

# Die Überführung von Glykokoll in Diglykolamidsäure und Triglykolamidsäure.

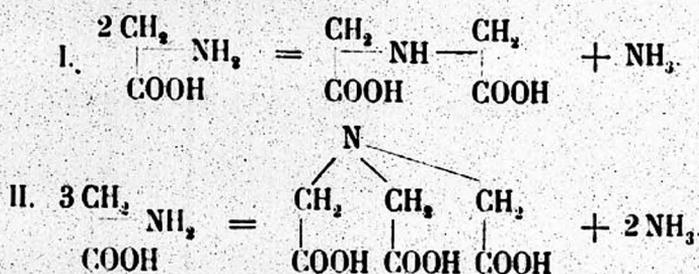
Von  
M. Siegfried.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Institutes der Universität Leipzig.)  
(Der Redaktion zugegangen am 22. Juni 1911.)

Wir wissen, daß die Pflanze in ausgedehntem Maße die Fähigkeit besitzt, Aminosäuren mit höherem Kohlenstoffgehalt aus solchen mit niederem aufzubauen. Über den Verlauf solcher Synthesen sind wir nicht unterrichtet. In dieser Beziehung erscheint es bemerkenswert, daß aus Glykokoll bei Körpertemperatur durch die Gegenwart von Quecksilberchlorid Diglykolamidsäure, die der Asparaginsäure isomer ist, und Triglykolamidsäure unter Abspaltung von Ammoniak entstehen.

Aus der 2 Atome C enthaltenden Säure sind also solche mit 4 bzw. 6 Atomen C entstanden.

Gleichzeitig erfolgt bei dieser Reaktion die Reduktion von Quecksilberchlorid zum Chlorür. Ob die Bildung der Diglykolamidsäure und Triglykolamidsäure mit Hilfe einer Zwischenreaktion, bei der die Oxydationswirkung des Quecksilberchlorides in Betracht kommt, geschieht, läßt sich zurzeit nicht sagen, wenn auch der Umstand, daß Alanin bei Gegenwart von Sublimat nicht Iminodipropionsäure oder Trilactamidsäure bildet, dafür spricht. Der Gesamtverlauf wird jedenfalls durch folgende Gleichungen wiedergegeben:



Bei der Verwendung synthetischen Glykokolls besteht die Gefahr, daß dieses mit Diglykolamidsäure verunreinigt ist. Deshalb wurde das zu den Versuchen benutzte Glykokoll Kahlbaum, wie im experimentellen Teile angegeben wird, sorgfältigst auf die Gegenwart von Diglykolamidsäure geprüft und ihre Abwesenheit festgestellt. Es wurde ferner gezeigt, daß auch Glykokoll, das von mir aus Hippursäure dargestellt war, das also mit Diglykolamidsäure nicht verunreinigt sein konnte, die Reaktion gibt.

Die hier mitgeteilte Tatsache wurde bei der weiteren Verfolgung der Beobachtung, daß die Lösungen der säurehydrolytischen Zersetzungsprodukte der Gelatine Sublimat unter Bildung von Quecksilberchlorür reduzieren, aufgefunden. Es ergibt sich daraus, daß die Verwendung von Quecksilbersalzen bei der Aufarbeitung von Eiweißspaltungsprodukten mit dem Bewußtsein zu geschehen hat, daß durch sie Glykokoll und vielleicht noch andere Spaltungsprodukte verändert werden.

