

Die Synthesen des Tryptophans

Von Dr. H. HELLMANN, KWI für Biochemie, Tübingen

Für die lebenswichtige Aminosäure L-Tryptophan, u. a. die Muttersubstanz des als Coferment wasserstoff-übertragender Fermente wichtigen Nicotinsäureamids^{a)}, wobei der Weg über das im Zusammenhang mit gen-chemischen Fragen eingehend bearbeitete Kynurenin^{b)} führt, sind nunmehr praktisch brauchbare Synthesen gefunden. Da die bedeutendsten Arbeiten in der noch schwer erhaltlichen Auslandsliteratur erschienen, sei eine Zusammenfassung aller bisher veröffentlichten Syntheseversuche gebracht.

Bereits Hopkins, der das Tryptophan 1901 zuerst krystallisierte aus tryptisch verdautem Casein isolierte¹⁾, hat die große Bedeutung dieser Aminosäure für die tierische Ernährung erkannt²⁾. Man bemühte sich daher frühzeitig um ihre Synthese, um sich von der langwierigen und umständlichen Isolierung aus natürlichem Material freizumachen. Jedoch zeigten sich unerwartete Schwierigkeiten, und so dauerte es 40 Jahre, bis das Problem gelöst war. Wir verfügen heute über Möglichkeiten der Synthese dieser Aminosäure, die alle Erwartungen übertroffen haben; Tryptophan gehört nicht mehr zu den schwerzugänglichen Substanzen!

Da es sich bei diesen Arbeiten teilweise um Weiterentwicklung älterer Synthesen handelt, werden auch diese betrachtet, und der Bericht umfaßt damit einen Zeitraum von etwa einem halben Jahrhundert. Aus der chronologischen Disposition ergibt sich von selber eine solche nach chemischen Gesichtspunkten:

I. Synthesen von *dl*-Tryptophan durch

- A) Kondensation von β -Indolyl-aldehyd mit Hippursäure bzw. Hydantoin.
- B) Kondensation von Gramin mit Acylamino-carbonsäure-estern.
- C) Kondensation von Indol mit tertiären Esterbasen.
- D) Ringschluß.

II. Versuche zur Darstellung von Tryptophan.

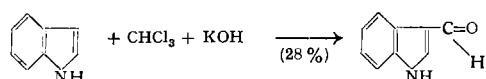
III. Synthese kern-substituierter Tryptophane.

IV. Synthese von mit Tryptophan isosteren Verbindungen.

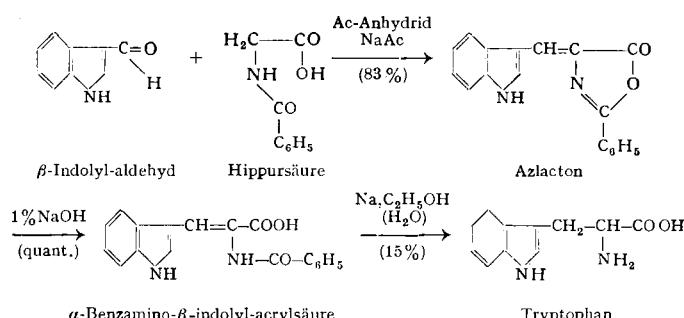
V. Gewinnung vln *d*- und *l*-Tryptophan.

A. Synthesen durch Kondensation von β -Indolylaldehyd mit Hippursäure bzw. Hydantoin

a) Etwa zu derselben Zeit, als Hopkins und Cole¹⁾ die Isolierung von krystallisiertem Tryptophan aus tryptisch verdautem Casein gelang, erkannte Erlenmeyer jun.³⁾ die allgemeine Bedeutung der Plöchl'schen Phenylalanin-Synthese, deren Prinzip durch Kondensation von Benzaldehyd mit Hippursäure gekennzeichnet ist⁴⁾). Er fand, daß die Hippursäure-Methode nicht auf den Benzaldehyd beschränkt war, und es gelang ihm, die Konstitution der Aldehyd-Hippursäure-Kondensationsprodukte, die er Azlactone nannte, aufzuklären. Nun hatten Hopkins und Cole⁵⁾ bereits durch Oxydation von Tryptophan mit Eisen(III)-chlorid eine Verbindung C_9H_7ON erhalten, die ihrer Meinung nach ein Oxychinolin darstellen mußte, von Ellinger⁶⁾ jedoch als β -Indolyl-aldehyd identifiziert wurde, indem er sie nach der Reimer-Tiemannschen Methode aus Indol, Chloroform und Kalilauge synthetisierte. Es war naheliegend, daß Ellinger sogleich versuchte, die Azlacton-Methode Erlenmeyers in Anlehnung an dessen Phenylalanin-Synthese auf den neuen β -Indolyl-aldehyd anzuwenden. Nach beträchtlichen, anfänglichen Schwierigkeiten gelang es ihm schließlich, in Gemeinschaft mit Flamand⁷⁾ *dl*-Tryptophan zu synthetisieren:



- ^{a)} G. W. Beadle, H. K. Mitchell u. J. F. Nye, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 33, 155 [1947].
- ^{b)} A. Butenandt u. Mitarb., Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 279, 27 [1943]; vgl. a. diese Ztschr. 56, 64 [1943].
- ¹⁾ F. G. Hopkins u. S. W. Cole, J. Physiology 27, 418 [1901].
- ²⁾ E. G. Wilcock u. F. G. Hopkins, ebenda 35, 88 [1906/7].
- ³⁾ Liebigs Ann. Chem. 337, 265 [1904]; Zus. Darst.: H. E. Carter, „Azlactones“ in „Organic Reactions“ Vol. III, New York 1944.
- ⁴⁾ J. Plöchl, Ber. dtsh. chem. Ges. 16, 2815 [1883].
- ⁵⁾ J. Physiology 29, 451 [1903].
- ⁶⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. 39, 2515 [1906].
- ⁷⁾ Ebenda 40, 3029 [1907].



Erlenmeyer hatte zwei Wege angegeben, von der ungesättigten, benzoylierten Aminosäure zum Phenylalanin zu gelangen, nämlich die Reduktion mit Natriummanganal und nachherige Abspaltung der Benzoyl-Gruppe mit kochender Salzsäure sowie die Einwirkung von Ammoniak im Einschmelzrohr. Beide Methoden ließen sich jedoch nicht für die Tryptophan-Synthese verwenden. Ellinger und Flamand fanden schließlich im metallischen Natrium in alkoholischer Lösung ein geeignetes Reduktionsmittel für die Indolyl-benzamino-acrylicsäure, das noch den Vorteil bot, bei Zugabe von wenig Wasser nach beendigter Reduktion zugleich die Abspaltung der Benzoyl-Gruppe zu bewirken. Recht umständlich war die Isolierung des gebildeten *dl*-Tryptophans aus dem Reaktionsgemisch. Sie benutzten hierzu die von Hopkins und Cole beschriebene Fällung mit Quecksilber(II)-sulfat in schwefelsaurer Lösung. Das Quecksilbersalz wurde mit Schwefelsäure zerstellt. Nach Neuberg und Popowsky⁸⁾ entfernten sie die Schwefelsäure und den Schwefelwasserstoff aus der Lösung nach Abtrennen des Quecksilbersulfids durch Bleicarbonat. Überschüssiges Blei wurde durch Schwefelwasserstoff-Fällung beseitigt, der überschüssige Schwefelwasserstoff durch Kochen. Aus der eingegangten Lösung schied sich das Tryptophan nach Alkohol-Zusatz krystallin ab; es war jedoch erst nach mehrfachem Umkristallisieren aus 50proz. Alkohol rein.

