

# Reaktionen von Bisdiazohexan mit Aminosäuren, Mercaptanen, Wollkeratin und Seidenfibroin

Von Helmut Zahn und Otto Waschka\*)

*Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg*

Eingegangen am 20. Oktober 1955

## ZUSAMMENFASSUNG:

1. N-acylierte Aminosäuren, wie Acetyl-glycin, Hippursäure, Acetyl- $\epsilon$ -aminocapronsäure reagieren mit Bisdiazohexan.
2. Aus Bisdiazohexan und Mercaptanen wie Thiophenol, Benzylmercaptan entstanden Bisthioäther.
3. N-Benzoyl-tyrosinäthylester reagiert mit Bisdiazohexan zu einem kristallisierten Bisäther.
4. Die Reaktion von Bisdiazohexan mit reduzierter Wolle führt zur Bildung von S,S'-Hexamethylen-bis-cystein und O,O'-Hexamethylen-bis-tyrosin in der Faser. Beide wurden aus Hydrolysaten isoliert.
5. Bei Fibroin reagieren die Tyrosinphenole und Carboxyle mit Bisdiazohexan. Der Bisäther wurde isoliert, die Esterbildung durch Titration der Faser ermittelt.
6. Bisdiazohexan gehört zu den mildesten Vernetzungsmitteln.

## SUMMARY:

1. N-acylated amino acids like acetyl glycine, hippuric acid, acetyl- $\epsilon$ -aminocaproic acid react with bisdiazohexane.
2. Bisdiazohexane and mercaptanes like thiophenol, benzylmercaptane give bis-thioethers.
2. Ethyl-N-benzoyl-tyrosinate gives with bisdiazohexane a crystalline bisether.
4. By treatment of reduced wool with bisdiazohexane S,S'-hexamethylen-bis-cysteine and O,O'-hexamethylen-bis-tyrosine will be formed in the fibre. Both could be isolated.
5. With fibroine the phenolic groups of tyrosine and the carboxylic groups react with bisdiazohexane. The bisether has been isolated; the occurrence of ester linkages has been demonstrated by titration of the fibre.
6. Bisdiazohexane belongs to the mildest cross linking agents.

W. Kirst<sup>1)</sup> studierte im Rahmen umfangreicher Versuchsserien über die Veredlung von Wolle durch chemische Modifizierung die Reaktion zwischen einem „bifunktionellen Diazomethan“, dem von ihm erstmalig dargestellten Bisdiazohexan (I) und Faserproteinen wie Wolle und Kollagen.

\*) Teil der Diplomarbeit und Dissertation, Heidelberg 1952 und 1954.

<sup>1)</sup> W. Kirst, *Melliand Textilber.* **28** (1947) 169.



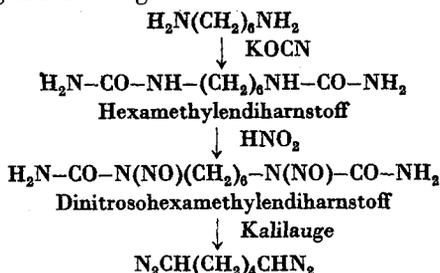
Die behandelte Wolle zeigte gegenüber der Originalwolle eine erhöhte Alkalibeständigkeit, welche auf die Bildung neuer weitgehend beständiger Brückenglieder zurückgeführt wurde. Ebenso war auch die Reaktion zwischen Bisdiazohexan und reduzierter Wolle erfolgreich, wobei hier an eine zusätzliche Reaktion mit den SH-Gruppen der reduzierten Wolle gedacht wurde.

Mit Alkohol und Äther entwässerte Kalbsblöße zeigte nach 5 Tage langer Einwirkung einer ätherischen Lösung von Bisdiazohexan ähnliche Eigenschaften wie weißgegerbtes Leder.

Nach Kirst kann die Reaktion der Bisdiazookane mit Wolle für die weitere Aufklärung des Verhaltens der Faser und ihres Aufbaues gute Dienste leisten. Dem Autor kam es in erster Linie in seiner Arbeit auf den faserchemischen Veredlungseffekt an; die Frage, mit welchen Gruppen im Eiweiß Bisdiazohexan reagiert hat, wurde nur allgemein diskutiert. Wir hielten es im Rahmen unserer präparativen Arbeiten an Brückenreaktionen mit Aminosäuren und Proteinen<sup>2)</sup> für wünschenswert, zu klären, welche der im Eiweiß vorkommenden Gruppen mit Bisdiazohexan reagieren und entsprechende Reaktionsprodukte aus dem Reagens und aus geeigneten Modellsubstanzen zu synthetisieren.

### 1. Zur Darstellung von Bisdiazohexan

Kirst<sup>1)</sup> gewann eine ätherische Bisdiazohexanlösung aus Hexamethylendiamin auf folgendem Wege:



E. Müller und S. Petersen<sup>3)</sup> verwendeten das beständigere Dinitrosourethan. Die Arbeit von C. M. Samour und J. Philip Mason<sup>5)</sup> erschien erst nach Abschluß unserer Arbeiten. Wir hielten uns im wesentlichen an die Angaben von Th. Lieser und G. Beck<sup>4)</sup>: Der Dinitrosohexamethylen-

<sup>2)</sup> Vgl. H. Zahn, *Angew. Chem.* **67** (1955) 561.

<sup>3)</sup> E. Müller u. S. Petersen, *Angew. Chem.* **63** (1951) 18.

<sup>4)</sup> Th. Lieser u. G. Beck, *Chem. Ber.* **83** (1950) 137.

<sup>5)</sup> C. M. Samour u. J. Ph. Mason, *J. Amer. chem. Soc.* **76** (1954) 441.

diharnstoff wurde in einer Ausbeute von 45 % erhalten und war bei Aufbewahrung im Eisschrank einige Monate haltbar. Die Ausbeute an Bisdiazohexan aus dem Nitrosokörper betrug etwa 40 %.

Bisdiazohexan ist ein orangerot gefärbtes, durchdringend riechendes, sehr toxisches Öl, das sich schon bei 10° zersetzt. Bei der Vakuumdestillation der Verbindung erhielten wir wie Lieser und Beck<sup>4)</sup> *Cyclohexen* (Kp. 82–84°), jedoch in einer Ausbeute von 30 %. Der Destillationsrückstand bestand aus dunklen Harzen.

