

5. Verhalten der Hefe-Dipeptidase gegenüber acylierten Peptiden.  
(Nach Versuchen mit F. Waldschmidt-Leitz und W. Klein.)

Trotz der Anwendung großer Enzym-Mengen und langer Spaltungszeiten ergab sich bei keinem der neugeprüften Substrate ein sicher außerhalb der Fehlergrenze gelegener Aciditäts-Zuwachs. Dagegen ist die früher mitgeteilte<sup>35)</sup> Beobachtung zu bestätigen, wonach Acetyl-[phenyl-alanyl]-alanin von Hefe-Dipeptidase-Präparaten, wenngleich sehr langsam, hydrolysiert wird.

Tabelle 9.

Einwirkung der Hefe-Dipeptidase auf acylierte Peptide.

(Die Titrationsprobe von 10 ccm enthält 1 Dip.-Einh.;  $p_H = 7.8$ ; 18 Stdn. bei 30°; Titration mit  $n'_{20}$ -KOH.)

Substrat	angew. g	Spaltung	
		ccm $n'_{20}$ -KOH	%
Benzoyl-glycyl-glycin .....	0.128	0.00	0
Glycyl-glycin-carbonsäure .....	0.1030	0.10	2
Carbäthoxyl-glycyl- <i>d,l</i> -leucin .....	0.0901	0.09	3
Naphthalinsulfonyl-glycyl-tyrosin .....	0.0839	0.04	3
Acetyl-[phenyl-alanyl]-alanin .....	0.1290	0.23	6
Benzoyl-diglycyl-glycin .....	0.147	0.00	0

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danken wir ergebenst für die Förderung unserer Arbeit durch die zur Verfügung gestellten Mittel.

### 105. H. Gall und G. Lehmann: Über Oxydation von Alkalicyaniden durch Permanganat.

[Aus d. Anorgan. Laborat. d. Techn. Hochschule München.]  
(Eingegangen am 13. Juli 1927.)

Nachdem Baudrimont<sup>1)</sup> bei der Oxydation von Cyaniden durch Permanganat sowohl in alkalischem wie saurem Medium eine ganze Reihe von Reaktionsprodukten beobachtet hatte, war es Volhard<sup>2)</sup> gelungen, indirekt Kaliumcyanat als Hauptprodukt der Reaktion festzustellen, in dem das intermediär entstehende Cyanat durch Ammoniumsulfat in Harnstoff übergeführt und in dieser Form isoliert wurde. Auf diesem Wege lassen sich 68% des angewandten Cyanids als Harnstoff gewinnen. Messungen des Permanganat-Verbrauchs bei dieser Oxydation des Cyanids sind aus den Angaben Volhards nicht zu ersehen, weshalb wir zunächst annähernd den Verbrauch an Permanganat bei der Oxydation des Cyanids festgestellt haben. In stark alkalischem Medium entspricht der Permanganat-Verbrauch, bezogen auf die angewandte Menge Cyanid, ungefähr 2 Äquivalenten Sauerstoff. Die Oxydation erfordert jedoch mehrere Stunden und ist mit umfangreichen Nebenreaktionen verknüpft, so daß diese direkte Oxydation in analytischer Hinsicht vollkommen ausscheidet. Wir versuchten deshalb,

<sup>1)</sup> Baudrimont, Compt. rend. Acad. Sciences 89, 1115.

<sup>2)</sup> Volhard, A. 259, 377.

durch Zugabe von Katalysatoren eine Beschleunigung des Oxydations-Vorganges zu erzielen. Sobald man der Lösung, die Kaliumcyanid, Kalilauge und Kaliumpermanganat enthält, Kupfersulfat zusetzt, ist nach einigen Minuten beim Erwärmen auf 60° ein Verbrauch von zwei Äquivalenten Sauerstoff auf ein Mol. angewandtes Cyanid zu beobachten.

Da bei verschiedenen Varianten wechselnde Ergebnisse zu beobachten waren, haben wir zunächst den Einfluß der verschiedenen Komponenten auf die Geschwindigkeit der Reaktion festgestellt. Zu diesem Zweck haben wir mehrere Versuchsreihen durchgeführt, bei denen stets nur eine Bedingung variiert wurde, während die übrigen konstant gehalten wurden. Bei sämtlichen Versuchen wandten wir eine ca. 0.1-n. Kaliumcyanid-Lösung an, deren Gehalt an Cyan-Ion argentometrisch nach Liebig<sup>3)</sup> und teilweise bromometrisch nach F. Oberhauser<sup>4)</sup> bestimmt war.

