

Zur Kenntnis der organischen Gerüstsubstanz des Anthozoenskeletts.

IV. Mitteilung.

Isolierung und Identifizierung der Bromgorgosäure.

Von

Carl Th. Mörner, Upsala.

(Der Redaktion zugegangen am 20. September 1913.)

Inhaltsverzeichnis.

Einleitung. — A. Der Hauptversuch (Baryumhydroxydhydrolyse). 1. Hydrolysierung und Fraktionierung. 2. Die weitere Reinigung der Roh-Bromsubstanz. 3. Die Identifizierung der Bromsubstanz. 4. Findet sich Brom in anderer Bindungsform als in Dibromtyrosin? — B. Orientierende Säurehydrolysenversuche. — Anhang.

Einleitung.

In Teil I¹⁾ der vorliegenden Untersuchungsserie wurde gesagt: «Es besteht Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen einer der Jodgorgosäure analogen Bromgorgosäure». In demselben Aufsatz wird bemerkt, daß man, bei einem zielbewußten Versuch, ein derartiges, eventuell auftretendes Br-haltiges, hydrolytisches Spaltungsprodukt aus dem Gorgonaceenskelett zu isolieren, als Ausgangsmaterial eine möglichst Br-reiche (und gleichzeitig möglichst J-arme) Art, z. B. *Primnoa lepadifera*, wählen muß, und es wird ferner erwähnt, daß Verfasser, um hierüber, wenn möglich, Klarheit zu gewinnen, schon ein relativ reichliches Material (mehrere 100 g) von der letztgenannten Art unter Vorbehandlung habe. Dem fraglichen Baryumhydroxydhydrolyseversuche, für dessen Ausführung, nach der sorgfältigen Dekalzifizierung des Rohmaterials, eine Quan-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 51 (1907), S. 33—63.

tität von 160 g wasserfreier Substanz (Gorgonin) zu Gebote stand, war indessen nur die Rolle eines vorbereitenden Versuches beschieden. Zwar gelang es, durch eine weitläufige Serie von Fraktionierungen zu einer durchweg in glasklaren, derben Prismen krystallisierenden, Millons Reaktion nicht ergebenden (tyrosinfreien), nur Spuren von Jod, dagegen reichlich Brom enthaltenden, bei ca. $+ 240^{\circ}$ C. unter starker Gasentwicklung und Dunkelfärbung schmelzenden Fraktion zu gelangen; die erhaltene Menge davon war aber so gering, daß es am klügsten erschien — nach Ausführung der angedeuteten, präliminären Prüfungen — die übrigbleibende Menge (0,25 g) bis auf weiteres, in der Hoffnung auf Erwerb weiteren Materials, aufzubewahren. Unter solchen Umständen können die Einzelheiten der fraglichen Versuche hier ruhig übergangen werden, und ich wende mich sogleich dem Bericht über den Versuch zu, den ich später anzustellen Gelegenheit gehabt habe, und bei dem ich, über ein bedeutend reichlicheres Ausgangsmaterial (von Primnoa-Stengeln) verfügend, mir die bei dem ersten Versuch gewonnene Erfahrung habe zunutze machen können. Die Erwerbung des genannten Materials¹⁾ verdanke ich ausschließlich dem freundlichen Entgegenkommen und unermüdlichen Interesse des Herrn Institutsdirektor cand. phil. O. Nordgaard (Trondhjem).

A. Der Hauptversuch (Baryumhydroxyhydrolyse).

1. Hydrolysierung und Fraktionierung.

Die Primnoa-Stengel wurden nacheinander mit verdünnter HCl ($1\frac{1}{2}$ Monate), verdünntem NH_3 (2 Monate) und destilliertem Wasser behandelt unter fleißigem Umtausch der Flüssigkeiten, worauf die Masse an der Luft getrocknet wurde.

Von dem lufttrockenen Material²⁾ wurden 746 g, entsprechend 650 g wasser- und aschefreier Substanz,³⁾ abgewogen

¹⁾ Eingesammelt in Norwegen (im Trondhjemsfjord).

²⁾ Wassergehalt: 12,57; Aschegehalt: 0,26 %.

³⁾ Nach des Verfassers früheren Bestimmungen enthaltend: etwa $3\frac{3}{4}$ % Br, $\frac{1}{10}$ % J.

und in geräumiger Porzellanschale mit 2,5 kg reinem Baryumhydroxyd (Mercks pro analysi) und 10 Liter destilliertem Wasser zusammengegeben. Die Mischung wurde auf Wasserbad erwärmt, bis das meiste von dem Baryumhydroxyd sich gelöst hatte, danach in Zimmerwärme 1 Tag lang stehen gelassen und schließlich über Gasofen zum Kochen gebracht. Das Kochen dauerte 2 Stunden, wobei dann und wann kochend heißes Wasser hinzugesetzt wurde, um das verdampfte zu ersetzen. Die obenstehende, dunkelbraune Flüssigkeit wurde am folgenden Tage von dem Bodensatz (schwarzbrauner Schlamm + Baryumhydroxydkristalle¹⁾) abgegossen, filtriert und (nebst dem Waschwasser vom Bodensatz her) auf Wasserbad konzentriert. Nach Abkühlen (Volumen: 5³/₄ Liter) wurde sie (in großem Glaszylinder) mit 5 Volumen 95%igem Spiritus versetzt, wobei reichlicher Niederschlag auftrat. Nach 2 Tage langem Stillstehn wurde die auf dem Boden zu einem kompakten «Kuchen» angesammelte Fällung (I) durch Absiphonieren von der alkoholischen Flüssigkeit (II) befreit. Die Masse wurde mit 3 Liter Spiritus (bereitet aus 5 Vol. 95%igem Spiritus + 1 Vol. Wasser) durchknetet; die Mischung wurde nach 2 Tagen filtriert, dann wieder mit derselben Art Spiritus²⁾ gewaschen, die Masse an der Luft getrocknet, zerbröckelt und durch ein Sieb getrieben.

