

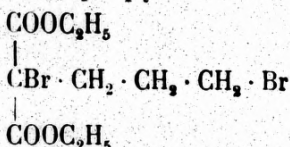
**Studien über Aminosäuresynthesen.**<sup>1)</sup>  
**VII. Prolin ( $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure).**<sup>2)</sup>

Von

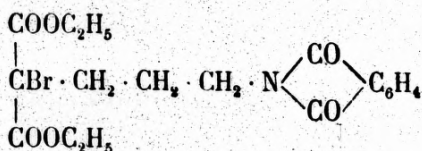
**S. P. L. Sørensen und A. C. Andersen.**

(Der Redaktion zugegangen am 29. Mai 1908.)

Prolin wurde zum erstenmal im Jahre 1900 von R. Willstätter<sup>3)</sup> aus  $\alpha$ - $\delta$ -Dibrompropylmalonsäureester



— oder aus der durch Erhitzen desselben mit Bromwasserstoffsäure gebildeten  $\alpha$ - $\delta$ -Dibromvaleriansäure — durch Einwirkung von Ammoniak und passende Behandlung des Reaktionsgemisches dargestellt. Kurz darauf versuchte E. Fischer<sup>4)</sup> durch Einwirkung von Ammoniak auf Phthalimidopropylbrommalonester



die  $\alpha$ - $\delta$ -Diaminovaleriansäure (rac. Ornithin) zu gewinnen; dies gelang nicht, aus dem Reaktionsprodukt konnte aber eine verhältnismäßig geringe Menge Prolin isoliert werden. Durch Er-

<sup>1)</sup> Die ersten sechs Abschnitte dieser Studien sind in den Comptes rendus du Lab. de Carlsberg, Bd. VI, S. 1 (1902), 137 und 209 (1905), veröffentlicht worden. Eine kurze Zusammenstellung derselben ist in dieser Zeitschrift, Bd XLIV, S. 448 (1905) publiziert worden.

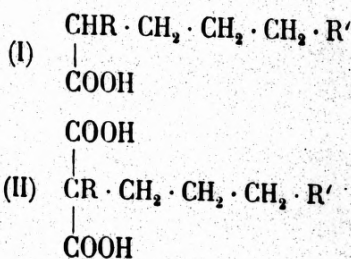
<sup>2)</sup> Wird gleichzeitig hiermit in französischer Sprache in den Comptes rendus du Lab. de Carlsberg, Bd. VII, S. 72 (1908), veröffentlicht.

<sup>3)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIII, S. 1160 (1900).

<sup>4)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIV, S. 454 (1901).

wärmen des Phthalimidopropylbrommalonsäureesters mit Bromwasserstoffsäure und nachfolgende Erhitzung der gebildeten Säure in trockenem Zustand auf 140—145° konnte indessen  $\delta$ -Phthalimido- $\alpha$ -bromvaleriansäure dargestellt werden, und durch Behandlung dieser Säure mit Ammoniak gelang es, wie bekannt, E. Fischer, das racemische Ornithin zu gewinnen.

Gleichzeitig hiermit isolierte E. Fischer<sup>1)</sup> das Prolin aus den Salzsäurespaltprodukten des Caseins und nach diesem interessanten Fund folgten eine Reihe Untersuchungen, besonders von E. Fischer, E. Abderhalden und ihren Mitarbeitern, durch welche es nachgewiesen wurde, daß das Prolin unter den Spaltprodukten der meisten Proteine sich befindet. Noch größeres Interesse gewann das Prolin durch die von E. Fischer<sup>2)</sup> gleich gestellte Frage, ob das Prolin als ein primäres Spaltprodukt zu betrachten oder ob es sekundär aus einem  $\alpha$ - $\delta$ -Derivat der Valeriansäure durch Ringschließung entstanden sei. In einer früheren Abhandlung<sup>3)</sup> ist diese Frage ausführlich erörtert worden und wir können uns daher mit dem Ausspruch begnügen, daß auch wir es für völlig berechtigt halten, das Prolin unter den primären Spaltprodukten der Proteine aufzuführen, solange Tatsachen, die das Gegenteil beweisen, nicht vorliegen. Dieses schließt selbstverständlich nicht aus, daß jede Umsetzung, durch welche eine  $\alpha$ - $\delta$ -substituierte Valeriansäure (I) oder Malonsäure (II)



unter Ringschließung Prolin gibt, ein großes Interesse bietet.

Von solchen Umsetzungen sind außer den beiden oben erwähnten, die zum erstenmal R. Willstätter bzw. E. Fischer

<sup>1)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIV, S. 447 (1901), und Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 151 (1901).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 169 (1901).

