

# Ueber eine quantitative Eiweisspaltung durch Salzsäure.

(I. Mittheilung.)

## Auffindung eines Pyridinderivates.

Von

**Dr. Rudolf Cohn**, Privatdocent.

(Aus dem Laboratorium für Pharmakologie u. med. Chemie zu Königsberg i. P.)  
(Der Redaction zugegangen am 29. April 1896.)

Den Ausgangspunkt der in Nachstehendem mitzutheilenden Versuche bildet eine Arbeit des russischen Forschers Krawkow<sup>1)</sup> über die chemische Zusammensetzung der Amyloidsubstanz. Derselbe fand, dass die Amyloidsubstanz fast die gleichen Farbenreactionen gibt, wie gereinigtes Chitin. Besonders deutlich wurde z. B. die Methylviolettreaction des Chitins, wenn man dieses für einige Wochen in die Bauchhöhle eines Hundes brachte, auch liess sich die Aehnlichkeit der Chitinreactionen mit denen des Amyloids im mikroskopischen Bilde sehr schön zeigen, wenn man Embolien von Chitin in Lungen von Hunden machte. Vf. schliesst aus seinen Versuchen, dass das Amyloid wahrscheinlich, wenn auch nicht ganz identisch mit Chitin, so doch wenigstens eine chemische Combination desselben mit einem Eiweisskörper, vielleicht dem Hyalin, ist; man würde dann die Amyloidartung richtiger als Chitinartung bezeichnen können.

<sup>1)</sup> N. P. Krawkow: Neues über die Amyloidsubstanz. Centralbl. f. d. med. Wissensch., 1892, S. 145—148.

Krawkow basirt seine Annahme von der Identität des Amyloids mit dem Chitin einzig und allein auf die Uebereinstimmung ihrer Farbenreactionen im mikroskopischen Bilde; dass dies aber ein sehr missliches Unternehmen ist, liegt auf der Hand, und lässt sich auch von vornherein die Richtigkeit seiner Vermuthung nicht bestreiten, so erscheint es doch geboten, nach strengeren Beweisen für dieselbe zu suchen. Die Möglichkeit dazu ist nun aber in Folgendem gegeben: das Chitin liefert bekanntlich beim Kochen mit starker Salzsäure salzsaures Glucosamin, das sich mit Leichtigkeit isoliren und identificiren lässt. Ist also die Annahme von der Identität des Chitins mit dem Amyloid eine richtige, so musste es gelingen, auch aus letzterem salzsaures Glucosamin zu gewinnen. Zur Ausführung eines dahin gehenden Versuches standen mir 2 sehr stark amyloidhaltige menschliche Milzen zur Verfügung, die ich durch die Güte des Herrn Privatdocenten Dr. Askanazy, Assistenten am hiesigen patholog. Institute, erhielt und wofür ich demselben auch an dieser Stelle bestens danke. Zur möglichsten Isolirung des in ihnen enthaltenen Amyloids wurden dieselben, nachdem sie von der Kapsel und den grösseren Gefässen befreit waren, in kleine Stücke zerschnitten, fein zerrieben, der Brei zunächst mit Wasser übergossen zwei Tage stehen gelassen, dann filtrirt und der Rückstand erst mehrere Stunden lang mit Wasser, dann noch 3 Mal mit viel Alkohol von 96% ausgekocht, an der Luft getrocknet und zu einem feinen Pulver zerrieben, das im Soxhlet mit Aether extrahirt wurde. Das wiederum getrocknete Pulver, dessen Menge in beiden Versuchen etwa je 25 gr. betrug, wurde jetzt noch 4 Stunden mit künstlichem Magensaft verdaut, dabei aber äusserst wenig angegriffen. (Vgl. die Arbeit von Tschermak, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XX, S. 343, der das Amyloid dabei leicht angreifbar fand.) Der in einer Presse möglichst von der Flüssigkeit befreite Rückstand wurde darauf mit reiner rauchender Salzsäure 5 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Die Masse löste sich dabei unter Schwarzfärbung vollständig auf und roch stark nach Mercaptan, dessen Isolirung mir jedoch nicht gelang. Ich will auch nur ganz

kurz erwähnen, dass ich von Glucosamin keine Spur auffand und dass daher die Behauptung von Krawkow, Amyloid sei mit Chitin identisch, auf sehr schwachen Füßen steht.

