

Über ein einfaches und bequemes Verfahren zur Darstellung der freien Ester der Aminosäuren.

Von

N. Zelinsky, A. Annenkoff und J. Kulikoff.¹⁾

(Aus dem Laboratorium für organische Chemie an der Universität Moskau)
(Der Redaktion zugegangen am 13. Juli 1911.)

Die freien Ester der Aminosäuren haben sich bekanntlich im Gegensatz zu den Säuren selbst, dank ihrer Eigenschaft, im Vakuum ohne Zersetzung zu destillieren, als sehr geeignet zur Reinigung und Trennung der einzelnen Aminosäuren erwiesen. E. Fischers Methode der Überführung der Aminosäuren in ihre Ester hat nicht nur die Abscheidung bekannter Aminosäuren erleichtert, sondern hat auch zur Entdeckung neuer Säuren geführt, sowie die Möglichkeit erbracht, die Mischung der hydrolytischen Spaltungsprodukte des Eiweißes in ihre Bestandteile zu zerlegen, während es früher unmöglich war, sich in derselben genau zurechtzufinden.

Mit Hilfe der Aminoester gelingt auch nach E. Fischers Verfahren die Synthese der Peptide und Polypeptide. Die höheren Polypeptide zeigen aber eine große Ähnlichkeit mit den natürlichen Peptonen, den Spaltungsprodukten der unvollständigen Hydrolyse des Eiweißes; sie zeigen einige Farbreaktionen, z. B. die Biuretreaktion, lassen sich hydrolytisch weiter spalten u. dgl. So haben denn die freien Ester der Aminosäuren eine wichtige Bedeutung für das Studium der Eiweißstoffe und ihrer Abbauprodukte erhalten.

¹⁾ An der experimentellen Ausarbeitung der zu besprechenden Frage beteiligte sich stud. J. Kulikoff durch Darstellung nach dem beschriebenen Verfahren des Aminoisobuttersäure- und des Amino-cyclohexancarbonsäureesters. In den übrigen Fällen beteiligte sich stud. A. Annenkoff an den Untersuchungen.

Die ersten genaueren Angaben über die Entstehung der Aminosäureester und ihrer Salze rühren von Curtius¹⁾ her, welcher schon in den 80er Jahren des vorigen Jahrhunderts nachwies — erstens, daß die Chlorhydrate der Aminosäureester leicht durch Einleiten von Chlorwasserstoffgas in die Lösungen der Aminosäuren in absolutem Alkohol erhalten werden, zweitens, daß die freien Aminoester aus den Chlorhydraten durch Zugabe von Silberoxyd (dem Chlor äquivalent) zu der konzentrierten wässerigen Salzlösung und nachfolgendes Ausziehen mit Äther oder Chloroform erhalten werden können. Allein das Verfahren von Curtius ist nicht gut anwendbar in den Fällen, wo die Menge des zur Abscheidung aus gegebener Salzmischung aller Aminoester erforderlichen Silberoxydes schwer anzugeben ist. Aus diesem Grunde arbeitete E. Fischer,²⁾ als er an die Erforschung der Proteine schritt, ein neues Verfahren zur Darstellung der Ester aus ihren Salzen aus. Fischers³⁾ Verfahren gründet sich auf die verhältnismäßig hohe Widerstandsfähigkeit der Ester gegen Alkali bei niederen Temperaturen. Daher können die Ester aus ihren Salzen erhalten werden, indem man konzentrierte Alkalilösung auf die konzentrierte wässrige Lösung der Estersalze unter sorgsamer Kühlung einwirken läßt und die freien Ester mit Äther extrahiert. Bei leicht wasserlöslichen Aminosäureestern wird die Flüssigkeit vorher mit Pottasche abgesättigt. Diejenigen Ester, welche dank der Anwesenheit einer Phenolgruppe Verbindungen mit dem Alkali bilden könnten, werden aus ihren Salzen erhalten, indem man zu der Lösung des Esterchlorhydrates in absolutem Alkohol eine dem Chlor entsprechende Menge Natriummethylat⁴⁾ gibt und nach vorsichtigem Eindampfen mit Äther extrahiert.

Bei der Darstellung der freien Ester nach E. Fischers Verfahren sind Verluste nicht zu vermeiden, da trotz der niedrigen Temperatur die Ester in jedem Falle teilweise hydro-

¹⁾ Ber., Bd. 16, S. 753 (1883).