In ätherischer Lösung ist das Reagens in der Kälte und im Dunkeln einige Tage haltbar. Die Zersetzung erkennt man an der N<sub>2</sub>-Entwicklung und dem Verblässen der Farbe. Leider erwiesen sich die nach dem Abdestillieren des Äthers erhaltenen sirupösen Zersetzungsprodukte als in fast allen Lösungsmitteln löslich, so daß es sehr schwierig war, die Reaktionsprodukte aus Bisdiazohexan und Aminosäuren zu reinigen.

## 2. Frühere Arbeiten über Reaktionen von Bisdiazohexan (BDH) mit niedrigmolekularen Verbindungen

H. Lettré und U. Brose<sup>6)</sup> erhielten aus BDH und Benzoesäure sowie p-Nitrobenzoesäure kristallisierte Bisester, während Th. Lieser und G. Beck<sup>4)</sup> mit Phenol und β-Naphthol kristalline Bisäther aufbauten. In neuester Zeit berichteten Samour und Mason<sup>5)</sup> über Versuche, bei welchen sie Benzoesäure, Phenol, Acetessigester, Acetaldehyd, Heptylaldehyd, Furfurol und andere Aldehyde mit Bisdiazohexan reagieren ließen.

Im Falle von Proteinen waren Reaktionen an den peptidkettenendständigen und den Seitenketten-Carboxylen (Glutamin- und Asparaginsäure) sowie mit den phenolischen Gruppen des Tyrosins zu erwarten. Voraussetzung für diese Bisester- und Bisätherbildung ist, daß diese Gruppen im festen Faserprotein nicht zu weit voneinander entfernt vorliegen. Ferner war es nicht ausgeschlossen, daß auch die Thiole eingebauter, sowohl ursprünglich vorhandener, als auch durch Reduktion nachträglich geschaffener Cysteinreste unter Thioätherbildung reagieren würden, obwohl solche Reaktionen zwischen Mercaptanen und Bisdiazohexan noch nicht beschrieben waren.

## 3. Reaktionen von BDH mit Aminosäuren und ihren Derivaten

a) Die primäre *Aminogruppe* scheint mit BDH nicht zu reagieren. Jedenfalls gelang es uns nicht, sowohl freies Glycin als auch dessen Äthylester oder ε-Aminocaprinsäure zur Reaktion zu bringen.

<sup>6)</sup> Naturwissenschaften 36 (1949) 57.

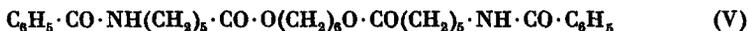
b) Erwartungsgemäß reagieren die undissoziierten *Carboxygruppen* der in Dimethylformamid gelösten *N*-Acetyl- oder Benzoyl-aminosäuren mit einer ätherischen BDH-Lösung.

Durch Bestimmung des Verseifungsäquivalents und der Verseifungszahl wurde ermittelt, daß die beiden Bisester, Bis-[*N*-acetylglycyl]-hexandiol-(1,6) (II) und Bis-[*N*-benzoylglycyl]-hexandiol-(1,6) (III), zu 87 % bzw. 70 % in den bei der Aufarbeitung erhaltenen sirupösen Endprodukten enthalten waren, welche wegen der bereits erwähnten Schwierigkeit, die entstandenen Beiprodukte abzutrennen, nicht zur Kristallisation gebracht werden konnten.



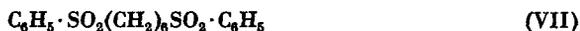
Ferner wurde das bei der Verseifung von (II) gebildete Hexandiol durch Vakuumdestillation isoliert und identifiziert.

Die Bisester Bis-[*N*-acetyl- $\epsilon$ -aminocaproyl]-hexandiol-(1,6) (IV) und Bis-[*N*-benzoyl- $\epsilon$ -aminocaproyl]-hexandiol-(1,6) (V) entstanden aus BDH und *N*-Acetyl- $\epsilon$ -aminocapronsäure sowie *N*-Benzoyl- $\epsilon$ -aminocapronsäure; die Reaktionen wurden ebenfalls in Dimethylformamid-Lösung durchgeführt.

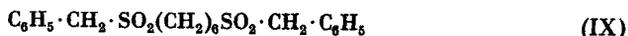
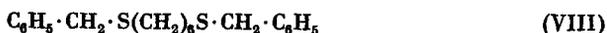


Bis-[*N*-benzoyl- $\epsilon$ -aminocaproyl]-hexandiol-(1,6) (V) konnte dabei als reine kristallisierte Verbindung vom Schmelzpunkt 151–153° erhalten werden.

c) *Mercaptane* wie Thiophenol, Benzylmercaptan und *L*-Cysteinäthylester reagierten mit BDH glatt zu den erwarteten Bis-thioäthern, die sich in reiner, kristallisierter Form isolieren ließen. *S,S'*-Hexamethylen-bis-thiophenol (VI) konnte durch Wasserstoffperoxyd in Eisessig in das Disulfon (VII) übergeführt werden:



Auch *S,S'*-Hexamethylen-bis-benzylmercaptan (VIII) wurde zum Disulfon (IX) oxydiert.



Beide Disulfone wurden kristallin erhalten.

S,S'-Hexamethylen-bis-L-cysteinäthylester (X) bildete sich viel langsamer als die Bisthioäther (VI) und (VIII), was wir auf eine Wechselwirkung zwischen der Thiol- und Aminogruppe im Cysteinester zurückführen.

Aus dem Ester wurde die freie Diaminosäure (XI) durch Verseifen gewonnen und ihre Konstitution



durch Vergleich mit dem früher aus L-Cystein und 1,6-Dibromhexan dargestellten Bisthioäther<sup>7)</sup> sichergestellt. Die  $R_f$ -Werte der Verbindungen (X), (XI) sowie des Cysteinäthylesters, des Cystinesters und des Cystins finden sich in Tab. 1 (vgl. Abb. 1, 2).