Ellinger und Flamand⁹⁾ erzielten nur 3,5% Ausbeute^{a)} an Tryptophan, bezogen auf Indol. Dieses magere Ergebnis ist zum großen Teil der schwierigen ersten Stufe, der Aldehyd-Synthese zuzuschreiben. Selbst bei Wiederverwendung des nicht umgesetzten Indols liefert die Reimer-Tiemannsche Synthese hier günstigstenfalls 28% d. Th. an Indolyl-aldehyd neben mehr als 35% Chlorchinolin. Trotz ihrer schlechten Ausbeute war diese Synthese von hoher Bedeutung, weil sie die Konstitution des Tryptophans als β -Indolyl-amino-propionsäure erstmals erkennen ließ.

b) Bereits Hopkins²⁾ hatte bei Fütterungsversuchen an Mäusen entdeckt, daß das Tryptophan eine der wichtigsten Aminosäuren für die Tierernährung darstellt, und zahlreiche Laboratorien bestätigten dies. Die Kenntnis dieser Arbeiten veranlaßte 1922 Majima und Kotake¹⁰⁾, sich mit der Synthese des Tryptophans zu befassen. Es gelang ihnen, den nach der Reimer-Tiemannschen Methode nur in schlechter Ausbeute darstellbaren β -Indolyl-aldehyd etwas leichter zugänglich zu machen durch Umsetzung von Indolyl-magnesium-jodid mit Ameisensäureester. Die Darstellung des Aldehyds auf diesem Wege war schon von Alessandrini¹¹⁾ mit sehr unbefriedigendem Ergebnis versucht worden. Als die japanischen Forscher jedoch den üblichen Äther durch Anisol ersetzten, erzielten sie eine 40-proz. Ausbeute an Aldehyd. Mit diesem verfolgten sie nicht den von Ellinger vorgezeichneten Weg, sondern kondensierten ihn mit

^{a)} Biochem. Z. 2, 357 [1906].

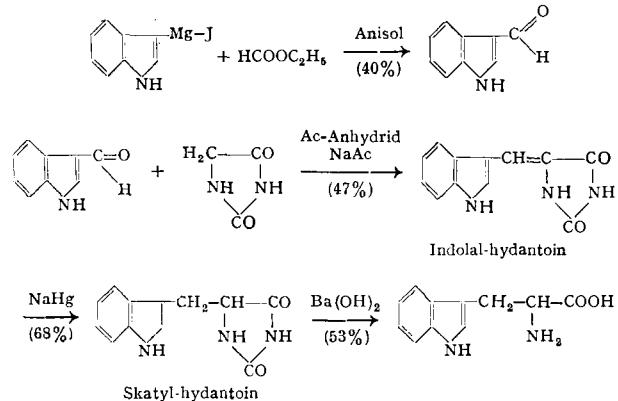
⁹⁾ Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 55, 8 [1908].

¹⁰⁾ Welche Gesamtausbeute Ellinger u. Flamand tatsächlich bekommen haben, ist nicht einwandfrei festzustellen, da sie in den beiden Beschreibungen ihrer Synthese^{7,9)} am Schluß von 15% ohne Bezugnahme sprechen. M. S. Dunn u. L. B. Rockland (Adv. Protein Chemistry 3, 330 [1947]) verstehen unter dieser Angabe die Gesamtausbeute, während J. Elks, D. F. Elliott u. B. A. Hemis (J. chem. Soc. [London] 1944, 632) sie auf die letzte Stufe beziehen. Eine Gesamtausbeute von 15% darf als unwahrscheinlich gelten, da in diesem Falle für die Reduktion und Abspaltung der Benzoyl-Gruppe, die nach Darstellung der Autoren einen recht unerfreulichen Verlauf nehmen, eine 75-proz. Ausbeute angenommen werden müßte.

¹¹⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. 55, 3859 [1922].

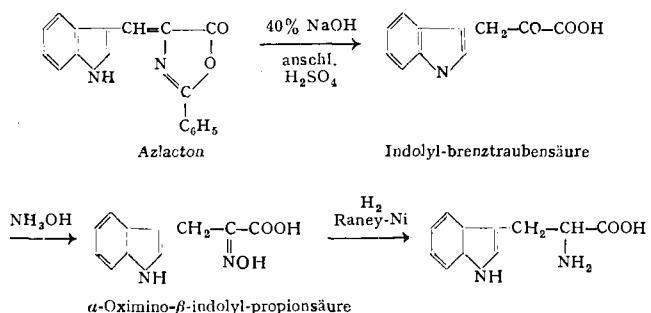
¹¹⁾ Atti R. Accad. naz. Lincei, 5, 24, II, 194 [1915]; Chem. Zbl. 1916, I, 1073.

Hydantoin nach einer Methode, die 1911 von *Wheeler* und *Hoffmann*¹²⁾ entwickelt worden war. Die Kondensation führte aber erst mit 47proz. Ausbeute zum Ziel, nachdem sie das in der Originalmethode verwendete Gemisch von Eisessig/Natriumacetat durch Acetanhydrid/Natriumacetat ersetzen. Die Reduktion des Kondensationsproduktes zum Skatylhydantoin erfolgte mit Natriumamalgam in Natronlauge und die Spaltung zum Tryptophan anschließend mit gesättigtem Barytwasser:



Die Isolierung des *dl*-Tryptophans aus der Reaktionsmischung wurde auf dieselbe umständliche Weise wie bei der *Ellingerschen Synthese* durchgeführt. Trotz der ergiebigeren Darstellungsweise für den Indolyl-aldehyd betrug die Ausbeute an Tryptophan (bezogen auf Indol) nur 6,5%.

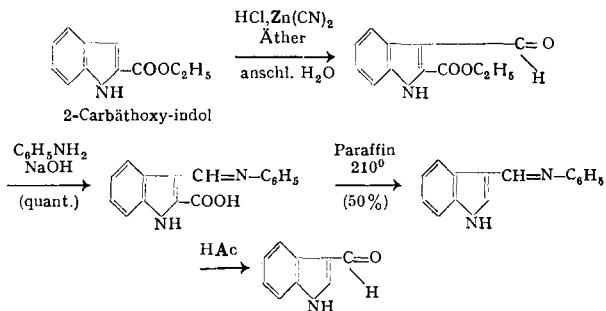
c) Im Zuge einer stoffwechsel-physiologischen Arbeit, deren Zweck keineswegs die Auffindung einer ökonomischen Tryptophan-Synthese war, bereiteten *Bauguess* und *Berg*¹³⁾ es durch katalytische Hydrierung von α -Oximino- β -indolyl-propionsäure mit Raney-Nickel als Katalysator in alkoholischer Lösung. Die Oximinoäure hatten sie durch Einwirkung von Hydroxylamin auf Indolyl-brenztraubensäure erhalten, die schon von *Ellinger* und *Matsuoka*¹⁴⁾ durch alkalische Hydrolyse des Azlactons dargestellt wurde.



