

58. Alfons Schöberl: Über die Anlagerung von Sulfhydrylcarbonsäuren an ungesättigte Säuren und über eine neue Synthese von Lanthionin*).

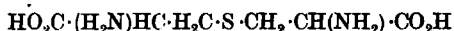
(Mitbearbeitet von Annemarie Wagner.)

(Eingegangen aus Würzburg am 8. März 1947.)

Im Zusammenhang mit der Frage nach dem Chemismus der Lanthionin-Bildung bei der Alkalibehandlung von Eiweißstoffen wird die Anlagerung von Sulfhydrylcarbonsäuren an ungesättigte Säuren untersucht. In neutraler bis schwach alkalischer Lösung können Thioglykolsäure, Thiohydraacrylsäure und *l*-Cystein an Acrylsäure in glatter Reaktion unter Bildung der entsprechenden Thioäther-dicarbonsäuren angelagert werden. Diese Reaktion ermöglicht durch Addition von *l*-Cystein an α -Acetylamino-acrylsäure eine in guter Ausbeute verlaufende neue Synthese von *meso*- und *l*-Lanthionin. Aus kinetischen Messungen an der Umsetzung zwischen Cystein und Acrylsäure lassen sich Geschwindigkeit und Art der Anlagerungsreaktion ableiten. α -Acetylamino-acrylsäure kann Thioessigsäure unter Bildung von *N,S*-Diacetyl-cystein addieren.

Es ist bekannt, daß bei der Einwirkung von Natriumcarbonat auf cystinhaltige Eiweißstoffe der Cystingehalt innerhalb kurzer Zeit weitgehend absinkt, der Gesamtschwefelgehalt hingegen keine so starke Verringerung erfährt¹⁾. Auch verdünnte Laugen und Ammoniak bewirken ein starkes Abfallen des Cystinschwefels in den hier besonders ausführlich untersuchten Wollkeratinen, wobei besonders wichtig ist, daß trotz Abspaltung von Schwefelwasserstoff und Bildung von Sulfhydrylverbindungen die behandelten Präparate noch einen hohen Gehalt an organisch gebundenem Schwefel besitzen. Feststellungen dieser Art führten zur Aufstellung des „Schwefelbilanzverfahrens“, um gewisse, auf chemische Einflüsse zurückzuführende Schädigungen von Schafwollfasern zu ermitteln²⁾.

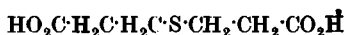
Es erhob sich die Frage, in welcher Form der organisch gebundene Schwefel in so vorbehandelten Proteinen vorliegt; unter anderem wurde eine Thioätherbildung diskutiert³⁾. M.H. Horn, D.B. Jones und S.J. Ringel⁴⁾ bestätigten diese Ansicht, indem sie Lanthionin (I), eine neue Thioätheramino-säure, aus mit Natriumcarbonat behandelter Wolle in guter Ausbeute isolierten.



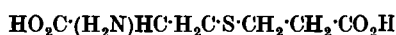
I.



II.



III.



IV.

Nach früheren Untersuchungen⁵⁾ läßt sich ihre Bildung so erklären, daß durch Hydrolyse die Disulfidbindung des Cystins aufgesprengt und das sich bildende Thiol mit unge-

*) Vergl. Diplom-Arbeit A. Wagner, Würzburg 1945.

¹⁾ Vergl. W.F. Hoffmann, Journ. biol. Chem. **65**, 251 [1925]; A. Schöberl, B. **76**, 970 [1943]; E. Elöd, H. Nowotny und H. Zahn, Melliand Textilber. **23**, 58 [1942].

²⁾ A. Schöberl und P. Rambacher, Biochem. Ztschr. **306**, 269 [1940]; A. Schöberl, Angew. Chem. **53**, 227 [1940]; **54**, 313 [1940]; Collegium [Darmstadt] **1941**, 177; Klepzig Textiltzshr. **45**, 41 [1942]; **46**, 81 [1943].

³⁾ A. Schöberl, Angew. Chem. **54**, 313 [1941].

⁴⁾ Journ. biol. Chem. **138**, 141 [1941]; vergl. a. die ausführlichere Darstellung der Entwicklung dieser Problemstellung bei A. Schöberl, B. **76**, 970 [1943].

⁵⁾ A. Schöberl, Biochem. Ztschr. **313**, 214 [1942]; **317**, 171 [1944]; Klepzig Textiltzshr. **45**, 41 [1942].

sättigten Sekundärprodukten der Spaltung⁶⁾, und zwar mit Dehydroalaninresten, zum Thioäther umgesetzt wird, während B.H. Nicolet und A. Shinn⁷⁾ zunächst eine Aufspaltung der C-S-Bindung in den Cystinresten und eine darauf folgende Schwefelabspaltung aus dem schwefelhaltigen Bruchstück annehmen. Weiter diskutiert Nicolet⁸⁾ eine Schwefelwasserstoffabspaltung aus der intermediär enolisierten Form des Cysteins, und schließlich wird auch hier als letzter Schritt zur Lanthioninbildung eine Anlagerung der SH-Gruppen an Dehydroalaninreste gefordert.

Bei der Lanthioninbildung in Proteinen bleiben wahrscheinlich die Cystinreste in die Peptidketten eingebaut. Das freie Lanthionin dürfte erst durch Hydrolyse der vorbehandelten Produkte entstehen. Ob diese Vorstellungen über die Entstehung von Lanthionin auch auf das freie Cystin übertragen werden können, und ob es gelingt, Lanthionin auch durch Alkalibehandlung dieser Aminosäure zu gewinnen, müssen weitere Versuche zeigen.

