im Perjodat-Kollagen zu 0,00164-m., folglich enthält Perjodat-Kollagen noch 0,26% Oxylysin.

b) *Tyrosin*: Seine Bestimmung erfolgte nach FRITZE und ZAHN¹⁸. Während normales Kollagen 0,71% Tyrosin aufwies, enthielt Perjodat-Kollagen noch 0,03%, also praktisch kein Tyrosin.

III. Die Perjodat-Oxydation von Wolle: 500 mg Wolle, 2,5 g NaJO₄ und 100 mg NaHCO₃ wurden in 200 cm³ Wasser aufgeschlämmt und unter CO₂-Durchleiten und gutem Rühren auf 80° C erwärmt. Nach 2–3 Stdn. war die Wolle fast restlos in Lösung gegangen. Die Beseitigung des Oxydationsmittels, Entsalzung und Gefriertrocknung erfolgte ähnlich wie beim

Kollagen⁵. 50% der aufgelösten Wolle gingen beim Dialysieren verloren, was durch Stickstoffbestimmung festgestellt wurde. Das nicht dialysable gefriergetrocknete Produkt war gelblich gefärbt.

100 mg Perjodat-Wolle wurden, wie oben bei Perjodat-Kollagen beschrieben, hydrolysiert und zur Chromatographie vorbereitet. Aus Methionin war Methioninsulfon mit dem *R_f*-Wert 0,55 in Phenol/Wasser und 0,1 in sek. Butanol/Ameisensäure/Wasser 75/15/10 entstanden. Die chromatographisch beobachtete Abnahme von Tyrosin und Cystin wurde wie oben bestimmt^{18, 20}. Beide Aminosäuren waren ebenso wie Tryptophan (bestimmt nach I. c.¹⁹) praktisch völlig zerstört.

Über die Kondensation von Formaldehyd mit 2-Acetaminoacetyl-thiophen und ω -Acetamino-acetophenon

Von OTTO DANN und GÖTZ BENEDICKT *

Aus dem Institut für angewandte Chemie der Universität Erlangen

(Z. Naturforschg. **12 b**, 791–794 [1957]; eingegangen am 11. Juli 1957)

Die bei der Anlagerung von 2 HCHO an 2-Acetaminoacetyl-thiophen (I) und ω -Acetamino-acetophenon (II) entstehenden doppelten Kondensationsprodukte V und VI spalten bei der Meerwein-Ponndorf-Reduktion HCHO ab.

Bei der Anlagerung von Formaldehyd an 2-Acetaminoacetyl-thiophen (I) erhielten sowohl CARRARA und WEITNAUER¹ als auch KESKIN, MASON und NORD² das bei 113° schmelzende DL-2-(α -Acetamino- β -hydroxy-propionyl)-thiophen (III), während von DANN, ULRICH und MÖLLER³ ein bei 167° schmelzendes Kondensationsprodukt V erhalten wurde mit angeblich gleichem Stickstoffgehalt.

Durch freundliche Privatmitteilung von Herrn Prof. G. CARRARA⁴ wurden wir darauf aufmerksam gemacht, daß diese Stickstoffanalyse falsch ist, daß die Verbindung vom Schmp. 167° sich vielmehr als doppeltes Kondensationsprodukt V analysiert, welches aus 2 Moll. Formaldehyd und 1 Mol. 2-Acetaminoacetyl-thiophen (I) entsteht, und daß unter den von DANN, ULRICH und MÖLLER³ angegebenen Versuchsbedingungen fast ausschließlich das bei 113° einfache Kondensationsprodukt (III) erhalten wird.

Daraufhin haben wir die früheren³ Angaben nachgeprüft. Zuerst wurden die Originalpräparate von ULRICH⁵ nachanalysiert; es bestätigten sich die Analysenergebnisse von ETTORRE und VECCHI⁴ und damit die vorgeschlagenen Formulierungen⁴ der Verbindung VII d³ vom Schmp. 167° als 2-(α -Acetamino- α -hydroxymethyl- β -hydroxy-propionyl)-thiophen (V) und dessen Acetylierungsproduktes XVI d³ vom Schmp. 157° als 2-(α -Acetamino- α -acetoxymethyl- β -acetoxo-propionyl)-thiophen (VII). Mangels Vorrat wurde das aus der Verbindung VII d³ durch Salzsäure-Hydrolyse hergestellte, bei 200° sich zersetzende Chlorhydrat nicht nachanalysiert⁶.

