

Mir lag es nur daran, zu zeigen, dass structurechemische Betrachtungen, welche mit unseren Valenzbegriffen und sonstigen Anschauungen vollständig im Einklang stehen, die vorliegende Frage mindestens in gleichbefriedigender Weise zu erklären vermögen, wie die in äusserst genialer Weise entwickelte und durch die Versuchsergebnisse gestützte Theorie von dem »Vorliegen einer festen Lösung von Stickstoffoxydul und Stickstoff in Uransäure« und der »Existenz eines den heliumhaltigen Mineralen entsprechenden Modells«, welches durch Erhitzen von Hydroxylaminuranat auf 126° gebildet werden soll. —

Hrn. cand. phil. Paul Schulz besten Dank für die werthvolle, bei Darstellung der Präparate und Ausführung der Analysen geleistete Hilfe.

Bern, Anorganisches Laboratorium der Universität, 23. Juni 1905.

#### 419. C. Neuberg und A. Manasse: Die Isolirung der Aminosäuren.

[Aus dem chem. Laboratorium des Patholog. Instituts d. Universität Berlin.]

(Eingegangen am 27. Juni 1905.)

Die Erfahrungen in der Kohlehydratreihe haben gelehrt, dass die Zahl der schwer löslichen, zur Abscheidung der Zucker geeigneten Hydrazone im allgemeinen mit dem Molekulargewicht des Hydrazinrestes zunimmt. Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei dem augenblicklich besonders actuellem Problem der Isolirung von Eiweisspaltproducten.

E. Fischer und Bergell<sup>1)</sup> haben gezeigt, dass an Stelle des früher verwendeten Benzolsulfochlorids das höher molekulare  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid mit grossem Vortheil benutzt werden kann, indem es schwer lösliche Derivate auch dort giebt, wo die Benzolsulfamide leicht löslich sind. Aehnliches hat später M. Siegfried<sup>2)</sup> für das 4-Nitrotoluol-2-sulfochlorid constatirt, und von analogen Gesichtspunkten ausgehend, hat früher O. Hinsberg<sup>3)</sup> zur Diagnose der Amine das  $\beta$ -Anthrachinonsulfochlorid an Stelle des Benzol-, resp. Toluolsulfo-Chlorids empfohlen.

Bei Anwendung auf den Harn, oder andere dem Thierkörper entstammende Flüssigkeiten, machen sich bei den bisherigen Methoden

<sup>1)</sup> Diese Berichte 35, 3779 [1902].

<sup>2)</sup> Zeitschr. für physiolog. Chem. 43, 69 [1904].

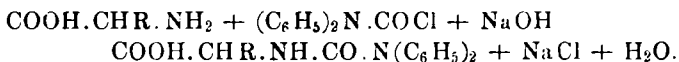
<sup>3)</sup> Diese Berichte 33, 3526 [1900].

zwei Schwierigkeiten geltend, einmal der nicht quantitative Verlauf der Reaction<sup>1)</sup>, zweitens die ziemlich umständliche Vorbearbeitung des Harns, wie Entfernung der Hippursäure, die zahlreich nöthigen Extraktionen mit Aether und die für schnelle Untersuchungen am Krankenbette lästigen vielstündigen mechanischen Schüttelungen.

Zu einer von diesen Nachtheilen freien Methode sind wir durch Ausbildung des Verfahrens gelangt, das die Aminosäuren in substituirte Harnstoffe überführt, und zwar gleichfalls unter Berücksichtigung des erwähnten Principes, durch Vergrößerung des Molekulargewichts eine Erhöhung der Schwerlöslichkeit zu erreichen.

Zwei einfache Wege boten sich für dieses Ziel.

1. Statt durch Behandlung mit Isocyanaten musste man Aminosäuren mit Harnstoffchloriden in substituirte Carbamide verwandeln können. Wir benutzten Diphenylharnstoffchlorid, das sich bei Gegenwart von Alkali, aus früher<sup>2)</sup> angegebenen Gründen am besten in Acetonlösung, thatsächlich sehr glatt mit Aminosäuren vereinigt:



Die Reaction vollzieht sich langsam beim Stehen in der Kälte, rascher beim Erwärmen. Man muss in praxi noch 1 Mol. Natronlauge anwenden; verdampft man dann das Aceton, lässt abkühlen, filtrirt vom Tetraphenylharnstoff<sup>3)</sup> (?) ab und säuert an, so scheidet sich die gesuchte Diphenylhydantoinsäure ab.