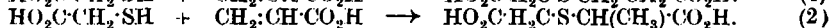
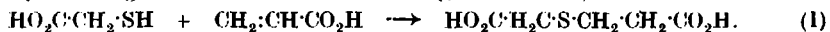
In der vorliegenden Arbeit sollte der experimentelle Beweis dafür erbracht werden, daß Lanthionin nach den oben erörterten Vorstellungen durch Addition der SH-Gruppe an die Kohlenstoffdoppelbindung gebildet wird. Zugleich wurde damit eine neue, präparativ verwertbare Synthese von Lanthionin angestrebt.

Die Anlagerung von SH-Verbindungen an ungesättigte Systeme mit und ohne Lösungsmittel ist mehrfach in der Literatur beschrieben worden⁹⁾. Diese Umsetzungen lassen sich aber nicht ohne weiteres auf Reaktionen, die sich in wäbr. Lösung abspielen, übertragen.

Über die Anlagerung von Sulfhydrylcarbonsäuren an ungesättigte Verbindungen sind wenig Angaben vorhanden. M. S. Kharasch und Mitarbeiter¹⁰⁾ addierten beispielsweise Thioglykolsäure an Styrol und Isobutylen. E. J. Morgan und E. Friedmann¹¹⁾ untersuchten die Umsetzung von Glutathion, Cystein und Thioglykolsäure mit mehreren ungesättigten Säuren, besonders mit Maleinsäure, in wäbr. Lösungen, vor allem ihren zeitlichen Verlauf und die Höhe des Umsatzes. Die Komponenten reagierten als Natriumsalze in wäbr. Lösung bei 37°, wobei mit Phosphatpuffer ein pH. von 7.4 eingestellt war.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, Versuchsmaterial für solche Additionreaktionen zu erbringen.

Für derartige Anlagerungen, z. B. für das Substanzpaar Thioglykolsäure und Acrylsäure, gibt es theoretisch zwei Möglichkeiten¹²⁾:



Entweder tritt der RS-Rest an das wasserstoffreichste C-Atom der Kohlenstoffdoppelbindung (1) oder im Sinne der Regel von W. Markownikoff an

⁶⁾ A. Schöberl und P. Rambacher, A. 538, 84 [1939].

⁷⁾ Vortragsbericht, zit. nach L.R. Mizell und M. Harris, Journ. Res. nat. Bur. Standards 80, 47 [1943]; vergl. B.H. Nicolet und L.A. Shinn, Journ. Amer. chem. Soc. 63, 2284 [1941] (vorl. Mitteil.; in dieser Arbeit wird die Einwirkung von Thiolen auf alkalisch vorbehandelte Eiweißstoffe untersucht).

⁸⁾ Journ. Amer. chem. Soc. 53, 3066 [1931].

⁹⁾ G. Axberg, B. 66, 1193 [1933]; B. Holmberg und E. Schjanberg, Ark. Kemi., Mineral. Geol. Ser. A. 14, 1 [1940]; C. 1941 II, 2553; E. Schjanberg, B. 74, 1751 [1941]; E. Larsson, Svensk. chem. Tidskr. 55, 168 [1943]; C. 1943 II, 1951; F. Kögl und Mitarb., Ztschr. physiol. Chem. 279, 126 [1943]; B. H. Nicolet, Journ. biol. Chem. 95, 389 [1932]; H.F. Carter, C.M. Steven und L.F. Ney, Journ. biol. Chem. 139, 248 [1941]; B.H. Nicolet, Journ. Amer. chem. Soc. 57, 1098 [1935]; 58, 3066 [1931]; V.N. Ipatieff, H. Pines und B.S. Friedmann, Journ. Amer. chem. Soc. 60, 2731 [1938]; S. Akabori und T. Kaneko, Bull. Chem. Soc. Japan 14, 1 [1939].

¹⁰⁾ M.S. Kharasch, A.T. Read und F.R. Majo, Chem. and Ind. 57, 752 [1930].

¹¹⁾ Biochem. Journ. 32, 733 [1938].

¹²⁾ R. Seka, Handb. d. Katalyse, VII, 2. Hälfte, S. 109.

das wasserstoffärmste C-Atom (2). V.N. Ipatieff und B.S. Friedmann¹³⁾ fanden, daß bei Gegenwart von Schwefelsäure die Mercaptananlagerung nach der Markownikoff-Regel verläuft; die Alkylschwefelsäure soll dabei Zwischenprodukt sein. Ebenso wirkt Schwefel als Katalysator im Sinne dieser Regel. Bei Abwesenheit dieser Katalysatoren, aber auch bei Anwesenheit von Phosphorsäure oder Peroxyden, findet dagegen die Anlagerung nach Gleichung (1) statt.

Wegen der oben erwähnten, allgemeinen Zielsetzung der Arbeit mußte bei Auswahl der untersuchten Reaktionen Wert darauf gelegt werden, daß diese in wäßriger Lösung verliefen und damit auch als Modellversuche brauchbar waren.

Thioglykolsäure lagert sich unter Bildung von Methyl-äthyl-sulfid- α,β' -dicarbonsäure (II) nur bei einem $p_H > 7$ leicht an Acrylsäure an. In saurer Lösung läßt sich die Addition nicht durchführen. Das weist darauf hin, daß keine Anlagerung erfolgen kann, wenn die Dissoziation der SH-Gruppe durch hohe Wasserstoff-Ionen-Konzentration zurückgedrängt ist. Auch in stark alkalischer Lösung läßt sich keine gute Ausbeute an Thioäther erzielen, da Thioäther gegenüber Alkali nach Nicolet¹⁴⁾ unbeständig sind.

