

0.1566 g Sbst.: 0.2438 g CO₂, 0.0326 g H₂O. — 0.1858 g Sbst.: 17.6 ccm N (24°, 767 mm).

C₁₄H₉N₃Br₂O. Ber. C 42.52, H 2.30, N 10.64.
Gef. » 42.46, » 2.33, » 10.99.

3. Di-(*p*-aminophenyl-imesatyl)-imesatin.

Aus einer siedenden Lösung von 16 g Isatin und 5 g *p*-Phenylendiamin in 120 ccm Alkohol und 30 ccm Wasser scheiden sich nach kurzem Aufkochen gelbliche Krystalle aus. Durch Umlösen aus Pyridin entstehen gelbrote Schuppen, die unter dem Mikroskop sehr charakteristisch und vollkommen anders aussehen wie die bei 1 beschriebene Substanz. Schmp. 310° unter Zersetzung. Die nach Möhlau und Litter (s. o.) ausgeführte Kondensation liefert das gleiche Produkt.

0.1447 g Sbst.: 0.3810 g CO₂, 0.0543 g H₂O. — 0.2298 g Sbst.: 0.6037 g CO₂, 0.0804 g H₂O. — 0.2829 g Sbst.: 0.7442 g CO₂, 0.1035 g H₂O. — 0.1625 g Sbst.: 22.4 ccm N (21°, 755 mm). — 0.1384 g Sbst.: 19.0 ccm N (21°, 757 mm). — 0.0930 g Sbst.: 13.2 ccm N (19°, 744 mm).

C₃₆H₂₅N₇O₃. Ber. C 71.61, H 4.18, N 16.25.
Gef. » 71.81, 71.65, 71.74, » 4.20, 3.92, 4.09, » 15.71, 15.88, 16.18.

Durch Erwärmen mit *p*-Phenylendiamin geht die Substanz in *p*-Aminophenyl-imesatin über.

127. P. Pfeiffer und Fr. Wittka¹⁾: Über das Aussalzen der Aminosäuren und die Trennung von Aminosäuren mit Hilfe von Neutralsalzen.

(Eingegangen am 26. Mai 1915.)

In zwei vor kurzem erschienenen Arbeiten²⁾ wurde mitgeteilt, daß einfache Aminosäuren und auch Polypeptide die Eigenschaft haben, Alkali- und Erdalkalisalze zu gut charakterisierten Verbindungen zu addieren, eine Tatsache, die von Wichtigkeit für das Verständnis des Verhaltens der Eiweißkörper gegen Neutralsalze ist. Auf

¹⁾ Vorversuche zu dieser Arbeit sind von Hrn. J. v. Modolski durchgeführt worden.

²⁾ P. Pfeiffer und J. v. Modolski, H. 81, 329 [1912]; 85, 1 [1913].

die Frage nach der Konstitution dieser Additionsprodukte werden wir auf Grund von neuem, experimentellem Material demnächst zurückkommen. An dieser Stelle soll an Hand eines bestimmten Beispiels gezeigt werden, daß man mit Hilfe der Neutralsalzverbindungen Aminosäuren weitgehend von einander trennen kann.

In der ersten Mitteilung wurde schon erwähnt, daß Neutralsalze die Löslichkeit von Aminosäuren ganz erheblich beeinflussen. Es kommen sowohl Löslichkeitserhöhungen vor, die im wesentlichen auf die Bildung von in Lösung befindlichen Neutralsalzverbindungen zurückzuführen sind, wie auch Löslichkeitserniedrigungen. Neuere Versuche haben nun ergeben, daß diese Löslichkeitserniedrigungen in bestimmten Fällen unerwartet groß sind, so daß sich gewisse Aminosäuren ähnlich den Eiweißkörpern weitgehend aussalzen lassen. Einige Daten hierüber haben wir im Folgenden zusammengestellt. Indem sich nun die einzelnen Aminosäuren in Bezug auf ihre Aussalzbarkeit stark von einander unterscheiden, bietet sich die Möglichkeit, ein weiteres Trennungsverfahren für diese Verbindungen auszuarbeiten. In dieser Richtung angestellte Versuche hatten guten Erfolg.