Das eben beschriebene Fällen mittels Spiritus aus baryumhydroxyd-alkalischer Flüssigkeit wurde im Hinblick auf die Erfahrungen vorgenommen, die in dem nächstvorhergehenden Aufsatz (Abschnitt 16, k) referiert worden sind. Eine Brombestimmung an aliquoten Teilen der getrockneten Fällung (I) und der Spiritusflüssigkeit (II) gab ab, daß von der gesamten Br-Menge sich befanden

in I	etwa 78%;
» II	» 22%.

¹⁾ Hieraus wurde Oxalsäure isoliert (vgl. S. 153).

²⁾ Spiritusfiltrat und Waschspritus wurden mit der alkoholischen Flüssigkeit (II) vereinigt.

I. Die Fällung.

Die Fällung wurde mit destilliertem Wasser (4 l) bei + 40° C. ein paar Tage lang digeriert. CO₂ wurde bis zur Sättigung eingeleitet; die Mischung auf Wasserbad 12 Stunden lang erwärmt und noch warm filtriert. Filtrat¹⁾ und Waschwasser wurden auf Wasserbad zu Sirupdicke konzentriert und während längerer Zeit in kaltem Raum stehen gelassen, wobei einige Krystalle sich absetzten. Nach Verdünnung mit einigen Volumen Wasser wurde, durch Zentrifugieren, das krystallinische Sediment entfernt.²⁾ Die Flüssigkeit (dunkel rotbraun, von alkalischer Reaktion³⁾) wurde mit gesättigter Bleiacetat-lösung, 250 ccm, versetzt (dabei vollständige Ausfällung und etwas Pb-Überschuß); danach sofort zentrifugiert.

A. Die Fällung.

Waschen mit Wasser mittels Zentrifuge, Aufschwemmen in Wasser (2 l), Einleiten von H₂S in Überschuß, Abfiltrieren von PbS, Einleiten von Luft in Filtrat und Waschwasser (die Flüssigkeit nun stark sauer reagierend auf Lackmus, auf Kongo nur kleinste Andeutung). Gesättigte Bleiacetat-lösung (50 ccm) wurde zugesetzt; die entstandene, dickflockige Fällung nach einem Tage abfiltriert. Das, wie oben, von Pb und H₂S befreite Filtrat (stark sauer, u. a. von Essigsäure) wurde auf Wasserbad konzentriert. Nachdem die dabei sich absetzende, braune, amorphe Fällung ein paarmal entfernt worden, und die Konzentration bis zu ca. 20 ccm fortgeschritten war, erstarrte die Flüssigkeit bei Abkühlen zu einem Krystallmagma, das hauptsächlich aus bei mikroskopischer Besichtigung farblosen, größeren und kleineren, wetzsteinförmigen Krystallen bestand, welche einzeln oder paarweise oder zu Rosetten vereinigt vor-

¹⁾ Betreffs des Rückstandes auf dem Filter, hauptsächlich aus BaCO₃ bestehend, siehe S. 150.

²⁾ Erwies sich als aus Tyrosin bestehend.

³⁾ Etwa vorkommende saure Hydrolyseprodukte waren demnach in Form von Salzen vorhanden.

kamen.¹⁾ Qualitative Prüfung gab reichlichen Gehalt an Br in organischer Bindung an. Die Krystallmasse wurde vom Filter genommen, mit Wasser gewaschen, kräftig ausgepreßt und im Exsikkator getrocknet (Gewicht: 1,8 g) = *Roh-Bromsubstanz, Fraktion 1.*

B. Das Zentrifugat.

Die Flüssigkeit (braunrot, aber bedeutend heller als vor der Ausfällung mit Bleiacetat) wurde mit Wasser verdünnt. Pb-Ausfällung mit H_2S , Lufteinleitung, Ba-Ausfällung mit verdünnter H_2SO_4 in durch Vorprobe berechneter Menge. Das Filtrat (+ Waschwasser) (stark sauer reagierend auf Lackmus, auf Kongo aber nur spurenweise) wurde mit 20%iger Phosphorwolframsäurelösung (250 ccm) versetzt, wobei reichliche Fällung (PWS-Fällung 1) eintrat, die nach $\frac{1}{2}$ Stunde abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde mit verdünnter H_2SO_4 bis zu kräftiger Kongoreaktion angesäuert, wobei wiederum Fällung (PWS-Fällung 2) eintrat, die entfernt wurde. Das Filtrat wurde von neuem mit 20%iger PWS-Lösung versetzt; die neu entstandene Fällung (PWS-Fällung 3) wurde am folgenden Tage abfiltriert, worauf das saure Filtrat mit einigen Volumen 95%igem Spiritus versetzt und die dabei auftretende weiße, dickflockige Fällung (PWS-Fällung 4) am Tage darauf abfiltriert wurde. Durch Zusatz von Baryumhydroxyd in Überschuß, Konzentrierung (behufs Abdampfens des Spiritus) und Filtrieren wurde PWS (und H_2SO_4) entfernt.

An der so erhaltenen Flüssigkeit (a) und an den 4 verschiedenen PWS-Fällungen (b—e) wurde zur Orientierung vergleichende Br-Prüfung, unter Anwendung proportionaler Materialmengen (in jedem Falle $\frac{1}{200}$ des Ganzen) ausgeführt.