Zur Verbesserung der Ausbeute bei der Anlagerung von Thioglykolsäure wurde deshalb bei neutraler bis schwach alkalischer Reaktion gearbeitet und durch einen Überschuß von Acrylsäure das Gleichgewicht zugunsten der Thioätherbildung verschoben. Die Anlagerung von Thioglykolsäure an Acrylsäure (1) führte zu derselben Verbindung, die J.M. Lovén¹⁵⁾ aus Thiohydracrylsäure und chloressigsaurem Natrium dargestellt hatte, eine Reaktion, die allgemein zur Gewinnung von Thioäthern benutzt wird. Also verlief die Addition auch gegen die Regel von Markownikoff.

Bei der Anlagerung von Thiohydracrylsäure an Acrylsäure, bei der Diäthyl-sulfid- β,β' -dicarbonsäure (III) entsteht, ergaben sich keine neuen Gesichtspunkte. Auch hier bildete sich die Thioätherdicarbonsäure, die Lovén¹⁵⁾ durch Umsetzung von β -Jod-propionsäure mit Natriumsulfid erhalten hat.

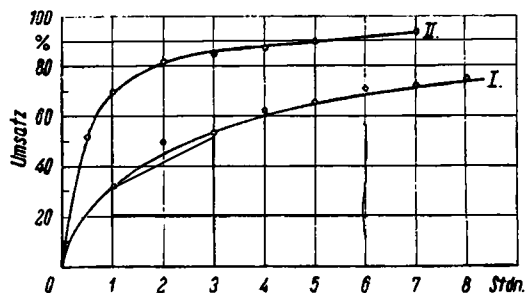
Die Anlagerung von *L*-Cystein an Acrylsäure lieferte in neutraler bis schwach alkalischer Reaktion glatt in guter Ausbeute die bisher nicht bekannte β -Amino-diäthyl-sulfid- β,β' -dicarbonsäure (IV). Diese gut krystallisierende, in heißem Wasser lösliche Thioätherdicarbonsäure besitzt alle Eigenschaften einer Aminosäure. In ihrer Krystallform und in ihren Löslichkeitseigenschaften erinnert sie an das um eine Aminogruppe reichere Lanthionin (I). Die gleiche β -Amino-diäthyl-sulfid- β,β' -dicarbonsäure wurde auch aus *L*-Cystein und β -Brom-propionsäure in der üblichen Weise gewonnen. Sie ist infolge der optischen Aktivität der einen Ausgangskomponente, des *L*-Cysteins, optisch aktiv und dreht nach links, während das *L*-Lanthionin um fast denselben Betrag nach rechts dreht. Andeutungen von Racemisierung waren bei den beiden Darstellungsverfahren nicht zu beobachten.

¹³⁾ Journ. Amer. chem. Soc. **61**, 71 [1939]; **60**, 2731 [1938]

¹⁴⁾ Journ. Amer. chem. Soc. **53**, 3066 [1931].

¹⁵⁾ B. **20**, 1140 [1896].

Kinetische Messungen nach der Thunberg-Methodik zeigten, daß die Anlagerung des Thiols an die Kohlenstoffdoppelbindung schon bei 20° mit durchaus meßbarer Geschwindigkeit verläuft (Abbild., Kurve I). Bei Erhöhung der Reaktionstemperatur von



Abbild. Anlagerung von Cystein an Acrylsäure.
Kurve I bei 20°, Kurve II bei 40°.

20° auf 40° stieg die Geschwindigkeit auf das 4–5-fache an (Kurve II) und bei einer Temperatur von 100° war die Anlagerung innerhalb von 2 Stdn. praktisch vollständig.

Bei diesen Messungen ergaben nur sorgfältig gereinigte Acrylsäure-Präparate maximale Reaktionsgeschwindigkeit und maximalen Umsatz. Vielleicht sind bei weniger sorgfältig gereinigter Acrylsäure Polymerisationsreaktionen begünstigt.

Bei der Addition von Cystein an Acrylsäure nach der üblichen Formulierung müßte eine bimolekulare Reaktion vorliegen. Bei der Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten nach der Gleichung für Reaktionen 2. Ordnung ergab sich, daß die Formel wenigstens angenähert gilt. Es scheint jedoch noch eine stark temperaturabhängige Umsetzung stattzufinden, die das Bild der bimolekularen Reaktion trübt; denn der Abfall der Geschwindigkeitskonstanten bei 40° ist größer als der bei 20°. Dieser Befund deckt sich gut mit der bekannten Polymerisationsneigung der Acrylsäure. Schon bei 40° zeigte sich nach längerer Reaktionszeit in den Thunberg-Rohren eine merkliche Trübung und bei 100° bildete sich ein flockiger Niederschlag polymerisierter Acrylsäure.

Im Zusammenhang mit diesen kinetischen Versuchen wurde schließlich auch das Verhalten der β -Amino-diäthyl-sulfid- β ′-dicarbonsäure gegenüber Alkali untersucht. Natronlauge spaltet diese Thioätherdicarbonsäure bei 100°, aber auch schon bei 40° wieder in die Komponenten Cystein und Acrylsäure.

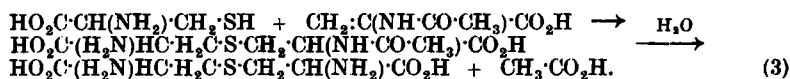
Bei dieser alkalischen Spaltung der Thioäther-dicarbonsäure ließ sich eine auffällige Beeinflussung der Acrylsäure-Polymerisation durch den Luftsauerstoff feststellen. Führt man nämlich diese Spaltung, entsprechend der Thunberg-Technik, bei Ausschluß von Sauerstoff durch, so traten schon nach kurzer Zeit kräftige Trübungen durch polymerisierte Acrylsäure auf. Hingegen blieben bei Gegenwart von Luftsauerstoff die Trübungen vollständig aus. Sauerstoff hemmt daher die Acrylsäure-Polymerisation, wie dies auch in den Angaben über den Einfluß von Sauerstoff bei der Destillation von Acrylsäurepräparaten zum Ausdruck kommt¹⁶⁾.

