

195. Untersuchungen über den optischen Reinheitsgrad von Aminosäuren in natürlichen Eiweisstoffen

von K. Weil und Werner Kuhn.

(17. X. 44.)

1. *Optisch aktive Stoffe als Aufbaustoffe der Organismen; stereo-autonome und stereostabilisierte Substanzen.*

Die optische Aktivität ist ein Gebiet, welche unter verschiedenen Gesichtspunkten Interesse bietet. Wir haben auf der einen Seite die theoretisch-physikalische Fragestellung nach den Grössen, welche innerhalb der optisch aktiven Molekel für Grösse und Vorzeichen der auftretenden Drehung den Ausschlag geben, also die Frage nach der modellmässigen Deutung des Drehungsvermögens. In den letzten Jahrzehnten ist es möglich geworden, hier einen klaren Überblick zu bekommen¹⁾.

Von eben so grossem Interesse war und ist die Frage nach der Entstehung der aktiven Verbindungen. Da optisch aktive Stoffe zuerst als Baustoffe lebender Organismen gefunden wurden, galt ihre Darstellung und Verwendung eine Zeitlang als besondere Leistung der Lebenskraft. Die Vermutung wurde aufgegeben, sobald es gelang, Racemate mit Hilfe bereits vorhandener optisch aktiver Stoffe in die Komponenten zu zerlegen, und erst recht, als gezeigt wurde, dass aktive Substanzen aus inaktivem Ausgangsmaterial unter Benützung optisch aktiver Katalysatoren erzeugt werden können²⁾. Ein weiterer Schritt war die Erzeugung aktiver Substanzen aus inaktivem Ausgangsmaterial ohne Benützung aktiver Hilfsstoffe durch Anwendung von zirkularpolarisiertem Lichte³⁾.

Wenn nun auch durch solche Versuche, insbesondere durch die Synthese mit Katalysatoren gezeigt ist, dass die fortlaufende Erzeugung optisch aktiver Aufbaustoffe durch einen Organismus, welcher bei seiner Entstehung mit einer kleinen Menge aktiver Stoffe ausgestattet wurde, keine unbekannten Kräfte erfordert, so bleibt die Synthese und ausschliessliche Verwendung dieser Stoffe an den lebenswichtigen Punkten der Organismen doch eine merkwürdige Tatsache. Wenn wir alle Hilfsmittel beiziehen, bleibt ja die Reindarstellung eines optischen Antipoden und noch mehr die ausschliessliche Darstellung eines Antipoden (ohne den Umweg über das Race-

¹⁾ Vgl. z. B. W. Kuhn, Naturwiss. **26**, 289, 305 (1938); W. Kuhn und K. Freudenberg, Hand- und Jahrbuch d. chem. Physik, Bd. **8**, III (1932).

²⁾ G. Bredig und K. Fajans, B. **41**, 752 (1908); Z. physikal. Ch. **73**, 25 (1910); **75**, 232 (1911).

³⁾ W. Kuhn und E. Knopf, Z. physikal. Ch. [B] **7**, 299 (1930).

mat und die nachfolgende Trennung desselben), eine mühsame Aufgabe. Die Verwendung optisch aktiver Stoffe ist, chemisch gesehen, eine Belastung.

Die Gründe, derentwegen der Organismus diese Komplikation auf sich nimmt, sind aber nicht klar. Wir müssen uns im Augenblick mit der Feststellung der Tatsache begnügen und mit dem Hinweis, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten, die Lage der Gleichgewichte und die Löslichkeit von Verbindungen bei Verwendung optisch aktiver Stoffe anders, mitunter ganz anders liegen als bei Verwendung von Racematen¹⁾.

Ein Beispiel hierfür, eines der ausgeprägtesten dieser Art, welches uns bisher bekannt geworden ist, wird uns weiter unten begegnen: das Salz des Leucin-methyl-esters mit Dioxy-dinaphtyl-dicarbonsäure. Es wird sich zeigen, dass der linksdrehende Ester mit der linksdrehenden Säure ein ausgezeichnet krystallisierendes und in Methylalkohol schwerlösliches Salz liefert, während der linksdrehende Leucinester mit der rechtsdrehenden Säure ein praktisch genommen unendlich lösliches, nicht zur Krystallisation zu bringendes Salz gibt.

Wenn somit die Frage nach den Gründen, warum der Organismus aktive Substanzen von hohem Reinheitsgrad als Aufbau-stoffe verwendet, eine schwierige, vielleicht aber auch unnütze Frage ist, so ist über die Mittel, mit deren Hilfe der Reinheitsgrad erzeugt und aufrecht erhalten wird, etliches auszusagen.

Einmal zeigt es sich, dass die in einem Organismus vorkommenden aktiven Substanzen eingeteilt werden können in stereoautonome aktive Pfeilersubstanzen und stereostabilisierte aktive Substanzen²⁾.

Stereostabilisierte Substanzen sind solche, bei denen der optische Reinheitsgrad, mit dem die Substanz im Organismus auftritt, grösser ist als der Reinheitsgrad, den man auf Grund der Racemisierungsgeschwindigkeit der Substanz und auf Grund der Selektivität, die bei der asymmetrischen Synthese der Substanz vorherrscht, erwarten würde; der optische Reinheitsgrad stereostabiler Substanzen ist vielmehr dadurch bedingt, dass sie im Organismus an andere, optisch sehr reine stereoautonome Substanzen gebunden und in diesem gebundenen Zustande gespeichert werden. Ein Beispiel für eine stereostabilisierte Substanz ist das *d*-Mandelsäurenitril, welches als schwerlösliches Glucosid der Gentiobiose gespeichert wird in solcher Weise, dass der optische Reinheitsgrad des Nitrils durch den optischen Reinheitsgrad der Gentiobiose erzwingen und aufrecht erhalten wird³⁾.

Bei den stereoautonomen Substanzen wird der optische Reinheitsgrad nicht durch Bindung an andere optisch stabilere und reinere Substanzen erzwingen. Hier ist der Reinheitsgrad vielmehr ausschliesslich gegeben durch den Grad der Selektivität, welcher bei der Synthese der Substanz vorherrscht. Es ist wahrscheinlich, dass die im Organismus

¹⁾ Für eine Zusammenstellung solcher Unterschiede vgl. z. B. *W. Kuhn*, Ergebnisse der Enzymforschung **5**, 1 (1936), insbes. S. 5ff.; im folgenden wird diese Arbeit als l. c. I bezeichnet. Siehe ausserdem *W. Kuhn*, Optische Spezifität von Enzymen in Handbuch d. Enzymologie, Hrsg. von *F. F. Nord* und *R. Weidenhagen*, S. 188 (1940); im folgenden als l. c. III bezeichnet, insbes. S. 194ff.

²⁾ *W. Kuhn*, l. c. I, insbes. S. 43 ff.; sowie *Z. angew. Ch.* **49**, 215 (1936), im folgenden als l. c. II bezeichnet.

³⁾ l. c. I, insbes. S. 44; l. c. II S. 217.

vorkommenden Zucker und die Aminosäuren zu den stereoautonomen Substanzen gehören. Sie sind als der Pfeiler zu betrachten, mit dem das ganze Gebäude der optischen Selektivität des Organismus steht und fällt.

2. Grenzen bei der Erzeugung und Erhaltung des Reinheitsgrades aktiver Substanzen; Haltbarkeitsgleichung.

Eine genauere kinetische und thermodynamische Analyse der Bedingungen, unter denen stereoautonome Substanzen vom Organismus aufgebaut werden, zeigt nun, dass der bei einer Synthese erzielbare optische Reinheitsgrade auch unter günstigsten Bedingungen endlich ist und dass er zudem nicht unbeschränkt haltbar ist¹⁾.

Die Überlegungen wurden am Beispiel der Synthese des Mandelsäurenitrils aus Benzaldehyd und Blausäure mit Emulsin als Katalysator genau durchgeführt und durch Vergleich mit der Erfahrung, wie sie in der Literatur beschrieben war, bestätigt. Der charakteristische Verlauf ist folgender: An dem optisch selektiven Katalysator (Emulsin) wird zunächst der eine der möglichen Antipoden des Endproduktes (Mandelsäurenitril) in grossem Überschuss erzeugt, sodass in einem bestimmten Zeitpunkt praktisch genommen die gesamte Ausgangssubstanz in den bevorzugten Antipoden des Endproduktes umgewandelt ist. Dann aber zeigt sich, dass die so erhaltene optische Aktivität nur eine vorübergehende Erscheinung ist. Wenn die mit Hilfe des Katalysators erzeugte aktive Verbindung nicht sofort vom Katalysator entfernt und weiterverarbeitet wird, so tritt unweigerlich, und zwar unter Mithilfe desselben Katalysators, der zunächst die fast 100-proz. selektive Synthese bewirkt hatte, eine Racemisierung der erzeugten aktiven Substanz ein.

Die Verhältnisse werden in diesen und ähnlichen Fällen durch die sogenannte Haltbarkeitsgleichung²⁾ wiedergeben. Unter der Haltbarkeit H der am Katalysator erzeugten Substanz verstehen wir dabei das Verhältnis

$$H = \frac{\tau_{\text{rac}}}{\tau_{\text{akt}}}$$

wo τ_{akt} die Zeit ist, während welcher der Katalysator mit dem Substrat in Berührung sein muss, damit sich $\frac{2}{3}$ der Ausgangssubstanz in das (optisch fast reine) Endprodukt umsetzen, und τ_{rac} die Zeit, während welcher das Substrat nach Erreichung des Höchstwertes der optischen Aktivität mit dem Katalysator in Berührung bleiben muss, damit die optische Aktivität von ihrem Höchstwert auf $\frac{1}{3}$ dieses Betrages absinkt.

¹⁾ W. Kuhn, l. c. I und II, sowie Forschungen und Fortschritte **14**, 91 (1938); Z. Altersf. **1**, 325 (1939), im folgenden als l. c. IV bezeichnet; Handb. d. Enzymologie (l. c. III), insbes. S. 211 ff.

²⁾ l. c. I., S. 35; l. c. II, S. 217; l. c. III, S. 213.

Diese Haltbarkeit H ist, wie in den zitierten Arbeiten gezeigt wurde, proportional der Gleichgewichtskonstanten K , welche chemisch-thermodynamisch die Umsetzung der Ausgangsstoffe in die Endprodukte beherrscht und welche umso grösser ist, je vollständiger, chemisch gesehen, der Umsatz der Ausgangsstoffe in die Endprodukte stattfindet; ausserdem ist H proportional der Selektivität des Katalysators, welche letztere gemessen wird durch k_d/k_l , wenn k_d die Geschwindigkeitskonstante ist, mit welcher am Katalysator die Bildung des d -Antipoden, k_l die Geschwindigkeitskonstante, mit welcher am selben Katalysator die Bildung des l -Antipoden erfolgt. Die Haltbarkeitsgleichung lautet für das angegebene Beispiel bei Benützung der eben gegebenen Definitionen:

$$H = \frac{\tau_{rac}}{\tau_{akt}} = \frac{1}{2} \frac{k_d}{k_l} K \quad (1)$$

Wäre H gleich unendlich, so könnten wir in einer endlichen Zeit τ_{akt} die aktive Substanz am Katalysator erzeugen und nachher unendlich lange in reinem aktivem Zustande behalten. Nach (1) wäre aber hierzu notwendig, dass entweder k_d/k_l , d. h. die Selektivität des Katalysators oder aber K , die bei der Synthese obwaltende chemische Gleichgewichtskonstante, unendlich gross wäre. In Wirklichkeit ist bei allen chemischen Reaktionen die Gleichgewichtskonstante K endlich, weil einem unendlich grossen K eine unendlich grosse Bildungsaffinität entsprechen würde; aber auch die Selektivität k_d/k_l ist bei allen in vitro bekannten Reaktionen endlich. Dies heisst, es wird wohl H recht gross, aber nicht unendlich gross werden, auch nicht bei den aktiven Synthesen im Organismus.