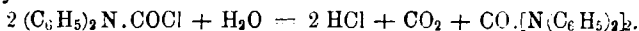
2. der zweite Weg ist viel bequemer und daher allein weiter ausgearbeitet; er besteht darin, dass man das Phenylisocyanat durch das  $\alpha$ -Naphthylisocyanat,  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{.N:CO}$ , ersetzt. Durch diese so geringfügig erscheinende Aenderung erreicht man ganz überraschende Vortheile.

Während die Phenylcyanatadditionsproducte der Aminosäuren sich nicht quantitativ abscheiden und vielfach unerfreuliche zähe Harze bilden, die erst durch Kochen mit Mineralsäuren in die krystallisirenden Hydantoine übergeführt werden müssen, scheidet sich die Reactionsproducte von  $\alpha$ -Naphthylcyanat mit den Aminosäuren in fester krystal-

<sup>1)</sup> A. Ignatowski, Zeitschr. für physiolog. Chem. 42, 771 [1904]. F. Erben, ebenda 43, 320 [1905]. Abderhalden und Rona, ebenda 44, 205 [1905]. Die beiden ersten Autoren erzielten eine Ausbeute von 50–80 pCt.

<sup>2)</sup> C. Neuberg und H. Wolff, diese Berichte 34, 3843 [1901].

<sup>3)</sup> Derselbe entsteht vermuthlich durch Zersetzung von überschüssigem Diphenylharnstoffchlorid:



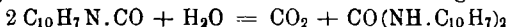
linischer Form und in allen bisher untersuchten Fällen quantitativ aus, selbst wenn man in erheblicher Verdünnung (1 bis 2 pCt.) arbeitet.

Demnach besitzt dieses Verfahren grosse Vorzüge. Das  $\alpha$ -Naphtylisocyanat ist flüchtig<sup>1)</sup>, daher ist im Gegensatz zum  $\beta$ -Naphtalinsulfochlorid kein besonderes Lösungsmittel nöthig. Vor dem Phenylcyanat zeichnet es sich dadurch aus, dass es wegen seines sehr viel höheren Siedepunktes (270°) keine stechenden, giftigen Dämpfe entwickelt, dass es gegen Wasser viel beständiger ist und — das ist für die praktische Handhabung besonders wichtig — ohne jede Kühlung mit der alkalischen Lösung der Aminosäure zusammengebracht werden kann. Eine besondere mechanische Schüttelung ist auch unnöthig, ebenso wenig ein portionsweiser Zusatz des Reagenzes oder des erforderlichen Alkalis, es genügt, das Gemisch mehrmals im verschlossenen Gefäss<sup>2)</sup> 2—3 Minuten mit der Hand zu schütteln und darauf  $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$  Stunde ruhig stehen zu lassen. Man filtrirt dann vom ganz unlöslichen Dinaphtylharnstoff ab, in den der Ueberschuss des  $\alpha$ -Naphtylcyanats sich vollständig verwandelt, und säuert an; wie erwähnt, fallen dabei quantitativ die Naphtylhydantoinsäuren aus. Wegen ihrer vortrefflichen Eigenschaften ist eine Umwandlung unter Wasserabspaltung in die Naphtylhydantoine durch Kochen mit Säuren unnöthig, ganz davon abgesehen, dass hierdurch eine für die praktische Ausführung lästige weitere Operation umgangen wird.

Die Methode ist in gleicher Vortrefflichkeit bei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Aminosäuren, Aminoaldehyden, Oxyaminosäuren, Diaminosäuren und Peptiden anwendbar, sie lässt, wie ersichtlich, an Schnelligkeit, Einfachheit und Exactheit nichts zu wünschen übrig. Sie hat sich auch in gleicher Weise in der physiologischen Praxis durchaus bewährt, und über diese Ergebnisse wird an anderer Stelle von uns und anderen Autoren, die bereits mit dem Verfahren gearbeitet haben, berichtet.