Bromvorkommen:

- a) + (bedeutend reichlicher als in b).
- b) +
- c) —
- d) —
- e) —

¹⁾ In derselben Krystallform hatte sich auch die bei dem vorbereitenden Versuche (siehe S. 139) erhaltene Br-Substanz bei ihrem ersten Auftreten (d. h. vor Umkrystallisierung) präsentiert.

M. a. W., die Flüssigkeit a ist diejenige Fraktion — nach der Bleiacetatausfällung — die rücksichtlich des Br-Gehaltes die Hauptfraktion darstellt.

Die Flüssigkeit¹⁾ wurde mit verdünnter H_2SO_4 bis zu deutlicher Kongoreaktion versetzt (wobei alles Ba sich als ausgefällt erwies). $BaSO_4$ wurde abfiltriert; das saure Filtrat wurde fünfmal ausgeschüttelt, jedesmal mit $\frac{1}{2}$ Volumen Äther.²⁾ Nach Zusatz von NH_3 bis zu schwach alkalischer Reaktion wurde auf Wasserbad zu dünnem Sirup konzentriert (wobei die Reaktion stark sauer gegen Lackmus wurde). Während etwa einwöchiger Aufbewahrung in kaltem Raum fiel keine Br-Substanz aus. Da auch bei fortgesetzter Aufbewahrung in kaltem Raum keine Auskrystallisierung von Br-Substanz sich einstellte, und da es sich durch Orientierungsproben gezeigt hatte, daß eine beträchtliche Konzentration von Br-Substanz — in der Spiritusflüssigkeit — erhalten wurde, so wurde die nachstehend erwähnte Spiritusfraktionierung vorgenommen. Die Flüssigkeit, auf 100 ccm Volumen verdünnt, wurde nach Erwärmen mit warmem 95%igem Spiritus (3 Volumen) versetzt, wobei sich auf dem Boden des Gefäßes ein dunkelbrauner Sirup absetzte. Nach eintägigem Stehen in Zimmerwärme wurde die klare, oben befindliche, Br-reiche Flüssigkeit abgegossen. Der Spiritus wurde auf Wasserbad abgetrieben und Essigsäure bis zu stark saurer Reaktion hinzugesetzt. Im Kälteschrank begannen nach fünf Tagen reichlich Br-haltige Krystalle von demselben Aussehen, wie es oben (S. 141) beschrieben worden, sich abzusetzen.³⁾ Nach weiteren zehn Tagen wurde mit etwas Wasser verdünnt und zentrifugiert. Die Krystallmasse wurde mit Wasser gewaschen, ausgepreßt und in H_2SO_4 -Exsikkator getrocknet (Gewicht: 0,9 g) = *Roh-Bromsubstanz, Fraktion 2.*

¹⁾ Auch die Br-haltige PWS-Fällung 1 wurde weiter bearbeitet, ohne aber krystallisierende Br-Substanz zu ergeben.

²⁾ Beim Verdunsten des Äthers fiel ein rußschwarzes Pulver aus, und als Rest blieb eine braune, harzartige (Br-freie) Masse zurück. Mit dem Äther wurde auch eine beträchtliche Menge Essigsäure (von dem früheren Bleiacetatzusatz herrührend) entfernt.

³⁾ Bei sämtlichen 3 Gelegenheiten, wo Dibromtyrosin bisher isoliert worden ist, hat also die Substanz zuerst ihre Gegenwart durch das Auftreten von wetzsteinähnlichen, glasklaren Krystallen zu erkennen gegeben.

Auf Grund der nunmehr bei 2 verschiedenen Hydrolyseversuchen gewonnenen Erfahrung — bei dem ersten wurde keine Pb-Ausfällung angewandt, und bei dem zweiten wurden einige Operationen lediglich zur Orientierung über die Verteilung des Br-Gehalts usw. vorgenommen — bin ich der Ansicht, daß die Isolierungsmethode für die fragliche, krystallisierende Br-Substanz beträchtlich vereinfacht werden kann, wie es nachstehend kurz skizziert werden soll.

Die aus der baryumhydroxydalkalischen, filtrierten Hydrolyseflüssigkeit mit 5 Volumen 95%igem Spiritus erhaltene und mit Spiritus (5 Vol. 95%ige + 1 Vol. Wasser) reichlich gewaschene und ausgepreßte Fällung wird in Wasser aufgeschwemmt, H_2SO_4 bis zu vollständiger Ausfällung von Ba und in sochem Überschuß hinzugesetzt, daß die Flüssigkeit auf Kongo stark sauer reagiert. Nach Verdünnung¹⁾ mit Wasser wird vollständige Ausfällung mit Phosphorwolframsäure vorgenommen; aus dem Filtrat wird der PWS-Überschuß mittels Baryumhydroxyd entfernt und der Überschuß hiervon wiederum mittels H_2SO_4 , worauf das Filtrat, leicht mit NH_3 alkalisiert, auf ein geringes Volumen abgedampft und, noch warm, mit 3 Volumen warmem 95%igem Spiritus versetzt wird. Nach 1 Tage wird die Spiritusflüssigkeit abfiltriert, der Spiritus auf Wasserbad abgetrieben, Essigsäure bis zu stark saurer Reaktion hinzugesetzt, und die Mischung zur Auskrystallisierung in den Kälteschrank gesetzt.

II. Die alkoholische Flüssigkeit.

Obwohl dieselbe, wie oben (S. 140) erwähnt, ca. $\frac{1}{5}$ des ursprünglichen Br-Gehalts des verarbeiteten Gorgoninmaterials enthielt, gelang es nicht, trotz Fraktionierung auf mannigfache Weise, daraus eine krystallisierende Br-Verbindung zu isolieren. (Betreffs daraus dargestellter Br-freier Aminosäuren siehe unten im Anhang!).