Es schien mir nun von Interesse zu sein, weil ich hoffen konnte, dadurch vielleicht einen Anhaltspunkt für die Zusammensetzung des Amyloids zu gewinnen, die Spaltungsproducte, die sich bei der Zersetzung des Amyloids mit Salzsäure gebildet hatten, einer näheren Untersuchung zu unterziehen. Zu dem Zwecke wurde in dem zweiten Versuch die Salzsäure unter mehrfacher Erneuerung des Wassers auf dem Wasserbade möglichst verjagt, der Rückstand nochmals in Wasser gelöst, mit Thierkohle etwas entfärbt und aus der braunen Lösung der Rest der Salzsäure durch Silberoxyd entfernt, das Filtrat mit  $H_2S$  entsilbert und das nunmehr farblose Filtrat auf ca. 20 ccm. eingedampft; es schied sich 0,6 gr. Tyrosin aus; bei weiterem Einengen des Filtrats und Waschwassers erhielt ich 0,8 gr. Leucin; das Filtrat von diesem wurde stark eingeengt und mit dem 3fachen Vol. Alkohol versetzt; dabei fand eine Ausscheidung eines hellbraunen, schweren Oeles und einer Menge Krystalle statt, welche von dem Oel durch Filtriren getrennt wurden; die Krystalle, ebenfalls Leucin, wogen 2 gr. Aus dem Alkohol erhielt ich beim Eindampfen noch 0,7 gr. Leucin, dessen Gesamtmenge also 3,5 gr. betrug; natürlich war es noch nicht ganz rein, und ob ihm andere Stoffe beigemischt waren, wurde nicht untersucht. Das Oel, dessen Eigenschaften mit keinem der aus Eiweiss bisher abgespaltenen Producte übereinstimmten, erwies sich als äusserst leicht löslich in Wasser, unlöslich in Alkohol. Um es von etwaigen Resten beigemischten Leucins oder anderer Substanzen zu befreien, wurde es noch mehrmals in Wasser gelöst und durch Alkohol wieder ausgefällt; zum Krystallisiren war es dabei nicht zu bringen, seine Reaction war stark sauer. Zur weiteren Untersuchung stellte ich, nachdem ein Barytsalz der Säure immer nur in amorphem Zustande erhalten war, aus derselben ein Kupfersalz dar. Zu dem Zwecke löste ich den noch verbleibenden Rest in 1 Ltr. Wasser und kochte die Lösung mit frisch gefälltem  $Cu(OH)_2$ .

von dem sie sehr viel auflöste. Das dunkelblaue Filtrat, aus dem sich beim Abkühlen Nichts ausschied, wurde erst auf ein kleineres Volumen eingedampft und als auch jetzt keine Krystallisation erfolgte, bis auf ca. 5—10 cbcm. Es bleibt ein dicker Syrup, der nicht krystallisirte. Aus verdünnterer Lösung fällte Alkohol das Kupfersalz nur flockig, schmierig; der stark concentrirte Syrup dagegen erstarrte beim Verreiben mit Alkohol und Stehenlassen unter diesem zu einer festen Masse, die aus Krystallen besteht, im mikroskopischen Bilde kleine Kugeln mit undeutlicher radiärer Streifung. Auf diese Weise war das Kupfersalz jedoch nicht gut umzukrystallisiren, da es sich von den Verunreinigungen so nicht trennen liess. Während es in Wasser äusserst leicht löslich war, erwies es sich als unlöslich ausser in Alkohol auch noch in Aether, Chloroform, Benzol und Toluol, dagegen löste es sich leicht in heissem concentr. Phenol, aus dem es durch Alkohol krystallinisch gefällt werden konnte. 5 gr. des Kupfersalzes, die ich nach den vielen Proben noch übrig hatte, wurden in 100 cbcm. flüssiger conc. Carbonsäure heiss gelöst und zunächst mit 100 cbcm. Alkohol versetzt, wobei sich nur ein Theil ausschied, der nach 2tägigem Stehen harte Krystallwarzen bildete, die aus kugelförmigen Aggregaten feiner Nadeln bestanden. Sie wurden abfiltrirt, mit einer Mischung gleicher Theile Phenol und Alkohol, dann mit reinem Alkohol gewaschen und wogen lufttrocken 2,7 gr. Aus dem Filtrat erhielt ich auf weiteren Zusatz von 200 cbcm. Alkohol noch 0,4 gr. in Kugeln, die aus zierlichen, mikroskopischen Nadelchen zusammengesetzt waren. Weiterer Alkoholzusatz gab keine Fällung mehr, dagegen wird der Rest des Kupfersalzes durch reichlichen Aetherzusatz ausgefällt, allerdings in etwas schmieriger Form.