<sup>1)</sup>  $\alpha$ -Naphtylisocyanat ist flüchtig von A. W. v. Hofmann (diese Berichte 3, 658 [1870]) erwähnt: es wird aus  $\alpha$ -Naphtylurethan mit Phosphorsäureanhydrid dargestellt; wir fanden es für wichtig, bei der Destillation einen erheblichen Ueberschuss von Phosphorsäureanhydrid anzuwenden. Das Präparat ist auf unsere Veranlassung von Dr. Schuchardt-Görlitz und C. A. F. Kahlbaum-Berlin angefertigt.

<sup>2)</sup> Nach jeder Schüttelung ist der Stopfen zu lüften; denn der Ueberschuss des Cyanates zerfällt unter Kohlensäureentwicklung:



Die Kohlensäure wird in der alkalischen Lösung nicht gebunden, da die Naphtylhydantoinsäuren starke Säuren sind, also beständige Alkalisalze bilden.

Erwähnt sei nur, dass die Anwendung auf Harn, Oedemflüssigkeit, Exsudate etc. genau so einfach ist<sup>1)</sup>. Die Flüssigkeiten können — natürlich nach Enteiweissung — ohne jede Vorbereitung direct oder bei geringem Aminosäuregehalt nach einfacher Concentration auf dem Wasserbad, bei Gegenwart von Alkali mit dem Reagens behandelt werden. Die Untersuchung des normalen Harns hat in sofern ein interessantes Resultat ergeben, als man in kleiner Menge das  $\alpha$ -Naphtylcyanatadditionsproduct einer höher molekularen Substanz<sup>2)</sup> erhält, die vermuthlich Peptid-Charakter besitzt.

Im Folgenden seien nur einige auch für die rein chemische Praxis wichtige Verbindungen beschrieben.

$\alpha$ -Naphtylisocyanat-Glykocoll,  $\text{COOH.CH}_2\text{.NH.CO.NH.C}_{10}\text{H}_7$ .

0.75 g Glykocoll werden in 60 ccm Wasser und 10 ccm Normal-Kalilauge gelöst, mit 2.0 g Naphtylcyanat ( $\frac{3}{4}$ -mol.) versetzt und öfter umgeschüttelt. Nach ca.  $\frac{3}{4}$  Stunden wird vom Dinaphtylharnstoff abfiltrirt, dieser gut ausgewaschen und mit Salzsäure angesäuert. Die Flüssigkeit erstarrt zu einem Brei der Naphtylhydantoinsäure, die nach einiger Zeit abgesaugt und aus verdünntem Alkohol umkrystallisirt wird.

Feine, farblose Nadelchen vom Schmp.  $190.5^{\circ}$ — $191.5^{\circ}$ . Die im Vacuum über Phosphorsäureanhydrid getrocknete Substanz enthält kein Wasser, solches haben wir auch bei keiner der übrigen  $\alpha$ -Naphtylhydantoinsäuren gefunden.

0.1838 g Sbst.: 17.8 ccm N (20.5 $^{\circ}$ , 760 mm).

$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ . Ber. N 11.47. Gef. N 11.05.

Die Verbindung löst sich ausser in Alkalien auch in Ammoniak. Die ammoniakalische Lösung giebt auf Zusatz von Chlorbaryum oder Barytwasser einen dichten Brei verfilzter Nadeln, die aus dem Barymsalz der  $\alpha$ -Naphtylcyanatglykocolls bestehen; die Abscheidung des letzteren ist quantitativ und erfolgt noch in grosser Verdünnung. Hierdurch kann Glykocoll von den anderen Aminosäuren leicht getrennt werden.

<sup>1)</sup> Hippursäure reagirt nicht mit  $\alpha$ -Naphtylcyanat, sie braucht auch nicht entfernt zu werden, da sie bei der schwach alkalischen Reaktion dieser Operation nicht gespalten wird.

<sup>2)</sup> Wir sind derselben schon vor längerer Zeit bei Behandlung von normalem Harn mit Phenylcyanat begegnet; aber erst das  $\alpha$ -Naphtylcyanat gestattet ihre Darstellung in beliebiger Menge, die Untersuchung dieses Productes möchten wir uns vorbehalten.

