

Wasser langsam eingegossen, wobei sich ein weisser, flockiger Niederschlag abschied, welcher nach mehrstündigem Stehen abgesaugt und mit Wasser gewaschen wurde. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

$C_{21}H_{22}O_6N_6S_4$	Ber. C 43,28	H 3,81	N 14,42	S 22,01%
	Gef. „	43,34	„ 3,41	„ 14,41 „ 22,18%

Spaltung mit Natronlauge.

10 g Sulfathiazol-Formaldehyd-Kondensationsprodukt wurden in 1 Liter n.-Natronlauge suspendiert und 14 Stunden auf 80° erwärmt. Schon nach kurzer Zeit war alles in Lösung gegangen. Hierauf wurde mit Eisessig lackmussauer gestellt, und nach längerem Stehen in der Kälte abgesaugt. Es wurden 6,5 g rohes Sulfathiazol gewonnen, dessen Schmelzpunkt nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser bei 200—201° lag.

Einstündiges Sieden mit der halben Menge 2-n. Natronlauge führte zum gleichen Ergebnis.

Die Analysen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium unter der Leitung von Herrn Dr. *Gysel* durchgeführt.

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

38. Trennung von teilweise racemisiertem Phenylalanin in optisch aktive und optisch inaktive Form

von K. Vogler und H. Koenig.

(20. XII. 47.)

In einer früheren Mitteilung¹⁾ berichteten wir über die Trennung von *d,l*- und *l*-Methionin mit Hilfe von 4'-Methyl-4-nitro-diphenylamin-2-sulfosäure. Inzwischen konnte diese Trennungsmethode mit Diphenylaminsulfosäuren auf teilweise racemisiertes Phenylalanin übertragen werden, worüber in dieser Mitteilung die Rede sein soll.

In Vorversuchen mit einer grösseren Anzahl verschiedenster Diphenylaminsulfosäuren stellten wir am optisch aktiven und optisch inaktiven Phenylalaninsalz der 4'-Chlor-2-nitrodiphenylamin-4-sulfosäure eine ausserordentlich grosse Löslichkeitsdifferenz fest. Das *d,l*-Phenylalaninsalz krystallisierte aus Wasser sehr gut, während die Krystallisation der *l*-Komponente vorerst Schwierigkeiten bereitete.

Da *l*-Phenylalanin auch in siedendem Wasser beschränkt löslich ist (9,9 g pro 100 cm³ Wasser bei 100° C)²⁾, musste die wässrige Salzlösung, entstanden durch Zusammengießen der Komponenten in Wasser, im Vakuum eingeengt werden, was meistens zu einem ölichen

¹⁾ K. Vogler und F. Hunziker, Helv. **30**, 2013 (1947).

²⁾ J. B. Dalton und C. L. A. Schmidt, J. Biol. Chem. **109**, 241 (1935).

Produkt führte. Deshalb wurde die äquivalente Mischung von festem *l*-Phenylalanin und fester krystallisierter Sulfosäure in möglichst wenig Wasser heiss gelöst und ohne Einengen abgekühlt. Diese Methode ermöglichte die Krystallisation des *l*-Salzes.

Um der Mischkrystallbildung zwischen *d*- und *l*-Salz vorzubeugen, wurde in den Fraktionierungsbeispielen (siehe experimenteller Teil) nicht die Gesamtmenge des teilweise racemischen Phenylalanins durch die Sulfosäure neutralisiert, sondern nur diejenige Menge (mit etwas Überschuss), die dem Gehalt an *d,l*-Form entsprach. Auf diese Weise konnte ein Gemisch von teilweise racemischem Phenylalanin präparativ befriedigend in die optisch aktive und die optisch inaktive Form getrennt werden.

Experimenteller Teil.

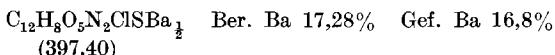
1. Darstellung der 4'-Chlor-2-nitro-diphenylamin-4-sulfosäure.