²⁾ Ber., Bd. 39, S. 530 (1906).

³⁾ Ber., Bd. 34, S. 433 (1901).

⁴⁾ Ber., Bd. 38, S. 4176 (1905).

lysiert werden. Man ist veranlaßt, sehr schnell zu arbeiten, ohne die Operation zu unterbrechen. Das Arbeiten wird hitzig wegen Verlustbefürchtungen durch Verseifung, sehr umständlich, weil große Äthermengen abgedampft werden müssen, und zeitraubend. Daher gibt auch dieses Verfahren nicht vollkommen befriedigende Resultate, zumal da es mit nicht unerheblichen experimentellen Schwierigkeiten verbunden ist.

Wir haben jetzt ein neues Verfahren ausgearbeitet, nach welchem die freien Ester der Aminosäuren aus ihren Salzen leicht und einfach dargestellt werden können. Dasselbe gründet sich auf die Wirkung des Bleihydroxyds im Überschuß auf die möglichst gut getrockneten Salze der Aminosäureester. Als sehr schwache Base wirkt das Bleihydroxyd nicht zerstörend auf die Aminosäuren, sodaß die Mischung gefahrlos zur Destillation des Aminoesters im Vakuum erhitzt werden kann. Das Silberoxyd dagegen oxydiert leicht, selbst beim schwachen Erwärmen, wie wir es zu beobachten Gelegenheit hatten, sowohl die Ester der Amino- wie auch der Iminosäuren.

Die Arbeitsweise gestaltete sich folgendermaßen: das Chlorhydrat der Aminosäureester wurde auf die übliche Weise dargestellt, nämlich durch Einleiten von Chlorwasserstoff in die Lösung der Aminosäure in absolutem Alkohol. Der Alkohol wurde im Vakuum abgetrieben, der trockene Rückstand mit Bleihydroxyd vermischt und unter allmählicher Steigerung der Temperatur des Ölbad im Vakuum destilliert. Das Destillat enthält den freien Aminoester, sowie geringe Mengen des freigewordenen Wassers.

Die Ausbeuten betragen 85—95% der Theorie, berechnet für das Chlorhydrat des Esters als Ausgangsprodukt.

Nach dieser Methode wurden folgende Ester dargestellt.

Der Äthylester der Aminoisobuttersäure.

Aus einem Grammmolekül Aceton wurde das Chlorhydrat der Aminoisobuttersäure nach dem von N. Zelinsky und G. Stadnikow¹⁾ ausgearbeiteten Verfahren dargestellt, näm-

¹⁾ Ber., Bd. 39, S. 1722 (1906).

lich durch Einwirkung von Cyankalium und Ammoniumchlorid auf Aceton in wässriger Lösung. Nach Verseifung des erhaltenen Aminonitrils mit Salzsäure und Abdunstung des Wassers, sowie der überschüssigen Säure im Vakuum wurde der Trockenrückstand zwecks Reindarstellung des Chlorhydrats mit absolutem Alkohol extrahiert. Das Chlorhydrat wurde darauf nach E. Fischer verestert, wobei auf einen Teil Säure ein Teil absoluter Alkohol genommen wurde; die Mischung mit Chlorwasserstoffgas gesättigt, eine Stunde auf dem Wasserbad erhitzt und der Alkohol unter vermindertem Druck abgetrieben.

Ein Teil des erhaltenen Chlorhydrates des Aminoisobuttersäureesters (45 g) wurde sorgfältig mit trockenem Bleihydroxyd (195 g) vermischt und die Mischung im Glaskolben bei 12 mm Druck auf dem Ölbad erwärmt. Die Destillation begann bei 80° und wurde bei 180° (Ölbadtemperatur) abgeschlossen. Das erhaltene Rohprodukt enthielt freien Aminoisobuttersäureester und geringe Wassermengen. Ausbeute 45,6 g.

Bei einer nochmaligen Destillation (10—11 mm) wurden drei Fraktionen getrennt aufgefangen:

I. 30—34°	2,1 g
II. 34—38,5°	8 „
III. 38,5—41°	22 „

Beim Fraktionieren ging ein Teil des Esters wegen seiner Leichtflüchtigkeit verloren.

Die dritte Fraktion stellt den reinen Ester dar:

0,1098 g Substanz gaben 10 ccm N (757,5 mm, 13°)

$C_6H_{13}NO_2$ Berechnet: N — 10,78%

Gefunden: N — 10,73%.

