

1. Thallonitrat wurde aus 15-prozentig salpetersaurer Lösung umkristallisiert.

In Lösung . . . . .	ThD $18.96 \pm 0.2$	Tl <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 138.0 mg
Im Thallonitrat . . . . .	» $10.34 \pm 0.07$	» 101.9 »
Verhältnis Krystalle/Lösung	» 1 : 1.35	» 1 : 1.355

2. Thallocarbonat wurde aus schwach ammoniakalischer Thorium-D-Lösung umkristallisiert.

In Lösung . . . . .	ThD $4.35 \pm 0.06$	Tl <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 167.2 mg
Im Thallocarbonat . . . . .	» $2.09 \pm 0.01$	» 81.6 »
Verhältnis Krystalle/Lösung	» 1 : 2.08	» 1 : 2.05

3. In eine schwefelsaure, bromhaltige Thallisalzlösung wurde festes Ammoniumsulfat eingetragen, bis sich ein Krystallbrei abschied.

In Lösung . . . . .	ThD $7.43 \pm 0.1$	Tl <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 115.6 mg
Tl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	» $4.27 \pm 0.04$	» 67.3 »
Verhältnis Krystalle/Lösung	» 1 : 1.74	» 1 : 1.72

Ich möchte nicht verfehlten, Hrn. Dr. Cammerer auch an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank auszusprechen für das große Interesse, daß er der Untersuchung entgegengebracht hat.

Charlottenburg, März 1913.

---

**116. Hermann Leuchs und J. F. Brewster:  
Die Synthese des natürlichen, aus Eiweißstoffen gewonnenen  
Oxy-prolins. (Über Pyrrolidin-Abkömmlinge IV.)**

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Berlin.]

(Eingegangen am 11. März 1913; vorgetragen in der Sitzung vom 10. März von Hrn. H. Leuchs.)

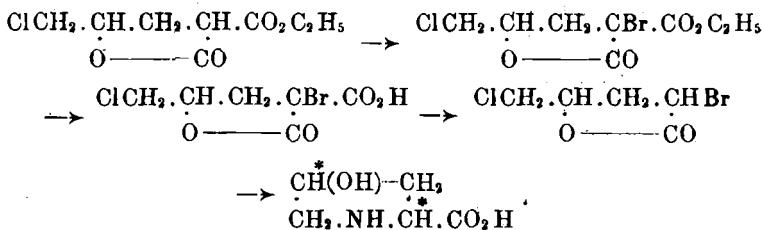
Die Grundlagen der vorliegenden Arbeit sind in drei früheren Mitteilungen<sup>1)</sup> enthalten, von denen die erste die Beschreibung einer Synthese von  $\gamma$ -Oxy-prolinen ( $\gamma$ -Oxy-pyrrolidin- $\alpha$ -carbonsäuren) gebracht hat.

Als Ausgangsmaterial diente der von W. Traube und Lehmann<sup>2)</sup> aus Epichlorhydrin und Natriummalonester dargestellte  $\delta$ -Chlor- $\gamma$ -valerolacton- $\alpha$ -carbonsäureester. Dieser wurde weiter in den  $\alpha$ -bromierten Ester und das  $\delta$ -Chlor- $\alpha$ -brom- $\gamma$ -valerolacton

<sup>1)</sup> Ber. 38, 1937 [1905]; 41, 1726 [1908]; 45, 1962 [1912].

<sup>2)</sup> B. 32, 720 [1899]; 34, 1971 [1901].

verwandelt, das mit wäßrigem Ammoniak zwei isomere, in Form ihrer Kupfersalze getrennte  $\gamma$ -Oxy-proline lieferte:



Die Isomerie der beiden Oxyproline, die mit (a) und (b) unterschieden wurden, ist durch die Anwesenheit zweier asymmetrischer Koblenstoffatome in der Formel des  $\gamma$ -Oxyprolins bedingt. Der Nachweis dafür wurde in der zweiten Mitteilung erbracht durch die Reduktion der Isomeren mit Phosphor und Jodwasserstoffsäure, die beide gleichmäßig in Prolin überführte.

Eine dritte isomere Aminosäure war schon vorher von Emil Fischer<sup>1)</sup> unter den Spaltprodukten des Leims aufgefunden worden. Sie kommt nach späteren Untersuchungen auch im Casein<sup>2)</sup>, Edestin<sup>3)</sup>, krystallisierten Oxyhämoglobin<sup>4)</sup> vor. Nach dem Ergebnis ihrer Reduktion stellte sie gleichfalls ein Oxy-prolin dar, in dem jedoch die Stellung des Hydroxyls unbestimmt blieb.

Ein unmittelbarer Vergleich der synthetischen Produkte mit dem natürlichen war nun nicht möglich, da dieses optisch-aktiv ist. Es wurden deshalb Versuche unternommen, es in der gewöhnlichen Weise durch Erhitzen mit Barytwasser zu racemisieren. Allein selbst bei einer Temperatur von 200—210° gelang dies nicht; denn die zurückgewonnene Säure zeigte noch immer etwa den achten Teil der ursprünglichen Aktivität, und es ließ sich aus ihr weder durch erneutes Erhitzen noch durch Reinigung, z. B. über das Kupfersalz ein inaktives oder merklich schwächer drehendes Präparat gewinnen.

Dieses von dem der gewöhnlichen aktiven  $\alpha$ -Aminosäuren abweichende Verhalten ließ sich nur so erklären, daß im vorliegenden Falle außer dem stets asymmetrischen  $\alpha$ -Kohlenstoffatom der substituierten  $\alpha$ -Aminosäuren noch ein zweites vorhanden war, oder daß mit anderen Worten das Hydroxyl nicht am  $\alpha$ -, sondern am  $\beta$ ,  $\gamma$ - oder  $\delta$ -C-Atom haftete. Die  $\delta$  Stellung war bei der großen Beständigkeit der Säure nicht wahrscheinlich, die übrigens auch ein zweiter

<sup>1)</sup> B. 35, 2660 [1902].

