46. *Synthese der intermediären Stoffwechselprodukte des Histidins. I.*

Synthese der Urocaninsäure.

Von Shiro AKABORI, Sinsuke OSE und Takeo KANEKO.

Chemisches Institut, Naturwissenschaftliche Fakultät
der Kaiserlichen Universität, Osaka.

(Comm. by R. MAJIMA, M.I.A., May 13, 1940.)

Urocaninsäure ist zuerst im Jahre 1874 von M. Jaffé¹⁾ aus Hundeharn isoliert und ihre Zusammensetzung als $C_6H_6O_2N_2 \cdot 2H_2O$ festgestellt worden. Im Jahre 1912 hat Hunter²⁾ gefunden, dass die von Barger und Ewins³⁾ als Abbauprodukt von Ergothionein gewonnene Imidazol-4(5)-acrylsäure mit der Urocaninsäure identisch ist. Y. Kotake und M. Konishi⁴⁾ haben weiter gefunden, dass Histidin sich im tierischen Gewebe in Urocaninsäure umwandelt.

Eine teilweise Synthese der Urocaninsäure ist von Barger und Ewins³⁾ beschrieben worden. Sie haben durch Behandeln von α -Chlor- β -imidazolyl-propionsäure mit Trimethylamin eine kleine Menge Urocaninsäure gewonnen. Die totale Synthese der Urocaninsäure wurde von Barger und Dakin⁵⁾ vergebens versucht. Sie haben Imidazol-4(5)-aldehyd (I) mit Malonsäure zu Imidazol-4(5)-methyliden-malonsäure (II) kondensiert und versucht, diese zu Urocaninsäure (III) zu dekarboxylieren.

Beim Erhitzen der Dikarbonsäure (II) in Krystallform oder in Lösung spaltete sich Kohlendioxyd ab, aber aus dem Rückstand konnte keine Urocaninsäure gewonnen werden. Pyman⁶⁾ ist auch die gewöhnliche Perkinsche Synthese aus Imidazol-4(5)-aldehyd nicht gelungen.

Wir haben nun das Verfahren von Barger und Dakin nachgeprüft und bei der Verbesserung der Dekarboxylierungsmethode ist uns die Synthese der Urocaninsäure mit einer befriedigenden Ausbeute gelungen.

Als Ausgangsmaterial benützten wir 4(5)-Oxymethylimidazol, das durch Salpetersäure leicht zu Imidazol-4(5)-aldehyd oxidiert wird. Zur Darstellung der Imidazolderivate war Pyman⁷⁾ von Diaminoaceton aus-

1) Jaffé: Ber. **71** (1874), 1671.

2) Hunter: J. Biol. Chem. **11** (1912), 537.

3) Barger u. Ewins: J. C. S. **99** (1911), 2336.

4) Kotake u. Konishi: Z. physiol. Chem. **122** (1922), 230.

5) Barger u. Dakin: Biochem. J. **10** (1916), 376.

6) Pyman: J. C. S. **109** (1916), 186.

7) Pyman: Ibid. **99** (1911), 668.

gegangen. Nach Girard und Parrod⁸⁾ entsteht Oxymethylimidazol bei der Luftoxydation der Fruktose in einer ammoniakalischen Kupferlösung. Weidenhagen und Herrmann⁹⁾ haben von Oxymethylimidazol in 71% iger Ausbeute aus Dioxyaceton und Formaldehyd durch Erhitzen in ammoniakalischer Kupferlösung erhalten. Weidenhagen¹⁰⁾ beschreibt weiter die Entstehung derselben Imidazolderivate in 38% iger Ausbeute aus Fruktose und Formaldehyd in der gleichen Weise. Wir haben zuerst die Methode von Weidenhagen geprüft, aber die Ausbeute stieg nicht über 15% der Theorie. Darauf sind wir von Rohrzucker ausgegangen und haben direkt nach der Inversion mittels der Methode von Girard und Parrod unter Modifizierung der Reinigungsmethode, wie im experimentellen Teil beschrieben wird, eine genügende Menge Oxymethylimidazol gewonnen.