I. Über das Aussalzen der Aminosäuren.

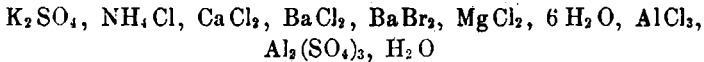
Die Fällungsversuche wurden mit gesättigten Lösungen von Glykokoll, Alanin, Leucin, Phenylalanin, Tyrosin und Asparaginsäure angestellt. Als fällende Salze, die in einer solchen Menge angewandt wurden, daß auch an ihnen Sättigung herrschte, dienten Chloride, Bromide, Sulfate der Alkali-, Erdalkali- und Ammoniumreihe, außerdem Aluminiumchlorid, Aluminiumsulfat, Kalium- und Natriumacetat und Kaliumoxalat. Die ausgefällten Aminosäuren wurden jedesmal abgesaugt, auf Ton getrocknet und gewogen; dann wurde das mitgerissene Salz analytisch bestimmt und in Abzug gebracht.

Die wichtigsten Ergebnisse sind folgende: Glykokoll, Tyrosin und Asparaginsäure werden durch Salze nicht gefällt; Alanin wird aus seiner gesättigten, wäßrigen Lösung nur durch Ammoniumsulfat ausgesalzen und zwar zu etwa 19%. Gegen die übrigen angewandten Salze verhält sich die Alaninlösung indifferent.

Weitgehend ausgesalzen werden aber *d,l*-Leucin und *d,l*-Phenylalanin. Wir haben die erhaltenen Resultate in einer kleinen Tabelle zusammengestellt; die angegebenen Prozentzahlen an ausgefällter Aminosäure beziehen sich auf Zimmertemperatur; sie haben nur orientierenden Charakter, machen also auf absolute Genauigkeit keinen Anspruch.

	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NaCl	KCl	Na_2SO_4	$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{CH}_3 \cdot \text{COONa}$	$\text{CH}_3 \cdot \text{COOK}$	$\text{C}_2\text{O}_4\text{K}_2$
Leucin	78.2	60.8	48.9	34.3	31.9	31.4	13.6	39.2
Phenylalanin . .	80.8	57.4	38.4	31.4	66.4	36.9	25.8	67.0

Wir sehen, daß vor allem Ammoniumsulfat, bekanntlich eins der besten Fällungsmittel der Eiweißkörper, unsere Aminosäuren Leucin und Phenylalanin weitgehend, zu rund 80 %, aussalzt; aber auch Kochsalz, Chlorkalium, Kaliumoxalat, Magnesiumsulfat, Natriumsulfat, Natriumacetat und Kaliumacetat üben eine stark ausfällende Wirkung aus, wobei noch besonders betont sei, daß sich die Aminosäuren nicht etwa verbunden mit dem betreffenden Salz, sondern in freiem Zustand in kristallisierter Form abscheiden. Mit den Salzen:



gibt Phenylalanin keine Niederschläge.

Durch den hiermit erbrachten Nachweis der weitgehenden Fällbarkeit einfacher Aminosäuren durch Neutralsalze wird der Aminosäurecharakter der Eiweißsubstanzen von neuem bestätigt. Auch zeigen unsere Versuche, daß man die Eigenschaft der Proteine und Albumosen, ausgesalzen zu werden, nun nicht mehr herbeiziehen darf, um die hochmolekulare Natur dieser Verbindungen zu beweisen.

Die Aussalzbarekeit der Eiweißkörper kann auch nicht mehr als ein besonderes Kriterium der kolloidalen Natur der Eiweißlösungen betrachtet werden. Prinzipiell sind Lösungen von Aminosäuren ganz allgemein ausfällbar, seien sie nun »echte« oder »kolloidale«. Die nahe Verwandtschaft von echten Lösungen und Emulsoiden, zu welchen letzteren ja die Eiweißlösungen gehören, erfährt so eine neue Beleuchtung.

