

Verbindungen von Aminosäuren und Ammoniak.

IX. Mitteilung.

Von

Peter Bergell.

(Der Redaktion zugegangen am 31. Januar 1917.)

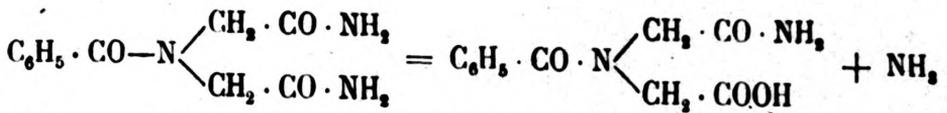
In der letzten Mitteilung¹⁾ war eine neue Synthese des Iminodiacetamids aus Glycinamid und Chloracetamid beschrieben, dessen Benzoylderivat leicht darstellbar ist. Diese Verbindung zeigte eine gewisse Ähnlichkeit mit dem früher beschriebenen Bezoyldiglylamid.

Nachfolgend wird nun zunächst eine weitere Verbesserung der Synthese des Iminodiacetamidchlorhydrates beschrieben. Ferner wird gezeigt, wie das Iminodiacetamid durch Alkalien in zwei Moleküle Ammoniak und ein Molekül Iminodiessigsäure gespalten wird, die als β -Naphthalinsulfoverbindung identifiziert wurde.

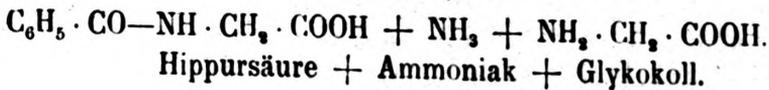
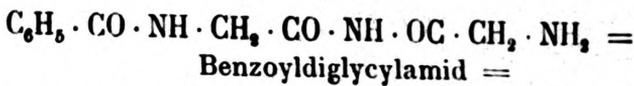
Die Benzoylverbindung spaltet beim Kochen mit verdünnter Natronlauge mehr als zwei Moleküle Ammoniak ab. Beim vorsichtigen Behandeln mit ein bis zwei Molekülen NaOH in der Kälte ließ sich ein Teil der Verbindung als das Halbamid der Benzoylnitrilodiessigsäure isolieren, da die Hydrolyse unter diesen Bedingungen nur eine partielle ist. Die Benzoylnitrilodiessigsäure scheint nicht sehr resistent zu sein, so daß sie bei dem brutaleren Angriff des Alkalis in der Wärme teilweise zersetzt wird.

Die Ergebnisse der Spaltung sind also völlig andere wie beim Bezoyldiglylamid und bestätigen die angegebenen Formeln.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 97, S. 293 (1916).



Benzoylnitrilodiacetamid¹⁾ = Benzoylnitrilodiessigsäurehalbamid
+ Ammoniak.



Dagegen gibt freies Iminodiacetamid $\text{NH} \begin{cases} \text{CH}_2 \cdot \text{CONH}_2 \\ \text{CH}_2 \text{CO} \cdot \text{NH}_2 \end{cases}$

genau ebenso wie Diglycylamid



zwei Moleküle Ammoniak und Iminodiessigsäure bei der Alkalisplaltung.

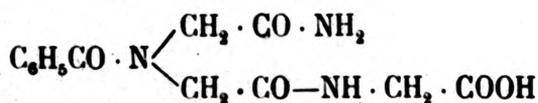
Ob dem Diamid der Iminodiessigsäure und ihren weiteren Verbindungen ein physiologisches Interesse zukommt, war zunächst zweifelhaft. Es zeigte sich jedoch, daß das Iminodiacetamid anscheinend sehr leicht dem Angriff der proteolytischen Fermente der Leber unterliegt. Dieser Abbau geht insofern in charakteristischer Weise vor sich, als er bei dem Halbamid stehen bleibt, so daß die Fermenthydrolyse hier eine partielle Hydrolyse ist. Da das Iminodiacetamid resp. sein Carbonat gegen Ammoniak und Natriumbicarbonat ziemlich beständig ist, lassen sich diese Erscheinungen durch die Reaktion mit Benzoylchlorid oder Naphthalinsulfochlorid verfolgen. Läßt man Leberferment auf Iminodiacetamidcarbonat in Gegenwart von 0,2% Soda bei 37–40° einwirken, so ergibt nach 3 Stunden die Lösung beim Behandeln mit Benzoylchlorid und Natriumbicarbonat kein schwerlösliches Benzoylderivat mehr, während die Kontrolle dies prompt ergibt. Wird ferner eine fermentierte Lösung bei vorsichtiger Vermeidung eines Alkaliüberschusses der Naphthalinsulfureaktion unterworfen, so erhält man das entsprechende Derivat des Halbamids der Imino-