Es wurde in den zitierten Arbeiten weiter darauf hingewiesen, dass die in Gleichung (1) zutage tretenden Möglichkeiten, H gross zu machen, bei den im Organismus getätigten aktiven Synthesen weitgehend ausgenützt werden, indem die Gleichgewichtskonstante K extrem gross gewählt wird, ebenso die Selektivität k_d/k_l . Es wurde ferner darauf hingewiesen, dass der Gleichung (1) auch insofern Rechnung getragen wird, als Substrat und Katalysator bei den biochemischen aktiven Synthesen nicht lange miteinander in Berührung gelassen werden, indem die synthetisierten Substanzen rasch von den Katalysatoren entfernt und anderweitig verwendet werden. Es wurde aber gezeigt, dass auch die beste Ausnützung dieser Möglichkeiten das Auftreten unerwünschter Antipoden in zunächst kleinen Mengen nicht verhindern kann.

Man kann weiter sehen, dass die Bildung kleiner Mengen der unerwünschten Antipoden noch nicht gleichbedeutend ist mit deren Auftreten an den entscheidend wichtigen Stellen im Organismus, indem beispielsweise der Auf-

bau von Eiweisstoffen aus Aminosäuren selbst wieder ein Vorgang ist, bei welchem die erwünschten *l*-Aminosäuren vor den *d*-Aminosäuren bevorzugt werden. Man sieht weiter, dass die trotz allem entstandenen unerwünschten Antipoden durch besondere Mechanismen ausgetilgt werden können, im Falle der Aminosäuren durch die *d*-Aminosäure-Oxydasen¹⁾. Man bemerkt aber dabei, dass solche Abwehrmechanismen erst wirksam sein können, nachdem die unerwünschten Antipoden eine gewisse endliche Konzentration erreicht haben und dass sie dementsprechend eine 100-proz. Entfernung der unerwünschten Antipoden nicht bewerkstelligen können. D. h.: die Einschaltung der Abwehrmechanismen kann nur bewirken, dass die unerwünschten Antipoden nicht sofort in die im Organismus lebenswichtigen Organstellen vordringen, oder: es brauchen nicht alle Organstellen gleichzeitig und in gleichem Masse von den unerwünschten Antipoden befallen zu werden. Dies ist alles, was durch die Abwehrmechanismen und durch die Zwischenschaltung einer Mehrzahl von selektiven Reaktionen beim Aufbau der wichtigsten Verbindungen erzielt werden kann.

Überlegungen dieser Art führen²⁾ zu der Vermutung, dass im Laufe des Alterns eines Individuums eine Abnahme des optischen Reinheitsgrades eintreten wird und dass die Begrenztheit der Lebensdauer der Individuen mit dieser Abnahme des Reinheitsgrades zusammenhängen könnte.

Unabhängig von der Richtigkeit solcher Vermutungen stellt sich die Frage nach dem genauen Grade der optischen Reinheit, mit welchem die aktiven Stoffe in einem Organismus oder in verschiedenen Organen desselben zu treffen sind. Es war zu vermuten, dass der Reinheitsgrad mitunter sehr gross und damit die Feststellung einer Abweichung von 100 % schwierig sein wird.

3. Schwierigkeiten der Methoden zum Nachweis kleiner Mengen seltener optischer Antipoden neben grossen Mengen der natürlichen Antipoden.

Nach der Auseinandersetzung und Hervorhebung dieser Gesichtspunkte³⁾ sind Versuche von *F. Kögl* und Mitarbeitern durchgeführt⁴⁾ worden, welche die Feststellung der Begrenztheit des optischen Reinheitsgrades von Aminosäuren in verschiedenen Eiweisstoffen zum Gegenstand haben. Über die Richtigkeit der von *Kögl*

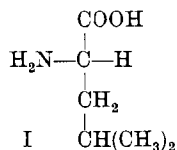
¹⁾ *H. A. Krebs*, Z. physiol. Ch. **217**, 191 (1933); Biochem. J. **29**, 1620 (1935).

²⁾ I. c. I bis IV. ³⁾ I. c. I (1936).

⁴⁾ *F. Kögl* und *H. Erzleben*, Z. physiol. Ch. **258**, 57 (1939); **261**, 154 (1939); **264**, 108, 198 (1940); Naturwiss. **27**, 486 (1939); *F. Kögl*, *H. Erzleben* und *A. M. Akkermann*, Z. physiol. Ch. **261**, 141 (1939); *F. Kögl*, *H. Erzleben* und *H. Herken*, Z. physiol. Ch. **263**, 107 (1940); **264**, 219 (1940); *F. Kögl*, *H. Erzleben* und *G. J. van Veersen*, Z. physiol. Ch. **277**, 251 (1943).

veröffentlichten Ergebnisse, insbesondere über das Vorkommen von racemischer Glutaminsäure in malignen Tumoren ist eine restlose Einigkeit bisher nicht erzielt worden¹⁾.

Es hängt dies weitgehend mit der Schwierigkeit eines einwandfreien Nachweises kleiner Mengen von optischen Antipoden neben grossen Mengen des normalen Antipoden zusammen. In Erkenntnis dieser Schwierigkeit haben wir uns in einer Untersuchung, welche sich über mehrere Jahre erstreckte, bemüht, eine Methode zu finden, um ganz kleine Mengen von *d*(-)-Leucin neben grossen Mengen des normalen *l*(+)-Leucins in Substanz nachzuweisen.



Die Schwierigkeit besteht hier wie in andern Fällen z. T. darin, dass das Leucin (Formel I) in den natürlichen Eiweisstoffen gemeinsam mit andern Aminosäuren vorkommt, sodass bei der Hydrolyse ein kompliziertes Gemisch erhalten wird. Die nächste Aufgabe nach der Hydrolyse besteht also darin, aus dem Hydrolysegemisch die interessierende Aminosäure herauszuholen, um anschliessend den seltenen, nicht normalen Antipoden nachzuweisen. Bei keiner der Operationen darf der experimentelle Eingriff eine Spur einer Racemisierung verursachen; ebensowenig aber darf er zu einem Verlust des seltenen Antipoden führen.

Wir werden weiter unten zeigen, dass bei der Hydrolyse der Peptidbindungen, sowie bei der Behandlung von *l*-Leucin mit Salzsäure bei den bei der Eiweisshydrolyse angewendeten Temperaturen und Konzentrationen innerhalb der Fehlergrenze unserer Versuche keine Racemisierung des Leucins stattfindet. (Abschnitt 7.)

Bei der anschliessend zu bewirkenden chemischen Trennung der Aminosäuren voneinander muss man sich klar darüber sein, dass jede Methode, bei welcher eine fraktionierte Krystallisation vorkommt, auszuschliessen ist. Es ist nämlich bekannt, dass wir beispielsweise aus optisch nicht reiner Mandelsäure durch fraktionierte Krystallisation eine kleine Menge des im Überschuss vorhandenen Antipoden in optisch reiner Form herausarbeiten können, d. h.: der seltene Antipode bleibt, wenn die Löslichkeit des häufigen Antipoden bereits überschritten ist, zunächst noch in Lösung und wird mit der Mutterlauge, gegebenenfalls zusammen mit andern Verunreinigungen, entfernt.

¹⁾ E. Abderhalden, Z. physiol. Ch. **275**, 1335 (1942); Th. Wieland, B. **75**, 1001 (1942); E. Waldschmidt-Leitz, Ergebn. Enzymf. **9**, 193 (1943).

Wir haben zur Trennung der Aminosäuren die Estermethode von *E. Fischer* angewendet. Die Aminosäuren werden quantitativ in die Methylester übergeführt und diese werden anschliessend durch fraktionierte Destillation voneinander getrennt. Es wird noch zu zeigen sein, dass bei der Esterbildung, bei der Freisetzung des Esters und bei der Destillation innerhalb der Grenzen unseres Nachweises keine Racemisierung eintritt. Ein Verlust an seltenen Antipoden ist auch nicht zu erwarten, da die Veresterung in flüssiger Phase und quantitativ erfolgt. Ebenso ist kein Fall bekannt, in welchem bei der fraktionierten Destillation eine auch nur teilweise Racemattrennung bewirkt worden wäre. Die quantitative Trennung von Aminosäureestern voneinander durch fraktionierte Destillation ist andererseits eine anspruchsvolle Aufgabe, welche aber mit Hilfe eines von *W. Kuhn* und *K. Ryffel* beschriebenen Apparates¹⁾ gelöst werden konnte.

Es sei darauf hingewiesen, dass während der Destillation ein Verlust an einen oder andern Antipoden des Leucins durch Reaktion mit einem Aminosäure-ester unter Bildung eines Diketo-piperazins denkbar ist. Wir haben, um dies nach Möglichkeit zu vermeiden, die Destillation bei möglichst niedriger Temperatur (47° C) vorgenommen.

Eine Bildung von Diketo-piperazin in grösserer Menge haben wir bei der Dauer und bei der Temperatur unserer Destillation weder beim racemischen noch beim aktiven Leucin-methylester festgestellt. Wir haben daher keinen Grund, hier eine wesentliche Fehlerquelle zu vermuten, wenn auch die Bildung gemischter Diketo-piperazine durch das Gesagte nicht ausgeschlossen ist. Jedenfalls aber können wir feststellen, dass die Bildung von Diketo-piperazin höchstens einen mengenmässigen Verlust an einen oder andern Antipoden, aber niemals die Entstehung des seltenen Antipoden zur Folge haben kann.

Grundsätzlich sollte es möglich sein, eine Trennung der Aminosäuren voneinander ohne Verschiebung des Konzentrationsverhältnisses, in welchem die Antipoden vertreten sind, auch durch Ausschütteln der wässrigen Lösung mit verschiedenen Lösungsmitteln zu verwirklichen (Methode von *Dakin*)²⁾, sowie mit Hilfe des elektrischen Transportes in wässriger Lösung (Trennung auf Grund der verschiedenen Basizität)³⁾ als auch durch Adsorption an Kohle⁴⁾ oder allgemeiner durch die chromatographische Analyse⁵⁾. Bei einer allfälligen Anwendung dieser Methoden wäre zu bedenken, dass die aus dem Hydrolysegemisch herauszuholende Substanz (in unserem Falle das Leucin) unter Umständen zunächst in grosser Verdünnung erhalten wird. Sie müsste also anschliessend an die chemische Trennung und unter Vermeidung von Krystallisationen zwecks Nachweis des seltenen Antipoden wieder konzentriert werden. Dabei muss das Präparat (z. B. das Leucin) zum mindesten grammweise gewonnen werden, wenn der seltene Antipode erst darin gesucht werden muss.

Um den seltenen Antipoden (*d*(-)-Leucin) in dem durch Destillation des Estergemisches gewonnenen Leucin-methylester nachzuweisen, wurde der Ester in methylalkoholischer Lösung mit dem im

¹⁾ *W. Kuhn* und *K. Ryffel*, *Helv.* **26**, 1693 (1943).