Die Darstellung der 4'-Chlor-2-nitro-diphenylamin-4-sulfosäure erfolgte nach Modellvorschriften von *Ullmann*¹⁾, *J. Goldberg*²⁾, *J. S. Joffe*, *S. D. Ssudakow* und *S. G. Kusnetzow*³⁾.

520 g 3-Nitro-4-chlorbenzol-sulfosaures Natrium (2 Mol), 373 g p-Chloranilin (3 Mol), 100 g Kreidepulver, 2,5 g Kupferpulver und 1,5 g Jod wurden in einer geräumigen Flasche auf dem Rollschemel während 4 Stunden gut gemischt und anschliessend in einem Rundkolben unter Röhren am Rückfluss während 7 Stunden gekocht. Die braune Lösung wurde mit Natronlauge alkalisch gemacht und das überschüssige p-Chloranilin mit Wasserdampf abgeblasen. Die verbleibende Lösung wurde noch heiss filtriert und das Filtrat langsam abgekühlt. Es wurden 382 g luftgetrocknetes Natriumsalz (Ausbeute 55% der Theorie) erhalten, das wahrscheinlich noch Verunreinigungen enthielt.

Darstellung des Bariumsalzes.

382 g luftgetrocknetes Natriumsalz der Sulfosäure (Mol.-Gew. 350) wurden in 5 Liter Wasser unter starkem Turbinieren aufgeschlämmt und bei 80° mit einer Lösung von 200 g Bariumchlorid (0,75 Mol) in 250 cm³ destilliertem Wasser versetzt. Die Farbe wechselt von gelb nach orange. Es wurde noch während 3 Stunden bei 80° weitergerührt, über Nacht abgekühlt und abgesaugt. Ausbeute 168 g (39%) orangefarbene Krystallblättchen.



Darstellung der freien Sulfosäure.

20 g krystallisiertes Bariumsalz wurden in 150 cm³ destilliertem Wasser unter starkem Röhren aufgeschlämmt und bei 80° 3 Äquivalente 1-n. Schwefelsäure zugetropft. Das tief rot gefärbte Reaktionsgemisch wurde während 5 Stunden bei 80° weitergerührt, abgekühlt und durch Abnutschen vom Bariumsulfat befreit. Das rote Filtrat wurde im Vakuum auf ein Volumen von 40 cm³ eingeengt und unter Zugabe von einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure krystallisiert. Ausbeute 15,8 g mattgelbe Krystalle (95% der Theorie), welche aus wenig Alkohol oder Dioxan umkrystallisiert wurden. Smp. 142°.

¹⁾ *Ullmann*, B. 41, 3751 (1902); DRP. 193 448.

²⁾ *J. Goldberg*, DRP. 187 870; *Friedländer* 9, 126.

³⁾ *J. S. Joffe*, *S. D. Ssudakow* und *S. G. Kusnetzow*, C. 1936 II, 2801.

2. Darstellung des *d,l*-Phenylalaninsalzes der 4'-Chlor-2-nitro-diphenylamin-4-sulfosäure.

0,5 g *d,l*-Phenylalanin wurden auf dem Wasserbad in 50 cm³ destilliertem Wasser gelöst und dazu 1 g krystallisierte 4'-Chlor-2-nitro-diphenylamin-4-sulfosäure gegeben. Die Lösung färbte sich momentan rot und die Sulfosäure löste sich sehr gut. Hierauf wurde heiss filtriert. Das Salz krystallisierte ziemlich rasch in feinen Nadeln, die sich beim weiteren Abkühlen zusammenballten. Die Krystalle wurden abgesaugt und in 80 cm³ destilliertem Wasser auf dem Wasserbad gelöst. Die heisse orangefarbene Lösung wurde durch ein Filter gegossen und langsam abgekühlt. Das Salz krystallisierte nun in langen, orange-gelben Prismen, welche bei 213—214° (korrig.) unter Zersetzung schmolzen. Ausbeute 0,7 g.

Für die Elementaranalyse wurde noch zweimal aus Wasser umkrystallisiert und nachher im Hochvakuum bei 56° während 24 Stunden über Phosphorpentoxid getrocknet.