Die Konstanten des Aminoisobuttersäureesters sind folgende

$$d_{40}^{17} = 1,0974$$

$$n_{17}^{17} = 1,4169$$

$$MR = 34,32 \quad \text{theor. } 35,09.$$

Die Depression 0,77 der Molekularrefraktion ist recht bedeutend und, wie wir weiter sehen werden, scheint dieses eine allgemeine Erscheinung bei den Aminoestern zu sein.

Der Alaninäthylester. Erster Versuch.

Das Alanin wurde nach den Angaben¹⁾ von N. Zelinsky und G. Stadnikow dargestellt. In Arbeit wurden molekulare Mengen Acetaldehyd (44 g), Cyankalium (65 g) und Ammoniumchlorid (58 g — ein geringer Überschuß) genommen. Zu der konzentrierten wässerigen Ammoniumchloridlösung, welche sich in einem Standgefäß von starkem Glase befand, wurde die ätherische Acetaldehydlösung gegeben und unter Kühlung die Cyankaliumlösung tropfenweise zugesetzt. Die Mischung blieb 40 Stunden stehen, wobei sie sich dunkelbraun färbte, und wurde dann 5 Stunden automatisch geschüttelt. Hierauf wurde unter guter Kühlung mit Chlorwasserstoffgas abgesättigt und tags darauf nach anderthalbstündigem Kochen auf dem Wasserbad zur Trockene eingedampft. Aus der einen Hälfte des Trockenrückstandes wurde das Alaninchlorhydrat mit absolutem Alkohol ausgezogen und, ohne das Salz abzuscheiden, zweimal nacheinander verestert. Der Alkohol wurde im Vakuum bei 35° abgetrieben und der Rückstand, eine dunkle, sirupöse Masse, mit 120,5 g (1/2 Mol.) Bleihydroxyd sorgfältig vermischt, wobei die Mischung sich stark erwärmt. Der freie Ester wurde dann im Vakuum unter allmählicher Temperaturerhöhung des Ölbades bis 220° abdestilliert, während das Destillat mit Eis-Salz-Mischung gekühlt wurde. Erhalten 45 g Rohprodukt. Dasselbe fraktioniert gab 3 Fraktionen.

I. bei 10 mm 28—45° = 12 g

II. » 10 » 49—51° = 11 »

III. » 10 » 114—115° = 21,5 g

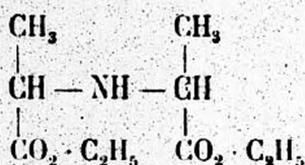
Die erste Fraktion enthielt Wasser und Alaninester und trennte sich nach Pottaschezugabe in zwei Schichten. Die obere Schicht bestand aus Alaninester, welches bald in Diketopiperazin überging.

Die zweite Fraktion enthielt den reinen Alaninester.

Die dritte Fraktion erwies sich als Ester der symmetrischen Dimethyl-imino-diessigsäure, welcher unlängst von Ciamician und Silber²⁾ auf anderem Wege erhalten wurde.

¹⁾ Ber., Bd. 41, S. 2061 (1908).

²⁾ Ber., Bd. 39, S. 3953 (1906).



Die Analyse dieser Fraktion ergab:

0,1356 g Subst.: CO_2 — 0,2748 g, H_2O — 0,1102 g.

$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ Ber.: C — 55,30, H — 8,82,

Gef.: C — 55,37, H — 9,01.

$$d_{40}^{20} = 1,0152 \qquad n_{20} = 1,4728$$

$$\text{M R} = \begin{array}{l} \text{Ber.: — 55,57} \\ \text{Gef.: — 55,01} \end{array}$$

Depression: — 0,56.

Die zweite Hälfte des nach Abdunstung des Wassers erhaltenen Trockenrückstandes wurde zwecks Vereinfachung des Verfahrens ohne vorherige Extraktion direkt in Gegenwart der Salze verestert, welche dann erst abfiltriert wurden. Darauf folgte die Behandlung mit Bleihydroxyd wie oben beschrieben. Die Ausbeute betrug 42 g Rohprodukt, — etwas weniger als im ersten Falle.

Zweiter Versuch der Darstellung des Alaninesters.