<sup>3)</sup> Compt. rend. du Lab. de Carlsberg, Bd. VI, S. 140 (1905).

das Prolin in die Hände gaben, nur ein paar hier im Laboratorium ausgeführte Prolinsynthesen bekannt.<sup>1)</sup> Bei der Darstellung von  $\alpha$ -Amino- $\delta$ -oxyvaleriansäure aus  $\gamma$ -Brompropylphthalimidmalonester (nach der von Willstätter benutzten Nomenklatur  $\alpha$ -Phthalimid- $\delta$ -brommalonester genannt) wurden als Nebenprodukt 15—20% der gewünschten Oxyaminosäure als Prolin gewonnen. Ebenso wurde konstatiert, daß auch ganz reine  $\alpha$ -Amino- $\delta$ -oxyvaleriansäure durch Eindampfen mit starker Salzsäure partiell in Prolin übergeht. Es hat sich indessen gezeigt, daß  $\gamma$ -Brompropylphthalimidmalonester auch auf andere Weise als die eben erwähnte Prolin geben kann. Der in der oben zitierten Abhandlung schon erwähnte  $\gamma$ -Cyanamidpropylphthalimidmalonester,<sup>2)</sup> welcher durch Einwirkung von Natriumcyanamid auf die  $\gamma$ -Brompropylverbindung gebildet wird, gibt durch Verseifung und nachfolgende Eindampfung mit Salzsäure reichlich Prolin. Ebenfalls gibt die schon oft erwähnte  $\gamma$ -Brompropylverbindung durch Erwärmen in alkoholischer Lösung mit Natriumalkoholat oder einfach mit einer alkoholischen Lösung von Natriumhydroxyd ein Reaktionsprodukt, das durch Eindampfen mit Salzsäure nicht die erwartete  $\alpha$ -Amino- $\delta$ -oxäthylvaleriansäure, sondern dagegen Prolin in vorzüglicher Ausbeute liefert.

Da keine von den bisher bekannten Prolinsynthesen zu präparativen Zwecken brauchbar ist, hat man bei der Darstellung einigermaßen reichlicher Mengen von Prolin einen geeigneten Proteinkörper, z. B. Gelatine,<sup>3)</sup> als Ausgangsmaterial benutzen müssen. Dieses Verfahren ist indessen sowohl lang wie auch beschwerlich und hat übrigens die Unannehmlichkeit, daß eine Mischung von racemischem und optisch aktivem Prolin gewonnen wird, welche durch Erhitzen mit Wasser und Baryt im Autoklaven bis 145° vollständig racemisiert werden muß,

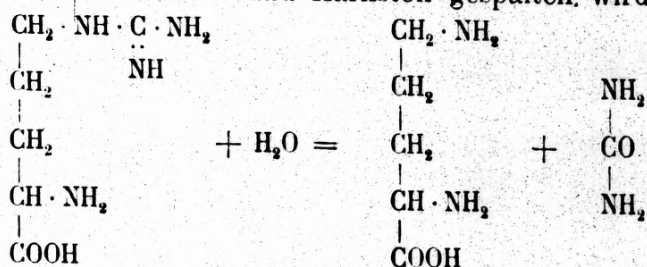
<sup>1)</sup> Compt. rend. du Lab. de Carlsberg, Bd. VI, S. 137 (1905).

<sup>2)</sup> Compt. rend. du Lab. de Carlsberg, Bd. VI, S. 148 (1905). Der  $\gamma$ -Cyanamidpropyl-phthalimidmalonester, sowie auch eine Reihe wohl charakterisierter Spaltprodukte desselben, die wir mit einer Synthese von  $\alpha$ -Amino- $\delta$ -guanidinovaleriansäure (Arginin) vor Augen dargestellt haben, werden in einer folgenden Abhandlung beschrieben werden.

<sup>3)</sup> E. Fischer und E. Abderhalden, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 3071 (1904).

bevor eine vollständige Reinigung bewerkstelligt werden kann. Wir haben daher geglaubt, daß ein synthetisches Verfahren, welches, wie das oben skizzierte, auf eine einigermaßen einfache Weise eine gute Ausbeute an racemischem Prolin liefert, einiges Interesse bieten könnte. Die Einzelheiten des Verfahrens, welches sich eng an die schon früher veröffentlichten Synthesen mit Phthalimidmalonester als Ausgangsmaterial anschließt, finden sich in dem experimentellen Teil angegeben.