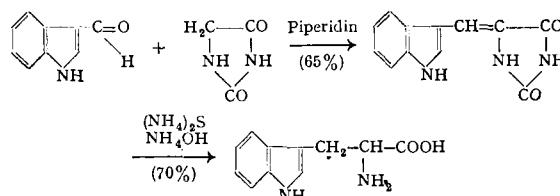
Die Isolierung des Endproduktes gestaltete sich wesentlich einfacher als bei den früheren Synthesen; aus der stark eingengten alkoholischen Lösung schied sich das Tryptophan in kristallisierter Form ab. Ausbeuten sind in dieser Publikation nicht angegeben.

d) Der ungünstige Verlauf der Synthese von *Majima* und *Kotake* (b) regte die Engländer *Boyd* und *Robson* zu einer gründlichen Untersuchung der einzelnen Phasen an. Zunächst bemühten sie sich, die Darstellung des β -Indolyl-aldehyds zu verbessern¹⁵⁾. Durch Verwendung von einem beträchtlichen Überschuss an Kalilauge konnten sie die Ausbeute an Aldehyd der *Reimer-Tiemannschen Synthese* in einem Arbeitsgang auf 31% erhöhen. Ein noch besseres Ergebnis erreichten sie durch Benutzung der von *Adams* und *Levine*¹⁶⁾ modifizierten Synthese von *Gattermann*, indem sie 2-Carbäthoxy-indol mit Zinkcyanid und Chlorwasserstoff in Äther und nachfolgendem Kochen mit Wasser zum entsprechenden Ester-aldehyd umsetzten. Einwirkung von Anilin in alkalischer Lösung ergab das Anil einer Säure, die sich bei 210° in flüssigem Paraffin decarboxylieren ließ. Durch

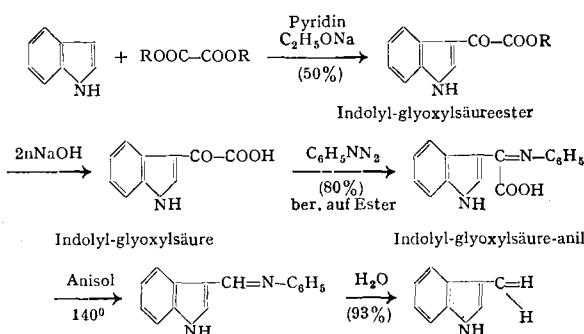
verdünnte Essigsäure wurde der Aldehyd aus dem Anil freigesetzt. Die Ausbeute betrug 40–50%, bezogen auf Indol.



Majima und *Kotake* hatten für die Kondensation von Indolyl-aldehyd und Hydantoin ein Gemisch von Acetanhydrid und Natriumacetat benutzt. Da *Knoevenagel*¹⁷⁾ mit gutem Erfolg Aldehyde mit aktiven Methylen-Gruppen unter Zuhilfenahme von organischen Basen hatte kondensieren können, erprobten *Boyd* und *Robson*¹⁸⁾ solche Basen als Kondensationsmittel in der Tryptophan-Synthese. Durch Verwendung von Piperidin als Lösungsmittel und Katalysator anstelle von Acetanhydrid/Natriumacetat gelang es, die Ausbeute an Kondensationsprodukt von 47% auf 65% zu steigern. Eine weitere Vereinfachung erreichten sie dadurch, daß sie die Reduktion des Kondensationsproduktes und die Hydrolyse des gebildeten Skatylhydantoin in einem Arbeitsgang mit einem Gemisch von Ammoniumsulfid und Ammoniumhydroxyd durchführten¹⁹⁾. Diese Methode ermöglichte außerdem eine leichtere Isolierbarkeit des Endproduktes; denn die Reduktion mit Natrium-amalgam hatte immer den Nachteil, daß das Tryptophan in der Endlösung von relativ großen Mengen Natriumsalz durch die umständliche Quecksilber-salz-Fällung abgetrennt werden mußte. Die Isolierung geschah hier durch Extraktion des Trockenrückstandes von der Reaktionslösung mit stark verdünntem Ammoniak und Abscheiden des Tryptophans durch Alkohol. Die Ausbeute errechnet sich zu etwa 20%, bezogen auf 2-Carbäthoxy-indol.



e) Schließlich unternahmen *Elks*, *Elliott* und *Hems*²⁰⁾ 1944 einen letzten Versuch, eine lohnende Darstellungsweise für *dl*-Tryptophan auf dem Wege über den β -Indolyl-aldehyd zu finden. Sie benutzten wieder eine andere Synthese für den Aldehyd. Indol und Oxalester wurden unter der katalytischen Wirkung von Pyridin zu Indolyl-glyoxylsäure-ester umgesetzt.



Die hieraus durch Verseifen mit 2n Natronlauge gewonnene Säure bildet ein Anil, das in einer Mischung mit Anisol beim Erwärmen auf 140° Kohlendioxyd abspaltet. Die Hydrolyse des decarboxylierten Anils lieferte den β -Indolyl-aldehyd in 37-proz. Ausbeute, bezogen auf Indol.

Mit dem so gewonnenen Indolyl-aldehyd verfahren sie einerseits wie *Boyd* und *Robson*¹⁹⁾, jedoch mit der Abänderung, daß

¹²⁾ J. Amer. Chem. Soc. 45, 368 [1911].

¹³⁾ J. biol. Chemistry 104, 678 [1934].

¹⁴⁾ Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 109, 259 [1920].

¹⁵⁾ Biochemic. J. 29, 555 [1935].

¹⁶⁾ J. Amer. Chem. Soc. 45, 2373 [1923].

¹⁷⁾ Liebigs Ann. Chem. 281, 25 [1894].

¹⁸⁾ Biochemic. J. 29, 542 [1935].

¹⁹⁾ Ebenda 29, 2256 [1935].

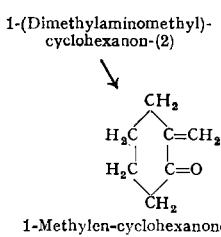
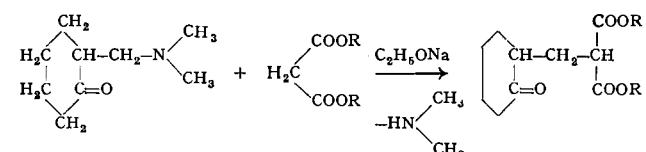
²⁰⁾ J. chem. Soc. [London] 1944, 629.

die Reduktion von Indolal-hydantoin auf katalytischem Wege mit Raney-Nickel in verdünnter Natronlauge oder 65-proz. Alkohol und die Hydrolyse zu Tryptophan mit Baryt erfolgte. Ihre Ausbeute entsprach hierbei etwa derjenigen von *Boyd* und *Robson*. Andererseits wurde der Aldehyd aber auch nach der Methode von *Ellinger* und *Flamand* (a) verarbeitet, wobei wiederum katalytisch hydriert wurde. Die α -Benzamino- β -indolyl-acrylsäure ergab dabei in 72-proz. Ausbeute *dl*-Tryptophan, was einer Gesamtausbeute (bezogen auf Indol) von 27% entspricht.

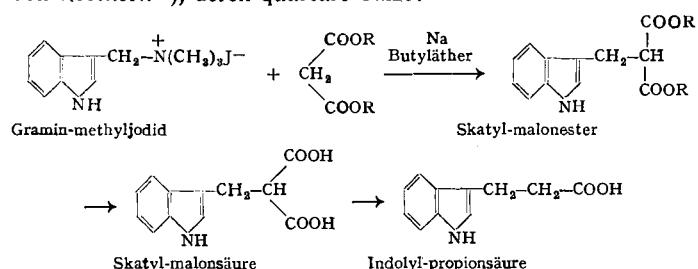
B. Synthesen durch Kondensation von Gramin mit Acylamino-carbonsäureestern

40 Jahre lang hat man sich bemüht, eine ergiebige Darstellungswweise für *dl*-Tryptophan zu finden; diese Bemühungen waren eng verknüpft mit dem Bestreben, den β -Indolyl-aldehyd leichter zugänglich zu machen, der immer wieder als Ausgangspunkt gewählt wurde. Zweifellos waren von Synthese zu Synthese Fortschritte zu verzeichnen, doch im großen und ganzen blieb das Ergebnis unbefriedigend. Aber die Forderung nach einer guten Synthese wurde immer dringender in Anbetracht der wichtigen Entdeckungen auf dem Gebiet des Eiweiß-Stoffwechsels und der biochemischen Genetik. Es war daher von größter Bedeutung, als im Gramin ein Alkylierungsmittel für Acylamino-carbonsäureester gefunden wurde; denn diese Entdeckung führte zu einer ausgezeichneten Tryptophan-Synthese, deren glatter Verlauf und Ergiebigkeit wohl kaum wird überboten werden können.

