

# Über die bei der Isolierung der Monoaminosäuren mit Hilfe der Estermethode entstehenden Verluste.

## II. Mitteilung.

Von

**Emil Abderhalden und Arthur Weil.**

(Aus dem physiologischen Institute der Universität Halle a. S.)

(Der Redaktion zugegangen am 30. Dezember 1911.)

In der ersten Mitteilung<sup>1)</sup> war festgestellt worden, daß ausgehend von reiner Asparaginsäure mit Hilfe der Estermethode ca. 50—55% wieder gewonnen werden. Bei der Glutaminsäure wurden bis zu 70% des Ausgangsmateriales isoliert. Die Verluste an diesen Dicarbonsäuren sind somit ganz beträchtliche. Wir haben nun die Versuche auf Glykokoll, d-Alanin und l-Leucin ausgedehnt und für jede einzelne Aminosäure bestimmt, wie viel man von ihr zurückgewinnt, wenn man die Estermethode anwendet. Schließlich haben wir Glykokoll, d-Alanin, l-Leucin, l-Asparaginsäure und d-Glutaminsäure vereinigt und dann jede einzelne Aminosäure mit Hilfe der Estermethode zurückgewonnen. Die Ausbeute an den einzelnen Bausteinen betrug im letzten Falle beim Glykokoll ca. 50% des Ausgangsmateriales, beim d-Alanin 57%, beim dl-Leucin 66%, bei der Glutaminsäure 58% und bei der l-Asparaginsäure ca. 40%. Glykokoll allein verestert lieferte bis zu 62,5% Ausbeute, d-Alanin bis gegen 70% und dl-Leucin gegen 80%.

Wir haben neben den unten mitgeteilten Versuchen noch eine Reihe anderer ausgeführt, bei denen wir jedoch die Verluste, die bei den einzelnen Operationen eintreten, nicht mit

<sup>1)</sup> I. Mitteilung. Diese Zeitschrift, Bd. 74, S. 445, 1911.

Hilfe von Stickstoffbestimmungen verfolgt haben. Wir begnügten uns mit der Isolierung des Ausgangsmateriales. Es wurden dabei folgende Werte erhalten.

10 g Glykokoll wurden mit 50 ccm absolutem Alkohol verestert. Die Veresterung wurde dreimal wiederholt. Die jedesmal ausgefallenen Krystalle von Glykokollesterchlorhydrat wurden abgesaugt und schließlich bei der Infreiheitsetzung der Ester wieder in den Kolben zurückgegeben. Dann wurde unter guter Kühlung destilliert und der Ester durch Kochen mit Wasser verseift. Die Ester wurden mit Natronlauge (1 und 2), mit Baryumhydroxyd (3 und 4) und endlich mit Natriumalkoholat (5 und 6) in Freiheit gesetzt. Die Ausbeute an reinem Glykokoll betrug bei Versuch 1: 45<sup>0</sup>/<sub>0</sub>; 2: 53<sup>0</sup>/<sub>0</sub>; 3: 51<sup>0</sup>/<sub>0</sub>; 4: 56<sup>0</sup>/<sub>0</sub>; 5: 56<sup>0</sup>/<sub>0</sub>; 6: 58<sup>0</sup>/<sub>0</sub>. Bei Verarbeitung des bei der Infreiheitsetzung verbleibenden Rückstandes konnte die Ausbeute um 5—7<sup>0</sup>/<sub>0</sub> gesteigert werden, so daß die höchste Ausbeute an Glykokoll ca. 65<sup>0</sup>/<sub>0</sub> betrug.

d-Alanin lieferte bei dreimaliger Veresterung 61<sup>0</sup>/<sub>0</sub> und 64<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Ausbeute bei der Infreiheitsetzung der Ester mit Natronlauge, 60 und 59,5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> bei Anwendung von Barythydrat zur Befreiung der Ester und endlich 66<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, als Natriumalkoholat verwendet wurde. Bei Wiederholung der Veresterung stieg die Ausbeute um 5<sup>0</sup>/<sub>0</sub>. Die höchste Ausbeute betrug somit etwa 70<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

l-Leucin lieferte im Maximum 75<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Ausbeute. Bei Durchführung des einmaligen Veresterungsprozesses erhielten wir bei dreimaliger Wiederholung der Veresterung 69<sup>0</sup>/<sub>0</sub> und 68<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Ausbeute. Die Ester wurden stets mit Natronlauge in Freiheit gesetzt. Die Wiederholung des Veresterungsprozesses verbesserte die Ausbeute, wie angegeben.