Eine Versuchsreihe über die Wirkung der Laugen-Konzentration hatte ergeben, daß sie in weiten Grenzen variiert werden kann, ohne daß eine Änderung der Reaktions-Geschwindigkeit zu beobachten gewesen wäre. Nur bei Anwendung sehr geringer Laugen-Mengen traten Unregelmäßigkeiten auf, die in einem Überschreiten des theoretischen Permanganat-Verbrauchs bestanden.

Eine besondere Bedeutung war natürlich dem Einfluß der jeweils zugesetzten Kupfer-Mengen zuzuschreiben, da wir gefunden hatten, daß durch Zusatz von Kupfersalz eine außerordentlich große Beschleunigung der Reaktion zu beobachten war. Bei dieser Versuchsreihe wurden die Konzentration von Kaliumpermanganat, Kaliumcyanid und Kalilauge, sowie die Temperatur und Zeitdauer konstant gehalten, während die angewandte Kupfersulfat-Menge variiert wurde.

Um reproduzierbare Werte zu erhalten, benutzten wir folgende Arbeitsweise: Die Cyanid-Lösung von konstantem bekannten Gehalt versetzt man mit 20 ccm 28.1-proz. Kalilauge. Davon getrennt werden 70 ccm 0.1-n. Kaliumpermanganat und die jeweilige Kupfersulfat-Menge in einem Thermostaten auf 50.0° bis zur Einstellung des Temperatur-Gleichgewichts erwärmt. Durch Zugabe von Wasser wird das Volumen während der Versuchsreihe auf 110 ccm konstant gehalten. Man vermischt dann die auf 50° erwärmten Lösungen möglichst rasch und läßt 5 Min. unter kräftigem Rühren bei 50.0° im Thermostaten reagieren. Die Reaktion wird leicht durch Eingießen in überschüssige Oxalsäure, die auf 60° erwärmt und mit Schwefelsäure angesäuert ist, abgebrochen.

Angewandt wurden 0.0651 g KCN, entspr. einer Konzentrat. von 0.00909 Mol. KCN.

### Einfluß der Katalysator-Menge.

Zeit 5 Min., Temp. 50.0°.

Gef. g KCN(O)	Angew. g CuO	Konzentration	
		Mol. CuO	Mol. KCN(O)
0.0811	0.0286	0.0033	0.00909
0.0807	0.0143	0.0016	0.00904
0.0766	0.0072	0.00081	0.00858
0.0737	0.0057	0.00065	0.00826
0.0721	0.0043	0.00049	0.00807
0.0661	0.0014	0.00016	0.00750
0.0588	—	—	0.00658

<sup>3)</sup> Liebig, A. **77**, 102.

<sup>4)</sup> F. Oberhauser, Ztschr. anorgan. Chem. **144**, 257 [1925].

Aus dieser Versuchsreihe geht demnach hervor, daß sich die zugesetzte Menge Kupfersalz unter den gegebenen Bedingungen bis auf ein Minimum von 0.0143 g Kupferoxyd herabdrücken läßt. Die Reaktion wird jedoch innerhalb der gegebenen Zeit von 5 Min. unvollständig, sobald weniger als 0.0143 g Kupferoxyd zur Anwendung kommen.

Wie man aus der untersten Reihe der Tabelle erkennen kann, bleibt die Cyanat-Konzentration, die man ohne Zusatz von Kupfersulfat nach 5 Min. beobachtet, noch beträchtlich unterhalb der Grenze, die sogar mit der sehr geringen Kupfer-Konzentration von 0.00016 Mol.  $\text{CuO}$  erreicht wird. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse haben sich folgende zwei Arbeitsweisen für die oxydimetrische Bestimmung von Alkalicyaniden ergeben. Die eine Methode beruht auf der Oxydation des Cyanids in der Wärme bei 60°, während bei der anderen die Oxydation sich in der Kälte vollzieht. Die Titration in der Wärme ist vorteilhafter.