Tabelle 1

$R_f$ -Werte in	SBA	Phenol
S,S'-Hexamethylenbiscysteinäthylester .....	0,40	0,96
S,S'-Hexamethylenbiscystein .....	0,18	0,72
Cysteinäthylester .....	0,54	0,99
Cystindiäthylester .....	0,10	0,89
Cystin .....	0,04	0,25

SBA = 75 Teile Sek. Butanol, 15 Teile Ameisensäure, 10 Teile Wasser.

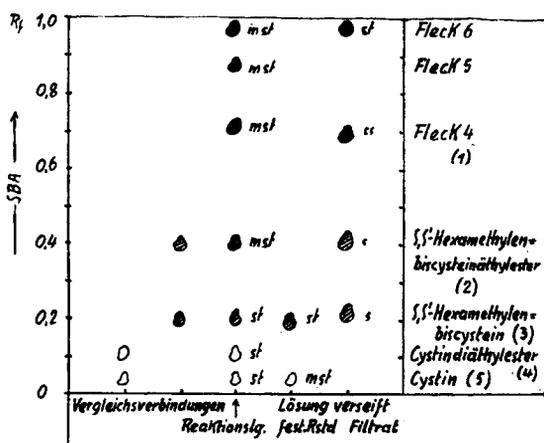


Abb. 1 Papierchromatographische Untersuchung der Reaktion von Bisdiazohexan mit Cysteinäthylester

<sup>7)</sup> H. Zahn u. B. Wolle mann, Makromolekulare Chem. 10 (1953) 122; H. Zahn u. K. Traumann, Liebigs Ann. Chem. 581 (1953) 168, 591 (1955) 232.

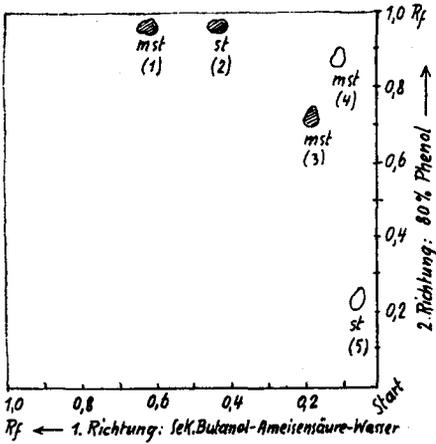


Abb. 2. Zweidimensionales Papierchromatogramm des Reaktionsproduktes von BDH mit Cysteinäthylester

d) Die Reaktion von BDH mit *L*-Tyrosinäthylester verlief ebenfalls langsam und führte zur Bildung von *O,O'*-Hexamethylen-bis-*L*-tyrosin-äthylester (XII) und *O,O'*-Hexamethylen-bis-*L*-tyrosin (XIII), die als Gemisch im sirupösen Reaktionsprodukt vorlagen und nur chromatographisch getrennt und aufgeklärt werden konnten (vgl. Abb. 3).

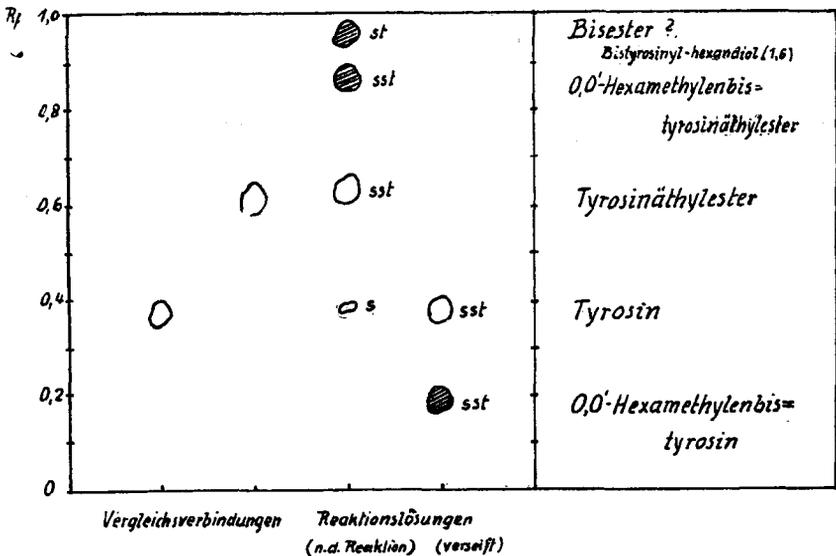
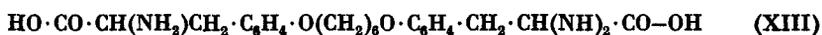


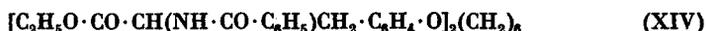
Abb. 3. Eindimensionales Papierchromatogramm des Reaktionsgemisches Tyrosinäthylester + BDH.

[aufsteigende Methode; Whatman Nr. 1; Lösungsmittelgemisch: Sek. Butanol-Ameisensäure-Wasser (75:15:10)]

Reaktionen von Bisdiazohexan mit Aminosäuren, Mercaptanen, Wollkeratin, Seidenfibroin



Dagegen gelang die Isolierung von kristallinem O,O'-Hexamethylen-bis-N-benzoyl-L-tyrosinäthylester (XIV) aus dem Umsatz von BDH mit N-Benzoyl-L-tyrosinäthylester



e) Die *alkoholischen Hydroxyle* in Tetrahydrofurfurylalkohol und Sekundärbutanol reagierten mit der ätherischen BDH-Lösung nicht.

#### 4. Reaktionen von BDH mit Faserproteinen

Nach dem Studium der Reaktionen von BDH mit Aminosäuren hielten wir es für wahrscheinlich, daß es uns unter bestimmten Bedingungen gelingen würde, die Tyrosinphenole in Wolle und Seide, die Cysteinthiole in reduzierter Wolle, sowie die Carboxyle beider Faserproteine mit BDH ebenfalls zur Reaktion zu bringen.