Schon in seiner ersten Abhandlung über das Vorhandensein des Prolins unter den Spaltprodukten der Proteine macht E. Fischer<sup>1)</sup> darauf aufmerksam, daß das Prolin möglicherweise aus dem Arginin durch Abspaltung der Guanidingruppe unter Ringschluß entstehen könnte. Fischer konnte indessen experimentell nachweisen, daß weder das Arginin noch das Ornithin durch Erhitzen mit starker Salzsäure Prolin gaben. Auch aus Versuchen von E. Schulze und E. Winterstein<sup>2)</sup> geht hervor, daß Arginin starker Salzsäure gegenüber selbst in der Wärme sehr widerstandsfähig ist. Dagegen haben dieselben beiden Forscher<sup>3)</sup> bekanntlich nachgewiesen, daß das Arginin durch Basen in Ornithin und Harnstoff gespalten wird:



Obwohl das Ornithin in Form der beinahe unlöslichen Ornithursäure leicht isoliert werden kann, ist es indessen Schulze und Winterstein nicht möglich gewesen, mehr als höchstens 40% von der aus vorstehender Gleichung berechneten Ornithursäuremenge zu erhalten. Sie nehmen daher an, daß

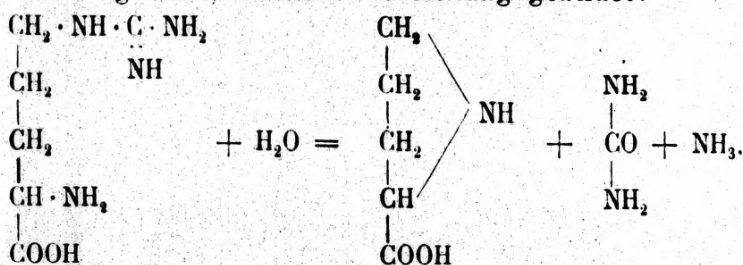
<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 169 (1901).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV, S. 143 (1901).

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 1 (1898); Bd. XXXIV, S. 128 (1901); Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXX, S. 2879 (1897).

nur ein Teil des Arginins derartig zersetzt werde, während die übrige Argininmenge Spaltprodukte liefere, über deren Art und Menge erst weitere Untersuchungen Aufschluß geben können.

In der Annahme, daß es vielleicht möglich wäre, unter diesen bisher nicht isolierten Spaltprodukten das Prolin zu finden, nach der folgenden, einfachen Gleichung gebildet:



haben wir eine Spaltung des Arginins durch Barytlaug vorgenommen und die Isolierung des Prolins aus den Reaktionsprodukten versucht. Indem wir in betreff der Einzelheiten dieses Versuches auf den letzten Abschnitt dieser Abhandlung verweisen, möchten wir jedoch schon hier anführen, teils, daß es uns nicht gelungen ist, das Prolin unter den Spaltprodukten des Arginins zu isolieren und teils, daß wir eine so große Ornithursäuremenge gewonnen haben, daß dieselbe ungefähr  $\frac{2}{3}$  von der nach obiger Gleichung von Schulze und Winterstein berechneten Ornithursäuremenge entspricht. Schließlich sei nur noch hinzugefügt, daß wir uns im übrigen nicht mit den aus Arginin durch Barytbehandlung entstehenden Zersetzungsprodukten haben beschäftigen wollen, weil Schulze und Winterstein am Schlusse der letzteren ihrer oben zitierten Abhandlungen weitere dahin zielende Untersuchungen angekündigt haben.

### Experimenteller Teil.

#### 1. Darstellung von Prolin.

$\frac{1}{3}$  Gramm-Moleküle Natrium-phthalimidmalonester<sup>1)</sup> wurde auf die in einer früheren Abhandlung<sup>2)</sup> beschriebene Weise mit 500 g Trimethylenbromid behandelt und der Überschuß des

<sup>1)</sup> Compt. rend. du Lab. de Carlsberg, Bd. VI, S. 10 (1902), und Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 454 (1905).

<sup>2)</sup> Compt. rend. du Lab. de Carlsberg, Bd. VI, S. 148 (1905).

letzteren mit Wasserdampf abgetrieben. Nach Abkühlung wurde das Wasser so gut wie möglich abgegossen und das zurückgebliebene gelbe Öl ohne weitere Reinigung zur Prolindarstellung verwendet. Das Öl enthält, wie in der früheren Abhandlung angeführt, circa 80%  $\gamma$ -Bromphylphthalimidmalonester, während der Rest aus «glycingebenden Verunreinigungen» besteht.