Titration in der Wärme: Zur Lösung des Cyanids gibt man 20 ccm einer ca. 30-proz. Kalilauge und 20 ccm einer 5-proz. Kupfersulfat-Lösung, wobei die hier angegebene Reihenfolge einzuhalten ist. Nach Zusatz von Permanganat erwärmt man 5 Min. auf 60°. Das überschüssige unverbrauchte Permanganat wird mit Oxalsäure zurücktitriert. Es ist vorteilhaft, die gleiche Menge Oxalsäure, die der gesamten Menge des angewandten Permanganats entspricht, anzuwenden. Die Oxalsäure wird vor der Zugabe mit 100 ccm 10-proz. Schwefelsäure angesäuert und auf 70° erwärmt.

Bei dieser Methode ist zu beachten, daß nach Zugabe des Permanganats die Lösung sowohl in der Kälte, wie in der Wärme die rein grüne Farbe des Manganats zeigen muß. Verschwindet die Manganat-Farbe beim Erwärmen, ist noch so viel Permanganat nachträglich zuzusetzen, bis sie erhalten bleibt. Andererseits muß man unbedingt vermeiden, daß neben Manganat noch freies Permanganat auftritt. Das Auftreten des Permanganats läßt sich sofort durch das Umschlagen der grünen Farbe in blau erkennen. Ist dieser Umschlag eingetreten, muß die zweite Arbeitsweise, die Titration in der Kälte angewandt werden.

Titration in der Kälte: Zur Cyanid-Lösung gibt man die gleiche Menge Kalilauge und Kupfersulfat wie bei der ersten Methode. Dann setzt man so viel Permanganat zu, bis die Lösung rein blau gefärbt ist. Unmittelbar anschließend wird mit schwefelsaurer Oxalsäure austitriert. Für die durchschnittlich notwendige Zeit ergibt der Leerversuch einen Verbrauch von 0.2 ccm 0.1-n.  $\text{KMnO}_4$ , entspr. 0.00025 g CN. Wenn es notwendig ist, kann dieser geringe Fehler berücksichtigt werden.

An Stelle von Oxalsäure läßt sich bei beiden Methoden schwefelsaure 0.1-n. Ferrosulfat-Lösung verwenden.

Analysen bei 60° (mit Oxalsäure):

Gef. 12.4 ccm 0.1-n.  $\text{KMnO}_4$ , entspr. 0.0161 g CN; ber. 0.0161 g CN. — Gef. 22.5 ccm 0.1-n.  $\text{KMnO}_4$ , entspr. 0.0293 g CN; ber. 0.0286 g CN. — Gef. 40.0 ccm 0.1-n.  $\text{KMnO}_4$ , entspr. 0.0520 g CN; ber. 0.0519 g CN. — Gef. 53.1 ccm 0.1-n.  $\text{KMnO}_4$ , entspr. 0.0691 g; ber. 0.0690 g CN.

Analysen bei 60° (mit Ferrosulfat):

Gef. 4.26 ccm 0.1-n.  $\text{KMnO}_4$ , entspr. 0.0055 g CN; ber. 0.0051 g CN. — Gef. 3.96 ccm 0.1-n.  $\text{KMnO}_4$ , entspr. 0.0052 g CN, ber. 0.0051 g CN. — Gef. 18.37 ccm 0.1-n.  $\text{KMnO}_4$ , entspr. 0.0239 g CN, ber. 0.0249 g CN. — Gef. 14.63 ccm 0.1-n.  $\text{KMnO}_4$ , entspr. 0.0190 g CN; ber. 0.0191 g CN.

Analysen bei Zimmer-Temperatur (mit Ferrosulfat):

Gef. 3.96 ccm 0.1-n.  $\text{KMnO}_4$ , entspr. 0.0052 g CN; ber. 0.0051 g CN. — Gef. 31.0 ccm 0.1-n.  $\text{KMnO}_4$ , entspr. 0.0403 g CN; ber. 0.0408 g CN. — Gef. 39.7 ccm 0.1-n.

$\text{KMnO}_4$ , entspr. 0.0516 g CN, ber. 0.0522 g CN. — Gef. 1.96 ccm 0.1-n.  $\text{KMnO}_4$ , entspr. 0.0026 g CN, ber. 0.0023 g CN.