d-Valin wurde dreimal verestert und die Ester mit Natronlauge in Freiheit gesetzt. Ausbeute 68<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

l-Phenylalanin lieferte nur eine Ausbeute von 54<sup>0</sup>/<sub>0</sub>. Die Veresterung wurde dreimal vorgenommen, die Ester mit Natronlauge in Freiheit gesetzt und dann die zwischen 100 und 180° übergehende Fraktion, wie üblich, mit Äther extrahiert, der Äther mit Wasser gewaschen, dann mit Natriumsulfat getrocknet.

der Äther abdestilliert und der Rückstand mit Salzsäure verseift. Das reine salzsaure Salz kam zur Wägung. Bei der Darstellung der freien Aminosäure trat noch einmal ein kleiner Verlust ein.

Bei allen Versuchen wurden stets 10 g der Aminosäure angewandt. Wir haben ferner je 10 g der genannten Aminosäuren mit 10 g Asparaginsäure und 10 g d-Glutaminsäure gemischt und das Gemisch dreimal verestert. Die Ausbeute an den einzelnen Aminosäuren betrug: Glykokoll 55,5%, d-Alanin 65%, d-Valin 58%, l-Leucin 71%, l-Phenylalanin 49%, l-Asparaginsäure 45% und d-Glutaminsäure 61,5%. Die Versuche zeigen, daß es bei Anwendung der reinen Aminosäuren unmöglich ist, sie mit Hilfe der Estermethode quantitativ wieder zu erhalten. Ein ganz beträchtlicher Teil der Aminosäuren entgeht der Bestimmung. Wir arbeiten, wenn wir von den reinen Aminosäuren ausgehen, unter besonders günstigen Bedingungen. Daß die Ausbeuten sich noch verringern, wenn wir von Eiweißstoffen ausgehen, zeigt der Versuch, eine bestimmte Menge Glykokoll einem Protein, das sicher diese Aminosäure nicht besitzt, zugesetzt, nach erfolgter Hydrolyse wiederzugewinnen. Wir wählten sicher glykokollfreies Casein. 10 g Glykokoll wurden zu 100 g Casein zugesetzt, dann wurde durch sechsständiges Kochen mit der dreifachen Menge rauchender Salzsäure hydrolysiert. Die weitere Verarbeitung war die übliche. Es wurden nur 4,5 g reines Glykokoll wieder gewonnen.

Betrachten wir die bei der Hydrolyse der verschiedenartigsten Eiweißstoffe erhaltenen Ausbeuten an einzelnen Aminosäuren unter Berücksichtigung der bei der Isolierung mit Hilfe der Estermethode entstehenden Verluste, dann erkennen wir, daß der größte Teil des Eiweißmoleküls aus Bausteinen besteht, die wir kennen. Vielleicht sind auch schon alle Bausteine der gewöhnlicheren Proteine bekannt. Dafür spricht auch die Tatsache, daß es gelingt, Eiweiß in der Nahrung durch ein Gemisch der uns bekannten Aminosäuren zu ersetzen.

Im folgenden sind diejenigen Versuche ausführlich mit-

geteilt, bei denen die Verluste, die bei den einzelnen Operationen eintreten, ermittelt sind.

### Versuche mit Glykokoll.

#### Versuchsordnung.

Als Ausgangsmaterial diente durch wiederholtes Umkristallisieren gereinigtes Glykokoll, das wir aus dem bei Seidenhydrolysen erhaltenen Esterchlorhydrat darstellten.

10 g resp. 20 g wurden mit 100 ccm resp. 200 ccm absolutem Alkohol unter Einleiten von trockenem Salzsäuregas verestert. Die Veresterung wurde gewöhnlich nur ein zweites Mal wiederholt, da sich gezeigt hatte, daß eine dritte Veresterung die Ausbeuten nicht verbesserte, im Gegenteil oft noch verschlechterte. Die Infreiheitsetzung der Ester aus dem Chlorhydrat geschah mit Natronlauge, der berechneten Menge Natriumäthylat oder mit Ammoniak. Bei der ersten Methode machte sich die verhältnismäßig schwere Löslichkeit des Esterchlorhydrats in Wasser, besonders bei der Verarbeitung größerer Mengen störend bemerkbar. Bei Zimmertemperatur in möglichst wenig Wasser gelöst, schied es sich beim Abkühlen im Kältegemisch sofort wieder in großen Klumpen ab, die auch beim Zusatz der Natronlauge und bei kräftigem Schütteln zum größten Teil nicht gelöst wurden. Daher erklärt sich auch wohl die schlechte Ausbeute an Ester der Versuche Tabelle III, Nr. 1 und 3.