2. Die weitere Reinigung der Roh-Bromsubstanz.

Disponibles Material:

a)	Von dem vorbereitenden Versuch her	aufbewahrter Rest	. 0,25 g
b)	»	Hauptversuch her, Fraktion 1 1,8 »
c)	»	»	» 2 0,9 »
			Summa . . . 2,95 g ²⁾

¹⁾ Bei zu starker Konzentration von Dibromtyrosin in der Flüssigkeit kann ein Verlust an dieser Substanz durch Ausfällung derselben durch PWS eintreten (siehe Abschnitt 16, h der nächstvorhergehenden Mitteilung).

²⁾ Für die orientierende Prüfung war bereits insgesamt ca. 0,3 g verbraucht worden.

Das vereinigte, pulverisierte Material (graubraun an Farbe, bei Millonscher Prüfung schwach, aber deutlich reagierend und Spuren, approx. etwa $\frac{1}{100}$ 0/0, von J enthaltend) wurde in Zimmerwärme mit 20 ccm Wasser geschüttelt, am folgenden Tage filtriert und mit Wasser gewaschen.¹⁾ Der ungelöste Rückstand wurde in dest. Wasser aufgeschwemmt, verd. NH_3 , ganz wenig jedesmal, unter kräftigem Umschütteln hinzugesetzt, bis schließlich die Masse bis auf einen kleineren Rest sich aufgelöst hatte; danach Filtrierung.²⁾ Behandlung des braunen Filtrats in Wärme mit vorsichtig abgemessener Menge von Tierkohle, mit nachfolgendem Filtrieren und reichlichem Auswaschen des Kohlerestes mit kochendem Wasser. Filtrat + Waschwasser (die Flüssigkeit wenig gefärbt) wurden im Vakuum konzentriert, schließlich bei ganz geringer Wasserbadwärme, wobei schöne, fast farblose, kompakte Krystalldrüsen auszufallen begannen. Unter langsam fortschreitender Konzentrierung der Flüssigkeit wurde sukzessiv ausfallende Krystallmasse ausgeschieden, so daß auf diese Weise 5 Fraktionen erhalten wurden, deren jede auf Tyrosingehalt mittels Millons Reagens geprüft wurde:

- Fraktion 1—3 . . . tyrosinfrei (Gewicht insgesamt: 1,2 g),
- > 4 . . . Spuren von Tyrosin,
- > 5 . . . deutlicher Tyrosingehalt.

Die Fraktionen 4—5 wurden vereinigt und erneuter Fraktionierung unterzogen, wodurch 0,3 tyrosinfreie krystallisierte Substanz erhalten wurde. Es standen somit nunmehr 1,5 g tyrosinfreie, wohlkrystallisierte, aber noch schwach graugelbe Substanz zur Verfügung.

Um zur Tyrosinfreiheit zu gelangen, hatte also, ungeachtet der an sich geringen Menge des verunreinigenden Tyrosins, ungefähr die Hälfte des Gewichts der Rohsubstanz — und offenbar damit auch ein bedeutender Teil der Br-Substanz selbst geopfert werden müssen. Aus den vereinigten Mutterlaugen wurde, wenn auch in geringer Menge, eine in Nadeln krystal-

¹⁾ Aus dem Filtrat + Waschwasser wurde eine Spur von Tyrosin gewonnen.

²⁾ Auf dem Filter blieb etwas grauer Schlamm zurück, der Tyrosin enthielt.

lisierende Br-reiche Substanz isoliert, die, allem nach zu beurteilen, aus Dibrom-l-Tyrosin bestand.¹⁾

Schließlich wurde (unter Anwendung von ganz wenig Tierkohle) umkrystallisiert, wobei farblose, glasklare, schwere Krystalle erhalten wurden, kurze und dicke Prismen oder dicke, viereckige Tafeln, welche Krystalle nach 1-stündiger Aufbewahrung im H_2SO_4 -Exsikkator 1,2 g wogen.

3. Die Identifizierung der Bromsubstanz.

Wenngleich die zu Gebote stehende Quantität reiner Substanz verhältnismäßig beschränkt war, so hat sie sich doch als hinreichend erwiesen, um — unter Beobachtung strenger Sparsamkeit und Anwendung von Kombinationen, wo solches möglich gewesen²⁾ — zu voller Klarheit über die chemische Natur der vorliegenden Substanz zu führen. Nach Ausführung einer Krystallwasserbestimmung an einer Portion des 1 Stunde lang im H_2SO_4 -Exsikkator aufbewahrten, vereinigten Materials wurde auch das übrige bei $+ 120^\circ \text{C}$. getrocknet.

Die Substanz ist, wie bereits aus der Darstellungsweise hervorgeht, schwerlöslich in Wasser bei gewöhnlicher Temperatur, weit leichter löslich in kochendem Wasser. Die wässrige Lösung, die einen säuerlich-bitteren Geschmack hat, reagiert sauer auf Lackmus. In verdünnter Mineralsäure, in verdünnter Natronlauge oder Ammoniak löst sie sich mit Leichtigkeit; aus solchen Lösungen fällt sie bei Zusatz von Natriumacetat bzw. Essigsäure in Krystallform aus. Eine ammoniakalische Lösung läßt bei Abdampfen in gelinder Wärme Krystalle zurück, die kein Ammoniak enthalten. Eine mit sehr verdünnter Salpetersäure bereitete Lösung wird bei Zusatz von

¹⁾ Auf eine vollständige Racemisierung der in dem Gorgoninmolekül präformierten l-Form ist bei der relativ milden Baryumhydroxydbehandlung, die hier zur Anwendung kam, nicht zu rechnen (vgl. Anm. 2 auf S. 140 in der nächstvorhergehenden Mitteilung).

