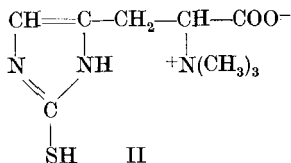
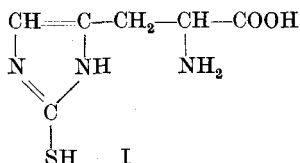


4. Über eine neue Synthese des DL-2-Thiol-histidins

von B. Hegedüs.

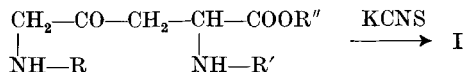
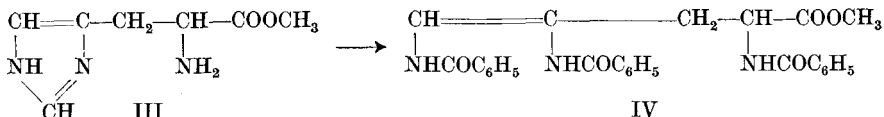
(5. XI. 54.)

Das 2-Thiol-histidin (I) ist die Stammsubstanz des in der Natur vorkommenden Ergothioneins¹⁾ (II). Dieses stellt das α -N-Betain des 2-Thiol-histidins (I) dar:



Während die Synthese des Ergothioneins (II) erst kürzlich gelang²⁾, ist diejenige des 2-Thiol-histidins schon vor längerer Zeit von J. N. Ashley & Ch. R. Harington und Ch. R. Harington & J. Overhoff³⁾ veröffentlicht worden. Die Synthese von Ashley & Harington wurde später von Ch. Tesar & D. Rittenberg⁴⁾ und neuerdings von H. Heath, A. Lawson & C. Rimington⁵⁾ nachgearbeitet, wobei die letzteren Autoren die Ausbeuten wesentlich verbessern konnten.

Harington & Ashley⁶⁾ gehen vom Histidin-methylester (III) aus, der nach A. Kossel & S. Edlbacher⁷⁾ im Sinne der Reaktion von E. Bamberger & B. Berle⁸⁾ benzylierend zu α,γ,δ -Tribenzoylamino-allylessigsäure-methylester (IV) aufgespalten wird. Partielle Verseifung der γ -ständigen Benzoylimino-Gruppe in IV führt zu α,δ -Dibenzoylamino- γ -oxo-n-valeriansäure-methylester (V), dessen Totalverseifung mit starker Salzsäure das Di-



V R und R' = COC_6H_5 ; R'' = CH_3

VIa R, R' und R'' = $\text{H} + 2\text{HCl}$

VIb R, R' und R'' = $\text{H} + 1\text{HCl}$

¹⁾ S. hierzu M. Guggenheim, Die biogenen Amine, 4. Auflage S. 243 (1951).

²⁾ H. Heath, A. Lawson & C. Rimington, J. chem. Soc. **1951**, 2215, dort weitere Literatur.

³⁾ J. chem. Soc. **1930**, 2586; Biochem. J. **27**, 338 (1933).

⁴⁾ J. biol. Chemistry **170**, 35 (1947).

⁵⁾ J. chem. Soc. **1951**, 2216.

⁶⁾ Loc. cit.

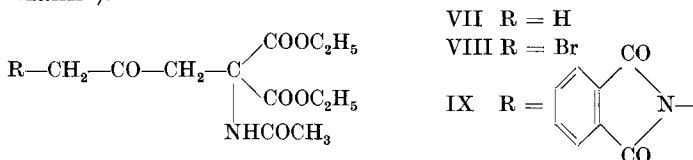
⁷⁾ Z. physiol. Chem. **93**, 396 (1914); s. a. A. Windaus, W. Dörries & H. Jensen, Ber. deutsch. chem. Ges. **54**, 2745 (1921); O. Gerngross, ibid. **46**, 1912 (1913); L. Wolff, Liebigs Ann. Chem. **399**, 297 (1913).

⁸⁾ Liebigs Ann. Chem. **273**, 343 (1893).

hydrochlorid der α,δ -Diamino- γ -oxo-n-valeriansäure (VIa) ergibt, das hierbei nur ölig und mit Ammoniumchlorid verunreinigt erhalten wird¹⁾. Ringschluss von VIa mit Kaliumrhodanid führt zu 2-Thiol-histidin (I)²⁾.