¹⁾ Die Verbindung wurde zunächst (Bd. 97, S. 305 f.) fälschlich als Benzoyliminodiacetamid bezeichnet. Dasselbe gilt auch für einige analoge Derivate, z. B. das Bromcapronynitrilodiacetamid.

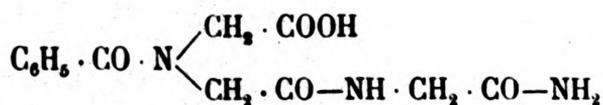
diessigsäure. Die Kontrolle ergibt nur Spuren dieser Verbindung, da das Biamid der Iminodiessigsäure nur sehr träge mit dem Chlorid reagiert und auch bei der Reindarstellung geringe Ausbeute ergab. Da die Unterschiede bei diesen Reaktionen höchst eklatant sind, ist die Annahme einer Fermentspaltung berechtigt. Als absolut bewiesen will ich sie noch nicht hinstellen, da das Iminodiacetamid durch freies Alkali leicht zum Halbamid verseift wird und daher bei der Durchführung der β -Naphthalinsulfochloridreaktion leicht Versuchsfehler entstehen können. Die fermentative Verseifung derartiger Biamide zu Monoamiden wäre jedenfalls nicht ohne physiologisches Interesse. Ob allerdings Verbindungen der Iminodiessigsäurereihe im Organismus vorkommen, ist hiermit noch nicht bewiesen.

Da bei diesen Untersuchungen verschiedentlich auch auf die Frage der Sarkosinbildung Rücksicht genommen wurde, ist zur Erleichterung der Identifizierung auch vom Sarkosin die schön krystallisierende Naphthalinsulfoverbindung hergestellt worden. Sie ähnelt in mancher Beziehung dem analogen Iminodiessigsäurederivat.

Im weiteren Ausbau der Reaktion zwischen Monoamino-säureamid und Halogenfettsäureamid wurde Glycinamid und Chloracetyl-glycinamid miteinander zur Umsetzung gebracht. Daß auch hierbei ein Abkömmling der Iminodiessigsäure entstanden war, zeigte die Gewinnung einer krystallisierten Benzoylverbindung. Sie war anzusprechen als das Derivat einer Iminodiessigsäure, deren eines Carboxyl noch peptidartig mit einem Glykokoll verbunden ist. Da auf die Verseifung der Amidbindung nicht besondere Rücksicht genommen wurde, war es nicht unerwartet, daß auch hier statt des ursprünglich entstandenen Biamids ein Monoamid erzielt wurde. In Frage kommen folgende beiden Formeln



oder



von welchen die erstere die wahrscheinlichere ist, da sowohl Chloracetyl-glycinamid wie Glycyl-glycinamid äußerst leicht verseifbar sind. Hieraus ergibt sich, daß ein Aufbau von Imino-diessigsäureverbindungen möglich ist, bei denen eine peptidartige Verknüpfung einer Aminosäure mit dem einen Essigsäurecarboxyl durchgeführt ist. Da wir gesehen haben, daß sich ein Halogenfettsäurerest an das tertiäre Stickstoffatom heften läßt, so erscheint der Aufbau komplizierterer Verbindungen nicht unmöglich. Es entsteht alsdann die Frage, ob derartige Stoffe ebenso wie das Iminodiacetamid und manche Aminosäureamide für die Körperfermente ein adäquates Substrat darstellen.

Aus äußeren Gründen mußte die vorliegende Arbeit mit diesen vorläufigen Ergebnissen abgeschlossen werden.

Experimenteller Teil.

Darstellung des salzsauren Iminodiacetamids.