Als letzter Schritt zum Beweis, daß die Lanthionin-Bildung im Eiweißverband über die Addition von SH-Gruppen des Cysteins an die Kohlenstoffdoppelbindung verlaufen kann, wurde die Umsetzung eines Dehydroalanin-systems gewählt, das Doppelbindung und Aminogruppe an gleichen Kohlenstoffatom trägt. Die freie α -Amino-acrylsäure wäre hierzu geeignet; sie ist jedoch nicht beständig. Nach M. Bergmann und K. Grafe¹⁷⁾ ist aber die N-Acetyl-Verbindung der Aminoacrylsäure verhältnismäßig leicht aus Brenztraubensäure darstellbar.

¹⁶⁾ H. Staudinger und E. Urech, *Helv. chim. Acta* **12**, 1107 [1929]; vergl. H. Staudinger und H.W. Kohlschütter, *B.* **64**, 2091 [1931].

¹⁷⁾ *Ztschr. physiol. Chem.* **187**, 189 [1930].

Die Versuche mit *l*-Cystein und α -Acetylamino-acrylsäure zeigten, daß diese nach folgender Gleichung miteinander reagieren:

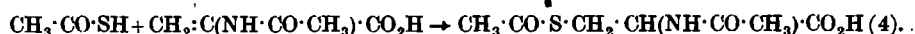


Da in dem so entstandenen *N*-Acetyl-lanthionin die Acetylgruppe leicht durch Säurehydrolyse abspaltbar ist, war damit eine neue Synthese von Lanthionin aufgefunden und die Fähigkeit der C-C-Doppelbindung in diesem Aminoacrylsäure-Derivat zur Thiol-Addition bewiesen. Auch hier erwies sich die Anwendung von höherer Temperatur zur Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit als zweckmäßig; in der Siedehitze war das Cystein in so kurzer Zeit verbraucht, daß die Instabilität der α -Acetylamino-acrylsäure gegen kochendes Wasser nicht ins Gewicht fiel.

Das Acetyl-lanthionin wurde nicht in Substanz isoliert, sondern unmittelbar hydrolysiert und so das freie Lanthionin gewonnen. Infolge der Schwerlöslichkeit dieser Aminosäure bereitete die praktisch quantitative Abtrennung keine besonderen Schwierigkeiten; die Ausbeute betrug über 80% der Theorie. Da zur Addition die *l*-Form von Cystein benutzt wurde, führte die Synthese zu *meso*- und *l*-Lanthionin, die sich in ihrer Krystallform und Löslichkeit unterscheiden. Das aktive Lanthionin zeigt Rechtsdrehung, wie an einem reinen und an einem Mischpräparat festgestellt wurde.

Bisher sind in der Literatur zwei Synthesen von Lanthionin beschrieben worden. V. du Vigneaud und G.B. Brown¹⁸⁾ bauten erstmalig diese Aminosäure durch Kondensation von Cystein mit α -Amino- β -chlor-propionsäure auf. R. Kuhn und G. Quadbeck¹⁹⁾ benutzten dazu die Umsetzung zwischen Natrium-phthalimidomalonester und *symm.* Dichlordimethylsulfid. Beide Synthesen verlaufen aber nur mit mäßiger Ausbeute.

Es ist beabsichtigt, die Umsetzung zwischen α -Acetylamino-acrylsäure und Thiolen an weiteren Beispielen, unter besonderer Berücksichtigung ihrer Kinetik, zu untersuchen. Es zeigte sich z. B., daß sich auch die Thioessigsäure unter geeigneten Bedingungen glatt an die α -Acetylamino-acrylsäure anlagert²⁰⁾:



Diese Umsetzung ist als neuartige Cystin-Synthese von besonderem Interesse, da das primär entstehende *N,S*-Diacetyl-cystein sich nach Säureabspaltung der Acetylreste mit Jod oder Wasserstoffperoxyd ohne weiteres zum Cystin oxydieren läßt. Diese Synthese verläuft in guter Ausbeute und macht das Cystin aus einfachen Ausgangsstoffen leicht zugänglich. Infolge der neuen Erkenntnisse von H. Fink und A. Hock²¹⁾ über die Steigerung des biologischen Wertes von biosynthetischem Hefe- und Pilzmyceleiweiß durch Cystinzusatz ist eine präparativ brauchbare Cystinsynthese heute von besonderer Bedeutung geworden. Eine solche stand bisher nicht zur Verfügung.

¹⁸⁾ Journ. biol. Chem. 188, 151 [1941].

¹⁹⁾ B. 76, 527 [1943].

²⁰⁾ Entsprechende Versuche sind bereits durchgeführt. Hierüber soll bald berichtet werden.

²¹⁾ Vergl. Chemie 58, 34 [1945].

Beschreibung der Versuche.

1. Anlagerung von Thioglykolsäure an Acrylsäure.

Thioglykolsäure und käufliche Acrylsäure²²⁾, in äquimolekularen Mengen gemischt, gaben, sowohl in saurem, als auch in neutralem und stärker alkalischem Milieu, selbst nach tagelangem Stehen, noch einen starken SH-Test mit Nitroprussidnatrium (ohne KCN). Dagegen wurde diese Reaktion bei Überschuß von Acrylsäure in schwach alkalischer Lösung schon nach 1—2 Stdn. negativ.