Die Oxydation des Imidazolalkohols zum Aldehyd gelingt durch Salpetersäure nach Pyman⁷⁾ mit einer theoretischen Ausbeute von 56%. Durch Erwärmen des Imidazolaldehyds in wässriger Lösung mit Malonsäure bildet sich fast quantitativ Imidazol-4(5)-methyliden-malonsäure, die bei 212° unter Aufschäumen schmilzt. Wenn man diese Dicarbonsäure in Pyridin viele Stunden kocht, entwickelt sich langsam Kohlendioxyd und zurückbleibt Urocaninsäure, die nach dem Umkrystallisieren aus Wasser bei 230–231° unter Aufschäumen schmilzt und in allen Eigenschaften mit der durch enzymatischen Abbau von Histidin gewonnenen Urocaninsäure übereinstimmt. Ein autorisiertes Urocaninsäure-Präparat zur Mischprobe wurde uns freundlicherweise von Prof. Y. Sera zugeteilt, wofür wir unseren verbindlichsten Dank aussprechen. Zum weiteren Beweis der Konstitution haben wir die synthetisch gewonnene Urocaninsäure mit Natriumamalgam zu Imidazol-4(5)-propionsäure reduziert, die sich als mit der von einem der Verfasser¹¹⁾ aus Glutaminsäure synthetisierten Imidazol-4(5)-propionsäure identisch erwies.

Experimenteller Teil.

(1) 4(5)-Oxymethyl-imidazol.

1 kg krystallinisches Kupfersulfat wird in 3 l Wasser gelöst und dazu 1300 ccm 20% iges wässriges Ammoniak und 350 g Natriumhydroxyd in 1 l Wasser gefügt. Zur obigen blauen Kupfer-Ammoniak-Lösung wird durch Behandeln von 1 kg Rohrzucker in 1500 ccm Wasser mit 40 ccm konzentrierter Salzsäure dargestellte Invertzucker-Lösung zugesetzt. Die ganze Lösung wird mit Wasser auf 13 l verdünnt und dann wird bei Zimmertemperatur unter öfterem Umschütteln vier Tage lang ein milder Luftstrom eingeleitet. Der entstandene grünlichbraune

8) Girard u. Parrod: Compt. rend. **190** (1930), 328; **192** (1931), 1138; **195** (1932), 1110.

9) Weidenhagen u. Herrmann: Ber. **68** (1935), 1961.

10) Weidenhagen: Ber. **70** (1937), 570.

11) Akabori: Ber. **66** (1933), 151.

Niederschlag wird abfiltriert, in 3400 ccm 2 N-Schwefelsäure gelöst, von der unlöslichen Substanz abfiltriert und auf dem Wasserbad auf ca. 1 l eingengt. Nach dem Erkalten wird die von dem ausgeschiedenen Kupfersulfat abfiltrierte Lösung mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat des Kupfersulfids wird von Schwefelwasserstoff befreit, mit überschüssigem Calciumhydroxyd versetzt, auf dem Wasserbad erwärmt um das Ammoniak zu verjagen, die von dem Calciumsulfat abfiltrierte Lösung wird unter vermindertem Druck zum Sirup eingedampft und der Rückstand zweimal mit absolutem Alkohol ausgekocht. Die gesamte alkoholische Lösung wird auf dem Wasserbad möglichst konzentriert und dazu 100 g Pikrinsäure in 1200 ccm heissem Wasser zugegeben. Beim Erkalten der Lösung scheidet sich Oxymethylimidazolpikrat in gelben Nadeln aus, die bei 204° schmelzen. Die Ausbeute beträgt 110 g. Die aus Wasser umgelösten Kristalle schmelzen bei 205°.

Das freie Oxymethylimidazol wird aus seinem Pikrat folgenderweise gewonnen: 100 g des Pikrats werden mit 300 ccm konzentrierter Salzsäure auf dem Wasserbad erwärmt und nach dem Erkalten wird die ausgeschiedene Pikrinsäure abfiltriert. Die Lösung wird vielfach mit Benzol geschüttelt, um die Pikrinsäure völlig zu entfernen, unter vermindertem Druck zum Sirup eingengt, mit überschüssigem Natriumcarbonat vermischt und auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft. Die zurückgebliebene Masse wird pulverisiert und mit absolutem Alkohol ausgekocht. Nach der Abdestillation des Alkohols vom Extrakt bleibt Oxymethylimidazol als ein dicker Sirup zurück, der beim Reiben zu einer Krystallinischen Masse erstarrt. Schmp. 92°.

(2) Imidazol-4(5)-aldehyd.