Durch folgende Versuche wurde eine Hebung der Ausbeute angestrebt:

1. 8,2 g salzsaures Glycinamid wurde mit 1 Molekül NaHCO_3 und 1 Molekül Chloracetamid vermischt und in 30 ccm Alkohol und 20 ccm Wasser eingetragen, wobei die Kohlensäureentwicklung vor sich geht. Man läßt 14 Stunden stehen, wobei ein Teil ungelöst und die Reaktion alkalisch bleibt. Darauf wird $1\frac{1}{2}$ Stunde auf dem Wasserbad im Kolben unter Rückfluß erwärmt, wobei alles gelöst und die Reaktion schwach sauer wird. Beim Erkalten bleibt die Lösung klar. Nach einem Tage sind einige große Krystalle ausgeschieden; es werden noch 20 ccm Alkohol zugefügt, worauf sich nach weiteren 24 Stunden 1,5 g Krystalle abschieden. Diese schmolzen zunächst bei $218\text{--}220^\circ$. Sie wurden in 4 ccm Wasser gelöst, 1 ccm 25%ige Salzsäure zugefügt und mit 20 ccm Alkohol gefällt. Die erhaltenen 1,1 g Krystalle zeigten nun den Schmelzpunkt von 236° .

Das Filtrat von der ersten Krystallisation von 1,5 g wurde mit 10 ccm Alkohol und 5 ccm 25%ige Salzsäure ver-

die bei 156—160° schmilzt. Sie wird nochmals mit 10 ccm Wasser und 10 ccm n-NaOH aufgenommen und in der Porzellanschale auf dem Wasserbade zum Sirup verdampft, darauf in Wasser gelöst, mit 10 ccm n-H₂SO₄ versetzt und eingedampft. Der Rückstand wurde in ca. 10 ccm heißem Alkohol gelöst, mit Tierkohle behandelt und das Filtrat (zusammen mit einer gleichen Verarbeitung, bei der die Normalnatronlauge zuerst zwei Tage in der Kälte gewirkt hatte, bei der aber noch keine Behandlung mit Natronlauge in der Wärme stattgefunden hatte) eingedampft. Der rötlich gefärbte Sirup krystallisiert in 4 Tagen zu einer harten strahligen Krystallmasse, die mit gehärtetem Filtrierpapier scharf abgepreßt wird. Die harten Krystallkrusten bleiben noch etwas rötlich. Im Kapillarröhrchen erhitzt sintern sie ab 100° und sind bei 125° völlig geschmolzen. Die Analysenwerte weichen jedoch noch wesentlich von den für Benzoylnitrilodiessigsäure verlangten Werten ab.

Bestimmung des abspaltbaren Ammoniaks:

0,1728 g Benzoylnitrilodiacetamid werden in verdünnter Natronlauge gelöst und das beim Kochen ausgetriebene Ammoniak bestimmt. Zur Neutralisation des Destillates wurden 16,5 ccm ¹/₁₀-n-NaOH verbraucht, die 0,02805 g NH₃ entsprechen. Es werden also etwas mehr als 2 Moleküle NH₃ abgespaltet. Jedenfalls findet auch eine partielle Zersetzung der tertiären Verbindung statt, was den geringen Überschuß über 2 Moleküle NH₃ erklärt.

Spaltung des Iminodiacetamids durch Natronlauge.

2 g salzsaures Iminodiacetamid werden mit überschüssiger Natronlauge ¹/₂ Stunde lang gekocht und darauf der Naphthalinsulfochloridreaktion unterworfen. Es wird eine Verbindung erhalten, die völlig der früher von Bergell und Feigl¹⁾ beschriebenen gleicht. Der Schmelzpunkt wurde bei 223—224° (unkorr.) gefunden. Sie ist krystallwasserfrei und wurde zur Analyse bei 100° getrocknet.

¹⁾ Peter Bergell und Johannes Feigl, Diese Zeitschrift, Bd. 55, S. 173 (1908).

0,1586 g gaben 6,3 ccm N (20°; 761 mm)

0,2060 g > 0,1475 g BaSO₄

0,1647 g > 0,3065 g CO₂ und 0,0614 H₂O

Ber.: C = 51,98% H = 4,05% N = 4,34% S = 9,92%

Gef.: C = 50,75% H = 4,14% N = 4,57% S = 9,81%

C₁₄H₁₃O₆NS. Mol. 323,2.