9.2 g Thioglykolsäure ($\frac{1}{10}$ Mol) wurden mit 15 g Acrylsäure (etwa $\frac{1}{5}$ Mol) versetzt und mit 2 *n* NaOH auf pH 7—8 gebracht (Universal-Indikatorpapier). Sämtliche Umsetzungen wurden in Kohlensäureatmosphäre ausgeführt. Nach dem Verschwinden der Reaktion auf die SH-Gruppen wurde salzsauer gemacht und das Reaktionsgemisch i. Vak. zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde 12 Stdn. im Vakuumexsiccator über Kaliumhydroxyd getrocknet und erschöpfend mit Äther extrahiert. Der gelbliche, ölige Ätherrückstand krystallisierte in der Kälte und wurde mit wenig kaltem Äther gewaschen. Aus Äther weiße Krystalle vom Schmp. 94°; Ausb. 9 g (55% der Th.). Der Misch-Schmelzpunkt mit auf anderem Wege dargestellter Methyl-äthyl-sulfid- α,β' -dicarbonsäure (II) (vergl. den folgenden Abschnitt) ergab keine Schmelzpunkts-Erniedrigung.

Methyl-äthyl-sulfid- α,β' -dicarbonsäure (II) aus Thioglykolsäure und β -Brom-propionsäure²³⁾: 7 g Thioglykolsäure wurden mit 9.5 g Kaliumhydroxyd versetzt (1 g Überschuß) und 11.6 g β -Brom-propionsäure²⁴⁾, die mit 10.8 g Krystall-soda neutralisiert waren, zugegeben. Insgesamt wurden dabei 10 ccm Wasser zugesetzt. Die Lösung erwärmte sich und wurde 2 Stdn. auf dem Wasserbad erhitzt. Nunmehr extrahierte man nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure 3 mal mit Äther. Die Ätherauszüge wurden über Natriumsulfat getrocknet und der Äther abgedunstet. Das zurückgebliebene Öl erstarrte in der Kälte. Zur Entfernung der etwa noch vorhandenen Brompropionsäure kochte man die mit Äther gewaschene Substanz mit Tetrachlorkohlenstoff aus. Aus Äther Schmp. 94° (leichtes Sintern bei 92°); Ausb. 6 g = 48% d. Theorie.

II. Anlagerung von Thiohydracrylsäure²⁵⁾ an Acrylsäure.

Die Acrylsäure für diesen und die folgenden Versuche wurde aus dem Methyl ester gewonnen²⁶⁾.

Es wurden 3.0 g Thiohydracrylsäure in einer Kohlensäureatmosphäre mit 4.0 g Acrylsäure versetzt (Mol.-Verhältnis 1 : 2) und schwach alkalisch gemacht. Nach dem Stehenlassen über Nacht war bereits ein geringer, krystalliner Niederschlag entstanden. Die Lösung wurde salzsauer gemacht und i. Vak. zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in etwa 10 ccm Wasser heiß gelöst; beim Abkühlen fiel die Diäthylsulfid- β,β' -dicarbonsäure (III) in weißen Blättchen aus. Ausb. 3.3 g (= 65.5% d. Th.); Schmp. 129—130° in Übereinstimmung mit den Literaturangaben.

III. Anlagerung von *l*-Cystein an Acrylsäure.

3.5 g Cystein-hydrochlorid²⁷⁾ wurden mit 4.0 g Acrylsäure (Mol.-Verhältnis 1 : 3) in einer Kohlensäureatmosphäre versetzt und die Mischung mit Natronlauge auf pH 7—8

²²⁾ Präparat der Firma Schuchardt, Görlitz.

²³⁾ Vergl. die Umsetzung von Merkapto-isobuttersäure mit Natriummonochloracetat nach E. Larsson und K. Jönssen, B. 67, 757 [1934].

²⁴⁾ Dargestellt nach Org. Syntheses I, 251 und 126.

²⁵⁾ Darstellung nach E. Biilmann, A. 339, 363 [1905] und A. 348, 125 [1906] aus β -Brom-propionsäure.

²⁶⁾ Größere Mengen von Acrylsäuremethyl ester überließen dankenswerterweise die Firmen Röhm und Haas, Darmstadt, und die frühere I.G. Farbenindustrie A.G., Frankfurt/Main-Höchst. Die Ester waren durch Hydrochinon stabilisiert.

²⁷⁾ Darstellung vergl. A. Schöberl, Ztschr. physiol. Chem. 209, 231 [1932]. Umkrystallisation aus 5 *n* HCl. Salzsäures Cystein krystallisiert mit 1 Mol. Krystallwasser.

gebracht. Die Lösung blieb bei Zimmertemperatur stehen. Nach dem Verschwinden der SH-Reaktion wurde die Lösung salzsauer gemacht und i. Vak. zur Trockne eingeeengt. Den Rückstand trocknete man über Nacht im Vakuumexsiccator über Kaliumhydroxyd. Die etwas klebrige Krystallmasse wurde in 10 ccm Wasser heiß gelöst und mit Natriumacetat-Lösung abgepuffert. Beim Abkühlen und Reiben mit einem Glasstab entstanden Krystalle. Diese wurden nach dem Stehenlassen im Eisschrank über Nacht abfiltriert, in wenig Wasser gelöst und diese Lösung mit Alkohol gefällt, um u. U. noch vorhandene Acrylsäure in Lösung zu halten. Nach einigen Stunden wurde abfiltriert und im Vakuumexsiccator getrocknet. Ausb. an β -Amino-diäthyl-sulfid- β , β' -dicarbonsäure (IV) nach zweimaligem Umkrystallisieren 2.5 g (65% der Theorie). Dreieckige, oft igelartig angeordnete Blättchen; unlöslich in Benzol, Äther, Eisessig, Aceton, Äthyl- und Propylalkohol. Zersp. 214—216°. Mit alkal. Plumbit-Lösung tritt nach längerem Kochen nur eine ganz schwache Gelbfärbung auf, während Cystin schon nach kurzer Zeit eine starke Bleisulfidfällung gibt. Quecksilber(I)-nitrat liefert eine weiße Fällung, die in der Hitze löslich ist. Quecksilber(II)-nitrat ruft keine Fällung hervor; erst beim Abpuffern mit Natriumacetat entsteht ein schwacher Niederschlag. Zusatz von Kupferacetat bewirkt Farbvertiefung (Komplexbildung). Das Hydrochlorid krystallisiert in Nadeln und ist gut in Wasser löslich.