Angewendet wurden 22 g ($1/2$ Mol.) Acetaldehyd, 32,5 g Cyankalium, 30 g Ammoniumchlorid. Die Versuchsbedingungen wichen von denen des ersten Versuches im folgenden ab: das Reaktionsgemisch wurde während des Cyankaliumzusatzes ununterbrochen mechanisch verrührt und stand vor dem Schütteln 15 Stunden. Im übrigen blieb die Arbeitsweise dieselbe. Es wurden 44 g Rohprodukt erhalten. Zwecks Abscheidung der geringen Wassermengen wurde dasselbe in wenig Äther gelöst und über Glaubersalz getrocknet. Nach Abdunstung des Äthers ergab die Fraktionierung:

I. bei 10 mm 49—50° = 27 g,

II. „ 10 „ 114—115° = 5 g.

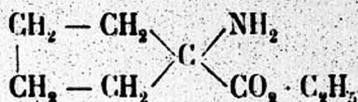
Die erste Fraktion enthielt den Alaninester, die zweite den Iminoester.

Diese Versuche zeigen, daß je nach der Arbeitsweise in einem Fall der Alaninester, im anderen Falle der Dimethylimino-diessigsäureester als Hauptprodukt erhalten werden kann.

Beim ersten Versuch stelle man sich den Reaktionsverlauf folgendermaßen vor: die Cyankaliumlösung reagiert mit der ätherischen Acetaldehydlösung unter Bildung von Oxynitril. Letzterer, als Alkohol, in Wasser leichter löslich als in Äther, geht in die Wasserschicht über, wo er mit dem Ammoniak Aminonitril bildet. Der Aminonitril befindet sich nun in der wässerigen Schicht zusammen mit dem Oxynitril und hat die Möglichkeit, mit demselben unter Iminonitrilbildung zu reagieren. Beim zweiten Versuch veranlaßt die Rührung den Übergang des Aminonitrils aus der Wasser- in die Ätherschicht, so daß letzterem die Möglichkeit genommen wird, in seiner Hauptmasse mit dem Oxynitril zu reagieren. Der Mechanismus der Iminonitrilbildung ist in unserem Laboratorium von G. Stadnikow¹⁾ aufgeklärt worden und verläuft zweifellos nach dem von ihm angegebenen Schema.

Zur Lösung der Frage, inwieweit die Bildung der freien Aminosäureester aus dem Chlorhydrat bei der Einwirkung von Bleihydroxyd quantitativ verläuft, wurde folgender Versuch angestellt: es wurden 11 g reinen Alanins in Arbeit genommen; nach zweimaligem Verestern wurde der Alkohol im Vakuum abgetrieben, der krystallinische Rückstand mit 30 g Bleihydroxyd vermischt und der entstehende freie Alaninester abdestilliert. Erhalten 14 g Rohprodukt, welches mit geschmolzener Pottasche entwässert wurde. Nach einer halben Stunde wurde der Alaninester abgetrennt und im Vakuum fraktioniert. Ausbeute 12,5 g (49—50° bei 10 mm) oder 86,4% der Theorie.

Der α -Aminocyclopentancarbonsäureäthylester.



In Arbeit genommen wurden 16,8 g Cyklopentanon, 14 g Ammoniumchlorid und 13 g Cyankalium. Die Reaktion wurde

¹⁾ Ber., Bd. 40, S. 1014 (1907).

in Wasseralkohollösung geführt; Alkohol wurde bis zur Lösung des Ketons zugesetzt. Nach Einführung des Cyankaliums stand die Mischung ca. 20 Stunden, dann wurde ein gleiches Volumen rauchender Salzsäure zugesetzt, verseift, zur Trockene eingedampft, das Chlorhydrat der α -Aminocyclopentancarbonsäure mit absolutem Alkohol extrahiert und zweimalig verestert. Nach Abtreiben des Alkohols wurden 48 g Bleihydroxyd zugemischt, der freie Aminoester im Vakuum abdestilliert, mit geschmolzener Pottasche getrocknet und fraktioniert. Erhalten 18,5 g Ester, welcher bei 80° (10 mm) überging.

Da 26,5 g Chlorhydrat des Esters angewendet wurden, berechnet sich die Ausbeute mit 85,5% der Theorie.

Analyse:

0,1861 g Subst. — 14,8 ccm N bei 22° und 744,4 ccm

0,1094 „ „ — CO_2 — 0,245, H_2O — 0,0954.

$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_2$ Ber.: N — 8,91%, C — 61,09%, H — 9,95%,

Gef.: N — 8,82%, C — 61,06%, H — 9,69%.

