

Über den Nachweis des Ornithins unter den Spaltungsprodukten der Proteinstoffe.

Von

A. Kossel und F. Weiss.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Heidelberg.)

Die Aufsuchung des Ornithins in lysinfreien Gemischen der Eiweißspaltungsprodukte bietet keine Schwierigkeiten, da diese Base nach Entfernung des Histidins und Arginins durch das Silberbarytverfahren in dem Phosphorwolframsäureniederschlag gefunden wird. Das Ornithin kann als Pikrat oder als Chloroplatinat, am leichtesten in diesem Fall wohl als Benzoylverbindung (Ornithursäure) nachgewiesen werden. Für die Auffindung des Ornithins neben dem Lysin fehlte es aber bisher an einer Methode und doch ist dieser Nachweis für die Aufteilung von Gemischen, welche durch fermentative Prozesse oder durch Alkalihydrolyse aus Proteinstoffen entstanden sind, unbedingt erforderlich.

Wir bedurften für die Untersuchungen, welche in der folgenden Mitteilung beschrieben sind, eines Verfahrens zur Trennung der beiden Basen und haben ein befriedigendes Ergebnis erzielt auf Grund der Beobachtung, daß die Pikrate des Ornithins in Wasser und besonders in Methylalkohol leichter löslich sind als das Pikrat des Lysins.

Es sind bisher drei Pikrate des Ornithins beschrieben worden:

1. Rechtsornithinmonopikrat.¹⁾ Dies Salz entsteht nach O. Riesser beim Zusatz alkoholischer Pikrinsäure zur wässrigen Lösung des Rechtsornithincarbonats. Das von uns in dieser Weise dargestellte Salz bildete Krystalle vom Schmelzpunkt 203—204° (nach Riesser 198—199°), welche in Übereinstimmung mit den Angaben Riessers ein Molekül Krystallwasser enthielten.

Berechnet für $C_5H_{12}N_2O_2$, $C_6H_3N_3O_7$ + H_2O :	Gefunden:
4,7 %	4,7 %

Der Gehalt an Pikrinsäure wurde durch Ätherextraktion des mit Schwefelsäure angesäuerten Pikrats bestimmt. Die

¹⁾ cf. Schulze und Winterstein, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV, S. 132. O. Riesser, Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 239, 1906.

Werte sind nicht genau, genügen aber, um festzustellen, ob es sich um Mono- oder Dipikrat handelt.

	Berechnet für:		Gefunden:
	Monopikrat	Dipikrat	
Pikrinsäure:	63,4 %	77,6 %	65,2 %

2. Inaktives Ornithinmonopikrat. Dieses von E. Fischer und K. Raske¹⁾ sowie von Riesser²⁾ beschriebene Salz ist für die Analyse das wichtigste. Wir erhielten es, wie das vorhergehende, beim Zusatz alkoholischer Pikrinsäure zu der wässrigen Lösung des inaktiven Ornithincarbonats. Es schied sich beim Umkrystallisieren in ziemlich großen Krystallen ab, die nach freundlicher Mitteilung des Herrn Professor Wülfing³⁾ dem triklinen System angehören. Nach Riesser krystallisiert dieses Salz zuweilen mit 1½ Mol. Wasser: die von uns dargestellten Krystalle enthielten kein Krystallwasser. Der Schmelzpunkt lag in Übereinstimmung mit E. Fischer und Raske, sowie mit Riesser unscharf bei 170°. ⁴⁾ Die Ausbeute an Pikrinsäure näherte sich der für das Monopikrat berechneten Zahl.

	Pikrinsäure berechnet für:		Gefunden:
	Monopikrat	Dipikrat	
	63,4 %	77,6 %	66,7 %

3. Inaktives Ornithindipikrat. Ein solches Salz ist von Fischer und Raske (l. c.) sowie von Riesser (l. c.) und F. Weiss⁵⁾ beschrieben worden. Die beiden erstgenannten Forscher erhielten es durch Zusatz der für 1 Mol. berechne-

¹⁾ E. Fischer u. K. Raske, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVIII, S. 3607 (1905).

²⁾ O. Riesser, Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 242, 1906.

³⁾ Genauere krystallographische Angaben, die für den Nachweis des Ornithins von Wert sein können, sollen später mitgeteilt werden.