Bei der Infreiheitsetzung der Ester mit Natriumalkoholat oder Ammoniak gingen wir so vor, daß wir das Esterchlorhydrat in möglichst wenig absolutem Alkohol lösten, mit etwa der 10fachen Menge Äther überschichteten und nun entweder die in einem aliquoten Teil aus dem Ergebnis der Chlortitration berechnete Menge Natriumalkoholat unter Kühlung hinzufügten, oder ebenfalls unter Abkühlung im Kältegemisch unter kräftigem Umschütteln oder Turbinieren solange trockenes Ammoniak einleiteten, bis ein schwacher Ammoniakgeruch auftrat.

Bei der Infreiheitsetzung mit Natronlauge wurde die ätherische Esterlösung meistens 14—15 Stunden über 10—15 g Magnesiumsulfat (bei 20 g Ausgangsmaterial) getrocknet. Es

blieben hierbei 8—10% des Gesamtstickstoffs zurück. Bei nur 3—4stündiger Trocknung kann man diese Verluste bedeutend verringern. Sie betragen in einem Falle (Tabelle I, 3) nur 4,87%.

Den Äther der Esterlösung destillierten wir bei eisgekühlter Vorlage und etwa 20 mm stets bei nur 18—20° des Wasserbades ab, da bei wenig höherer Temperatur schon größere Verluste an Ester entstehen.

Bei der Destillation selbst schalteten wir zwischen Vorlage und Vakuumpumpe noch eine eisgekühlte Saugflasche ein. Diese Vorsicht erwies sich als sehr nötig, da trotz guter Kühlung oft noch bis 3% des Destillats mit in die I. Vorlage gehen.

Der abdestillierte Ester wurde mit der zehnfachen Menge Wasser 8—10 Stunden verseift.

Tabelle I. Glykokoll.

Ester mit Natriumhydroxyd in Freiheit gesetzt.

	Versuch I		Versuch II		Versuch III		Versuch IV	
	g	%	g	%	g	%	g	%
Ausgangsmaterial . . . . .	3,734	100	3,734	100	1,867	100	3,734	100
Kaliumcarbonatrückstand . . . . .	0,586	15,7	0,719	19,26	0,348	18,64	0,744	19,79
Ätherische Lösung . . . . .	2,77	74,30	2,313	61,96	1,372	72,48	2,406	64,44
Probeentnahme . . . . .	0,031	0,83	0,066	1,76	0,040	2,16	0,076	2,05
Chloroformauszug . . . . .	—	—	0,378	10,12	0,090	4,84	0,235	6,31
Magnesiumsulfat . . . . .	0,374	10,01	0,308	8,25	0,091	4,87	0,357	9,56
Destillat I . . . . .	2,58	69,12	1,99	53,32	1,042	55,82	1,948	52,18
"    II . . . . .	—	—	0,010	0,28	0,030	1,61		
Probeentnahme I + II . . . . .	0,018	0,49	0,067	1,80	0,072	3,84	0,065	1,73
Destillationsrückstand . . . . .	0,147	3,95	0,224	5,99	0,210	11,25	0,355	9,51
Abdestillierter Äther . . . . .	0,010	0,28	0,023	0,60	0,031	1,64	0,039	1,05
II. Vorlage der Verseifung . . . . .	—	—	0,002	0,06	0,003	0,16	—	—
Reines Glykokoll . . . . .	—	—	1,92	51,5	0,99	53,0	1,87	50
Gesamtproben . . . . .	0,049	1,32	0,133	3,56	0,112	6,0	0,141	3,78

Tabelle II. Glykokoll.

Ester mit Natriumäthylat in Freiheit gesetzt.