²⁾ So z. B. konnte die zur Krystallwasserbestimmung verwendete Quantität danach zu anderem Zwecke benutzt werden, die zur acidimetrischen Titrierung gebrauchte Substanz wurde zur N-Bestimmung verwendet, das bei den Br-Bestimmungen gewogene Halogensilber zur Prüfung auf eventuellen J-Gehalt.

AgNO₃ nicht zur Fällung gebracht; wird mehr Säure hinzugefügt und erwärmt, so fällt AgBr aus. Bei Prüfung hinsichtlich der in der nächstvorhergehenden Mitteilung (Abschnitte 15 und 16) erwähnten Färbungs- und Fällungsreaktionen verhielt sich die Substanz in allen Beziehungen auf dieselbe Weise, wie es dort für synthetisches Dibromtyrosin angegeben worden ist, ohne, bei Anwendung gleichgroßer Substanzmengen, irgend welchen Unterschied in bezug auf Farbennüance oder Intensität der Färbung aufzuweisen. Schmelzpunkt: ca. + 245° C.,¹⁾ wobei braunschwarze Färbung der äußerst stark aufgeblähten Masse eintritt. Bei Debromierung mittels Zn-Staubes wird Tyrosin erhalten, identifiziert durch Krystallform, Schmelzpunkt (+ 302° C.), intensive Färbung bei Millons und Denigès-Mörners Reaktionen.

Krystallwasserbestimmung.

0,1270 g verloren bei 120° bis zum Eintritt konstanten Gewichts
 0,0063 g, entsprechend 4,96%
 (Für C₉H₉NO₃Br₂ + H₂O ergibt die Berechnung 5,05%)

Acidimetrische Titrierung.²⁾

0,2234 g verbrauchten 6,8 ccm n/10-NaOH.
 (Berechnet für C₉H₉NO₃Br₂ . . . 6,6 > >).

N-Bestimmung.

Hierzu wurde die fertigtitrierte Mischung vom vorigen Versuch her verwendet, die kjeldahlisiert wurde.³⁾

0,2234 g verbrauchten 6,45 ccm n/10-H₂SO₄, entsprechend 4,05% N.

Bei in dieselbe Serie eingefügten Kontrollbestimmungen an reinem, synthetischem Dibromtyrosin wurde erhalten:

4,12 } Mittel: 4,07% N.
 4,03 }

(Berechnet für C₉H₉NO₃Br₂: 4,13% N).

¹⁾ Siehe Anm. 4 auf S. 148.

²⁾ Vgl. die nächstvorhergehende Mitteilung, Abschnitt 8, b.

³⁾ Dabei wurde, wie bei entsprechender Behandlung von synthetischem Dibromtyrosin, im Kolbenhalse Sublimat von farblosen, stark nach Bromphenol riechenden Krystallen beobachtet.

Br-Bestimmung.

Diese Bestimmung wurde unter Benutzung von Piria und Schiffs Methode (Verbrennung¹⁾ mit $\text{CaO} + \text{Na}_2\text{CO}_3$) ausgeführt, wobei zur Kontrolle alternierend Bestimmungen an reinem Dibrom-d,l-Tyrosin (getrocknet bei $+ 120^\circ \text{C.}$) eingeschaltet wurden.

a) 0,2585 g ergaben 0,2799 g AgBr,²⁾ entsprechend 46,08% Br } Mittel:
 b) 0,2335 „ „ 0,2547 „ „ 46,42% „ } 46,25% Br.

Bei den in die Serie eingeschalteten Kontrollbestimmungen an reinem, synthetischem Dibromtyrosin wurde erhalten:

46,28 }
 46,64 } Mittel: 46,46% Br.

(Berechnet für $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3\text{Br}_2$: 47,17% Br.)³⁾

Auf Grund der eben angeführten Untersuchungsergebnisse ist es klar, daß die aus Primnoa-Gorgonin als hydrolytisches Spaltungsprodukt isolierte Bromsubstanz eine der Jodgorgosäure Drechsels analoge Bromgorgosäure, oder, genauer bestimmt, mit 3,5-Dibrom-d,l-Tyrosin identisch ist.⁴⁾

Es ist dies die erste, wohlcharakterisierte organische Bromverbindung, die durch absichtliche Hydrolyse eines nativen Proteinstoffes erhalten worden ist. Eine spontan gebildete, sonst in gewissem Grade analoge, organische Br-Verbindung hat man neulich, dank Friedländers⁵⁾ schöner Untersuchung, in dem Farbstoff der Purpurschnecke (des Purpurs der Antike) kennen

¹⁾ Während des Verbrennens wurde an den abziehenden Dämpfen dieselbe Geruchsqualität wahrgenommen wie bei den Proben mit synthetischem Dibromtyrosin, d. h. ein Geruch von Phenol und von NH_3 (kein fremder Geruch wie von Indol, Pyrrol usw.).

²⁾ Die gewogenen Ag-Fällungen wurden mit $\text{Zn} + \text{verd. H}_2\text{SO}_4$ dekomponiert; auf J wurde keine Reaktion bei Prüfung mit CS_2 und vorsichtigem Zusatz von Cl-Wasser (bis Br-Reaktion eintrat) erhalten.

³⁾ Vgl. den nächstvorhergehenden Aufsatz, S. 141.

