösliche Verbindung zeigt einen Drehwert: von $[\alpha]_D = +41,6^{\circ}$ im gleichen Lösungsmittel und gibt die verlangten Analysenwerte für N, Cl und Acetyl. Für Modellzwecke untersuchten wir noch die Einwirkung von Acetylchlorid auf in flüssigem Schwefeldioxyd befindliches Glycyl-l-tyrosin. Dabei konnte das eben erwähnte Esterhydrochlorid sogar in noch etwas höherer Ausbeute erhalten werden. — Aus nicht ganz geklärten Ursachen entstand einmal bei einem solchen Ansatz ein Hydrochlorid vom tieferen Zersp. 195° , welches sich nach der Mischungprobe als nicht ident mit dem eben beschriebenen Esterhydrochlorid erwies. Nach der positiven Eisenchloridreaktion und der gut stimmenden Analyse muß das Hydrochlorid des Glycyl-l-tyrosin-methylesters vorliegen (Formel Vc). Es ist also bei diesem Versuch Verseifung des Acetylrestes und Veresterung der Carboxylgruppe eingetreten. Wir vermuten auf Grund von Beobachtungen *Freudenbergs*¹², daß vielleicht bei der Umkristallisation aus Methanol-Äther nicht restlos entferntes Acetylchlorid die Veresterung des Carboxyls und Verseifung der O-Acetylgruppe katalysiert hat. — Zum Beweis für die Bindung der Acetylgruppe am Sauerstoff im O-Acetyl-glycyl-l-tyrosinhydrochlorid verseiften wir diese Verbindung mit Bariumhydroxyd unter Bedingungen, unter welchen keine N-Acetylgruppe verseift werden dürfte, zum Glycyl-l-tyrosin (Formel Va) zurück.

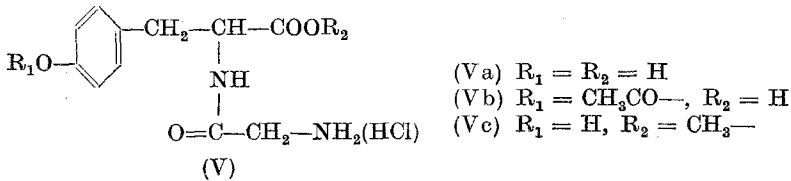
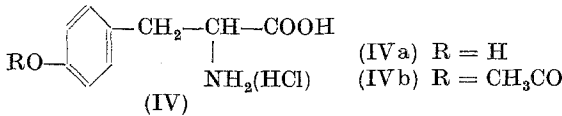
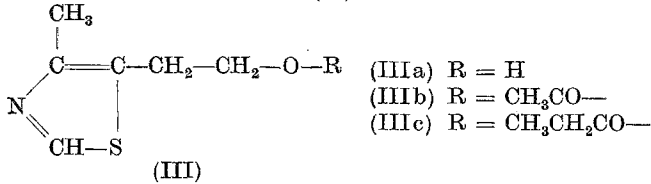
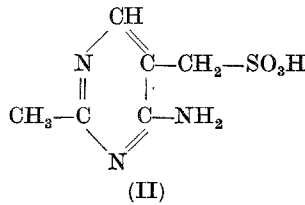
Die prinzipielle Verwendbarkeit unserer Arbeitsmethodik zur partiellen Acylierung von Hydroxylgruppen in verschiedenen Oxy- und Aminogruppen enthaltenden Verbindungen auch *peptidartiger* Natur scheint somit erwiesen. Wir möchten ferner annehmen, daß für präparative Zwecke unsere Methoden der O-Acylierung von phenolischen Hydroxylen infolge ihrer einfachen und raschen Ausführbarkeit den Vorzug gegenüber der von *Toennies* angegebenen Arbeitsweise verdienen. Ob sie auch auf hochmolekulare und empfindliche Eiweißmoleküle sich übertragen läßt, sollen weitere Versuche erweisen.

Formelübersicht.



