

Additionsprodukt aus Urankomplex (II): Die alkohol. Lösungen von 50 mg der Verbindung I und 50 mg Uranylacetat werden bei Wasserbadtemperatur unter Rückfluß 2 Stdn. gekocht. Die dunkelrote Lösung wird dann eingeeengt und stehengelassen. Nach einigen Tagen werden die abgeschiedenen Kristalle abgesaugt, mit Alkohol nachgewaschen; dunkelrote Kristalle. Die Verbindung besitzt keinen scharfen Schmelzpunkt. Ab 234° tritt eine teilweise Zersetzung ein.

$C_{21}H_{18}O_4N_5SU \cdot C_{21}H_{18}O_2N_5S$ (1070.9) Ber. N 13.08 Gef. N 12.76

N-Phenyl-*N'*-phenyl-*C*-[benzthiazolyl-(2)]-formazan (III): Die Darstellung erfolgt analog der Verbindung I durch Kuppelung von 75 mg diazotiertem Anilin mit einer stark alkalisch gemachten methanol. Lösung von 120 mg Benzthiazol-aldehyd-(2)-phenylhydrazon. Aus Alkohol umkristallisiert, rote Kristalle vom Schmp. 185 bis 186° (Zers.); Ausb. 80 mg.

$C_{26}H_{18}N_5S$ (357.4) Ber. C 67.21 H 4.23 Gef. C 67.56 H 3.89

Auf Zusatz von 20-proz. Überchlorsäure zur roten Eisessiglösung scheidet sich das Perchlorat ab; dunkelrote Kristalle vom Schmp. 165–166°.

$C_{20}H_{16}N_5S \cdot HClO_4$ (457.9) Ber. N 15.30 Gef. N 15.43

N-Phenyl-*N'*-phenyl-*C*-[chinolyl-(2)]-formazan (IV): 190 mg diazotiertes Anilin wird mit einer stark alkalisch gemachten methanol. Lösung von 390 mg Chinolin-aldehyd-(2)-phenylhydrazon gekuppelt. Nach 2 Stdn. wird von etwas abgeschiedenem Chinolin-aldehyd-(2)-phenylhydrazon abfiltriert und die klare rote Lösung mit Eisessig angesäuert. Auf Zusatz von Wasser fällt die Formazylverbindung IV aus. Dunkelrote Kristalle; Ausb. 280 mg. Das Perchlorat, dargestellt wie oben, bildet dunkelrote Kristalle vom Schmp. 192–193°.

$C_{22}H_{17}N_5 \cdot HClO_4$ (451.9) Ber. N 15.50 Gef. N 15.57

Additionsprodukt aus IV mit Kobaltchlorid (V): Die alkohol. Lösungen von 50 mg der Verbindung IV und 30 mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ werden auf dem Wasserbad unter Rückfluß kurze Zeit gekocht. Die abgeschiedenen Kristalle werden abgesaugt und mit Alkohol nachgewaschen. Prachtvolle dunkelgrüne Kristalle vom Schmp. 252° (Zers.).

$C_{22}H_{17}N_5 \cdot CoCl_2$ (481.3) Ber. N 14.55 Gef. N 14.79

99. Hans Brockmann und Hans Musso: Hydrolytischer Abbau der Geomycine; Geomycin, III. Mittel.¹⁾ Antibiotica aus Actinomyceten. XXX. Mittel.¹⁾

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen]

(Eingegangen am 31. Januar 1955)

Bei der Säurehydrolyse des Geomycins entstehen neben Ammoniak und Kohlendioxyd zwei basische Abbauprodukte, die als kristallisierte Salze isoliert wurden. Das eine ließ sich als *L*-β-Lysin identifizieren, das andere, Geamin genannt, ist eine Aminosäure $C_6H_{12}O_3N_4$, die offenbar einen Aminoimidazolinring enthält.

Vor kurzem haben wir aus *Streptomyces xanthophaeus*²⁾ das Geomycin, einen basischen, auch gegen gramnegative Bakterien wirksamen Antibiotica-Komplex isoliert, der sich durch Verteilungschromatographie in die Geomycine A, B, C und D zerlegen ließ³⁾. Er liefert ebenso wie seine reinen Kompo-

¹⁾ II. bzw. XXIX. Mittel.; H. Brockmann u. H. Musso, Chem. Ber. 87, 1779 [1954]. ²⁾ W. Lindenbein, Arch. Mikrobiol. 17, 361 [1952].

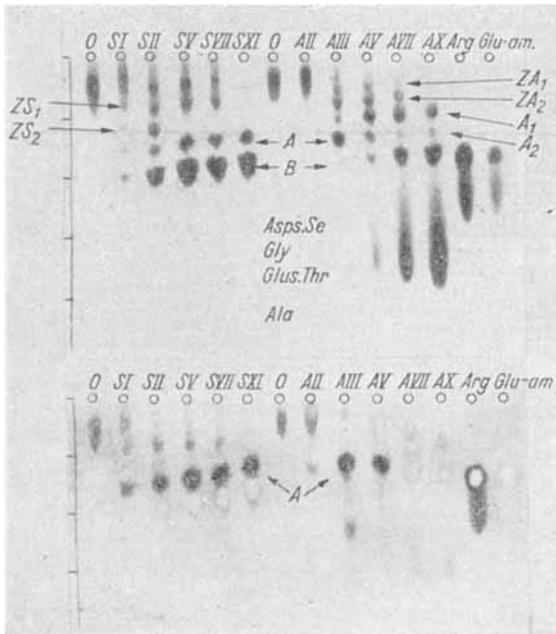
³⁾ H. Brockmann u. H. Musso, Naturwissenschaften 41, 451 [1954]; Chem. Ber. 87, 1779 [1954].

nennten Geomycin A, B, C und D nach längerem Kochen mit 20-proz. Salzsäure Hydrolysate, die dem Papierchromatogramm nach neben Spuren anderer Substanzen nur zwei ninhydrinpositive Abbauprodukte enthalten. Ihre Isolierung und Charakterisierung ist das Ziel der vorliegenden Untersuchung.

I. Die Isolierung der Abbauprodukte

Auch Geomycin-Präparate, die nicht durch fraktionierte Kristallisation des Helianthinsalzes gereinigt sind, zeigen nach Salzsäurehydrolyse im Papierchromatogramm praktisch nur die beiden ninhydrinpositiven Zonen. Um die beiden Abbauprodukte zu isolieren, brauchten wir daher nicht vom reinsten Geomycin auszugehen, dessen Gewinnung mühsam und verlustreich ist, sondern konnten Präparate mittleren Reinheitsgrades verwenden. Nur dadurch war es möglich, ohne allzu großen Aufwand genügend Material für die Abbauprobe bereitzustellen.

Um optimale Hydrolysebedingungen zu finden, haben wir Geomycin zunächst in Vorversuchen mit Säure und Alkali abgebaut und den Reaktionsverlauf papierchromatographisch verfolgt. Abbild. 1 zeigt unter S Chromato-



Abbild. 1. Papierchromatogramme von Geomycin-Hydrolysaten. 0 = Geomycin. S = Säurehydrolysate (6*n*HCl bei 100°): I nach Siedebeginn; II nach 0.5 Stdn.; V nach 3 Stdn.; VII nach 5 Stdn.; XI nach 24 Stdn. A = alkalische Hydrolyse mit 0.34*n*Ba(OH)₂: II nach 18 Stdn. bei 20°; III 0.3 Stdn. bei 100°; V nach 2 Stdn. bei 100°; VII 11 Stdn. 100°; X 35 Stdn. 100°. Arg = Arginin; Glu-am = Glucosamin; A = Geamin; B = β-Lysin. A₁, A₂, A₃ = Spaltprodukte des Geamins; ZS₁, ZS₂, und ZA₁, ZA₂, = Zwischenprodukte der sauren bzw. alkalischen Hydrolyse. System: Butanol-Eisessig-Wasser (2: 1: 1), obere Reihe mit Ninhydrin, untere mit Eisen(III)-cyanid-Nitrosylprussiat besprüht. Die Spuren von Asps, Ser, Gly, Glu, Thr und Ala sind in der Abbild. beim sauren Abbau nicht und beim alkalischen nur teilweise zu erkennen.

gramme, die nach verschieden langem Kochen mit $6n\text{HCl}$ erhalten wurden. Unter diesen Bedingungen war die Hydrolyse nach 24 Stdn. beendet, und im Chromatogramm (Abbild. 1, S XI) ließen sich nur die beiden ninhydrinpositiven Abbauprodukte nachweisen, die im folgenden zunächst als A und B bezeichnet sind. A unterscheidet sich von B dadurch, daß seine Chromatogrammzone mit Eisen(III)-cyanid-Nitrosylprussiat violett wird, während B nicht reagiert.