Die Reduktion des Mercurichlorids durch Glykokoll wird durch die Gegenwart verschiedener Ionen beeinflußt. So oxydiert z. B. Mercurichlorid bei Gegenwart von Natriumchlorid oder Salzsäure viel langsamer, als ohne dieselbe. Die hierüber bisher angestellten Versuche haben ergeben, daß die oxydierende Wirkung des Quecksilberchlorides und anderer Mercurisalze vom Ionenzustande abhängt. Diese Tatsache dürfte als Parallele zur Giftwirkung der Mercurisalze in Betracht kommen und daher biologisches Interesse haben. Die Verhältnisse liegen sowohl für die Beurteilung der Gift- als Oxydationswirkung einigermaßen verwickelt, da die Mercurisalze in so mannigfacher Weise Komplexsalze bilden. Hier kommt noch hinzu, daß Quecksilberoxyd Glykokoll so schnell oxydiert, und daß daher die Hydrolyse der Mercurisalze bei der Beurteilung der Oxydationswirkung der Mercuriionen weitgehend zu berücksichtigen ist. Es werden also sowohl die Umstände, welche die Dissoziation, als solche, welche die Hydrolyse der Mercurisalze begünstigen, die Oxydationswirkung fördern.

Über die diesbezüglichen Untersuchungen soll später berichtet werden, ein Teil der Resultate derselben ist bereits

mitgeteilt worden. An derselben Stelle ist auch der größere Teil der im folgenden angegebenen Versuche mitgeteilt worden. Ich führe diese besonders deshalb nochmals an, weil nach Privatmitteilungen aus Referaten irrtümlich geschlossen worden ist, daß die aufgefundene Diglykolamidsäure (über die Bildung der Triglykolamidsäure ist an genannter Stelle noch nicht berichtet worden) nicht ein Reaktionsprodukt, sondern eine Verunreinigung des verwendeten Glykokolls gewesen sei.<sup>1)</sup>

### Experimenteller Teil.

Versuch I. In die siedende Lösung von 271 g Quecksilberchlorid in 800 ccm Wasser wurden 75 g Glykokoll Kahlbaum eingetragen; geringe Kohlensäureentwicklung. Nach 18stündigem Erwärmen im Luftbade auf 70—75° abgesaugt. Gewicht des mit Wasser ausgewaschenen und getrockneten Quecksilberchlorürs: 199 g. Nach weiterem 24stündigen Erwärmen auf 70—75° noch erhalten: 7,8 g. Von dem jetzt erhaltenen Filtrate wurden 50 ccm zum Nachweis des gebildeten Ammoniaks verwendet (s. S. 200). Der Rest des Filtrates auf dem Wasserbade eingengt, mit der heißen wässerigen Lösung von 150 g Quecksilberchlorid vermischt und weitere 48 Stunden bei 70—75° belassen. Es hatten sich weitere 32,9 g HgCl<sub>2</sub> ausgeschieden; nach weiteren 120 Stunden (bei 70—75°) waren noch 9,2 HgCl<sub>2</sub> gebildet. Im ganzen waren also aus 420 g HgCl<sub>2</sub>, 248,9 g HgCl<sub>2</sub> entstanden.

Von dem mit dem Waschwasser vereinigten Filtrate, dessen Volumen 1120 ccm betrug, wurden 100 ccm zu Vorversuchen verwendet. Aus dem Reste wurde das Quecksilber durch Ammoniak ausgefällt, das Filtrat solange mit heißer Barythydratlösung vermischt, bis eingetauchtes Lackmuspapier auch nach dem Erwärmen auf dem Wasserbade blau blieb. Die geringe Ausscheidung, welche sich bei der Untersuchung als Baryumoxalat erwies, wurde abfiltriert, das Filtrat auf

<sup>1)</sup> M. Siegfried, Über die Einwirkung von Quecksilberchlorid auf Glykokoll. Ber. d. mathem. phys. Kl. d. Königl. Sächs. Ges. d. Wissenschaften. Bd. 62, S. 57 (1910).

dem Wasserbade eingedampft, in Wasser aufgenommen, das Baryum mit Schwefelsäure genau ausgefällt, das Filtrat vom Baryumsulfat eingeengt. Durch Alkohol wurde aus dem Rückstande ein Chloridgemenge auskrystallisiert, das, wie weiter unten angegeben wird, verarbeitet wurde.