- (Ia) R = H
 (Ib) R = CH₃CO—
 (Ic) R = CH₃CH₂CO—

¹² K. *Freudenberg*, Ber. dtsch. chem. Ges. 74, 162 (1941).



Experimenteller Teil.

Acetylierung von Aneurinchlorid-hydrochlorid (Ia) in flüssigem Schwefeldioxyd mit Acetylchlorid.

1,5 g Ia wurden in 25 ccm flüssigem SO₂ gelöst und mit 5 ccm Acetylchlorid versetzt. Es entstand eine milchige Trübung, die sich zuerst als Öl abschied, beim Umschütteln aber leicht in Lösung gebracht wurde. Das Reaktionsgefäß wurde mit einem Trockengelröhrchen verschlossen und in Eis-Kochsalz gestellt. Nach 16stündigem Stehen wurde das SO₂ durch Einstellen des Kolbens in warmes Wasser verdampft. Der Rückstand, ein weißer Kristallbrei, wurde noch 3mal mit zirka 50 ccm absol. Äther digeriert und im Wasserstrahlvak. bei 40° Badtemp. der Trockenrest hergestellt. Zersp. 231 bis 233°. Zur Entfernung von noch immer anhaftendem Acetylchlorid wurde auf der Nutsche bis zur Geruchlosigkeit mit absol. Äther gewaschen. Der Zersp. war gleich geblieben: 231 bis 233°. 1,65 g (= 97,5% Ausbeute) O-Acetyl-aneurin-chlorid-hydrochlorid (Ib).

Ib: C₁₄H₂₀O₂N₄Cl₂S (379,3). Ber. C 44,33, H 5,32, N 14,7, Cl 18,69, S 8,46.

Monohydrat: C₁₄H₂₀O₂N₄Cl₂S · H₂O (397,3). Ber. C 42,32, H 5,58, N 14,10, Cl 17,85, S 8,08.

Dihydrat: C₁₄H₂₀O₂N₄Cl₂S · 2 H₂O (415,3). Ber. C 40,49, H 5,83, N 13,49, Cl 17,07, S 7,74.

Gef. C 40,91, H 5,84, N 13,10, 13,08, Cl 16,98, S 7,32.

Pikrat. Zur Vermeidung einer Umesterung durch Säurespuren aus etwa noch vorhandenem Säurechlorid wurden 54 mg (Ib) in der Kälte in 10 ccm abs. Alkohol gelöst und langsam 0,75 ccm 10%ige alkohol. Pikrinsäurelösung eingetroppt, mit dem gleichen Volum Äther versetzt und in Kältemischung gestellt. Die mit Äther gewaschenen und bei 100°/1 mm getrockneten Kristalle zeigten einen Schmp. von 162 bis 165° (Literatur 176°⁶). Aus heißem Alkohol umkristallisiert: Tafeln, 35 mg, Schmp. 174 bis 177°.

Propionylfrierung von Aneurinchlorid-hydrochlorid (Ia) in flüssigem Schwefeldioxyd mit Propionylchlorid.

Wie im vorigen Versuch wurden 1,5 g (Ia) in 25 ccm flüssigem SO₂ mit 5 ccm Propionylchlorid umgesetzt und aufgearbeitet. Der Trockenrest enthielt noch beträchtliche Mengen Säurechlorid. Zersp. 199 bis 202°. Nach 5maligem Digerieren auf der Nutsche mit abs. Äther hatte sich der Zersp. etwas erhöht: 202 bis 205°. 1,67 g (Ic) (= 98,5% Ausbeute). — Zur Analyse wurden 1,45 g (Ic) in 30 ccm abs. Alkohol unter mäßiger Erwärmung gelöst, im Vak. bis zur beginnenden Kristallisation eingengt, mit Äther nachgefällt und über Nacht in Eis gestellt: 1,002 g Kristallinat, bei 100°/1 mm getrocknet. Zersp. 216 bis 218,5°.

Aus der Mutterlauge konnte durch weiteres Einengen und Ätherzugabe noch 111 mg (Ic) erhalten werden. Zersp. 216 bis 217,5°.