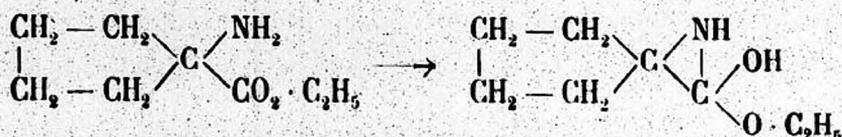
$d_{4^\circ}^{20^\circ} = 1,0292$ Ber.: 42,19

MR = Gef.: 41,26

$n_{20} = 1,4531$

Depression: 0,93.

Nimmt man aber für den Aminosäureester die tautomere Form an, nämlich statt



so nähert sich die gefundene Molrefraktion (41,26) der theoretischen (41,63).

Der α -Aminocyclohexancarbonsäureäthylester.

Angewendet: 24,5 g Cyclohexanon, 17 g Ammoniumchlorid und 16,2 g Cyankalium.

Die Reaktion sowie die Verarbeitung des erhaltenen Produktes wurde ebenso geführt, wie beim Cyclopentanon beschrieben. Bei Zugabe der rauchenden Salzsäure fiel ein voluminöser Niederschlag aus, welcher sich beim Erwärmen löste.

Beim weiteren Verarbeiten wurden 28,7 g Chlorhydrat erhalten, welche bei der Destillation mit Bleihydroxyd im Vakuum und nochmaligem Fraktionieren 22 g des freien α -Aminocyclohexancarbonsäureesters gaben, oder 93,02% der theoretischen Ausbeute. Der Siedepunkt des Esters liegt bei 100° (14 mm).

Analyse:

0,1747 g Subst. — 12 ccm N (10,6° und 748 mm)

0,112 „ „ CO₂ — 0,2588, H₂O — 0,1017

C₉H₁₇NO₂ Ber.: C — 63,11%, H — 10,01%, N — 8,12%,

Gef.: C — 63,01%, H — 10,07%, N — 8,05%.

$d_{4}^{20} = 1,0182$ Ber.: 46,87

$n_{20} = 1,4614$ M R = Gef.: 46,15

Depression: 0,72.

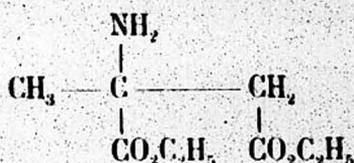
Für die tautomere Form, d. h. statt



berechnet sich die Molrefraktion = 46,31, also fast gleich der gefundenen.

Wir erachten es für wichtig, gleich zu bemerken, daß die Ester der cyclischen α -Aminosäuren sich durch eine große Beständigkeit auszeichnen und nicht leicht in Diketopiperazine übergehen. Nach mehr als einjährigem Aufbewahren im zugeschmolzenen Gefäß konnte deren Entstehung nicht wahrgenommen werden.

Synthese des Methylasparaginsäureäthylester.



39 g ($\frac{3}{10}$ Mol.) Acetessigester und 18,5 g Ammoniumchlorid wurden in Wasseralkohollösung mit 19,5 g Cyankaliumlösung zusammengebracht. Nach 20 Stunden wurde das Reaktionsgemisch mit dem gleichen Volumen rauchender Salzsäure versetzt und am nächsten Tage durch zweistündiges Kochen

verseift. Das Wasser wurde im Vakuum abdestilliert und der Rückstand zweimalig verestert. Nach der ersten Veresterung wurden die Mineralsalze abfiltriert, nach der zweiten der Alkohol verdunstet, zum Rückstand 72 g Bleihydroxyd zugesetzt und im Vakuum destilliert. Aus dem erhaltenen freien Ester wurde der Wasserrest durch Erwärmen auf dem Wasserbad im Vakuum entfernt und der Aminoester fraktioniert, wobei alles bei 112,5—113° und 12 mm übergang. Ausbeute — 38 g, d. h. 62,4% der theoretischen, berechnet auf den angewandten Acetessigester.

Analyse:

0,2472 g Subst. — 14,7 ccm N bei 18° und 751 mm

0,1142 „ „ CO₂ — 0,222, H₂O — 0,0858

C₉H₁₇NO₄ Ber.: C — 53,16%, H — 8,43%, N — 6,89%,

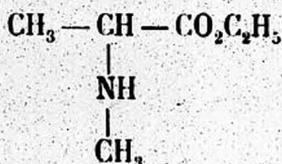
Gef.: C — 53,02%, H — 8,40%, N — 6,78%.