Nach kürzerem Kochen traten im Chromatogramm neben A und B noch Zonen mit kleineren R_F -Werten auf (ZS_1, ZS_2). Da ihre Intensität im Laufe der Hydrolyse ab-, die von A und B aber zunimmt, enthalten diese Zonen offenbar Zwischenprodukte des Abbaus.

Anders als in Säure verläuft der Abbau des Geomycins in Alkali (Abbild. 1). Nach 24stdg. Kochen mit $0.34n\text{Ba}(\text{OH})_2$ gab das Hydrolysat drei ninhydrinpositive Hauptzonen. Mindestens zwei von ihnen, nämlich A_1 und A_2 , enthalten Abbauprodukte, die man im Säurehydrolysat nicht antrifft. Dagegen fehlte das Abbauprodukt A. Wirkte Bariumhydroxyd kürzer ein, so fanden sich im Chromatogramm (ebenso wie beim Säureabbau) oberhalb A noch Zonen mit kleineren R_F -Werten (ZA_1, ZA_2 in Abbild. 1), die bei längerer Alkalieinwirkung wieder verschwanden und zweifellos von Zwischenprodukten herrühren. Ferner ließ sich nachweisen, daß anfangs auch in Alkali das Abbauprodukt A entsteht. Im gleichen Maß wie seine Menge im Laufe der Hydrolyse kleiner wird, nimmt die Intensität der Zonen A_1 und A_2 (Abbild. 1) zu, ein Zeichen, daß sie Abbauprodukte von A enthalten.

Um die Abbauprodukte A und B zu isolieren, haben wir Geomycin-hydrochlorid in Mengen von 0.3–1.0 g 24 Stdn. mit $6n\text{HCl}$ gekocht. Dabei entstanden etwa 1.3 Moll. Kohlendioxyd und 2.6–2.8 Moll. Ammoniak (bezogen auf die vorläufige Geomycin-hydrochlorid-Summenformel $(\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}_2\text{Cl})_8$, Mol.-Gew. 1440).

Da sich die Hydrolyseprodukte des Geomycins papierchromatographisch gut trennen lassen, war es naheliegend, auch für ihre präparative Isolierung die Verteilungschromatographie heranzuziehen und dabei als Träger der stationären Phase Cellulosepulver zu verwenden. Um hierfür ein Lösungsmittel-System zur Verfügung zu haben, in dem die Differenz der R_F -Werte von A und B optimal ist, haben wir die papierchromatographische Trennung der beiden Abbauprodukte in mehr als 50 verschiedenen Systemen untersucht. Dabei bewährten sich am besten Butanol-Eisessig-Wasser (2:1:1) und Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (30:2:20). Geeignet zur Trennung der Hydrolyse-Zwischenprodukte war neben den beiden eben genannten Systemen auch noch Butanol-Ameisensäure-Wasser (4.5:1.5:2) sowie (2:1:1).

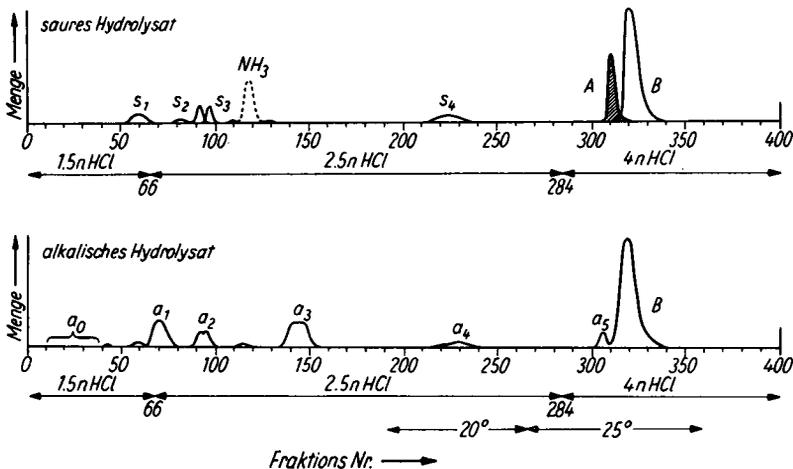
Da wir im Ring-Chromatogramm den größten Abstand zwischen Zone A und B mit Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (30:2:20) erreichten, wurde die präparative Trennung der Abbauprodukte an der Cellulose-Säule zuerst mit diesem System versucht. Das Ergebnis war sehr enttäuschend, denn 1. trat kaum eine Fraktionierung von A und B ein, und 2. bildeten sich in der Säule erhebliche Mengen von Sekundärprodukten, deren R_F -Werte größer waren als die von B. Auch ein zweiter Versuch mit Butanol-Eisessig-Wasser (2:1:1) verlief unbefriedigend. Zwar ließ sich in diesem System eine deutliche Trennung von A und B feststellen, die Sekundärprodukte aber traten auch hier auf und verschmierten die Säule.

Dieser Mißerfolg ist, wie sich später herausstellte, auf die Versuchsdauer (30 Stdn.) zurückzuführen, die fünfmal größer war als bei der Papierchromatographie. Während

dieser langen Zeit kann sowohl bei den Abbauprodukten als auch im Lösungsmittel-System Veresterung eintreten. A und B bilden in beiden Systemen Ester, die als die oben erwähnten Sekundärprodukte den Trennungsgang stören. Eine erhebliche Veresterung innerhalb des Lösungsmittel-Systemes fanden wir beim Gemisch Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (30:2:20) und weniger ausgeprägt bei Butanol-Eisessig-Wasser (2:1:1) (vergl. Versuchsteil Tafel 6). Da sich bei zunehmender Estermenge die R_F -Werte der zu trennenden Verbindungen laufend ändern, ist verständlich, daß im ersten System kaum eine Trennung von A und B stattfand, während sie in Butanol-Eisessig-Wasser (2:1:1), bei dem die Esterbildung geringer ist, deutlich war.

Eine befriedigende Trennung der Abbauprodukte gelang uns schließlich an einer Säule des stark sauren Ionen-Austauschers Dowex 50×12 nach Stein und Moore⁴). Vorversuche zeigten, daß die Trennungsergebnisse auf 1% genau reproduzierbar sind, wenn bei den einzelnen Versuchen die Säulendimensionen, Temperatur, Durchlaufgeschwindigkeit, Fraktionsvolumina sowie Volumen und Konzentration der Elutionsmittel um weniger als 1% voneinander abweichen. Auch ließen sich die in Vorversuchen ermittelten Bedingungen ohne Einbuße an Genauigkeit auf die 10–100fache Substanzmenge übertragen, wenn man (bei gleichbleibender Säulenlänge) die Menge des Austauschers, die Durchlaufgeschwindigkeit sowie das Volumen der Elutionsmittel und der Filtratfraktionen um den gleichen Faktor vergrößerte wie die eingesetzte Substanzmenge. Diese Menge betrug bei unseren Versuchen 0.3–1 g je Säule. Eluiert wurde mit Salzsäure steigender Konzentration, wobei wir mit einem automatischen Sammler bis 800 Filtratfraktionen auffingen und zur Aufstellung des Elutionsdiagrammes kolorimetrisch analysierten.