²⁾ *H. D. Dakin*, *Biochem. J.* **12**, 290 (1918), *J. Biol. Chem.* **44**, 499 (1920); *Z. physiol. Ch.* **130**, 159 (1923).

³⁾ *G. L. Forster* und *C. L. A. Schmidt*, *J. Biol. Chem.* **56**, 545 (1923); *Am. Soc.* **48**, 1709 (1926). Weitere Literatur siehe: *C. L. A. Schmidt*, *The Chemistry of Aminoacids and Proteins* S. 147 (1938).

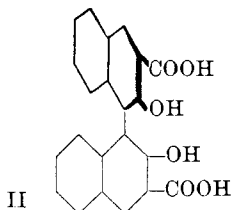
⁴⁾ *A. Tiselius*, *Koll. Z.* **105**, 101, 105 (1943).

⁵⁾ Siehe z. B. *Th. Wieland*, *B.* **75**, 1001 (1942).

Sichtbaren links drehenden Antipoden der 1,1'-Dinaphtyl-2,2'-dioxy-3,3'-dicarbonsäure neutralisiert. Diese Säure bildet mit dem seltenen Antipoden, also mit dem $d(-)$ Leucin-methylester ein schwer lösliches krystallisiertes Salz, während das Salz dieser Säure mit dem Ester des natürlichen $l(+)$ Leucins praktisch genommen unendlich löslich ist. Die Genauigkeit des Nachweises kann noch dadurch verschärft werden, dass die Hauptmenge des $l(+)$ Leucinesters vor dem Zusatz der Dioxy-dinaphtyl-dicarbonsäure als Pikrat oder Oxalat entfernt wird. Der Nachweis des seltenen Antipoden beruht also darauf, dass die Löslichkeitseigenschaften der diastereomeren Salze

$l(+)$ Leucinester — linksdrehende Säure; Abkürzung: [$l(+)$ L; $(-)$ D]; und
 $d(-)$ Leucinester — linksdrehende Säure; Abkürzung: [$d(-)$ L; $(-)$ D]

extrem verschieden sind.



Anstatt der Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure (Formel II) könnte grundsätzlich jede andere optisch aktive Säure verwendet werden, wenn sie nur mit den beiden Antipoden des Leucinesters diastereomere Salze von genügend verschiedener Löslichkeit liefert. Tatsächlich haben wir ausser der Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure auch die Salzbildung weiterer aktiver Säuren mit Leucinester untersucht. Über die Ergebnisse wird in einer andern Arbeit berichtet werden. Die Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure war diejenige Verbindung, bei welcher die mit den Leucinestern gebildeten beiden diastereomeren Salze am ausgeprägtesten unterschieden waren. Die Unterschiede scheinen grösser zu sein als bei irgendeinem andern bisher in der Literatur beschriebenen Paar von diastereomeren Verbindungen. Da die Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure für unseren Nachweis eine entscheidende Rolle spielt, sei über die Eigenschaften ihrer Verbindungen mit $d(-)$ - und $l(+)$ -Leucin-methylester das Wichtigste zusammengestellt.

4. Die diastereomeren Salze von 1,1'-Dinaphtyl-2,2'-dioxy-3,3'-dicarbonsäure mit d - und l -Leucin-methylester.

a. Das Salz $l(+)$ -Leucin-methylester mit $(+)$ -Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure.

Abkürzung: [$l(+)$ L; $(+)$ D].

Dieses Salz fällt als blassgelbes Pulver krystallin aus, wenn die Komponenten ($l(+)$ -Leucin und $(+)$ -Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure) in methylalkoholischer Lösung zusammengegeben werden. Entsprechendes gilt für das Spiegelbild dieses Salzes, das [$d(-)$ L; $(-)$ D]. Das Aussehen der Krystalle ist aus den Mikrophotographien 1 und 2 ersichtlich. Smp. 217,5—218° C korr.

Elementaranalyse von [$l(+)$ L; $(+)$ D]; Krystalle Fig. 1; Bruttoformel: $C_{36}H_{44}O_{10}N_2$; entsprechend einer Zusammensetzung des neutralen Salzes aus 1 Mol 1,1'-Dinaphtyl-2,2'-dioxy-3,3'-dicarbonsäure und 2 Mol Leucin-methylester¹⁾.

¹⁾ Die Analysen wurden im organ. analyt. Laboratorium der E. T. H. ausgeführt.

$C_{36}H_{44}O_{10}N_2$	Ber. C 65,04	H 6,67%
	Gef. „ 64,99	„ 6,66%
Elementaranalyse von $[d(-)L; (-)D]$; Krystalle Fig. 2;		
$C_{36}H_{44}O_{10}N_2$	Ber. C 65,04	H 6,67%
	Gef. „ 65,04	„ 6,68%

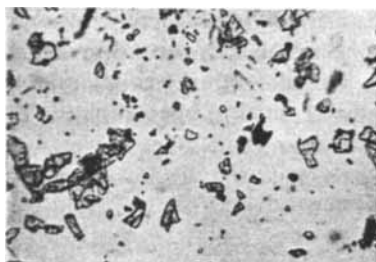


Fig. 1.

Salz von $l(+)$ -Leucin-methylester mit
(+)-Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure.
Smp. 218° C. Vergrößerung 360 mal.

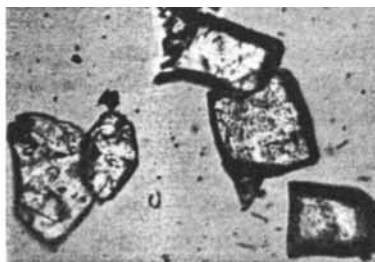


Fig. 2.

Salz von $d(-)$ -Leucin-methylester mit
(-)-Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure.
Smp. 218° C. Vergrößerung 360 mal.

Die Zusammensetzung des Salzes wurde auch durch das Ergebnis einer Stickstoffbestimmung (nach *Kjeldahl*) bestätigt.

Spezifische Drehung in CH_3OH :

$$l(+)L; (+)D]: [\alpha]_D^{18} = +113,33^{\circ} \text{ in } 0,474\text{-proz. Lösung}$$

$$d(-)L; (-)D]: [\alpha]_D^{18} = -113,56^{\circ} \text{ in } 0,411\text{-proz. Lösung}$$

Der Mittelwert dieser beiden spez. Drehungen ist: $[\alpha]_D^{18} = 113,45^{\circ}$. Dem entspricht eine molekulare Drehung für $[l(+)L; (+)D]$ von $[M]_D^{18} = 754,3^{\circ}$.

Dabei betragen die molekularen Drehungen in Methylalkohol vom Natriumsalz der $[+D]: [M]_D^{18} = 671^{\circ}$ und vom sauren Oxalat des $[l(+)L]: [M]_D^{18} = 51,76^{\circ}$; die Summe der Drehungen von einer Molekel $[+D]$ -Salz und 2 Molekeln $[l(+)L]$ -Salz wäre also zusammen $[M]_{\text{Komponenten des Salzes}} = 774,52^{\circ}$.

Der Vergleich der Zahlen 754,3 und 774,5 zeigt, dass die molekulare Drehung von $[l(+)L; (+)D]$ mit ziemlich guter Näherung additiv zusammengesetzt ist aus der Drehung des aktiven Säureions und der des aktiven Basenions.

Wir können vorwegnehmen, dass eine ähnliche Superposition der Drehungen auch für das Salz $[l(+)L; (-)D]$ festzustellen ist. Die beobachtete molekulare Drehung ist hier gleich $-570,0^{\circ}$, während sich additiv aus den angegebenen Werten für das Natriumsalz der Säure und das saure Oxalat der Base ein Wert $-567,5^{\circ}$ berechnen würde.

Die Löslichkeit des Salzes $[l(+)L; (+)D]$ in Methylalkohol beträgt bei $28,5^{\circ}$ C $0,44 \pm 0,4$ g Salz in 100 g CH_3OH .

b. Das Salz von $l(+)$ -Leucin-methylester mit (-)-Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure.

Abkürzung $[l(+)L; (-)D]$.

Es fällt amorph aus, wenn die Komponenten in ätherischer Lösung zusammengegeben werden. Ebenso wird es erhalten durch Zusammengeben der Komponenten in methylalkoholischer Lösung und Abdunsten des Lösungsmittels. Mit Methylalkohol ist die Substanz in jedem Verhältnis mischbar; es tritt Auflösung ein, sobald der Methylalkohol ausreicht, um alle Substanz zu benetzen. In krystalliner Form konnte das Salz bisher nicht erhalten werden.

Genau entsprechend verhält sich das zu $[l(+)\text{L}; (-)\text{D}]$ spiegelbildliche Salz $[d(-)\text{L}; (+)\text{D}]$. Smp. unscharf 170—174° C kor. r.

Elementaranalyse von $[l(+)\text{L}; (-)\text{D}]$; amorphes Pulver, Bruttoformel $\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{O}_{10}\text{N}_2$, entsprechend einer Zusammensetzung des neutralen Salzes aus 1 Mol 1,1'-Dinaphtyl-2,2'-dioxy-3,3'-dicarbonsäure und 2 Mol Leucin-methylester.

$\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{O}_{10}\text{N}_2$	Ber. C 65,04	H 6,67%
	Gef. „ 64,89	„ 6,55%

Spez. Drehung in CH_3OH von $[l(+)\text{L}; (-)\text{D}]$: $(\alpha)_D^{17} = -85,8^\circ$ in 0,711-proz. Lösung. Die daraus folgende molekulare Drehung, sowie die Gültigkeit der Superposition siehe oben.

Löslichkeitsverhältnisse: Das Salz ist sehr gut löslich in CH_3OH , praktisch genommen unlöslich dagegen in Äther.

c. Halbracemische Salze von Leucin-methylester und Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure.

α) Racemischer Leucin-methylester und aktive Säure. Beim Zusammengeben von racemischem Leucin-methylester und $[(+)\text{D}]$ in Methylalkohol fällt sofort das schwerlösliche $[l(+)\text{L}; (+)\text{D}]$ aus, während das leichtlösliche Diastereomere $[d(-)\text{L}; (+)\text{D}]$ in Lösung bleibt. Es tritt also Racemattrennung ein. Sie kann für die präparative Durchführung der Spaltung von racemischem Leucin-methylester benützt werden.

Gibt man die gleichen Substanzen in einem Lösungsmittel wie Äther zusammen, in welchem die beiden diastereomeren Salze unlöslich sind, so erhält man ein Gemenge von krystallinischem $[l(+)\text{L}; (+)\text{D}]$ und amorphem $[d(-)\text{L}; (+)\text{D}]$. Entsprechendes gilt beim Zusammengeben von racemischem Leucin-methylester mit $[(-)\text{D}]$.

β) Aktiver Leucin-methylester und racemische Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure. Beim Zusammengeben von $[l(+)\text{L}]$ mit racemischer Säure fällt aus Methylalkohol das schwerlösliche $[l(+)\text{L}; (+)\text{D}]$ aus, während das leichtlösliche Diastereomere $[l(+)\text{L}; (-)\text{D}]$ in Lösung bleibt. Auch hier tritt also Racemattrennung ein; sie ist für die präparative Reindarstellung von $[(+)\text{D}]$ und $[(-)\text{D}]$ benützt worden. Aus Äther fällt analog wie unter α) beschrieben, ein Gemisch von krystallinem $[l(+)\text{L}; (+)\text{D}]$ und amorphem $[l(+)\text{L}; (-)\text{D}]$ aus. Sinngemäß Entsprechendes gilt beim Zusammengeben von racemischem Leucinester mit $[(-)\text{D}]$.