3,604 mg Subst. gaben	6,724 mg CO ₂	und 1,286 mg H ₂ O
3,434 mg Subst. gaben	0,254 cm ³ N (20° C; 728 mm)	
4,773 mg Subst. gaben	1,429 mg AgCl	
3,181 mg Subst. verbrauchten	0,675 cm ³ 1/50-n. KJO ₃	
C ₂₁ H ₂₀ O ₇ N ₃ ClS	Ber. C 51,10 H 4,17 N 8,49 Cl 7,17 S 6,47%	
(493,91)	Gef. , , 50,92 , , 3,99 , , 8,25 , , 7,41 , , 6,80% , ,	

3. Löslichkeitsbestimmung des *d,l*-Phenylalaninsalzes der 4'-Chlor-2-nitro-diphenylamin-4-sulfosäure¹⁾.

250 mg des *d,l*-Phenylalaninsalzes der 4'-Chlor-2-nitro-diphenylamin-4-sulfosäure wurden in einer Schiff-Flasche mit 50 cm³ bidestilliertem Wasser versetzt und zur Einstellung des Löslichkeitsgleichgewichtes während 1½ Stunden auf dem Rollschemel bei Zimmertemperatur (21,9° C) gedreht. Nach zweistündigem Stehen wurde durch eine kleine G 3 Glasfilternutsche abgesaugt. Vom gelben Filtrat wurden bei 20,9° C (Zimmer-temp.) 25 cm³ ausgemessen und in einer Platinschale bei 105° C eingedampft. Rückstand 52,8 mg.

Löslichkeit des *d,l*-Phenylalaninsalzes der 4'-Chlor-2-nitro-diphenylamin-4-sulfosäure: 2,12 mg/cm³ in Wasser bei 20,9° C.

4. Darstellung des *l*-Phenylalaninsalzes der 4'-Chlor-2-nitro-diphenylamin-4-sulfosäure.

Nachdem verschiedene Versuche zur Darstellung des krystallisierten *l*-Phenylalaninsalzes der 4'-Chlor-2-nitro-diphenylamin-4-sulfosäure nur ölige Produkte lieferten, die selbst nach monatelangem Stehen im Eisschrank nicht krystallisierten, gelang es in einem weiteren Vorversuch mit kleinen Mengen nach viertätigem Stehen im Eisschrank aus stark konzentrierter Lösung einige Krystalle des *l*-Phenylalaninsalzes zu erhalten. Es wurde nun versucht, grössere Mengen derselben herzustellen.

1,00 g *l*(-)-Phenylalanin wurde auf dem Wasserbad unter Zugabe von 2,0 g freier, krystallisierte 4'-Chlor-2-nitro-diphenylamin-4-sulfosäure in 7 cm³ destilliertem Wasser gelöst, heiss filtriert und langsam auf Zimmertemperatur abgekühlt. Nach dem Aufbewahren im Kühlschrank wurde die rote Lösung geimpft, worauf über Nacht 2,33 g gelbe Krystalle erhalten wurden. Nach dreimaligem Umkrystallisieren aus Dioxan wurden 1,5 g Salz erhalten, welches bei 118° sinterte und einen unscharfen Smp. von 135—162° aufwies.

500 mg des *l*-Phenylalaninsalzes, während 24 Stunden im Hochvakuum bei 95—100° über Phosphorpentoxid getrocknet, lieferten 450 mg matte, rote Krystalle, welche bei 158° sinterten und von 166—168° (unkorr.) schmolzen.

¹⁾ Wir verdanken diese Löslichkeitsbestimmung Hrn. Dr. G. Frey von der Aligena A.G.

3,961 mg Subst. gaben	7,386 mg CO ₂	und 1,482 mg H ₂ O
3,892 mg Subst. gaben	0,288 cm ³	N (19° C; 731 mm)
3,766 mg Subst. gaben	1,706 mg AgCl	
4,376 mg Subst. verbrauchten	0,862 cm ³	1/50-n. KJO ₃
C ₂₁ H ₂₀ O ₇ N ₃ ClS	Ber. C 51,10	H 4,17
(493,91)	Gef. ,,	50,89 ,,
		4,19 ,,
		8,32 ,,
		7,32 ,,
		6,32%

Offenbar ist der unscharfe Schmelzpunkt des unvollständig getrockneten Präparates auf die Addition von Lösungsmittel zurückzuführen.