21 ccm konzentrierte Salpetersäure (Sp. Gew. 1.422) werden in einem Rundkolben auf dem siedenden Wasserbad erhitzt und dazu 13 g Oxymethylimidazol in kleinen Portionen zugefügt. Nachdem das Rauchen aufgehört hat, wird die Reaktionslösung zur Trockne abgedampft. Der Rückstand wird mit 8,5 g wasserfreiem Natriumcarbonat in 40 ccm Wasser in der Wärme aufgelöst und mit einer kleinen Menge von Kohle entfärbt. Beim Erkalten der Lösung scheidet sich Imidazol-4(5)-aldehyd in hellgelben Krystallen aus, die bei 173° schmelzen. Ausbeute 3,1 g. Beim Ansäuern der Mutterlauge bis zum pH 2,2-2,4 scheidet sich Imidazol-4(5)-carbonsäure als weisses Pulver aus. Nach dem Einengen und Erkalten der Mutterlösung wird die wieder auskrystallisierte Imidazol-4(5)-carbonsäure abfiltriert, das Filtrat wird getrocknet und der Rückstand mit absolutem Alkohol extrahiert. Aus der alkoholischen Lösung gewinnt man durch Einengen 3,9 g etwas unreines Imidazol-4(5)-aldehyd.

(3) Imidazol-4(5)-methyliden-malonsäure.

4,7 g Imidazol-4(5)-aldehyd und 5,6 g Malonsäure werden in 100 ccm warmen Wasser gelöst und auf dem Wasserbad bei ca. 50° gehalten, wobei nach etwa 10 Minuten weisse Nadeln auszukrystallisieren beginnen. Nach 3 stündigem Erhitzen wird abgekühlt und filtriert. Die Ausbeute ist 7,0 g. Schmp. 212° (unter Zersetzung). Aus der Mutter-

lösung gewinnt man weitere 1.5 g der Dicarbonsäure. Die gesammte Ausbeute beträgt 96% der Theorie.

Subst. 3.218 mg, N₂ 0.433 ccm (14.2°, 763.7 mm)

Gef. N 15.74%. Ber. f. C₇H₅N₂O₄ N 15.39%

(4) Urocaninsäure.

7.5 g fein pulverisierte Imidazol-4(5)-methyliden-malonsäure werden in 400 ccm Pyridin suspendiert und auf dem Ölbad unter Rückfluss 14 Stunden lang gekocht, wobei sich die Dicarbonsäure unter Entwicklung von Kohlendioxyd, allmählich löst. Nach beendeter Kohlendioxydentwicklung wird das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wird in etwa 100 ccm heissem Wasser gelöst, von den schwerlöslichen Verunreinigungen abfiltriert, mit aktiver Kohle entfärbt und eingeeengt. Beim Abkühlen der Lösung scheiden sich 4.1 g weisse Krystalle aus. Aus der Mutterlösung gewinnt man weitere 0.5 g unreiner Urocaninsäure. Die gesammte Ausbeute ist 64% der Theorie. Aus heissem Wasser umkrystallisierte Urocaninsäure schmilzt unter Aufschäumen bei 230–231°. Die Mischprobe mit dem aus Histidin enzymatisch gewonnenen Urocaninsäure-Präparat zeigt denselben Schmelzpunkt.

Subst. 3.858 mg, CO₂ 5.920 mg, H₂O 2.026 mg;

Subst. 2.210 mg, N₂ 0.308 ccm (16°, 766.7 mm)

Gef. C 41.85, H 5.88 N 16.28%

Ber. f. C₈H₅N₂O₂ · 2H₂O C 41.35, H 5.78 N 16.09%

Subst. 5.654 mg, Gewichtsverlust durch Trocknen bei 111° unter vermindertem Druck 1.168 mg.

Gef. H₂O 20.66%; Ber. f. C₈H₅N₂O₂ · 2H₂O 20.70%

Urocaninsäure-flavianat: gelbe Krystalle, schmilzt unter Zersetzung bei 271°.

Subst. 1.594 mg, N₂ 0.170 ccm (13.3°, 763.6 mm)

Gef. N 12.55%. Ber. f. C₆H₅N₂O₂ · C₁₀H₈O₈N₂S N 12.39%

(5) Reduktion der Urocaninsäure zu Imidazol-4(5)-propionsäure.

0.52 g Urocaninsäure werden in 20 ccm Wasser suspendiert und mit 30 g 2.3% igem Natriumamalgam und überschüssiger Essigsäure in gewöhnlicher Weise reduziert. Die Reaktionslösung wird mit einer Lösung von 10 g Quecksilberchlorid in 50 ccm warmem Wasser versetzt, der entstandene weisse Niederschlag wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt und das Filtrat des Quecksilbersulfids auf etwa 3 ccm eingeeengt. Beim Abkühlen der Lösung scheiden sich weisse Krystalle aus, die bei 83° schmelzen und sich als Hydrochlorid der Imidazol-4(5)-propionsäure erweisen.