Nach Eindampfen des Filtrates wurde der in Wasser gelöste Rückstand desselben mit Silbersulfat entchlort, das Filtrat vom Chlorsilber mit Barythydrat  $\text{SO}_4$ -frei gemacht und der überschüssige Baryt durch Ammoncarbonat entfernt. Durch Zusatz von Silbernitrat und ammoniakalischer Silbernitratlösung wurde ein starker Niederschlag gefällt, der nach sorgfältigem Auswaschen mit kaltem Wasser durch Schwefelwasserstoff zersetzt wurde. Aus dem zum Sirup eingedampften Filtrate vom Schwefelsilber krystallisierten bei allmählichem Zusatz von Alkohol schwachgefärbte Blättchen aus, die abgesaugt, mit etwas kaltem Wasser nachgewaschen und aus Wasser umkrystallisiert wurden. Sie wurden so farblos erhalten und nochmals aus Wasser, diesmal unter Zusatz von Alkohol, umkrystallisiert; über Schwefelsäure im Vakuum bis zum konstanten Gewichte getrocknet. Fp.  $236^\circ$ .

Die Substanz war, wie zu erwarten, optisch inaktiv.

0,2247 g in 25 ccm gelöst  $l = 2$ ,  $\alpha = 0^\circ (\pm 0,02^\circ)$ .

#### Analysen:

- I. 0,1429 g Substanz gaben 0,1902 g  $\text{CO}_2$  und 0,0693 g  $\text{H}_2\text{O}$   
 II. 0,1712 » » erfordern 12,7 ccm  $n_{10}$ -S.

Gefunden:	Berechnet für $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$ :
C 36,24%	36,09%
H 5,39%	5,26%
N 10,39%	10,53%.

#### Silbersalz.

Aus der mit Ammoniak alkalisch gemachten wässerigen Lösung der Säure wurde durch Silbernitrat das in Wasser fast unlösliche Silbersalz abgeschieden, das nach Auswaschen mit Wasser über Schwefelsäure bis zum konstanten Gewichte getrocknet wurde.

0,2652 g Substanz gaben 0,1639 g Ag.

Gefunden:	Berechnet für $C_4H_5NO_4Ag_2$ :
Ag 61,80 %	62,25 %.

### Kupfersalz.

Nach Kochen der wässrigen Lösung der Säure mit anhydrichem Kupferoxydhydrat und Einengen des Filtrates krystallisierte ein intensiv helles Kupfersalz aus, dessen Ausscheidung durch Alkohol fast völlig erreicht wurde.

0,1248 g Substanz, kurz über Schwefelsäure getrocknet, verloren beim Erhitzen auf  $130^\circ$  nur 0,0013 g.

0,1248 g über  $H_2SO_4$  kurz getrocknete Substanz (a) = 0,1235 g bei  $130^\circ$  getrockneter Substanz (b) gaben 0,0506 g CuO.

Gefunden:		Berechnet
a	b	für $C_4H_5NO_4Cu$ :
Cu 32,40 %	32,74 %	32,63 %.

Das Kupfersalz krystallisiert also im Gegensatze zum asparaginsäuren Kupfer ohne Krystallwasser.

Aus den Mutterlaugen der Diglykolamidsäure wurden weitere 0,90 g Kupfersalz erhalten.

Gefunden:	Berechnet:
Cu 32,57 %	32,63 %.

Aus dem oben erwähnten Chlorhydratgemische wurden ferner 3,5 g diglykolamidsäures Silber erhalten. Es berechnet sich eine Gesamtausbeute an Diglykolamidsäure von 3,1 g, d. i. unter Berücksichtigung des Abzuges der angeführten zu Nebenversuchen verwendeten Mengen der Reaktionslösung rund 5 % vom angewandten Glykokoll.