Die vorliegende Arbeit bezweckte die Ausarbeitung einer möglichst einfachen Synthese des DL-2-Thiol-histidins (I), unter Umgehung des an und für sich unnötigen Prozesses der Öffnung und Wiederschliessung des Imidazolringes (III $\rightarrow$ I), wie er sich bei der Verwendung des Histidins als Ausgangsmaterial notwendig erweist³⁾. Dieses Ziel wurde auf folgendem Wege erreicht.

Aus Bromaceton und alkoholfreiem Natrium-acetamino-malonester erhält man den Acetyl-acetamino-malonester (VII) leicht in grösseren Mengen nach einer von uns etwas abgeänderten Vorschrift von O. Wiss & H. Fuchs⁴⁾. Interessant ist es, zu vermerken, dass Chloraceton mit Natrium-acetamino-malonester nicht zu VII kondensiert werden kann⁵⁾.



VII liefert mit Brom in Eisessig unter Ersatz eines Wasserstoffatoms in der endständigen CH_3 -Gruppe⁶⁾ glatt und in guter Ausbeute den (ω -Bromacetyl)-acetamino-malonester (VIII). Die gleiche Verbindung kann man auch aus VII mit N-Bromsuccinimid in Tetrachlorkohlenstoff erhalten; die Ausbeuten sind aber schlecht, und die Entstehung reichlicher Brommengen zeigt, dass Nebenreaktionen ablaufen.

¹⁾ Über die Verbindung VIa siehe weiter unten.

²⁾ Da von natürlichem Histidin ausgegangen wird, ist das so erhaltene 2-Thiol-histidin optisch aktiv: $(\alpha)_D: -9,5^\circ$ (in 2-n. HCl).

³⁾ Die Synthese von Ch. R. Harington & J. Overhoff (loc. cit.) vermeidet zwar auch die Verwendung des Histidins, geht aber von einem anderen Naturprodukt, der Asparaginsäure, aus. Der Weg ist jedoch zu umständlich und eignet sich zur Herstellung von grösseren Mengen 2-Thiol-histidin nicht. — In prinzipiell gleicher Art versuchten A. O. Jackson & C. S. Marvel (J. biol. Chemistry **103**, 191 (1933)), das 2-Thiol-histidin bzw. das Ergothionein aufzubauen. Sie gelangten hierbei bis zum 4(5)-Oxymethyl-2-thiol-imidazol, dessen OH-Gruppe sich aber nicht durch Halogen ersetzen liess. Ähnlich ist auch die neue Synthese des Histamins von M. M. Fraser & R. A. Raphael (J. chem. Soc. **4952**, 226).

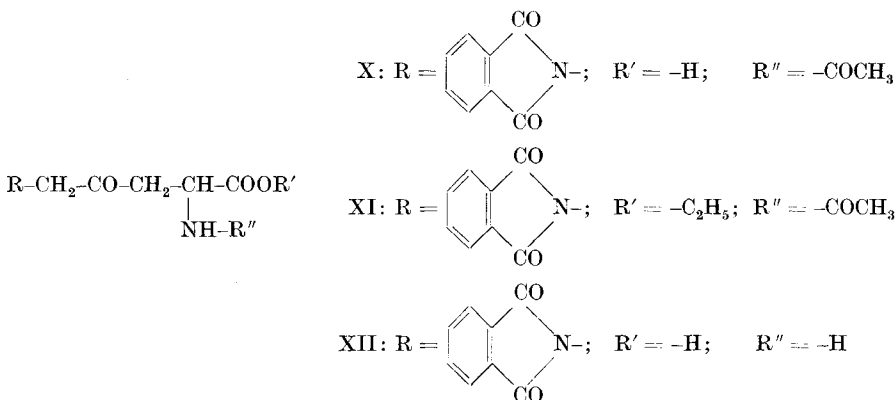
⁴⁾ Helv. **35**, 407 (1952); s. a. K. Dittmer u. Mitarb., Abst. of Papers 117th Meeting, Am. Chem. Soc. S. 17 C (1950).

⁵⁾ Dittmer u. Mitarb. (s. vorhergehende Fussnote) vermerken zwar, dass sie Verbindungen der allgemeinen Formel RCOCH_2Cl zur Kondensation verwendet haben. Experimentelle Details sind jedoch nicht angegeben.