#### Oxydation von Alkalicyaniden mit Manganat.

Die Oxydation des Cyanids durch Permanganat erfolgt bei einer Konzentration von 0.8 Mol. KOH. Diese Laugen-Konzentration genügt bereits, um die schon lange bekannte Reaktion von Permanganat mit Lauge wenigstens teilweise in Gang zu bringen, wodurch es in Manganat unter Sauerstoff-Entwicklung übergeht. Aus den von uns durchgeführten reaktionskinetischen Messungen ergibt sich, daß bei der Oxydation von Cyanid in primärer Reaktion mit unmeßbarer Geschwindigkeit sofort Manganat entsteht. Qualitativ erkennt man die Bildung des Manganats sehr leicht, wenn man zu einer alkalischen Lösung von Kaliumcyanid und Kupfersulfat 1 ccm  $\text{KMnO}_4$  gibt, die ganze Flüssigkeit färbt sich sofort intensiv grün. Der Leerversuch läßt unter sonst gleichen Bedingungen keine deutlich sichtbare Manganat-Bildung erkennen. Mit dem Ergebnis, daß die primäre Reaktion momentan zu Manganat führt, ergibt sich der Schluß, daß nicht Permanganat, sondern Manganat in alkalischem Medium das stabile Oxydationsmittel darstellt. Ganz allgemein kann man sagen, daß sich eine Oxydation mit Permanganat bei Gegenwart von Lauge nur dann durchführen läßt, wenn das Permanganat sofort in Manganat übergeht. Das Manganat selbst ist nach den Untersuchungen von Holluta<sup>5)</sup> um so beständiger, je höher die Laugen-Konzentration ist, indem der Sauerstoff-Druck des Manganats proportional der vierten Potenz der Hydroxyl-Ionen-Konzentration sinkt. Daraus erklärt sich auch der von uns beobachtete Mehrverbrauch an Permanganat bei niedriger Laugen-Konzentration, indem hier das entstehende Manganat unbeständig ist und unter Sauerstoff-Abgabe weiter zerfällt, wodurch sich ein zu hoher Permanganat-Verbrauch ergibt.

Die Oxydation des Cyanids durch Permanganat führt unmittelbar zu Manganat, das auch bei der erhöhten Temperatur von 60° und der Alkali-Konzentration von 0.8 Mol. vollkommen beständig ist. Wird jedoch so viel Permanganat angewandt, daß die totale Oxydation zu Cyanat nur den Übergang in Manganat erfordert, ist die Möglichkeit gegeben, daß freies Permanganat neben Manganat auftritt. In diesem Falle würde die Lauge einen Fehler bedingen, der sich jedoch, wie in der zweiten Arbeitsvorschrift angegeben ist, durch Arbeiten in der Kälte auf einen belanglosen Betrag reduzieren läßt.

Voraussetzung für eine analytisch brauchbare Permanganat-Oxydation bei Gegenwart von Alkali ist demnach der momentane Übergang des Permanganats in Manganat. In allen solchen Fällen, bei denen diese Reaktion nur sehr langsam stattfindet, tritt Permanganat-Verbrauch durch Einwirkung von Lauge ein. Bei der alkalischen Oxydation von Ruthenium(II)-chlorid haben wir<sup>6)</sup> bereits einen Fall beschrieben, bei dem der Oxydationsvorgang nicht unmittelbar zu Manganat führt. Wir bedienen uns dort eines Kunstgriffes, indem wir als Oxydationsmittel nicht Permanganat, sondern Manganat anwandten. In analoger Weise läßt sich auch Kaliumcyanid durch Manganat bei Gegenwart von Kupfersalz zu Cyanat oxydieren.

<sup>5)</sup> J. Holluta, Ztschr. physikal. Chem. **102**, 32 [1922].

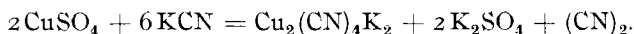
<sup>6)</sup> H. Gall und G. Lehmann, B. **60**, 2491 [1927].

Die Darstellung der Manganat-Lösung geschieht in Anlehnung an die bereits von Jolles<sup>7)</sup> mitgeteilte Methode, auf die von uns schon früher a. a. O. beschriebene Weise.