$\alpha$ -Naphtylisocyanat-*r*-Alanin,  
 $\text{COOH} \cdot \text{CH}(\text{CH}_3) \cdot \text{NH} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{C}_{10}\text{H}_7$ ,

entsteht in gleicher Weise aus 0.9 g Alanin in 60 ccm Wasser, 10 ccm Normal-Natronlauge und 2.0 g  $\alpha$ -Naphtylisocyanat. Die Ausbeute ist quantitativ. Kleine Nadelchen vom Schmp. 198°.

0.1784 g Subst.: 16.5 ccm N (18°, 771 mm).

$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ . Ber. N 10.85. Gef. N 10.85.

Das Baryumsalz ist viel leichter löslich als die Glycocollverbindung und nur in concentrirter Lösung erhältlich.

$\alpha$ -Naphtylisocyanat-*n*- $\alpha$ -*r*-Aminobuttersäure,  
 $\text{COOH} \cdot \text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3) \cdot \text{NH} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{C}_{10}\text{H}_7$ ,

wurde auf dieselbe Art aus 1.05 g racemischer *n*- $\alpha$ -Aminobuttersäure, 10 ccm Normal-Natronlauge, 60 ccm Wasser und 2.0 g  $\alpha$ -Naphtylisocyanat hergestellt. Ausbeute quantitativ. Aus verdünntem Alkohol scheidet sich die Verbindung in langen, spießigen Krystallen ab, die den Schmp. 194—195° besitzen.

0.1708 g Subst.: 15.1 ccm N (18°, 760 mm).

$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ . Ber. N 10.21. Gef. N 10.29.

$\alpha$ -Naphtylisocyanat-Leucin,  
 $\text{COOH} \cdot \text{CH}(\text{C}_4\text{H}_9) \cdot \text{NH} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{C}_{10}\text{H}_7$ .

Die Verbindung ist schon vor längerer Zeit aus einem sehr reinen durch Pancreasverdauung von Casein gewonnen, mehrfach umkrystallisirten »Leucin« dargestellt, dürfte jedoch F. Ehrlichs »Isoleucin« enthalten haben<sup>1)</sup>. Sie sei beschrieben, da in der Regel in dem natürlichen »Leucin« ein solches Gemisch vorliegt.

Aus 1.30 g Subst., 10 ccm *n*-Natronlauge, 60 ccm Wasser und 2.0 g Naphtyl-isocyanat entsteht die Verbindung in quantitativer Ausbeute; sie ist ein selten schönes Leucinderivat und bildet, aus verdünntem Alkohol umkrystallisirt, sehr schwer lösliche, prachtvolle lange, spießige Krystalle vom Schmp. 163.5°.

0.1624 g Subst.: 13.0 ccm N (22°, 762 mm).

$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$ . Ber. N 9.33. Gef. N 9.24.

$\alpha$ -Naphtylisocyanat-*l*-Tyrosin,  
 $\text{COOH} \cdot \text{CH}(\text{CH}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})) \cdot \text{NH} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{C}_{10}\text{H}_7$ .

Verwendet wurde ein mehrfach umkrystallisirtes, durch tryptische Verdauung von Fibrin gewonnenes Product. Aus 1 g diesen

<sup>1)</sup> Die Beschreibung der aus reinen optisch activen Eiweisspaltproducten dargestellten Verbindungen wird demnächst erfolgen, soweit wir bisher gesehen haben, sind sie ebenfalls sehr schwer löslich und in alkalischer Lösung optisch activ.

Tyrosins, 6 ccm *n*-Natronlauge, 60 ccm Wasser und 1.2 g  $\alpha$ -Naphthyl iso-cyanat bildet sich das Additionsproduct in quantitativer Ausbeute.

Feine sternförmig gruppirte Nadeln vom Schmp. 205–206°.

0.1778 g Sbst.: 12.9 ccm N (23°, 762 mm).

$C_{20}H_{18}N_2O_4$ . Ber. N 8.01. Gef. N 8.20.

$\alpha$ -Naphthylisocyanat-Glycylglycin,  
 $COOH.CH_2.NH.CO.CH_2.NH.CO.NH.C_{10}H_7$ .