Das Öl wurde in 250 ccm absolutem Alkohol in einem Kolben mit Rückflußkühler gelöst und dann 10 g gepulvertes Natriumhydroxyd zugesetzt (ein wenig mehr als die dem Bromgehalt entsprechende Menge). Nach zweistündigem Erwärmen auf dem Wasserbade, wodurch das Natriumhydroxyd größtenteils in Lösung ging, und ein krystallinischer Niederschlag, wahrscheinlich ein Natriumsalz, sich abzuscheiden begann, wurden 20 g und nach weiterem zweistündigen Kochen noch 20 g gepulvertes Natriumhydroxyd zugesetzt. Hiernach wurde noch 4 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt, wodurch die ganze Masse gallertartig erstarrte. Nach Abkühlung wurde in 200 ccm Wasser gelöst, und der Alkohol durch Eindampfen in einer Schale ausgetrieben. Der Rest wurde in  $\frac{1}{2}$  l Wasser gelöst und die Lösung nach Zusatz von 200 ccm konzentrierter Salzsäure bis zu einer breiartigen Masse eingedampft, welche aus den salzsauren Salzen des Prolins und des Glycins, nebst Phthalsäure und einer reichlichen Menge Kochsalz bestand.

Auf die in der früheren Abhandlung<sup>1)</sup> über die Darstellung von  $\alpha$ -Amino- $\delta$ -oxyvaleriansäure ausführlich beschriebene Weise wurde der größte Teil des Kochsalzes und der Phthalsäure durch Behandlung der Masse mit starker Salzsäure beseitigt.

Die ungelöste Mischung von Kochsalz und Phthalsäure enthielt im ganzen nur 20 mg Stickstoff.

Das Filtrat wurde eingedampft und darauf der Rest der Phthalsäure durch Äther extrahiert.

Die ausgeschüttelte Phthalsäure enthielt nur 4 mg Stickstoff.

Die phthalsäurefreie Lösung wurde in einem Kolben erwärmt, bis der Äthergeruch verschwunden war, und dann in einer Schale bis zu einer sirupösen Masse auf dem Wasser-

<sup>1)</sup> Compt. rend. du Lab. de Carlsberg, Bd. VI, S. 151 (1905).

bade eingeengt. Nach Stehenlassen im Exsikkator über Schwefelsäure bis zum nächsten Tage wurde die Masse mit 100 ccm absolutem Alkohol ausgerührt, wodurch die salzsauren Salze der Aminosäuren in Lösung gingen, während ein kleiner Rückstand von Natriumchlorid

vom Gewicht 4 g mit einem Gesamtstickstoffgehalt von 1 mg ungelöst zurückblieb.

Die erhaltene alkoholische Lösung wurde mit Wasser verdünnt und der Alkohol abdestilliert, worauf die Salzsäure, ganz wie in der oft erwähnten Abhandlung beschrieben, durch Bleiweiß und Silbercarbonat eliminiert wurde.

Der gesamte Stickstoffverlust bei diesen Operationen betrug nur 24 mg.

Die so resultierende, beinahe farblose Flüssigkeit, welche weder Blei noch Silber, dagegen eine schwache Spur von Salzsäure enthielt, wurde erst im Vakuum bis zu einem kleinen Volumen und schließlich auf dem Wasserbade in einer Schale bis zum Sirup eingedampft. Nach Stehenlassen über Schwefelsäure bis zum nächsten Tage wurde die beinahe vollständig erstarrte Masse, welche aus Prolin nebst Glycin und anderen Verunreinigungen (unter welchen wahrscheinlich auch ein wenig  $\alpha$ -Amino- $\delta$ -oxyvaleriansäure) bestand, in einem Mörser pulverisiert und gut mit 100 ccm 93%igem Alkohol<sup>1)</sup> geknetet, wodurch die Hauptmenge des Prolins im Laufe von ein paar Stunden in Lösung ging, während der größte Teil der Verunreinigungen ungelöst zurückblieb. Nach Filtrieren und Waschen mit 2 mal 50 ccm Alkohol wurde das Ungelöste noch zweimal mit je 100 ccm Alkohol gut durchgeknetet und der Rückstand abfiltriert.

Der ungelöste Rückstand wog in lufttrockenem Zustande 3 g und enthielt 12,60% Stickstoff.