	Versuch I		Versuch II	
	Stickstoffgehalt in			
	g	%	g	%
Ausgangsmaterial . . . . .	3,734	100	3,734	100
NaCl-Rückstand . . . . .	0,529	14,10	0,433	11,59
Esterlösung . . . . .	3,224	86,36	3,286	88,03
Probeentnahme . . . . .	0,126	3,37	0,116	3,10
Destillat I + II . . . . .	2,040	54,64	2,282	61,12
Probe . . . . .	0,102	2,73	0,093	2,51
Destillierrückstand . . . . .	0,872	23,35	0,739	19,81
Abdestillierter Äther . . . . .	0,159	4,26	0,137	3,67
Krystalle . . . . .	1,92	51,5	2,16	58
Gesamtproben . . . . .	0,228	6,10	0,209	5,61

Es ist hier ebenfalls wie bei der Asparagin- und Glutaminsäure unbedingt nötig, sofort nach der Destillation den Ester mindestens 3 Stunden lang am Rückflußkühler mit der zehnfachen Menge Wasser zu kochen. Wartet man mit dem Kochen oder verseift man zunächst nur kurze Zeit, so erhält man beim Einengen auf dem Wasserbade nur geringe Mengen eines sirupösen Rückstandes (Versuch 1, Tabelle I und III, 2). Den Rückflußkühler verbanden wir mit einem zweiten, ihm parallelen, der in eine eisgekühlte Saugflasche mündete, so daß etwa übergehende Esterdämpfe hier kondensiert werden konnten.

Das verseifte Destillat wurde zur Trockne verdampft und mit etwa 100 ccm absolutem Alkohol extrahiert, um unveränderten Ester zu entfernen; doch verlief die Verseifung meistens quantitativ.

Tabelle III. Glykokoll.

Ver- such Nr.	Aus- gangs- ma- terial	Ver- estert mal	Ester in Freiheit gesetzt mit	Ester- aus- beute g %	Destillation				Vergiftetes Destillat % der Säure	Gesamt- ausbeute mit Be- rücksich- tigung d. Proben %	Bemerkungen				
					Temp. mm	Dauer Min.	% der Säure	% des Esters				Rück- stand g			
1	150	—	Natronlauge + Kalium- carbonat	65,5	59,1	51,5	25	46,9	42,3	71,6	9,8	24,6	38,5	39,9	Ausgangsmaterial Esterchlorhydrat, rein
2	20	1	desgl.	20,4	74,3	52	27	19	69,1	93	0,6	—	—	—	Tabelle I. 1
3	20	2	„	17,0	61,9	49	20	14,6	53,3	86,1	1,1	10,3	51,5	54,8	„ I. 2
4	10	3	„	9,9	72,5	52	28	7,9	57,4	79,2	1,3	5,3	53	58,4	„ I. 3
5	20	3	„	17,7	64,4	50,5	25	14,3	52,2	81,1	2,3	10	50	53,3	„ I. 4
6	20	2	Natrium- alkoholat	23,7	86,4	51	22	15	54,6	63,2	—	10,3	51,5	56	„ II. 1
7	20	2	desgl.	24,2	88,0	50	20	16,7	61,1	69,3	—	11,6	58	62,5	„ II. 2
8	139	—	Ammoniak	—	—	—	—	—	—	—	—	64,8	86,6	—	Nicht destilliert Esterchlorhydrat
9	10	2	desgl.	—	—	49	20	7,8	57	—	1,5	5,6	56	—	—
10	20	2	„	—	—	48	20	16,9	61,5	—	2,8	12,2	61	—	—
11	150	—	„	—	—	50	22	56,6	51	—	7,2	40,9	50,5	—	Ausgangsmaterial Esterchlorhydrat, roh.

## Versuche mit d-Alanin.

Die Versuchsanordnung beim Alanin war dieselbe, wie beim Glykokoll.<sup>1)</sup> Das Ausgangsmaterial war ebenfalls aus Seide dargestellt und zeigte in salzsaurer Lösung eine spezifische Drehung von  $+ 10,27^\circ$ . (0,2760 g Substanz in 10,1617 g salzsaurer Lösung drehten  $+ 0,40^\circ$  [ $\pm 0,01^\circ$ ]  $d = 1,020$ ). d-Alanin wird bei der Veresterung, Destillation des Esters oder seiner Verseifung nicht racemisiert, da das Endprodukt dieselbe spezifische Drehung, wie das Ausgangsmaterial, besaß.

Tabelle I. d-Alanin.

Ester mit Natronlauge in Freiheit gesetzt.