Aus den Analysen des bei 105—110° getrockneten Salzes, welches dabei 3,7% Wasser verlor, liess sich eine bestimmte Formel nicht ausrechnen, ich unterlasse es daher, dieselben anzuführen, da ich später noch auf die Substanz zurückkommen werde. Der verbliebene Rest des Kupfersalzes, 1,6 gr., wurde in Wasser gelöst, das Kupfer mit H<sub>2</sub>S entfernt, das Filtrat

bis auf etwa 2 cbcm. eingedampft; es wurde selbst nach wochenlangem Stehen unterm Exsiccator nicht krystallinisch, sondern bildete eine lackartige Masse. Zu weiteren Versuchen fehlte mir zunächst das Material und neue, stark amyloid entartete Organe konnte ich nicht erhalten.

Es war nun die Frage, ob diese, von mir aus Amyloid erhaltene Säure, diesem eigenthümlich ist, oder ob man sie auch aus anderen Eiweisskörpern abspalten konnte. Als solchen wählte ich zunächst das Casein. Frisches Marktcasein wurde 2 Tage mit Chloroformwasser ausgelaugt, dann zur Entfernung des Fettes erst 2 Mal mit grossen Mengen Alkohol von 96% ausgekocht, nach dem Trocknen an der Luft zu einem mittelfeinen Pulver zerrieben, dieses im Soxhlet eine Reihe von Stunden mit Aether extrahirt und an der Luft getrocknet. 325 gr. des trockenen Pulvers wurden darauf mit 1 Ltr. reiner, concentr. rauchender Salzsäure vom spec. Gew. 1,19 am Rückflusskühler 5 Stunden gekocht. Die etwas dickflüssige, ganz schwarz gefärbte Lösung riecht nach niederen Fettsäuren und hat bis zum nächsten Tage eine Menge nadel-förmiger Krystalle abgeschieden. Da sich deren Abfiltriren nur schwer bewerkstelligen liess, die Asbest- und Glaswollefilter sich sofort verstopften, und da sich zeigte, dass die ausgeschiedenen Krystalle leicht in Aether löslich waren, so schüttelte ich die salzsaure Flüssigkeit 3 Mal mit je 1½ Ltr. Aether aus und destillirte diesen ab. Es bleibt ein ölig-krystallinischer Rückstand, der nach 3 wöchentlichem Stehen im luftverdünnten Exsiccator 8,7 gr. wiegt. In einem zweiten Versuche erhielt ich aus 300 gr. von Merck bezogenen Caseins, das ein trockenes, fein zerriebenes Pulver darstellte und das im Soxhlet mit Aether extrahirt war, welcher nur 3,25 gr. Fett aufgenommen hatte, bei derselben Behandlung 12,5 gr. der ölig-krystallinischen Masse. Es liess sich nun leicht durch fractionirte Magnesiafällung, Schmelzpunktsbestimmung der aus den einzelnen Fractionen zurückgewonnenen, nochmals fractionirt gefällten und aus Petroläther umkrystallisirten Säuren, und Umwandlung des durch essigsäure Magnesia nicht Fällbaren in das Bleisalz, welches leicht in Aether löslich

war, nachweisen, dass es sich um ein Gemenge von Palmitin-, Stearin- und Oelsäure handelte.