<sup>2)</sup> H. 39, 156 [1903]. <sup>3)</sup> E. Abderhalden, H. 87, 499 [1903].

<sup>4)</sup> E. Abderhalden, H. 37, 484 [1903].

Grund gegen die  $\alpha$ -Stellung war; denn derartige Verbindungen würden dem Typus des Aldehyd- und Keton-Ammoniaks entsprechen.

Nachdem die Racemisierung nicht zum Ziel geführt hatte, wurde der zweite mögliche Weg, der der Spaltung beschritten. Da die Oxyproline selbst kaum mehr saure Eigenschaften besitzen, wurden zum Zweck der Salzbildung mit Alkaloiden die Acyl-Derivate, die Formyl-Naphthalinsulfo-Phenylisocyanat-Verbindungen verwendet. Aber auch hier war kein Erfolg zu verzeichnen; die dargestellten Salze krystallisierten entweder nicht, oder es war im Falle der Krystallisation keine Spaltung der *d,l*-Säuren eingetreten.

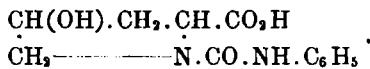
Die Versuche mußten aus äußeren Gründen abgebrochen werden, zumal die Schwierigkeit der Materialbeschaffung das Arbeiten sehr erschwerete.

Wir haben diese Versuche nun wieder aufgenommen, da inzwischen die Darstellung der Oxy-proline in zwei Richtungen verbessert worden ist. Durch ein bei monosubstituierten Malonsäureestern allgemeinwendbares Verfahren<sup>1)</sup>, nämlich den Zusatz von einem Molekül überchüssigem, freiem Ester konnte die Ausbeute an dem Traube-Lehmannschen Ester von 50% auf gegen 78% gesteigert werden.

Die zweite Verbesserung bestand darin, daß nicht mehr das  $\delta$ -Chlor- $\alpha$ -brom- $\gamma$ -valerolacton mit Ammoniak behandelt wurde, sondern das  $\alpha,\delta$ -Dichlor-valerolacton, das aus dem erwähnten Ester durch Chlorierung, Verseifung mit konzentrierter Salzsäure und Abspaltung von Kohlendioxyd erhalten wurde.

Die Ausbeute an den Oxyprolinen war in diesem Falle wesentlich besser: sie betrug 57% der berechneten gegen 21% beim Bromchlorlacton, auch war das Verhältnis von Säure a und b für die erstere günstiger<sup>2)</sup>.

Bei den neuen Spaltversuchen beschränkten wir uns auf das am leichtesten zugängliche saure Derivat der Oxyproline, die Verbindung mit Phenylisocyanat:



Zur Erzielung einer möglichst genauen Vergleichung bestimmten wir zunächst die optische Drehung des schon von E. Fischer beschriebenen gleichen Abkömmlings von natürlichem Oxyprolin in der berechneten Menge  $n/2$ -Natronlauge und stellten dann Alkaloidsalze von ihm dar, teils zu dem erwähnten Zweck, teils um durch das Impfen mit ihnen die Spaltung der *d,l*-Formen zu bewirken.

<sup>1)</sup> H. Leuchs, B. 44, 1507 [1911]. <sup>2)</sup> B. 45, 1960 [1912].

Ferner führten wir auch die Phenylisocyanat-Verbindung durch Abdampfen mit Salzsäure in das entsprechende Hydantoin über und ermittelten gleichfalls dessen Eigenschaften, besonders die optische Drehung.

Wir richteten bei den Spaltungsversuchen unser Augenmerk besonders auf das  $\gamma$ -Oxy-prolin (a), weil diese Säure nach ihrem süßen Geschmack, der neutralen Reaktion sowie der Umsetzung mit Naphthalinsulfochlorid dem natürlichen Stoff sehr nahe steht, während die Säure (b) sich in diesen Eigenschaften von ihm unterscheidet. Von Alkaloiden erwies sich schließlich das Chinin geeignet, den gewünschten Erfolg zu bringen. Durch zweimalige Krystallisation des Salzes aus Säure a aus alkoholischer Lösung wurde ein Produkt erhalten, das mit dem Vergleichspräparat nach Krystallform wie Schmelzpunkt übereinstimmte und auch die Mischprobe bestand. Außerdem war die daraus durch Behandeln mit Ammoniakwasser und Ausschütteln mit Chloroform dargestellte Lösung des Ammoniumsalzes aktiv und zwar annähernd so stark wie das Natriumsalz aus natürlichem Oxyprolin. Die Isolierung der freien, schön krystallisierten Säure bestätigte dann die völlige Übereinstimmung nach Schmelzpunkt, Krystallform, Löslichkeit usw. Vor allem war auch die Drehung der Natriumsalze beider Präparate fast genau die gleiche:

$$\text{Nat. Präp.: } [\alpha]_D^{19} = - \frac{2.15 \cdot 100}{11.05 \cdot 1.045}^2 = - 37.2^\circ.$$

$$\text{Synth. } [\alpha]_D^{20} = - \frac{2.14 \cdot 100}{11.08 \cdot 1.045}^2 = - 37.0^\circ.$$

Die Ausbeute an reinem Chininsalz betrug etwa 35% der berechneten, es konnte demnach nicht erwartet werden, daß sich aus den Mutterlaugen das reine Salz der *d*-Säure herausarbeiten lassen würde.

Zum Glück ist aber die *d,l*-Säure in Wasser sehr viel schwerer löslich, so daß aus den verschiedenen Fraktionen des Chinin- bzw. Ammoniumsalzes, die 20—30% überschüssige *d*-Säure enthielten, die inaktive Form so gut wie vollständig durch einfache Krystallisation entfernt werden konnte. Es wurde so ein Präparat erhalten, das nach der optischen Bestimmung 92% überschüssige *d*-Säure enthielt.