⁶⁾ Ob zuerst die dem tertiären Kohlenstoffatom benachbarte CH_2 -Gruppe bromiert wird und erst durch den überschüssigen Bromwasserstoff eine Umlagerung zu VIII erfolgt (s. hiezu die Umlagerung von α - in γ -Brom-Acetessigester, H. Gault & L. Klees, Bull. Soc. chim. France [4] **39**, 884 (1926)), wurde nicht weiter untersucht. Immerhin spricht der weitere Verlauf der Synthese eindeutig zugunsten der Formel VIII für das Bromierungsprodukt.

Setzt man das Bromid VIII mit Phtalimidkalium in Dimethylformamid nach der Methode von *J. C. Sheehan & W. A. Bolhofer*¹⁾ um, so entsteht in glatter Reaktion der (ω -Phtalylamino-acetonyl)-acetamino-malonester (IX).

Versuche, in dieser Verbindung den Phtalylrest durch Hydrazinolyse abzuspalten, führten nur zu undefinierbaren Produkten²⁾. Erhitzt man IX mit 2,2 Mol Alkali und kocht dann noch kurze Zeit bei pH = 4–5, so erhält man unter Verseifung und Decarboxylierung der entstehenden Malonsäure die α -Acetamino- γ -oxo- δ -phtalylamino- n -valeriansäure (X) oder durch direkte Veresterung den entsprechenden Äthylester XI. Der Ester XI wurde schon vor einiger Zeit von *Ch. R. Harington & J. Overhoff*³⁾ auf einem umständlichen Weg, ausgehend von Asparaginsäure, dargestellt. Versuche, den Phtalylrest in X oder XI hydrazinolytisch zu entfernen, misslangen gleich wie bei der Verbindung IX.



Durch Kochen des Esters XI mit n . Salzsäure erhielten *Ch. R. Harington & J. Overhoff*³⁾ die α -Amino- γ -oxo- δ -phtalylamino- n -valeriansäure (XII). Versuche, in XII die α -ständige Aminogruppe zu methylieren, schlugen fehl.

Wird der (ω -Phtalylamino-acetonyl)-acetamino-malonester (IX) längere Zeit mit konzentrierter Salzsäure gekocht, so erhält man unter Verseifung, Decarboxylierung, Abspaltung der Phtalyl- und der Acetylgruppe das Dihydrochlorid der α, δ -Diamino- δ -oxo-valeriansäure (VIa) in sehr guter Ausbeute. Die Verbindung VI wurde, wie schon eingangs erwähnt, von *J. N. Ashley & Ch. R. Harington*⁴⁾ als ein hygroskopisches Öl, mit wenig Ammoniumchlorid verunreinigt⁵⁾, beschrieben. Bei der Totalverseifung von IX wird sie in Form farbloser bis schwach bräunlicher Kristalle vom Smp. 135–139° erhalten, die in trockenem Zustand gar nicht hygroskopisch sind. Sie lösen sich in

¹⁾ J. Amer. chem. Soc. **72**, 2786 (1950).

²⁾ Das Versagen dieser Reaktion kann nur durch das Vorhandensein der Keto-Gruppe in α -Stellung zum Phtalylamino-Rest bedingt sein. Andererseits gelingt es auch nicht, die CO-Gruppe in IX durch azeotrope Verätherung mit Äthylenglykol in ein cyclisches Ketal überzuführen.

³⁾ Biochem. J. **27**, 338 (1933).

⁴⁾ J. chem. Soc. **1930**, 2588.

⁵⁾ Herrührend von den Nebenreaktionen bei der Verseifung des α, δ -Dibenzoylamino- γ -oxo-valeriansäure-methylesters (V).

Wasser leicht mit kongosaurer Reaktion. Die hervorstechendste Eigenschaft dieser Verbindung VIa ist ihre Neigung, 1 Mol Salzsäure zu verlieren unter Übergang in das in Wasser mit neutraler Reaktion ebenfalls leicht lösliche Monohydrochlorid VIb¹⁾. Dieser Verlust erfolgt beim Umkristallisieren von VIa aus Wasser und Alkohol oder bei längerem Aufbewahren des Dihydrochlorids VIa über Kali im Vakuumexsikkator. Er macht sich durch ein langsames Ansteigen des Smp. 135–140° des reinen Monohydrochlorides VIb bemerkbar.