II. Trennung von Aminosäuren nach der Aussalz-Methode.

Es seien hier zunächst einige Versuche mitgeteilt, die sich auf die Trennung von Glykokoll und Phenylalanin beziehen. Nach den obigen Angaben wird Glykokoll durch Ammoniumsulfat nicht ausgesalzen, während Phenylalanin aus seiner konzentrierten, wäßrigen Lösung durch dieses Reagens zu etwa 81 % ausgefällt wird. Versuche mit einer Lösung, die sowohl Glykokoll wie Phenylalanin enthielt, gaben nachstehendes Resultat:

Zu 70 ccm einer an Phenylalanin gesättigten Lösung, die etwa 0.976 g Phenylalanin enthielt, wurden 2 g Glykokoll, dann 49 g Ammoniumsulfat gegeben. Das Ganze wurde über Nacht stehen gelassen; der krystallinische Niederschlag wurde scharf abgesaugt, auf Ton, dann bei 90° getrocknet und gewogen. Er enthielt außer etwas beigemengtem Ammoniumsulfat 0.8161 g Aminosäuren; das würde, falls nur Phenylalanin ausgefallen wäre, einer Ausbeute an dieser Säure von 83.6 % entsprechen. Der Niederschlag wurde nun, um zu beweisen, daß in der Tat nur geringe Mengen Glykokoll beigemischt waren, mit Kupfersulfat und einer Baryhydratlösung gekocht; dann wurde die entstandene blaue Lösung der freiwilligen Krystallisation überlassen. Angewandt wurde eine Fällung mit 0.7518 g Aminosäuregehalt.

Die erste Fraktion bestand (nach dem Trocknen bei 100°) aus 0.5877 g reinem, krystallisiertem Phenylalanin-kupfer; sie wurde zur Analyse mit wenig Wasser gewaschen und dann bei 100° getrocknet.

0.1279 g der getrockneten Sbst.: 0.0206 g Cu.

Ber. Cu 16.25. Gef. Cu 16.10.

Die zweite Fraktion bildete ein blaues Krystallmehl (0.1409 g lufttrocknes Produkt), zu dem bei weiterer Krystallisation noch 0.0228 g einer letzten Fraktion kamen. Ein Teil der zweiten Fraktion, welche etwas Ammoniumsalz enthielt, wurde aus heißem Wasser umkrystallisiert. Die abgeschiedenen Krystalle hatten für Phenylalanin-kupfer einen etwas zu hohen Kupfergehalt.

0.0305 g wasserfreie Sbst.: 0.0055 g = 18.03 % Cu.

Da aber Glykokollkupfer 30.06 % Cu enthält, so bestanden auch diese Krystalle im wesentlichen aus Phenylalaninkupfer.

Zusammenfassend sieht man also, daß beim Versetzen einer wäßrigen Lösung von Phenylalanin und Glykokoll mit Ammoniumsulfat in der Hauptsache Phenylalanin ausfällt, dem nur wenig Glykokoll beigemischt ist. Durch Behandeln der Fällung mit Kupferhydroxyd gewinnt man sofort reines Phenylalanin-kupfer.

Ebenso günstig verliefen die Versuche zur Trennung von *l*-Leucin und Glykokoll. Das angewandte *l*-Leucin zeigte eine spezifische Drehung von -4.0° ; in stark salzsäurehaltiger Lösung (in 10 ccm derselben befanden sich 0.1020 g Sbst. und 1 ccm konzentrierter, wäßriger Salzsäure) betrug die spezifische Drehung $+8.2^\circ$.

10 ccm einer Lösung von 0.097 g *l*-Leucin und 0.1 g Glykokoll wurden mit 7 g Ammoniumsulfat gefällt. Der Niederschlag wurde abgesaugt und auf Ton getrocknet. Die Fällung enthielt neben Ammoniumsulfat 0.0588 g Aminosäure; sie gab in stark salzsäurehaltiger, wäßriger Lösung (siehe oben) einen Drehungswert von $+0.050^\circ$, so daß die spezifische Drehung $+8.5^\circ$ betrug.

Die ausgefällte Aminosäure bestand also aus fast reinem Leucin; die Ausbeute betrug 60.5 %.

Der Versuch wurde mit 0.097 g *l*-Leucin, 0.2 g Glykokoll, 7 g Ammoniumsulfat und obiger Wassermenge wiederholt. Das Gewicht des Niederschlages betrug nach Abzug des beigemengten Ammoniumsulfats 0.0575 g; er gab in stark salzsaurer Lösung eine spezifische Drehung von + 7.8°.