Mannich entdeckte 1937 die Kondensationsfähigkeit gewisser tertiärer Basen, die durch Einwirkung von Formalin und sekundärem Amin auf Verbindungen mit aktivem Wasserstoff nach der nach ihm benannten Reaktion leicht erhalten sind^{20a)}. Er hatte gefunden, daß 1-(Dimethylaminomethyl)-cyclohexanon-(2) mit Acetessigester²¹⁾ oder Malonester²²⁾ und wenig Natriumalkoholat unter Abspaltung von Dimethylamin und Knüpfung einer C-C-Bindung reagiert. Zur Erklärung dieser überraschenden Reaktion, nahm er als Primärprodukt 1-Methylen-cyclohexanon-(2) an, das nach Art einer *Michael*-Kondensation den Ester dank dessen aktiver Methylen-Gruppe addieren sollte:



Andere Forscher schlossen sich dieser Auffassung an²³⁾. Daß diese Annahme aber zumindest nicht in allen Fällen zu Recht besteht, konnte *Snyder*²⁴⁾ dadurch zeigen, daß es ihm gelang, in entsprechender Weise solche tertiären Basen zur Umsetzung zu bringen, die gar nicht zur Bildung einer olefinischen Verbindung durch Abspaltung von sekundärem Amin fähig sind, weil sie in β -Stellung zum tertiären Stickstoff-Atom ein quartäres C-Atom tragen, wie z. B. Benzyl- oder Skatyl-amine. Er benutzte nicht die Basen selbst, sondern nach einem Vorschlag von *Robinson*²⁵⁾, deren quartäre Salze:



^{20a)} Dieselbe Kondensation wurde zur gleichen Zeit von *R. Robinson*²⁵⁾ beschrieben, offenbar unabhängig von *Mannich*.

²¹⁾ *C. Mannich, W. Koch u. F. Borkowsky*, Ber. dtsch. chem. Ges. 70, 355 [1937].

²²⁾ *C. Mannich u. W. Koch*, ebenda 75, 803 [1942].

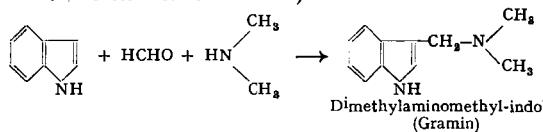
²³⁾ *F. F. Blicke*, „The Mannich Reaction“ in „Organic Reactions“, Vol. I., 301, New York 1942.

²⁴⁾ *J. Amer. Chem. Soc.* 66, 200 [1944].

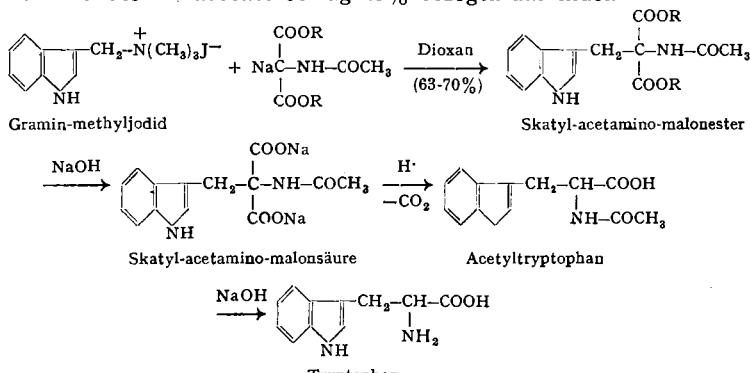
²⁵⁾ *E. C. du Feu, F. J. McQuillin u. R. Robinson*, J. chem. Soc. [London].

1937, 53.

Die dem quartären Salz zugrunde liegende Base, Dimethylaminomethyl-indol, ist das bekannte Alkaloid Gramin, das aus Indol, Formaldehyd und Dimethylamin durch *Mannich*-Reaktion leicht erhalten werden kann²⁶⁾.



Aus dem durch Alkylierung mit Gramin entstandenen Skatylmalonester gewinnt man durch Verseifen und Abspalten von Kohlendioxyd Indolyl-propionsäure. Um von dieser Reaktionsfolge zu einer Tryptophan-Synthese zu gelangen, brauchte nur der Malonester durch den Acetamino-malonester ersetzt zu werden. Im Frühjahr 1944 teilten *Snyder* und *Smith*²⁷⁾ die erste Fassung einer derartigen Synthese mit, die als eine Variante der alten *Sörensen*schen Aminosäure-Synthese aufgefaßt werden kann. Gramin-methyljodid wurde mit der Natrium-Verbindung des Acetamino-malonesters in siedendem Dioxan in 22 h zum Skatyl-acetamino-malonester umgesetzt, der bei der alkalischen Verseifung die Skatyl-acetamino-malonsäure lieferte. Nach Eliminierung einer Carboxyl-Gruppe ergab nochmalige alkalische Hydrolyse *dl*-Tryptophan. Die Isolierung der Aminosäure machte keinerlei Schwierigkeiten; sie scheidet sich nach dem Ansäuern mit Essigsäure in der Kälte aus der Reaktionsmischung ab. Die Gesamtausbeute betrug 45% bezogen auf Indol.



Kurz darauf publizierten *Albertson* und Mitarbeiter²⁸⁾ die gleiche Synthese. Beide Arbeitskreise gaben ein Jahr später Verbesserungen bekannt. *Albertson, Archer* und *Suter*²⁹⁾ erzielten in vierstündiger Reaktion bei Zimmertemperatur einen 95 proz. Umsatz zu Skatyl-acetamino-malonester, wenn sie das quartäre Salz erst in der Reaktionsmischung durch Zusatz von Äthyljodid oder Methylsulfat erzeugten. *Snyder* und Mitarbeiter³⁰⁾ fanden dagegen, daß die Bildung des quartären Salzes überhaupt überflüssig ist; denn freies Gramin bildet mit Acetamino-malonester in Gegenwart von wenig gepulvertem Natriumhydroxyd in siedendem Toluol oder Xylo 90% d. Th. an Skatyl-acetamino-malonester. Die Gesamtausbeute an *dl*-Tryptophan betrug somit 66%, bezogen auf Indol. Als *Albertson* und *Tullar*³¹⁾ den Acetamino-malonester durch den Acetamino-cyanessigester ersetzen, konnten sie die Ausbeute auf 71% erhöhen; die Alkylierung des Esters mit Gramin erbrachte 98% d. Th. an Skatyl-acetamino-cyanessigester, der zudem den Vorteil bietet, bei der alkalischen Hydrolyse in einem Arbeitsgang *dl*-Tryptophan zu liefern. Endlich führte *Hellmann*³²⁾ die *Snydersche Synthese*³⁰⁾ mit dem von *Galat*³³⁾ für Aminosäure-Synthesen vorgeschlagenen Formamino-malonester und Diäthylaminomethyl-indol durch. Vereinfachte Darstellung dieser beiden Ausgangssubstanzen, leichtere Alkylierbarkeit des Formamino-esters und einfache Spaltbarkeit des Skatyl-formamino-malonesters ermöglichen die Bereitung von *dl*-Tryptophan aus Indol und Malonester in 1–2 Tagen mit nahezu 90 proz. Ausbeute. Damit war der Forderung nach einer schnell ausführbaren, ergiebigen Tryptophan-Synthese entsprochen worden.