Diese *d*-Form mußte, wenn die *l*-Form mit dem Abkömmling des natürlichen Oxyprolins identisch war, dessen optischer Antipode sein und deshalb mit ihm im Verhältnis 1 : 1 gemischt das synthetische *d,l*- $\gamma$ -Oxyprolin (a) liefern, das einen um  $20^\circ$  höheren Schmelzpunkt als die Komponenten besitzt.

Der Versuch bestätigte auch diese Folgerung und somit ist die Konstitution des natürlichen Oxy-prolins als die eines  $\gamma$ -Oxy-derivates der Pyrrolidin- $\alpha$ -carbonsäure einwandfrei bestimmt.

Die  $\gamma$ -Stellung des Hydroxyls war nach einem Analogieschluß eigentlich nicht zu erwarten gewesen, denn die bisher bekannten ähnlich substituierten Aminosäuren der Eiweißstoffe, das Serin und das Cystin enthalten Sauerstoff und Schwefel in  $\beta$ -Stellung.

Da ferner das Oxyprolin sehr wahrscheinlich aus Prolin durch biologische Oxydation entsteht, so war man geneigt, dabei an die den Physiologen geläufige Theorie der  $\beta$ -Oxydation<sup>1)</sup> von Fettsäuren und verwandten Körpern zu denken, die z. B. im Auftreten von Acetessigsäure (Aceton) und *l*- $\beta$ -Oxybuttersäure bei der Zuckerkrankheit eine Grundlage findet und auch in manchen Fällen experimentell bestätigt<sup>1)</sup> worden ist.

Ebenso wie die Phenylisocyanat-Verbindung des Oxyprolins (a) ließ sich auch diejenige der Säure (b) mit Chinin spalten.

Wir krystallisierten das Salz aus 50-prozentigem Alkohol und erhielten 75 % der Theorie an reinem Salz der *l*-Säure und 25 % von dem der *d*-Säure.

Die Drehung der Ammoniumsalze betrug etwa  $\pm \frac{45^\circ}{d}$ . Dieser Minimalwert übersteigt schon den des Salzes aus natürlichem Oxyprolin, genau ließ er sich nicht bestimmen, da es nicht gelang, die aktiven Säuren zu krystallisieren. Sie sind in Wasser sehr leicht löslich, und es bot deshalb auch hier keine Schwierigkeit, aus dem zuletzt erhaltenen 50 - prozentigen Salz der *d*-Säure die beigemengte schwer lösliche *d,l*-Säure (b) durch Krystallisation zu entfernen.

Zur Kennzeichnung der optisch-aktiven *b*-Säuren benützten wir ihre Überführung in die zugehörigen Hydantoin, die schön krystallisiert und in sehr guter Ausbeute gewonnen wurden. Sie erwiesen sich in den einzelnen Fraktionen als völlig gleich stark drehend. Dies spricht sowohl für die Vollständigkeit der Spaltung bei der *d,l*-Säure (b) wie dafür, daß die Wasserabspaltung ohne Racemisierung vor sich gegangen ist.

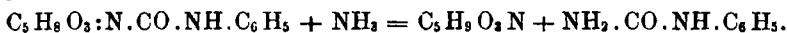
Die aktiven Hydantoin (b) zeigten sich in ihren Eigenschaften, auch in der Größe der Drehung als völlig verschieden von dem Anhydrid des Phenylisocyanat-*nat.-Oxyprolins*, das wir zum Vergleich hergestellt hatten.

Für die vollständige Synthese des natürlichen Oxyprolins war es noch notwendig, die Rückwärtsspaltung zur Aminosäure auszuführen, und zwar in solcher Weise, daß die Aktivität erhalten blieb. Derartige Zerlegungen sind auch bei inaktiven Derivaten noch nicht bewirkt worden; wir verwendeten daher zunächst die *d,l*-Formen.

---

<sup>1)</sup> Vergl. z. B. Blum und Koppel, B. 44, 3576 [1911].

Es zeigte sich, daß Kochen mit Barytwasser den Zerfall in Oxyprolin, Kohlendioxyd und Anilin bewirkte, jedoch war zur Beendigung der Reaktion sehr lange Zeit erforderlich. 10-prozentige Schwefelsäure lieferte bei 100° ausschließlich das Hydantoin; eine Spaltung im gewünschten Sinn trat hingegen beim Erhitzen mit konzentrierter Salzsäure im Rohr auf 95° ein. Die Anwendung dieses Verfahrens auf das *l*-Phenylisocyanat- $\gamma$ -oxyprolin (a) ergab jedoch ein nur schwach und zudem nach der anderen Richtung, nach rechts drehendes Präparat der Aminosäure. In saurer Lösung scheint das Gleichgewicht der verschiedenen aktiven Formen ein anderes zu sein als in alkalischer, aus der, wie bei den Racemisierungs-Versuchen erwähnt, eine schwach links drehende Säure isoliert worden ist. Vielleicht wird man durch Mischung in passendem Verhältnis doch die Verwandlung der aktiven Säure in ein inaktives, aus einer oder zwei *d,l*-Formen bestehendes Präparat erreichen können. Weiter wurde die Wirkung von Anilin untersucht, das bei 100° nur unter Bildung eines Anilids reagierte, und die von wäßrigem Ammoniak. Hier trat bei mehrstündigem Erhitzen im Rohr auf 95° in der Tat eine Austauschreaktion ein, und nach folgender Gleichung entstanden Oxyprolin und Phenyl-harnstoff:



Die Anwendung des Verfahrens auf das *l*-Phenylisocyanat- $\gamma$ -oxyprolin (a) brachte endlich den erstrebten Erfolg. Denn das in ganz einfacher Weise zu isolierende Roh-Oxyprolin zeigte unmittelbar den Schmelzpunkt der natürlichen Säure, ihre charakteristische Krystallform, sowie eine Drehung von mindestens -74°. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser war es analysenrein, und seine Drehung war auf -76.3° gestiegen. Dieser Wert ist nicht genau der für die natürliche Säure angegebene  $[\alpha]_D^{20} = -81.0^\circ$ . Aber da wir auch bei öfterem Umkristallisieren und ganz gleich, ob wir länger oder kürzer mit Ammoniak erhielten, ob wir das Derivat aus natürlicher oder synthetischer Säure verwendeten, stets den gleichen Endwert erhielten, möchten wir den Unterschied eher durch Beobachtungsfehler bei der einmaligen früheren Bestimmung oder durch die Anwesenheit einer unbekannten, stärker drehenden Verunreinigung im Naturprodukt erklären, als durch eine geringe Racemisierung bei unseren Präparaten.