---

<sup>1)</sup> In einer früheren Abhandlung (Compt. rend. du Lab. de Carlsberg, Bd. VI. S. 156 [1905]) ist darauf aufmerksam gemacht worden, daß wasserhaltiges Prolin durch Umkrystallisation aus absolutem Alkohol in wasserfreiem Zustande auskrystallisiert. Da absoluter Alkohol also das Prolin zu entwässern vermag, und da das wasserfreie Prolin in absolutem Alkohol bei gewöhnlicher Temperatur ziemlich schwer löslich ist, empfiehlt es sich, bei dem oben erwähnten Auslaugen 93%igen, nicht absoluten Alkohol zu verwenden.

Aus den gewonnenen alkoholischen Lösungen wurde der Alkohol abdestilliert, der Rückstand in Wasser gelöst und die Lösung mit Kupfercarbonat erwärmt. Durch Eindampfen und Stehenlassen der kupferhaltigen Lösung krystallisierte in völlig reinem Zustande das charakteristische Kupfersalz des Prolins (Kupfersalz I : 17,4 g) und aus der Mutterlauge wurde durch weiteres Eindampfen noch mehr reines Salz gewonnen (Kupfersalz II : 3,7 g).

Die Mutterlauge des Kupfersalzes II enthielt noch 470 mg Stickstoff, und zweifellos einen Teil davon in Form von Prolin. Das Kupfer wurde dann in schwefelsaurer Lösung mit Schwefelwasserstoff gefällt, der Überschuß an letzterem weggekocht und die Schwefelsäure mit Barytlauge niedergeschlagen. Der erhaltenen Lösung wurden die oben erwähnten 3 g Verunreinigungen zugesetzt, wonach das Ganze eingedampft wurde. Der durch Stehenlassen nur teilweise krystallisierte Rückstand wurde wie oben mit Alkohol extrahiert und die Lösung mit Kupfercarbonat behandelt. Es gelang auf diese Weise noch 1,8 g Salz (Kupfersalz III) zu gewinnen, welches, da es schließlich mit etwas Alkohol gewaschen wurde, zu wenig Krystallwasser enthielt,<sup>1)</sup> aber sonst vollständig rein war.

Nimmt man an, daß das Ausgangsmaterial 80% der berechneten Menge  $\gamma$ -Brompropylphthalimidmalonester enthalten hat, beträgt die entsprechende Kupfersalzmenge  $[(C_5H_8O_2N)_2Cu, 2H_2O]$  26,2 g, die Gesamtausbeute 22,9 g, beträgt also 87% der berechneten.

0,4234 g des Kupfersalzes I gaben bei Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure bis zu konstantem Gewicht 0,0465 g Wasser ab (10,98%, berechnet 10,99%).

0,2526 g des Kupfersalzes I enthielten 21,55 mg Stickstoff (8,53%, berechnet 8,57%).

0,5039 g des Kupfersalzes II enthielten 0,0553 g Wasser (10,97%).

0,2200 g des Kupfersalzes II enthielten 18,65 mg Stickstoff (8,48%).

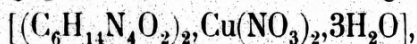
Nach dem Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure bis zu konstantem Gewicht enthielten 0,1991 g des Kupfersalzes III 19,00 mg Stickstoff (9,54%, berechnet 9,62%).

<sup>1)</sup> Siehe: Compt. rend. du Lab. de Carlsberg. Bd. VI, S. 175 (1905).



## 2. Wird bei der Spaltung von Arginin durch Barytlauge Prolin gebildet?

Als Ausgangsmaterial wurde ein Argininkupferniträt benutzt, das aus verschiedenen alten Argininpräparaten dargestellt und dann mehrmals umkrystallisiert worden war. Das lufttrockene Salz hatte beinahe die zuerst von E. Schulze und E. Steiger<sup>1)</sup> angegebene Zusammensetzung



jedoch wurde der Wassergehalt ein wenig zu hoch, nämlich 9,43 % statt des berechneten 9,16 % gefunden.<sup>2)</sup> Das entwässerte Salz enthielt die berechnete Kupfermenge.

0,3053 g lufttrockenes Salz verloren bei zweitägigem Stehenlassen im Vakuum über Schwefelsäure 0,0120 g. Bei weiterem Trocknen unter einem Druck von 30 mm wurden in 24 Stunden bei 85° 0,0165 g und danach in 48 Stunden bei 110° nur 0,0003 g abgegeben. Gesamtverlust: 0,0288 g (9,43 %).

Das entwässerte Salz (0,2765 g) gab beim Glühen in der Luft bis zu konstantem Gewicht 0,0407 g Kupferoxyd, wonach der Kupfergehalt des wasserfreien Salzes 11,76 % betrug (berechnet 11,86 %).

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XI, S. 52 (1886).