Die Verbindung wuede aus salzsaurem Glycylglycin dargestellt; 1.69 g wurden in 20 ccm *n*-Natronlauge (2 Mol.) und 60 ccm Wasser gelöst, dann mit 2.0 g Naphtyl iso cyanat behandelt. Ausbeute quantitativ. Die Substanz kann aus verdünntem Alkohol umkrystallisirt werden; am einfachsten wird sie durch Lösen in verdünntem Ammoniak und Ausfällen unter starkem Rühren durch Schwefelsäure gereinigt. Die Substanz bildet feine Nadelchen vom Schmp. 217°; gleich dem Glykocollderivat liefert sich ein Baryumsalz, doch ist dieses bedeutend leichter löslich, sodass Glykocoll und Glycylglycin dadurch nebeneinander erkannt werden können.

0.1912 g Sbst.: 22.4 ccm N (20°, 759 mm).

$C_{15}H_{15}N_2O_4$ . Ber. N 13.39. Gef. N 13.97.

$\alpha$ -Naphthylisocyanat-Glutaminsäure,  
 $COOH.(CH_2)_2.CH(COOH).NH.CO.NH.C_{10}H_7$ .

Die zweibasischen Säuren erfordern natürlich 2 Mol. Lauge; im übrigen entsteht die Verbindung aus 1.47 g Glutaminsäure, 20 ccm *n*-Natronlauge, 50 ccm Wasser und 2.0 g  $\alpha$ -Naphthyl-iso-cyanat in der gleichen Weise und in quantitativer Ausbeute.

Die Verbindung wird am besten aus Alkohol von 90 pCt. umkrystallisirt, sie bildet dann lange, verfilzte Nadelchen vom Schmp. 236–237°.

0.1823 g Sbst.: 14.2 ccm N (22°, 762.5 mm).

$C_{11}H_{16}N_2O_5$ . Ber. N 8.86. Gef. N 8.84.

$\alpha$ -Naphthylisocyanat-Cystin,  $\left( \begin{array}{c} COOH.CH.NH.CH_2.S- \\ CO.NH.C_{10}H_7 \end{array} \right)_2$ ,

entsteht aus 1.2 g Cystin, 10.0 ccm *n*-Kalilauge, 100 ccm Wasser und 2.0 g  $\alpha$ -Naphthylisocyanat. Das Product ist sehr voluminös; beim Trocknen in vacuo über Phosphorsäureanhydrid schrumpft es zusammen, und es zeigt sich, dass die Ausbeute quantitativ ist.

0.2094 g Sbst.: 16.5 ccm N (21°, 760 mm).

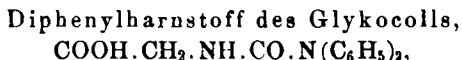
$(C_{14}H_{13}N_2O_3S)_2$ . Ber. N 9.60. Gef. N 9.00.

Verwendet man an Stelle der Kalilauge Natriumhydroxyd und lässt einige Zeit stehen, so erstarrt die gesammte Masse zu einem dichten Brei schöner Nadelchen, die den nebenbei gebildeten  $\alpha$ -Dinaphtylharnstoff einschliessen; sie bestehen aus dem schwerlöslichen Natriumsalz der Naphtylhydantoinsäure des Cystins.

Auch das Kaliumsalz ist nicht ganz leicht löslich und krystallisirt in Nadeln; man muss daher in ziemlicher Verdünnung arbeiten. Scheiden sich trotzdem neben dem Dinaphtylharnstoff die durch ihr Aussehen leicht erkennbaren Nadeln ab, so kann man sie durch Auskochen mit Wasser abtrennen. Das Filtrat ergiebt dann auf Säurezusatz die freie Cyanatverbindung.

Die ammoniakalische Lösung des Cystinderivates giebt mit Baryumsalzen einen krystallinischen, mit Chlorcalcium und Magnesiumsulfat amorphen Niederschlag. Starke Natron- und Kali-Lauge scheiden die schwerlöslichen Alkalisalze ab.

Als Beispiel der eingangs erwähnten Diphenyl-hydantoinsäuren sei der



angeführt.