⁴⁾ Die überhaupt einzige beobachtete, durch die bloß spurenweise Gegenwart eines Fremdstoffes erklärliche Abweichung von dem reinen synthetischen Produkt ist die, daß der Schmelzpunkt, bei gleichzeitiger Ausführung, als $1-2^\circ$ niedriger liegend befunden worden ist.

⁵⁾ Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 42 (1909), S. 765—770.

gelernt, der aus 6,6'-Dibromindigo besteht. Die Zusammengehörigkeit auch dieser Substanz mit der Proteinstoffchemie wird von v. Fürth¹⁾ betont.

4. Findet sich Brom in anderer Bindungsform als in Dibromtyrosin?

Rechnet man den totalen Br-Gehalt der in dem Hauptversuch bearbeiteten Gorgoninquantität auf Dibromtyrosin um, so erhält man den Wert 51,7 g. In grellem Kontrast hierzu steht die tatsächlich isolierte Menge (1,2 g) der genannten Verbindung. Auch unter Berücksichtigung des Umstandes, daß mit unvermeidlichen, zusammengenommen beträchtlichen Verlusten zu rechnen ist — wie dem im Laufe der Arbeit sukzessiv stattfindenden Verbrauch von zahlreichen, kleineren Quantitäten der verschiedenen Fraktionen (behufs Orientierung über den Br-Gehalt, Fällbarkeit gegenüber gewissen Reagentien), Adsorption der zahlreichen, oft voluminösen Fällungen, in Mutterlaugen zurückbleibender Substanz — und daß demnach die tatsächliche Dibromtyrosinmenge gut um ein Vielfaches größer als die wirklich in reinem Zustand isolierte gewesen sein kann, so muß ich doch, im Hinblick auf die mir bekannt gewordenen Eigenschaften des Dibromtyrosins,²⁾ die Annahme als völlig unmöglich ansehen, daß der gesamte Br-Gehalt des fraglichen Gorgonins innerhalb des Moleküls ausschließlich in Form von Dibromtyrosin gebunden sein sollte. Einer solchen Annahme widersprechen auch einige bei dem Hydrolyseversuch gemachte Erfahrungen. In den beiden Hauptfraktionen (I und II), hauptsächlich jedoch in dem ersteren, sind an mehreren Stellen bei der fortgesetzten Fraktionierung stark Br-haltige, braungefärbte, schwerlösliche, aber amorphe, überhaupt «harz»-ähnliche Produkte angetroffen worden, die bald bei der Konzentrierung an-

¹⁾ Probleme der physiol. und pathol. Chemie, Bd. 1, Leipzig 1912, S. 76. «In der Purpurschnecke vollzieht sich also ein Bromierungsvorgang, der den zweifellos aus dem Eiweißtryptophan stammenden Indolkomplex in ein Chromogen umwandelt. Wir dürfen also auch den Purpurfarbstoff fortan wohl den zyklischen Eiweißderivaten zuzählen.»

²⁾ Unter anderem habe ich experimentell mich von der großen Resistenz der Substanz bei Kochen mit Baryumhydroxyd und von der Möglichkeit, danach in guter Ausbeute sie zurückzugewinnen, überzeugt.

fangs klarer Lösungen ausfielen, bald in verschiedenen Fällungen (BaCO_3 -, PbS - usw.) enthalten waren. Besonders zeichnete sich in dieser Hinsicht die auf S. 141 erwähnte BaCO_3 -Fällung aus. Auch nach dreimal wiederholtem, langdauerndem Auskochen mit, jedesmal, 6—7 l Wasser¹⁾ und danach mehrmals wiederholter Digestion auf Wasserbad mit verd. NH_3 ,²⁾ ein paar Litern jedesmal, erwies sich der Pulverrest als andauernd stark Br-haltig. Die angeführten Umstände machen es allzu wahrscheinlich, daß Br auch in der einen oder anderen Bindungsform von anderer Art als in der von Dibromtyrosin enthalten ist, wobei zunächst Bindung an Tryptophan³⁾ oder Histidin, vielleicht auch ein höher bromiertes Tyrosin mit von der Di-Verbindung ganz abweichenden Eigenschaften in Betracht kämen. Diese Überlegung dürfte, mutatis mutandis, auch auf die J-Bindung in den J-reicheren Formen des Gorgonins Anwendung finden. Aus den Mitteilungen der Autoren geht klar hervor, daß die Ausbeute von Dijodtyrosin (Jodgorgosäure) sich stets sehr unbedeutend gestellt hat. Ausdrücklich wird der Betrag der Ausbeute von Drechsel⁴⁾ und von Oswald⁵⁾ angegeben; pro 100 g Gorgoninmaterial berechnet, erhielt ersterer 0,7, letzterer 0,9 g,⁶⁾ beide bei Arbeit mit dem extrem J-reichen Gorgonin von *Gorgonia Cavolini*. Wird der von mir⁷⁾ für die genannte Art gefundene J-Wert, 5,5 %, auf Dijodtyrosin umgerechnet,

1) Betreffs dieses Wasserextraktes siehe «Anhang», S. 154.

2) Durch NH_3 herausgelöste, Br-haltige, braune Substanz mittels H_2SO_4 als amorphe Flocken ausfällbar, zeigte bei Erhitzen starken Indolgeruch.

3) Siehe die nächstvorhergehende Anm.

4) Zeitschrift f. Biologie, Bd. 33 (1896), S. 100.

5) Diese Zeitschrift, Bd. 75 (1911), S. 353—362.