Abbild. 2 zeigt die Elutionsdiagramme eines sauren und alkalischen Geomycin-Hydrolysates. In Tafel 1 sind die in den einzelnen Diagrammbergen



Abbild. 2. Elutionsdiagramme von Geomycin-Hydrolysaten. Säule 3.0×57 cm aus Dowex 50×12. Durchlaufgeschwindigkeit 47.3 cm/Stde.; $t=25^{\circ}$; Fraktionsvolumina 13.5 ccm. Auf der Ordinate: Mengen in mg und relative Intensität der Farbreaktionen. — Ninhydrin; - - - - - Nessler's Reagens; // // // Eisen(III)-cyanid-Nitrosylprussiat

⁴) W. H. Stein u. St. Moore, Cold Spring Harbor Sympos. quantitativ. Biol. 14, 189 [1949].

gefundenen Substanzmengen zusammengestellt. Die Alkalihydrolyse erfolgte durch 24stdg. Kochen von Geomycin-hydrochlorid mit $0.5n\text{Ba}(\text{OH})_2$, wobei Kohlendioxyd (Menge nicht bestimmt) und 3.6–4.1 Moll. Ammoniak frei wurden, d. h. etwa 1 Mol. mehr als beim Säureabbau.

Tafel I. Trennung von Geomycin-Hydrolysaten an der Austauscher-Säule

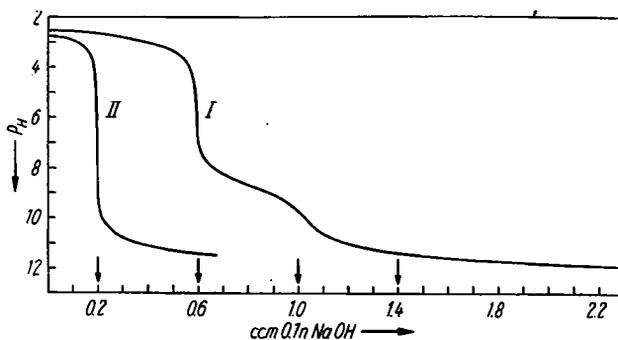
Abbau mit $6n\text{HCl}$, 24 Stdn., 100° eingesetzt: 295 mg Hydrolysat			Abbau mit $0.5n\text{Ba}(\text{OH})_2$, 24 Stdn., 100° eingesetzt: 997 mg Hydrolysat		
Bezeichng.	Frakt. Nr.	Ausbeute*)	Bezeichng.	Frakt. Nr.	Ausbeute*)
s_1	37–42	1.2 (0.5)	a_0	10–40	35.4 (3.9)
	53–67	5.9 (2.2)		56–63	3.7 (0.4)
	81–82	2.6 (1.0)	a_1	64–80	49.0 (5.4)
s_2	89–92	2.7 (1.0)	a_2	87–100	22.5 (2.5)
	95–98	2.4 (0.9)	a_3	135–153	56.4 (6.2)
NH_4Cl	113–123	25.6 (9.5)	a_4	224–240	8.9 (1.0)
s_4	214–228	7.0 (2.6)	a_5	304–309	11.1 (1.2)
A	308–315	44.7 (16.7)	B	311–340	376.3 (41.5)
B	316–335	156.4 (58.4)	a_6	350–430	46.0 (5.1)
	Summe	(92.8)		Summe	(67.2)

*) in mg; eingeklammerte Zahlen = Ausbeuten in % des auf die Säule gegebenen Hydrolysates (die für die kolorimetrischen Testreaktionen verbrauchten Mengen einbegriffen)

II. Die Charakterisierung der Abbauprodukte A und B

Von den Diagrammzonen des sauren Geomycin-Hydrolysates (Abbild. 2) entsprechen A und B den in gleicher Weise bezeichneten Zonen des Papierchromatogrammes (Abbild. 1). Ihre Lage im Elutionsdiagramm ließ vermuten, daß A und B basische Aminosäuren sind.

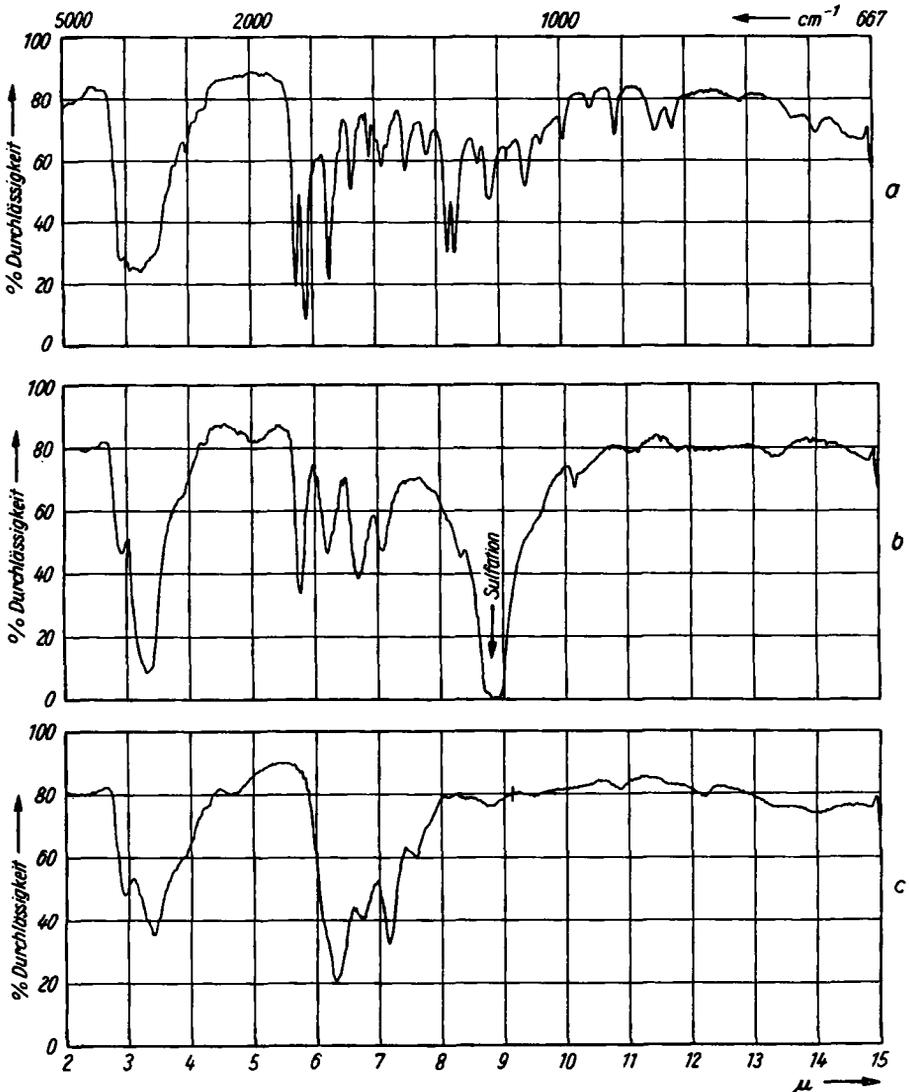
Abbauprodukt A kristallisierte aus Äthanol-Wasser in farblosen Nadeln, Zersp. $208\text{--}213^\circ$. Die Analysenzahlen passen auf die kleinste Formel $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_3\text{N}_4\text{Cl}_2$ (261.1). Daß sie die Bruttoformel des Abbauproduktes ist, zeigte eine durch potentiometrische Titration vorgenommene Mol.-Gew.-Bestimmung⁵⁾, die den Wert 269 ± 5 ergab. Aus der Titrationskurve (Abbild. 3)



Abbild. 3. Potentiometrische Titration von Geamin-dihydrochlorid mit $0.1n\text{NaOH}$.
Kurve I 11.1 mg Sbst. in einer Mischung von 2.00 ccm Wasser und 0.20 ccm $0.1n\text{HCl}$.
Kurve II 0.20 ccm $0.1n\text{HCl}$ in 2.00 ccm Wasser

⁵⁾ H. Brockmann u. E. Meyer, Chem. Ber. 86, 1514 [1953].

und dem Halogengehalt läßt sich entnehmen, daß eine saure und zwei basische Gruppen (eine davon stark basisch) vorhanden sind. Unser kristallisiertes Abbauprodukt ist demnach das Dihydrochlorid einer Verbindung $C_6H_{12}O_3N_4$, die wir nunmehr als Geamin bezeichnen.