Unsere Nachprüfung der verschiedenen Kondensationsbedingungen von 2-Acetaminoacetyl-thiophen (I) mit Formaldehyd bestätigte ferner, daß mit 1,2 Äquival. HCHO und K₂CO₃¹ oder mit 1 Äquival.

* Aus der Dissertation G. BENEDICKT, Erlangen 1957.

¹ G. CARRARA u. G. WEITNAUER, Gazz. chim. ital. **81**, 142 [1951].

² H. KESKIN, C. D. MASON u. F. NORD, J. org. Chemistry **16**, 1333 [1951].

³ O. DANN, H. ULRICH u. E. F. MÖLLER, Z. Naturforschg. **7 b**, 344 [1952].

⁴ Vgl. R. ETTORRE u. A. VECCHI, Z. Naturforschg. **12 b**, 479 [1957].

⁵ H. ULRICH, Dissertation, Erlangen 1952.

⁶ Bei weiterer Nachforschung stellte sich heraus, daß die seinerzeit analysierende Laborantin Analysenergebnisse gefälscht hat.

HCHO und $\text{NaHCO}_3 + \text{Na}_2\text{CO}_3$ ² oder mit 1,9 Äquival. HCHO und NaHCO_3 ³ ganz überwiegend das einfache, bei 113° schmelzende Kondensationsprodukt III entsteht, während wir mit 3,5 Äquival. HCHO und K_2CO_3 ausschließlich das doppelte, bei 167° schmelzende Kondensationsprodukt V gefaßt haben. Das frühere³, nicht mehr rekonstruierbare Kondensationsergebnis von ULRICH⁵ wäre verständlich, wenn etwa an Stelle von NaHCO_3 das stärker alkalische Na_2CO_3 oder K_2CO_3 verwandt worden wäre.

Nachdem wir aus ω -Acetamino-acetophenon (II) mit 4 Äquival. HCHO und K_2CO_3 ebenfalls glatt ein doppeltes Kondensationsprodukt VI erhalten haben, ergibt sich im Verein mit Befunden von REBSTOCK und PFEIFFER⁷, daß die stufenweise Anlagerung von zwei Moll. Formaldehyd an *Acetaminomethyl-arylketone* begünstigt wird durch Formaldehydüberschuß, durch stark basische Katalysatoren, Alkalicarbonat an Stelle von NaHCO_3 , durch erhöhte Reaktionstemperaturen und durch verlängerte Reaktionszeiten.

Schließlich hatten wir noch das Reduktionsverhalten der doppelten Kondensationsprodukte V und VI nachzuprüfen. VI wurde in Äthanol mit $\text{Pd} + \text{H}_2$ glatt hydriert zu X, welches auch bei der NaBH_4 -Reduktion von VI in Methanol entstand. Bei der Meerwein-Ponndorf-Reduktion mit Aluminiumisopropylat in Isopropanol jedoch ließ sich als einziges Hydrierungsprodukt das bekannte DL-threo-1-Phenyl-2-acetamino-propandiol-(1.3) (XII)⁸ fassen, wobei der vermutlich in einer Gleichgewichtsreaktion abgespaltene Formaldehyd sowohl im Destillat als auch im Reduktionsansatz nachgewiesen werden konnte; somit darf man annehmen, daß auch umgekehrt die Formaldehyd-Kondensation von Acetaminomethyl-arylketonen mit Alkoholaten gelingen sollte. Etwas weniger vollständig erfolgte die Formaldehydabspaltung bei der Meerwein-Ponndorf-Reduktion der Thiophenverbindung V; zwar bestand das Reduktionsgemisch auch hier überwiegend aus dem bei 144° schmelzenden, unter Formaldehydabspaltung entstandenen, bekannten DL-

threo-1-[Thienyl-(2')]-2-acetamino-propandiol-1.3 (XI)^{1,2}, aber daneben ließ sich gelegentlich im Kofler-Heiztischmikroskop die bei 132° schmelzende Verbindung IX erkennen, deren Abtrennung durch fraktionierte Kristallisation ULRICH⁵ in einem Falle geglückt war, und die wiederum auf Grund falscher Analysen⁶ seinerzeit irrtümlicherweise als erythro-Racemat (VIII d³) angesehen worden war. In Wirklichkeit handelt es sich bei dem Reduktionsprodukt vom Schmp. 132° um das *ohne* Formaldehydabspaltung entstandene DL-1-[Thienyl-(2')]-2-acetamino-2-hydroxymethyl-propandiol-(1.3) (IX), welches durch NaBH_4 -Reduktion von V unschwer zugänglich ist.