(Ic): C₁₅H₂₂O₂N₄Cl₂S (393,3). Ber. N 14,24, Cl 18,03, S 8,15.

Gef. N 14,07, Cl 18,15, S 7,99.

Pikrat. Wie beim Acetat wurden 55 mg (Ic) in 5 ccm abs. Alkohol gelöst (kalt) und 0,75 ccm 10%ige alkohol. Pikrinsäure (2,2 Mol) eingetroppt und angeimpft. Zur Kristallisation wurde in Eis gestellt. Die abgesaugten, mit Alkohol-Äther gewaschenen, bei 100°/1 mm getrockneten Kristalle zeigten einen Schmp. von 163 bis 166°. Dieser erhöhte sich durch Umkristallisieren aus abs. Alkohol auf 168 bis 169° (53 mg).

Sulfitspaltung des Aneurins nach Williams⁷.

0,5 g (Ia) wurden in 7,5 ccm einer Natriumsulfit-Schwefeldioxyd-Lösung gelöst. (Diese bestand aus einer 14%igen Natriumsulfitlösung, in die SO₂ eingeleitet wurde, bis ein pH von 4,8 bis 5,2 erreicht war.) Über Nacht hatten sich Kristalle abgeschieden, die sich im Laufe von 5 Tagen noch etwas vermehrten. Nun wurde abgesaugt und mit Wasser 3mal gewaschen. Der Niederschlag wurde noch mit Alkohol und Äther vom anhaftenden Wasser möglichst befreit und einige Tage über Schwefelsäure im Vak. getrocknet. 0,275 g (= 91,7% Ausbeute) 2-Methyl-4-amino-pyrimidin-5-methylen-sulfonsäure C₆H₉O₃N₃S (II) (im folgenden „saurer Spaltstück“ genannt).

Filtrat und Waschwasser wurden vereinigt (zirka 20 ccm), im Scheidetrichter mit 25 ccm Chloroform unterschichtet und unter Umschütteln mit Soda gesättigt. Die wäbr. Phase wurde noch 4mal mit 25 ccm Chloroform erschöpft. Der Trockenrückstand bestand aus zirka 0,25 g eines bräunlichen Öles, das den typischen Aneuringeruch zeigte. Dieses Öl wurde mit Chloroform in ein Kugelrohr gespült und nach dem Entfernen des Lösungsmittels bei 0,5 mm und 110 bis 120° Luftbadtemp. überdestilliert. Das erhaltene 4-Methyl-5-äthoxy-thiazol (IIIa) (im folgenden „basisches Spaltstück“ genannt) stellte 0,189 g (= 89,1% Ausbeute) eines farblosen Öles dar.

Pikrat des basischen Spaltstückes. Die so erhaltene Base (IIIa) (0,189 g) wurde in 1,5 ccm abs. Alkohol mit 0,35 g (= 1,1 Mol) Pikrinsäure in 2,2 ccm

abs. Alkohol versetzt. Der sofort entstandene Kristallbrei wurde nach Zusatz von weiteren 5 ccm Alkohol bis zur Lösung erwärmt. Das Pikrat kristallisierte beim Abkühlen in gelben Nadeln aus. Nach Waschen mit Alkohol und Äther wurden 0,392 g (= 81% d. Th.) bei 100°/1 mm getrockneter Kristalle erhalten. Schmp. 162,5 bis 165° (langsam absinkendes Gleichgewicht), Literatur 163 bis 164°¹³.

Acetylierung von (IIIa) zum 4-Methyl-5-acetoxyäthyl-thiazol (IIIb).

308 mg des basischen Spaltstückes wurden in einem Kugelrohr mit 1 ccm Pyridin und 1 ccm Essiganhydrid über Nacht belassen. Nach 1stündigem Erhitzen im Wasserbad wurde der Trockenrest bei 20 mm hergestellt und dieser 3mal mit zirka 1,5 ccm abs. Alkohol im Vak. abgedampft. Das erhaltene Öl wurde bei 1 mm und 100 bis 110° Badtemp. überdestilliert. Es resultierten 352 mg (= 87,8% Ausbeute) des Acetylderivats IIIb), das ebenfalls ein farbloses Öl darstellt.