Abbild. 4. IR-Spektren. a) 0.45 mg Geamin-dihydrochlorid; b) 0.6 mg L- β -Lysin-sulfat; c) 0.26 mg L- β -Lysin, in 200 mg Kaliumbromid gepreßt

Geamin-dihydrochlorid ist optisch aktiv, $[\alpha]_D^{20} : +57.5^{\circ}$ ($c=1.9$, in Wasser). Sein in Kaliumbromid gemessenes IR-Spektrum (Abbild. 4) zeigt eine breite Absorption zwischen 2.9 und 3.5 μ , die auf Überlagerung der Valenzschwingungen von Amino-, Imino-, Oxy- und C-H-Schwingungen zurückzuführen ist.

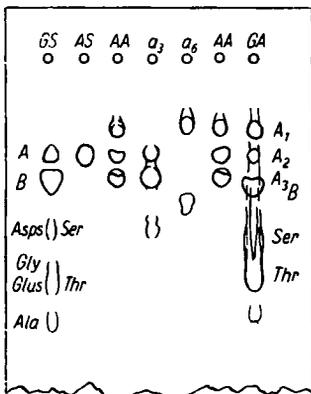
Die Bande bei 5.75μ ist der Carboxygruppe, die bei 5.90μ einer C=N-Valenzschwingung zuzuordnen. Auf N-H-Deformationsschwingungen dürften die Banden bei 6.30 und 6.63μ beruhen.

Aus den in Tafel 2 zusammengestellten Farbreaktionen läßt sich entnehmen, daß Geamin eine disubstituierte Guanidinogruppe enthält, die offenbar in einen Amino-imidazolring eingebaut ist.

Tafel 2. Farbreaktionen des Geamins und anderer Aminosäuren

	Geamin	Arginin	Kreatin	Kreatinin	Histidin
Ninhydrin	viol.	viol.	—	—	viol.
Sakaguchi ⁶⁾	—	hellrot	hellrot	—	—
Voges-Proskauer ⁷⁾	—	rotviol.	rotviol.	—	—
Jaffé ⁸⁾	—	—	—	rot	—
Benedict ⁹⁾	—	—	—	dunkelviol.	—
Eisen(III)-cyanid-Nitrosylprussiat ⁹⁾	viol.	rot	dunkelrot	—	schwachviol.
diazotierte Sulfanilsäure	—	—	—	—	dunkelrot
2,4-Dinitro-phenylhydrazin	—	—	—	—	—

Mit 4'-Oxy-azobenzol-sulfonsäure-(4) erhielten wir aus Geamin ein in gelbroten Plättchen kristallisierendes Salz $C_6H_{12}O_3N_4 \cdot 2C_{12}H_{10}O_4N_2S$ vom Schmp. $254-258^\circ$ (Zers.), mit Pikrinsäure ein Geamin-dipikrat $C_6H_{12}O_3N_4 \cdot 2C_6H_3O_7N_3$, derbe tiefgelbe Prismen vom Schmp. $235-237^\circ$.



Abbild. 5. Papierchromatogramm des alkalischen Geamin-Hydrolysates in Butanol-Eisessig-Wasser 2:1:1. GS = saures, GA = alkalisches Geomycin-Hydrolysat. AS = saures, AA = alkalisches Geamin-Hydrolysat. a_3 und a_6 = Fraktionen des am Austauscher getrennten alkalischen Geomycin-Hydrolysates. A_1 , A_2 , A_3 = Abbauprodukte des Geamins

Erhitzt man Geamin in $0.34\% Ba(OH)_2$ 12 Stdn. auf 110° , so wird es unter Entwicklung von Kohlendioxyd und Ammoniak vollständig abgebaut. Das Papierchromatogramm des Hydrolysates (Abbild. 5) zeigte drei ninhydrinpositive Zonen, von denen die unterste (A_3) im R_F -Wert mit β -Lysin übereinstimmte. Der Vergleich dieses Chromatogrammes (AA, Abbild. 5) mit dem des alkalischen Geomycin-Hydrolysates (Abbild. 5) ergibt, daß die Zonen A_1 und A_2 des alkalischen Geomycin-Hydrolysates von Abbauprodukten des Geamins herrühren und daß die Zone B neben β -Lysin das dritte Abbauprodukt (A_3) des Geamins enthalten muß. Gegen Säure ist Geamin recht beständig, nach 24stdg. Kochen mit $6\% HCl$ zeigte das Chromatogramm (Abbild. 5) nur die Zone des Geamins.

Geamin ist isomer mit Roseonin, einem Abbauprodukt des Antibioticums

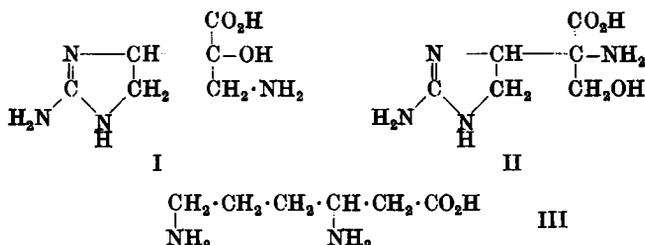
⁶⁾ Auf Filterpapier, verbessert von R. Acher u. C. Crocker, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 9, 704 [1952].

⁷⁾ Nach den Verbesserungen von H. Tuppy, Mh. Chem. 84, 342 [1953].

⁸⁾ Mit 3,5-Dinitro-benzoesäure, S. R. Benedict u. J. A. Behre, J. biol. Chemistry 114, 515 [1936]. ⁹⁾ R. E. Horne u. A. L. Pollard, J. Bacteriol. 55, 231 [1948].

Roseothricin, das kürzlich von K. Nakanishi, T. Ito und Y. Hirata¹⁰⁾ beschrieben wurde. Geamin und Roseonin stimmen in der spezifischen Drehung ($[\alpha]_D^{13}$: + 51.0° in Wasser¹⁰⁾) und im Schmp. ihres Dihydrochlorides (215¹⁰⁾) sowie im Schmp. ihres Dipikrates (237°, Zers.¹⁰⁾) überein. Die Vermutung, daß beide identisch sind, ist daher nicht von der Hand zu weisen.

Die japanischen Autoren haben ihrem Roseonin die Formel I zugeschrieben. Daß die Amino- und Oxygruppe in der Seitenkette die in I angegebene Stellung haben, begründen die Autoren durch die p_K -Werte und die negativ verlaufenen Reaktionen auf α -Aminosäuren. Uns erscheinen diese Argumente nicht stichhaltig, da 1. der Ninhydrinabbau auch bei α -substituierten α -Aminosäuren versagt¹¹⁾, und 2. bei so kleinen p_K -Differenzen, wie sie zwischen einer Serin- und Isoserin-Gruppierung auftreten, eine einwandfreie Zuordnung nur dann möglich ist, wenn beide in Frage kommenden Verbindungen als Modellsubstanzen mittitriert werden¹²⁾. Ein derartiger Vergleich ist im vorliegenden Fall besonders wichtig, weil hier der Einfluß des α -Substituenten auf die p_K -Werte nicht genau vorausgesagt werden kann. Demnach steht die Entscheidung zwischen Formel I und II noch aus.