Es ergibt sich hieraus, dass halbracemische Salze wie etwa $[d,\text{L}; (+)\text{D}]$ von Zimmertemperatur an bis 0° C nicht existieren.

d. Total-racemische Salze von Leucin-methylester und Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure.

Beim Zusammengeben von racemischem Leucin-methylester mit racemischer Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure in methylalkoholischer Lösung wurden, infolge starker Krystallisationsverzögerungen, verschiedene Ergebnisse erhalten:

α) Amorphes Racemat: In den meisten Fällen tritt eine Ausscheidung krystallisierter Salze nicht ein. Beim Abdunsten des Lösungsmittels wird das Totalracemat als braungelber amorpher Körper erhalten; Schmelzpunkt: allmähliches Sintern und Schmelzen zwischen 99 und 157° C. Als amorphe Fällung wird das Totalracemat auch beim Zusammengeben der Komponenten in ätherischer Lösung erhalten.

β) Krystallinische Ausscheidungen aus dem Totalracemat. Bei längerem Stehen scheiden sich aus der methylalkoholischen Lösung des Totalracemates hellgelbe Krystalle aus. Eine solche Ausscheidung ist zu erwarten, weil in der Lösung des Totalracemates die Voraussetzungen für die Ausscheidung der schwerlöslichen, gutkrystallisierenden Verbindungen $[l(+)\text{L}; (+)\text{D}]$ und $[d(-)\text{L}; (-)\text{D}]$ gegeben sind. Ausser einem Konglomerat dieser beiden Verbindungen könnte auch die Ausscheidung von wahren Racematkrystallen in Frage kommen, nämlich dann, wenn die Löslichkeit des Racemates ausserordentlich klein, viel kleiner als die Löslichkeit der eben genannten diastereomeren Salze sein sollte.

Die erwähnten, aus der totalracemischen Lösung erhaltenen Krystalle geben bei der Schmelzpunktsbestimmung folgendes Bild: 1. Das Krystallgemisch schmilzt unscharf bei etwa 190° C. Ein künstlich durch Zusammenreiben hergestelltes Gemisch aus $[l(+)L; (+)D]$ und $[d(-)L; (-)D]$ ergibt dasselbe. 2. Bestimmt man den Schmelzpunkt unter dem Schmelzpunktsmikroskop, so zeigt sich, dass einzelne isoliert liegende Krystalle bei etwa 215—217° schmelzen. Es folgt daraus¹⁾ mit grosser Wahrscheinlichkeit, dass die aus der totalracemischen Lösung erhaltenen Krystalle tatsächlich ein Gemisch aus den zueinander spiegelbildlichen Verbindungen $[l(+)L; (+)D]$ und $[d(-)L; (-)D]$ sind. Totalracemische Krystalle existieren also nicht; würden solche vorliegen, so müsste sich das Schmelzen eines einzelnen Krystallindividuums vom Schmelzen mehrerer nebeneinanderliegender Individuen, also vom Schmelzen des Krystallgemisches nicht unterscheiden.

Löslichkeit des Totalracemates in Methylalkohol. Beim Totalracemat tritt nicht nur wie erwähnt die Ausscheidung von Krystallen schwer und mit Verzögerungen auf, sondern es ist auch nach eingetretener Keimbildung die Krystallisationsgeschwindigkeit und damit die Geschwindigkeit der Einstellung des Lösungsgleichgewichtes klein. Über die Löslichkeit des Totalracemates sind daher nur orientierende Angaben möglich, wobei wir versucht haben, das Lösungsgleichgewicht von beiden Seiten her zu bestimmen.

Es wurde in einem Falle racemischer Leucin-methylester mit in Methylalkohol gelöster racemischer Dinaphtyl-dioxy-dicarbonensäure zusammengegeben. In diesem Falle mussten sich die Krystalle (Gemisch von $[d(-)L; (-)D]$ und $[l(+)L; (+)D]$) in der Lösung erst bilden; hier wird das Lösungsgleichgewicht von der Seite einer übersättigten Lösung her eingestellt. Der Gehalt der Lösung betrug nach einer Dauer von 50 Tagen bei 21° C etwa 6,1 g auf 100 g Methylalkohol.

Im zweiten Falle wurden je 0,1 g krystallisiertes $[d(-)L; (-)D]$ und $[l(+)L; (+)D]$, je vom Smp. 218° C miteinander gemischt, mit 6 cm³ Methylalkohol übergossen und stehen gelassen. Hier betrug der Gehalt der Lösung nach einer Dauer von 50 Tagen bei 21° C etwa 2,2 g auf 100 g Methylalkohol. Es folgt daraus, dass das Gleichgewicht in keinem der beiden Fälle ganz hergestellt war und dass die wahre Löslichkeit bei 21° C zwischen 2,2 und 6,1 g auf 100 g Methylalkohol liegen muss.

Da nach weiter oben gemachten Angaben die Löslichkeit von $[d(-)L; (-)D]$ für sich und die von $[l(+)L; (+)D]$ für sich bei 28,5° C nur 0,44 g auf 100 g Methylalkohol beträgt, ist es zunächst erstaunlich, dass bei gleichzeitiger Gegenwart dieser beiden Salze eine Löslichkeit herauskommt, welche sicher grösser als 2,2 und damit grösser als 0,88 (Summe der beiden Einzellöslichkeiten) ist. Man versteht aber die grössere Löslichkeit des Totalracemates, wenn man sich vergegenwärtigt, dass auf 100 g Methylalkohol, welcher mit beiden genannten Krystallsorten als Bodenkörper in Berührung steht, nicht nur

$$0,44 \text{ g } \left[\begin{matrix} d(-)L \\ d(-)L - D \end{matrix} \right] \text{ und } 0,44 \text{ g } \left[\begin{matrix} l(+)L \\ l(+)L + D \end{matrix} \right]$$

enthalten sein wird, sondern dass sich durch Umsetzung dieser Salze mit $[l(+)L]$ bzw. $[d(-)L]$ in Lösung gemischte Salz-molekeln bilden müssen, welche als Bodenkörper nicht vorkommen, trotzdem aber zum Trockengehalt der Lösung beitragen. Falls die Affinitätskonstanten, was ungefähr zutreffen dürfte, bei der Bildung dieser gemischten Salz-molekeln in Lösung alle gleich gross sind, haben wir neben den bereits erwähnten Molekel-sorten in Lösung zu erwarten

$$0,44 \text{ g } \left[\begin{matrix} l(+)L - D \\ l(+)L \end{matrix} \right]; 0,44 \text{ g } \left[\begin{matrix} d(-)L + D \\ d(-)L \end{matrix} \right]; 0,88 \text{ g } \left[\begin{matrix} d(-)L - D \\ l(+)L \end{matrix} \right];$$

$$(2 \times 0,44 \text{ g aus statistischen Gründen}); 0,88 \text{ g } \left[\begin{matrix} d(-)L + D \\ l(+)L \end{matrix} \right];$$

also insgesamt $8 \times 0,44 = 3,5$ g Salz auf 100 g Methylalkohol. Das ist eine Zahl, welche jedenfalls zwischen den beiden experimentell bestimmten Grenzen von 2,2 und 6,1 g liegt.

¹⁾ Der Schmelzpunkt von $[l(+)L; (+)D]$ und von $[d(-)L; (-)D]$ liegt bei 217,5° C.

Auf Grund dieser Überlegung ist auch die unten zu erwähnende Feststellung zu verstehen, dass die Löslichkeit von $[d(-)L; (-)D]$ in einer methylalkoholischen Lösung, welche einen grossen Überschuss von dem leicht löslichen $[l(+)L; (-)D]$ enthält, grösser ist als in reinem Methylalkohol.

Es sei weiter erwähnt, dass sowohl von racemischem Leucin-methylester als auch von racemischer Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure das Molekulargewicht durch Bestimmung der Siedepunktserhöhung in Methylalkohol bestimmt wurde. Dabei zeigte sich, dass beide Stoffe monomolekular gelöst werden, d. h. dass die racemische Lösung ein äquimolekulares Gemisch monomer gelöster Antipoden ist. Auf Grund dieses Befundes ist es wahrscheinlich, dass auch die Lösung des Salzes in allen Fällen monomere Salzmolekeln enthält und dass damit die vorhin gegebene Deutung der Löslichkeit des Totalracemates qualitativ und quantitativ richtig ist.

Da in unsern Versuchen immer nur die Fälle a, b und c verwirklicht sind, sind die Eigenschaften des Totalracemates, obwohl an sich interessant, für das Nachfolgende ohne besondere Bedeutung. Insbesondere folgt aus den unter a, b und c gemachten Angaben für die praktische Feststellung von kleinen Mengen an $d(-)$ -Leucin neben $l(+)$ -Leucin: Wenn wir den Leucinester in methylalkoholischer Lösung mit $[(-)D]$ versetzen, so ist das einzige Salz, das sich aus der Lösung in krystallinischer Form ausscheiden kann, das schwerlösliche $[d(-)L; (-)D]$. Die Grenze des Nachweises ist gegeben durch die allerdings geringe Löslichkeit von $[d(-)L; (-)D]$, wobei zu bemerken ist, dass die Löslichkeit dieses Salzes in sehr konzentrierten und sehr hochviskosen methylalkoholischen Lösungen von überschüssigem $[l(+)L; (-)D]$ etwas grösser als in reinem Methylalkohol ist.

e) Nachweis kleiner Mengen von $d(-)$ -Leucin-methylester in fast reinem $l(+)$ -Leucin-methylester mit Hilfe von Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure.

Die Möglichkeit und Empfindlichkeit dieses Nachweises wird durch die nachstehenden beiden Versuche deutlich gemacht.

1. 2,3230 g des Salzes $[l(+)L; (-)D]$ und 0,0210 g des Salzes $[d(-)L; (-)D]$ werden in 4 g CH_3OH durch leichtes Erwärmen völlig gelöst. Das in Lösung vorhandene Leucin ist dann zu 99,10% die Form $[l(+)L]$, zu 0,89% die Form $[d(-)L]$. Die Lösung wird darauf vorsichtig im Vakuum eingedampft bis zu einem Gewicht von 4,58 g. In diesem Zustande besteht die Lösung aus 2,34 g Salz und 2,24 g Methylalkohol; Salzgehalt demnach 51%. Die Lösung wird während einiger Tage bei 0° C stehen gelassen, wobei sich ein fester Bodenkörper ausscheidet; die überstehende Mutterlauge wird dekantiert, der Bodenkörper wiederum in etwa 10 cm³ Methylalkohol gelöst. Die so gewonnene Lösung wird wiederum durch Abdunsten des Methylalkohols auf etwa 1 g Gesamtgewicht eingengt und sodann während zwei Tagen bei 0° C stehen gelassen. Der entstandene Bodenkörper wird abfiltriert, mit kaltem Methylalkohol gewaschen und bei 80° C getrocknet. Man erhält 0,028 g Salz vom Smp. 203° (anstatt 217,5—218°). Durch nochmaliges Umkrystallisieren aus Methylalkohol erhält man 0,010 g eines Salzes vom Smp. 217,5—218° kor., welches sich durch Mischschmelzpunkt als reines $[d(-)L; (-)D]$ identifizieren lässt.