$$[\alpha]_D^{18} = -0.18^\circ \times 100/1 \times 2.1976 = -8.19^\circ \text{ (in } n \text{ HCl)}.$$

$C_6H_{11}O_4NS$ (193.2) Ber. S 16.59 N 7.25

Gef. S 16.50²⁸⁾ N 6.70 (Kjeldahl), 7.11, 7.44 (van Slyke)

(5-mal umkrystallisiertes, i. Hochvak. bei 65° über Diphosphorpentoxyd (P_2O_5) getr. Präparat).

Das Naphthalinsulfo-Derivat der Thioätheraminocarbonsäure wurde aus dieser in alkal. Lösung mit β -Naphthalinsulfochlorid gewonnen. Nadeln aus 20-proz. Alkohol. vom Schmp. 146°²⁹⁾

β -Amino-diäthyl-sulfid- β , β' -dicarbonsäure (IV) aus Cystein und β -Brompropionsäure: 3.5 g Cysteinhydrochlorid wurden in einer Stickstoffatmosphäre mit 3.3 g Kaliumhydroxyd in wenig Wasser versetzt. Zu dieser Lösung wurde eine konz. Lösung von 3.06 g β -Brom-propionsäure und 2.86 g Krystallsoda gegeben und das sich erwärmende Gemisch etwa 2 Stdn. auf dem siedenden Wasserbad stehen gelassen. Da am nächsten Tag die Reaktion auf SH-Gruppen negativ war, wurde mit Salzsäure angesäuert und i. Vak. zur Trockne eingedampft. Nach nochmaligem Lösen in Wasser und Einengen wurde in wenig kochendem Wasser gelöst und mit einer konz. Natriumacetat-Lösung auf pH 5—6 abgestumpft. Die Flüssigkeit erstarrte beim Abkühlen zu einem weißen Krystallbrei, den man nach 12 Stdn. abtrennte und trocknete; Zersp. 218—220°.

$$[\alpha]_D^{18} = -0.22^\circ \times 100/1 \times 226.52 = -8.39^\circ \text{ (in } n \text{ HCl)}.$$

$C_6H_{11}O_4NS$ (193.2) Ber. S 16.59 N 7.25 Gef. S 16.50, N 6.95, 6.8, 6.7³⁰⁾ (Kjeldahl)

(4 mal umkrystallisiertes, i. Hochvak. bei 65° über Diphosphorpentoxyd (P_2O_5) getr. Präparat).

Das Naphthalinsulfo-Derivat zeigte ebenfalls den Schmp. 146°.

²⁸⁾ Verbrennung im Quarzrohr nach Schöberl und Mitarbeitern, *Angew. Chem.* 50, 334 [1937], mit anschließender konduktometrischer Sulfat-Titration (A. Schöberl und P. Rambacher, *Kleptzigs Textiltschr.* 42, 369 [1939]; vergl. A. Schöberl, *Ztschr. Analyt. Chem.*, im Druck). Die Vorlage zur Absorption von SO_3 bzw. SO_2 enthielt eine Mischung aus 2 ccm Perhydrol, 2 ccm 5 n NH_3 und 6 ccm Wasser.

²⁹⁾ Sämtliche Schmelzpunkte wurden mit abgekürzten Thermometern (unkorr.) im Kupferblock bestimmt.

³⁰⁾ Die Kjeldahl-Bestimmung scheint bei dieser Substanz etwas zu geringe Werte zu geben (vergl. a. oben).

IV. Anlagerung von *l*-Cystein an α -Acetyl-amino-acrylsäure (Synthese von Lanthionin).

1.6 g Cysteinhydrochlorid und 2.6 g α -Acetyl-amino-acrylsäure wurden in 10 ccm Wasser aufgeschlämmt und durch Zugabe von 28 ccm *n* NaOH gelöst, wobei sich pH 7—8 einstellte (Universal-Indicatorenpapier). Es wurde unter Ausschluß von Sauerstoff in einer Wasserstoff-Atmosphäre mit Bunsenventil gearbeitet.

Nachdem die Lösung 45 Min. bei 50° gestanden hatte, war der SH-Test mit Nitroprussidnatrium noch äußerst stark. Bei 100° wurde er dagegen innerhalb 25 Min. vollständig negativ. Die Lösung wurde i. Vak. zur Trockne eingengt und der Rückstand mit etwa 50 ccm 20-proz. Salzsäure $4\frac{1}{2}$ Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach dem Verdampfen der Salzsäure i. Vak. wurde der Rückstand in Wasser gelöst, die Lösung filtriert und nochmals eingengt. Schließlich löste man heiß mit 14 ccm Wasser und stempfte mit 5 ccm einer gesättigten Natriumacetat-Lösung ab. Es fiel sofort eine beträchtliche Menge eines weißen Stoffes aus. Nach dem Stehenlassen im Eisschrank über Nacht ließen sich 1.54 g weißer Krystalle abfiltrieren. Diese zeigten die für das *meso*-Lanthionin typische Krystallform, waren aber vermengt mit hexagonalen, länglichen Platten, die für das *l*-Lanthionin charakteristisch sind³¹⁾. Die Substanz wurde in 3 ccm Wasser aufgeschlämmt und tropfenweise bis zur vollständigen Lösung mit konz. Salzsäure versetzt. Darauf wurde die blaßgelbliche Lösung mit einer Spatelspitze Carboraffin entfärbt und mit einer gesättigten Natriumacetat-Lösung abgepuffert. Die mikroskopische Prüfung ergab wohl ausgebildete Krystalle des *meso*-Lanthionins.