Einwirkung von Fermenten auf Iminodiacetamid.

1. 3,3 g salzsaures Iminodiacetamid werden mit 1,7 g Natr. bicarb. verrieben und mit 30 ccm Wasser versetzt. Es entweicht Kohlensäure. Eine Probe von 5 ccm wird als Kontrolle abgetrennt. Die Hauptmenge wird mit zwei frischen Mäuselebern verrieben, zwei Tropfen Chloroform hinzugefügt und nebst der Kontrolle 4 Stunden auf 40° erwärmt. Die Hauptmenge wird darauf mit Tierkohle geschüttelt, filtriert und das Filtrat ebenso wie die Kontrollprobe mit Benzoylchlorid und Natr. bicarb. behandelt. Die letztere ergibt sofort Benzoylaminodiacetamid, während die erstere völlig klar bleibt.

2. Läßt man auf die wässrige Lösung von freiem Iminodiacetamid Naphthalinsulfochlorid in gewohnter Weise einwirken, so entsteht eine kleine Menge einer schwerlöslichen Verbindung, die wahrscheinlich das Derivat der freien Base darstellt. Außerdem erhält man eine geringe Menge von Naphthalinsulfonitrilodiacetmonoamid. Läßt man das Chlorid in Gegenwart von freier Natronlauge einwirken, so entsteht die letztere Verbindung in größerer Ausbeute.

Bei Fermentversuchen nach 1., bei denen jedoch in schwach ammoniakalischer Reaktion gearbeitet wurde, ergab die fermentierte Lösung stets größere Mengen des Naphthalinsulfoderivates des Halbamids der Iminodiessigsäure. Die Kontrollen ergaben nur Spuren dieser Verbindung.

Ein Präparat, das aus einer fermentierten Lösung erhalten war, zeigte folgende Eigenschaften:

Unter dem Mikroskop erscheinen die sich aus heißem Alkohol abscheidenden harten Krystalle als Blätter, die sich in charakteristischer Weise zu Büscheln anordnen. Sie sind in heißem Wasser und in heißem Alkohol recht schwer löslich,

wesentlich leichter in verdünntem Alkohol und lassen sich z. B. aus 30—40%igem Alkohol gut umkrystallisieren. In Äther, Aceton, Tetrachlorkohlenstoff und Benzol sind sie nicht löslich, in Chloroform schwer löslich.

Sie sind krystallwasserfrei und schmelzen im Kapillarröhrchen erhitzt bei 202—204° (unkorr.) unter Zersetzung.

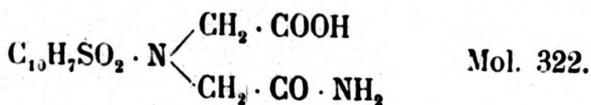
Zur Analyse wurde im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0,1666 g Substanz gaben 0,3162 g CO₂ und 0,0642 g H₂O

0,1317 g „ „ 0,0840 g BaSO₄

0,1334 g „ „ 10,3 ccm N (17°; 755 mm)

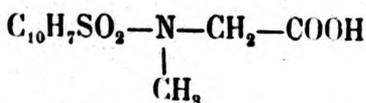
0,1290 g „ „ 10,1 ccm N (18°; 759 mm).



Ber.: C = 52,17% H = 4,34% N = 8,70% S = 9,9%

Gef.: C = 51,76% H = 4,28% N = 8,88% S = 8,9%.

β-Naphthalinsulfo-sarkosin.¹⁾



1,0 g Sarkosin wird in 20 ccm Wasser und 12 ccm n-NaOH gelöst und mit 3 g β-Naphthalinsulfochlorid in Äther auf der Maschine geschüttelt und nach je 2 Stunden noch 2 × 12 ccm n-NaOH zugefügt. Darauf wird die wässrige etwas gelb gefärbte Lösung abgetrennt und mit HCl angesäuert. Es fällt ein weißes Öl, das sofort beim Reiben fest wird. Nach 24 Stunden wird abgesogen und der Niederschlag in 20 ccm heißem Alkohol gelöst und mit Tierkohle behandelt. Das Filtrat läßt beim Erkalten ca. 1 mm lange Nadeln fallen. Nach 24 Stunden werden 1,95 g Krystalle abgesaugt. Im Kapillarröhrchen erhitzt schmelzen sie bei 169—171° (unkorr.). Das alkoholische Filtrat wird in Wasser gegossen, wobei die Flüssigkeit zunächst klar bleibt. Beim Reiben trübt sie sich und es