Wir werden noch auf diesen Punkt unsere Aufmerksamkeit bei neuen Versuchen richten, die sich auf die Darstellung des *d*-Oxyprolins (a) und der aktiven Formen der (b) Säure erstrecken sollen. Die völlige Kenntnis auch dieser drei aktiven Formen scheint uns von Wert

für die Aufklärung der Racemisierungsvorgänge, wie im Hinblick darauf, daß vielleicht einmal eine von ihnen durch sterische Umwandlung unter bestimmten Bedingungen aus der bekannten natürlichen aktiven Säure entstehen mag und in den Eiweiß-Spaltprodukten aufgefunden werden wird.

### Chinin-Salz und Aktivität des natürlichen Phenylisocyanat-oxyprolins.

Zur Bestimmung des optischen Drehungsvermögens wurde die Lösung des Natriumsalzes verwendet.

0.1820 g Sbst. wurden in 1.46 ccm  $\frac{1}{2}$ -Natronlauge (ber. Menge) gelöst. Die Reaktion war noch schwach sauer. Das Gewicht der Lösung war 1.647 g, der Gehalt 11.05%; das spezifische Gewicht 1.045; der abgelesene Winkel im  $\frac{1}{2}$ -dm-Rohr = 2.15°.

$$[\alpha]_D^{19} = \frac{-2.15 \cdot 100.2}{11.05 \cdot 1.045} = -37.2^\circ.$$

Zur Darstellung des Chininsalzes wurden 0.3 g mit 0.43 g Chinin statt der berechneten Menge von 0.453 g in 10 Raumteilen 50-prozentigem Alkohol zusammengebracht. Es entstand ein Niederschlag sehr feiner, gallertiger Nadeln, der abgesaugt und auf Ton an der Luft getrocknet wurde. Menge 0.6 g.

Der Schmelzbereich des Salzes ist 206—209° (Zersetzung) bei mäßig schnellem Erhitzen. Es ist in heißem Methyl- und Äthylalkohol wie in kochendem Wasser ziemlich leicht löslich, schwerer in warmem Aceton; es krystallisiert aus diesen Mitteln in Nadeln oder dünnen Prismen von unverändertem Schmelzpunkt.

### Hydantoin aus natürlichem Oxyprolin.

0.5 g der Phenylisocyanat-Verbindung wurden in der gewöhnlichen Weise in das Anhydrid verwandelt, von dem 0.5 g erhalten wurden. Für die Analyse wurde es unter Zusatz von Tierkohle aus kochendem Wasser umkrystallisiert. Die so gewonnenen Nadeln oder auch dünnen Prismen schmolzen infolge des Wassergehaltes unscharf gegen 72°. Der lufttrockne Stoff wurde über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet:

0.0893 g Sbst.: 0.0121 g H<sub>2</sub>O (in 2 Tagen).

Die getrocknete Substanz nahm an der Luft kein Wasser mehr auf. Sie schmolz bei 122—123°.

0.1412 g Sbst.: 0.2786 g CO<sub>2</sub>, 0.0770 g H<sub>2</sub>O.



Gef. • 53.81, • 6.06, • 13.55.

Das Hydantoin ist in Alkohol, Aceton, Eisessig leicht löslich, in Äther, Chloroform, Essigester ziemlich leicht, in Benzol schwerer löslich.

0.0362 g wasserfr. Sbst.; 4.174 g wäßrige Lösung. Gehalt: 0.868%; Drehung im 1-dm-Rohr: 0.44°; d = 1.

$$\text{I. } [\alpha]_D^{20} = -50.7^\circ$$

$$\text{II. } [\alpha]_D^{20} = -\frac{0.430 \cdot 100}{0.853 \cdot 1} = -50.4^\circ.$$

### Spaltung des Phenylisocyanat- $\gamma$ -oxyprolins (a).

3.1 g reines (a)-Derivat wurde mit 4.4 g Chinin ( $C_{20}H_{24}N_2O_2 + 3H_2O$ ) statt 4.7 g vermischt und das Gemenge in 100 ccm absolutem Alkohol gelöst. Auf Animpfen mit dem Chininsalz des Derivates vom natürlichen Oxyprolin begann die Krystallisation, die man während dreier Stunden bei gewöhnlicher Temperatur in Ruhe vor sich gehen ließ. Dann saugte man die Krystalle, kleine dünne Prismen, ab und wusch sie einige Male mit absolutem Alkohol, schließlich mit Äther. Ihre Menge war 2.5 g; ihr Schmelzpunkt lag bei mäßig schnellem Erhitzen bei 202° (Zersetzung). Mischen mit dem Chininsalz aus natürlichem Oxyprolin bewirkte keine Änderung.

Zur weiteren Reinigung wurde das Salz in 50 ccm absolutem, heißem Alkohol gelöst, wobei 40 ccm nötig waren, und wieder drei Stunden der Krystallisation bei 20° überlassen. Man erhielt 1.3 g Salz, das bei 206—209° unter Zersetzung schmolz.