Die Mutterlauge der ersten Krystallisation gab, auf ein Viertel eingengt, eine Krystallmasse, die nur zum geringsten Teil aus der Aminosäure bestand. Man isolierte hieraus noch etwa 50 mg *meso*-Lanthionin. Somit betrug die Gesamtausbeute 1.59 g = 83,7% der Theorie. $[\alpha]_D^{20}$: $0.20^\circ \times 100/1 \times 6.968 = + 2.87^\circ$ (in *n* NaOH)³²⁾.

$C_6H_{12}O_4N_2S$ (208.2) Ber. S 15.40 Gef. S 15.35, 15.33.

V. Kinetik der Anlagerung von *l*-Cystein an Acrylsäure.

Zu den kinetischen Messungen nach der Thunberg-Technik dienten verschiedene Acrylsäurepräparate.

0.5 ccm einer wäßr. Lösung mit annähernd 175 mg Cysteinhydrochlorid und 0.5 ccm einer wäßr. Lösung von 72 mg Acrylsäure wurden mit 2 ccm *n*NaOH und 2 ccm 0.1 *m* Phosphatpuffer (pH 7.1) im Thunberg-Rohr versetzt, das Rohr in üblicher Weise evakuiert und mit Wasserstoff gefüllt.

Im allgemeinen diente ein Rohr für 2—3 Bestimmungen, einige Rohre auch nur zu Einzelbestimmungen. Nach bestimmten Zeiten entnahm man den Rohren 0.05 ccm und bestimmte hierin photometrisch das noch vorhandene Cystein mit Phosphorwolframsäure (Folin-Methode)³³⁾. Nach der Probeentnahme wurden die Rohre wiederum evakuiert und mit Wasserstoff gefüllt. Die Versuche wurden mit einem Ultrathermostaten nach Höppler durchgeführt.

³¹⁾ Vergleichspräparate von *meso*- und *dl*-Lanthionin aus alkalibehandelte Schafwolle standen für den kristallographischen Vergleich zur Verfügung; vergl. A. Schöberl, B. 76, 970 [1943].

³²⁾ Unter der Voraussetzung, daß die Drehung von *l*(+)-Lanthionin genau bekannt ist, kann hieraus die Konzentration der aktiven Komponente in dem vorliegenden Gemisch errechnet werden. In einem anderen Versuchsansatz fanden wir an einem durch frakt. Krystallisation gereinigten *l*-Lanthionin $[\alpha]_D^{20}$: $+ 19.9^\circ$ (in *n* NaOH).

³³⁾ Vergl. A. Schöberl und P. Rambacher, Biochem. Ztschr. 295, 377 [1938]; direkte SH-Bestimmung ohne Sulfitzusatz.

Versuche bei 20°: Die Tafel 1 enthält die Ergebnisse von 2 bei 20° mit zwei verschiedenen Acrylsäurepräparaten durchgeführten Versuchsreihen.

Tafel 1.
Anlagerung von *l*-Cystein an Acrylsäure bei 20°.

Reaktions- zeit in Stdn.	Versuchsreihe I		Versuchsreihe II	
	mg vorh. Cystein	% Umsatz	mg vorh. Cystein	% Umsatz
0	124.8	—	132.6	—
1	112.6	9.8	90.2	32.0
2	101.7	18.5	67.2	49.3
3	92.1	26.2	62.4	53.0
4	84.1	32.6	50.5	62.0
5	79.0	36.7	47.2	64.4
6	76.3	38.9	38.5	71.0
7	71.8	42.5	37.5	71.7
8	69.6	44.2	33.0	75.1
9	67.8	45.6	31.8	76.0
10	66.9	46.4	23.0	82.6
11	66.0	47.1	22.4	83.1
30	51.3	58.9	13.8	89.6

Während für die Versuchsreihe I die Acrylsäure nur i. Vak. ohne weitere Trennung in einzelne Fraktionen destilliert worden war, wurde für die Versuchsreihe II eine Acrylsäure-Fraktion benutzt, die bei 12 Torr zwischen 41° und 45° abgetrennt worden war und beim Ausfrieren völlig erstarrte.

Aus dem Mittelwert mehrerer Versuchsreihen wurden die Geschwindigkeitskonstanten nach

$$k = \frac{1}{t} \times \frac{c_x}{c_a(c_a - c_x)}$$

berechnet und in der Tafel 2 zusammengestellt.

Tafel 2.
Geschwindigkeitskonstanten bei der Anlagerung von *l*-Cystein an Acrylsäure bei 20°.

Zeit	c_x	$c_a - c_x$	k °
0	—	0.2065	—
1	0.0645	0.1420	0.0366
2	0.0967	0.1098	0.0356
3	0.1133	0.0932	0.0327
4	0.1290	0.0775	0.0336
5	0.1363	0.0702	0.0314
6	0.1437	0.0628	0.0308

Versuch c bei 40°: In der Tafel 3 sind die bei 40° angesetzten Versuche verzeichnet.

Tafel 3.

Anlagerung von L-Cystein an Acrylsäure bei 40°.