Auch in diesem Fall war fast reines Leucin ausgefällt worden; die Ausbeute war 59.2 %.

Durch besondere Versuche wurde noch festgestellt, daß aus einer Glykokoll-freien wäßrigen Lösung von 0.097 g *l*-Leucin durch Ammoniumsulfat rund 61 % der Aminosäure ausgefällt werden, in guter Übereinstimmung mit den bei den obigen Trennungsvorsuchen erhaltenen Ausbeutezahlen.

III. Trennung von Aminosäuren mit Hilfe der Neutralsalz-Verbindungen.

Als spezielles Beispiel wurde die Trennung von Glykokoll und *d*-Alanin ausgearbeitet.

Von der Tatsache ausgehend, daß die Aminosäuren speziell mit Chlorcalcium gut charakterisierte Verbindungen geben — Verbindungen des Glykokolls und *d, l*-Alanins mit Chlorcalcium sind schon in reinem Zustand isoliert worden — wurde versucht, eine Trennung von Glykokoll und *d*-Alanin bei Gegenwart von Chlorcalcium durchzuführen. Während nun die CaCl_2 -Verbindungen der beiden Aminosäuren ebenso wie die freien Säuren selbst leicht löslich in Wasser sind, zeigen sie große Löslichkeitsunterschiede gegen wäßrigen Alkohol. Hierüber zunächst einige Daten:

1. 0.5 g Glykokoll und 10 g $\text{CaCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ wurden in 8 ccm Wasser gelöst; dann wurden 120 ccm absoluten Alkohols hinzugegeben. Im Eisschrank im verschlossenen Gefäß schieden sich in Form farbloser Nadeln 0.87 g einer Glykokoll-Chlorcalciumverbindung ab. Da sich unter diesen Bedingungen, wie zahlreiche Versuche gezeigt haben, ein Hydrat des Diglykokoll-Chlorcalciums bildet, da ferner der lufttrockne Niederschlag 23.18 % Wasser enthielt, so sind 76.9 % des aufgelösten Glykokolls zur Abscheidung gelangt.

2. 0.5 g *d*-Alanin und 10 g $\text{CaCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ wurden in 8 ccm Wasser gelöst und wiederum 120 ccm absoluten Alkohols hinzugegeben. Auch nach tagelangem Stehen im Eisschrank fand keine Abscheidung von Krystallen statt.

Daß dieser Unterschied im Verhalten von Glykokoll und *d*-Alanin mit der Existenz verschiedener löslicher Calciumchlorid-Verbindungen zusammenhängt, beweisen sehr schön die folgenden beiden Versuche, nach denen ohne Zusatz von Calciumchlorid sowohl Glykokoll wie *d*-Alanin aus ihren wäßrigen Lösungen durch Alkohol weitgehend ausgefällt werden.

3. 0.5 g Glykokoll wurden in 8 ccm Wasser gelöst; dann wurden 120 ccm absoluten Alkohols hinzugegeben. Im Eisschrank schieden sich 0.46 g Glykokoll, also 92 %, in körnigen Krystallen aus.

4. 0.5 g *d*-Alanin wurden in 8 ccm Wasser gelöst; dann wurden 120 ccm absoluten Alkohols hinzugefügt. In Eisschrank Abscheidung von 0.41 g = 82 % krystallisiertem *d*-Alanin.

Nach diesen Vorversuchen schien eine Trennung von Glykokoll und *d*-Alanin mit Chlorcalcium bei Gegenwart von Alkohol möglich zu sein.

a) Trennung von Glykokoll und *d*-Alanin.

Von den zahlreichen Trennungsversuchen seien hier nur einige wenige besonders charakteristische angeführt.

1. 0.5 g Glykokoll, 0.5 g *d*-Alanin und 10 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ wurden in 8 ccm Wasser gelöst; dann wurden 120 ccm absoluten Alkohols hinzugegeben. Die im Eisschrank im verschlossenen Gefäß abgeschiedenen Krystalle wurden scharf abgesaugt und auf Ton getrocknet.