### *l*-Phenylisocyanat- $\gamma$ -oxyprolin (a).

Zur Gewinnung der freien Säure und ihrer Prüfung auf Aktivität wurde das Salz in Wasser suspendiert, mit Ammoniak versetzt und mehrere Male mit Chloroform ausgeschüttelt. Die so von Chinin befreite wäßrige Schicht wurde im Vakuum auf 25 g eingedunstet. Dann war ihr Prozentgehalt, da sie ungefähr 0.6 g Säure als Ammoniumsalz enthielt, etwa 2.4. Diese Lösung drehte im  $\frac{1}{2}$ -dm-Rohr gelbes Licht 0.44° nach links. Daraus berechnet sich

$$[\alpha]_D^{20} = -\frac{0.44 \cdot 2 \cdot 100}{2.4 \cdot d} = -\frac{36.7^\circ}{d}$$

Die Flüssigkeit wurde weiter im Vakuum auf 6 ccm eingedunstet und mit 0.6 ccm 5-n. Salzsäure versetzt, der Niederschlag, der beim Stehen in Eis entstanden war, wurde abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen. Man erhielt 0.35 g, die zur Reinigung aus 5 Tln. heißem Wasser umkrystallisiert 0.25 g (Kryst. I) lieferten. Der Schmelzpunkt der über Schwefelsäure getrockneten Substanz lag bei 175° (Zersetzung).

Eine zweite Krystallisation wurde durch Eindunsten der ersten Mutterlauge gewonnen und aus der zweiten umgelöst: Menge 0.2 g, Schmp. 175°.

Zur Bestimmung der Aktivität wurde das Präparat I in der berechneten Menge  $\frac{1}{2}$ -Natronlauge gelöst:

0.0550 g Sbst.: 0.4966 g Lösung; Prozentgehalt 11.08; Drehung im  $\frac{1}{2}$  dm-Mikrorohr = 2.14°.

$$[\alpha]_D^{20} = - \frac{2.14 \cdot 100 \cdot 2}{11.08 \cdot 1.045} = - 37.0^\circ.$$

Die Reaktion der Flüssigkeit war noch schwach sauer.

Dieser Wert ist in sehr guter Übereinstimmung mit dem für das Derivat des natürlichen Oxyprolins gefundenen:

$$[\alpha]_D^{19} = - \frac{4.30 \cdot 100}{11.05 \cdot 1.045} = - 37.2^\circ.$$

In der Tat sind auch alle anderen Eigenschaften dieselben: beide Substanzen lösen sich in weniger als 5 Tln. heißem Wasser und krystallisieren daraus in glänzenden, acht- und vierseitigen Blättchen oder sechsseitigen dünnen Prismen. Auch ihr Gemisch krystallisiert in schönen Blättchen. Sie schmelzen gleichzeitig erhitzt beim selben Punkt (175°); die Mischprobe gibt keine Erniedrigung.

Die Analyse der durch die Spaltung gewonnenen Säure gab die erwarteten Zahlen:

0.1507 g Sbst.: 0.3177 g CO<sub>2</sub>, 0.0742 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>(250). Ber. C 57.55, H 5.60.

Gef. » 57.49, » 5.47.

Das Derivat ist in Alkohol und Aceton leicht, in Eisessig ziemlich schwer, in Chloroform wenig, in Äther und Benzol kaum löslich.

Auch die freie Säure dreht polarisiertes Licht nach links. Die verwendete wäßrige Lösung war übersättigt.

0.0436 g Sbst: 1.150 g Lösung. Gehalt: 3.79%;  $\alpha = - 1.10^\circ$ ,  $d = 1.01$ .

$$[\alpha]_D^{20} = - 57.5^\circ.$$

#### *d*-Phenyl-isocyanat- $\gamma$ -oxyprolin ( $\alpha$ ).

Durch Einengen der ursprünglichen Chininsalz-Lösungen wurden noch einige Krystallfraktionen (II—V) gewonnen. Ihre Schmelzpunkte erreichten jedoch auch nach dem Umlösen des Salzes aus Alkohol, wozu für die erste Fraktion die Mutterlauge des reinen Chinin-*l*-derivates verwendet wurde, nicht den dieses Salzes. Sie lagen vielmehr bei 202—193°. Dem entsprach die optische Untersuchung der aus ihnen bereiteten Ammoniumsalze: Fraktion II (0.7 g) erwies sich als inaktiv; Fraktion III (1.6 g) enthielt nach ihrer Drehung  $\alpha^D = + 7.5^\circ$  20% überschüssiges *d*-Salz; Fraktion IV (2.4 g) bei  $\alpha^D = + 13.5^\circ$  33% und das in der letzten Mutterlauge enthaltene Salz (1.1 g) wieder 20% der *d*-Form. Zu ihrer Isolierung wurden die drei rechtsdrehenden Lösungen

vereinigt, im Vakuum auf 15 ccm eingedampft und mit wenig überschüssiger 5-n.Salzsäure versetzt. Es entstand sofort ein reichlicher, kristallinischer Niederschlag, der nach einiger Zeit abgesaugt und mit Wasser gewaschen wurde. Seine Menge war 1.8 g; er schmolz wie *d,l*-Phenylisocyanat-oxyprolin (a) gegen 195° (Zersetzung) und erwies sich in alkalischer Lösung als beinahe inaktiv.

Das Filtrat von der Racemform wurde im Exsiccator eingedunstet. Den Rückstand nahm man in 2 ccm Wasser auf, saugte ab und deckte einige Male mit sehr wenig Eiswasser. Man erhielt 0.35 g, die gegen 175° schmolzen. Sie wurden aus 15 Tln. heißem Wasser umkristallisiert. Die ausgeschiedenen glänzenden vier- oder achtseitigen Blättchen oder sechseitigen dünnen Prismen wurden über Schwefelsäure getrocknet. Die Lösung in  $\frac{1}{2}$ -Natronlauge wurde optisch untersucht:

0.0490 g Sbst.; 0.4434 g Lösung; Gehalt 11.05%; Drehung im  $\frac{1}{2}$ -dm-Rohr + 1.97°.

$$[\alpha]_D^{20} = + \frac{1.97 \cdot 100 \cdot 2}{11.05 \cdot 1.045} = + 34.1^\circ.$$

Das Präparat enthielt also gegen 92% überschüssige *d*-Säure.