### Prüfung des verwendeten Glykokolls auf etwaige Verunreinigung mit Diglykolamidsäure.

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß aus der Reaktionslösung des ersten Versuches Diglykolamidsäure isoliert werden kann, war zunächst die Frage zu beantworten: Ist das Glykokoll Kahlbaum sicher auch frei von Diglykolamidsäure? War es von vornherein unwahrscheinlich, daß das Glykokoll

in so starker Weise verunreinigt sei, so war doch die Möglichkeit zu berücksichtigen, da aus Monochloressigsäure durch Ammoniak neben Glykokoll Diglykolamidsäure entsteht.

Deshalb wurde erstens die Lösung von 5 g des im Versuch I verwendeten Glykokolls in ca. 200 ccm Wasser mit ammoniakalischer Silbernitratlösung und 10%iger Silbernitratlösung abwechselnd vermischt. Es erfolgte keine Ausscheidung eines Silbersalzes. Da diese Reaktion auf Diglykolamidsäure wegen der fast völligen Unlöslichkeit des Silbersalzes sehr scharf ist, geht schon aus dem Umstande, daß keine Fällung erhalten wurde, die Abwesenheit der Diglykolamidsäure hervor. Es wurde aber mit der ganz unwahrscheinlichen Möglichkeit gerechnet, daß aus irgend einem nicht erkennbaren Grunde die Abscheidung des Silbersalzes verzögert oder gehemmt wurde. Deshalb wurde noch weiter Silbernitratlösung zugesetzt und die Lösung im Eisschranke aufbewahrt. Es krystallisierte so ein hartes Silbersalz aus. Wäre Diglykolamidsäure im Glykokoll zugegen gewesen, so hätte dieses Silbersalz sicher das Silbersalz dieser Säure enthalten müssen. Es wurde abgesaugt, mit eiskaltem Wasser gewaschen, mit Schwefelwasserstoff zersetzt und aus dem Filtrate vom Schwefelsilber nach Einengen zum dünnen Sirup die Substanz mit Alkohol krystallisiert. Ausbeute 0,5 g.

Die erhaltenen Krystalle erwiesen sich bei der Analyse als reines Glykokoll.

0,1303 g verbrauchten 17,3 ccm  $n_{10}$ -S.

Gefunden: Berechnet für  $C_2H_5NO_2$ :

N : 18,66% 18,58%.

Somit ist die Abwesenheit der Diglykolamidsäure in dem verwendeten Glykokoll nachgewiesen.

Das zu den folgenden Versuchen dienende Glykokoll wurde in Mengen von 15 g mit ebenfalls negativem Resultate durch Silbernitrat- und ammoniakalische Silbernitratlösung auf die Gegenwart von Diglykolamidsäure geprüft und die Abwesenheit der letzteren erwiesen.

Schließlich wurden 60 g des Glykokolls in 400 ccm Wasser gelöst, mit Zinkoxyd anhaltend gekocht. Auf diese Weise er-

hält man aus diglykolamidsäurehaltigem Glykokoll schwerlösliches diglykolamidsaures Zink.<sup>1)</sup> Der nach Absaugen und Auswaschen mit wenig Wasser erhaltene Zinkniederschlag wurde mit Schwefelammonium anhaltend auf dem Wasserbade digeriert, das Filtrat völlig eingedampft. Eine Fällung mit Silbernitrat war mit der Lösung des geringen Rückstandes in keiner Weise zu erzielen.

### Nachweis des bei der Reaktion entstehenden Ammoniaks.

50 ccm des Filtrates vom Mercurichloridniederschlag (s. S. 196) wurden mit Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit, nach Verjagen des Schwefelwasserstoffs mit Natronlauge alkalisiert und destilliert. Aus dem in Salzsäure aufgefangenen Destillate wurde das Platinsalz dargestellt, das nach Umkrystallisieren aus Wasser folgenden Wert bei der Analyse gab:

0,2353 g Substanz gaben 0,1027 g Pt.

Gefunden:            Berechnet für  $\text{PtCl}_6(\text{NH}_4)_2$ :

Pt: 43,64 %

43,80 %.