Nun war es im höchsten Maasse auffallend, dass das Casein trotz vorgängiger, anscheinend vollständiger Extraction des in ihm enthaltenen Fettes, doch noch diese grossen Mengen Fettsäuren — bis über 4% — bei dem Kochen mit der concentrirtesten Salzsäure abspaltete, und man hätte auf die, von vorneherein allerdings sehr unwahrscheinliche, Vermuthung kommen können, dass die Fettabspaltung aus dem Casein selbst stattgefunden habe — ein Befund, der natürlich für die ganze Lehre von der Fettbildung aus Eiweiss im Thierkörper von höchster Bedeutung sein musste, wenn sich nicht nachweisen liess, dass es sich doch nur um dem Casein mechanisch beigemengtes und nur schwer extrahirbares Fett handelte<sup>1)</sup>.

Zur Entscheidung dieser Frage wählte ich zunächst einen an sich fettarmen Eiweisskörper, nämlich Blutfibrin (von Merck bezogen), das möglichst fein gepulvert im Soxhlet der Reihe nach 12 Stunden mit Benzol, 6 Stunden mit Aceton und 4 Stunden mit Aether extrahirt wurde, bis dieser Nichts mehr aufnahm. Darauf wurde das Pulver  $2 \times 24$  Stunden an der Luft getrocknet und 130 gr. desselben mit 420 ccm. der conc. Salzsäure 5 Stunden gekocht. Geruch nach niederen Fettsäuren trat nicht auf, in den Aether gingen noch 1,14 gr. Fettsäuren über, also fast 1%.

Da auch dieser Versuch eine sichere Entscheidung nicht gebracht hatte, so ging ich auf den Rath des Herrn Geheimrath Fleischmann, Directors des hiesigen landwirthschaftlichen Instituts, in folgender Weise vor<sup>2)</sup>: In 15 Ltr. Mager-

<sup>1)</sup> E. und H. Salkowski (Berl. Ber., XII, S. 648) hatten ebenfalls aus trockenem, mit Aether auf das Sorgfältigste extrahirten Fleischpulver das sie der Fäulniss unterwarfen, etwa 3% höhere Fettsäuren erhalten und im Anschluss an diesen Befund die Frage der Bildung von Fett aus Eiweiss ventilirt. Sie beabsichtigten, diese Frage unter Anwendung eines noch vorurtheilsfreieren Materials — des Peptons — weiter zu verfolgen. So viel mir bekannt, ist aber eine spätere, hierauf bezügliche Arbeit der beiden Forscher nicht erschienen.

<sup>2)</sup> Herrn Geheimrath Fleischmann sowie seinem Assistenten, Herrn Dr. Leichmann, der die Darstellung des möglichst fettfreien Caseins, sowie die Fettbestimmungen für mich ausführte, spreche ich auch an dieser Stelle noch meinen besten Dank aus.

milch wurde der Fettgehalt genau bestimmt, dann das Casein ausgefällt, in der Molke und den Waschwässern wiederum das Fett bestimmt, ebenso in dem zur ferneren Fettextraction des Caseins benutzten wässerigen Alkohol, reinen Alkohol und Aether. Die Aetherextraction wurde so lange fortgesetzt, bis auch nicht die geringsten, mikroskopisch sichtbaren Fettspuren nachzuweisen waren. Die Resultate dieser Bestimmungen zeigt folgende Tabelle:

15 Ltr. Magermilch enthielten . . . . .	61,8 gr. Fett.
30 Ltr. (Molke + Wasser I) enthielten	18,2 gr. Fett
50 Ltr. (Wasser II + Wasser III) »	15,0 » »
8½ Ltr. wässriger Alkohol »	1,1 » »
4 Ltr. Alkohol »	8,7 » »
Aetherextract »	17,3 » »