<sup>2)</sup> Der Wassergehalt des hier erwähnten Salzes wird in der Literatur verschieden angegeben:

a) E. Schulze und E. Steiger (l. c.) haben in einem über Calciumchlorid getrockneten Salz 9,54, 9,37 und 9,41 % Wasser gefunden.

b) S. G. Hedin (Diese Zeitschrift, Bd. XX, S. 191 [1894]) hat in einem, wahrscheinlich lufttrockenen Salz 9,17 % Wasser gefunden.

c) Wl. Gulewitsch (Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 197 [1899]) findet dagegen in dem lufttrockenen Salz 10,44 und 10,32 % Wasser, und schließlic hat

d) O. Riesser (Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 219 [1906]) in einem über Schwefelsäure getrockneten Salz 9,07 % Wasser gefunden.

Es ist offenbar, daß das Salz mit einem ein wenig variierenden Wassergehalt krystallisieren kann, derselbe nähert sich indessen dem für 3 Mol. Wasser berechneten, wenn das Trocknen des Salzes in ziemlich trockener Luft oder bei kurzem Stehenlassen über Schwefelsäure oder Calciumchlorid vor sich geht. Dagegen ist es nicht ganz richtig, wenn O. Riesser (l. c.) kurz und gut schreibt: «Das über Schwefelsäure getrocknete Salz enthält 3 Moleküle Krystallwasser», denn auch ein Salz mit 3 Mol. Wasser verliert, wie schon Hedin angegeben hat, und wie wir es haben bestätigen können, bei längerem Stehenlassen über Schwefelsäure beträchtliche Mengen von Krystallwasser.

10g Argininkupfernitrat wurden in ganz verdünnter Schwefelsäure gelöst und das Kupfer mit Schwefelwasserstoff gefällt. Nach Wegkochen des Schwefelwasserstoffes wurde das Arginin mit Phosphorwolframsäure gefällt und der Niederschlag mit einer 5%igen, schwach schwefelsauren Lösung von Phosphorwolframsäure salpetersäurefrei gewaschen und schließlich mit Barytlauge in der Kälte zersetzt. Die alkalische Lösung wurde mit Kohlensäure gesättigt, filtriert, im Vakuum eingedampft, wieder filtriert und dann bis zu 1 l verdünnt. 10 ccm dieser Lösung, in welcher durch Diphenylamin und Schwefelsäure eine äußerst geringe Spur von Salpetersäure nachgewiesen werden konnte, enthielten 17,93 mg Stickstoff.

Für die Spaltung durch Barytlauge wurde die restierende Lösung, welche also im ganzen 1775 mg Stickstoff enthielt, verwendet. Die Lösung wurde in einem Kolben (von 3 l) mit 200 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Barytlauge eine Stunde auf dem Wasserbade erwärmt und darauf das gebildete Ammoniak im Vakuum abdestilliert und durch vorgelegte Schwefelsäure aufgenommen; im ganzen wurden 200 ccm Flüssigkeit abdestilliert. Darauf wurden aufs neue 200 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Barytlauge zugesetzt, die Flüssigkeit eine Stunde auf dem Wasserbade erwärmt und das gebildete Ammoniak abgetrieben. Diese Behandlung wurde im ganzen 16 Male wiederholt, indem jedoch bei den späteren Behandlungen mehr als eine Stunde erwärmt wurde, bevor das Ammoniak abdestilliert wurde. Wie aus der folgenden Tabelle hervorgeht, wurde im ganzen 88 Stunden erwärmt, und das dadurch gebildete Ammoniak entspricht 843 mg Stickstoff, während die nach der Gleichung von Schulze und Winterstein (siehe S. 239) berechnete Harnstoffmenge bei vollständiger Spaltung in Kohlensäure und Ammoniak eine Menge des letzteren geben kann, welche 887,5 mg Stickstoff entspricht. Obgleich die gebildete Ammoniakmenge also die berechnete nicht vollständig erreichte, wurde das Erwärmen jedoch nicht weiter fortgesetzt, da die letzte Erwärmung, obwohl die Barytkonzentration schon eine ziemlich bedeutende war, eine Ammoniakmenge gegeben hatte, welche nur ca. 2 mg Stickstoff pro Stunde entsprach.