⁴⁾ Das Salz begann schon bei 130° sich aufzublähen und schmolz vollständig zwischen 160 und 170° (Fischer u. Raske, l. c.).

⁵⁾ Dies Pikrat ist von F. Weiss auf Grund einer Stickstoffbestimmung als Monopikrat bezeichnet worden (Weiss, Diese Zeitschrift, Bd. LIX, S. 501). Diese Verwechslung ist dadurch möglich geworden, daß der Stickstoffgehalt des Monopikrats sich von dem des Dipikrats nur um 0,39% unterscheidet und daß es sich schon dann ausscheidet, wenn weniger als 2 Mol. Pikrinsäure zum Ornithinsulfat hinzugefügt sind.

ten Menge Pikrinsäure zu der freien Base, Riesser stellte es durch alkoholische Pikrinsäurelösung aus dem Carbonat dar, F. Weiss durch Fällung der Lösung des Ornithinsulfats mit alkoholischer Pikrinsäure. Das von uns untersuchte Salz war in gleicher Weise gewonnen. Dies Salz gab die für das Dipikrat berechnete Pikrinsäuremenge.

	Berechnet für Dipikrat:	Gefunden:
Pikrinsäure	77,6%	78,4%

Dieses Dipikrat scheint mit dem von Fischer und Raske sowie von Riesser beschriebenen nicht identisch zu sein, da es einen höheren Schmelzpunkt und kein Krystallwasser besitzt. Der von uns gefundene Schmelzpunkt betrug 195° , während Fischer und Raske 183° (korr. 185°) und Riesser $183-184^{\circ}$ angeben. Bemerkenswert ist auch die zuerst von Fischer und Raske gemachte Beobachtung, daß die Ausscheidung des Dipikrats beim Zusatz der Pikrinsäure zu der freien Base unter Umständen schon dann erfolgt, wenn die Menge der Pikrinsäure noch nicht ganz 1 Molekül Pikrinsäure für 1 Molekül Ornithin entspricht. Wir haben ähnliches beobachtet: auch scheint das Monopikrat beim Umkrystallisieren in geringer Menge in das Dipikrat überzugehen und umgekehrt. Hierdurch kann eine Unsicherheit in die Analysen eingeführt werden, und vielleicht sind die zu hohen Pikrinsäurewerte der von uns untersuchten Monopikrate durch solche Erscheinungen bedingt und auf eine Beimischung von Dipikrat zu beziehen.

Ebenso wie die Pikrinsäure bildet auch die Pikrolonsäure zwei Reihen von Salzen mit dem Ornithin und diese können ebenfalls zum Nachweis des Ornithins dienen. Das Monopikrolonat des inaktiven Ornithins ist bereits von F. Weiss¹⁾ beschrieben worden. Ein Dipikrolonat wurde aus den Produkten der Einwirkung des Barythydrats auf Leim gewonnen. Dasselbe hatte den Schmelzpunkt $235-236^{\circ}$ und gab bei der Analyse folgende Zahlen:

- 0,1452 g Substanz gaben 0,2370 g CO_2 und 0,0553 g H_2O .
d. i. 45,35% C und 4,31% H.
- 0,1479 g Substanz gaben 26,1 ccm N bei 12° und 753 mm Bar.
d. i. 20,75% N.
- 0,6040 g Substanz gaben 0,4950 g Pikrolonsäure.
d. i. 81,9% Pikrolonsäure.

¹⁾ F. Weiss, Diese Zeitschrift, Bd. LIX, S. 502, 1909.

Berechnet für $C_5H_{12}N_2O_2(C_{10}H_{20}N_4O_5)_2$:	Gefunden:
C 45,45 %	45,35 %
H 4,24 %	4,31 %
N 21,2 %	20,75 %
Pikrolonsäure 80,0 %	81,9 %

Zur Ausführung der Löslichkeitsbestimmung wurden die fein gepulverten trockenen Salze eine Stunde im Schüttelapparat mit dem Lösungsmittel geschüttelt. Es ergab sich, daß 100 ccm Methylalkohol 4,2—4,5 g racemisches Ornithindipikrat, 2,5—3 g racemisches Ornithinmonopikrat, aber nur 0,3—0,4 g Rechtsornithinmonopikrat lösten. Solche Unterschiede wurden beim Pikrat des aktiven und des inaktiven Lysins nicht beobachtet. 100 Teile Methylalkohol lösten 0,10—0,13 g Rechtslysinpikrat und 0,09 g inaktives Lysinpikrat.