Wie der nachstehende 2. Versuch zeigt, ist es für die Durchführung des Nachweises nicht unbedingt nötig, den gesamten auf Gehalt an $[d(-)L]$ zu prüfenden Leucin-methylester mit $[(-)D]$ zu neutralisieren.

2. Zu einem Gemisch von

1,1046 g [*l*(+)*L*] und 0,0145 g [*d*(-)*L*]

entsprechend 98,71% [*l*(+)*L*] und 1,29% [*d*(-)*L*] werden 0,516 g [*(-)**D*], sowie 1,5 cm³ CH₃OH zugesetzt. (Zur vollständigen Neutralisierung des vorhandenen Leucin-methylesters wären 1,45 g [*(-)**D*] notwendig.) Aus dem Gemisch von Estersalz und freiem Ester krystallisieren wir bei 18° C 0,020 g Salz vom Smp. 211—213° korr. aus. Aus 0,0145 g [*d*(-)*L*] hätten sich 0,033 g [*d*(-)*L*; (*-*)*D*] bilden können. Das noch unreine Salz wurde durch Umkrystallisieren aus CH₃OH gereinigt; es wurde dabei 0,004 g reines [*d*(-)*L*; (*-*)*D*] vom Smp. 217—218° C erhalten.

Beide Versuche zeigen, dass wir in Leucin-methylester, welcher zu 99% aus [*l*(-)*L*] und zu 1% aus [*d*(-)*L*] besteht, den seltenen Antipoden durch (*-*)-Dioxy-dinaphtyl-dicarbonsäure mit völliger Sicherheit in Substanz als [*d*(-)*L*; (*-*)*D*] vom Schmelzpunkt 217,5° nachweisen können.

Die Grenze des unmittelbaren Nachweises liegt vermutlich bei etwa 0,8% des seltenen Antipoden. Sie könnte durch vorherige Eliminierung der Hauptmenge des normalen Antipoden um 1 oder 2 Zehnerpotenzen weiter getrieben werden. Nur wäre es dann erforderlich, dass gleichzeitig damit der Nachweis geführt wird, dass die Operationen, welche zur Darstellung und Isolierung des Leucin-methylesters angewendet werden, innerhalb derselben Fehlergrenzen keine Racemisierung bewirken.

f) Verhalten der Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure gegenüber anderen optisch aktiven Aminosäure-estern.

Da sich nach dem Vorstehenden und dem weiter Mitzuteilenden die (*-*)-Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure ausgezeichnet für den Nachweis des seltenen Antipoden von Leucin eignet, haben wir einige orientierende Versuche unternommen, um abzuklären, ob dieselbe Substanz sich auch für den Nachweis der seltenen Antipoden bei andern Aminosäuren bzw. deren Methylestern eignen würde. Dies ist merkwürdigerweise, soweit unsere bisherigen Feststellungen reichen, nicht der Fall.

Salze mit *l*(+)-Glutaminsäure-dimethylester. Hergestellt wurden die neutralen Salze des Dimethylesters der *l*(+)-Glutaminsäure (Sdp. 102,5—103° bei 2 mm Hg; $\alpha_D^{16} = 11,19^\circ$ (*l* = 1 dm)) sowohl mit [(+)*D*] als auch mit [(*-*)*D*]. Sowohl in Methylalkohol als auch in Aceton als Lösungsmittel konnten diese Salze, selbst nach stärkstem Eindampfen, niemals krystallisiert erhalten werden.

Salze mit *l*(+)-Alanin-methylester. Hergestellt wurden die neutralen Salze von *l*(+)-Alanin-methylester {Abkürzung: [*l*(+)*A*]; Sdp. 38° C bei 14 mm Hg; $\alpha_D^{20} = +1,70^\circ$ (*l* = 1 dm)} mit [(+)*D*], [(*-*)*D*] und [(±)*D*].

Das neutrale Salz [*l*(+)*A*, rac *D*] krystallisiert beim Zusammengeben der Komponenten in Methylalkohol aus. Der Schmelzpunkt der Krystalle liegt bei 120° C uncorr.; die durch Zersetzung des Salzes erhaltene Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure erweist sich als racemisch; die entstandenen Krystalle sind also ein Halbracemat, gebildet aus *l*(+)-Alanin-methylester und racemischer Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure.

Bei Bildung der Salze $[l(+)\text{A}; (+)\text{D}]$ und $[l(+)\text{A}; (-)\text{D}]$ durch Zusammengeben der Komponenten in methylalkoholischer Lösung konnte keinerlei Krystallisation beobachtet werden.

Salze mit $l(-)$ Prolin-methylester. Hergestellt wurden die sauren und neutralen Salze von $l(-)$ Prolin-methylester [Sdp. 43°C bei 3 mm Hg; $\alpha_{\text{D}}^{20} = -28,15^{\circ}$ ($l = 1\text{ dm}$)] mit $[+D]$, $[-D]$ und $[\pm D]$. Es konnten aus methylalkoholischer Lösung bei allen diesen Komponenten, auch bei Konzentrierung bis zur völligen Entfernung des Lösungsmittels niemals krystallisierte Verbindungen erhalten werden.

Es ergibt sich daraus, dass die Bildung einer gut krystallisierenden schwer löslichen Verbindung von $[-D]$ mit $d(-)$ -Leucin-methylester eine weitgehend spezifische Reaktion ist.

5. Gang des Versuchs.

Als ersten natürlichen Eiweisstoff, in welchem eine Prüfung des darin vorhandenen Leucins auf $d(-)$ -Leucin durchgeführt wurde, wählten wir Rosshaar. Dies geschah in der Überlegung, dass es sich hier gewissermassen um ein Abfallprodukt des Organismus handelt, mit dessen Hilfe gegebenenfalls die unerwünschten Antipoden aus dem Organismus entfernt werden.

Die beim Versuch eingehaltenen Bedingungen werden nachstehend genau angegeben, da auch die Kontrollversuche nur bei genauer Einhaltung der selben Bedingungen einen Sinn haben.

Zur Freisetzung der Aminosäuren werden 300 g gereinigtes und bei 100°C getrocknetes Schweifhaar des Pferdes mit 900 g konz. HCl ($d = 1,19$) versetzt und während $1\frac{1}{2}$ Stunden auf dem Wasserbad erwärmt. Dabei tritt vollständige Auflösung ein. Die Lösung wird darauf während 6 Stunden auf dem *Babo*-Blech im Luftbad bei 100 — 110°C vorsichtig am Rückfluss gekocht.

Kontrollversuche durch Formoltitration¹⁾ zeigen, dass hierbei eine völlige Hydrolyse eintritt, indem der freie Aminostickstoff einen bei weiterer Behandlung unveränderlich festen Grenzwert erreicht. Nach der selben Methode wurde auch festgestellt, dass die Hydrolyse während 25 Stunden bei 90°C , während 23 Stunden bei 108°C und während 6 oder 10 Stunden bei 113°C je zum selben Ergebnis führt.

Es wird darauf unter vermindertem Druck bei einer Badtemperatur von 40 — 50°C das Wasser-Salzsäuregemisch abdestilliert; der Rückstand wird mit 1 Liter CH_3OH übergossen, worauf getrocknetes Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet wird; anschliessend wird zur völligen Lösung $\frac{1}{2}$ Stunde auf dem Wasserbade erwärmt. Der Alkohol wird wiederum bei 35°C unter vermindertem Druck abdestilliert. Die Operation wird noch zweimal wiederholt.

Anschliessend werden die entstandenen Aminosäure-methylester mit NaOH bzw. mit K_2CO_3 in Freiheit gesetzt und in Äther aufgenommen. Zu diesem Zwecke wird das erhaltene Gemisch von Hydrochloriden der Aminosäure-ester in drei Teile geteilt; jeder Teil wird zu etwa $\frac{1}{3}$ seines Volumens mit Wasser versetzt und die Lösung mit dem Doppelten ihres Volumens an Äther überschichtet. Unter energischer Kühlung (0°C in der wässrigen Lösung der Esterhydrochloride) und unter kräftigem Schütteln wird 33-proz. NaOH -Lösung in kleinen Portionen so lange zugegeben, bis die überschüssig vorhandene Salzsäure neutralisiert ist. Zur so neutralisierten Lösung wird, weiterhin unter Kühlung und in kleinen Portionen, K_2CO_3 zugegeben. Die im Kolben vorhandenen Salze erstarren dabei zu einer krümeligen Masse, welche gründlich mit Äther ausgeschüttelt wird. Die

¹⁾ J. H. Northrop, J. gen. Physiol. 9, 767 (1926).

ätherische Lösung wird mit K_2CO_3 getrocknet; von diesem wird abfiltriert und die Lösung anschließend über wasserfreiem Na_2SO_4 aufgehoben.

Die im Kolben verbliebene Masse von Kalium- und Natriumchlorid und -carbonat umhüllt noch einen Teil der entstandenen Aminosäure-ester. Eine Gewinnung derselben wäre durch Versetzen des Rückstandes mit Säuren und Laugen und wiederholtes Ausäthern möglich, allerdings unter Gefahr der Racemisierung. Wir haben auf die Gewinnung verzichtet, da es auf eine Bestimmung des Verhältnisses von $d(-)$ und $l(+)$ Leucin und nicht auf eine Erfassung des gesamten Leucins ankommt.

Der Äther wird aus der ätherischen Lösung durch vorsichtiges Abdestillieren auf einem Wasserbad entfernt und das verbleibende Estergemisch einer Rohdestillation im Vakuum mittels einer ausschliesslich aus Glas bestehenden Apparatur unterworfen. Die unter verschiedenen Bedingungen übergehenden Ester werden durch Kühlen mit flüssiger Luft aufgefangen.

Eine erste Fraktion, die bei einem Druck von 12 mm unterhalb $25^\circ C$ übergeht, kann praktisch genommen keinen Leucinester enthalten; sie wird verworfen. Ebenso wird eine zweite Fraktion von etwa 13 g, die bei 12 mm Druck zwischen 25 und 60° übergeht, nicht weiter untersucht. Sie dürfte im wesentlichen die Ester von Glykokoll und Alanin enthalten.

Der Siedepunkt von Alanin-methylester bei einem Druck von 14 mm Hg wird beispielsweise zu $38^\circ C$, der von Leucin-methylester bei 12 mm Hg zu $80^\circ C$ angegeben.

Weitere Fraktionen der Rohdestillation werden erhalten, indem der Druck auf 0,5 mm erniedrigt und die Temperatur gleichzeitig gesenkt wird. Man erhält als dritte Fraktion etwa 30 g, die bei 0,5 mm zwischen 35 — $40^\circ C$ übergehen und als vierte Fraktion etwa 8,4 g, welche zwischen 40 und $100^\circ C$ übergehen. Diese beiden Fraktionen (die dritte und vierte) werden vereinigt und einer sorgfältigen fraktionierten Destillation unterworfen. Die Fraktionierung erfolgt in der Weise, dass bei konstant gehaltener Temperatur von $30^\circ C$ zunächst der Druck allmählich auf 3 mm Hg erniedrigt wird und dass der Rest bei konstantem Druck von 3 mm Hg durch sukzessive Steigerung der Temperatur überdestilliert wird.