Die Ausbeute an Krystallen betrug 0.9700 g; sie besaßen (Trocknen bei 130°) 25.08 % Wasser. 0.1882 g der wasserfreien Substanz gaben 0.2055 g Silberchlorid; die wasserfreien Krystalle enthielten also 27.01 % Chlor.

Da nun $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{NH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$ einen Chlor-Gehalt von 27.17 % besitzt, so bestanden die mit Alkohol gefällten Krystalle aus fast reinem Di-glykokoll-Chlorcalcium; die Ausbeute an Glykokoll berechnet sich zu 84.2 %.

Ein Kontrollversuch gab eine Ausbeute an Krystallen von 0.8891 g; sie besaßen einen Wassergehalt von 23.40 %. 0.2156 g der wasserfreien Substanz gaben 0.2363 g Silberchlorid. Der Chlor-Gehalt der wasserfreien Substanz betrug also diesmal 27.12 %; die Ausbeute an Glykokoll war 78.3 %.

Daß bei der gewählten Versuchsanordnung in der Tat fast das gesamte *d*-Alanin in Lösung bleibt, zeigt der nächste Versuch.

2. Der neue Versuch wurde wie die vorhergehenden durchgeführt. Die Ausbeute an Krystallen war 0.9408 g; ihr Wassergehalt betrug 24.43 %. Die Mutterlauge wurde diesmal polarisiert; sie wurde zunächst weitgehend eingedampft, dann wurden 5 ccm konzentrierter Salzsäure zugegeben, das Ganze mit Wasser auf 25 ccm aufgefüllt und der Drehungswert bestimmt. Aus dem gefundenen Drehungswinkel berechnet sich, unter der Annahme, daß alles *d*-Alanin in der Lösung geblieben ist, ein spezifischer Drehungswert von $[\alpha]_D = +13.5^\circ$. Da die spezifische Drehung unseres *d*-Alanins unter den angewandten Bedingungen $+14.0^\circ$ betrug, so zeigt uns auch dieses Versuchsergebnis, daß *d*-Alanin und Glykokoll mit Hilfe von Chlorcalcium in einer einzigen Operation weitgehend von einander getrennt werden können.

Die Ausbeute an Glykokoll (in Form der Calciumchlorid-Verbindung) betrug 81.7 %.

Ein Kontrollversuch gab eine Ausbeute an Glykokoll von 77.2 % (0.7988 g Niederschlag mit einem Wasser-Gehalt von 15.97 %), die Mutterlauge zeigte diesmal $[\alpha]_D = +14.0^\circ$; *d*-Alanin war also geradezu quantitativ in Lösung geblieben.

Auf analoge Weise lassen sich auch Glykokoll und inaktives Alanin leicht von einander trennen; die Beleganalysen sollen hier nicht mitgeteilt werden.

b) Isolierung der Aminosäuren.

Zur Isolierung des Glykokolls wurde 1 g der aus der Calciumchlorid-haltigen wäßrigen Lösung von Glykokoll und Alanin mit Alkohol abgeschiedenen Verbindung $\text{CaCl}_2, 2 \text{NH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$ in wenig Wasser gelöst; dann wurde die Lösung mit 1.5 g Silberoxyd¹⁾ kräftig durchgeschüttelt. Der Niederschlag von Silberchlorid wurde abfiltriert und das chlorfreie Filtrat mit Schwefelwasserstoff gefällt. Dann wurde der überschüssige Schwefelwasserstoff durch Kochen der Lösung vertrieben und letztere mit einem Überschuß von Ammoniak und Ammoniumcarbonat versetzt und 24 Stunden stehen gelassen. Es bildete sich ein Niederschlag von Calciumcarbonat, dessen Filtrat auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft wurde; der Rückstand war fast aschefrei. Die wäßrige Lösung des Rückstandes wurde mit überschüssigem Kupferhydroxyd gekocht und filtriert. Das Filtrat gab beim Eindampfen schöne blaue Nadeln. Die erste, zweite und dritte Krystallfraktion besaßen Kupferwerte, die gut auf die Formel $\text{Cu}(\text{O} \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NH}_2)_2, \text{H}_2\text{O}$ stimmten; die letzte Fraktion hatte einen etwas zu hohen Kupfergehalt. Die Gesamtausbeute an Kupferglykokoll betrug 0.659 g statt der berechneten Menge 0.691 g.