6) Angenommen, wir arbeiten mit zwei Arten von Gorgonin, die eine Br-reich und J-arm, die andere umgekehrt, und beide denselben Prozentgehalt an dem betreffenden Dihalogenotyrosin aufweisend, so ist, ceteris paribus, eine verhältnismäßig noch geringere Ausbeute an Dibrom-d.l-Tyrosin zu erwarten als an dem entsprechenden J-Derivat, nämlich auf Grund des geringeren Grades von Schwerlöslichkeit beim ersteren, 1:591 (nach Bestimmung von mir, bei + 20° C.) bzw. 1:2164 (nach Bestimmung von Oswald, bei + 15°; diese Zeitschrift, Bd. 69 [1909], S. 320—324).

7) A. a. O.

so entspricht dies 9,4 g pro 100 g Gorgonin! Auch bemerkt Oswald, dabei sich auch auf andere experimentelle Beobachtungen stützend: «daß jedoch das Tyrosin nicht die einzige jodbindende Gruppe des Gorgonins ist».

B. Orientierende Säurehydrolysenversuche.

Im Hinblick auf die Angaben der Literatur über die ziemlich geringe Resistenz des Dijodtyrosins bei Säurebehandlung hatte ich kaum gewagt, an die Möglichkeit zu denken, das analog konstituierte Br-Derivat durch Säurehydrolyse von Gorgonin zu erhalten, sondern hatte a priori die Baryumhydroxydhydrolyse für den einzigen anwendbaren Ausweg gehalten. Ein ganz anderes Aussehen erhielt indessen die Sache, nachdem ich die im nächstvorhergehenden Aufsatz (Abschn. 10) angeführten Erfahrungen betreffs des Verhaltens des l-Dibromtyrosins gegen konz. HCl gemacht hatte, weshalb ein Versuch in diesem Sinne mit der spärlichen Quantität Primnoa-Gorgonin, die noch zu Gebote stand, ausgeführt wurde.

30 g an der Luft getrocknete Substanz (entsprechend ca. 25 g wasserfreier) wurde in verschlossenem Kolben mit 100 ccm konzentrierter HCl (spez. Gew. 1,19) ein paar Tage lang stehen gelassen, worauf die Mischung 5 Stunden lang kochend gehalten wurde.

An der oberen Mündung des Rückflußkühlers war ein mit Natronlauge beschickter Absorptionsapparat angebracht; gasförmig entweichende HCl wurde von demselben in reichlicher Menge aufgenommen, Br bzw. HBr waren aber nicht einmal spurenweise bei der näheren Prüfung der Absorptionsflüssigkeit zu entdecken.

Die braunschwarze Flüssigkeit wurde auf Wasserbad zu Sirupdicke eingedampft, mit Wasser verdünnt und aufs neue konzentriert. Sie wurde sodann mit Wasser entnommen, Baryumhydroxyd wurde in reichlichem Überschuß hinzugesetzt und die Mischung 6 Stunden lang auf Wasserbad (behufs Austreibens von NH_3) erwärmt. Nach Filtrieren wurde die Flüssigkeit¹⁾ mit 5 Vol. Spiritus (96 %ig) versetzt, wobei reichliche

¹⁾ Eine kleine Portion davon — schwach angesäuert mittels Salpetersäure, ausgefällt mit AgNO_3 in Überschuß und filtriert — ergab, nach weiterem Salpetersäurezusatz, bei Aufkochen, reichliche Fällung von AgBr (die Gegenwart organisch gebundenen Broms anzeigend).

Fällung eintrat; Umschütteln. Die nach einigen Tagen abfiltrierte Fällung wurde zunächst, der Hauptsache nach in Übereinstimmung mit dem oben auf S. 144 skizzierten Verfahren, bis zur Entfernung des PWS-Überschusses mit Baryumhydroxyd und behufs Entfernung dieses letzteren mit H_2SO_4 behandelt, in diesem Falle jedoch mit Vermeidung eines H_2SO_4 -Überschusses. Das Filtrat (von BaSO_4) wurde zur Trockne eingedampft (behufs Abrauchens von aus BaCl_2 freigemachter HCl). Der Rest wurde mit Wasser aufgenommen, der braune Bodensatz abfiltriert, das Filtrat mit Ag_2O in Überschuß geschüttelt und sofort filtriert. In dem Filtrat (stark Ag-haltig; saure Reaktion) trat einige Nachtrübung ein, weshalb dasselbe, nach Aufbewahrung an dunklem Platz, am Tage darauf von neuem filtriert wurde. Ag wurde mittels H_2S und dieser letztere durch Lufteinleitung entfernt. Die Flüssigkeit wurde, nach Zusatz von NH_3 bis zu schwach alkalischer Reaktion, konzentriert, mit Essigsäure angesäuert und in den Kälteschrank gestellt. Binnen 2 Tagen begann die Auskrystallisierung, die später noch weiter zunahm: (außer Tyrosinkugeln) klare, wetzsteinähnliche, schwere Krystalle. Durch Fraktionierung in der oben angegebenen Weise wurden schließlich 0,07 g tyrosinfreie, kopiös Br-haltige Krystalle erhalten, die sich als ca. 4 % Krystallwasser enthaltend erwiesen, und die, nach Umkrystallisierung, glasklare Prismen von dem Aussehen und dem Schmelzpunkt des Dibrom-d,l-Tyrosins bildeten. Nach der Behandlung der Lösung mit Zn-Staub in Wärme konnten in der Reaktionsflüssigkeit Tyrosin und Br (nicht J) nachgewiesen werden.