##### a) Wolle

Wolle wurde nach Harris und Mitarbeitern<sup>8)</sup> reduziert, in Alkohol eingelegt und mit einer ätherischen Bisdiazohexanlösung 4 Tage lang umgesetzt. Nach dieser Zeit waren mit Nitroprussidnatrium keine Thiolgruppen mehr nachzuweisen. Im Hydrolysat der umgesetzten Wolle wurden papierchromatographisch O,O'-Hexamethylen-bis-tyrosin und S,S'-Hexamethylen-bis-cystein nachgewiesen (Abb. 5). Der Bisthioäther konnte auch in Substanz isoliert werden. Laut Cystinanalyse hatten 18,8% des Cystins mit BDH reagiert. In einer früheren Arbeit<sup>7)</sup> konnten wir 49,6% des Cystins in Bisthioäther umwandeln. Damals wurde jedoch bei p<sub>H</sub> 8 und in wäßrig-acetonischem Milieu bei 60° gearbeitet, während hier bei Zimmertemperatur, p<sub>H</sub> 5 und unter Ausschluß von Wasser umgesetzt wurde.

Durch Messung der Alkali- und Säurebindung der BDH-Wolle wurde die Zahl der sauren bzw. basischen Gruppen bestimmt. Hierbei werden als Säuren erfaßt die Tyrosinphenole, die nicht dissoziierten Carboxyle und die RNH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Ionen. Basische Gruppen sind im Eiweiß die Carboxylatanionen RCOO<sup>-</sup>.

<sup>8)</sup> W. I. Patterson, W. B. Geiger, L. R. Mizell u. M. Harris, J. Res. nat. Bur. Standards 27 (1941) 89.

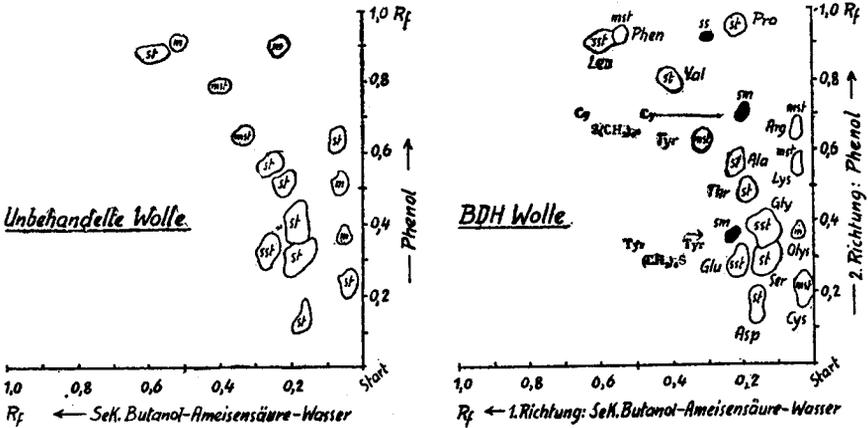


Abb. 4 u. 5. Zweidimensionale Papierchromatogramme von Woll-Hydrolysaten: Schleicher & Schüll 2043 b GI-Papier

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich wird, hat die Alkalibindung um 21,2% gegenüber unbehandelter Wolle abgenommen, es hatte also eine entsprechende Anzahl undissoziierter Carboxyle und Phenolgruppen unter Bisester- bzw. Bisätherbildung reagiert.

Tabelle 2. Alkali- und Säurebindung der Wollpräparate

	Unbehandelte Wolle	Reduzierte und mit Bisdiazohexan behandelte Wolle
N .....	16,75 %	16,25
NH <sub>3</sub> -N .....	1,40 %	1,34
Cystin .....	11,20 %	9,10
Säurebildung mVale/g .....	0,91	0,80
Alkalibindung mVale/g .....	0,99	0,78
Säurelöslichkeit .....	12,0 %	17,4 %
Alkalilöslichkeit .....	12,1 %	10,2 %
Halbe Lebensdauer i. Erdvergrabungsversuch	4,8 Tage	9,6 Tage

Weitere Untersuchungen ergaben eine erhöhte Stabilität der BDH-Wolle gegen Alkalien (Alkalilöslichkeit) und Mikroorganismen (Erdvergrabungsversuch) (vgl. Abb. 6). Dagegen hatte die Säurelöslichkeit, vermutlich wegen einer teilweisen Verseifung der Bisester und Bisäther in der Faser zugenommen.

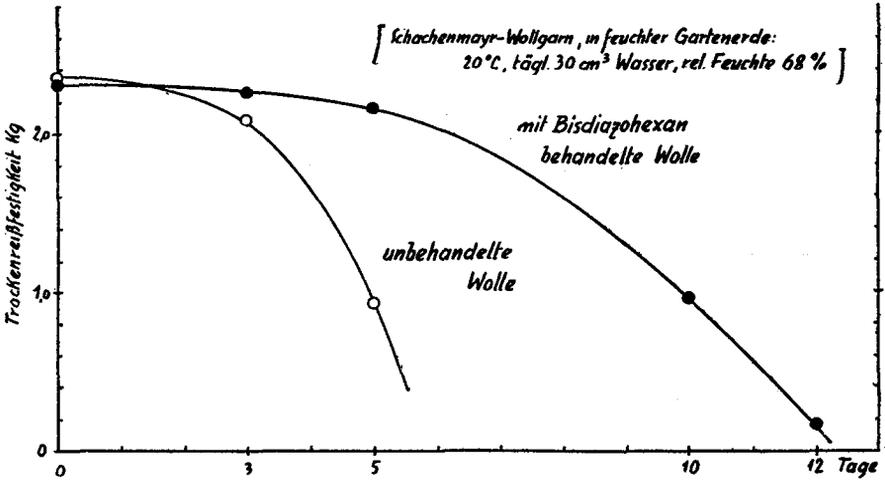


Abb. 6. Abhängigkeit der Reißfestigkeit bei Wollgarnen von der Dauer des Eingrübungsversuches

b) Seidenfibroin

Bei ähnlichen Untersuchungen an *Seidenfibroin* wurde im Hydrolysat der BDH-Seide wiederum O,O'-Hexamethylen-bis-tyrosin nachgewiesen (Abb. 7, 8) und in einer Ausbeute von 21 % d. Th. in Substanz isoliert. Auch hier hatten sich Bisester gebildet, da die Alkalibindung von BDH-Fibroin stärker verringert war, als allein aus der Abnahme der Zahl von Tyrosinphenolen geschlossen werden konnte (vgl. Tabelle 3). Ferner hatte sich auch hier, wie theoretisch nicht anders zu erwarten war, die Säurebindung nur unwesentlich geändert.