Die Apparatur ist eine Kolonne von 140 cm Länge und kreisringförmigem Querschnitt, wie sie von W. Kuhn und K. Ryffel (l. c.) vor einiger Zeit beschrieben wurde. Weitere Einzelheiten siehe in einer späteren Arbeit. Ausgehend von 50 g Rohdestillat wurden beispielsweise folgende Fraktionen erhalten¹⁾:

1. 17 g bei 30° , Druck abnehmend von 50 auf 10 mm Hg; $n_D^{27^\circ} = 1,3829$
2. 2 g bei 30° , Druck abnehmend von 10 auf 6 mm Hg
3. 0,4 g bei 30 — 43° , Druck abnehmend auf 3 mm Hg
4. 2,4 g bei 43 — 45° , Druck konstant auf 3 mm Hg
5. 3,2 g bei 45 — 46° , Druck konstant auf 3 mm Hg
6. 5 g bei 46 — 47° , Druck konstant auf 3 mm Hg
7. 3 g bei 47° , Druck konstant auf 3 mm Hg

Die physikalischen Konstanten der 4.—7. Fraktion waren:

- | | | |
|-------------|------------------------------|--|
| 4. Fraktion | $n_D^{27^\circ} = 1,4152$ | $\alpha_D^{27^\circ} = +20,98^\circ$ ($l = 1$ dm) |
| 5. Fraktion | $\varrho^{27^\circ} = 0,983$ | $n_D^{27^\circ} = 1,4291$ $\alpha_D^{27^\circ} = +16,07^\circ$ ($l = 1$ dm) |
| 6. Fraktion | $\varrho^{27^\circ} = 0,957$ | $n_D^{27^\circ} = 1,4261$ $\alpha_D^{27^\circ} = +13,07^\circ$ ($l = 1$ dm) |
| 7. Fraktion | $\varrho^{27^\circ} = 0,931$ | $n_D^{27^\circ} = 1,4176$ $\alpha_D^{27^\circ} = +16,21^\circ$ ($l = 1$ dm) |

Zum Vergleich seien die physikalischen Konstanten für reinen Leucin-methylester angegeben:

$$\text{Sdp.}_3 \text{ mm} = 47^\circ C; n_D^{27^\circ} = 1,4271; \alpha_D^{27^\circ} = +14,10^\circ; \varrho^{27^\circ} = 0,942.$$

¹⁾ Mit gleich gutem Trennungsergebnis kann auch die Rohdestillation unterlassen und die Feindestillation mit dem nach Abdunsten des Äthers verbleibenden Estergemisch unmittelbar vorgenommen werden.

Der Vergleich mit den an den Fraktionen der Feindestillation beobachteten Daten zeigt, dass der im Rosshaar vorhandene Leucin-methylester in den Fraktionen 5, 6 und 7 enthalten ist und dass insbesondere die 6. Fraktion aus praktisch reinem Leucin-methylester besteht.

Als Verunreinigung kommt insbesondere der Prolin-methylester in Frage, welcher unter 3 mm Hg bei 43° C siedet, also gegenüber dem Leucin-methylester nur 4° Siedepunktsdifferenz aufweist. Durch den Versuch, sowie theoretisch aus den bei der Destillation angewandten Bedingungen wurde gezeigt, dass die Trennung von Prolin-methylester und Leucin bei unsern Versuchsbedingungen praktisch vollständig war. Die beim Vergleich interessierenden weiteren Daten für *l*-Prolin-methylester sind $n_D^{21} = 1,45197$; $\alpha_D^{21} = -27,06^\circ$ ($l = 10$ cm); $\alpha_D^{21} = 1,076$; $[\alpha]_D^{21} = -25,2^\circ$.

Zur Prüfung der gewonnenen, das Leucin enthaltenden Esterfraktionen auf einen Gehalt an *d*(-)-Leucin wurden beispielsweise 0,8060 g Leucinester sowie 1,0410 g der linksdrehenden Dioxy-dinaphtyl-dicarbonsäure in 4,14 cm³ Methylalkohol gelöst und einige Tage bei 0° C stehen gelassen. Bei Anwesenheit von *d*-Leucin krystallisiert das schwerlösliche [*d*(-)-L; (-)-D] aus; es kann gewogen, nötigenfalls umkrystallisiert und durch den Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt identifiziert werden.

6. Ergebnisse mit Eiweisstoffen verschiedener Herkunft.

a) Rosshaar I. Eine erste Probe von Rosshaar (Schweifhaar eines alten, nicht näher gekennzeichneten Pferdes) wurde in vorstehend beschriebener Weise hydrolysiert und auf Leucin-methylester verarbeitet. Die durch Rohdestillation und anschliessende Feindestillation des Estergemisches gewonnene, aus praktisch reinem Leucinester bestehende Fraktion hatte:

$$n_D^{27} = 1,4227, \alpha_D^{27} = +16,70^\circ \quad (l = 1 \text{ dm})$$

Nach Vermischung von 0,775 g dieses Esters mit 1,00 g (-)-Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure und 4 cm³ Methylalkohol schieden sich 0,042 g zunächst unreines [*d*(-)-L; (-)-D] vom Smp. 210° korr. (anstatt 217,5—218°) aus. Durch einmaliges Umkrystallisieren aus wenig Methylalkohol steigt der Schmelzpunkt auf 217,5—218°. Ein Mischschmelzpunkt bestätigt das Vorliegen von reinem [*d*(-)-L; (-)-D]. Diese Identifizierung der Krystalle wurde auch durch Beobachtung des Verhaltens im Polarisationsmikroskop sowie durch Messung des Drehungsvermögens in Methylalkohol bestätigt.

Das Auftreten des nicht natürlichen Antipoden *d*(-)-Leucin in dieser Rosshaarprobe ist damit eindeutig festgestellt, und zwar beträgt der relative Gehalt an *d*(-)-Leucin neben dem natürlichen *l*(+)-Leucin mindestens $100 \times \frac{0,042}{1,775} = 2,4\%$, indem ja auf 1,775 g Salz 0,042 g [*d*(-)-L; (-)-D] isoliert wurden. Auf Grund von Versuchen über die Löslichkeit von [*d*(-)-L; (-)-D] ist anzunehmen, dass in der Lösung, welche 4 cm³ CH₃OH enthält, weitere 0,016 g des Salzes gelöst bleiben; der Gesamtgehalt von 1,775 g Estersalz an [*d*(-)-L; (-)-D] würde demgemäss gleich $0,042 + 0,016 \text{ g} = 0,058 \text{ g}$ sein. D. h. der Gehalt an *d*(-)-Leucin neben dem natürlichen *l*(+)-Leucin in Rosshaar I beträgt dann $100 \times \frac{0,058}{1,775} = 3,3 \pm 0,5\%$.

b) Rosshaar II. Eine zweite Probe von Pferdeschweifhaar stammte von einem siebenjährigen Pferde. Die physikalischen Daten der bei der fraktionierten Destillation erhaltenen Aminosäure-methylester wurden bei der Besprechung des im vorigen Kapitel beschriebenen Beispiels angegeben. 0,8060 g Substanz aus der 6. Fraktion ($n_D^{27} = 1,4261$) wurden zusammen mit 1,0410 g [(-)-D] in 4,14 cm³ Methylalkohol gelöst. Trotzdem die Lösung mit [*d*(-)-L; (-)-D] angeimpft wurde und trotzdem die Lösung während drei Monaten bei 0° aufgestellt wurde, erfolgte keine Ausscheidung des schwerlöslichen [*d*(-)-L; (-)-D]. Die Lösung wurde anschliessend durch Abdunsten von Methylalkohol auf eine Konzentration von 50 Gew.-% Estersalz in Methylalkohol eingeengt und wiederum geimpft; es trat dabei wiederum keine Krystallausscheidung ein. Es musste der Schluss

gezogen werden, dass der Gehalt dieser Rosshaarprobe wesentlich kleiner ist als bei Probe I; der Gehalt an $[d(-)L]$ ist offenbar so klein, dass die Löslichkeitsgrenze von $[d(-)L; (-)D]$ bei diesen Versuchsbedingungen nicht unterschritten wird.

Auch die Fraktionen 5 und 7 wurden in derselben Weise auf $d(-)$ -Leucinester geprüft mit dem Ergebnis, dass dieser Antipode nicht nachzuweisen war. Um sicher zu gehen, dass für das negative Ergebnis nicht eine Krystallisationsverzögerung entscheidend war, wurden zu 0,775 g Ester der Fraktion 6 4 cm³ Methylalkohol und 1 g $[(-)D]$, ausserdem aber noch 0,044 g $[d(-)L]$ und die dazu äquivalente Menge von $[(-)D]$ zugegeben. Eine Ausscheidung von $[d(-)L; (-)D]$ trat daraufhin ein und es konnten nach 12 Tagen bei 0° C 0,057 g dieses Salzes vom richtigen Smp. (217—218°) erhalten werden.

Die Versuche zeigen zusammen, dass in Rosshaar II innerhalb der Fehlergrenzen der Methode kein $d(-)$ -Leucin enthalten ist; d. h.: die Verunreinigung des in dieser Substanz enthaltenen normalen $l(+)$ -Leucins mit $d(-)$ -Leucin ist kleiner als etwa 0,5%.

c) Rosshaar III. Es war durch diese Versuche erwiesen, dass $d(-)$ -Leucin im natürlichen Eiweiss des Rosshaares (gelegentlich) vorkommt, dass aber quantitative Unterschiede zwischen einzelnen Individuen bestehen. Bei der nächstfolgenden Probe wurde darauf Wert gelegt, Schweifhaar von einem älteren Individuum zu erhalten. Untersucht wurde als Probe III das Schweifhaar von einem 24jährigen Pferde.

Zur Prüfung auf $d(-)$ -Leucin gelangte eine Esterfraktion, welche durch Feindestillation ohne vorangehende Rohdestillation gewonnen war und welche folgende Konstanten aufwies: $n_D^{21°} = 1,4235$; $\alpha_D^{21°} = +14,45°$ ($l = 1$ dm); $\rho^{21°} = 0,954$; Sdp._{3 mm} = 47° C. Die Vergleichsdaten für reinen Leucinester sind: $n_D^{21°} = 1,4295$; $\alpha_D^{21°} = +14,3°$ ($l = 1$ dm); $\rho^{21°} = 0,949$. 0,775 g von diesem Ester wurden mit 4 cm³ Methylalkohol und 1 g $[(-)D]$ versetzt und während 30 Tagen der Krystallisation bei 0° C überlassen. Es gelangten dabei Krystalle von $[d(-)L; (-)D]$ zur Ausscheidung; sie wiesen nach einmaligem gutem Waschen mit Methylalkohol einen Schmelzpunkt von 217,5—218° C auf. Durch den Mischschmelzpunkt mit der Vergleichssubstanz, durch Vergleich der Krystalle unter dem Mikroskop mit denen von Fig. 1 und 2, sowie durch Messung der optischen Drehung in Methylalkohol wurden sie als das Salz des „unnatürlichen“ Leucins identifiziert. Die bei Anwendung von 0,775 g $[L]$ in Substanz erhaltene Menge an $[d(-)L; (-)D]$ betrug 0,007 g. Es entspricht dies einem Gehalt des in Rosshaar III enthaltenen $(+)$ -Leucins an dem unnatürlichen Antipoden $[d(-)Leucin]$ von 0,4%.