$d_{4}^{20} = 1,0632$ Ber.: 50,76

$n_{20} = 1,4332$ M R = Gef.: 49,68

Depression: 1,08.

Der Methylasparaginsäureäthylester ist sehr beständig und hält sich gut im zugeschmolzenen Glas.

Synthese des α -Methylaminopropionsäureäthylesters.

Angewendet: 35,5 g Methylaminchlorhydrat, 22 g Acetaldehyd und 32,5 g Cyankalium.

Zur wässerigen Lösung des Methylaminchlorhydrates wurde die ätherische Aldehydlösung gegeben und unter Kühlung die wässrige Cyankaliumlösung tropfenweise eingeführt. Die Mischung wurde darauf 12 Stunden automatisch geschüttelt, dann ein gleiches Volumen rauchender Salzsäure zugesetzt und tags darauf nach Abdunstung des Äthers und Wasserzusatz 2 Stunden erwärmt. Nach der Verseifung wurde das Wasser im Vakuum abgetrieben, der Trockenrückstand verestert, die

Mineralsalze abfiltriert, der Alkohol abgedunstet und der Rückstand von neuem verestert. Nach Entfernung des Alkohols wurden 120 g Bleihydroxyd zugemischt und der freie Aminoester im Vakuum abdestilliert. Dann wurde der Aminosäureester in wenig Äther gelöst, mit Glaubersalz getrocknet und fraktioniert.

Sein Siedepunkt bei 65 mm 75—76°.

» » » 755 » 147—148°.

Ausbeute 43 g oder 66% der theoretischen, berechnet auf das angewandte Aldehyd.

Analyse:

0,2511 g Subst. — 22,9 ccm N bei 18° und 758,4 mm

$C_6H_{13}NO_2$ Ber.: N — 10,67%,

Gef.: N — 10,51%.

$d_{4}^{20} = 0,9353$ Ber.: 35,29

$n_{20} = 1,4128$ M R = Gef.: 34,93

Depression: 0,36.

Der α -Methylaminopropionsäureester hält sich gut im zugeschmolzenen Glas. Die Eigenschaft, Kondensationsprodukte zu bilden, zeigt er nur in sehr geringem Maße. Nach einigen Monaten waren nur Spuren eines krystallinischen Kondensationsproduktes zu bemerken.

Nachtrag.

Der eine von uns (N. Zelinsky) unternahm gemeinschaftlich mit Herrn E. Dengin den Versuch, nach dem beschriebenen Verfahren die Aminosäureester, welche sich bei der Hydrolyse der Gelatine und nachheriger Esterifizierung bilden, zu trennen. Es wurden 100 g weißer Gelatine mit 13,21% Wasser- und 1,59% Aschengehalt in Arbeit genommen und nach Abdunstung des Alkohols und der Salzsäure zum zurückgebliebenen Sirup ungefähr 200 g Bleihydroxyd unter gutem Verrühren zugesetzt. Die Mischung wurde anfangs auf dem Wasserbad bis 100° bei 11 mm Druck erwärmt, wobei 23 g (I) Destillat erhalten wurden. Darauf wurde der Kolben

in ein Ölbad übergeführt und bei 1 mm Druck von 100 bis 240° weiter erhitzt. Es gingen 25,2 g (II) Destillat über, wobei die Vorlage mit Eissalzmischung gekühlt wurde. Schließlich wurden in einer Vorlage, welche mit einer Mischung von Äther und fester Kohlensäure gekühlt, noch 9,6 g (III) einer sehr leichtflüchtigen Flüssigkeit von unangenehmem Geruch aufgefangen. Das Destillat I enthielt Wasser und Aminoester, Destillat II hauptsächlich die Aminoester.

Es wird bequemer sein, nach wiederholter Esterifizierung zuerst das Glykoll esterchlorhydrat durch Auskrystallisieren lassen zu entfernen und dann erst den nach Abdampfen des Alkohols und der Salzsäure zurückbleibenden Sirup zur Abtrennung der übrigen Aminosäureester mit Bleihydroxyd zu bearbeiten.

Wir hoffen bald unsere Methode an einer größeren Menge Gelatine, sowie auch an anderen Eiweißstoffen weiter nachprüfen zu können.