Das papierchromatographisch einheitliche, hygroskopische Abbauprodukt B ließ sich mit 4'-Oxy-azobenzol-sulfonsäure-(4) in ein Disulfonat überführen, das in goldgelben Blättchen kristallisierte und sich bei 247–249° zersetzte; $[\alpha]_D^{20}$: + 7.6° ± 1° ($c=1$, in 95-proz. Äthanol).

Mit Pikrinsäure bildete B ein gleichfalls in Plättchen kristallisierendes gelbes Salz $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_2\text{N}_2 \cdot 2\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_7\text{N}_3$ vom Schmp. 201–203°. Dem Abbauprodukt kommt demnach die Summenformel $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_2\text{N}_2$ zu, d. h. es ist isomer mit Lysin, mit dem es auch hinsichtlich seiner Lage im Elutionsdiagramm übereinstimmt.

Aus dem Schmp. und der spezif. Drehung seiner Salze ergibt sich aber, daß Abbauprodukt B sicher kein Lysin ist. Vielmehr stimmt es, wie Tafel 3 zeigt, so weitgehend mit L- β -Lysin (III) überein, daß wir an seiner Identität mit dieser Aminosäure nicht zweifeln. L- β -Lysin ist bereits als Abbauprodukt der Antibiotica Viomycin¹³⁾, Streptothricin¹⁴⁾, Streptolin¹⁵⁾ und Roseothricin¹⁰⁾ aufgefunden worden.

¹⁰⁾ J. Amer. chem. Soc. 76, 2845 [1954].

¹¹⁾ E. H. Flynn, J. W. Hinman, E. L. Caron u. D. O. Woolf, J. Amer. chem. Soc. 75, 5368 [1953]. ¹²⁾ Vergl. den Konstitutionsbeweis beim α -Methyl-serin l. c. ¹¹⁾.

¹³⁾ T. H. Haskell, S. A. Fusari, R. P. Frohardt u. Q. R. Bartz, J. Amer. chem. Soc. 74, 599 [1952].

¹⁴⁾ H. E. Carter, W. R. Hearn, E. M. Lansford, A. C. Page, N. P. Salzman, D. Shapiro u. W. R. Taylor, J. Amer. chem. Soc. 74, 3704 [1952].

¹⁵⁾ E. E. Smismann, R. W. Sharpe, B. F. Aycock, E. E. van Tamelen u. W. H. Peterson, J. Amer. chem. Soc. 75, 2029 [1953]; E. E. van Tamelen u. E. E. Smismann, ebenda 75, 2031 [1953].

Tafel 3. Vergleich von Abbauprodukt B mit L- β -Lysin

Derivat	L- β -Lysin	Abbauprodukt B
Bis-[4'-oxy-azobenzol-sulfonat-(4)]	Schmp. 240–241 ^{o 13)} 224–246 ^{o 14)} 243.5–244 ^{o 15)}	Schmp. 247–249 ^o
Dipikrat	$[\alpha]_D^{20}$: +6.5 ^o \pm 1 ^{o 15)} Schmp. 205–206 ^{o 13)} 200–201 ^{o 15)}	$[\alpha]_D^{20}$: +7.6 ^o \pm 1 ^o Schmp. 201–203 ^o
Sulfat	Schmp. 220–224 ^{o 13)}	Schmp. 228–229 ^o

Zone B des Alkalihydrolysates enthielt ebenso wie Zone B des Säurehydrolysates L- β -Lysin, das als kristallisiertes 4'-Oxy-azobenzol-sulfonat-(4) isoliert wurde. Aus dem Sulfonat konnten wir β -Lysin-sulfat gewinnen, das in derben Nadeln kristallisierte und nach zweimaligem Umkristallisieren aus verdünntem Äthanol bei 228–229^o schmolz (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: +15.4^o ($c = 2.9$, in Wasser). Das daraus mit Bariumhydroxyd freigesetzte β -Lysin kristallisierte aus Methanol-Äthanol in hygroskopischen, gegen 160^o schmelzenden Prismen, deren Analysenzahlen gut auf die Formel C₆H₁₄O₂N₂ paßten.

Bei Fraktionierungsversuchen, bei denen ein Geomycin-Hydrolysat mit saurem Methanol behandelt wurde, isolierten wir ein kristallisiertes Dipikrat vom Schmp. 189–190^o, das sich durch Analyse und Verseifung als β -Lysin-methylester identifizieren ließ.

Die IR-Spektren des aus Geomycin gewonnenen L- β -Lysins und seines Sulfates zeigt Abbild. 4. Die Banden bei 2.95 und 3.30 bzw. 3.40 μ lassen sich Valenzschwingungen von Amino-, Ammoniumgruppen und CH-Gruppen zuordnen. Beim β -Lysin-sulfat ist die Bande 5.78 μ seiner Carboxygruppe und die bei 6.20 und 6.69 μ NH-Deformationsschwingungen zuzuschreiben.

Die Bande 6.32 μ des freien β -Lysins rührt her von der C=O-Streckschwingung des Carboxylat-Ions sowie von N-H-Deformationsschwingungen der nicht ionisierten NH₂-Gruppe.

III. Nebenprodukte der Geomycin-Hydrolyse

Die Nebenfraktionen, die bei der oben beschriebenen Trennung des sauren und alkalischen Geomycin-Hydrolysates anfielen, haben wir papierchromatographisch im System Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 oder 2:1:1 sowie in Phenol-Ammoniak und Phenol-Wasser untersucht und die dabei erhaltenen Aminosäuren halbquantitativ mit Ninhydrin bestimmt.

Fraktion s₁ gab im Papierchromatogramm vier ninhydrinpositive Flecken mit den R_F-Werten der Asparaginsäure, Glutaminsäure, des Threonins und Serins. In s₂ war neben einer sehr geringen ninhydrinpositiven Beimengung nur Glycin, in s₃ nur Alanin nachzuweisen, während s₄ zwei unbekannte ninhydrinpositive Substanzen enthielt.

Im alkalischen Geomycin-Hydrolysat sind die Mengen der Nebenprodukte größer als im sauren. Fraktion a₀ war ninhydrinnegativ, färbte sich an der Luft rotbraun und enthielt der Lage im Elutionsdiagramm nach nur saure oder neutrale Stoffe. In a₁ waren Glutaminsäure, Threonin und Serin vorhanden. a₂ enthielt Glycin und Alanin, und in a₃ fanden wir die beiden Produkte A₂ und A₃, die beim alkalischen Abbau des Geamins entstehen (Abbild. 5). Fraktion a₄ war mit s₄ des sauren Abbaus identisch. a₅ enthielt eine ninhydrinpositive Substanz, die im R_F-Wert mit Lysin übereinstimmte, aber nach dem Zersp. ihres kristallisierten 4'-Oxy-azobenzol-sulfonates-(4) weder mit Lysin noch β -Lysin identisch war. Fraktion a₆, die ihrer Lage im Diagramm nach nur starke Basen enthalten konnte, gab im Papierchromatogramm zwei ninhydrinpositive Flecken, von denen der stärkere den gleichen R_F-Wert hatte wie das Abbauprodukt A₁ des Geamins.