²⁶⁾ *H. Kühn u. O. Stein*, Ber. dtsch. chem. Ges. 70, 569 [1937].

²⁷⁾ *J. Amer. Chem. Soc.* 66, 380 [1944].

²⁸⁾ *N. F. Albertson, S. Archer u. C. M. Suter*, ebenda 66, 500 [1941].

²⁹⁾ Dieselben, ebenda 67, 36 [1945].

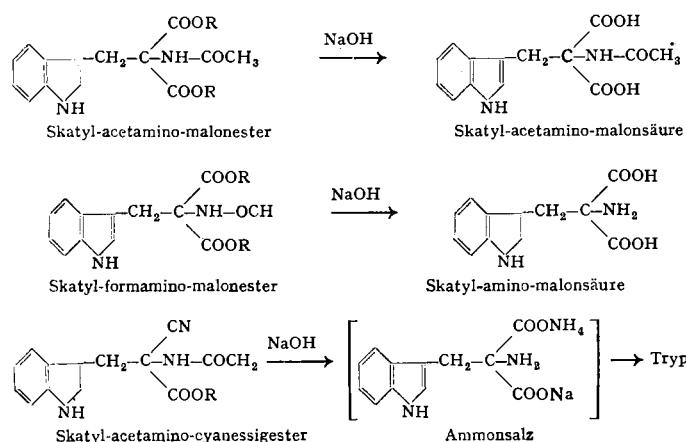
³⁰⁾ *E. E. Howe, A. J. Zambito, H. R. Snyder u. M. Tishler*, ebenda 67, 38 [1945].

³¹⁾ Ebenda 67, 502 [1945].

³²⁾ *H. Hellmann*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. [1949], im Druck.

³³⁾ *A. Galat*, J. Amer. Chem. Soc. 69, 965 [1947].

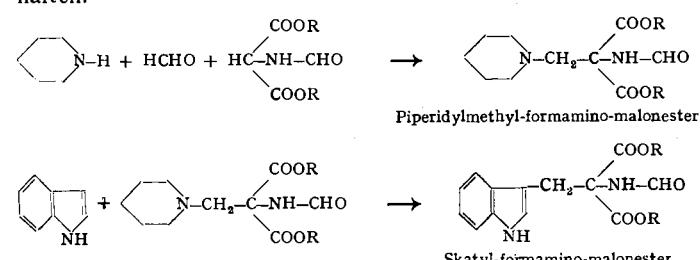
Interessant ist das verschiedenartige Verhalten der drei erwähnten Skatyl-acetylamino-ester bei der alkalischen Hydrolyse. Skatyl-acetamino-malonester verliert selbst bei anhaltendem Kochen mit 20proz. Natronlauge nicht seine Acetyl-Gruppe²⁷⁾, man erhält die Skatyl-acetamino-malonsäure. Anders beim entsprechenden Formaminoester, dessen Verseifungsprodukt beim Erhitzen in schwach saurem Milieu bereits in Tryptophan übergeht; hier muß also bei der alkalischen Hydrolyse die freie Skatyl-amino-malonsäure entstanden sein. Die Verseifung des Skatyl-acetamino-cyanessigesters führt zum



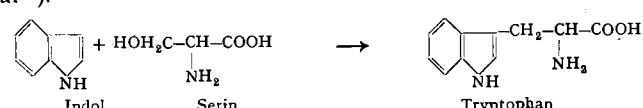
Tryptophan. Dabei ist als Zwischenprodukt wohl ein Ammoniumsalz anzunehmen, dessen Zerfall sich durch Entwicklung von Ammoniak und Bildung von Carbonat zu erkennen gibt³⁴⁾; einen analogen Zerfall hat Albertson beim Ammoniumsalz der 3-Acetamino- α -piperidon-carbonsäure-3 beobachtet.

C. Synthese durch Kondensation von Indol mit tertiären Esterbasen

Alle bisher besprochenen Synthesen gehen von einem Indol-Derivat aus, das in 3-Stellung bereits das β -C-Atom der Alanin-Seitenkette trägt, entweder als Aldehyd- oder als Dialkylamino-methyl-Gruppe. Kürzlich fanden Butenandt und Mitarbeiter³⁵⁾ in gewissen tertiären Esterbasen, die durch Mannich-Reaktion leicht darstellbar sind, kondensationsfähige Stoffe, die mit dem unsubstituierten Indol zu Produkten zusammen treten können, die mit denjenigen aus Gramin und Acylamino-estern identisch sind. So bildet Formamino-malonester mit Formaldehyd und Piperidin innerhalb einer Minute bei Zimmertemperatur einen Piperidylmethyl-formamino-malonester³⁶⁾, der mit Indol in siedendem Xylool bei Gegenwart von wenig Natriumhydroxyd leicht zum bereits im vorigen Abschnitt erwähnten Skatyl-formamino-malonester unter Austritt von Piperidin kondensiert. *dl*-Tryptophan wurde auf diesem Wege in 71 proz. Ausbeute erhalten.



Diese Synthese ist von besonderem Interesse im Hinblick auf die biologische Bildungsweise des Tryptophans bei einigen Mikroorganismen, von der kürzlich Teilvorgänge bekannt geworden sind. Der Schimmelpilz *Neurospora crassa* beispielsweise baut die Aminosäure in letzter Phase aus Indol und Serin auf³⁷⁾.



³⁴⁾ N. F. Albertson, ebenda 68, 2105 [1946].

³⁵⁾ A. Butenandt, H. Hellmann u. E. Renz, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. [1949], im Druck.

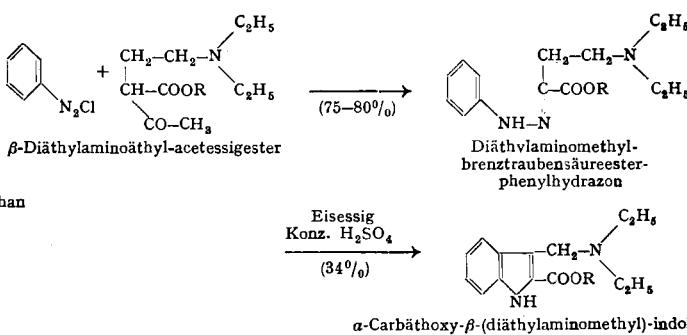
³⁶⁾ A. Butenandt u. H. Hellmann, ebenda [1949], im Druck.

³⁷⁾ E. L. Tatum u. D. Bonner, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 30, 2, 30 [1944].

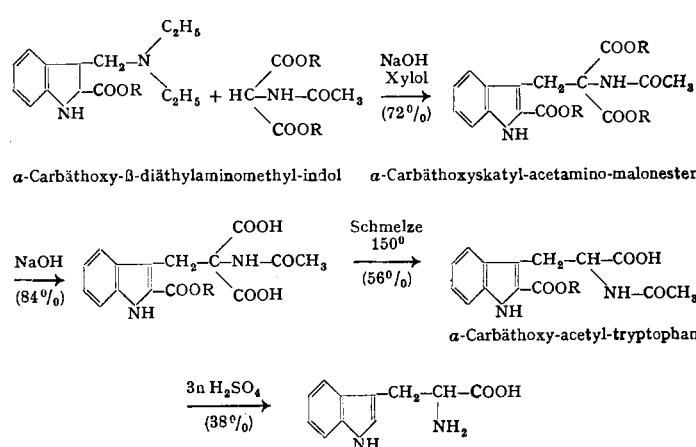
Die Synthese von Butenandt und Mitarbeitern entspricht diesem Prinzip völlig, da sie ebenfalls die ganze Seitenkette mit dem unsubstituierten Indol verknüpft.