Es konnte also in den 270 gr. Casein, welche erhalten wurden, höchstens 1,5 gr. Fett enthalten sein. Das Casein, welches ein weisses, staubfeines Pulver bildete, dessen einzelne Partikelchen bei 330facher Vergrößerung ziemlich gleichmässig ca.  $\frac{1}{5}$  mm. gross waren, wurde nun mit 900 ccm. der conc. Salzsäure gekocht. Die salzsaure Lösung roch nicht nach flüchtigen Fettsäuren, schied auch keine Fettsäurenadeln aus; aus dem Aetherextract liessen sich nur 1,15 gr. Fettsäuren gewinnen. Jedenfalls ergab die Spaltung nicht mehr Fett, als dem Casein im Maximum mechanisch beigemischt sein konnte, eine Abspaltung von Fett aus Eiweiss auf diesem Wege darf also als widerlegt angesehen werden. Höchst auffällig ist es nur, wie hartnäckig das Fett dem Casein anhaftet; es stimmt das übrigens mit Erfahrungen überein, die in neuester Zeit nach Abschluss meiner Versuche von anderer Seite mitgeteilt worden sind<sup>1)</sup>.

Ich will nun dazu übergehen, die Resultate der Spaltung des Caseins mit Salzsäure, die ich erhalten habe und die in

<sup>1)</sup> C. Dormeyer: Die quantitative Bestimmung von Fett in thierischen Organen. Pflüg. Arch., Bd. 61, S. 341.

einigen sehr wesentlichen Punkten von denen der früheren Autoren abweichen, mitzutheilen. Die grundlegende Arbeit auf dem Gebiete der Eiweisspaltung durch Salzsäure ist diejenige von Hlasiwetz und Habermann (Annal. d. Chem. u. Pharm., Bd. 169, S. 150). Da sich bei ihren Spaltungsversuchen gezeigt hatte, dass die Salzsäure neben der blossen Spaltung auch noch eine tiefer gehende Zersetzung bewirkt, in Folge welcher die saure Lösung der Proteinstoffe bei anhaltendem Kochen braun, zuletzt fast schwarz und dicklich wird, so suchten sie nach einem zweckmässigen Mittel, der Bildung jener gefärbten, secundären Producte vorzubeugen und die Zersetzung glatt und exact auszuführen. Sie fanden ein solches in dem Zinnchlorür. Bei seinem Zusatz bleibt die Lösung der Proteinstoffe auch nach tagelangem Kochen völlig klar und nur wenig gefärbt. Hlasiwetz und Habermann nahmen ferner Salzsäure gewöhnlicher Stärke, die dann noch mit der gleichen Menge Wassers verdünnt wurde, arbeiteten also nicht, wie gewöhnlich angegeben wird, mit concentrirter, sondern mit verdünnter Salzsäure.  $\frac{1}{4}$  von dem Gewicht des angewandten Caseins setzten sie Zinnchlorür zu und kochten ununterbrochen 3 Tage lang. Dieser Methode folgten auch die späteren Autoren auf diesem Gebiete. Ich will hier nicht schildern, wie dieselben die einzelnen Zersetzungsproducte darstellten, sondern nur ihre Resultate erwähnen: Hlasiwetz und Habermann erhielten aus Casein als Hauptspaltungsproduct Glutaminsäure, ferner Leucin, Tyrosin, Asparaginsäure, Ammoniak und Schwefelwasserstoff; E. Schulze und Barbieri aus Kürbissameneiweiss noch Phenyl- $\alpha$ -amidopropionsäure; Drechsel aus Casein noch Lysin, Lysatin, Lysatinin und Diamidoessigsäure.

Die Methode, nach der ich arbeitete, weicht nun in 3 wesentlichen Punkten von der der früheren Autoren ab. Erstens nahm ich nicht verdünnte, sondern die concentrirteste, rauchende reine Salzsäure (spec. Gew. 1,19). Zweitens setzte ich nicht Zinnchlorür zu, da dieses wegen seiner reducirenden Eigenschaften nicht ohne Einfluss auf den Gang der Zersetzung sein musste und da seine Gegenwart das fernere Verarbeiten

des Reactionsproductes erschwert; meine Methode wird dadurch einfacher. Die Schwarzfärbung der salzsauren Lösung ist anscheinend ziemlich gleichgiltig, denn einmal erhält man bei der weiteren Verarbeitung sehr bald und mit Leichtigkeit farblose oder nur schwach gefärbte Lösungen, und dann sind die dadurch erlittenen Verluste nur äusserst geringfügig, wie aus den quantitativen Resultaten der Zersetzung sogleich ersichtlich sein wird. Drittens kochte ich nicht 3 Tage lang, sondern nur 5 Stunden, nach welcher Zeit die Zersetzung schon zu Ende geführt ist. Ob eine noch kürzere Zeit ausreicht, habe ich nicht untersucht.