Pikrat. Das in 2 ccm abs. Alkohol gelöste Acetat (IIIb) wurde mit 0,5 g (= 1,1 Mol) Pikrinsäure in 3,1 ccm abs. Alkohol versetzt. Der erhaltene Kristallbrei wurde mit 7,5 ccm abs. Alkohol bis zur Lösung erhitzt. Beim langsamen Erkalten fiel das Pikrat in langen gelben Nadeln aus. Nach Kühlung wurden an mit Alkohol und Äther gewaschenem und bei 100°/1 mm getrocknetem Pikrat 689 mg (= 87,2% d. Th.) erhalten. Schmp. 131 bis 133° (Gleichgewicht), Literatur 131°¹³.

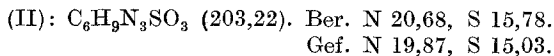
Darstellung des Propionsäureesters (IIIc) des basischen Spaltstückes.

Analog der Acetylierung wurden aus 252 mg „basischem Spaltstück“ (IIIa) mit Pyridin und Propionsäureanhydrid in gleicher Weise 346 mg des Propionats als farbloses, bei 110 bis 120° Luftbadtemp. und 1,5 mm destillierendes Öl erhalten (97% d. Th.).

Pikrat. Nach Versetzen mit 460 mg Pikrinsäure in insgesamt 13,5 ccm Alkohol kristallisierten beim Abkühlen 663 mg (= 87% Ausbeute) des gelben, nadelförmigen Pikrats vom Schmp. 137 bis 139° (Gleichgewicht) aus.

Sulfitspaltung von O-Acetyl-aneurinchlorid-hydrochlorid (Ib).

504 mg (Ib) wurden in 7,5 ccm Sulfite-SO₂-Lösung (wie bei der Spaltung von Aneurin) gelöst (Opaleszenz). Die über Nacht ausgefallenen Kristalldrusen wurden nach 4tägigem Stehen bei Zimmertemp. abgesaugt, gewaschen und getrocknet: 238 mg des sauren Spaltstückes (II) (= 89,5% Ausbeute). Zur Analyse wurden 101 mg (II) in 7,5 ccm siedendem Wasser gelöst und filtriert. Beim Abkühlen fiel die Sulfonsäure in feinen Nadeln wieder aus. Das Kristallisat wurde mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und bei 100°/1 mm getrocknet: 66 mg.



N-Acetylsulfonsäure: C₈H₁₁N₃SO₄ (245,26). Ber. N 17,15, S 13,10.

Isolierung des basischen Spaltstückes von (Ib). Filtrat und Waschwasser wurden im Scheidetrichter mit 25 ccm Chloroform unterschichtet, die wäsr. Phase mit Soda gesättigt und noch 3mal mit Chloroform extrahiert.

¹³ H. Andersag und K. Westphal, Ber. dtsch. chem. Ges. 70, 2043 (1937).

Der ölige Trockenrest der vereinigten, getrockneten Chloroformextrakte wurde bei 0,5 mm und 90 bis 100° Luftbad im Kugelrohr destilliert. 198 mg Base (= 81% Ausbeute, berechnet auf das acetylierte basische Spaltstück IIIb).

Pikrat. 198 mg wurden in 2 ccm abs. Alkohol gelöst und mit 1,1 Mol Pikrinsäure (2,7 ccm 10%ige alkohol. Lösung) versetzt. Der entstandene Kristallbrei wurde durch Zusatz von 2 ccm Alkohol und Erwärmen in Lösung gebracht. Beim Erkalten kristallisierte das Pikrat in großen, dunkelgelben Nadeln aus. 443 mg (= 86% Ausbeute). Schmp. 131 bis 133° (Gleichgewicht).

Mischschmp. mit 4-Methyl-5-acetoxyäthyl-thiazol-pikrat (IIIb-Pikrat) (Schmp. 131 bis 133°) ergab keine Depression, mit dem 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazol-pikrat (IIIa-Pikrat) (Schmp. 162,5 bis 165°) jedoch ein Schmelzintervall von 119 bis 157°.

