

Somit ist die Reihenfolge der Haftfestigkeit der untersuchten Ester im Zinkcarbonatchromatogramm folgende:

Glykokollderivat > Alaninderivat > Leucinderivat > Valinderivat.

Da die grössere Haftfestigkeit des Leucinderivates im Vergleich mit dem Valinderivat überraschend war, haben wir mit der Mischung von N-p-Phenyl-azobenzoyl-*l*-valin-methylester und N-p-Phenyl-azobenzoyl-*l*-leucin-methylester die chromatographische Trennung wiederholt. Hier wurde, im Gegensatz zum ersten Versuch, das Derivat des optisch aktiven Leucins, nicht des Racemates, verwendet.

Die Mischung von 40 mg Valinderivat und 110 mg Leucinderivat in 8 cm³ Benzol gelöst, wurde nach dem Vorwaschen der Säule mit einer Mischung von 90 % Ligroin und 10 % Benzol in diese eingesaugt. (Länge der Adsorptionsschicht 30 cm, Durchmesser 27 mm). Nach der Entwicklung mit 370 cm³ Ligroin-Benzolmischung war eine gefärbte Schicht in den Durchlauf ausgewaschen, eine andere haftete noch in der Röhre. Aus letzterer gewann man nach der Elution 42 mg N-p-Phenyl-azobenzoyl-*l*-leucin-ester vom Smp. 104°, während sich aus dem Durchlauf N-p-Phenyl-azobenzoyl-*l*-valin-methylester vom Smp. 138° isolieren liess.

Auch bei Verwendung des optisch aktiven Leucinderivates haftete dieses in der Zinkcarbonatsäule somit weniger als die Valinverbindung.

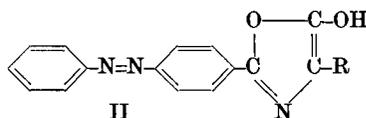
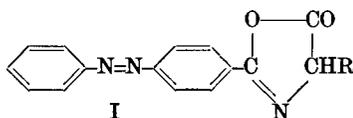
Zürich, Chemisches Institut der Universität.

6. Die Natur der *Waser'schen* spezifischen Farbreaktion auf α -Aminosäuren

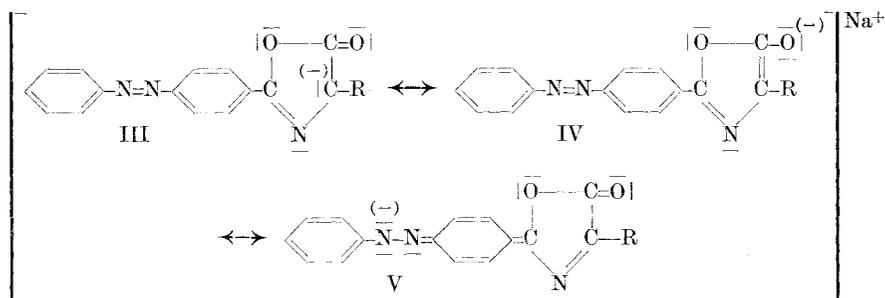
von P. Karrer und R. Keller.

(1. XII. 42.)

In der voranstehenden Abhandlung¹⁾ war gezeigt worden, dass bei der Einwirkung von Azobenzol-p-carbonsäurechlorid auf einige Aminosäuren (z. B. Leucin und Valin) „Lactone“ gebildet werden, die dadurch charakterisiert sind, dass sie tief farbige, violettblaue bis blaue Alkalisalze bilden. Für diese „Lactone“ treffen die tautomeren Formeln I und II zu, und die tiefen Farben der Salze wurden auf Mesomerie im Sinne der Bilder III, IV und V zurückgeführt.