Reakt.- Zeit Stdn.	I		II		III		IV		V		VI	
	mg vorh. Cystein	% Umsatz	mg vorh. Cystein	% Umsatz	mg vorh. Cystein	% Umsatz	mg vorh. Cystein	% Umsatz	mg vorh. Cystein	% Umsatz	mg vorh. Cystein	% Umsatz
0	124.8	—	123.8	—	129.0	—	129.2	—	132.7	—	132.7	—
0.5	95.1	23.2	61.2	50.6	54.8	57.5	74.7	42.2	64.0	51.8	41.5	68.7
1	77.5	37.9	44.8	63.8	39.1	69.7	60.6	53.0	40.3	69.6	27.9	79.0
2	62.1	50.2	28.2	77.2	21.8	83.1	46.7	63.8	24.1	81.8	20.9	84.3
3	56.3	54.9	21.8	82.4	19.4	85.0	41.8	67.6	20.0	84.9	16.9	87.3
4	51.6	58.7	17.6	85.8	15.2	88.2	37.6	70.9	16.7	87.4	13.6	89.8
5	51.2	59.0	14.9	88.0					13.6	89.8	9.7	92.7
6	49.9	59.9	13.3	89.3								
7			11.2	90.9					8.2	93.8		

Auch hier wurde zur Versuchsreihe I die Acrylsäure nur i. Vak. ohne weitere Trennung in einzelne Fraktionen destilliert. Zu den Versuchsreihen III und IV dienten verschiedene Fraktionen einer Acrylsäure-Destillation und zwar zu III die Fraktion zwischen 40° und 48°/12 Torr und zu IV die Fraktion unterhalb 40°. Die Acrylsäure für die Versuchsreihen V und VI war sorgfältig destilliert und durch Ausfrieren gereinigt, nur war bei VI die Säure am Tage der Messung bereits 7 Tage alt.

Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten für die Versuchsreihe V ergab folgende Werte (Tafel 4):

Tafel 4.
Geschwindigkeitskonstanten bei der Anlagerung von *l*-Cystein
an Acrylsäure bei 40° (Vers. V der Tafel 3).

Zeit	c_x	$c_a - c_x$	k
0	—	0.2191	—
1	0.1525	0.0666	0.1745
2	0.1782	0.0410	0.1655
3	0.1862	0.0331	0.1427
4	0.1915	0.0276	0.1321
5	0.1970	0.0225	0.1338

Versuche bei 100°: Zu den Versuchen bei 100° wurden die Rohre im Gegensatz zu den vorhergehenden Versuchen nach dem Evakuieren nicht mit Wasserstoff gefüllt. Innerhalb weniger Sekunden entstand in allen eingesetzten Rohren ein flockiger Niederschlag polymerisierter Acrylsäure.

Es wurden 3 Ansätze für verschiedene Reaktionszeiten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tafel 5 verzeichnet. Im Rohr 3 erfolgte hier auch die Cystein-Bestimmung bei Anwesenheit von Sulfid, wobei sich zeigte, daß kein Cystin gebildet worden war.

Tafel 5.
Anlagerung von *l*-Cystein an Acrylsäure bei 100°.

Rohr Nr.	Zeit in Stdn.	mg vorh. Cystein	% Umsatz
1	0.5	10.6	91.44
2	1	10.0	91.92
3	2	4.38	96.46
3	2	4.0	(mit Sulfidzusatz)

VI. Spaltung von β -Amino-diäthyl-sulfid- β , β' -dicarbonsäure mit Natronlauge.

1.) Spaltung bei 100°: Es wurde in offenen 5-cm-Kölbchen gearbeitet, die nach der gewünschten Reaktionszeit auf 5 ccm aufgefüllt wurden. Es reagierten jeweils 19.97 mg Thioätheraminocarbonsäure mit 1 ccm Wasser und 2 ccm *n*NaOH. Die Kölbchen kamen dann in ein siedendes Wasserbad. Das entstandene Cystein wurde wie vorher photometrisch bestimmt. Hierbei erfaßten Parallelbestimmungen mit Sulfid das unter Umständen durch Luftoxydation aus dem Cystein entstandene Cystin. Die Sullivan-Reaktion auf Cystein in den Ansätzen war positiv³⁴). Diese spezifische Farbreaktion beweist die Entstehung von Cystein.

³⁴) Vergl. A. Schöberl und R. Hamm, Biochem. Ztschr., im Druck.

In der Tafel 6 sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zusammengestellt.

Tafel 6.

Spaltung von β -Amino-diäthyl-sulfid- β . β' -dicarbonsäure mit Natronlauge bei 100°.

Zeit Stdn.	Thioäther mg	Cystein mg	Cystin mg	Cystein + Cystin auf Cystein umgerechnet	% Cystein
1	19.97	1.0	—	1.0	8.0
2	19.40	1.545	—	1.545	12.7
3	19.40	1.97	—	1.97	16.2
4	19.40	2.42	—	2.42	19.9
5	19.40	2.33	0.72	3.056	25.1
6	19.97	2.23 (?)	0.34	2.575	20.5
7	19.97	2.485	—	2.485	19.9

Die Verringerung des Cystingehaltes nach 6 Stdn. dürfte auf die Zerstörung dieser Aminosäure durch Alkali zurückzuführen sein. Diese Alkalilabilität wird wohl auch die Ursache der Abnahme des Cysteins nach einer Reaktionsdauer von 5 Stdn. sein.

2.) Spaltung bei 40°: Je 19.40 mg Thioätheraminocarbonsäure wurden mit 1 ccm Wasser und 2 ccm 30-proz. Natronlauge versetzt. Sulfitzusatz bei der Folin-Bestimmung zeigte kein Cystin an (Tafel 7).

Tafel 7.

Spaltung von β -Amino-diäthyl-sulfid- β . β' -dicarbonsäure mit Natronlauge bei 40°.

Zeit in Stdn.	mg Cystein	% Cystein
3	0.531	2.74
6	0.955	4.92
8	1.105	5.70