III b-Pikrat: $C_8H_{11}O_2NS \cdot C_6H_3O_7N_3 = C_{14}H_{14}O_9N_4S$. Ber. N 13,52, S 7,74.
Gef. N 13,51, S 7,62.

Sulfitspaltung von O-Propionyl-aneurinchlorid-hydrochlorid (Ic).

508 mg (Ic) wurden wie (Ib) mit 7,5 ccm Sulfite-SO₂-Lösung gespalten. Es wurden 241 mg des sauren Spaltstückes II erhalten (= 91,5% Ausbeute). Zur Analyse wurde aus heißem Wasser umkristallisiert.

II: $C_8H_9N_3SO_3$ (203,22). Ber. N 20,68, S 15,78.
Gef. N 19,20, S 15,09.

N-Propionyl-sulfonsäure: $C_9H_{13}N_3SO_4$ (259,29). Ber. N 15,62, S 12,37.

Die Isolierung des basischen Spaltstückes erfolgte wie beim Acetylderivat. Der ölige Trockenrest der Chloroformextraktion ergab 220 mg (86% d. Th.) eines bei 95 bis 105° Luftbadtemp. und 0,5 mm übergelassenen Öles.

Pikrat. Das oben erhaltene Öl wurde in 2,5 ccm abs. Alkohol gelöst, mit 2,75 ccm 10%iger Pikrinsäure in Alkohol (1,1 Mol) versetzt und nach Zusatz von noch etwas Alkohol bis zur Lösung erhitzt. Beim Erkalten kristallisierte das Pikrat in feinen, gelben Nadeln. 410 mg (= 87% Ausbeute). Schmp. 133 bis 136°. Der Mischschmp. mit dem Pikrat des Propionylderivats (IIIc) ergab keine Depression, wohl aber mit dem 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazol-pikrat (IIIa-Pikrat) (Schmp. 162,5 bis 165°) ein Schmelzintervall von 120 bis 153°.

IIIc-Pikrat: $C_9H_{13}O_2NS \cdot C_6H_3O_7N_3 = C_{15}H_{16}O_9N_4S$. Ber. N 13,08, S 7,48.
Gef. N 12,85, S 7,37.

O-Essigsäureester des l-Tyrosinhydrochlorids (IVb).

1,00 g l-Tyrosin (*Schuchardt*) wurden in 4,0 ccm HCl-gesättigtem Eisessig und 3,0 ccm Acetylchlorid versetzt über Nacht belassen. Nach Zusatz von 10 ccm HCl-Eisessig und 4,0 ccm Acetylchlorid wurde unter Verschluss kurz auf zirka 80° erwärmt und dann noch 1 Std. stehen gelassen. Nach Kühlen mit Eis-Kochsalz wurde das kristalline Reaktionsprodukt abgesogen, mit Äther gewaschen und getrocknet. 1,22 g Rohprodukt (= 85% d. Th.), Zersp. = 214 bis 216° (Metallblock). Durch Umlösen aus Methanol-Äther wurden 0,81 g vom Zersp 222 bis 223° erhalten. Die Verbindung ist sehr leicht löslich in Wasser mit stark kongosaurer Reaktion, recht leicht löslich auch in Methanol und Äthanol, schwer hingegen in Aceton und Äther. Die

Drehung wurde zu $[\alpha]_D^{20} = -11,0^\circ$, $[M]_D^{20} = -28,5^\circ$ (0,2864 g ad 2,22 ccm Wasser, $c = 12,9$; $\alpha_D = -1,42^\circ$) bestimmt.

$C_{11}H_{14}O_4NCl$ (259,69). Ber. N 5,39, Cl 13,65, CH_3CO 16,57.
Gef. N 5,28, Cl 14,05, CH_3CO 16,00.