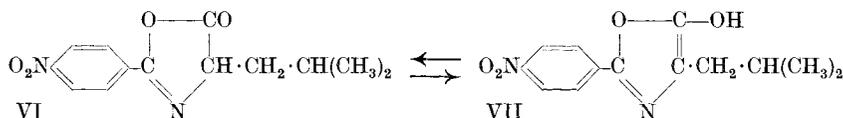


¹⁾ Helv. 26, 38 (1943).



Diese Farbreaktion erinnert nun an eine andere, ähnliche Farbreaktion, die *E. Waser* vor längerer Zeit beschrieben hat¹⁾. Diese besteht darin, dass man p-Nitrobenzoylchlorid auf α -Aminocarbonsäuren bei Gegenwart von Soda oder besser Pyridin einwirken lässt. Dabei treten mit allen Eiweiss-aminosäuren tiefe violette bis blaue Färbungen auf. Der Verlauf dieser Reaktion und die Reaktionsprodukte konnten von *Waser* nicht aufgeklärt werden und auch *Edlbacher* und *Litvan*²⁾, die sich später mit dieser Reaktion beschäftigten, machen über die eigenartigen Reaktionsprodukte keine Angaben.

Wir vermuteten, dass in diesen violetten Salzen ähnliche Stoffe vorliegen könnten, wie sie durch die Formeln III, IV und V dargestellt sind, wobei der Rest des Azobenzols hier durch den p-Nitrophenylrest ersetzt wäre. Es ist uns ohne Schwierigkeiten gelungen, die Richtigkeit dieser Annahme zu beweisen, indem sich bei der Einwirkung von p-Nitrobenzoylchlorid auf Leucin bei Gegenwart von 1 Mol Natronlauge neben p-Nitrobenzoyl-leucin das Lacton VI bzw. VII, d. h. 4-Isobutyl-2-[p-nitrophenyl]-oxazol-5, in kristallisiertem Zustand gewinnen liess. Dieses gibt mit Alkalihydroxyden und Soda die intensiv blauvioletteten Alkalisalze, die bei der *Waser'schen* Reaktion auftreten.



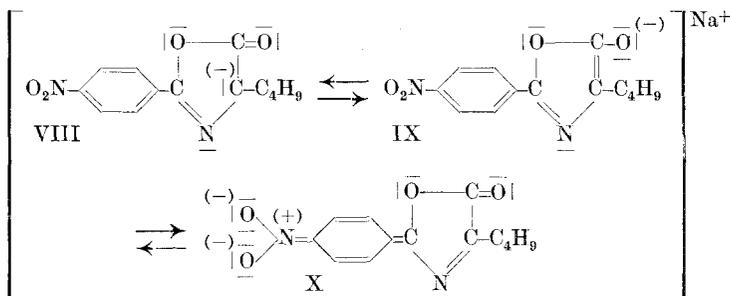
Durch Einwirkung von Lauge wird die Verbindung zu *d, l*-p-Nitrobenzoyl-leucin aufgespalten.

Für die Formulierung der violetten Salze dieser Verbindungen ist die Tatsache von Bedeutung, dass sich die Reaktion nur mit p-Nitrobenzoylchlorid durchführen lässt und o- und m-Nitrobenzoylchlorid, Benzoylchlorid usw. keine ähnlichen Farbreaktionen mit Aminosäuren veranlassen. Die para-ständige Nitrogruppe muss daher

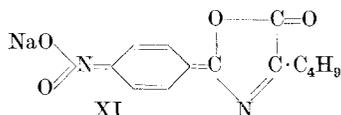
¹⁾ *E. Waser* und *E. Brauchli*, *Helv.* **7**, 757 (1924). — *E. Waser*, *Verhandl. Schweiz. Naturforsch. Ges.* Davos **1929**, II. Teil, S. 142. — *Mitt.* **20**, Heft 4/5 (1929). — *Schweiz. med. Wochenschr.* **59**, 602 (1929).