In Tafel 4 sind die Ausbeuten an Geomycin-Abbauprodukten in Moll. zusammengestellt, wobei 1440 als Mol.-Gew. für Geomycin-hydrochlorid angenommen ist. Die Säurehydrolyse, bei der alle der Menge nach ins Gewicht fallenden Abbauprodukte erfaßt wurden (vergl. Tafel 1), liefert neben Ammoniak und Kohlendioxyd L- β -Lysin und Geamin im Mol.-Verhältnis 4:1. Verglichen mit den Mengen dieser beiden Aminosäuren sind die des Serins, Threonins, Glycins, Alanins sowie der Asparagin- und Glutaminsäure gering.

Tafel 4. Ausbeute an Geomycin-Abbauprodukten in Moll., bezogen auf Geomycin-hydrochlorid ($C_6H_{13}O_2N_2 \cdot HCl$)₈ (1440)

Abbauprodukte	saurer Abbau	alkalischer Abbau
Ammoniak	2.8	3.6
	2.6	4.1
Kohlendioxyd	1.3	nicht bestimmt
Geamin	1.01	—
	1.04	—
L- β -Lysin	4.2	2.7
	3.9	—
Asparaginsäure	0.03	—
Glutaminsäure	0.05	0.03
Serin	0.05	0.17
Threonin	0.04	0.25
Glycin	0.11	0.13
Alanin	0.10	0.14

Daß diese sechs Aminosäuren einem Peptid entstammen, das Geomycin hartnäckig über alle Stufen der Reinigung begleitet, ist sehr unwahrscheinlich, denn 1. finden sich die Aminosäuren auch im Hydrolysat von reinstem, durch fraktionierte Kristallisation des Helianthinsalzes³⁾ gewonnenem Geomycin, 2. könnten sie nur sauren bzw. neutralen Peptiden entstammen, die bei der Reinigung des stark basischen Geomycins sicher abgetrennt worden wären, und 3. treten die genannten Aminosäuren beim alkalischen Abbau z. Tl. in einem ganz anderen Mengenverhältnis auf. So war Asparaginsäure nicht nachzuweisen, während Serin und Threonin in erheblich größerer Menge vorhanden waren als im sauren Hydrolysat.

Komplizierter als in Säure verläuft der Abbau in Alkali; Geamin zerfällt vollständig, wodurch 1 Mol. Ammoniak mehr frei wird als in Säure, und β -Lysin wird unter den angewandten Bedingungen zu einem Drittel zerstört. Nach Trennung in der Austauschere-Säule befanden sich nur 67 % des eingesetzten Hydrolysates (Tafel 1) im Eluat, der Rest wurde in der Säule festgehalten.

Im Geomycin müssen β -Lysin-Reste peptidartig verknüpft vorliegen, denn das Zwischenprodukt ZS₂ der sauren Hydrolyse (Abbild. 1) gibt keine Eisen-(III)-cyanid-Nitrosylprussiat-Reaktion, und die Hauptmenge an Kohlendioxyd und Ammoniak wird schon zu Beginn der Hydrolyse frei. Für eine Peptidstruktur des Geomycins sprechen ferner sein IR-Spektrum³⁾ und der beim Säureabbau beobachtete Anstieg des Aminostickstoffes von ein Drittel auf zwei Drittel des Gesamtstickstoffes³⁾. Die Abspaltung von Ammoniak und Kohlendioxyd läßt vermuten, daß im Geomycin neben normalen Peptidbin-

dungen der β -Aminosäuren auch Harnstoffbrücken vorhanden sind, wie sie in δ -verknüpften Citrullinpeptiden oder in Peptidketten vorliegen würden, die Aminoameisensäure als Baustein enthalten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, den Farbenfabriken Bayer, Werk Elberfeld, sowie dem Fonds der Chemie danken wir für großzügige Förderung unserer Arbeiten.

Beschreibung der Versuche *)

1. Hydrolytischer Abbau des Geomycins

Papierchromatographische Analyse des Hydrolyseverlaufes. a) Saure Hydrolyse: Einer unter Rückfluß kochenden Lösung von 205 mg reinem Geomycinhydrochlorid in 4 ccm 6*n*HCl entnahm man zu verschiedenen Zeiten Proben von 0.1 ccm, verdampfte sie im Vak.-Exsiccator über Kaliumhydroxyd und trocknete den Rückstand (4–5 mg), bis der Chlorwasserstoff-Geruch verschwunden war. Zur Chromatographie löste man in 0.03 ccm Wasser und brachte zwei- bzw. viermal je 1 cmm dieser Lösung auf den Startpunkt des Papierses (Schleicher & Schüll 2043 b).

b) Alkalische Hydrolyse: Eine Lösung von 153 mg reinem Geomycinhydrochlorid in 20 ccm 0.34*n*Ba(OH)₂ wurde unter Durchleiten von sauerstofffreiem Stickstoff unter Rückfluß gekocht. Der austretende Stickstoff passierte zur Absorption flüchtiger Basen eine mit 20 ccm 0.1*n*HCl beschickte Vorlage, die durch eine Falle mit konz. Schwefelsäure gegen Ammoniak aus der Außenluft geschützt war. Die für die Papierchromatographie bestimmten Proben von 0.1 ccm neutralisierte man mit 0.5*n*H₂SO₄ und dampfte das Filtrat vom Bariumsulfat-Niederschlag i. Vak. ein. Den Rückstand (7.5–9 mg) löste man in 0.05 ccm Wasser und brachte von dieser Lösung ein- bzw. zweimal je 1 cmm auf das Papier. (Die Hauptmenge an Kohlendioxyd und flüchtiger Base wurde innerhalb 1 Stde. nach Siedebeginn frei.)

Nach Beendigung der Hydrolyse (35 Stdn.) filtrierte man das in der Reaktionslösung ausgefallene Bariumcarbonat ab, wusch es mit Wasser, löste es in Salzsäure und verdampfte zur Trockne. Der Rückstand (110 mg BaCl₂) gab keine Ninhydrinreaktion.

Von den 20 ccm 0.1 *n* HCl der Vorlage wurden je 2 ccm mit 0.1*n*NaOH titriert. Verbrauch 1.58, 1.60 ccm; gef. 0.38 mMol flüchtiger Base (4.2% NH₃, bez. auf obige Einwaage an Geomycin). Die restlichen 16 ccm *n* HCl hinterließen beim Eindampfen 16.6 mg (Äquival.-Gew. für NH₄Cl ber. 53.5, gef. 52.4) eines farblosen, nicht hygroskopischen Rückstandes, der mit Nessler's Reagens die Ammoniak-Reaktion zeigte und dessen IR-Spektrum mit dem des Ammoniumchlorides übereinstimmte. Im Papierchromatogramm¹⁶⁾ konnten keine Beimengungen von ninhydrinpositiven Aminen festgestellt werden.

Präparative Hydrolyse. a) Mit Säure: Eine Lösung von 0.65 g reinem Geomycinhydrochlorid in 300 ccm 6*n*HCl wurde im Stickstoffstrom 24 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Der Gasstrom passierte nach Verlassen des Reaktionsgefäßes eine Falle mit 20 ccm 0.34*n*Ba(OH)₂ und eine zweite mit konz. wäßrigem Alkali. Als nach Beendigung der Hydrolyse die leicht getrübbte, braune Reaktionslösung i. Vak. unter Stickstoff auf 20 ccm eingengt, dann mit 50 mg Aktivkohle fast vollständig entfärbt und schließlich i. Vak. zur Trockene gebracht wurde, hinterblieb ein hellbrauner, teilweise kristallisierter, hygroskopischer Rückstand (712 mg).

Der Bariumcarbonat-Niederschlag der Vorlage wurde in 10 ccm *n* HCl gelöst und mit *n* NaOH zurücktitriert. Verbrauch: 8.83 ccm; gef. 25.8 mg CO₂ (4% der obigen Einwaage).

*) Alle Schmpp. wurden unter dem Heizmikroskop nach Kofler bestimmt. Alle Substanzen wurden zur Analyse i. Hochvak. bei 50° über Diphosphorpentoxyd getrocknet.