Beschreibung der Versuche*

2-(α -Acetamino- α -hydroxymethyl- β -hydroxy-propionyl)-thiophen (V)⁴

14 g (77 mMol) 2-(Acetaminoacetyl)-thiophen und 8 g (265 mMol) Paraformaldehyd wurden in 50 ml Wasser unter gutes Rühren suspendiert und im Wasser-

⁷ M. C. REBSTOCK u. E. L. PFEIFFER, J. Amer. chem. Soc. **74**, 3207 [1952].

⁸ L. M. LONG u. H. D. TROUTMAN, J. Amer. chem. Soc. **71**, 2472 [1948].

* Die aufgeführten Mikroanalysen wurden bei A. BERNHARDT, Mülheim (Ruhr), angefertigt. Die Schmelzpunktangaben sind nicht korrigiert.

bad bei langsam ansteigender Temperatur erwärmt. Bei 35° wurde 1 g (7,3 mMol) Kaliumcarbonat zugesetzt und die Temperatur langsam auf 45° gesteigert. In wenigen Min. erfolgte Auflösung der suspendierten Substanz mit bräunlicher Farbe. Nach 15 Min. wurde die noch warme Lösung filtriert und im Flüssigkeits-extraktor mit 200 ml Essigester unter Rückfluß 10 Stdn. lang extrahiert. Nach jeweils 2 Stdn. unterbrach man die Extraktion, um ausgefallene Substanz abzufiltrieren. Es fielen so insgesamt 10,2 g (55% d. Th.) V an. Aus Essigester, 2-mal ungelöst, erhielt man farblose Kristalle vom Schmp. 167°, die in Methanol und Äthanol leicht, in Wasser weniger leicht, in Benzol, Chloroform und Äther schwer löslich waren.

$C_{10}H_{13}O_4NS$ (243,3) Ber. C 49,37 H 5,38 N 5,76.
Gef. C 49,44 H 5,35 N 5,72.

α -Acetamino- α -hydroxymethyl- β -hydroxy-propiophenon (VI)

26,4 g (150 mMol) ω -Acetamino-acetophenon und 18 g (600 mMol) Paraformaldehyd wurden in 100 ml Wasser unter kräftigem Rühren suspendiert und im Wasserbad bei langsam ansteigender Temperatur erwärmt. Bei 35° setzte man 1,2 g (8,7 mMol) Kaliumcarbonat zu, worauf in wenigen Min. eine klare, bräunliche Lösung entstand. Dabei war die Temperatur auf 45° gestiegen. Ohne weitere Erwärmung wurde das langsam sich abkühlende Gemisch noch 45 Min. weitergerührt. Die filtrierte Lösung extrahierte man im Flüssigkeits-Extraktor unter Rückfluß 10 Stdn. mit 400 ml Essigester und trocknete den Essigester mit Natriumsulfat. Beim Eindampfen auf ca. 75 ml fielen 14 g vom Schmp. 135–138° aus. Aus dem heißen Filtrat erhielt man beim Abkühlen weitere 4 g vom Schmp. 139 bis 141° (51% d. Th.). Durch einmaliges Umlösen aus Essigester mit wenig Äthanol stieg der Schmp. auf 140 bis 142°. VI löste sich leicht in Methanol und Äthanol, weniger leicht in Essigester, Amylacetat und Chloroform, schwer in Benzol, Äther und Ligroin.

$C_{12}H_{15}O_4N$ (237,3) Ber. N 5,90.
Gef. N 5,74.

α -Acetamino- α -acetoxy-methyl- β -acetoxy-propiophenon (VIII)

0,5 g (ca. 2 mMol) VI wurden in 2 ml trockenem Pyridin gelöst und, nach Abkühlung auf 0°, mit 1 ml (10 mMol) Acetanhydrid versetzt. Nach 14-stdg. Stehen bei Raumtemperatur setzte man 25 ml Eiswasser zu und schüttelte 4-mal mit je 30 ml Essigester aus. Der Essigester wurde mit 2-n. H_2SO_4 , $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und danach i. V. bis auf 5 ml abgezogen. Es fielen 250 mg VIII (39% d. Th.) in farblosen Kristallen vom Schmp. 125–127° aus. Aus wenig Essigester umgelöst betrug der Schmp. 126–127°.

$C_{16}H_{19}O_6N$ (321,3) Ber. N 4,36.
Gef. N 4,37.