1. Krystallisation 0.265 g. 0.1321 g Sbst. gaben bei 100° 0.0101 g H_2O . — 0.1319 g Sbst.: 0.0459 g CuO .

2. Krystallisation 0.212 g. 0.1169 g Sbst.: 0.0408 g CuO .

3. Krystallisation 0.091 g. 0.0907 g Sbst.: 0.0314 g CuO .

4. Krystallisation 0.091 g. 0.0911 g Sbst.: 0.0326 g CuO .

Ber. Cu 27.70, H_2O 7.84.

Gef. » 1. 27.81, 2. 27.88, 3. 27.66, 4. 28.59, • 7.65.

Die Mutterlauge der $\text{CaCl}_2, 2 \text{NH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$ -Krystalle mußte nach obigem alles *d*-Alanin und etwa 20 % des Glykokolls enthalten. Zur Isolierung des Gemisches der beiden Aminosäuren in Form ihrer Kupferverbindungen wurde die Flüssigkeit weitgehend eingedampft (zur Verjagung des Alkohols) und dann so aufgearbeitet wie oben für

¹⁾ Man kann auch Bleioxyd anwenden.

die Isolierung des Glykokolls aus der Calciumchlorid-Verbindung angegeben worden ist.

Die erhaltenen blauen blättrigen Krystalle erwiesen sich bei der Analyse in der Tat als ein Gemisch von Glykokollkupfer und Alaninkupfer mit weit überwiegendem Alaningehalt; Verhältnis der Komponenten etwa 1 : 4 bis 1 : 5.

Zum Schluß sei noch darauf hingewiesen, daß Kupferglykokoll mit Chlorcalcium eine schön krystallisierte tiefblaue Molekülverbindung der Formel $\text{CaCl}_2, (\text{NH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COO})_2 \text{Cu}, 3 \text{H}_2\text{O}$ gibt, die in Wasser sehr leicht löslich ist. Die Existenz dieser Verbindung macht es unmöglich, aus einer Calciumchlorid-haltigen Lösung von Glykokoll direkt durch Kochen mit Kupferhydroxyd Glykokollkupfer zur Abscheidung zu bringen; man muß zunächst — wie es oben geschehen ist — das Chlorcalcium aus der Lösung entfernen.

Zürich, Chemisches Universitätslaboratorium, im Mai 1915.

128. P. Pfeiffer: Reaktionsunterschiede stereoisomerer Äthylenhalogenide II.

[Nach Versuchen von K. v. Swidzinski.]

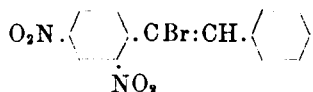
(Eingegangen am 26. Mai 1915.)

In der ersten Mitteilung über diesen Gegenstand¹⁾ habe ich nähere Angaben über das Verhalten der stereoisomeren Stilbenbromide, $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CHBr} \cdot \text{CHBr} \cdot \text{C}_6\text{H}_5$ und der stereoisomeren *o,p*-Dinitrostilbenbromide,

$\text{O}_2\text{N} \cdot \left\langle \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \right\rangle \cdot \text{CHBr} \cdot \text{CHBr} \cdot \left\langle \begin{array}{c} \diagdown \quad \diagup \\ \diagup \quad \diagdown \end{array} \right\rangle$ gegen Pyridin gemacht.

NO_2

Ich konnte zeigen, daß bei diesen beiden Verbindungsparen die höher schmelzenden (α -)Bromide beim Erwärmen mit Pyridin in der Hauptsache Brom abgeben, indem so Stilben resp. Dinitrostilben zurückgebildet wird, während die niedriger schmelzenden Formen, die β -Bromide, mit Pyridin normalerweise Bromwasserstoff verlieren, so daß die Monobromkörper $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CBr} : \text{CH} \cdot \text{C}_6\text{H}_5$ und



entstehen. Solch starke Reaktionsunterschiede asymmetrisomerer Verbindungen waren bisher kaum beobachtet worden.

¹⁾ B. 45, 1810 [1912].