Ein Mischschmelzpunkt mit freier, krystallisierter Sulfosäure gab eine deutliche Depression.

Eine genaue Bestimmung der Löslichkeit des *l*-Salzes erübrigte sich, da qualitativ festgestellt werden konnte, dass 4 cm³ Wasser bei Zimmertemperatur mindestens 2 g Substanz lösen. Somit ist der Löslichkeitsunterschied des *d,l*- und *l*-Phenylalaninsalzes der 4'-Chlor-2-nitro-diphenylamin-4-sulfosäure genügend gross, um eine Trennung der Isomeren zu gewährleisten.

5. Fraktionierungsbeispiel Nr. 1 (Trennung von *d,l* und *d*(+)-Phenylalanin).

Eine Mischung von 1,00 g *d,l*-Phenylalanin ($[\alpha]_D^{22} = 0^0 \pm 2^0$) und 4,00 g *d*(+)-Phenylalanin ($[\alpha]_D^{18} = +32,7^0 \pm 1^0$) wurde in 200 cm³ destilliertem Wasser auf dem Wasserbad gelöst und mit 3,00 g krystallisierter 4'-Chlor-2-nitro-diphenylamin-4-sulfosäure versetzt. Die tiefrote Lösung wurde sofort heiß filtriert und über Nacht abgekühlt. Es wurden 3,68 g *d,l*-Salz erhalten, die ohne weitere Reinigung in 200 cm³ destilliertem Wasser heiß gelöst und mit 1,1 Äquivalent Bariumhydroxydlösung versetzt wurden. Es schieden sich sogleich 2,97 g des krystallisierten Bariumsalzes der 4'-Chlor-2-nitro-diphenylamin-4-sulfosäure aus. (Ba ber. 17,28%, Ba gef. 16,47%).

Die vom Bariumsalz der Sulfosäure befreite, gelbe Lösung wurde im Vakuum auf ca. 20 cm³ eingeengt. Es wurden 0,93 g rohes *d,l*-Phenylalanin erhalten, welche noch schwach gefärbt waren. Durch weiteres Eindampfen der Mutterlauge konnte eine weitere Portion von 0,17 g rohem *d,l*-Phenylalanin erhalten werden. Durch Umkrystallisieren mit etwas Kohlezusatz wurden 0,67 g reines *d,l*-Phenylalanin gewonnen.

1. Fraktion $[\alpha]_D^{23} = -0,09^0 \pm 2^0$ (c = 1,064 in Wasser)
(165,18) Ber. N 8,49% Gef. N 8,56% (Kjeldahl)

Nach weiterem Einengen krystallisierten aus der Mutterlauge noch 0,20 g *d,l*-Phenylalanin.

2. Fraktion $[\alpha]_D^{23} = +10,5^0 \pm 2^0$ (c = 1,011 in Wasser)
Ber. N 8,49% Gef. N 8,45% (Kjeldahl)

Diese zweite Fraktion Phenylalanin war nicht mehr ganz inaktiv und konnte bei einer späteren Trennung wieder verwendet werden.

Die rote, vom *d,l*-Salz befreite Mutterlauge wurde mit einem kleinen Überschuss (1,1 Äquivalent) an Bariumhydroxyd heiß versetzt und abgekühlt. Es schieden sich 0,29 g Bariumsalz der 4'-Chlor-2-nitro-diphenylamin-4-sulfosäure ab (Ba ber. 17,28%, Ba gef. 17,59%), welche durch Filtration entfernt und zur Regeneration der freien Sulfosäure verwendet werden konnten. Die orangegefärbte Mutterlauge wurde nun mit 1-n. Schwefelsäure ausbalanciert, bis eine abfiltrierte Probe weder mit Baryt, noch mit Schwefelsäure eine Fällung ergab. Die gelbe Lösung, welche etwas Bariumsalz der Sulfosäure und Bariumsulfat als Niederschlag enthielt, wurde abfiltriert und im Vakuum auf ca. 20 cm³ eingeengt, wobei 2,59 g rohes, leicht gefärbtes *d*-Phenylalanin erhalten wurden. Umkrystallisation aus Wasser mit etwas Kohlezusatz lieferte 1,97 g *d*-Phenylalanin.