Die Umsetzung des Dihydrochlorids VIa mit Kaliumhodanid führt in bekannter Reaktion zu DL-2-Thiol-histidin (I).

Experimenteller Teil.

(Alle Smp. sind unkorrigiert.)

1. Acetyl-*o*-acetamino-malonester (VII). Die von *Wiss & Fuchs*²⁾ angegebene Vorschrift wurde wie folgt abgeändert: In eine Lösung von 70 g Natrium in 4 l abs. Alkohol werden 660 g Acetamino-malonester eingetragen. Die entstandene schwach trübe Lösung des Natrium-acetamino-malonesters wird im Vakuum zur Trockne eingedampft. Zwecks vollständiger Entfernung des Alkohols wird unter Zugabe von 2 l Benzol erneut eingedampft und über Nacht bei 100° im Vakuum erhitzt.

Der so erhaltene Natrium-acetamino-malonester wird mit 4 l Benzol überdeckt und nach Zugabe von 408 g (250 cm³) frisch destilliertem Bromacetone 48 Std. am Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wird der Kolbeninhalt vorsichtig in 3 l angesäuertes Wasser geleert, die Benzolschicht abgetrennt, zweimal mit je 1 l Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wird das Benzol im Vakuum abgedampft und der Rückstand³⁾ mit 2 l Äther verdünnt. Über Nacht kristallisieren im Eisschrank 322 g roher Acetyl-*o*-acetamino-malonester (VII) vom Smp. 95 bis 100° aus. Durch Umkristallisieren aus 800 cm³ Alkohol erhält man 270 g (33%) reines Produkt vom Smp. 104–107°.

2. (*o*-Bromacetyl)-acetamino-malonester (VIII). 160 g VII werden in 740 cm³ Eisessig gelöst und diese Lösung auf 70–80° erhitzt. Bei dieser Temperatur gießt man eine Lösung von 102 g (32,4 cm³) Brom in 440 cm³ Eisessig in 6–7 Anteilen hinzu, wobei nach jeder Zugabe der Verbrauch des Broms abgewartet wird. Die Bromierung soll in 4–5 Min. beendet sein. Rasches Arbeiten begünstigt die Ausbeute. Nach beendeter Zugabe dampft man sofort im Vakuum ein (Badtemp. 55–65°) und löst den öligen Rückstand noch warm in 400 cm³ Äther auf. Über Nacht kristallisieren im Eisschrank 130–135 g aus⁴⁾ (64–66% d. Theorie), Smp. 93–96°. Dieses Produkt ist für die nächste Stufe rein genug. Zur Analyse wurde eine Probe aus hochsiedendem Petroläther umkristallisiert. Smp. 95–96°.

C₁₂H₁₈O₆NBr (352) Ber. Br 22,75% Gef. Br 23,38%

3. (*o*-Phthalylamino-acetyl)-acetamino-malonester (IX). 100 g VIII werden in 600 cm³ Dimethylformamid gelöst und unter Rühren innert 20–30 Min. mit 52,8 g Phthalimidkalium portionsweise versetzt. Die Temperatur steigt hierbei auf 35–40°. Man rührt noch 30–40 Min. bei 40°, verdünnt mit 600 cm³ Chloroform und wäscht nacheinander mit zweimal 400 cm³ Wasser, 100 cm³ eiskalter n. NaOH und 20 cm³ 3-n. Salzsäure aus. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird das Chloroform abgedampft und der

¹⁾ *Harington & Overhoff* (l. c.) erhielten die gleiche Verbindung bei der Verseifung des Esters XI.

²⁾ *Helv.* **35**, 407 (1952).

³⁾ Vorsicht! Enthält noch wenig Bromaceton.

⁴⁾ In der Mutterlauge befinden sich nur unscharf schmelzende Gemische, deren Aufarbeitung sich nicht lohnt.

obige Rückstand noch warm in 400 cm³ Äther gelöst. Beim Abkühlen und Kratzen setzt bald Kristallisation ein. Nach Stehen über Nacht im Eisschrank wird abgenutscht und mit viel Äther gewaschen. Ausbeute: 91 g (76%), zum Weiterarbeiten rein genug. Smp. 168—171°. Zur Analyse wurde eine Probe aus wenig Alkohol umgelöst. Smp. 170—171°.