¹⁾ Vgl. die analoge, mit Toluolsulfochlorid von E. Fischer und Max Bergmann hergestellte Verbindung. Liebigs Annalen, Bd. 398, S. 96—124 (1913).

scheidet ein langsam sich vermehrender Niederschlag ab, der aus mikroskopischen kurzen, spitzen, aber völlig geraden und harten Nadelchen besteht, die sich sternförmig anordnen. Diese Fraktion schmilzt bei 167—170°, ihre Menge beträgt 0,6 g. Die neue Verbindung ist in kaltem Wasser sehr schwer löslich, aus heißem Wasser umkrystallisierbar. In 96%igem Alkohol ist sie recht schwer löslich, in Äther unlöslich, dagegen leicht löslich in Aceton, von Chloroform wird sie sehr schwer aufgenommen, in Tetrachlorkohlenstoff und Benzol ist sie unlöslich. Zur Analyse wurde im Vakuum bei 100° über P_2O_5 getrocknet.

0,1953 g Substanz gaben nach Carius 0,1613 g $BaSO_4$

0,1668 g " " 7,5 ccm N (21°; 757 mm)

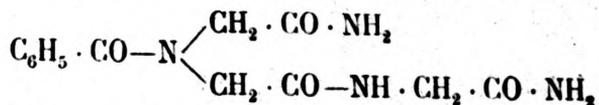
0,1644 g " " 0,3367 g CO_2 und 0,0713 g H_2O .

$C_{13}H_{19}O_4NS$. Mol. 279.

Ber.: C = 55,91% H = 4,66% N = 5,02% S = 11,47%

Gef.: C = 55,85% H = 4,82% N = 5,14% S = 10,71%

Benzoylnitriloacetamidacetylglycin.



3,2 g salzsaures Glycinamid werden mit 2,2 g $NaHCO_3$ fein gepulvert und gemischt und mit 50 ccm 96%igem Alkohol übergossen und unter Schütteln 15 ccm Wasser zugefügt, wobei Umsetzung erfolgt. Hierauf werden 4,4 g Chloracetylglycinamid eingetragen, die sich lösen, wobei ein geringer Niederschlag zurückbleibt. Nach 24 Stunden wird filtriert und das Filtrat zum Sirup verdampft. Da es nicht gelang, hieraus eine krystallisierte organische Substanz zu isolieren, wurde in 30 ccm Wasser gelöst und in gleicher Weise, wie bei der Gewinnung des Benzoylnitrilodiacetamids beschrieben, benzoyliert. Der erhaltene Niederschlag wird aus 20 ccm verdünnten Alkohols umkrystallisiert. Bei längerem Stehen scheiden sich schöne Prismen ab, während der erste Niederschlag aus feinen Nadelchen bestand.

Erhalten wurde 1,2 g anscheinend reine Substanz. Im Kapillarröhrchen erhitzt schmolz sie bei 186—188° zu einem klaren Öl, das sich bereits bei 191° zu zersetzen begann.

Die Substanz enthielt Krystallwasser, das beim Trocknen über Phosphorperoxyd nicht entweicht.

0,1523 g Substanz gaben 0,2828 g CO_2 und 0,0700 g H_2O

0,1027 g ' ' ' 11,1 ccm N (21°; 757 mm)

$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{O}_5\text{N}_3 + \text{H}_2\text{O}$. Mol. 311.

Gef.: C = 50,60% H = 5,11% N = 12,47%

Ber.: C = 50,16% H = 5,46% N = 13,50%

Es wurde bei 100° im Vakuum das Krystallwasser ausgetrieben, alsdann ergaben 0,1403 g Substanz 16,2 ccm (18°; 761 mm) = 13,39%. Eine Krystallwasserbestimmung wurde nicht vorgenommen.

Wenn auch die Analyse nicht völlig befriedigt, so scheint doch die Synthese den angenommenen Verlauf gefunden zu haben, wobei eine partielle Desamidierung durch Verseifung eingetreten ist.