Versuch II. 45 g Glykokoll in 150 ccm heißen Wassers gelöst, dazu die heiße Lösung von 65 g Sublimat in 200 ccm Wasser 22 Stunden auf 70—75° erwärmt. Da hier Glykokoll im großen Überschusse verwendet war, war das Sublimat völlig zu Quecksilberchlorür reduziert worden. Nach Ausfällen mit Silbernitrat wurde zu dem Filtrate vom Chlorsilber Ammoniak und Silbernitrat gegeben. Die durch Zersetzen des erhaltenen, mit Wasser ausgewaschenen Silberniederschlages mit Schwefelwasserstoff gewonnene Lösung wurde nach Auskochen des letzteren mit Zinkoxyd gekocht, der Zinkniederschlag mit Schwefelammonium zersetzt. Aus dem durch Eindampfen des Filtrates vom Schwefelzink gewonnenen Rückstande wurde wieder durch Silbernitrat- und ammoniakalische Silberlösung das Silbersalz der Diglykolamidsäure gefällt, aus diesem die Säure dargestellt, die nach dreimaligem Umkrystallisieren aus Wasser unter Alkoholzusatz analysenrein war.

<sup>1)</sup> Heintz, Liebigs Annalen, Bd. 145, 49.

Analyse: 0,1889 g Substanz erfordern 14,1 ccm  $n_{10}$ -Säure.

Gefunden:	Berechnet:
N: 10,43%	10,53%.

Die Ausbeute betrug 1,2 g.

Versuch III. In die Lösung von 271 g Quecksilberchlorid in 3,5 l Wasser wurde die Lösung von 37,5 g Glykokoll in 1 l warmen Wassers gegeben. Die Mischung blieb bei Zimmertemperatur vom 23. Februar bis 29. April stehen, wurde dann nach Zusatz weiterer 37,5 g Glykokoll 24 Tage bei 40° gehalten. Das Filtrat vom Quecksilberchlorür wurde mit Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit, das Filtrat vom Schwefelquecksilber eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst, mit Silbernitrat entchlort, das in Eis gekühlte Filtrat mit Ammoniak alkalisch gemacht und mit Silbernitrat- und ammoniakalischer Silbernitratlösung ausgefällt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser sorgfältig gewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt.

Der aus dem Filtrate vom Schwefelsilber durch Eindampfen gewonnene dünne Sirup erstarrte beim Erkalten zur Krystallmasse. Nach Umkrystallisieren aus Wasser unter Zusatz von Alkohol wurden 6,9 g der farblosen Säure erhalten.

Analyse: 0,1440 g Substanz erfordern 11,1 ccm  $n_{10}$ -Säure.

Gefunden:	Berechnet:
N: 10,78%	10,53%.

Aus den Mutterlaugen der Säure wurden 5,0 g diglykolamidsaures Silber gewonnen, entsprechend 1,9 g Säure. Somit beträgt die Gesamtausbeute 8,8 g. Da zu Zwischenversuchen aus der Reaktionsmischung  $\frac{1}{45}$  weggenommen war, waren diese 8,8 g Diglykolamidsäure aus 73,3 g Glykokoll entstanden. Die Ausbeute betrug also 13,5% der Theorie.

Der Schmelzpunkt (Zersetzungspunkt) der Säure lag nach einmaligem Umkrystallisieren bei 247° und blieb derselbe bei nochmaligem Umkrystallisieren. Entgegen den Angaben der Literatur schmolz auch aus Monochloressigsäure von mir dargestellte, über das Zink- und Silbersalz gereinigte Diglykolamidsäure bei 247,5°, nachdem die Säure zweimal aus Wasser

unter Alkoholzusatz umkrystallisiert war. Die Identität der Säuren wird mit Sicherheit dadurch bewiesen, daß ein Gemenge beider Säuren ebenfalls bei  $247^{\circ}$  unter Zersetzung schmolz.