Unter Berücksichtigung der Löslichkeit von $[d(-)L; (-)D]$ erhöht sich die Zahl auf $1,6 \pm 0,5\%$.

d) Casein. Zur Orientierung wurden entsprechende Versuche mit Casein vorgenommen [Präparat der Fa. *Wander A.-G.* Bern; aus Milch hergestellt]. Die Hydrolyse, Veresterung und Feindestillation wurden genau wie bei den Versuchen mit Rosshaar beschrieben durchgeführt. Zur Prüfung auf $d(-)$ -Leucin gelangte eine Esterfraktion mit folgenden Konstanten: $n_D^{21°} = 1,4177$, Sdp._{3 mm} = 45°. 0,775 g dieser Fraktion wurden mit 4 cm³ Methylalkohol und 1 g $[(-)D]$ versetzt und während 25 Tagen der Krystallisation bei 0° C überlassen. Eine Ausscheidung von $[d(-)L; (-)D]$ konnte dabei nicht beobachtet werden. Die Menge des zur Untersuchung gelangenden Caseinpräparates (insgesamt 150 g) war allerdings zur Erlangung von ca. 20 g bei 3 mm Hg destillierenden Estergemisches nicht ausreichend, so dass die Feinfraktionierung in der grossen Fraktionierkolonne Schwierigkeiten verursachte. Wir können aus dem Ausbleiben einer $[d(-)L; (-)D]$ -Fällung den Schluss ziehen, dass der Gehalt des Leucins an $d(-)L$ im Falle von Casein höchstens etwa 0,5—1% beträgt.

Die beschriebenen Versuche zeigen, dass offenbar die Empfindlichkeit, welche zum Nachweis der natürlichen Antipoden optisch aktiver Stoffe im natürlichen Eiweiss notwendig ist, im Falle des Leucins erreicht ist. Es zeigt sich, dass unnatürliche Antipoden neben den natürlichen in wechselnden Mengen vorkommen.

Die Feststellung, dass im Schweifhaar von zwei alten Pferden der unnatürliche Antipode gefunden wurde, im Schweifhaar eines jungen (7-jährigen) Pferdes dagegen nicht, lässt die Deutung zu, dass der optische Reinheitsgrad der im Organismus enthaltenen Aminosäuren mit zunehmendem Alter abnimmt. Um diese Aussage als sicher ansehen zu können, sind weitere Versuche, welche auch in Angriff genommen sind, notwendig; ebenso sei nochmals darauf hingewiesen, dass der optische Reinheitsgrad nicht in allen Organen eines Organismus der gleiche zu sein braucht.

Die Versuche, durch welche das Auftreten von $d(-)$ -Leucin nachgewiesen wurde, wären indessen unvollständig, wenn nicht gleichzeitig durch sorgfältige Versuche gezeigt werden könnte, dass die vom Eiweiss zum $[d(-)L; (-)D]$ vom Smp. 217,5° führenden Schritte innerhalb der Nachweisgrenze keine Erzeugung des nachzuweisenden $d(-)$ -Leucins mit sich bringen. Um dies zu zeigen, sind nachstehend eine Anzahl Testversuche beschrieben.

7. Ergänzungen, Testversuche.

a) Versuche über die eventuelle Racemisierung des Leucins beim Kochen mit konz. Salzsäure.

Solche Versuche sind notwendig, weil das Eiweiss zur Durchführung der Hydrolyse, wie in Abschnitt 5 ausgeführt wurde, während insgesamt 8 Std. mit konz. Salzsäure bei 100—110° behandelt wird.

In einem Testversuch wurden daher 5 g $l(+)$ -Leucin vom Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -10,14^\circ$ in konz. Salzsäure gelöst und in einer ausschliesslich aus Glas bestehenden Apparatur während 29½ Stunden bei 115—120° am Rückfluss auf dem Oelbad erhitzt; Wasser und Salzsäure werden darauf bei einer Badtemperatur von 40° C im Vakuum entfernt, und das Leucin mit Methylalkohol unter Einwirkung von Salzsäure, ähnlich wie in Abschnitt 5 beschrieben, verestert. Der Ester wird bei 76° C und einem Druck von 12 mm destilliert. Der erhaltene Ester besitzt eine Drehung $\alpha_D^{23} = +12,95^\circ$ ($l = 1$ dm). 0,85 g dieses Esters werden mit 1,1 g $[(-)D]$ und 10 cm³ Methylalkohol versetzt; der Methylalkohol wird durch Abdunsten entfernt, so dass eine Lösung entsteht, welche auf 2 g Estersalz 2 g Methylalkohol enthält. Trotz Impfen mit dem schwerlöslichen $[d(-)L; (-)D]$, findet auch bei monatelangem Stehen bei 0° C keine Krystallausscheidung statt. Durch Eindampfen kann der Methylalkohol noch weiter entfernt werden, ohne dass irgendeine Krystallausscheidung beobachtet worden wäre.

Der Versuch wurde mit kleinen Abänderungen beim Erhitzen des Leucins in Salzsäure, beim Verestern, sowie bei der Prüfung mit Hilfe von Dinaphtyl-dioxy-dicarbon-säure mehrmals mit demselben negativen Ergebnis wiederholt. Erst bei einem Versuch, in welchem das Kochen von $l(+)$ -Leucin mit konz. Salzsäure während 88 Stunden (anstatt 8 Stunden beim Hydrolyseversuch) fortgesetzt wurde, konnten in 2,05 g Leucin-methylester 0,014 g $d(-)$ -Leucin-methylester in Form von $[d(-)L; (-)D]$ vom Smp. 210° (nach dem Umkrystallisieren 217,5°) nachgewiesen werden. Es entspricht dies einer Bildung von 0,7% $d(-)$ -Leucin bei 88-stündigem Erhitzen mit konz. Salzsäure. Es ist damit klar, dass das Auftreten von 2 und mehr % $d(-)$ -Leucin nach nur 8-stündigem Erhitzen nicht die Folge einer Racemisierung durch Säureeinwirkung sein kann.

In Ergänzung hierzu wurde auch die Frage einer Racemisierung des Leucins beim Kochen mit methylalkoholischer Salzsäure experimentell geprüft. Zu diesem Zwecke wurden 5 g $l(+)$ -Leucin mit 50 cm³ 95-proz. Methylalkohol, welcher mit HCl-Gas gesättigt wurde, während 26 Stunden auf dem Wasserbad am Rückfluss zum Sieden erhitzt.

In dem in üblicher Weise aus diesem Leucin hergestellten Methylester konnte mit Hilfe von Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure keine Spur von *d*(-)-Leucinester nachgewiesen werden. Es könnte also auch eine alkoholische an die Stelle einer wässerigen Eiweiss-hydrolyse gesetzt werden, ohne dass bei den jetzigen Nachweisgrenzen eine Racemisierung zu befürchten ist. Der Versuch ist auch ein guter Beweis dafür, dass bei der Veresterung des Hydrolysegemischs mit methylalkoholischer Salzsäure keine Racemisierung eintritt

b) Ausschlüssung einer Racemisierung bei der Hydrolyse von Peptidbindungen.

Wenn auch durch die vorigen Versuche eine Racemisierung des Leucins durch Einwirkung der Salzsäure des Hydrolysegemisches auf das durch Hydrolyse freigesetzte Leucin ausgeschlossen wird, so besteht zunächst noch die Möglichkeit der Erzeugung von *d*(-)-Leucin aus *l*(+)-Leucin bei der Lösung der Peptidbindungen im Verlaufe des hydrolytischen Abbaus selbst. Die Lösung der Peptidbindungen dürfte über Zwischenzustände führen, in welchen eine normalerweise nicht erfolgende Umlagerung statthaben könnte. Um dies zu prüfen, wurde die Spaltung der Peptidbindungen im 3,6-Diaci-2,5-diisobutyl-piperazin untersucht. Dieser Stoff wurde aus reinem optisch aktivem Leucin-methylester durch längeres Erwärmen auf 40° C erhalten und durch Umkrystallisieren aus Alkohol weiter gereinigt. Smp. 263° korr.; spezif. Drehung in 0,582-proz. methylalkoholischer Lösung: $[\alpha]_D^{16} = -39,2^\circ$.

Die Hydrolyse wurde in der Weise durchgeführt, dass 3,1 g dieses Piperazins mit 31 cm³ konz. HCl (*d* = 1,19) während 7 Stunden bei 101—104° C erwärmt wurden. Dass die hierbei eintretende Hydrolyse vollständig ist, indem beide Peptidbindungen des Piperazins gelöst werden, wurde dadurch nachgewiesen, dass Übereinstimmung von Gesamtstickstoff (nach *Kjeldahl*¹⁾) und freiem Aminostickstoff (durch Formoltitration²⁾) festgestellt wurde. Aus dem so gewonnenen Leucin wurde in der mehrfach erwähnten Weise der Methylester dargestellt und der letztere mit Hilfe von Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure auf *d*(-)-Leucinester geprüft. Es erweist sich dabei als unmöglich, auch nur die geringste Menge [*d*(-)-L; (-)-D] zu erhalten. Es folgt daher, dass auch bei der sauren Hydrolyse der Peptidbindungen im 3,6-Diaci-2,5-diisobutyl-piperazin und auch bei der Hydrolyse des daraus bei Lösung der einen Bindung entstehenden *l*(+)-Leucyl-leucins keine Racemisierung des Leucins stattfindet. Selbstverständlich liegen in den natürlichen Eiweißstoffen ausser Peptidbindungen zwischen Leucin und Leucin auch Peptidbindungen zwischen Leucin und andern Eiweisskomponenten vor. Für die letzteren ist das Ausbleiben einer Racemisierung im Leucin bei der Lösung der Peptidbindungen durch die vorstehend beschriebenen Versuche nicht bewiesen, sondern nur wahrscheinlich gemacht.

8. Darstellung und optische Spaltung von 2,2'-Dioxy-3,3'-dicarboxy-1,1'-dinaphtyl.

Die Darstellung der Verbindung und deren Trennung in die Antipoden mit Hilfe von Brucin ist von *W. M. Stanley* und *R. Adams*³⁾ beschrieben worden. Da wir die dort gemachten Angaben nur teilweise bestätigen können, geben wir nachstehend die von uns benutzten Versuchsdaten.

a) Darstellung des Racemates. 60 g 3-Oxy-naphtalin-2-carbonsäure werden mit 12 g NaOH und 900 cm³ Wasser in einem 10 Liter fassenden Rundkolben unter lebhaftem Rühren zum Sieden erhitzt. Zu dieser Flüssigkeit werden 90 g Eisen(III)-chlorid (FeCl₃·6 H₂O), welche in 180 cm³ heissem Wasser gelöst sind, zutropft, wobei ein

¹⁾ Vgl. *J. K. Parnas*, Z. anal. Ch. **114**, 261 (1938).

²⁾ *J. H. Northrop*, J. gen. Physiol. (New York) **9**, 767 (1926).