¹⁶⁾ J. M. Bremner u. R. H. Kenten, Biochem. J. 49, 651 [1951].

b) Mit Alkali: Eine Lösung von 1 g reinem Geomycin-hydrochlorid in 10 cm Wasser versetzte man im Stickstoffstrom mit 150 cm 0.53*n* Ba(OH)₂, kochte 24 Stdn. unter Rückfluß und fing das entwickelte Ammoniak in 25 cm *n* HCl auf. Anschließend wurden noch 100 cm aus der Reaktionslösung abdestilliert. Das Destillat (*p*_H 7.5) zeigte schwachen Amingeruch, verbrauchte aber nur Spuren von *n* HCl. Aus der Vorlage konnten 154 mg reines Ammoniumchlorid isoliert werden.

Die vom Bariumcarbonat-Niederschlag abfiltrierte hellbraune Reaktionslösung wurde mit 4*n* H₂SO₄ auf *p*_H 6.0 gebracht, zentrifugiert, i. Vak. eingengt, filtriert und i. Vak. zur Trockene verdampft, wobei ein hellbrauner, hygroskopischer Rückstand (998 mg) hinterblieb.

2. Trennung der Hydrolysate an der Austausch-Säule

Verwendet wurde eine 57 × 3-cm-Säule des stark sauren Kationen-Austauschers Dowex 50 × 12 in der H-Form nach Moore und Stein⁴⁾. Ein Wassermantel (gespeist aus einem Höppler-Thermostat) hielt die Temperatur auf 25° ± 0.1°. Die Säule war oben mit einer Scheibe aus säurefestem Filtrierpapier und unten mit einem Glaswollepfropfen verschlossen. Zwischen Pfropfen und Austauscher lag (von unten nach oben) eine Schicht von grobem und feinem Glaspulver. Eine Hebevorrichtung gewährleistete gleichmäßigen Nachlauf der Waschlösung. Bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 47.3 cm/Stde. (geregelt durch einen angeritzten Glashahn am Ablaufrohr) wurden mit einem vollautomatischen Sammler¹⁷⁾ Fraktionen von 13.5 cm aufgefangen.

Zur Aufstellung der Elutionskurve (Abbild. 2) verdampfte man 10% jeder Fraktion in einem heizbaren Vak.-Exsiccator zur Trockene, löste den Rückstand in 0.06 cm Wasser und führte mit dieser Lösung auf Filtrierpapier die Ninhydrin- und Eisen(III)-cyanid-Nitrosylprussiat-Reaktion durch. Der Rest der Lösung wurde mit Nessler's Reagens auf Ammoniak geprüft. Die Farbteste auf Filtrierpapier wurden halbquantitativ ausgewertet. Die Fraktionen der Hauptmaxima (Abbild. 2) prüfte man außerdem papierchromatographisch auf Einheitlichkeit. Zur Identifizierung wurden die Fraktionen der Maxima vereinigt und unter Stickstoff i. Vak. eingedampft und die Rückstände über Natriumhydroxyd und Diphosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Aus den Fraktionen 112–123 des sauren Hydrolysates konnten 69 mg farblose Kristalle erhalten werden, die wie bei der alkalischen Hydrolyse als Ammoniumchlorid identifiziert wurden.

3. Abbauprodukt A, Geamin

Geamin-dihydrochlorid: Die bei der Auftrennung des sauren Hydrolysates gewonnenen Fraktionen 307–315 (Abbild. 2) hinterließen einen kristallisierten Rückstand (132 mg). Beim Umkristallisieren aus wenig Wasser unter Zusatz von Äthanol wurden farblose, stäbchenförmige Kristalle (92.5 mg) erhalten, die bei 205–207° (Zers.) schmolzen und dem Papierchromatogramm nach einheitlich waren.

Nochmaliges Umkristallisieren brachten den Schmp. auf 208–215° (Zers.); [α]_D²⁰: 57.5° ± 0.4° (*c* = 1.9, in Wasser).

C₆H₁₂O₃N₄ · 2HCl (261.1) Ber. C 27.60 H 5.40 O 18.38 N 21.46 Cl 27.16

C₆H₁₄O₃N₄ · 2HCl (263.1) Ber. C 27.39 H 6.13 O 18.24 N 21.29 Cl 26.95

Gef. C 27.12 H 5.58 O 18.83 N 21.02 Cl 26.51

Geamin-bis-[4'-oxy-azobenzol-sulfonat-(4)]: Die Hälfte der Mutterlauge aus der zweiten Umkristallisation des Geamin-dihydrochlorides wurde solange mit gesättigter wäßriger 4'-Oxy-azobenzol-sulfonsäure-(4)-Lösung versetzt, bis die rote Farbe nicht mehr nach Orange umschlug. Der kristalline, rotgelbe Niederschlag wurde dreimal aus Wasser umkristallisiert. Ausb. 39 mg; Schmp. 254–258° (Zers.). Das Salz

¹⁷⁾ Firma Dr. Hans Hösli, Bischofszell, Schweiz.

war im Papierchromatogramm¹⁸⁾ einheitlich und zeigte im IR-Spektrum die beiden für Geaminsalze charakteristischen Banden bei 5.74 und 5.90 μ .

$C_6H_{12}O_3N_4 \cdot 2C_{12}H_{10}O_4N_2S$ (744.7) Ber. C 48.38 H 4.33 N 15.05 S 8.61

Gef. C 46.76 H 4.49 N 14.20 S 7.48

Geamin-dipikrat: Eine Lösung von 120 mg Säurehydrolysat des Geomycins in 2 ccm Wasser wurde mit kalt gesättigter alkoholischer Pikrinsäure versetzt, bis kein Öl mehr ausfiel. Das auch nach häufigem Umfällen aus Wasser ölig bleibende Salz erstarrte nach einigen Wochen zu hell- und dunkelgelben Kristallen. Die dunkelgelben wurden ausgelesen und dreimal aus Wasser umkristallisiert. Tiefgelbe, derbe Prismen, Schmp. 235–237° (Zers.), von papierchromatographisch reinem Geaminsalz. Ausb. 26 mg.

$C_6H_{12}O_3N_4 \cdot 2C_6H_3O_7N_3$ (646.4) Ber. C 33.44 H 2.81 N 21.67

$C_6H_{14}O_3N_4 \cdot 2C_6H_3O_7N_3$ (648.4) Ber. C 33.34 H 3.19 N 21.60

Gef. C 33.20 H 3.55 N 21.53

Alkalische Hydrolyse des Geamins: 2 mg Geamin-dihydrochlorid wurden in 0.4 ccm 0.43 n Ba(OH)₂ 12 Stdn. bei 110° im zugeschmolzenen Röhrchen erhitzt. Nach dem Erkalten waren einige gut ausgebildete Bariumcarbonat-Kristalle zu erkennen, und beim Öffnen des Röhrchens konnte Ammoniak mit feuchtem Indikatorpapier und am Geruch nachgewiesen werden. Die farblose Lösung wurde mit Schwefelsäure auf p_H 6 gebracht, filtriert, konzentriert und zur Papierchromatographie verwendet.

4. Abbauprodukt B, L- β -Lysin

Die papierchromatographisch einheitlichen Fraktionen 322–339 der sauren Hydrolyse hinterließen einen gelblichen, amorphen, sehr hygroskopischen Rückstand (125 mg). Seine Lösung in 2.5 ccm Wasser wurde mit sehr wenig Aktivkohle filtriert und zur Darstellung der beiden folgenden Salze benutzt:

L- β -Lysin-bis-[4'-oxy-azobenzol-sulfonat-(4)]: 1.3 ccm der Lösung von Fraktion B versetzte man mit 2.5 ccm gesättigter wäbr. 4'-Oxy-azobenzol-sulfonsäure-(4) und brachte den ausgefallenen gelben Niederschlag durch Erwärmen in Lösung. Die beim Erkalten ausgeschiedenen, goldgelben Blättchen wurden aus Wasser umkristallisiert. Ausb. 120 mg; Zers. bei 246–248°; $[\alpha]_D^{25}$: $5.5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$, in 95-proz. Äthanol).