D. Unter Indol-Ringschluß verlaufende Synthesen des Tryptophans

In neuester Zeit wurden zwei Synthesen mitgeteilt, die nicht, wie bisher, das vorgebildete Indol zum Ausgangspunkt nahmen. Diejenige von Hegedüs³⁸⁾ ist in gewissem Sinne der Alkylierung mit Gramin wesensverwandt; sie bedient sich jedoch nicht der Mannich-Reaktion. Das benötigte Indol-Derivat, das α -Carbäthoxy- β -diäthylaminomethyl-indol, wird unter Anwendung der Japp-Klingemannschen Synthese³⁹⁾ aus Phenyl diazoniumchlorid und dem bereits bekannten β -Diäthylaminoäthyl-acetessigerester aufgebaut.



Da die Abspaltung der α -ständigen Carboxyl-Gruppe aus diesem Ester bzw. der entsprechenden Säure nicht ohne Verlust der β -ständigen basischen Seitenkette möglich war, wurde der Ester ohne vorherige Decarboxylierung nach der Snyderschen Methode³⁰⁾ mit Acetamino-malonester zum α -Carbäthoxy-skatyl-acetamino-malonester umgesetzt, der unter der Einwirkung von überschüssigem Natriumhydroxyd in der Kälte nur in seinem Malonester-Anteil verseift wird. Die dabei entstehende substituierte Malonsäure geht beim Erhitzen über ihren Schmelzpunkt unter Verlust von Kohlendioxyd in α -Carbäthoxy-acetyl-tryptophan über, aus dem nach längerem Kochen mit verdünnter Schwefelsäure durch Verseifen, Decarboxylieren und Entacylieren *dl*-Tryptophan entsteht.



Die Reaktionsfolge verlief mit einer Gesamtausbeute an *dl*-Tryptophan von 13%, bezogen auf α -Carbäthoxy- β -diäthylaminomethyl-indol.

Einfacher in der Durchführung und ergiebiger ist die kürzlich von Warner und Moe⁴⁰⁾ ausgearbeitete Synthese, die sich eines Ringschlusses nach Art der Fischer'schen Indol-Synthese bedient. Diese hübsche Synthese beginnt mit einer Addition von Acetamino-malonester an Acrolein unter der katalytischen Wirkung von Natriummethylat. Das Reaktionsprodukt, γ -Acetamino- γ , γ -dicarbäthoxy-butyr aldehyd, wird als Phenylhydrazone isoliert⁴¹⁾. Dieses Hydrazon wird mit

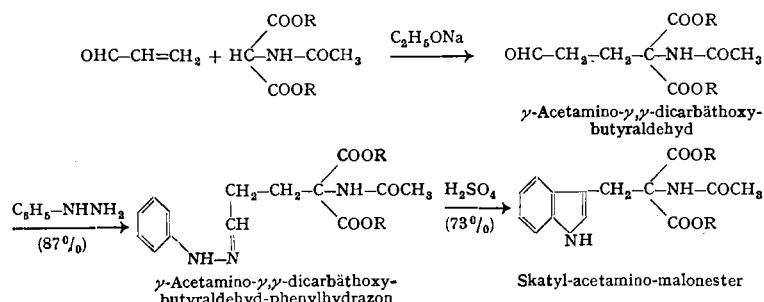
³⁸⁾ Helv. chim. Acta 29, 1499 [1946].

³⁹⁾ F. R. Japp u. F. Klingemann, Ber. dtsch. chem. Ges. 20, 1942 [1887].

⁴⁰⁾ J. Amer. Chem. Soc. 70, 2765 [1948].

⁴¹⁾ O. A. Moe u. D. T. Warner, ebenda 70, 2763 [1948].

Hilfe von Schwefelsäure oder Bor trifluorid⁴²⁾ als Cyclisierungsmittel in ein Indol-Derivat übergeführt, das mit dem Kondensationsprodukt aus Gramin und Acetamino-malonester identisch ist.

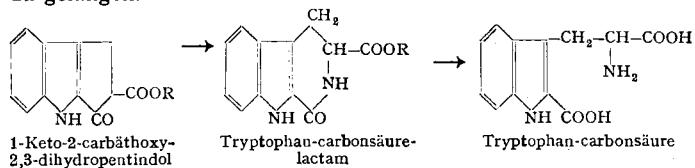


Die Gesamtausbeute an *dl*-Tryptophan, bezogen auf das Phenylhydrazone, beträgt 50%.

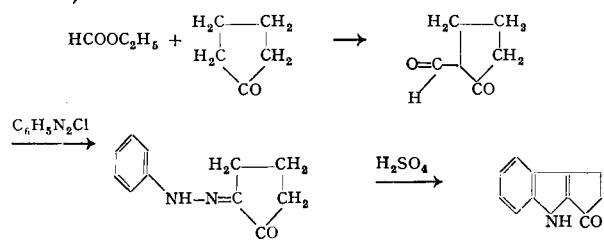
II. Versuche zur Darstellung von Tryptophan

Eine Schilderung der Bemühungen um die synthetische Gewinnung des Tryptophans darf diejenigen Syntheseversuche nicht unberücksichtigt lassen, denen ein interessanter Gedanke zugrunde lag, denen aber das experimentelle Gelingen versagt blieb.

Elks, Elliott und Hems⁴³⁾ hofften das 1-Oxo-2-carbäthoxy-2,3-dihydropentindol durch Einwirkung von Stickstoffwasserstoffsäure nach der Schmidtschen Reaktion oder durch Beckmannsche Umlagerung seines Oxims in das Lactam einer Tryptophan-carbonsäure umwandeln zu können, um von hier aus durch Ringöffnung und Decarboxylierung zum Tryptophan zu gelangen.

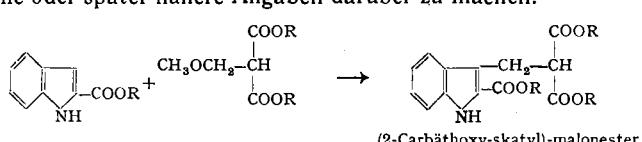


Der Aufbau des Dihydropentindol-Derivates gelang ihnen aber weder durch Cyclisierung von β -(2-Carbäthoxy-indolyl-3)-propionsäureester⁴⁴⁾ nach Dieckmann noch durch Einführung der Carbäthoxy-Gruppe in die 2-Stellung des 1-Keto-2,3-dihydropentindols, das sie durch Ringschluß aus dem Cyclopentan-1,2-dion-mono-phenylhydrazone in 40 proz. Ausbeute (bezogen auf Anilin) erhielten.



Wohl setzte sich das 1-Oxo-2,3-dihydropentindol mit Oxal-ester zum entsprechenden Glyoxylsäureester um, aber die Ab-spaltung von Kohlenmonoxid hieraus, die zum gewünschten Ester geführt hätte, ließ sich nicht bewerkstelligen.

Maurer und Moser⁴⁵⁾ beschrieben schon 1926 die Darstellung des (2-Carbäthoxy-skatyl)-malonesters durch Kondensation von Indolyl-2-carbonsäureester mit Methoxymethylen-malonester, und sie behaupten in derselben Arbeit, hieraus auch bereits Tryptophan dargestellt zu haben, ohne jedoch an dieser Stelle oder später nähere Angaben darüber zu machen.



Elks, Elliott und Hems⁴⁶⁾ haben sich vergeblich bemüht, auf diesem Wege zum Tryptophan zu gelangen. Zwar bildete der Ester ein Monobromprodukt, doch das Brom war in 5-Stellung

⁴² H. R. Snyder u. C. W. Smith, ebenda 65, 2452 [1943].