Die Nummern der Erwärmung	Die Erwärmungs- zeit in Stunden	Die gebildete Ammoniakmenge, in Milligramm Stick- stoff ausgedrückt	Die Ammonikmenge pro Stunde, in Milligramm Stick- stoff ausgedrückt
1	1	10.2	10.2
2	1	32.8	32.8
3	1	24.3	24.3
4	1	18.5	18.5
5	1	20.5	20.5
6	3	55.4	18.5
7	3	50.6	16.9
8	3	57.6	19.2
9	4	75.5	18.9
10	10	132.8	13.3
11	10	107.4	10.7
12	10	89.4	8.9
13	10	69.0	6.9
14	10	46.7	4.7
15	10	29.6	3.0
16	10	23.0	2.3

Die barythaltige Lösung wurde mit einem Liter Wasser verdünnt und dann unter Erwärmung mit Kohlensäure gesättigt. Das abfiltrierte und sorgfältig gewaschene Baryumcarbonat enthielt 60 mg Stickstoff. Das Filtrat wurde im Vakuum eingedampft, nochmals filtriert und dann bis zu 200 ccm verdünnt. 2 ccm dieser Lösung enthielten 8,53 mg Stickstoff, so daß der unkontrollierte Stickstoffverlust bei den bisher beschriebenen Operationen nur 19 mg Stickstoff betragen hat ( $1775 - [843 + 60 + 853] = 19$ ).

In der auf diese Weise behandelten Lösung finden sich jetzt: das gebildete Ornithin, das möglicherweise gebildete Prolin nebst anderen unbekanntem Spaltprodukten, wahrscheinlich auch kleine Mengen von Harnstoff und vielleicht auch von Guanidin, welche durch die Barytlaugung nicht gespalten worden sind, und schließlich das jedenfalls nur spurenweise vorhandene

unzersetzte Arginin. Für die Trennung dieser Stoffe haben wir die von E. Winterstein<sup>1)</sup> vorgeschlagene Fällung von Ornithin durch Quecksilberchlorid und Barytlauge benutzt, indem wir durch eine Reihe von Kontrollversuchen nachweisen konnten, daß nicht nur Ornithin und Arginin, sondern auch Guanidin und Harnstoff, wenigstens bei Anwendung von reichlichen Mengen Quecksilberchlorid, auf diese Weise so gut wie vollständig gefällt werden, während dagegen das Prolin nicht gefällt wird.

Der schwach alkalisch reagierenden Lösung wurden 5 ccm 5-n-Salzsäure und darauf eine gesättigte Quecksilberchloridlösung zugesetzt. Nach Zusatz von 600 ccm der letzteren gab Barytlauge mit einer Probe der Flüssigkeit einen nur gelbstichigen Niederschlag; erst nach Zusatz von 800 ccm der Quecksilberlösung hatte der durch Barytlauge hervorgerufene Niederschlag eine ausgesprochene gelbe Farbe. Im ganzen wurden 1000 ccm der Quecksilberlösung zugesetzt, worauf mit einem reichlichen Überschuß an Barytlauge (1500 ccm <sup>1</sup>/<sub>10</sub>-n) gefällt wurde. Nach einstündigem Stehenlassen wurde der Niederschlag abgenutscht und mit einer Mischung von Baryumchlorid und Barytlauge gut gewaschen.

Das Filtrat und die Waschwässer, welche ein Gesamtvolumen von 3400 ccm hatten, enthielten im ganzen nur 34 mg Stickstoff. Es erhellt hieraus, daß bei der Spaltung von Arginin durch Barytlauge Prolin in faßbarer Menge nicht gebildet worden ist.

Der quecksilberhaltige Niederschlag wurde mit Wasser und 100 ccm 2-n-Schwefelsäure ausgerührt und darauf mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Nach Filtrieren und Waschen wurde der Niederschlag mit schwefelsäurehaltigem Wasser erwärmt und wieder mit Schwefelwasserstoff behandelt. Aus den erhaltenen Filtraten wurde der Schwefelwasserstoff weggekocht, wonach eine Stickstoffbestimmung eine Gesamtstickstoffmenge von 798 mg ergab; das Quecksilbersulfid hatte also nur 12,5 mg Stickstoff zurückgehalten ( $853 - [8,53 + 34 + 798] = 12,47$ ).