	Versuch I		Versuch II		Versuch III		Versuch IV	
	Stickstoffgehalt in							
	g	%	g	%	g	%	g	%
Ausgangsmaterial . . .	3,146	100	3,146	100	1,573	100	3,146	100
Rückstand bei der Infreiheitsetzung . . . .	0,53	16,72	0,955	30,35	0,254	16,26	0,406	12,92
Ätherische Lösung . . .	2,35	74,53	2,098	66,68	1,193	75,86	2,501	79,48
Probeentnahme . . . .	0,073	2,35	0,083	2,65	0,021	1,35	0,080	2,54
Chloroformauszug . . .	—	—	0,078	2,50	0,053	3,37	0,119	3,80
Magnesiumauszug . . .	—	—	0,015	0,47	0,063	4,00	0,099	3,16
Destillat I . . . . .	1,91	60,62	1,671	53,12	1,068	67,97	2,124	67,50
"  II . . . . .	0,005	0,16	0,002	0,06	0,008	0,48		
Probeentnahme I + II	0,081	2,59	0,028	0,90	0,084	5,34	0,052	1,65
Destillationsrückstand	0,19	6,18	0,358	11,38	0,079	5,01	0,238	7,57
Abdestillierter Äther .	0,009	0,03	—	—	0,025	1,57	0,059	1,87
II. Vorlage bei der Verseifung . . . . .	0,02	0,62	0,019	0,60	—	—	—	—
Reines Alanin . . . . .	1,86	59,0	1,62	51,5	0,97	62,0	2,04	65,0
Gesamtproben . . . . .	0,154	5,04	0,106	3,55	0,105	6,49	0,132	4,19

<sup>1)</sup> In einem Falle (Tabelle I, 3 und III, 3) versuchten wir bei der Veresterung durch Zusatz von 15 g Magnesiumsulfat als wasserbindendes Mittel die Ausbeute an Ester zu erhöhen, konnten aber keine besseren Resultate als bei den anderen Versuchen erlangen.

Nach der Ausätherung des aus dem Chlorhydrat in Freiheit gesetzten Esters extrahierten wir den Rückstand nochmals mit 100—200 ccm Chloroform, ebenso wie bei den Versuchen mit Glykokoll. Hierbei zeigte sich, daß noch etwa 4% des Stickstoffs aufgenommen werden. Bei der Berechnung in der letzten Spalte von Tabelle III berücksichtigt, würden sie die Gesamtausbeute noch um etwa 3% erhöhen.

Tabelle II. d-Alanin.

Ester mit Natriumäthylat in Freiheit gesetzt.

	Versuch I		Versuch II	
	Stickstoffgehalt in			
	g	%	g	%
Ausgangsmaterial . . . . .	1,573	100	3,146	100
Destillationsrückstand . . . .	0,613	38,08	1,327	42,18
Destillat . . . . .	0,955	60,73	1,790	56,91
Probeentnahme . . . . .	0,049	3,13	0,093	2,96
Abdestillierter Äther . . . . .	0,011	0,72	0,032	1,01
II. Vorlage der Destillation . .	0,009	0,57	0,008	0,23
Reines Alanin . . . . .	0,88	56,5	1,67	53

## Versuche mit dl-Leucin.

Das Ausgangsmaterial war aus Iso-Valeraldehyd mittels der Cyanhydrinsynthese dargestellt. Die Veresterung geschah durch Einleiten von trockenem Salzsäuregas in die zehnfache Menge absoluten Alkohols. In einem Falle (Tabelle I, 3 und II, 3) wurden 15 g Magnesiumsulfat hinzugefügt, aber auch hier war, wie beim Alanin, die Ausbeute nicht besser als in dem entsprechenden Versuch Tabelle II, 1.

Die Destillation wurde meistens unter stark vermindertem Druck, 0,3—0,8 mm, vorgenommen. Nur in einem Falle (Tab. II, 3) wurde beim Vakuum der Wasserstrahlpumpe destilliert. Bei stark vermindertem Druck ging der Hauptanteil des Esters bei 100° des Wasserbades bei etwa 62° über, dann stieg plötzlich

Tabelle III. Alanin.