³⁾ *W. M. Stanley* und *R. Adams*, R. **48**, 1035 (1929).

grünblauer Niederschlag entsteht. Die Reaktionsmischung wird während 40—50 Minuten weiter zum Sieden erhitzt; nach dem Abkühlen wird sie mit 2-n. NaOH alkalisch gemacht; durch Filtrieren durch eine grosse Nutsche wird sie vom ausgeschiedenen Eisen(III)-hydroxyd getrennt. Die rotbraune Lösung enthält die rohe Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure, welche durch Zugabe von konz. Salzsäure ausgefällt wird. Sie wird abgenutscht, mit Wasser gewaschen und darauf 3 bis 4mal mit 80-proz. Essigsäure digeriert, wobei unverändert gebliebenes Ausgangsmaterial in Lösung geht und wieder gewonnen werden kann. Das ungelöst bleibende Produkt ist 2,2'-Dioxy-3,3'-dicarboxy-1,1'-dinaphtyl. Zersetzungspunkt 328—31° korr. Ausbeute etwa 40% der Theorie.

b) Spaltung des Racemates mit Hilfe von Brucin. 8 g *d,l*-Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure werden in 350 cm³ siedendem absolutem Äthylalkohol gelöst. Zu dieser Lösung werden 20 g Brucin zugegeben. Man erhält als Niederschlag 21 g Salz vom Smp. 236,5—237° unkor. 20 g dieses Salzes werden in 200 cm³ heissem Pyridin gelöst. Nach mehrwöchigem Stehen bei 0° C krystallisieren etwa 14 g Salz aus; sie werden ein zweites Mal aus 150 cm³ Pyridin umkrystallisiert, wobei etwa 8 g Salz erhalten werden, welche ihrerseits ein drittes Mal aus 70 cm³ Pyridin umkrystallisiert werden. Man erhält so etwa 7 g Salz vom Drehungsvermögen $[\alpha]_D^{10} = -85,4^\circ$ in 0,43-proz. Lösung in Pyridin; in Übereinstimmung mit den Angaben von Stanley und Adams l. c.

Zur Freisetzung der Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure wird das Brucinsalz mit der berechneten Menge NaOH versetzt und das sich ausscheidende Brucin mit Chloroform extrahiert, worauf die linksdrehende Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure durch Zufügung von konz. HCl ausgeschieden werden kann. Das Drehungsvermögen der so gewonnenen Säure in absolutem Äthylalkohol war $[\alpha]_D^{20} = -134,5^\circ$, während die weiter unten zu beschreibende Trennung mit Hilfe von *d*(-)-Leucin eine Säure mit dem Drehungsvermögen $[\alpha]_D^{20} = -166^\circ$ liefert.

Eine Literaturangabe (l. c.), wonach der Reinheitsgrad der aktiven Säure durch Umkrystallisieren aus Eisessig verbessert werden kann, konnte von uns nicht bestätigt werden; im Gegenteil: es wurde beim Umkrystallisieren aus Eisessig je nach der Dauer der Operation eine fast vollständige Racemisierung beobachtet.

c) Spaltung des Racemates mit Hilfe von *l*(+)-Leucin-methylester und *d,l*-Leucin-methylester. Sie erfolgt über das neutrale Salz (1 Mol Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure mit 2 Mol Leucin-methylester); eine Trennung mit Hilfe der sauren Salze gelingt nicht.

Zunächst wird der positiv drehende Antipode der Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure mit Hilfe von *l*(+)-Leucin-methylester aus dem Racemat herausgenommen. Zu diesem Zwecke werden 37,4 g der racemischen Säure in ca. 450 cm³ reinem Methylalkohol suspendiert und durch Kochen am Rückfluss teilweise gelöst. Zur siedenden Lösung werden 29 g *l*(+)-Leucin-methylester, [*l*(+)-L] zugegeben, wobei eine klare, dunkelgelb gefärbte Lösung entsteht. Beim Abkühlen auf Zimmertemperatur und anschliessendem Stehen bei 20° C krystallisiert 85% der Theorie an reinem [*l*(+)-L; (+)-D] vom Smp. 217,5° aus. Durch Abdunsten des Methylalkohols und Stehenlassen bei 0° C können weitere Mengen dieses Salzes, insgesamt etwa 98—99% der Theorie gewonnen werden. Durch Auswaschen mit kaltem Methylalkohol oder durch nochmaliges Umkrystallisieren kann das Salz von der anhaftenden Mutterlauge befreit werden. Es kann zur Gewinnung von reiner (+)-Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure verwendet werden. Zu letzterem Zweck wird das Salz [*l*(+)-L; (+)-D] mit der berechneten Menge verd. NaOH versetzt und der freigesetzte *l*(+)-Leucinester mit Äther aufgenommen; aus der wässrigen Lösung wird dann die optisch reine (+)-Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure durch Zusatz von konz. HCl ausgefällt.

Drehungsvermögen in Äthylalkohol: $[\alpha]_D^{23} = +166,5^\circ$ in 0,574-proz. Lösung;

Drehungsvermögen in Pyridin: $[\alpha]_D^{15} = +178,8^\circ$ in 0,97-proz. Lösung.

Der von Stanley und Adams für die Pyridinlösung angegebene Wert ist $[\alpha]_D^{20} = 171^\circ$ in 0,781-proz. Lösung.

Die für den Nachweis des *d*-Leucins benötigte (–)Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure befindet sich als leichtlösliches Salz [*l*(+)L; (–)D] in den Mutterlaugen, aus denen sich die Krystalle [*l*(–)L; (+)D] ausgeschieden hatten. Wegen der Schwerlöslichkeit der letzteren Verbindung muss sich nach Erreichung des Löslichkeitsgleichgewichts optisch fast reine, negativ drehende Säure in der Lösung befinden. — Wenn man bei der Krystallisation des schwerlöslichen Diastereomeren den Methylalkohol soweit entfernt, dass die verbleibende Lösung zu 50% aus Estersalz besteht, so erhält man tatsächlich durch etwa 4-wöchiges Stehen bei 0° C eine Mutterlauge, aus welcher [(–)D] unmittelbar mit einem optischen Reinheitsgrade von 98–99% gewonnen werden kann.

Um absolut reine [(–)D] zu erhalten, wird die das Salz [*l*(+)L; (–)D] enthaltende Mutterlauge durch Eindampfen vom grössten Teil des Methylalkohols befreit, die kalte Lösung sodann mit einem gleich grossen Volumen Wasser verdünnt, worauf die optisch nicht ganz reine [(–)D] mit konz. HCl ausgefällt, mit Wasser gewaschen und bei 120° getrocknet wird. 37,4 g (1/10 Mol) der nahezu reinen [(–)D] werden darauf in etwa 400 cm³ reinem CH₃OH suspendiert und erwärmt. Zur siedenden Lösung werden 58 g (0,4 Mol) von racemischem Leucin-methylester gegeben. (Besser wäre der Zusatz von 0,2 Mol *d*(–)-Leucinester, was aber auf Grund des hohen Preises dieser Substanz nicht durchführbar war.) Beim Abkühlen der Lösung krystallisiert das Salz [*d*(–)L; (–)D] vom Smp. 217,5°, welches in ausgezeichneter Ausbeute erhalten wird. Die Gewinnung der freien Säure aus dem Salz ist bereits bei der Darstellung der positiv drehenden Säure beschrieben worden. Das Drehungsvermögen wurde in Alkohol gemessen; es war $[\alpha]_D^{20} = -166,0^\circ$ in 0,57-proz. Lösung.

Sowohl die optisch aktiven Antipoden als auch das Racemat der Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure sind amorph. Beim Erhitzen tritt zwischen 328–31° korr. allmähliches Zersetzen ein.

Ausser der freien Säure ist zwecks Untersuchung weiterer optischer Eigenschaften der Diäthylester der Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure dargestellt worden. Es geschah dies deswegen, weil erfahrungsgemäss die Tendenz zur Bildung von Assoziaten zwischen Lösungsmittel und gelöster Molekel bei den Estern kleiner ist als bei freien Säuren, sodass die Untersuchung der Ester zweckmässig ist, wenn man die Eigenschaften der Molekel selbst in möglichster Unabhängigkeit von der Wahl des verwendeten Lösungsmittels finden will. Die spezifische Drehung des krystallisierten Dinaphtyl-dioxy-dicarbonsäure-diäthylesters in Äthylacetat bei 16° beträgt $[\alpha]_D = 172^\circ$. Die optische Absorption und insbesondere die Rotationsdispersion, welche bei dieser Verbindung besonderes Interesse bietet, sind in Essigester als Lösungsmittel im Sichtbaren und im Ultraviolett gemessen worden. Die Ergebnisse finden sich in einer kürzlich erschienenen Arbeit¹⁾, auf welche auch wegen der theoretischen Bedeutung der Messungen verwiesen wird.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, dass es mit Hilfe des negativ drehenden Antipoden von 1,1'-Dinaphtyl-2,2'-dioxy-3,3'-dicarbonsäure möglich ist, den nicht natürlichen Antipoden von Leucin [das *d*(–)-Leucin] neben grossen Mengen des natürlichen Antipoden [*l*(+)-Leucin] in Substanz nachzuweisen. Die Methode beruht darauf, dass die negativ drehende Säure mit *d*(–)-Leucin-methylester ein gut krystallisierendes, schwer lösliches Salz bildet, während das Salz mit *l*(+)-Leucin-methylester leicht löslich ist und nicht krystallisiert. Die Empfindlichkeit des direkten Nachweises liegt, bezogen auf das insgesamt anwesende Leucin, zwischen 0,5 und 0,8%.

¹⁾ W. Kuhn und R. Rometsch, Helv. **27**, 1080 (1944), insbesondere Fig. 7, Seite 1097.

Unter Benützung dieser Methode wird das in einigen natürlichen Eiweisstoffen vorkommende Leucin auf seinen Gehalt an „unerwünschten“ Antipoden ($d(-)$ -Leucin) geprüft.

Rosshaarproben von zwei alten Pferden ergaben einen Gehalt an $d(-)$ -Leucin von 3,3 und 1,6 %, die Probe von einem jungen (7-jährigen) Pferde 0 % $d(-)$ -Leucin. Es ist also möglich, dass mit fortschreitendem Alter eine Abnahme des optischen Reinheitsgrades eintritt.

In einer Probe von Casein (aus Milch) wurde kein $d(-)$ -Leucin gefunden.

Durch Kontrollversuche wurde festgestellt, dass weder bei der Hydrolyse der Eiweisstoffe noch bei der nachfolgenden Veresterung und Reingewinnung des Esters durch Destillation eine innerhalb der Nachweisgrenzen liegende Racemisierung stattfindet.

Der *Ciba-Stiftung* und der *Jacques Brodbeck-Sandreuter-Stiftung* sprechen wir für die Mittel, die uns zur Durchführung dieser Arbeit gewährt wurden, unsern Dank aus.

Physikalisch-chemisches Institut der Universität Basel.

196. Sur la mobilité des molécules étrangères dissoutes dans le caoutchouc

par Jean Haegel.

(11 X 44)

Les théories actuelles de l'élasticité du caoutchouc voient l'origine de ce phénomène dans l'agitation thermique des molécules qui le composent¹⁾²⁾³⁾. Un point capital en est la liberté de cette agitation tant qu'elle n'intéresse que des parties de ces très longues molécules, et en même temps l'impossibilité des grands déplacements browniens qui en modifieraient profondément la constellation. Ces propriétés doivent se trouver vérifiées même dans le caoutchouc ne contenant aucun solvant qui le gonflerait.

Un moyen commode d'étudier cette agitation thermique est fournie par l'étude de la mobilité des molécules étrangères ou des parties de ces molécules à l'état dissous dans le caoutchouc. Il est pratique d'utiliser, à cet effet, des corps colorés.

Les recherches qui ont déjà été faites dans le même laboratoire n'ayant pas épuisé la question et ayant fourni des résultats assez inattendus, il nous a paru justifié d'en continuer l'étude.

¹⁾ E. Wöhlisch, Verh. physik.-med. Ges. Würzburg [N. F.] **51**, 53 (1926).

²⁾ K. H. Meyer, v. Susich et Valko, Koll. Z. **59**, 208 (1932).

³⁾ W. Kuhn, Koll. Z. **68**, 2 (1934); Z. angew. Ch. **51**, 640 (1938).