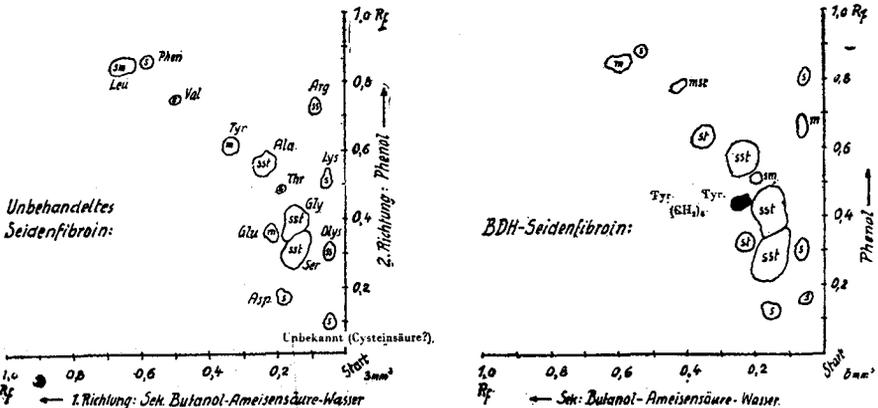


Abb. 7. u. 8. Zweidimensionale Papierchromatogramme von Seidenfibroin-Hydrolysaten: Schleicher & Schüll 2043 b Gl.

Tabelle 3

	Unbehandeltes Fibroin	Mit Bisdiazohexan behandeltes Fibroin
Freies Tyrosin im schwefelsauren Hydrolysat (30 Vol.-% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 110° 24 Std.)	12,5	11,4
Pauly-Reaktion auf freies Tyrosin .....	sehr stark	schwach-mittel
Millon-Reaktion auf freies Tyrosin .....	sehr stark	mittel
Säurebindung in mVale/g .....	0,31	0,27
Alkalibindung in mVale/g .....	0,97	0,36

### 5. Diskussion

Vor einigen Jahren wurden in dieser Zeitschrift unsere ersten Versuche über die Isolierung von Brücken-bis-aminosäuren aus chemisch modifizierter Wolle beschrieben<sup>7)</sup>. Zwar war die Tatsache, daß es gelang, die Sulfhydrylgruppen in reduzierter Wolle selbst mit einer Hexamethylenbrücke zu verbinden, von Interesse für die Vorstellungen über den Einbauort des Cystins in Wolle, aber man war ja letzten Endes von Disulfidbrücken in der Faser ausgegangen, so daß die polymeranaloge Reduktion der Wolle in heterogener Phase, also ohne Auflösung der Faser, notwendigerweise zu einer räumlichen Anhäufung von SH-Gruppen führen mußte.

Die hier beschriebenen Versuche mit Bisdiazohexan an SH-Wolle, die zur Isolierung von S,S'-Hexamethylen-bis-cystein führten, gehen nicht über das in der früheren Mitteilung Berichtete hinaus, es sei denn in der erstaunlich milden Reaktionsweise. Bisdiazohexan reagierte mit den Faserproteinen, obwohl der Zustand der Faser und des Reagens die Reaktion nicht begünstigten. Die Faser war etwa auf den isoelektrischen Punkt (p<sub>H</sub> 4,9)<sup>9)</sup> eingestellt. Als Reaktionsmedium lag ein Alkohol-Äthergemisch vor. Die Temperatur blieb unter 4° C. Daß unter diesen Bedingungen immerhin 40 % der Cysteingruppen mit Bisdiazohexan reagieren, war nicht ohne weiteres vorauszusehen.

Wichtiger für die Kenntnis der Topologie der reaktionsfähigen Gruppen in den Wollproteinen ist der Befund, daß sich aus Bisdiazohexan und reduzierter Wolle auch O,O'-Hexamethylen-bis-tyrosin bildet. Da in Wolle nur rund jeder vierzigste Aminosäurerest Tyrosin ist, bedeutet die beobachtete Brückenreaktion, daß mindestens ein Teil dieser aromatischen Aminosäurereste räumlich so angeordnet sein muß, daß der Abstand zwischen den Phenolgruppen nicht größer als 7,5 Å (= Länge der Hexamethylenbrücke) ist.

<sup>9)</sup> E. Elöd u. E. Silva, Z. physik. Chem. Abt. A 137 (1927) 142.

Auf die derzeitigen Hypothesen über den Bau der Faserproteine Kollagen, Fibroin und Keratin soll hier nicht eingegangen werden, da sich diese in anderen Arbeiten ausführlicher dargestellt finden<sup>10, 11, 12</sup>). Das Ergebnis unserer Überlegungen ist, daß ein Teil des Tyrosins in bestimmten Bereichen der Wollproteine gehäuft eingebaut sein muß, damit die bifunktionelle Reaktion von Bisdiazohexan ohne weiteres verständlich wird.

Nach Abschluß der hier beschriebenen Untersuchungen wurde gemeinsam mit J. Meienhofer<sup>13</sup>) die Reaktion zwischen 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol und unbehandelter Wolle studiert und O,O'-Dinitrophenylen-bis-tyrosin aus dem Hydrolysat isoliert. Auch diese Versuchsergebnisse deuten wir durch die Annahme einer Häufung des Tyrosins<sup>2</sup>).

Die dritte Reaktion von BDH mit Wolle war die Veresterung von Carboxylen. Daß eine solche stattgefunden hat, wurde durch die Titration der freien Carboxyle (Alkalibindung) und Carboxylationen (Säurebindung) vor und nach der Umsetzung nachgewiesen. Da aber die Ester die Proteinhydrolyse nicht überstehen, konnten Bisdiazohexanderivate von Aminosäuren im Hydrolysat nicht nachgewiesen werden. Die Frage, ob BDH bifunktionell oder nur einseitig mit den Carboxylen des Proteins reagiert hatte, muß daher offen bleiben.

Weitere Reaktionen von BDH etwa mit anderen funktionellen Gruppen der Wollproteine sind auf Grund unserer Modellversuche sehr unwahrscheinlich.