Ver- such Nr.	Aus- gangs- ma- terial	Ver- estert mal	Fester in Freiheit gesetzt mit	Fester- aus- beute g · %	Destillation				Verseiftes		Gesamt- ausbeute berechnet unter Be- rück-sichti- gung der Proben %	Bemerkungen		
					Temp. mm	Dauer Min.	% der Säure	% des Esters	Rück- stand g	Destillat g			% der Säure	
1	20	1	Natronlauge + Kalium- carbonat	19,6 74,5	54	28	15	16,0 60,8	81,6	2,3	11,8	59	63,2	Tabelle I. 1
2	20	2	desgl.	17,5 66,7	51	26	25	13,7 53,1	78,2	3,4	10,3	51,5	54,1	, I. 2
3	10	1	,	9,9 75,9	50,5	22	10	8,9 68	89,6	1,0	6,2	62	68,3	, I. 3
4	20	2	,	20,9 79,5	50	20	20	17,7 67,5	85	2,9	13	65	68,9	, I. 4
5	10	2	Natrium- alkoholat	—	51	20	15	8,0 60,7	—	—	5,65 NaCl- haltig	56,5	59,5	, II. 1
6	20	2	desgl.	—	51	18	20	14,9 56,9	—	,	10,6	53	56	, II. 2
7	10	2	Ammoniak	—	52	22	15	9,5 72,5	—	0,9	7,1	71	—	
8	20	2	,	—	50	20	20	19,7 75	—	2,1	14,9	74,5	—	

das Innenthermometer auf 94° unter heftigem Aufschäumen des Rückstandes. Obgleich die Destillation in diesem Momente meist sogleich abgebrochen wurde, ging doch ein großer Teil des Stickstoffs (4—10%) verloren, scheinbar in sehr flüchtiger Verbindung, die weder in der eisgekühlten, noch in der mit flüssiger Luft gekühlten Vorlage kondensiert wurde. — Die Verseifung mit der zehnfachen Menge Wasser durch 8- bis 10 stündiges Kochen am Rückflußkühler verlief nahezu quantitativ (1—2% N in der Mutterlauge).

Tabelle I. Leucin.

	Versuch I		Versuch II		Versuch III		Versuch IV	
	g	%	g	%	g	%	g	%
Ausgangsmaterial . . .	2,138	100	2,138	100	2,138	100	2,138	100
Rückstand bei der In- freiheitsetzung . . .	0,172	8,03	0,245	11,49	0,293	13,73	—	—
Atherlösung der Ester	1,917	89,69	1,834	85,83	1,767	82,68	—	—
Probeentnahme . . .	0,071	3,35	0,051	2,40	0,065	3,02	—	—
Chloroformauszug . .	—	—	0,042	1,96	0,031	1,47	—	—
Magnesiumsulfat . . .	0,050	2,35	0,023	1,10	0,045	2,12	—	—
Destillat I . . . . .	1,589	74,44	1,619	75,76	0,987	46,19	1,673	78,27
Probeentnahme . . .	0,059	2,75	0,030	1,40	0,040	1,85	0,042	1,96
Destillat II . . . . .	0,025	1,19	0,003	0,12	—	—	0,015	0,76
Destillerrückstand . .	0,013	0,61	0,058	2,71	0,749	35,07	0,441	20,64
Reines Leucin . . . .	1,53	71,5	1,57	73,5	0,908	42,5	1,61	75,5

Versuche mit Glykokoll + d-Alanin + dl-Leucin + l-Asparaginsäure + d-Glutaminsäure.

In ein Gemisch von je 20 g der genannten Aminosäuren mit 500 ccm absolutem Alkohol wurde trockenes Salzsäuregas bis zur vollständigen Lösung und Sättigung eingeleitet, im Vakuum bei etwa 40° bis zur Krystallisation eingeengt und die Veresterung ein zweites und drittes Mal wiederholt. — Aus den Chlorhydraten wurden die Ester mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt, in ca. 2 l absolutem Äther und

Tabelle II. Leucin.