$C_6H_{14}O_2N_2 \cdot 2C_{12}H_{10}O_4N_2S$ (702.7) Ber. C 51.27 H 4.88 N 11.96 S 9.12

Gef. C 50.63 H 4.98 N 11.02 S 8.37

Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Wasser schmolz das Salz bei 247–249° (Zers.) und zeigte im Papierchromatogramm nur den Fleck des β -Lysins, $[\alpha]_D^{25}$: $7.6^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$, in 95-proz. Äthanol). Gef. C 52.27 H 5.32 N 11.07 S 8.89.

L- β -Lysin-dipikrat: 1.2 ccm der Lösung von Fraktion B wurden mit 4.5 ccm gesättigter wäbr. Pikrinsäure versetzt. Die ausgeschiedenen Blättchen vom Schmp. 195 bis 199° wurden aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 14 mg vom Schmp. 201–203° (Sintern ab 190°). Im Papierchromatogramm zeigte das Salz nur den Fleck des β -Lysins.

$C_6H_{14}O_2N_2 \cdot 2C_6H_3O_7N_3$ (604.4) Ber. C 35.77 H 3.34 O 42.36 N 18.54

Gef. C 35.73 H 3.60 O 42.24 N 18.32

Mol.-Gew. aus der Extinktion im UV¹⁹⁾ Gef. 602

L- β -Lysin aus dem alkalischen Hydrolysat: Die Fraktionen 311–340 des alkalischen Hydrolysates ergaben 376 mg Rückstand, die nach Reinigung mit Aktivkohle in das 4'-Oxy-azobenzol-sulfonat-(4) übergeführt wurden. Ausb. nach viermaligem Umkristallisieren aus Wasser 680 mg vom Schmp. 244–245° (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$: $+6.5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$, in 95-proz. Äthanol).

L- β -Lysin-sulfat: 640 mg des vorstehenden Salzes schüttelte man in einer Mischung aus 4 ccm 2n H₂SO₄ und 5 ccm Butanol, bis alles gelöst war, extrahierte den Farb-

¹⁸⁾ Pikrate und 4'-Oxy-azobenzol-sulfonate-(4) lassen sich mit Butanol-Eisessig-Wasser 2:1:1 direkt chromatographieren. Die Flecken sind oft in der Laufrichtung etwas ausgezogen. Die Farbstoffe wandern dabei schneller als die Aminosäuren.

¹⁹⁾ Nach der Methode von K. G. Cunningham, W. Dawson u. F. S. Spring, J. chem. Soc. [London] 1951, 2305.

stoff mit Butanol und engte die wäbr. Lösung i. Vak. auf 2 ccm ein. Das nach Zusatz von Äthanol zunächst ölig ausfallende Sulfat kristallisierte nach längerem Aufbewahren bei 0° in derben, farblosen Nadeln. Diese gaben, zweimal aus Wasser-Äthanol umkristallisiert, 117 mg papierchromatographisch reines β -Lysin-sulfat vom Schmp. 226–228° (Zers.). Durch nochmaliges Umkristallisieren konnte der Schmp. auf 228–229,5° erhöht werden. Aus den Mutterlaugen ließen sich noch 47 mg schwach gelbliche Kristalle gewinnen. Gesamtausbe. 83% d. Th.; $[\alpha]_D^{20}$: +15,4° \pm 0,4° ($c = 2,9$, in Wasser).

$C_6H_{14}O_2N_2 \cdot H_2SO_4$ (244,3) Ber. S 13.13 Gef. S 13.2 (konduktometrisch als Sulfat titriert)

L- β -Lysin: Eine Lösung von 71,1 mg L- β -Lysin-sulfat in 1 ccm Wasser wurde mit 5,09 ccm 0,11 *n* Ba(OH)₂ versetzt (p_H 9,8) und nach dem Erwärmen auf 60° (20 Min.) mit wenig Aktivkohle zentrifugiert. Der Bariumsulfat-Niederschlag wurde 2mal mit je 2 ccm Wasser nachgewaschen. Die vereinigten Lösungen hinterließen beim Eindampfen i. Vak. über Kaliumhydroxyd die theoret. Menge (43,1 mg) einer farblosen z. Tl. kristallisierten Masse, die beim Anreiben mit absol. Äthanol vollständig erstarrte. Das freie β -Lysin löste sich in heißem absol. Methanol und kristallisierte nach Zusatz von absol. Äthanol in kleinen Prismen, beim Eindampfen der methanol. Lösung i. Vak. über Kaliumhydroxyd in dünnen, farblosen Stäbchen. Die Aminosäure ist stark hygroskopisch und zieht Kohlensäure aus der Luft an. Nach zweimaligem Umkristallisieren wurden 18 mg erhalten, die um 160° schmolzen²⁰). Die Schmelze zersetzte sich ab 200° zu einem braunen Öl, das nach Aminen roch.

$C_6H_{14}O_2N_2$ (146,2) Ber. C 49,29 H 9,65 N 19,16 Gef. C 49,16 H 9,57 N 19,17

L- β -Lysin-methylester-dipikrat: Aus einem sauren Geomycin-Hydrolysat, mit dem vergebliche Kristallisationsversuche aus absol. Methanol und Äthanol angestellt worden waren, konnte mit Pikrinsäure ein auch nach wiederholtem Umfällen aus Wasser nur teilweise kristallisiertes Geamin-dipikrat erhalten werden. Aus den vereinigten und eingeengten Mutterlaugen schieden sich nach einigen Wochen in geringer Menge große, zitronengelbe Kristalle vom Schmp. 187–188° ab. Ausb. nach dreimaligem Umkristallisieren aus Wasser 161 mg vom Schmp. 188,5–190°.

$C_7H_{16}O_2N_2 \cdot 2C_6H_3O_7N_3$ (618,4) Ber. C 36,90 H 3,59 O 41,39 N 18,12 CH₃O 5,0
Gef. C 37,05 H 3,43 O 40,79 N 17,63 CH₃O 4,9

Hydrolyse: Je 3 mg Ester-pikrat hydrolysierte man in 0,4 ccm 6*n* HCl bzw. 0,4 ccm 0,43 *n* Ba(OH)₂ 12 Stdn. im zugeschmolzenen Röhrchen bei 110° und machte die alkalische Lösung anschließend mit Schwefelsäure schwach sauer. Beide Hydrolysate wurden durch Ausäthern von der Pikrinsäure befreit, i. Vak. zur Trockene verdampft und in 0,03 ccm Wasser zur Papierchromatographie verwendet.

Tafel 5. Veresterung der Lösungsmittelgemische bei 20°

		nach 1 Tag in % der inges. Säure	nach 12 Tagen in % der inges. Säure
Isopropanol-Ameisensäure-Wasser ..	30:2:10	6	19
Isopropanol-Eisessig-Wasser	30:2:20	0	0
Butanol-Eisessig-Wasser	2:1:1	1	7

Durch Titration mit *n* NaOH bestimmt.

Tafel 6. R_F -Werte der Hauptabbauprodukte

	Butanol-Eisessig- Wasser 2:1:1	Phenol-0,2-proz. wäbr. Ammoniak
Geamin	0,18	0,69
β -Lysin	0,24	0,86
A ₁	0,15	
A ₂	0,19	0,39
A ₃	0,25	0,48

²⁰) Die Schmelzpunktbestimmung ist wegen des stark hygroskopischen Verhaltens der Substanz ungenau.