²⁾ *Z. physiol. Ch.* **265**, 241 (1940); **267**, 285 (1941).

dem chromophoren System angehören. Dies ist der Fall, wenn die blauvioletteten Alkalisalze in den folgenden mesomeren Zuständen vorliegen:



Die mesomere Zustandsform X würde in der älteren Schreibweise der Strukturformel XI entsprechen:



d. h. das Natriumsalz einer Nitronsäure sein. Durch diese Strukturbilder, die viele Doppelbindungen in Konjugation enthalten, wird die tiefe Farbe dieser Salze erklärt.

Das 4-Isobutyl-2-p-nitrophenyl-oxazolon-5 bzw. dessen Enolform ist eine ziemlich starke Säure. Seine blauvioletteten Alkalisalze entstehen schon bei $p_{\text{H}} = 5,3$. Wenn man die Benzollösung der Verbindung durch eine Säule von Zinkcarbonat oder Aluminiumoxyd giesst, färbt sich das Adsorbens infolge Salzbildung mit dem 4-Isobutyl-2-p-nitrophenyl-oxazolon-5 tief blau.

Das bei dem Umsatz von *l*-Leucin mit p-Nitrobenzoylchlorid erhaltene p-Nitrobenzoyl-leucin ist optisch inaktiv; auch das bei der Benzoylierung des *l*-Leucins nach dem Verfahren von *Schotten-Baumann* gebildete Benzoylderivat kann racemisiert sein¹⁾. Der Grund dieser Racemisierungserscheinungen dürfte entsprechend den in dieser Abhandlung beschriebenen Beobachtungen darin bestehen, dass diese Benzoylderivate auf dem Umweg über die Lactone, die selbst als Folge ihres Enolisierungsvermögens optisch inaktiv sind, gebildet werden.

Experimenteller Teil.

Zu einer Lösung von 10 g *l*-Leucin in 38,2 cm³ 2-n. Natronlauge (ein Äquivalent) wurde eine Lösung von 14 g p-Nitrobenzoylchlorid in 150 cm³ Äther unter ständigem Schütteln in Anteilen im Laufe

¹⁾ A. Schultze, Z. physiol. Ch. 29, 470 (1900); E. Fischer, B. 33, 2379 (1900).

von 30 Minuten zugegeben. Bei dieser Arbeitsweise bleibt bis zur vollendeten Säurechlorid-Zugabe ein Überschuss von Leucin im Reaktionsgemisch vorhanden. Dieses schüttelte man hierauf 2 Stunden auf der Maschine und liess es über Nacht stehen.

An der Grenzfläche der beiden Flüssigkeits-Phasen blieb ein fester Stoff suspendiert, der sich nach dem Abtrennen und Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol als unverändertes Leucin erwies (0,5 g).

Die wässrige Phase wurde mehrmals mit Äther gewaschen und hierauf eingengt. Der Rückstand bestand aus Kochsalz und Leucin, dessen Menge ca. 1 g betrug.

Die durch Extraktion der wässrigen Phase gewonnenen Ätherlösungen wurden mit dem Hauptteil der ätherischen Phase vereinigt, diese Lösung mit Calciumchlorid getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Den festen Rückstand kochten wir 5mal mit je 50 cm³ Benzol aus. Die vereinigten benzolischen Auszüge, die bei Zusatz von alkoholischer Kalilauge starke Blaufärbung zeigten, wurden auf 50 cm³ eingengt und hierauf 24 Stunden stehen gelassen. Dabei krystallisierten noch einige mg fester Anteile aus, die mit dem beim Auskochen mit Benzol nicht gelösten Krystallgemisch, das die Hauptmenge der Reaktionsprodukte bildete, vereinigt wurden (A).

Die klare, schwach gelbe benzolische Lösung (B) schüttelten wir zur Entfernung saurer Anteile einmal mit verdünnter Natriumbicarbonatlösung schnell aus und trennten die wässrige Phase, die sich violett färbte, schnell von der Benzolschicht ab. Letztere wurde hierauf mit Wasser gewaschen, getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert (Badtemperatur nicht über 70°). Es blieben 1,85 g eines kaum gefärbten Öls zurück, das in der Kälte wachsartig erstarrte.