Der aus der Abnahme des Gesamt- sowie Amid-Stickstoffgehalts berechnete Anteil an Hexamethylengruppen in BDH-Wolle von 3,4% entspricht überwiegend der Reaktion von BDH mit den Thiolgruppen der reduzierten Wolle und zu einem kleineren Teil der Tyrosin- und Carboxyl-Reaktion, so daß für andere Reaktionen keine Anzeichen vorliegen.

Was die Versuche am Seidenfibroin angeht, so gilt Ähnliches wie für die Reaktion von BDH an reduzierter Wolle. Auch hier war der Befund, daß man zwischen je zwei Tyrosinphenolen eine Brücke einbauen kann, nicht neu, da schon mit A. Würz<sup>14</sup>) und H. Zuber<sup>11</sup>) die bifunktionelle Reaktionsweise von 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol und p,p'-Difluor-m,m'-dinitrodiphenylsulfon mit bis zu 75% der in Fibroin eingebauten Tyrosinphenole gezeigt worden war. Aber die hier beschriebene Brückenreaktion lief unter deutlich mildereren Bedingungen ab. Könnte man ein-

<sup>10</sup>) H. Zahn u. D. Wegerle, Leder 5 (1954) 121.

<sup>11</sup>) H. Zahn u. H. Zuber, Textil-Rdsch. [St. Gallen] 9 (1954) 119.

<sup>12</sup>) H. Zahn, Textil-Praxis 9 (1954) 515, 663.

<sup>13</sup>) H. Zahn u. J. Meienhofer, Unveröffentlichte Versuche.

<sup>14</sup>) H. Zahn, Melliand Textilber. 33 (1952) 1076.

wenden, daß bei unseren Reaktionen mit den aromatischen Fluorverbindungen infolge der Quellung ( $p_H$  8, 60°, wäßriges System) gewisse Bewegungen der Tyrosinphenolgruppen um die  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Gruppe einerseits und der ganzen Peptidkette andererseits die Phenolgruppen in eine für die Brückenreaktion günstige räumliche Lage bringen würden, so sind derartige Ortsveränderungen bei der Bisdiazohexan-Reaktion kaum anzunehmen.

Obwohl nur 21% des Tyrosins der Seide in Form der Brücken-bis-aminosäure aus dem Hydrolysat in Substanz isoliert wurden, kann der tatsächliche Umsatz wesentlich größer angenommen werden, da die Alkalibindung von BDH-Fibroin beinahe auf den Wert zurückging, der den RNH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Gruppen entspricht, so daß also die meisten anderen sauren Gruppen (Tyrosinphenole und freie Carboxyle) reagiert haben müssen. Die kolorimetrische Tyrosinanalyse im schwefelsauren Hydrolysat von BDH-Fibroin lieferte einen Umsatz von etwa 10% des eingebauten Tyrosins. Dies deutet darauf hin, daß die Phenoläthergruppen den Bedingungen der salz- und schwefelsauren Hydrolysen (30 Vol. % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 110°, 24 Std. für Tyrosinanalyse) nicht standzuhalten scheinen. Ein entsprechender Hydrolyseversuch mit 0,0'-Hexamethylen-bis-[N-benzoyl-L-tyrosinäthylester] als Modells substanz ergab analytisch allerdings nur eine Spaltung von weniger als 1%. Aus anderen Beobachtungen ist jedoch bekannt, daß sich das in entsprechend behandelten Proteinen eingebaute Tyrosin bezüglich Ätherspaltung ganz anders verhalten kann, als die gleicherweise verätherten, N-acylierten Tyrosine im Modellversuch.

Wenn wir schließlich auf die Arbeit von W. Kirst zurückkommen, der Bisdiazohexan erstmalig darstellte und auf Faserproteine einwirken ließ, so bestätigt unsere Untersuchung seine Annahmen, daß in reduzierter Wolle die SH-Gruppen vernetzt werden und daß eine Bisesterbildung möglich ist, dagegen scheinen nicht alle funktionellen Proteingruppen seiner Liste möglicher Ansatzpunkte für BDH mit diesem zu reagieren. Die Erkenntnis von W. Kirst, daß sich BDH für die Erforschung konstitutionschemischer Fragen bei Proteinen eignet, glauben wir hier bestätigt zu haben. BDH ist das mildeste Vernetzungsmittel für Gruppen mit aciden Wasserstoffatomen wie Carboxylen, Thiolen und Phenolen. BDH eignet sich quasi als chemischer Meßzirkel zum Nachweis derartiger Gruppen in Proteinen, die 7,5 Å und weniger voneinander entfernt liegen und sollte in Ergänzung zu den erwähnten Fluorverbindungen verwendet werden, die zwar auch mit Thio- und Phenolgruppen, nicht aber mit Carboxylen reagieren, sich dafür aber mit primären und sekundären Aminogruppen umsetzen.

### Beschreibung der Versuche

#### 1. Bisdiazohexan

a) *Hexamethylendiharnstoff*: Die Lösung von 58 g Hexamethyldiamin in 200 ml Wasser wurde mit ca. 100 ml konzentrierter HCl angesäuert, mit NaOH auf  $p_H$  9 eingestellt und mit einer Lösung von 81 g Kaliumcyanat in 150 ml Wasser versetzt. Man erwärmte und erhielt 98 g Rohprodukt, das nach dem Umkristallisieren aus Wasser 87,5 g weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 201° lieferte.

b) *Dinitrosohexamethylendiharnstoff*: Die Suspension von 80 g Diharnstoff in 450 ml Wasser wurde mit 54,6 ml konz.  $H_2SO_4$  (D 1,8) versetzt. Bei einer Temperatur von 0° ließ man langsam in 3 Stunden eine Lösung von 80 g  $NaNO_2$  in 180 ml Wasser zutropfen und saugte nach weiteren 3 Stunden den Niederschlag ab, der mit Eiswasser gut ausgewaschen, getrocknet und aus Methanol umkristallisiert wurde. Ausbeute 44,7 g (45% d. Th.). Gelbe Kristalle vom Schmelzpunkt 150°.

c) *Bisdiazohexan* (BDH): 20 ml 40%ige Kalilauge wurden mit 80 ml Äther überschichtet und 10 g Dinitrosohexamethylendiharnstoff bei Temperaturen unter 0° langsam eingetragen. Ausbeute an BDH 21–40%. Zur Gehaltsbestimmung ließ man jeweils 2 ml der ätherischen BDH-Lösung mit einer ätherischen Benzoesäurelösung zum Ester reagieren und titrierte die überschüssige Benzoesäure mit  $n/10$  NaOH zurück.