Verwendet wurde ein von der Reichsanstalt geprüftes Thermometer, dessen Skala bei  $200^{\circ}$  erst beginnt und welches bei den Schmelzpunktsbestimmungen bis fast zu dieser Stelle eintauchte.

### Kryoskopische Molekulargewichtsbestimmung.

Apparat Beckmann. Lösungsmittel Wasser.

Substanz: 0,2277 g. Vol. d. Wassers: 10 ccm:  $T = 0,308^{\circ}$ .

Gefunden:

Berechnet:

M: 136

133.

### Isolierung der Triglykolamidsäure.

Verwendet wurde von mir selbst aus Hippursäure dargestelltes Glykokoll, welches also von Diglykolamidsäure und Triglykolamidsäure völlig frei war.

271 g Sublimat in 4300 ccm warmen Wassers gelöst, dazu die Lösung von 37,5 g Glykokoll in 400 ccm Wasser. Nach 6 Tagen noch 13 g desselben Glykokolls dazu, nach weiteren Tagen noch 11 g desselben Glykokolls dazu. Während des ganzen Versuches befand sich die Mischung im Brutschrank. Nach 29 Tagen abgesaugt, Filtrat mit  $\text{SH}_2$  vom Quecksilber befreit, Cl durch  $\text{AgNO}_3$  ausgefällt, Filtrat vom Chlorsilber mit Silbernitrat + Ammoniak ausgefällt. Dieses Silbersalz lieferte bei der Zersetzung mit Schwefelwasserstoff eine schön krystallisierende, sehr schwer lösliche Säure, die erst durch Auskochen des Silbersulfids durch Schwefelammonium vollständig erhalten werden konnte. Nach Umkrystallisieren aus heißem Wasser wurden 2,95 g dieser Säure erhalten, das sind 4,8% des angewandten Glykokolls und 5,7% der Theorie.

Die Elementaranalyse gab Werte, welche mit den für Triglykolamidsäure berechneten übereinstimmen.

I. 0,1380 g Substanz über  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bis zum konstanten Gewicht getrocknete Substanz erforderten 7,2 ccm  $n/10$ -Säure.

II. 0,1013 g Substanz über  $H_2SO_4$  bis zum konstanten Gewicht getrocknete Substanz gaben 0,1379 g  $CO_2$  und 0,0414 g  $H_2O$ .

Gefunden:	Berechnet für $Cl_6H_4NO_6$ :
C: 37,16%	37,69%
H: 4,54%	4,71%
N: 7,29%	7,33%

Die Säure bindet ebenso wie Triglykolamidsäure keine Salzsäure. Nach Eindampfen mit Salzsäure gab der Rückstand keine Cl-Reaktion.

Schmelzpunkt: 256—257° unter Zersetzung.

Synthetisch aus Monochloressigsäure zum Vergleich dargestellte Triglykolamidsäure schmolz bei 258—59° unter Zersetzung. Ein Gemisch beider bei 256—257°. Benutzt wurde ein von der Reichsanstalt geprüftes Thermometer, dessen Skala bei 200° erst beginnt und das bis fast zu diesem Punkte bei der Schmelzpunktbestimmung in die Schwefelsäure eintauchte.

Schließlich wurde das Silbersalz dargestellt, indem die schwach ammoniakalische wässrige Lösung der Säure mit Silbernitratlösung ausgefällt wurde, das Silbersalz abgesaugt, mit Wasser und dann Alkohol gewaschen und über Schwefelsäure im Vakuum bis zum konstanten Gewichte getrocknet wurde.

0,1501 g Substanz gaben 0,0954 g Ag.

Gefunden:	Berechnet für $C_6H_6NO_6Ag_3$ :
Ag: 63,55%	63,28%

Bei Parallelversuchen mit Alanin konnte niemals Imino-dipropionsäure oder eine Trilactamidsäure erhalten werden. Es wurde fast das gesamte angewandte Alanin nach Entfernung des Quecksilbers und Chlors wiedergewonnen.