Zur Reinigung dieser Fraktion haben wir sie in 5 cm³ Benzol gelöst, wobei nur einige mg ungelöster Substanz zurückblieben. Zur Benzollösung wurde hierauf portionsweise Petroläther zugesetzt, wodurch Fällungen entstanden. Diese trennten wir jeweilen nach dem Stehen der Lösung bis zu ihrer Klärung durch Dekantieren der Mutterlauge ab. In der ersten Fällung waren neben öligen Produkten feste, in Benzol schwer lösliche Anteile enthalten; die zweite Fällung enthielt vorwiegend ölige Bestandteile, während die dritte Fällung neben Krystallen des 4-Isobutyl-2-p-nitrophenyl-oxazolons-5 ca. 10 mg Krystalle von p-Nitrobenzoesäure-anhydrid enthielt, die nach dem Auskochen mit ½ cm³ Alkohol bei 182° (unkorr.) schmolzen.

Aus der Mutterlauge, die nach Abtrennung der dritten Fällung übrigblieb, krystallisierten nach dem Stehen im Eisschrank grosse, sehr schwach gelblich gefärbte Krystalle, die sich in Benzol leicht

lösten, und die sich als 4-Isobutyl-2-p-nitrophenyl-oxazolon-5 erwiesen. Smp. 76°. Ausbeute 1,0 g.

$C_{13}H_{14}O_4N_2$	Ber. C 59,54	H 5,38%
	Gef. „ 59,33	„ 5,21%

Dieses „Nitrobenzoyl-leucin-lacton“ gibt bei Zusatz von Alkalien in wässriger oder alkoholischer Lösung violette Farbreaktionen. Wird als Lösungsmittel Pyridin, Aceton oder auch Acetessigester verwendet, so ist die Farbe rein blau.

Die Beständigkeit des Lactons gegen Laugen ist gering. Die Farbe einer Lösung von 0,15 g Lacton in 4 Äquivalenten 0,1-n. NaOH verschwand innerhalb 36 Stunden (Zimmertemperatur). Auch in mineral-saurer Lösung erfolgt Zersetzung. In Benzollösung scheint das Lacton beständig zu sein.

Ausser Benzol lösen auch Aceton und Alkohol das Lacton leicht auf; ob dabei Umsetzungen eintreten, wurde noch nicht untersucht. In Petroläther ist es unlöslich.

Die nach der Extraktion mit Benzol zurückgebliebenen festen Anteile (A) wurden zur Reinigung mit 350 cm³ Wasser in 3 Anteilen ausgekocht und heiss abgenutscht. Aus der wässrigen Lösung krystallisierte p-Nitrobenzoesäure aus. Sie war noch durch etwas p-Nitrobenzoyl-leucin verunreinigt. Die farblosen, in Wasser nicht löslichen Anteile des Krystallpulvers wurden in soviel Alkohol gelöst, dass eine nahezu heiss gesättigte Lösung entstand. Im Eisschrank krystallisierten daraus weisse Krystallblättchen von N-p-Nitrobenzoyl-leucin, die noch etwas Nitrobenzoesäure enthielten. Zur Entfernung der letzteren haben wir sie mit 20 cm³ Wasser ausgekocht, heiss abgenutscht und den Rückstand mit 10 cm³ heissem Wasser gewaschen. Hierauf wurden sie aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert.

Das so erhaltene N-p-Nitrobenzoyl-leucin krystallisierte in farblosen Blättchen vom Smp. 222—223°. Es zeigte keine optische Aktivität (0,2995 g in 12,339 g Aceton). Ausbeute 2 g. Weitere erhebliche Mengen der Verbindung befanden sich zusammen mit Nitrobenzoesäure in der alkoholischen Mutterlauge, aus denen das reine Nitrobenzoyl-leucin auskrystallisiert war.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.