Ver- such Nr.	Aus- gangs- mate- rial	Ver- estert mal	Ester in Freiheit gesetzt mit	Ester- aus- beute g %	Destillation						Verseiftes Destillat		Gesamt- ausbeute mit Be- rück- sichti- gung der Probent- nahmen %	Be- merkungen		
					Temp. mm	Dauer Min.	Destillat		Rück- stand g	g	% der Säure	% des Esters			% der Säure	
1	20	1	Natronlauge + Kalium- carbonat	22,1	90,9	—	—	—	—	—	14,8	74	—	Nicht destilliert		
2	20	3	desgl.	21,8	89,7	60	0,3	15	18,1	74,4	82,9	0,4	14,3	71,5	76,9	Tabelle I, 1
3	20	1	,	19,2	89,7	—	20	30	11,2	46,2	58,5	7,6	8,5	42,5	46,7	, 1, 3
4	20	2	,	20,8	85,8	61	0,6	20	18,4	75,8	88,3	0,9	14,7	73,5	78,6	, 1, 2
5	20	2	Natrium- alkoholat	—	—	62	0,8	15	19	78,3	—	—	15,1	75,5	77,5	, 1, 4
6	20	1	Ammoniak	—	—	62	0,8	20	18,4	76	—	0,4	15,5	77,5	—	Nicht destilliert
7	10	2	,	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8,1	81,0	—	

250 ccm Chloroform aufgenommen und über Magnesiumsulfat 14 Stunden getrocknet. Nachdem der Äther bei 20° des Wasserbades abdestilliert war, erfolgte die Destillation in drei Fraktionen.

I. Fraktion: 100° des Wasserbades. Die Esterfraktion geht bei 24 mm bei 51—52° über, innerhalb 20 Minuten; Ausbeute 52 g.

II. Fraktion: 100° des Wasserbades, 0,2 mm: Dauer 25 Minuten. Kolbenthermometer 62°. Ausbeute 21 g.

III. Fraktion geht in zwei Portionen über. Erste Hälfte bei 150° des Ölbad, 0,4 mm und 116°.

Zweite Hälfte bis 180° des Ölbad, 0,2 mm und 137°. Dauer der Destillation 1 Stunde. Ausbeute 19 g.

Der Destillationsrückstand wog 26 g und wurde 2 Stunden lang mit 250 ccm konzentrierter Salzsäure (spez. Gew. 1,19) am Rückflußkühler gekocht.

Die erste bis dritte Fraktion wurden durch die 10fache Menge Wasser verseift und zwar die erste und zweite durch 7stündiges, die dritte durch 30stündiges Kochen am Rückflußkühler. Die erste Fraktion hinterließ, im Vakuum zur Trockne eingengt, einen festen Rückstand von 21,2 g. Er wurde in 250,75 ccm Wasser gelöst. 10 ccm dieser Lösung + 1 ccm Salzsäure (spez. Gew. 1,19) drehten im 1 dm-Rohr die Ebene des polarisierten Lichtes + 0,59°. Setzen wir diesen Wert in

die Formel  $c = \frac{100\alpha}{l[\alpha]_D^{20}}$  ein und für  $[\alpha]_D^{20}$  die spezifische Drehung

des verarbeiteten Alanins in salzsaurer Lösung + 14,43° (10,27° für salzsaures Alanin), so ergibt sich für die Gesamtlösung von 250,75 ccm ein d-Alanin Gehalt von 11,26 g. — Aus dem Stickstoffgehalt der I. Fraktion wird d-Alanin mit 11,48 g berechnet, nach den beiden Formeln  $x + y = 21,2$  und  $18,67x + 15,73y = 3,620$ , wobei x das gesuchte Glykokoll, y das Alanin bedeutet. Für Glykokoll ergeben sich also nach beiden Berechnungen die Werte 9,94 und 9,72 g. Als Ausbeute wurde das Mittel beider Zahlen angenommen.

Die zweite Fraktion schied schon in der dritten Stunde der Verseifung Leucin in glänzenden Krystallblättchen ab. Sie wurde

auf dem Wasserbade bis auf etwa 100 ccm eingedampft und dann abgesaugt. Die erste Fraktion wog **10,1 g**. Das Filtrat wurde weiter eingeengt und mit 100 ccm absolutem Alkohol extrahiert. Der Rückstand wog nach dem Trocknen **3,05 g**.