Hiernach ist das Verfahren für die Aufsuchung des inaktiven Ornithins neben Lysin gegeben. Der nach Entfernung des Histidins und Arginins erhaltene Phosphorwolframsäureniederschlag wird in bekannter Weise durch Barythydrat zerlegt, die Lösung der Basen durch Kohlensäure vom Baryt befreit, die Carbonate mit alkoholischer Pikrinsäure in geringem Überschuß versetzt und zunächst in stark eingengteter Lösung bei mehrtägigem Stehen zur Krystallisation gebracht. Die erhaltenen Krystalle werden abgesaugt, mit wenig Alkohol gewaschen, getrocknet, fein gepulvert und mit Methylalkohol extrahiert. Die Mutterlauge wird mit Sand zur Trockene eingedampft und der Rückstand nach dem Pulvern ebenfalls mit Methylalkohol ausgeschüttelt.

Die Menge des Methylalkohols muß nach der Menge des Pikratrückstandes, wenn möglich nach der Menge des zu erwartenden Ornithins unter Berücksichtigung der oben angegebenen Löslichkeitsverhältnisse bemessen werden. Aus dem methylalkoholischen Auszug erhält man das Ornithinpikrat, dessen Schmelzpunkt zwar bisher als «unscharf» befunden (170° für das Monopikrat), immerhin zur Erkennung verwertbar ist. Zum weiteren Nachweis wird das Pikrat in das Chloroplatinat übergeführt. Dasselbe krystallisiert am besten aus starker Salzsäure und wir haben in manchen Fällen die Krystallisation dadurch beschleunigen können, daß wir die mit Platinchlorid

versetzte Lösung des Ornithinchlorhydrats in einen Schwefelsäureexsikkator brachten, dessen Schwefelsäure mit einigen Kochsalzkrystallen versetzt war. Die Darstellung des Platinsalzes hat sich bei diesen meist noch nicht ganz reinen Präparaten als zweckmäßiger erwiesen, wie die direkte Darstellung der Ornithursäure.

Das beschriebene Verfahren eignet sich am besten für das inaktive Ornithin, wie es nach unsern Versuchen bei der Alkalihydrolyse der Proteinstoffe¹⁾ und nach Ackermann auch bei der Fäulnis des Arginins²⁾ gewonnen wird. In solchen Fällen, wo Rechtsornithin zu erwarten ist, wird man es vorziehen, das Basengemisch zu racemisieren. Dies kann ohne erheblichen Verlust durch kurzes Erhitzen mit konzentrierter Schwefelsäure bewirkt werden, ähnlich dem von F. Kutscher³⁾ für die Racemisierung des Arginins angegebenen Verfahren.

Zum Schluß sei noch bemerkt, daß zwei Umstände die Auffindung des Ornithins und die Anwendung des oben beschriebenen Verfahrens erleichtern können. Zunächst die geringe Löslichkeit des Lysinpikrats in Wasser. Durch Umkrystallisieren aus Wasser kann man in manchen Fällen den größten Teil des Lysinpikrats abscheiden, so daß nur der in Wasser leichter lösliche Teil der Pikratmischung der Extraktion mit Methylalkohol zu unterwerfen ist.

Ferner haben wir bei der Fällung der Eiweißspaltungsprodukte mit Phosphorwolframsäure oft beobachtet, daß das Phosphorwolframat des Ornithins langsamer ausfiel, als das Gemisch der übrigen Phosphorwolframate. Wenn man das Filtrat des sofort entstehenden Phosphorwolframsäureniederschlages 24—48 Stunden stehen läßt, so scheidet sich bei Anwesenheit von Ornithin eine Nachfällung aus, welche sehr reich an Ornithin und zuweilen fast reines, etwa nur mit dem entsprechenden Prolinsalz vermisches Ornithinphosphorwolframat ist.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIX, S. 492. Bd. LX, 311.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LVI, S. 305.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 478.