Da die *d*-Säure der optische Antipode des Derivats von natürlichem Oxyprolin sein mußte, war zu erwarten, daß sie sich mit diesem vereinigen und das synthetische Phenylisocyanat-oxyprolin (a) geben würde.

Je 0.1 g der beiden aktiven Formen wurden in je 5 Tln. kochendem Wasser gelöst. Beim Mischen und Kochen der Lösung blieb ein dicker Brei ungelöster Krystalle, die erst in Lösung gingen, als im ganzen gegen 6 ccm Wasser zugegeben waren. Diese Löslichkeit entspricht der des *d,l*-Phenylisocyanat-oxyprolins (a). In der Tat zeigten auch die in der Kälte ausgefallenen Krystalle, 0.15 g glänzende Blättchen, das Aussehen und den Schmelzpunkt der Racemform (Mischprobe).

#### Spaltung des *d,l*-Phenylisocyanat- $\gamma$ -oxyprolins (b).

Eine Lösung von 6.2 g reinem b-Derivat und 9 g krystallisiertem Chinin (statt 9.3 g) in 120 ccm absolutem Alkohol zeigte keine Neigung zu krystallisieren. Sie wurde deshalb mit dem gleichen Gewicht (96 ccm) Wasser verdünnt. Die nach zwei Tagen abgeschiedenen feinen Nadeln wurden abgesaugt, mit 20 ccm 50-prozentigem Alkohol und mit Äther nachgewaschen. Sie sintereten von 170° an und schmolzen unter Gasentwicklung bei 186–188°. Die Menge dieser Fraktion I war 1.9 g. Durch Verdünnen des Filtrats mit 55 ccm Wasser wurde nach 2 Tagen eine Fraktion II von 1.5 g erhalten.

Weitere Wasserzugabe fällte nur noch amorphes Salz; deshalb wurde im Vakuum völlig eingedampft. Der Rückstand lieferte in 120 g 50-prozent. Alkohol aufgenommen beim Stehen über Nacht eine Fraktion III von 2.4 g.

Das bleibende Salz wurde schließlich in 60 g Alkohol der gleichen Stärke gelöst; den bei  $-15^{\circ}$  entstehenden Niederschlag krystallisierte man aus 40 g des gleichen Mittels um. Fraktion IV: 1.7 g.

Die ganzen Mutterlaugen, auch die vom Unikrystallisieren der ersten Fraktionen stammenden, lieferten die Fraktion V: 6.8 g (nach Berechnung).

Zur Feststellung, ob Spaltung eingetreten war, wurde zunächst von I eine Probe von 0.3 g in das Ammoniumsalz verwandelt. Es wurde folgender Minimalwert gefunden:

$$[\alpha]_D^{20} = - \frac{1.16^{\circ} \cdot 2 \cdot 100}{5.2 \cdot d} = - \frac{44.6^{\circ}}{d}$$

Die Hauptmenge des Salzes wurde in 20 ccm kochendem 50-prozentigem Alkohol gelöst und durch Abkühlen auf  $0^{\circ}$  wieder zur Abscheidung gebracht. Die Menge war 1.2 g; der Schmelzbereich unverändert 186—188 $^{\circ}$ . Die Drehung des Ammoniumsalzes  $[\alpha]_D^{20}$  wurde zu  $- \frac{44.5^{\circ}}{d}$  bestimmt.

Fraktion II wurde aus dem Filtrat der 1.2 g umgelöst: 1.65 g; das Ammoniumsalz zeigte  $[\alpha]_D^{20} = - \frac{44^{\circ}}{d}$ ; das gleiche Ergebnis hatte die Untersuchung der Fraktion III.

Die vierte Fraktion erwies sich hingegen in Form des Ammoniumsalzes als rechtsdrehend:

$$[\alpha]_D^{20} = + \frac{45^{\circ}}{d}$$

Der Rest des Salzes enthielt naturgemäß gleichfalls überschüssige *d*-Säure:

$$[\alpha]_D^{20} = + \frac{24^{\circ}}{d}$$

#### *l*-Phenylisocyanat- $\gamma$ -oxyprolin (b) und Hydantoin.

Zur Darstellung der freien *l*-Säure wurden zunächst die Lösungen des *l*-Salzes im Exsiccator eingeengt und schließlich mit der berechneten Menge 5-n. Salzsäure versetzt. Die Lösung schied nichts ab. Bei völligem Eindunsten blieb die Säure als in Wasser leicht löslicher Sirup zurück. Zur Trennung vom Chlorammonium wurde mit Essigester ausgezogen und Reste von Salz durch Zusatz von Äther gefällt. Die Esterlösung wurde auf dem Wasserbad verdampft, aber es gelang auch nach dieser Behandlung nicht, die Säure aus verschiedenen Mitteln zur Krystallisation zu bringen.

Zwar wurde bei der Probe mit Wasser eine geringe Menge von Krystallen erhalten; doch erwiesen sich diese als das zugehörige Hydantoin.

Es wurde deshalb die ganze Menge mit verdünnter Salzsäure auf dem Wasserbad abgedampft. Der völlig feste Rückstand wurde mit wenig kaltem Wasser verrieben und abgesaugt. Ausbeute 1.6—1.8 g.

Zur Reinigung wurde die Substanz aus heißem Wasser umkristallisiert und für die Analyse über Schwefelsäure getrocknet.

0.1401 g Sbst.: 0.3201 g CO<sub>2</sub>, 0.0649 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub> (232). Ber. C 62.07, H 5.17.

Gef. » 62.31, » 5.15.