DL-1-Phenyl-2-acetamino-2-hydroxymethyl-propandiol-(1.3) (X)

a) Reduktion mit Wasserstoff und PdO

1 g PdO⁹ (82 mMol) wurde in 60 ml abs. Äthanol bei Raumtemperatur mit Wasserstoff geschüttelt bis keine Aufnahme mehr erfolgte. Nach Evakuierung der Schüttelente ließ man 6 g (25 mMol) VI, gelöst in 80 ml warmem abs. Äthanol, einlaufen und schüttelte mit Wasserstoff bei Raumtemperatur. Nach 8 Stdn. war die theor. Menge (600 ml H_2) aufgenommen, die sich in 2 weiteren Stdn. nicht vermehrte. Man filtrierte die Lösung und engte i. V. bei 30° stark ein. Nach 2 Tagen waren aus der öligen Lösung 5,2 g (86% d. Th.) X in farblosen Kristallen gefallen, die aus Essigester mit dem Schmp. 103–104° sich abschieden.

$C_{12}H_{17}O_4N$ (239,3) Ber. N 5,85.
Gef. N 5,97.

b) Reduktion mit $NaBH_4$

0,5 g (ca. 2 mMol) VI wurden in 10 ml wasserfreiem Methanol gelöst, 50 mg (ca. 1,2 mMol) $NaBH_4$ zugesetzt und im Wasserbad 15 Min. bei leichtem Sieden gehalten. Nach kurzem Stehen säuerte man mit 2-n. H_2SO_4 an (pH 3–4) und erhitze nochmals 15 Min. zum schwachen Sieden. Nach 1-stdg. Stehen wurde von ausgefallenem Natriumsulfat abfiltriert und die Lösung i. V. eingedampft. Den zähen, öligen Rückstand nahm man mit einigen ml heißem Essigester auf und trocknete mit Natriumsulfat. Nach Einengen der filtrierten Lösung bis auf 3 ml versetzte man in der Hitze mit einigen Tropfen Äthanol und ließ abkühlen. Es kristallisierten nach längerem Stehen 150 mg X (30% d. Th.) vom Schmp. 102–103° aus, welches im Gemisch mit dem obigen Produkt unverändert schmolz.

DL-N,O,O,O-Tetraacetyl-1-phenyl-2-amino-2-hydroxymethyl-propandiol-(1.3) (XIV)

0,5 g (ca. 2 mMol) X wurden in 5 ml trockenem Pyridin mit 2 ml (20 mMol) Acetanhydrid acetyliert. Nach 2 Tagen goß man die Lösung in 50 ml Eiswasser und schüttelte mit Essigester aus. Die mit 2-n. H_2SO_4 , $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschene Lösung wurde i. V. eingeeengt. Man erhielt XIV in farblosen Kristallen, die bei 101–102° schmolzen. Aus Essigester umgelöst stieg der Schmp. auf 101–102,5°.

$C_{18}H_{23}O_7N$ (365,4) Ber. N 3,83.
Gef. N 3,96.

DL-threo-1-Phenyl-2-acetamino-propandiol-(1.3)⁸ (XII)

4,75 g (20 mMol) VI wurden in 80 ml Isopropanol gelöst und 4 g (20 mMol) Al-isopropylat in 80 ml Isopropanol zugesetzt. Die Reduktion wurde bei einer Badtemperatur von 115–120° wie unten bei XI beschrieben durchgeführt. Nach 9 Stdn. hydrolysierte man

⁹ Org. Synthes. Coll. Vol. II, S. 566, New York 1943.

mit 5 ml Wasser durch 10 Min. langes Kochen unter Rückfluß. Dann wurde heiß abgenutscht und der Rückstand mit 100 ml heißem, 80-proz. Isopropanol in Portionen extrahiert. Sowohl das Destillat als auch die Reduktionslösg. gaben Formaldehyd-Reaktion nach SCHRYVER¹⁰ und nach PILHAZY¹⁰. Das Filtrat hinterließ beim Einengen i. V. ein gelbliches Öl, das in wenig heißem Essigester gelöst wurde und nach Stehenlassen im Eisschrank beim Anreiben 4,5 g klebrige Kristalle lieferte. Aus Amylacetat umgelöst, schmolzen sie bei 135 bis 136°; Die Mischung mit einem nach LONG und TROUTMAN⁸ erhaltenen Produkt schmolz unverändert bei 135–136°. Kristallisierte Nebenprodukte waren nicht zu entdecken.