Aus der Lösung wurde die Schwefelsäure mit Barytlauge

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 77 (1905).

niedergeschlagen und das Filtrat bis auf ca. 100 ccm im Vakuum eingedampft, worauf die Lösung auf gewöhnliche Weise<sup>1)</sup> mit 28 g Benzoylchlorid und 220 ccm 2-n-Natronlauge benzoyliert wurde. Nach Stehenlassen bis zum nächsten Tage wurde ein schwacher Niederschlag (der im ganzen 7,45 mg Stickstoff enthielt) abfiltriert, und das Filtrat und die Waschwässer mit 70 ccm 5-n-Salzsäure gefällt. Nach eintägigem Stehenlassen im Eisschrank wurde filtriert, und der Niederschlag mit Eiswasser chlorfrei gewaschen. Das Filtrat und die Waschwässer (im ganzen 1500 ccm) enthielten 190,5 mg Stickstoff; der Niederschlag (Benzoessäure + Ornithursäure) wog im lufttrockenen Zustande 23,4 g. Nach Extraktion mit Petroläther im Soxhlet'schen Apparat blieben 6,63 g Ornithursäure ungelöst zurück, welche als rein zu betrachten war, da sie nicht nur die Eigenschaften der reinen Ornithursäure, sondern auch sowohl vor wie nach dem Umlösen aus Alkohol den berechneten Stickstoffgehalt zeigte.

0,1909 g, im Vakuum bei 110° getrocknete Ornithursäure gaben nach Kjeldahl eine Ammoniakmenge, welche 15,73 mg Stickstoff entsprach (8,24% berechnet 8,25%).

0,1673 g umgelöste, im Vakuum bei 110° getrocknete Ornithursäure enthielten 13,80 mg Stickstoff (8,25%).

Da die Ornithursäure nicht ganz unlöslich im Petroläther ist, geht bei lange fortgesetzter Extraktion eine kleine Menge in Lösung: es gelang daher auch, durch Wiederlösen der Benzoessäure in Petroläther noch 0,25 g beinahe reine Ornithursäure zu gewinnen.

Da die Gesamtausbeute an Ornithursäure demnach 6,88 g oder 64% von der nach der Gleichung von Schulze und Winterstein (siehe S. 239) berechneten Mengen (10,76 g) betragen hat, und da die Benzoylierung selbstverständlich nicht absolut quantitativ verlaufen ist, ebenso wie auch der Stickstoffverlust während der verschiedenen Operationen die Ausbeute an Ornithursäure etwas verringert hat, glauben wir aus dem hier beschriebenen Versuche den Schluß ziehen zu dürfen, daß die Spaltung des Arginins durch Erwärmung mit

<sup>1)</sup> Compt. rend. du Lab. de Carlsberg, Bd. VI, S. 45 (1902).

Barytlaug, wenigstens unter den von uns innegehaltenen Versuchsbedingungen, im großen und ganzen nach der Gleichung von Schulze und Winterstein verläuft, d. h. unter Bildung von Ornithin und Harnstoff, welcher letzterer weiter in Kohlensäure und Ammoniak zersetzt wird.

Wie zu erwarten war, hatte die lange dauernde Erwärmung mit Baryt einen Teil des Ornithins racemisiert. Das Drehungsvermögen der Ornithursäure betrug nur  $\frac{1}{3}$  von dem, welches die reine d-Ornithursäure zeigt, <sup>1)</sup> und hiermit übereinstimmend verhielt sich die Säure wie ein Gemisch von optisch-aktiver und racemischer Ornithursäure. So erlitten sowohl die rohe, wie auch die umkrystallisierte, lufttrockene Säure beide einen deutlichen Gewichtsverlust (ca. 0,7%) beim Trocknen im Vakuum bei 110°. <sup>2)</sup> Bei Neutralisation der Säure durch Ammoniak und Zusatz von Calciumchlorid erschien kein Niederschlag in der Kälte; wurde dagegen erwärmt, schied sich, wie dies für die Ornithursäure charakteristisch ist, das schwerlösliche Calciumsalz aus. Unter dem Mikroskop zeigte dasselbe indessen ein ziemlich verschiedenartiges Aussehen, hauptsächlich wurden jedoch flache Nadeln beobachtet. Das Salz hatte also weder das für die racemische noch das für die optisch-aktiven Verbindungen charakteristische Aussehen (schöne Blättchen bezw. ganz feine Nadeln). Schließlich sei angeführt, daß das hier besprochene Calciumsalz 1,67% Wasser enthielt, während die racemische Verbindung mit 1 Mol. Wasser (2,45% Wasser) und die optisch-aktiven Verbindungen wasserfrei krystallisieren; man ersieht, daß der gefundene Wassergehalt einem Gemisch von  $\frac{1}{3}$  optisch-aktiver und  $\frac{2}{3}$  racemischer Säure beinahe entspricht.

---

<sup>1)</sup> Compt. rend. du Lab. de Carlsberg, Bd. VI, S. 220 (1905).

<sup>2)</sup> Vergleiche: Compt. rend. du Lab. de Carlsberg, Bd. VI, S. 220 (1905).

Carlsberg Laboratorium, Kopenhagen, Valby; Mai 1908.

---

---