1. Fraktion $[\alpha]_D^{17} = +34,43^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,004$ in Wasser)

Ber. N 8,49% Gef. N 8,43% (Kjeldahl)

Aus den Mutterlaugen wurden durch Einengen und Umkristallisieren weitere 0,91 g reines *d*-Phenylalanin gewonnen.

2. Fraktion $[\alpha]_D^{17} = +34,65^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,055$ in Wasser)

Ber. N 8,49% Gef. N 8,41% (Kjeldahl)

Ausbeute 2,88 g reines *d*(+)-Phenylalanin oder 72% der Theorie.

6. Fraktionierungsbeispiel Nr. 2 (Trennung von *d*, *l*- und *l*(-)-Phenylalanin).

Eine Mischung von 1,00 g *d,l*-Phenylalanin ($[\alpha]_D^{22} = 0^\circ \pm 2^\circ$) und 4,00 g *l*(-)-Phenylalanin ($[\alpha]_D^{18} = -33,43^\circ \pm 2^\circ$) wurde genau wie unter 5. behandelt. Es kristallisierten 2,84 g *d,l*-Salz (ca. 95% der Theorie) vom Smp. 192° (unkorr.), die 2,87 g Bariumsalz der Sulfosäure (Ba ber. 17,28%, Ba gef. 16,62%) lieferten. Die vom Bariumsalz der Sulfosäure befreite, gelbe Lösung wurde im Vakuum auf ca. 20 cm³ eingedampft und ergab 0,65 g rohes *d,l*-Phenylalanin. Zweimaliges Umkristallisieren mit etwas Kohlezusatz lieferte 0,37 g reines *d,l*-Phenylalanin.

1. Fraktion $[\alpha]_D^{19} = -0,95^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,051$ in Wasser)

Ber. N 8,49% Gef. N 8,44% (Kjeldahl)

Durch weiteres Eindampfen der Mutterlaugen konnten noch weitere 0,22 g Phenylalanin gewonnen werden.

2. Fraktion $[\alpha]_D^{19} = -9,24^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,049$ in Wasser)

Ber. N 8,49% Gef. N 8,62% (Kjeldahl)

Auch diese zweite Fraktion war offenbar durch Mitreissen von *l*-Salz nicht mehr ganz inaktiv und wurde bei späteren Versuchen wieder verwendet.

Die wie oben aufgearbeitete rote Mutterlauge lieferte 1,65 g leicht gefärbtes *l*-Phenylalanin, welches mit etwas Kohlezusatz aus Wasser umkristallisiert wurde und 1,12 g reines *l*(-)-Phenylalanin ergab.

1. Fraktion $[\alpha]_D^{22} = -33,40^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,958$ in Wasser)

Ber. N 8,49% Gef. N 8,43% (Kjeldahl)

Aus der Mutterlauge wurden durch Einengen und Umkristallisieren mit etwas Kohlezusatz weitere 0,93 g *l*-Phenylalanin erhalten.

2. Fraktion $[\alpha]_D^{22} = -34,10^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,061$ in Wasser)

Ber. N 8,49% Gef. N 8,44% (Kjeldahl)

Aus den vereinigten Mutterlaugen konnten schliesslich noch 0,74 g Phenylalanin erhalten werden.

3. Fraktion $[\alpha]_D^{19} = -32,20^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,070$ in Wasser)

Ber. N 8,49% Gef. N 8,33% (Kjeldahl)

Durch weiteres Umkristallisieren liess sich der Drehwert der dritten Fraktion nicht erhöhen.