$C_{20}H_{22}O_8N_2$	Ber. C 57,30	H 5,30	N 6,69%
(418)	Gef. „ 57,58	„ 5,58	„ 6,79%

4. α -Acetamino- γ -oxo- δ -phthalylamino-n-valeriansäure (X). 8,2 g IX werden mit einer Lösung von 1,7 g Lithiumhydroxyd in 200 cm³ Wasser bis zur klaren Auflösung am Rückfluss gekocht (2½—3 Std.). Man gibt vorsichtig 48-proz. Bromwasserstoffsäure, bis pH 3—4 erreicht ist, hinzu und kocht weitere 30 Min. Durch erneute Zugabe von Bromwasserstoffsäure¹⁾ stellt man auf pH 2—2,2 und dampft im Vakuum ein. Bei ca. 80 cm³ Volumen tritt Kristallisation ein. Die Kristalle werden abgenutscht und der Rest durch vollständiges Eindampfen der Mutterlauge und Verdünnen des Rückstandes mit Alkohol gewonnen. Ausbeute roh: 3,2 g. Durch Umkristallisieren aus 300 cm³ Alkohol erhält man 2,7 g (43%) vom Smp. 238—240°.

$C_{15}H_{14}O_6N_2$	Ber. C 56,60	H 4,40	N 8,80%
(318)	Gef. „ 56,13	„ 4,60	„ 8,61%

Die Verbindung ist schwer löslich in kaltem, aber leicht löslich in heissem Wasser. Die wässrigen Lösungen neigen stark zur Übersättigung und kristallisieren nur sehr langsam.

5. α -Acetamino- γ -oxo- δ -phthalylamino-n-valeriansäure-äthylester (XI). 16,4 g IX werden mit einer Lösung von 4,2 g Natriumhydroxyd in 120 cm³ Wasser und 40 cm³ Alkohol 2 Std. am Rückfluss gekocht. Man stellt mit Salzsäure auf pH 3—4 und kocht weitere 30 Min. Nach Zugabe von Salzsäure bis zu stark kongosaurer Reaktion wird im Vakuum zur Trockne verdampft und der Rückstand durch mehrmaliges Abdampfen mit abs. Alkohol ganz getrocknet. Man übergiesst mit 200 cm³ 15-proz. abs. alkoholische Salzsäure und lässt über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Man filtriert von ausgeschiedenem Salz ab, wäscht mit abs. Alkohol nach und dampft im Vakuum ein. Der übrigbleibende Sirup wird mit 500 cm³ Wasser durchgerührt, worauf er bald durchkristallisiert. Man nutscht ab und kristallisiert noch feucht aus 500 cm³ Wasser von 60—70° um. Ausbeute: 5,4 g (40%). Smp. 172—174°²⁾. Mit dem Ausgangsester IX zeigt die Mischprobe eine Depression von 20—30°. Zur Analyse wurde über Nacht im Hochvakuum bei 80° getrocknet.

$C_{17}H_{18}O_6N_2$	Ber. C 58,96	H 5,20	N 8,08%
(346)	Gef. „ 58,88	„ 4,98	„ 8,16%

6. α, δ -Diamino- γ -oxo-valeriansäure-dihydrochlorid (VIa). 133 g IX werden mit 800 cm³ konz. Salzsäure 5 Std. am Rückfluss gekocht. Nach dieser Zeit ist eine klare, dunkelgrüne Lösung entstanden. Man gibt 1 l Wasser hinzu, stellt über Nacht in den Eisschrank und nutscht die ausgefallene Phtalsäure ab. Man dampft das Filtrat im Vakuum auf ca. 400 cm³ ein, filtriert die letzten Reste Phtalsäure³⁾ ab, entfärbt das Filtrat durch erneutes Filtrieren mit Kohle, engt im Vakuum auf ca. 150 cm³ ein und verdünnt mit 1200 cm³ Alkohol. Über Nacht kristallisieren im Eisschrank 67 g (96%) α, δ -Diamino- γ -oxo-n-valeriansäure-dihydrochlorid (VIa) aus. Smp. 135—140°. Das über Nacht auf Kali getrocknete Produkt hatte schon einen Teil der Salzsäure verloren, wie die Analyse zeigte:

$C_5H_{12}O_3N_2Cl_2$ (219)	Ber. Cl 32,21%	Gef. Cl 30,83%
-----------------------------	----------------	----------------

Wird das Dihydrochlorid VIa aus Alkohol + Wasser umgelöst, so geht es in das Monohydrochlorid VIb über. Smp. 256° (Zers.).