Die Ausführung der Oxydation gestaltet sich folgendermaßen: Zur Lösung des Cyanids gibt man 20 ccm einer ca. 30-proz. Kalilauge und 20 ccm einer 5-proz. Kupfersulfat-Lösung. Dazu gibt man die Manganat-Lösung und erhitzt auf freier Flamme fast bis zum Sieden. Die grüne Farbe des Manganats muß unter allen Umständen nach Beendigung der Oxydation noch vorhanden sein, anderenfalls ist noch Manganat zuzusetzen. Das Zurückmessen des überschüssigen Manganats geschieht durch Zugabe einer stark sauren 0.1-n.  $\text{FeSO}_4$ -Lösung oder 0.1-n. Oxalsäure.

Gef. 4.1 ccm 0.1-n.  $\text{KMnO}_4$ , entspr. 0.0053 g CN; ber. 0.0051 g CN. — Gef. 8.77 ccm 0.1-n.  $\text{KMnO}_4$ , entspr. 0.0114 g CN; ber. 0.0117 g CN. — Gef. 5.21 ccm 0.1-n.  $\text{KMnO}_4$ , entspr. 0.0067 g CN, ber. 0.0064 g CN. — Gef. 9.67 ccm 0.1-n.  $\text{KMnO}_4$ , entspr. 0.0126 g CN; ber. 0.0127 g CN<sup>8)</sup>.

Nach unserer Ansicht spielt hier das Kupfer-Ion die Rolle eines Katalysators, da einerseits eine beträchtliche Reaktions-Beschleunigung auftritt, andererseits Sauerstoff in keinem stöchiometrischen Verhältnis übertragen wird. Die beschriebene Oxydation von Cyanid zu Cyanat erscheint uns deshalb von Interesse, da der Katalysator mit der zu oxydierenden Substanz eine Zwischenreaktion eingeht. Nach den Untersuchungen von F. P. Treadwell<sup>9)</sup> ist anzunehmen, daß die vorhandenen Kupfer-Ionen mit Kaliumcyanid reagieren unter Bildung von Kupfer(II)-cyanid, das seinerseits unter Abspaltung von Cyan in Kupfer(I)-cyanid übergeht. Das auftretende Cyan verwandelt sich in alkalischem Medium in Cyanid und Cyanat, so daß auf 1 Mol. Cyanat 2 Mol. Kupfer(I)-cyanid entstehen nach folgendem Schema:



Welcher Komplex hierbei auftritt, spielt für diese Betrachtung keine Rolle, so daß die Beobachtung von R. Lang<sup>10)</sup>, der das Auftreten verschiedener Komplexe in Abhängigkeit von der Hydroxyl-Ionen-Konzentration festgestellt hat, ohne Berücksichtigung bleiben kann. Das unter jeder Bedingung auftretende, einwertige komplexe Kupfer-Ion wird dann durch Permanganat neuerdings zu zweiwertigen Kupfer oxydiert und so der Katalysator regeneriert. Wir halten dies für einen typischen Fall, bei dem der Katalysator unter Eingehen bekannter Zwischenreaktionen wieder vollkommen unverändert aus der Reaktion hervorgeht. Die Katalyse selbst erfolgt durch einen raschen Valenzwechsel des Katalysators.

#### Darstellung von Kaliumcyanat.

Sobald zu präparativen Zwecken größere Mengen Cyanid durch Permanganat allein oxydiert werden sollen, sind außerordentlich lange Reaktionszeiten notwendig. Die Darstellung von Cyanat gelingt jedoch unter Zusatz von Kupfersulfat. Da Kaliumcyanat sehr leicht der Hydrolyse unterliegt, mußten sämtliche Faktoren, die diesen Vorgang beschleunigen, ausgeschaltet werden.

<sup>7)</sup> Jolles, Ztschr. analyt. Chemie **28**, 238.

<sup>8)</sup> Die Werte bei der Oxydation mit Manganat sind ungerechnet auf 0.1-n  $\text{KMnO}_4$ .

<sup>9)</sup> F. P. Treadwell, Ztschr. anorgan. Chem. **38**, 92.

<sup>10)</sup> R. Lang, Ztschr. anorgan. Chem. **130**, 151.