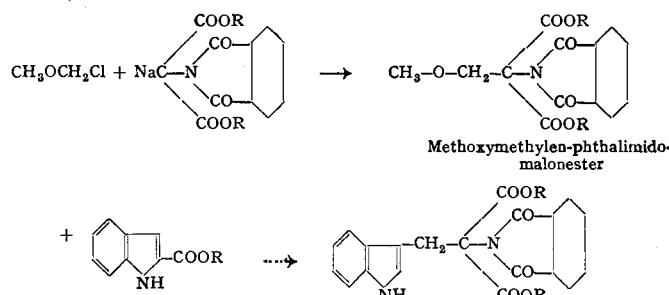
⁴³ J. chem. Soc. [London] 1944, 624.

⁴⁴ Kalb, Schweizer u. Schimpf, Ber. dtsch. chem. Ges. 59, 1858 [1926].

⁴⁵ Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 161, 131 [1926].

⁴⁶ J. chem. Soc. [London] 1944, 626.

des Indol-Ringes eingetreten, die freie Tricarbonsäure aber, die (2-Carboxy-skatyl)-malonsäure, ließ sich überhaupt nicht bromieren. Elks, Elliott und Hems versuchten nach diesem Fehlschlag Indol-2-carbonsäureester mit Methoxymethylen-phthalimido-malonester, den sie durch Umsetzung von Monochlor-methyläther mit Natrium-phthalimido-malonester gewannen, zu kondensieren:



Aber auch dieser Versuch mißlang ebenso wie diejenigen zur Oxydation oder Chlorierung des Skatoyl-2-carbonsäureesters.

Endlich seien noch die in gleicher Richtung strebenden Bemühungen von Smith und Sogn⁴⁷⁾ um die Halogenierung geeigneter Indolyl-carbonsäureester erwähnt. Ihr Ausgangsmaterial war der seit langem bekannte (2-Carbäthoxy-indolyl-3)-propionsäureester. Zwecks Bromierung sollte er in den entsprechenden Malonester übergeführt werden; er erwies sich jedoch als völlig indifferent gegen Äthylcarbonat⁴⁸⁾. Als dann auch die Überführung des Skatol-malonesters weder in definierte Brom-Produkte noch in die freie Säure gelang, unternahmen Smith und Sogn auf Vorschlag von Koelsch den Versuch der Alkylierung von Phthalimido-malonester mit β -Chlorpropionaldehydacetale in der Hoffnung, mit dem Phenylhydrazone des resultierenden Aldehyds durch Fischerse Indol-Synthese einen Ringschluß durchführen zu können, wie es später Warner und Moe⁴⁹⁾ glatt gelang. Aber im Gegensatz zum Acrolein reagiert β -Chlorpropionaldehyd-acetal überhaupt nicht mit dem Ester.

III. Synthese kernsubstituierter Tryptophane

a) Methyltryptophane

Sämtliche Kern-C-methylierten Tryptophane wurden von Rydon⁵⁰⁾, ausgehend von den entsprechenden Methyl-indolen nach der Gramin-Methode dargestellt; Besonderheiten sind darüber nicht zu vermerken. 2-Methyl-tryptophan⁵⁰⁾ und 5-Methyl-tryptophan⁵¹⁾ wurden früher auch schon nach den älteren Methoden gewonnen. Jackman und Archer⁵²⁾ synthetisierten das letztere, wie Rydon, über die Alkylierung mit Gramin.

b) Oxy-tryptophane

Unter den Oxytryptophanen haben bisher nur zwei Vertreter das Interesse der Chemiker gefunden, nämlich 6-Oxytryptophan und 2-Oxytryptophan (auch α -Oxytryptophan genannt), das erste wegen seiner Verwandtschaft zu den Harmala-Alkaloiden, das zweite wegen seiner Bedeutung als Bestandteil des Knollenblätterpilzgiftes Phalloidin und als erstes biologisches Oxydationsprodukt des Tryptophans in Richtung auf das Kynurenin.

Ein Versuch zur Synthese des 6-Oxytryptophans wurde von Harvey und Robson⁵³⁾ unternommen. Sie gingen vom 6-Methoxy-indol aus und bedienten sich der Hydantoin-Methode in der Modifikation von Boyd und Robson; sie gelangten aber nur bis zum 6-Methoxy-tryptophan. Die Spaltung der Phenoläther-Bindung zur freien Oxy-aminosäure konnten sie nicht durchführen.

Die Darstellung des α -Oxytryptophans im Laboratorium gelang bisher nur durch Oxydation des Tryptophans. Witkop⁵⁴⁾ führte sie 1947 mit Acetopersäure als Oxydationsmittel durch. Die besonderen Tautomerie-Verhältnisse in der Oxindol-Reihe stellen der aufbauenden Synthese des α -Oxytryptophans größte

⁴⁷ J. Amer. chem. Soc. 67, 822 [1945].

⁴⁸ V. H. Wallingford, A. H. Homeyer u. D. M. Jones, ebenda 63, 2056 [1941].

⁴⁹ J. chem. Soc. [London] 1948, 705.

⁵⁰ A. Ellinger u. Z. Matsuoka, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 91, 45 [1914]; G. Barger u. A. J. Ewins, Biochemic. J. 11, 58 [1917].

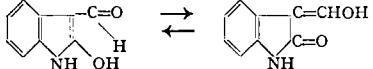
⁵¹ W. Robson, J. biol. Chemistry 62, 495 [1924-25].

⁵² J. Amer. Chem. Soc. 68, 2105 [1946].

⁵³ J. chem. Soc. [London] 1938, 97.

⁵⁴ Liebigs Ann. Chem. 558, 107 [1947].

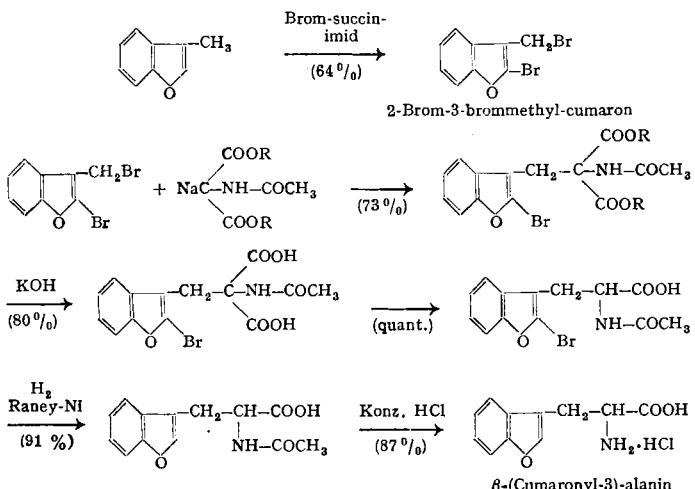
Schwierigkeiten entgegen. Versuche, den Aufbau nach der Azlacton-Methode vorzunehmen^{55, 56}), scheiterten daran, daß β -Oxindol-aldehyd vorwiegend in der Oxymethylen-Form vorliegt⁵⁷.