Zur Prüfung auf optische Einheitlichkeit wurde sowohl die erste Kristallisation, wie zwei weitere durch Einengen gewonnene untersucht. Es konnte nur eine etwa 1-prozentige wäßrige Lösung verwendet werden, die fast gesättigt ist:

$$\text{Für I: } [\alpha]_D^{20} = - \frac{0.55^\circ \cdot 100}{0.997 \cdot 1} = - 55.2^\circ. \text{ II: } - 55.4^\circ. \text{ III: } - 53.7^\circ.$$

Das Hydantoin schmilzt bei 156—158°. Es löst sich in weniger als 4 Tln. heißem Wasser und kristallisiert daraus in glänzenden schießen Prismen. Es ist in Aceton und Eisessig leicht löslich, ziemlich leicht in Alkohol, Chloroform, Essigester in der Hitze, in Äther wenig, in heißem Benzol ziemlich löslich.

#### *d*-Phenylisocyanat- $\gamma$ -oxyprolin (b) und Hydantoin.

Die rechtsdrehenden Lösungen des Ammoniumsalzes wurden auf 20 ccm gebracht, dann mit der berechneten Menge Salzsäure versetzt, worauf man den bei 0° ausgefallenen Niederschlag nach längerem Stehen abfiltrierte: Er bestand aus gegen 1.8 g der *d,l*-Säure (Schmelzpunkt, mangelnde Aktivität). Durch Einengen des Filtrats wurden noch 0.1 g davon gewonnen. Die abgetrennte Lösung wurde ohne weiteres mit verdünnter Salzsäure auf dem Wasserbad abgedampft, wonach die Behandlung die gleiche wie beim *l*-Hydantoin war.

0.1713 g Sbst.: 0.3888 g CO<sub>2</sub>, 0.0809 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub> (232). Ber. C 62.07, H 5.17.

Gef. » 61.90, » 5.25.

Es wurde gefunden:

$$[\alpha]_D^{20} = + \frac{0.52 \cdot 100}{0.96 \cdot 1} = + 54.2^\circ.$$

Die sonstigen Eigenschaften sind die gleichen wie beim *l*-Hydantoin (b).

#### Abspaltung des Phenylisocyanat-Restes aus der Verbindung mit Oxyprolin.

Die Vorversuche wurden mit dem *d,l*-Phenylisocyanat- $\gamma$ -oxyprolin (b) angestellt.

Es zeigte sich, daß durch Kochen mit Barytwasser eine Zersetzung des Phenylharnstoff-Abkömlings in Anilin, Kohlensäure und Oxyprolin bewirkt werden konnte. Die Umsetzung wurde jedoch erst nach mehrstündigem Dauern vollständig.

Kochen mit 10-prozentiger Schwefelsäure veranlaßte ausschließlich den Übergang in das entsprechende Hydantoin. Kohlendioxyd und Anilin traten dabei überhaupt nicht auf; dagegen war dies der Fall, als die Substanz mit konzentrierter Salzsäure im Rohr auf 95° erhitzt wurde. Erwärmen mit Anilin auf 100° während mehrerer Stunden führte zur Bildung eines Anilids der Säure.]

Nach diesen Ergebnissen schien es am aussichtsreichsten, die Spaltung der aktiven Säure mit Salzsäure im Rohr vorzunehmen. 0.5 g Derivat des natürlichen Oxyprolins wurden mit 20 ccm Säure (spez. Gew. 1.19) 5 Stunden auf 95° erhitzt. Dann dampfte man im Vakuum ein und entfernte die übrige Salzsäure durch Behandlung mit Silbercarbonat, engte stark ein und fällte mit absolutem Alkohol: man erhielt 0.15 g Krystalle, die gegen 250° schmolzen, von Verunreinigungen wie Chlor, Silber u. a. frei waren.

Ihre 5-prozentige Lösung in Wasser zeigte jedoch eine nur geringe Drehung, zudem nach rechts:  $[\alpha]_D^{20}$  ungefähr + 14°, während — 81.04° zu erwarten waren.

Nach diesem vergeblichen Versuch wurde die Einwirkung von wäßrigem Ammoniak von 25 % zunächst auf die *d,l*-Säure (b) untersucht. Diese wurde durch mehrstündigtes Erhitzen im Rohr auf 95° tatsächlich gespalten und zwar in Phenyl-harnstoff und Oxyprolin (b), das in einer Menge von 80 % der berechneten herausgearbeitet wurde.

Die Übertragung auf den aktiven Abkömmling brachte endlich den gewünschten Erfolg.

#### Künstliche Darstellung des natürlichen Oxyprolins.

1.5 g *l*-Phenylisocyanat- $\gamma$ -oxyprolin (a) (aus natürlicher Aminosäure) wurden mit 45 ccm wäßrigem 25-prozentigem Ammoniak 3 Stunden im Rohr auf 95° erhitzt. Dann dampfte man im Vakuum völlig ein und zog den Rückstand einige Male mit Äther aus, in dem sich der entstandene Phenyl-harnstoff löste. Den bleibenden Niederschlag nahm man mit absolutem Alkohol auf, wobei sich alsbald Krystalle abschieden.

Diese wurden abgesaugt und mit Alkohol nachgewaschen. Menge 0.35 g vom Schmp. 270° (Kr. I).

Die Mutterlauge enthielt noch Ammoniumsalz der Ausgangssäure. Sie wurde deshalb eingedampft und wieder 3 Stunden im Rohr mit 45 ccm Ammoniak auf 95° erhitzt. Die gleiche Verarbeitung lieferte 0.25 g in Alkohol unlösliche Krystalle (Kr. II).

Das Filtrat enthielt noch geringe Mengen Salz, das beim Ansäuern *l*-Phenylisocyanat-oxyprolin (a) lieferte.