7. Fraktionierungsbeispiel Nr. 3 (Trennung von *d*, *l*- und *l*(-)-Phenylalanin, Gehalt an *d,l*-Phenylalanin berechnet auf Grund der optischen Drehung).

Zur Verfügung stand uns ein teilweise racemisiertes Phenylalanin von $[\alpha]_D^{19} = -15,17^\circ \pm 1^\circ$ (Stickstoffgehalt 8,50%). Aus dem optischen Drehwert berechnet sich ein

Gehalt an *d,l*-Phenylalanin, welcher mit Rücksicht auf die Fehlergrenzen der optischen Drehung zwischen 60 und 54% liegt.

5,00 g dieses teilweise racemisierten Phenylalanins (2,7 bis 3,0 g *d,l*-Phenylalanin gehalt) wurden in 300 cm³ destilliertem Wasser auf dem Wasserbad gelöst und mit 8,58 g freier, krystallisierter 4'-Chlor-2-nitro-diphenylamin-4-sulfosäure (ca. 1,5 Mol berechnet auf *d,l*-Phenylalanin) versetzt. Die rote, filtrierte Lösung wurde über Nacht langsam abgekühlt und am andern Morgen konnten 8,73 g rohes *d,l*-Phenylalaninsalz vom Smp. 216° isoliert werden. Dieses wurde aus 550 cm³ destilliertem Wasser umkrystallisiert und ergab 7,39 g reines *d,l*-Phenylalaninsalz vom Smp. 223° (unkorr.). Dieses *d,l*-Salz wurde nach der üblichen Methode mit 2,18 g Bariumhydroxyd gespalten. Nach dem Eindampfen auf ca. 20 cm³ krystallisierten 1,90 g rohes *d,l*-Phenylalanin, welches mit etwas Kohle nach dem üblichen Verfahren aufgearbeitet wurde und 1,43 g reines *d,l*-Phenylalanin ergab.

1. Fraktion $[\alpha]_D^{21} = -0,30^\circ \pm 2^\circ$ (c = 0,990 in Wasser)

Ber. N 8,49% Gef. N 8,37% (*Kjeldahl*)

Aus den Mutterlaugen resultierten noch 0,62 g *d,l*-Phenylalanin.

2. Fraktion $[\alpha]_D^{21} = -0,59^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1,003 in Wasser)

Ber. N 8,49% Gef. N 8,28% (*Kjeldahl*)

Die zweite Fraktion war im Gegensatz zu den Beispielen 1 und 2 vollständig inaktiv, was auf das Umkrystallisieren des rohen *d,l*-Phenylalaninsulfosalzes zurückgeführt werden kann.

Aus dem roten, vom *d,l*-Salz befreiten Filtrat, wurden nach dem Aufarbeiten und Umkrystallisieren 0,92 g reines *l*-Phenylalanin erhalten.

1. Fraktion $[\alpha]_D^{21} = -34,52^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1,312 in Wasser)

Ber. N 8,49% Gef. N 8,38% (*Kjeldahl*)

Aus den Mutterlaugen konnten noch 0,40 g *l*-Phenylalanin gewonnen werden.

2. Fraktion $[\alpha]_D^{21} = -32,70^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1,003 in Wasser)

Ber. N 8,49% Gef. N 8,10% (*Kjeldahl*)

Die Analysen verdanken wir teils Herrn Dr. G. Frey von der Aligena Aktiengesellschaft, teils Herrn W. Manser von der E.T.H. Zürich.

Zusammenfassung.

Es wird ein Verfahren zur Trennung von optisch aktivem und optisch inaktivem Phenylalanin beschrieben, darauf beruhend, dass das Salz des optisch inaktiven Phenylalanins mit 4'-Chlor-2-nitro-diphenylamin-4-sulfosäure gegenüber den Salzen der optisch aktiven Komponenten mit dieser Sulfosäure in Wasser genügend grosse Löslichkeitsdifferenzen aufweist.

Wissenschaftliche Laboratorien der
Aligena Aktiengesellschaft, Basel.