Die verseifte dritte Fraktion wurde ebenfalls auf dem Wasserbade bis auf ca. 100 ccm eingeengt und Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet. Im Eisschrank schieden sich über Nacht Krystalle ab, die abgesaugt, mit Salzsäure gewaschen und getrocknet **6,14 g** wogen. Das Filtrat wurde weiter eingeengt, mit Salzsäuregas gesättigt. Es wurden so noch **0,37 g** Glutaminsäurechlorhydrat gewonnen. In einem aliquoten Teil des Filtrates wurde jetzt, nach dem Einengen im Vakuum und Wiederaufnahme des Rückstandes in Wasser, der Chlorgehalt durch Titration bestimmt und die berechnete Menge Normal-Lithiumhydroxydlösung, 182 ccm, hinzugefügt. Wieder wurde auf dem Wasserbade bis zur Krystallisation eingeengt, nach dem Erkalten mit ca. 100 ccm absolutem Alkohol extrahiert und von dem ausfallenden weißen Niederschlage und den Rückständen abgesaugt. Durch Umkrystallisieren aus wenig kochendem Wasser wurden so **7,85 g** Asparaginsäure gewonnen.

Der durch 2stündiges Kochen mit konzentrierter Salzsäure verseifte Destillationsrückstand gab nach dem Einengen und Sättigung mit Salzsäuregas eine erste Fraktion von **7,31 g** Glutaminsäurechlorhydrat. Aus dem Filtrat wurden noch **0,73 g** gewonnen.

Die Ausbeuten an den einzelnen Aminosäuren sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

	g	% des Ausgangsmaterials	
Glykokoll . . . . .	9,83	49,15	
Alanin . . . . .	11,37	56,85	
Leucin . . . . .	13,15	65,75	
Glutaminsäure . .	11,66	58,3	Berechnet aus dem Chlorhydrat
Asparaginsäure . .	7,85	39,25	
Summa . . . . .	53,86	—	

Berücksichtigt man die durch Probeentnahme entstandenen Verluste, so würde sich die Gesamtausbeute auf ca. 56% des Ausgangsmaterials belaufen.

## Stickstoffverteilung.

	g	%	Absolute Prozente
Ausgangsmaterial . . . . .	13,030	100	13,03
Rückstand bei der Infreiheitssetzung . .	2,606	20,01	—
Magnesiumsulfat . . . . .	0,233	1,78	—
Chloroform . . . . .	0,551	4,23	1,65
Probeentnahme . . . . .	0,061	0,46	—
Ätherlösung der Ester . . . . .	9,55	73,3	10,35
Probe . . . . .	0,255	1,95	—
Abdestillierter Äther + Chloroform . .	0,062	0,48	—
I. Fraktion . . . . .	3,656	28,05	7,03
II. Vorlage . . . . .	0,047	0,36	—
Probe . . . . .	0,036	0,27	—
II. Fraktion . . . . .	1,437	11,03	5,25
Probe . . . . .	0,024	0,18	—
III. Fraktion . . . . .	1,496	11,48	7,87
Probe . . . . .	0,037	0,29	—
Vakuum-Pumpe, Inhalt der Vorlage . .	0,35	2,69	—
Destillationsrückstand . . . . .	2,334	17,91	8,98
Probe . . . . .	0,141	1,08	—

Glykokoll: Das Pikrat schmilzt bei 190°. Nach der Umsetzung des Pikrates mit Schwefelsäure und Ausschütteln der Pikrinsäure mit Äther wurde aus der wässrigen Lösung nach quantitativer Ausfällung der Schwefelsäure mit Baryt reines Glykokoll. F. gegen 240°.  $\alpha = 0^\circ$ . Menge 7,8 g.

d-Alanin: Nach erfolgter Abtrennung des Glykokollpikrats wurde das Filtrat mit Schwefelsäure versetzt und die Pikrinsäure ausgeäthert. In der wässrigen Lösung wurde die Schwefelsäure mit Baryt quantitativ gefällt, und das Filtrat vom Baryumsulfat zur Trockne verdampft.  $\alpha = 8,8^\circ$  in der berechneten Menge n-Salzsäure gelöst.

74 Abderhalden u. Weil, Verluste bei Isolierung der Monoaminosäuren.

Leucin: 0,1530 g Substanz verbrauchten 11,6 ccm  
 $n_{10}^{\circ}\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

N berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$ (131,11):	Gefunden:
10,69%	10,62%

Glutaminsäurechlorhydrat: 0,1872 g verbrauchten  
10,05 ccm  $n_{10}^{\circ}\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

N berechnet für $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4 \cdot \text{HCl}$ (183,45):	Gefunden:
7,63%	7,52%

Asparaginsäure: 0,1371 g verbrauchten 10,25 ccm  
 $n_{10}^{\circ}\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

N berechnet für $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$ (133,07):	Gefunden:
10,53%	10,36%