#### 2. Bis-[N-acetylglycyl]-hexandiol-1,6 (II)

Die Lösung von 2,7 g Acetylglycin in 50 ml Dimethylformamid wurde langsam mit der Lösung von 1,54 g BDH in 50 ml Äther bei 0–5° versetzt. Nach beendeter Reaktion (Ende der  $N_2$ -Entwicklung und Verblässen der Farbe) wurde i. V. abdestilliert und der sirupöse Rückstand mit Äther aufgenommen. Nach dem Abdestillieren des Äthers verblieb eine Flüssigkeit, die nicht zum Kristallisieren gebracht werden konnte. Der Sirup bestand zu 87% aus dem Bisester, wie durch Bestimmung des Esteräquivalentes sowie der Verseifungszahl ermittelt wurde.

#### 3. Bis-[N-benzoylglycyl]-hexandiol-1,6 (III)

Die Lösung von 3,2 g Benzoylglycin in 20 ml Dimethylformamid wurde langsam bei 0–5° mit der Lösung von 2,03 g BDH in 60 ml Äther vereinigt. Nach der Vakuumdestillation der Lösungsmittel wurde ein sirupöser Rückstand (4,9 g) erhalten. Säure- und Esterzahl ergaben einen Gehalt von 8,3% Benzoylglycin und 70% Bisester im Sirup.

#### 4. Bis-[N-acetyl- $\epsilon$ -aminocaproyl]-hexandiol-1,6 (IV)

Aus dem Ansatz von 2 g N-Acetyl- $\epsilon$ -aminocapronsäure (Schmp. 102°) in 20 ml Dimethylformamid und 0,8 g BDH in Äther wurde eine schmierige Masse isoliert, die laut Esteräquivalentsbestimmung zu 80% aus dem Bisester bestand.

#### 5. Bis-[N-benzoyl- $\epsilon$ -aminocaproyl]-hexandiol-1,6 (V)

Der Ansatz von 8 g N-Benzoyl- $\epsilon$ -aminocapronsäure (Schmp. 79°) in 30 ml Dimethylformamid und 2,18 g BDH in 60 ml Äther lieferte Kristalle, die aus abs. Alkohol und Äther umkristallisiert einen Schmp. von 151–153° zeigten.

Ausbeute 2,15 g (24% d. Th.).

$C_{32}H_{44}O_6N_2$  (552,37) Ber. C 69,52 H 8,03 Gef. C 69,73 H 7,72

#### 6. S, S'-Hexamethylen-bisthiophenol (VI)

Der Ansatz von 1,82 g Thiophenol in Äther und 1,08 g BDH in 40 ml Äther ergab farblose Blättchen in einer Ausbeute von 850 mg (50,3% d. Th.), die nach dem Umkristallisieren aus absol. Alkohol bei 83° schmolzen.

$C_{18}H_{22}S_2$  (302,47) Ber. C 71,46 H 7,33 Gef. C 71,13 H 7,12

7. Hexamethylen-bis-phenylsulfon (VII)

80 mg Bisthioäther wurden in Eisessig mit  $H_2O_2$  auf dem kochenden Wasserbad 2 Stdn. behandelt und aus der abgekühlten Lösung mit Äther 66 mg Rohprodukt ausgefällt. Glänzende Nadeln aus absol. Alkohol. Schmp. 113–114°.

$C_{18}H_{22}O_4S_2$  (366,48) Ber. C 58,98 H 6,05 Gef. C 58,24 H 6,28

8. S,S'-Hexamethylen-bis-benzylmercaptan (VIII)

Der Ansatz von 1,06 g Benzylmercaptan in Äther und 0,48 g BDH in 28 ml Äther wurde nach erfolgter Reaktion durch Vakuum- und Hochvakuumdestillation aufgearbeitet. Aus den bei 1,5 mm Hg zwischen 210–240° C übergehenden Fraktionen wurden Nadeln erhalten, die aus Alkohol umkristallisiert bei 52° schmolzen.

$C_{26}H_{38}S_2$  (330,55) Ber. C 72,66 H 7,93 Gef. C 72,87 H 8,03

9. Hexamethylen-bis-benzylsulfon (IX)

Aus dem Bisthioäther durch Oxydation mit  $H_2O_2$  in Eisessig. Schmp. 166°.

$C_{26}H_{38}O_4S_2$  (394,53) Ber. C 60,88 H 6,64 Gef. C 61,39 H 6,69

10. S,S'-Hexamethylen-bis-L-cysteinäthylester (X) und  
S,S'-Hexamethylen-bis-L-cystein (XI)

Aus freiem L-Cysteinäthylester in Chloroform und BDH in Äther wurde in Lösung ein Gemisch von wenig Cystin und Cystindiäthylester, etwas mehr Hexamethylen-bis-cystein und viel S,S'-Hexamethylen-bis-cysteinäthylester und 3 unbekanntem ninhydrinpositiven Verbindungen erhalten, wie die laufende papyrographische Kontrolle des Ansatzes ergab (vgl. Tab. 4).

Tabelle 4. Reaktion von Cysteinäthylester mit Bisdiazohexan

$R_f$ -Werte (SBA) und Fleckenintensität aus eindimensionalen Papierchromatogrammen; Schleicher u. Schüll, 2043 bGI.