Zu 5 g Kaliumcyanid und 5 g Kaliumhydroxyd, die beide in möglichst wenig Wasser gelöst waren, wurde Kupferhydroxyd gegeben, das durch Fällen von 10 g kryst. Kupfersulfat mit Kaliumhydroxyd erhalten und bis zur Sulfat-Freiheit ausgewaschen war. Das sorgfältige Auswaschen ist notwendig, da sonst das Kaliumcyanat durch Kaliumsulfat verunreinigt ist. Zu der mit Kupferhydroxyd versetzten Lösung wurden 8 g Kaliumpermanganat gegeben, das in möglichst wenig Wasser gelöst war. Das ganze Reaktionsgemisch erhitzte man 2 Stdn. auf 60°. Das nun noch vorhandene überschüssige Permanganat wurde durch langsamen Zusatz von Wasserstoffsperoxyd vollkommen zerstört. Durch Abfiltrieren des ausgefallenen Braunsteins, in dem keine Spur von Cyanid mehr nachweisbar war, erhält man eine vollkommen klare Lösung. Das Filtrat wurde vorsichtig eingeeengt und die Lösung durch eine Eis-Kochsalz-Mischung gekühlt, wodurch nach kurzer Zeit Kaliumcyanat auskristallisierte. Das Rohprodukt wurde schließlich noch nach den Angaben von H. Erdmann<sup>11)</sup> aus 80-proz. Äthylalkohol, der 10% Methylalkohol enthielt, umkristallisiert.

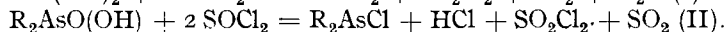
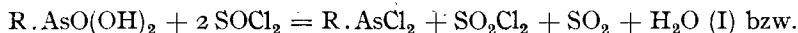
Die Ausbeute an Rohprodukt betrug 6 g, nach dem Umkristallisieren erhielten wir 5 g reines KCNO. Zur Identifizierung zogen wir einerseits die von Blomstrand<sup>12)</sup> angegebene Reaktion von Cyanat mit Kobaltacetat heran, wobei sich die Lösung unter Bildung von  $K_2[Co(NCO)_4]$  lasurblau färbt. Andererseits benutzten wir die von E. A. Werner<sup>13)</sup> empfohlene Reaktion mit Pyridin und Kupfersulfat, wobei ein Kupfer-pyridin-cyanat von der Formel  $Cu(C_5H_5N)_2(CNO)_2$  entsteht, das in Chloroform mit blauer Farbe löslich ist. Damit ist erwiesen, daß als Endprodukt der Oxydation von Cyanid mit Permanganat bei Gegenwart von Kupfer-Ion Kaliumcyanat auftritt.

### 106. Wilhelm Steinkopf und Siegfried Schmidt: Zur Kenntnis organischer Arsenverbindungen, XI.<sup>1)</sup>: Über die Einwirkung von Thionylchlorid auf primäre und sekundäre Arsinsäuren.

[Aus d. Institut für organ. Chemie d. Techn. Hochschule Dresden.]

(Eingegangen am 21. Februar 1928.)

Es interessierte uns die Frage, ob primäre und sekundäre Chlorarsine der Form  $R \cdot AsCl_2$  und  $R_2AsCl$ , die bisher meist aus primären und sekundären Arsinsäuren durch Reduktion mit schwefliger Säure bei Gegenwart von Salzsäure und etwas Jod hergestellt wurden, sich auch analog den Carbonsäurechloriden mit Thionylchlorid gewinnen ließen, wobei allerdings das Thionylchlorid das 5-wertige Arsen gleichzeitig zu 3-wertigem reduzieren mußte. Die Reaktionen sollten so verlaufen:



Zur Verwendung kamen Phenyl-, Diphenyl- und 1-Anthrachinonyl-arsinsäure. Es ergab sich, daß Phenyl-arsinsäure in der Tat etwa zur Hälfte im Sinne der Gleichung I unter Bildung von Phenyl-arsindichlorid mit Thionylchlorid reagiert, daß aber daneben eine zweite Reaktion verläuft,

<sup>11)</sup> H. Erdmann, B. **26**, 2441 [1893].

<sup>12)</sup> Blomstrand, Journ. prakt. Chem. [2] **23**, 206.

<sup>13)</sup> A. Werner, Journ. chem. Soc. London **121**, 2318.

<sup>1)</sup> 10. Mitteilung: B. **59**, 1463 [1926].