$C_5H_{11}O_3N_2Cl$ (182,5)	Ber. N 15,35	Cl 19,45%	Gef. N 14,85	Cl 19,61%
-----------------------------	--------------	-----------	--------------	-----------

¹⁾ Durch die Verwendung von LiOH und HBr vermeidet man eine Verunreinigung durch anorganische Salze (LiBr ist gut alkohollöslich).

²⁾ Lit. 170—172° (Biochem. J. **27**, 338 (1933)).

³⁾ Erhalten: 44 g Phtalsäure (entspr. 93%; ber. 47,5 g).

7. DL-2-Thiol-histidin (I). 61 g α, δ -Diamino- γ -oxo-n-valeriansäure-dihydrochlorid (VIa) werden in 500 cm³ Wasser gelöst und bei 90–100° mit 61 g Kaliumrhodanid in 4 Portionen in Abständen von je 30 Min. versetzt. Dann erhitzt man noch 1 Std. auf 80–90°, kocht kurz auf und filtriert mit Kohle. Das klare, hellgelbe Filtrat wird unter vorsichtiger Zugabe von Natriumcarbonat-decahydrat auf pH 5 gestellt, worauf das 2-Thiol-histidin ausfällt. Man lässt über Nacht im Eisschrank kristallisieren, nutsch ab und wäscht gut mit Wasser aus. Das gut abgepresste Rohprodukt wird noch feucht aus 3 l Wasser umkristallisiert. Reinausbeute: 26 g (50%) (20 g 1. Fraktion + 6 g aus der Mutterlauge beim Einengen im Vakuum auf 200 cm³). Zers. über 300° ohne Schmelzen. Ninhydrin-Probe und Nitroprussid-Reaktion positiv. Zur Analyse wurde 48 Std. im Hochvakuum bei 120° getrocknet.

$C_6H_9O_2N_3S$	Ber.	C 38,50	H 4,85	S 17,12	N 22,46%
(187)	Gef. „	38,30	„ 4,86	„ 16,92	„ 21,17% ¹⁾

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung Dr. H. Waldmann) ausgeführt.

Zusammenfassung.

Es wird über eine Synthese von DL-2-Thiol-histidin berichtet, die über folgende Stufen verläuft: Acetyl-acetamino-malonester $\rightarrow$ (ω -Bromacetyl)-acetamino-malonester $\rightarrow$ (ω -Phthalylamino-acetyl)-acetamino-malonester $\rightarrow$ α, δ -Diamino- γ -oxo-n-valeriansäure $\rightarrow$ DL-2-Thiol-histidin.

Wissenschaftliche Laboratorien

der F. Hoffmann-La Roche & Co., Aktiengesellschaft, Basel.

5. Komplexbildner als Cofaktoren isolierter Zellgranula

von J. Raaflaub.

(18. XI. 54.)

Aus Leberzellen isolierte Granula – sog. Mitochondrien – bewahren, sofern sie in einem geeigneten Milieu suspendiert sind, während längerer Zeit ihre kompakte Struktur und die Fähigkeit, die Oxydation von Metaboliten des Intermediärstoffwechsels (Glieder des Zitronensäurezyklus usw.) zu katalysieren²⁾. Eine Reihe von Untersuchungen hat ergeben, dass die Stoffwechselaktivität dann verloren geht, wenn die Mitochondrien schwellen³⁾⁴⁾. Eine eingehende Darstellung der mit der Schwellung gekoppelten chemischen und physikalisch-chemischen Veränderungen ist früher veröffentlicht worden⁴⁾⁵⁾.

¹⁾ Stickstoffwerte stets zu niedrig; die Substanz ist sehr schwer verbrennbar.

²⁾ F. Leuthardt & J. Mauron, Helv. physiol. pharmacol. Acta **8**, 386 (1950). — D. E. Green, Symposium sur le cycle tricarboxylique, II^{me} Congrès international de Biochimie, Paris 1952.

³⁾ J. W. Harman, Exper. Cell Res. **1**, 382 (1950).

⁴⁾ J. Raaflaub, Helv. physiol. pharmacol. Acta **11**, 142, 157 (1953).

⁵⁾ O. Brenner-Holzach & J. Raaflaub, Helv. physiol. pharmacol. Acta **12**, 243 (1954).