Die Verbindung entsteht, wenn äquimolekulare Mengen von Glykocoll und Diphenylharnstoffchlorid mit 2 Mol. *n*-Natronlauge und soviel Aceton gemischt werden, dass eine klare Flüssigkeit resultirt. Verdampft man nach zweistündigem gelinden Erwärmen am Rückflusskühler oder nach 20-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur das Aceton, filtrirt von dem in kleiner Menge gebildeten Tetraphenylharnstoff ab und säuert an, so scheidet sich die Diphenylhydantoinsäure als farbloser dicker Krystallbrei ab.

Die Substanz entsteht fast quantitativ; aus verdünntem Alkohol krystallisirt sie in glitzernden, langgestreckten, hexagonalen Blättchen vom Schmp. 144.5°.

0.1792 g Sbst.: 16.4 ccm N (17°, 747 mm).

$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ . Ber. N 10.37. Gef. N 10.44.

Zu den  $\alpha$ -Naphtylhydantoinsäuren ist noch zu bemerken, dass sie sich aus unreinen Lösungen manchmal sehr voluminös, fast gelatinös, abscheiden und sich in diesem Zustande an der Luft leicht bläulich bis violett färben. Trotzdem lassen sich die Verbindungen auf einer Nutsche leicht absaugen und verlieren im Vacuum bei der Trocknung über Phosphorsäureanhydrid den voluminösen Charakter. Ihre Reini-

gung kann durch Krystallisation aus verdünntem Alkohol wie durch Umfällung aus alkalischer Lösung durch Salz- oder Schwefel-Säure geschehen, in beiden Fällen unter Zusatz von etwas Knochenkohle.

Bei einer Diaminosäure haben wir gefunden, dass die alkalische Lösung das Naphtylcyanatadditionsproductes sehr dicklich ist und schlecht filtrirt; man braucht dann einfach vor der Filtration stark zu verdünnen und zum Sieden zu erhitzen. Dabei ballt sich der Naphtylharnstoff tadellos zusammen und die Verarbeitung kann in gewohnter Weise vor sich gehen.

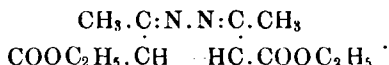
Liegen Gemische von Aminosäuren vor, so entstehen auch Gemische der  $\alpha$ -Naphtylhydantoinsäuren. Wir werden später zeigen, dass sich diese theils durch Salzfällung, theils auf andere Weise scheiden lassen; auf alle Fälle lässt sich das Glykocoll leicht als Baryumsalz abtrennen.

#### 420. Carl Bülow: Zur Kenntniss des Condensationsproductes aus Semicarbazid und Diacetbernsteinsäureester.

[Mitteilung aus dem chemischen Laboratorium der Universität Tübingen.]

(Eingegangen am 27. Juni 1905.)

Vor einiger Zeit konnte Bülow<sup>1)</sup> nachweisen, dass bei der Einwirkung äquimolekularer Mengen von Hydrazin auf Diacetbernsteinsäureester, je nach den angewandten Experimentalbedingungen, zwei verschiedene Reactionsendproducte entstehen: 1. bildet sich eine von Curtius<sup>2)</sup> in unreiner Form gewonnene und deshalb von ihm auch nicht weiter untersuchte Verbindung vom Schmp. 68—69°. Er erteilte ihr die »wahrscheinliche« Formel eines Dimethyldihydropyridazindicarbonsäureesters<sup>3)</sup>



Sie konnte von mir (l. c.), von Paal und seinen Mitarbeitern<sup>4)</sup> sowie von Korschun<sup>5)</sup> begründet werden.

<sup>1)</sup> C. Bülow, diese Berichte 35, 4311 [1902].

<sup>2)</sup> Curtius, Journ. für prakt. Chem. 50, 519 [1894].

<sup>3)</sup> Die Analysen, welche Hr. Hans Lang von diesem Körper anfertigte, liessen sich »nur schlecht mit der Pyridazinformel in Einklang bringen.«

<sup>4)</sup> Paal und Ueber, diese Berichte 36, 497 [1903]; Paal und Koch, diese Berichte 36, 2538 [1903]; 37, 4382 [1904].

<sup>5)</sup> Korschun, diese Berichte 37, 2186 [1904].