Reaktion mit Nitritlösung. 1 bis 2 mg Stbst. wurden in 1,5 ccm 5%iger Essigsäure gelöst und mit 0,3 ccm $\frac{1}{2}$ %iger Nitritlösung versetzt. Auch nach 2tägigem Stehen und auf Zusatz eines Tropfens verd. HCl trat nur eine ganz schwache Gelbfärbung auf, während Tyrosin unter den gleichen Bedingungen schon nach längstens 1 Std. eine starke rotgelbe Farbe zeigt.

Folin-Reaktion bei pH 8 und 11¹¹. Je 1 ccm einer Lösung von O-Acetyltyrosin bzw. Tyrosin (entsprechend je 1 mg freien Tyrosins) wurden mit 1 ccm Wasser, 0,5 ccm verd. Folin-Reagens (1:3) und 0,5 ccm Phosphatpuffer (60 ccm 0,5 m Na_2HPO_4 + 34 ccm 1 n-KOH + 6 ccm Wasser) versetzt. Im Fall des Tyrosins trat sofort intensive Blaufärbung ein, während das O-Acetyltyrosin nur einen schwach blaugrünen Stich zeigte, der innerhalb von 48 Stdn. in hellblau überging.

Bei der „pH 11-Methode“ wurde statt des einen ccm Wassers 0,5 ccm 0,1 n-NaOH und nach 5 Min. 0,5 ccm 0,1 n-HCl zugesetzt und erst dann wie oben das Reagens und die Pufferlösung. Sowohl Tyrosin als auch O-Acetyltyrosin zeigten sofort intensive Blaufärbung gleicher Intensität.

O-Essigsäureester des Glycyl-l-tyrosinhydrochlorids (Vb).

a) Darstellung mit Acetylchlorid in HCl-gesättigtem Eisessig: 1,19 g Glycyl-l-tyrosin (*Schuchardt*) (Va) $[\alpha]_D = +51,9^\circ$ (Wasser) wurden mit 7,2 ccm HCl-gesättigtem Eisessig und 4 ccm Acetylchlorid über Nacht bei Zimmertemp. belassen. Zur Aufarbeitung wurde der Ansatz, in welchem nie völlige Lösung beobachtet wurde, bei 40° im Vak. von 20 mm verdampft. Der Trockenrückstand wurde aus Methanol-Äther umgelöst, die isolierte Kristallisation mit Aceton-Äther gewaschen und bei 1 mm und 100° zur Analyse getrocknet. Man erhielt 912 mg vom Schmp. 205 bis 206° und der Drehung $[\alpha]_D^{20} = +41,6^\circ$ (0,1058 g ad 10 ccm Wasser, $\alpha_D = +0,44^\circ$). Die ionogenes Chlor enthaltende Verbindung gibt nicht wie das Ausgangsmaterial in mit Wasser verd. Essigsäure und $\frac{1}{2}$ %igem Natriumnitrit eine Orangefärbung. Sie ist leicht löslich in Wasser mit stark saurer Reaktion und zeigt keine Reaktion mit $FeCl_3$.

$C_{13}H_{17}O_5N_2Cl$. Ber. C 49,29, H 5,41, N 8,84, Cl 11,19, CH_3CO 13,59.
Gef. C 49,29, H 5,25, N 8,63, Cl 11,15, CH_3CO 13,04.

In besserer Ausbeute (83% d. Th.) wurde die Verbindung wie folgt erhalten: 504 mg Glycyltyrosin (Va) wurden in 1,5 ccm Eisessig gelöst und unter schwacher Kühlung auf 20° die Mischung von 3 ccm Acetylchlorid und 3 ccm HCl-gesättigtem Eisessig zugegeben, wobei vorübergehend ein Niederschlag auftritt. Nach 1stündigem Stehen bei Zimmertemp. erfolgte auf Impfen Kristallisation, die durch Zugabe von 60 ccm Äther vermehrt wurde. Das mit Äther gewaschene Kristallisat wurde im Vak. über KOH getrocknet und wog 560 mg. Zersp. wie bei obigem Versuch.