	Reaktion nach 48 Stdn.	Nach der Hydrolyse	
		Filtrat	Festes Produkt
Cystin .....	s-m 0,04	—	m-st 0,06
Cystindiäthylester .....	s-m 0,11	—	—
Fleck 1 S,S'-Hexamethylenbiscystein ..	m-st 0,17	s 0,24	st 0,27
Fleck 2 S,S'-Hexamethylenbiscystein- äthylester .....	sst 0,40	ss 0,38	s 0,38
Fleck 3 Ausgangssubstanz, Cystein- äthylester .....	— *)	—	—
Fleck 4 .....	m-st 0,70	s 0,56	—
Fleck 5 .....	sst 0,87	—	—
Fleck 6 .....	st 0,99	st 0,98	—

Die Lösung wurde i. V. eingengt, mit absol. Alkohol aufgenommen, mit Äther versetzt und etwas  $NH_4Cl$  abfiltriert. Nach der Entfernung der Lösungsmittel i. V. wurde der Rückstand mit 50 ml 6 n HCl auf dem Wasserbad 6 Stdn. verseift. Danach entfernte man

\*) Nach 8 Stunden Reaktionszeit noch vorhanden ( $R_f$ : 0,54–0,68)

die Säure, nahm den Rückstand mit wenig absol. Alkohol auf und fällte mit Pyridin einen Niederschlag, der aus Cystin und dem freien Bisthioäther bestand. Man kochte mit Wasser aus, filtrierte, digerierte mit ammoniakal. KCN-Lösung und fällte schließlich den Bisthioäther mit 2 n Essigsäure aus.

Ausbeute an Reinprodukt 147 mg, Schmp. 270–290° unter Zers.  $R_f$ : 0,17 in SBA. Mischpapyrogramm mit dem synthetisierten Bisthioäther: nur 1 Fleck.

#### 11. Umsetzungen mit L-Tyrosinäthylester

Aus dem Ansatz von 3 g L-Tyrosinäthylester in Dimethylformamid und 40 ml ätherischer BDH-Lösung (0,73 g BDH) wurde als Destillationsrückstand eine rotbraune Flüssigkeit erhalten, die laut papyrographischem Befund (vgl. Abb. 3) sehr wenig Tyrosin, viel Tyrosinäthylester und den erwarteten Bisätherdiester enthält. Nach dem Verseifen des Ansatzes fand man papyrographisch freies Tyrosin und freies O,O'-Hexamethylen-bis-tyrosin.

#### 12. O,O'-Hexamethylen-bis-[N-benzoyl-L-tyrosinäthylester] (XV)

Aus 6 g N-Benzoyl-L-tyrosinäthylester<sup>15</sup>) in Chloroform und 2,4 g BDH in Äther wurden 410 mg (5,6% d. Th.) weiße Kristalle isoliert. Schmp. 144–146°.

$C_{42}H_{48}O_8N_2$  (708,8) Ber. C 71,16 H 6,82 Gef. C 71,12 H 7,03

#### 13. BDH-Wolle

a) *Wolle*: Sportgarn der Firma Schachenmayr, Mann u. Cie., Salach (Württ.) der Spinn-Nr. 11 1/2/4 wurde mit Aceton im Soxhlet extrahiert und mit dest. Wasser gründlich gewaschen. Cystingehalt 11,2%, N 16,75%,  $NH_3$ -N 1,40%.

b) Reduzierte Wolle wurde bei der Behandlung von 48,7 g Wollgarn mit 27,2 g Thioglykolsäure, 680 ml Wasser und 11,0 g  $Ca(OH)_2$  erhalten<sup>7</sup>).

c) *BDH-Wolle*: Die reduzierte Wolle wurde in 1000 ml absol. Äthanol und 1 ml Essigsäure gequollen und 3 Tage mit ätherischer BDH-Lösung bei 0–4° behandelt. Die BDH-Wolle wurde mit Eiswasser gewaschen, mit Alkohol soxhletiert und an der Luft getrocknet.

Cystingehalt 9,10%, N 16,25%,  $NH_3$ -N 1,34%

#### 14. S,S'-Hexamethylen-bis-cystein aus dem Hydrolysat von BDH-Wolle

Aus dem Hydrolysat von 31,05 g BDH-Wolle wurden 840 mg (= 14% d. Th.) Bisthioäther isoliert<sup>7</sup>).

$R_f$  in SBA = 0,19–0,25 in Phenol 0,69–0,74, Schmp. 270–310° Zers.

#### 15. Alkalibindung von Wolle

1000 mg bei 105° getrocknete Wolle wurde mit 30 ml n/10 NaOH bei 6° 4 Stdn. belassen und dreimal 3 ml mit n/100 HCl gegen Methylorange titriert.

#### 16. Säurebindung von Wolle

200 mg getrocknete Wolle wurden mit 10 ml n/10 HCl 4 Tage bei 20° stehen gelassen und dreimal 1 ml mit n/100 NaOH gegen Methylrot titriert.

#### 17. Erdvergrabungstest und Reißfestigkeiten von BDH-Wolle

wurden nach H. Zahn und H. Wilhelm<sup>16</sup>) durchgeführt.

<sup>15</sup>) M. Rohrlisch, Dissertation, Berlin 1933, S. 16.

<sup>16</sup>) H. Zahn u. H. Wilhelm, *Melliand Textilber.* 34 (1953) 609.

**18. Alkali- und Säurelöslichkeit von Wolle**

wurden mit  $n/10$  NaOH bzw.  $4,5\ n$  HCl bei  $65^\circ$  ermittelt<sup>17)</sup>.

**19. Fibroin**

wurde aus gelber Rohseide durch Entbasten mit einer  $1,7\%$ igen Venezianer-Seifenlösung in 2 Behandlungen bei  $90^\circ$  und einer weiteren 20 Minuten langen Behandlung mit einer  $0,8\%$ igen Medizinalseifenlösung (Merck) bei  $85-90^\circ$ , gründlichem Auswaschen und Alkohol- sowie Ätherextraktion gewonnen.

**20. BDH-Fibroin**

42,05 g Fibroin in 1500 ml  $96\%$ igem Äthanol wurden mit 2,6 g BDH in Äther 20 Stunden bei  $0^\circ$  und mit weiteren 1,2 g BDH nochmals 24 Stunden behandelt, mit Äthanol sowie Äther Soxhletiert und an der Luft getrocknet.

**21. Hexamethylen-bis-tyrosin aus BDH-Fibroin**

Aus dem salzsauren Hydrolysat von 21 g BDH-Fibroin wurden mit der Pyridin-Methode (vgl. 7.) 0,684 g ( $21\%$  d. Th.) Bisäther isoliert.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, und dem Chemiefonds, Düsseldorf, für die Förderung der vorliegenden Arbeit, sowie Herrn Dr. E. R. Fritze für die Ausführung der Tyrosinanalysen.

---

<sup>17)</sup> H. Zahn u. A. Würz, Textil-Praxis 8 (1953) 971.