Die Krystallisation I (0.35 g) erwies sich bei der optischen Untersuchung als stark aktiv.

$$[\alpha]_D^{20} = - \frac{1.13 \cdot 2 \cdot 100}{2.954 \cdot 1.01} = - 76^\circ \pm 2^\circ.$$

Zur Reinigung wurde die noch etwas aschehaltige Säure aus wenig Wasser umgelöst. Die glasglänzenden Krystalle wurden zwischen Papier abgepreßt und über Schwefelsäure getrocknet: 0.2 g. Es wurde gefunden:

$$[\alpha]_D^{20} = - \frac{2.56 \cdot 2 \cdot 100}{6.612 \cdot 1.02} = - 75.9^\circ (\pm 0.8^\circ).$$

Weiteres Umlösen oder auch Auskochen mit Wasser lieferte eine Säure mit der gleichen Drehung:

$$[\alpha]_D^{20} = - \frac{3.98 \cdot 2 \cdot 100}{10.08 \cdot 1.035} = - 76.3^\circ.$$

Das gereinigte Oxyprolin schmolz gegen 274° unter Zersetzung und bildete die charakteristischen Krystalle des natürlichen Stoffes.

Seine Analyse gab folgende Werte:

0.1500 g Sbst.: 0.2508 g CO<sub>2</sub>, 0.0939 g H<sub>2</sub>O.  
 C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>N. Ber. C 45.80, H 6.87.  
 Gef. » 45.60, » 6.94.

Das in den Mutterlaugen gebliebene Produkt wurde aus Methylalkohol umgelöst:

$$[\alpha]_D^{20} = - 75.3^\circ.$$

Die Krystallisation II (0.25 g) war kaum weniger stark aktiv:

$$[\alpha]_D^{20} = - \frac{3.45^\circ \cdot 100.2}{9.0 \cdot 1.03} = - 74.5^\circ (\pm 1.1^\circ).$$

Umgelöst zeigte sie:

$$[\alpha]_D^{20} = - \frac{3.35^\circ \cdot 2 \cdot 100}{8.53 \cdot 1.03} = - 76.3^\circ.$$

Bei einem weiteren Spaltungsversuch diente synthetisches *t*-Phenyl-isocyanat-oxyprolin (a).

0.4 g wurden mit 12 ccm Ammoniak 8 Stunden auf 95° erhitzt. Die Ausbeute an Oxyprolin war 0.18 g (ber. 0.21 g).

Das Rohprodukt zeigte den Zersetzungspunkt 270° und

$$[\alpha]_D^{20} = - \frac{4.16 \cdot 2 \cdot 100}{10.84 \cdot 1.04} = - 73.9^\circ.$$

Die aus Wasser umgelöste Säure schmolz gegen 274° und gab

$$[\alpha]_D^{20} = - \frac{3.56 \cdot 2 \cdot 100}{9.14 \cdot 1.03} = - 75.6^\circ.$$

Die Drehung des möglichst gereinigten natürlichen Oxyprolins ist nur einmal<sup>1)</sup> bestimmt worden.

$$[\alpha]_D^{20} = - \frac{15.60^\circ \cdot 100}{9.828 \cdot 1.032 \cdot 2} = - 81.04^\circ.$$

<sup>1)</sup> B. 35, 2660 (1902). Weitere genaue Bestimmungen sind entweder gegebenen Falles nicht ausgeführt worden oder haben einen niedrigeren Wert ergeben. (Nach gütiger Mitteilung von Hrn. Prof. E. Abderhalden.)

Da wir aber unter den verschiedensten Bedingungen nur immer eine Drehung von  $-76^{\circ}$  erreichen konnten, möchten wir einstweilen diesen Wert für den zuverlässigeren halten. Der im ganzen nicht sehr beträchtliche Unterschied mag zum Teil durch Versuchsfehler oder durch eine Verunreinigung des natürlichen Stoffes mit einer noch stärker drehenden unbekannten Substanz veranlaßt sein.

Immerhin kann selbstverständlich auch bei dem künstlichen Stoff eine geringe Racemisierung eingetreten sein.

**117. O. Piloty: Bemerkungen zu der Mitteilung  
der HHrn. Hans Fischer und Heinrich Röse im 3. Heft  
dieser Berichte<sup>1)</sup>.**

(Eingegangen am 27. Februar 1913.)

Ich habe in einer gemeinsam mit S. J. Thannhauser veröffentlichten Mitteilung<sup>2)</sup> eine Säure von der Zusammensetzung  $C_{17}H_{26}N_2O_4$  beschrieben, welche wir durch Reduktion des Bilirubins mittels Jodwasserstoff erhalten haben und mit dem Namen Bilinsäure belegten. Fast gleichzeitig veröffentlichten H. Fischer und H. Röse<sup>3)</sup> ebenfalls eine Arbeit über diese Säure und nannten sie Bilirubinsäure. Um einer Verwirrung in der Literatur vorzubeugen, möchte ich betonen, daß Bilinsäure und Bilirubinsäure ein und dieselbe Substanz bezeichnen. Ferner habe ich in oben erwähnter Mitteilung (S. 206) zuerst die von mir Isophonopyrrol-carbonsäure genannte Substanz beschrieben und genau charakterisiert. Später fanden H. Fischer und E. Bartholomaeus<sup>4)</sup> diese zweite Substanz ebenfalls und nannten sie »isomere Phonopyrrol-carbonsäure«, an welcher Bezeichnung die Autoren bis jetzt festhalten.

Ferner habe ich in oben zitiertener Mitteilung (S. 197) den Nachweis geführt, daß im Bilirubin drei Kerne enthalten sind, von denen zwei einander ähnliche durch die Isophonopyrrol-carbonsäure zusammengehalten werden, da diese Säure durch schmelzendes Alkali sowohl in Form von Dimethylpyrrol als auch als Trimethylpyrrol abgespalten wird. Dies hätte Erwähnung finden müssen, als die HHrn. H. Fischer und H. Röse<sup>5)</sup> schrieben, daß sie »zum erstenmal« den Beweis geliefert haben, daß im Hemibilirubin und Bilirubin ein dritter Pyrrolkern enthalten sein muß.

<sup>1)</sup> B. 46, 439 [1913].

<sup>2)</sup> A. 390, 191 u. 202 [1912].

<sup>3)</sup> B. 45, 1579 [1912].

<sup>4)</sup> B. 45, 1979 [1912].

<sup>5)</sup> B. 46, 439 [1913].