DL-threo-1-[Thienyl-(2')]-2-acetamino-propandiol-(1.3) (XI)

3 g (12 mMol) V wurden in 30 ml Isopropanol gelöst und eine Lösung von 5 g (25 mMol) Al-isopropylat in 60 ml Isopropanol zugesetzt. Bei einer Badtemperatur von 120–130° wurde ein Aceton-Isopropanol-Gemisch über eine Vigreux-Kolonne (30 cm) mit eingesetztem Dephlegmator langsam abdestilliert. Die abdestillierte Menge wurde durch Zutropfen von Isopropanol zum Reduktionsgemisch laufend ergänzt. Nach 10 Stdn. war mit 2.4-Dinitrophenylhydrazin kein Aceton mehr nachweisbar. Die Reduktionslösung wurde nach Zusatz von 8 ml Wasser 15 Min. unter Rückfluß erhitzt, dann noch heiß abgenutscht und der Rückstand mit 30, 30, 20 ml heißem, 80-proz. Isopropanol, dann 2-mal mit je 20 ml heißem Isopropanol extrahiert. Sowohl im Destillat als auch in der Reduktionslösung war HCHO nach SCHRYVER^{*10} und nach PILHAZY^{**10} nachweisbar.

Die Reduktionslösung wurde bei einer Badtemperatur bis 70° i. V. eingedampft. Man erhielt 4 g einer braunen, öligen Flüssigkeit, die mit 7 ml heißem Essigester aufgenommen wurde. Beim Abkühlen fielen

350 mg Reduktionsprodukt in farblosen Kristallen vom Schmp. 127–131° aus. Aus der Mutterlauge gewann man weitere 250 mg. Beim weiteren Einengen erhielt man ein gelbes, nach Akazien riechendes Öl. Die aus Essigester umgelösten, farblosen Kristalle schmolzen bei 128–131°. Unter dem KOFLER-Heiztischmikroskop waren 2 Kristallformen zu erkennen: Prismen, die um 133–134° schmolzen, IX, und Nadeln, die um 139–141° schmolzen, XI. 150 mg des farblosen Kristallisates ergaben nach dem Umlösen aus 1,5 ml Essigester wiederum ein Gemisch.

Bei der Mehrzahl der Ansätze fiel beim Umlösen des kristallisierten Reduktionsproduktes *nur* bei 141 bis 142° schmelzendes XI^{1,2} an.

DL-1-[Thienyl-(2')]-2-acetamino-2-hydroxymethyl-propandiol-(1.3) (IX)

0,5 g (2 mMol) V wurden in 10 ml abs. Methanol gelöst, mit 50 mg (1,3 mMol) NaBH₄ versetzt und das Gemisch im Wasserbad 2 Stdn. bei schwachem Sieden gehalten. Dann säuerte man mit 2-n. H₂SO₄ schwach an (pH 3–4) und erhitze weitere 15 Min. gelinde, um gebildete, recht beständige Borsäureester zu zerlegen. Das ausgefallene Natriumsulfat wurde abfiltriert und das Filtrat i. V. eingedampft. Den zähen, öligen Rückstand nahm man mit einigen ml heißem Essigester auf, trocknete mit Na₂SO₄ und dampfte das Lösungsmittel bis auf 1 ml ein. Nach Zusatz von einigen Tropfen Äthanol in der Siedehitze kristallisierten beim Abkühlen 250 mg (50% d. Th.) vom Schmp. 129–130° aus. Das aus Essigester umgelöste IX schmolz bei 130 bis 132°³. Die Verbindung ist in Äthanol, Methanol, Aceton und Wasser leicht, in kaltem Essigester schwer löslich, in Benzol, Chloroform fast unlöslich.

C₁₀H₁₅O₄NS (245,3) Ber. C 48,96 H 6,16 N 5,71.
Gef. C 49,13 H 6,36 N 5,49.

* Nachweis von SCHRYVER¹⁰: 10 ml Analysenlösung + 2 ml 1-proz. salzsaurer Phenylhydrazinlsg. + 1 ml 5-proz. K₄Fe(CN)₆-Lsg. + 5 ml konz. HCl: fuchsinähnliche Färbung.

** Nachweis nach PILHAZY¹⁰: 15 ml Analysenlsg. + 1 ml 1-proz. salzsaurer Phenylhydrazinlsg. + einige Tropfen frisch bereiteter Natrium-nitroso-prussiat-Lsg. + einige Tropfen verd. NaOH: Blaufärbung.

¹⁰ TH. SABALITSCHKA u. CL. HARNISCH, Pharmaz. Zentralhalle Deutschland 67, 371 [1926].