b) Darstellung des O-Essigesters des Glycyl-l-tyrosinhydrochlorids (Vb) in flüssigem SO_2 mit Acetylchlorid: 500 mg Glycyltyrosin (Va) (entsprechend 442 mg wasserfreiem Material) wurden in 10 ccm flüssigem SO_2 eingetragen und 1,5 ccm Acetylchlorid zugesetzt. Nach 12stündigem Stehen im Kälte-

gemisch war Lösung eingetreten. Man versetzte mit abs. Äther und brachte im Vak. bei 50° zur Trockene. Nach Digerieren des erneut in Äther aufgenommenen Rückstandes unter Acetonzugabe erfolgte Kristallisation. Man wusch das isolierte Reaktionsprodukt mit Äther und erhielt 570 mg vom Zersp. 200°, ident nach der Mischprobe mit dem bei 205 bis 206° sich zersetzenden oben erwähnten Analysenprodukt. Ausbeute bezogen auf wasserfreies (Va) 97% d. Th.

Glycyl-l-Tyrosin-methylester-hydrochlorid (Vc).

Diese Verbindung resultierte bei einem wie oben angesetzten, aber anders aufgearbeiteten Versuch. Der bei 50° und 20 mm hergestellte Eindampfstrest wurde durch Digerieren mit Methanol-Äther schwierig zur Kristallisation gebracht; um diese aber zu vereinheitlichen, wurde nochmals im Vak. zur Trockene verdampft. Der nun spontan kristallisierende Sirup wurde aus Methanol-Äther umgelöst. Man erhielt 513 mg feine Nadeln, die S-frei, aber N- und Cl-haltig waren. Zersp. 194 bis 195°. Die Mischprobe mit oben erwähntem Analysenprodukt (Zersp. 205 bis 206°) zeigte eine deutliche Depression auf 179 bis 181°. Zur Analyse wurde nochmals aus Methanol-Äther umgelöst (Zersp. 196°). Die in Wasser mit schwach kongosaurer Reaktion leicht lösliche Verbindung zeigt zum Unterschied von oben erwähntem Derivat eine schmutzig-blauviolette FeCl₃-Reaktion. Glycyl-l-Tyrosin selbst gibt einen olivbraunen Farbton. Nach diesen Reaktionen, Eigenschaften und der Analyse ist das Vorliegen von Glycyl-l-tyrosin-methylester-hydrochlorid (Vc) anzunehmen.

C₁₂H₁₇O₄N₂Cl (288,73). Ber. N 9,70, Cl 12,28. Gef. N 9,37, Cl 11,97.

Schonende Rückverseifung des O-Acetyl-glycyl-l-tyrosins (Vb) zum Glycyl-l-tyrosin (Va).

317 mg O-Acetylglycyl-l-tyrosinhydrochlorid (Vb) wurden mit der zur Neutralisation von 4 alkalibindenden Gruppen (Phenolhydroxyl, Essigsäure, Carboxyl und Chlorwasserstoffsäure) äquival. Menge Barytlaug 5 Min. auf dem Wasserbad im Stickstoffstrom erhitzt und in der klaren Lösung die Bariumionen mit der äquival. Menge Schwefelsäure und die Chlorionen mit der berechneten Menge Silberazetat in der Wärme gefällt. Man filtrierte den Salzniederschlag über Kohle und dampfte das Filtrat zur Trockene ein (217 mg). Zur Kristallisation wurde in wenigen Tropfen heißen Wassers gelöst und mit Alkohol gefällt. Der isolierte Niederschlag wurde bei 100° und 20 mm getrocknet: 143 mg. $[\alpha]_D^{20} = + 48,6^\circ$ (0,1071 ad 10 ccm Wasser, $\alpha_D = + 0,52^\circ$).

In gleicher Weise wurde das käufliche Glycyl-l-tyrosin (Va) aus Alkohol-Wasser umgelöst und getrocknet, um ein Kristallinat gleichen Kristallwassergehaltes zu erhalten. Die Schmelz- bzw. Zersetzungspunkte sowie die Mischprobe zeigten dieselben Erscheinungen (Metallblock sint. 162 bis 165°, 258 bis 260° u. Zers.).