Das Kondensationsprodukt mit Hippursäure hat nicht die erwartete Formel; es trägt vielmehr, wie Horner⁵⁸ zeigen konnte, den Azlacton-Ring in α -Stellung. Erst nach Fixierung der aktiven H-Atome in 1- und 3-Stellung des Oxindols, nämlich vom 1,3-Dimethyl-oxindol aus, gelang Julian und Pilk⁵⁹ die Synthese des 1,3-Dimethyl-oxytryptophans. Aber auch die Einführung einer Dialkylaminomethyl-Gruppe in β -Stellung, die beim Indol so überaus glatt verläuft und dort zum Gramin führt, gelingt beim Oxindol nicht; es bildet sich ein amorphes Produkt, dessen Analyse auf ein Methylen-bis(oxindol) zutrifft, und in dem vermutlich die Methylen-Gruppe die beiden Oxindol-Reste an den Stickstoff-Atomen bindet⁶⁰). Horner hat in einer sehr gründlichen Studie auf zahlreichen Wegen versucht, durch aufbauende Synthese zum Oxytryptophan zu gelangen. Obwohl er fast alle denkbaren Möglichkeiten in den Kreis seiner experimentellen Untersuchungen einbezog, erreichte auch er nicht das Ziel.

IV. Synthese von mit Tryptophan isosteren Aminosäuren

Mit Tryptophan isostere Aminosäuren wurden dargestellt um ihren Einfluß auf das durch Tryptophan geförderte Wachstum von Mikroorganismen zu studieren. Hier sollen nur die beiden Isosteren berücksichtigt werden, die anstelle der NH-Gruppe im Fünfring ein Sauerstoff- oder Schwefel-Atom tragen. Erlenmeyer und Grubenmann⁶¹ stellten das β -(Cumaronyl-3)-alanin her, indem sie 3-Methyl-cumaron durch Einwirkung von



⁵⁵ H. Fischer, Ber. dtsch. chem. Ges. 56, 2370 [1923].

⁵⁶ B. Witkop, Dissert. München 1940.

⁵⁷ Ch. Gränacher u. A. Mahal, Helv. chim. Acta 6, 467 [1923].

⁵⁸ Liebigs Ann. Chem. 548, 117 [1941].

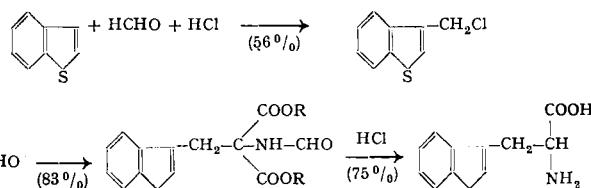
⁵⁹ J. Amer. chem. Soc. 57, 2026 [1935].

⁶⁰ H. Hellmann, unveröffentlicht.

⁶¹ Helv. chim. Acta 30, 297 [1947].

N-Brom-succinimid in das 2-Brom-3-brommethyl-cumaron überführten und dieses mit Acetamino-malonester kondensierten nach der Methode von Albertson⁶²). Verseifen zur substituierten Acetamino-malonsäure, Abspaltung von Kohlendioxyd, Entfernen des Broms durch katalytische Hydrierung mit Raney-Nickel in alkalischer Lösung und Entacetylieren mit konz. Salzsäure führte schließlich zum Hydrochlorid der gewünschten Aminosäure, die aus alkoholischer Lösung mit Pyridin frei abgeschieden wurde.

Wesentlich einfacher gestaltete sich die Synthese der β -(Benzothienyl-3)- α -amino-propionsäure, die von Avakian, Moss und Martin⁶³ beschrieben wurde, weil hier die Einführung der Halogenmethyl-Gruppe auf dem Wege der eleganten Chloromethylierung mit Formalin und Chlorwasserstoff gelingt.



Das Chlor-Produkt wurde mit Natrium-formamino-malonester kondensiert. Die Hydrolyse mit konz. Salzsäure ergab dann bereits das Benzothienyl-alanin.

Eine entsprechende Tryptophan-Synthese über das β -Chlor-methyl-indol ist nicht möglich, da Indol beim Versuch der Chloromethylierung mit Formaldehyd und Chlorwasserstoff unlösliche karmoisinrote Produkte liefert⁶⁴).

V. Gewinnung von d- und l-Tryptophan

In der Natur wird l-Tryptophan gefunden, die Synthese im Laboratorium liefert jedoch die dl-Form. Es wurde daher von verschiedenen Seiten versucht, dl-Tryptophan in seine optischen Antipoden zu spalten. du Vigneaud und Sealock⁶⁵) gelang die Racemat-Spaltung durch fraktionierte Krystallisation der Salze aus Acetyl-tryptophan mit d- α -Phenyläthylamin. Berg⁶⁶) benutzte im gleichen Verfahren als Base erfolgreich das Chinin. Ein biologisches Verfahren zur Gewinnung von d-Tryptophan wurde von Majima⁶⁷) angegeben. Er ließ Coli-Bakterien auf dl-Tryptophan wirken; sie bauen nur die l-Form zu Indol ab, lassen aber die d-Form unangegriffen. Schließlich beschrieben Brenner, Sailer und Kocher⁶⁸) eine Auftrennung des Racemats mit reinem Enzym. dl-Tryptophan-methylester wird von krystallisiertem Chymotrypsin „asymmetrisch“ verarbeitet. Die Ausbeuten bei dieser Methode an reinem d- und l-Tryptophan betragen bezogen auf eingesetztes dl-Tryptophan, 40–60 %.

Eingeg. am 7. April 1949.

[A 214]

⁶² J. Amer. Chem. Soc. 68, 450 [1946].

⁶³ Ebenda 70, 3075 [1948].

⁶⁴ A. Homer, Biochemic. J. 7, 114 [1913].

⁶⁵ J. biol. Chemistry 96, 515 [1932].

⁶⁶ Ebenda 100, 79 [1933].

⁶⁷ Hoppe-Seyl's Z. physiol. Chem. 243, 250 [1936].

⁶⁸ Helv. chim. Acta 31, 1908 [1948].

Biochemie des Nahrungseiweißes

Von Prof. Dr. J. KÜHNAU, Hamburg, Physiologisch-chemisches Institut der Universität

Zahlreiche neue Ergebnisse über Art, Verhalten und Aufgaben des Nahrungseiweißes und seiner Bestandteile, insbesondere im lebenden Organismus, werden mitgeteilt.

Der Bestand des tierischen Organismus an Kohlenhydraten wie an Fett dient vorwiegend der Energielieferung und -speicherung. Er weist insofern eine gewisse Unabhängigkeit von der Zufuhr gleichartigen Materials mit der Nahrung auf, als beide Baustoffgruppen im Körper aus C₂-Ketten beliebiger Herkunft synthetisiert und über diese hinweg ineinander umgewandelt werden können. Die Beziehungen zwischen dem Eiweiß des Körpers und der Nahrung sind aber sehr viel enger und spezifischer. Zwar ist auch ein Teil der Nahrungs-Aminosäuren durch reversible Vorgänge mit dem Kohlehydrat- und Fettstoffwechsel verknüpft und unter geeigneten Verhältnissen der Energielieferung dienstbar; aber im wesentlichen geht das mit der Nahrung aufgenommene Eiweiß seine eigenen, unabhängigen Wege. Es

ist das Rohmaterial, aus dem die spezifischen Strukturen der lebenden Substanz, die der tierische Organismus von sich aus zu synthetisieren nicht in der Lage ist, ebenso wie die meisten der Wirkstoffe, die den Ablauf der Lebensprozesse steuern, aufgebaut werden. So ist die Entstehung der lebenden Substanz – denn „nur das Eiweiß ist lebendig“ (E. Pflüger) – und damit auch das Wesen von Wachstum, Fortpflanzung und Vererbung nur verständlich aus genauer Kenntnis der stofflichen Natur des Nahrungseiweißes und der Funktionen und Umsetzungen seiner Komponenten im Organismus. Unser Wissen auf diesem Gebiet hat in den letzten Jahren dank der Zusammenarbeit von Chemikern, Physiologen, Mikrobiologen und Medizinern entscheidende Fortschritte gemacht.