Auch durch Säurehydrolyse hat demnach Dibromtyrosin erhalten werden können, jedoch — im Gegensatz zu dem, was man im ersten Augenblick annehmen möchte — nicht in der l-, sondern in der d,l-Form. Hierbei ist jedoch in Betracht zu ziehen, daß die ursprünglich saure Hydrolysenflüssigkeit später in Wärme mit Überschuß von Baryumhydroxyd (behufs Austreibens von NH_3) behandelt worden ist, wodurch die Substanz zum größeren Teile racemisiert worden sein kann (während eventuell zurückgebliebene l-Substanz, als u. a. leichter löslich, unausgefällt in der Mutterlauge verblieben ist).

Anhang.

Während der auf mannigfache Weise betriebenen Fraktionierung sind, bei dem Hauptversuch, in analysenreinem Zustande auch einige Br-freie hydrolytische Spaltungsprodukte isoliert worden, nämlich:

Aus «I. Fällung». ¹⁾

Tyrosin,
Asparaginsäure,
Glutaminsäure und
Oxalsäure.

Aus «II. Alkoholische Flüssigkeit». ²⁾

Glykokoll,
Alanin und
Leucin

(sowie, auch hier, etwas Tyrosin).

Von Leucin war die erhaltene Menge ganz gering, wohingegen Asparaginsäure und auch Glutaminsäure in verhältnismäßig reichlicher Ausbeute erhalten wurden. ³⁾ Glykokoll fand ich, in Übereinstimmung mit Henze, reichlich vertreten; dasselbe war der Fall auch beim Alanin. ⁴⁾ Die Oxalsäure ⁴⁾ soll, wenigstens zu einem Teil, von bei der Baryumhydroxydbehandlung zersetztem Cystin herrühren. ⁵⁾

Bei der Fraktionierung innerhalb der Gruppe der aliphatischen Monoaminosäuren habe ich in der Behandlung mit verdünnter Schwefelsäure + Kaliumdichromat (in Wärme) ⁶⁾ eine bequeme und empfindliche Geruchsprobe zur Orientierung

¹⁾ Siehe S. 141.

²⁾ Siehe S. 144.

³⁾ Keine von diesen 3 Monoaminosäuren gelang es Henze (Diese Zeitschrift, Bd. 38 (1903), S. 60—79), ungeachtet darauf abzielender Versuche, nach Baryumhydroxydhydrolyse von Gorgonin (dieses letztere jedoch von einer anderen Anthozoënant, Gorgonia Cavolini, herrührend) zu isolieren.

⁴⁾ Nicht zuvor als Gorgoninhydrolysenprodukt nachgewiesen.

⁵⁾ Siehe Baumann, Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 15 (1882), S. 1731 bis 1735.

⁶⁾ Auf dieses Verfahren gründet sich bekanntlich E. Fischers empfindliche Geruchsprobe auf Phenylalanin.

betreffs der An- oder Abwesenheit von Leucin in einer vorliegenden Fraktion gefunden.¹⁾ Während nämlich Leucin intensiven, lange zurückbleibenden Geruch (von Isovaleriansäure) ergibt, ist dies nicht bei den folgenden, direkt geprüften Substanzen der Fall: Glykokoll, Alanin, Valin (obwohl es selbst ein Isovaleriansäurederivat ist), Asparaginsäure und Glutaminsäure (auch nicht bei Cystin, Tyrosin oder Histidin).

Bei der starken Konzentrierung des auf S. 150 erwähnten Wasserextraktes auf Wasserbad fiel ein braungefärbter, sandartiger Niederschlag aus, der teilweise aus BaCO_3 bestand, aber auch eine schwefelhaltige Substanz enthielt, welche bei gelinder Erwärmung auf Wasserbad mit verdünnter H_2SO_4 reichlich Schwefeldioxyd (Zersetzungsprodukt von Cystin?) abgab. Diese Beobachtung ließ mich an ein Präparat denken, das Henze (a. a. O.) in geringer Menge aus Baryumhydroxydhydrolysenflüssigkeit von Gorgonin her erhalten hat. Es wird folgendermaßen beschrieben: «In langen, glashellen Prismen krystallisierende Substanz, — — — sehr leicht in Wasser löslich, verbrannte ohne Rückstand und reagierte sauer auf Lackmus. Mit Silbernitrat gab sie einen weißgelblichen Niederschlag, der sich aber in wenigen Sekunden tief rotbraun färbte. — — — Die Probe auf Stickstoff durch Schmelzen mit Kalium usw. fiel negativ aus.» Die Reaktion mit Silbernitrat könnte nämlich möglicherweise als auf der Einwirkung einer schwefelhaltigen Verbindung beruhend gedeutet werden, indem sie frappant z. B. an die von Thiosulfat erinnert (wenn auch eben solches wohl kaum hat vorliegen können). Übrigens möchte ich gegen Henzes Auffassung opponieren, nach welcher das genannte Präparat eine bestimmte, organische Chlorverbindung darstellen soll, genauer «ein chlorhaltiges Spaltungsprodukt des Gorgonins». Man muß nämlich bedenken, daß der gefundene Cl-Gehalt (2,55%), auch wenn man nur ein Atom Cl in dem Molekül voraussetzt — ein Molekulargewicht von nicht weniger als 1390 verlangen würde, was sich nicht gut mit den übrigen, beschriebenen Eigenschaften vereinigen läßt (es ist übrigens nicht direkt angegeben, ob der beobachtete Cl-Gehalt sich wirklich in organischer Bindung befand). Jedenfalls kann ich nichts anderes sehen, als daß der Cl-Gehalt als eine bloße Verunreinigung zu deuten ist.

¹⁾ Die Probe ist folgendermaßen ausgeführt worden: einige Zentigramme der Substanz werden mit 2 ccm verdünnter H_2SO_4 (1 Vol. konz. + 3 Vol. Wasser) und ein paar Körnchen von $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ erhitzt.