Der Gang der von mir durchgeführten Zersetzung ist folgender: 1000 gr. Casein werden mit 3000 cbcm. der reinen, rauchenden Salzsäure am Rückflusskühler 5 Stunden gekocht. Um etwaige flüchtige Producte aufzufangen, war das Ende des Kühlers mit 3 Paar Flaschen verbunden; von denen die ersten beiden destillirtes Wasser, das folgende Paar Barytwasser und das dritte Paar Bromwasser enthielten. Die Verbindung der Flaschen mit einander und der ersten mit dem Kühler war eine derartige<sup>1)</sup>, dass die je beiden zusammengehörigen unter sich durch ein fast bis auf den Boden beider Flaschen gehendes Glasrohr, der Kühler mit der ersten, die zweite mit der dritten und die vierte mit der fünften durch ein dicht unter den doppelt durchbohrten Gummistopfen endigendes Rohr verbunden waren. Ein Uebersteigen der Flüssigkeit aus den Wasserflaschen in die Barytflaschen oder aus diesen in die Bromflaschen und umgekehrt war so ausgeschlossen. Die ersten beiden Flaschen absorbirten unter starker Erwärmung die entweichenden Salzsäuredämpfe, in den Barytflaschen trat Anfangs eine mässige Ausscheidung von kohlen-saurem Baryt auf, die nach kurzer Zeit aufhörte. Ich erwähne dies deshalb, weil Drechsel als durchgreifenden Unterschied der Eiweisspaltung durch Säuren und Alkalien anführt, dass nur bei letzterer eine Kohlensäureabspaltung stattfindet. Dies konnte ich also nicht bestätigen,

<sup>1)</sup> Volhard, Annal. d. Chem., Bd. 242, S. 146.

denn unter den von mir gewählten Bedingungen trat auch bei der Säurespaltung eine, wenn auch nur geringfügige, Kohlensäureentwicklung auf.

In dem salzsauren Wasser der ersten beiden Flaschen liess sich in nicht unerheblicher Menge ein Körper nachweisen, der starke Jodoformreaction gab. Ob es sich dabei um Aceton selbst oder einen ihm nahestehenden Körper handelt, sollen weitere Untersuchungen noch erweisen. Jedenfalls ist dieser Befund der Abspaltung eines jodoformgebenden Körpers aus Eiweiss deshalb von Interesse, weil er geeignet ist, etwas Licht zu verbreiten über die Acetonausscheidung beim Diabetes, die ja ebenfalls wohl mit der Eiweisszersetzung im lebenden Körper zusammenhängt. Auch bei der Zersetzung anderer Eiweissstoffe, wie z. B. Blutfibrin und reines Pepton (100procentig von Merck bezogen) trat der jodoformgebende Körper auf. Vor längerer Zeit hat übrigens schon Weyl (Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. I, S. 339), als er Amyloid 5 Monate lang in Wasser faulen liess und dann mit Schwefelsäure destillirte, im Destillat die Jodoformreaction erhalten.

Das Bromwasser wurde nicht entfärbt, flüchtige organische Substanzen schienen nicht mehr aufzutreten, überhaupt hatte die anfängliche Gasentwicklung sehr bald ihr Ende erreicht. Nach Beendigung des Kochens wird die Flüssigkeit bis zum nächsten Tage kühl stehen gelassen; sie zeigt dann eine ziemlich reichliche Ausscheidung von Krystallen, die nur aus Fettsäurenadeln bestehen und durch dreimalige Ausschüttelung mit Aether entfernt werden. Ich erhielt aus dem Aether 34,25 gr. Fettsäuren. Der Aether wurde darauf durch einen kalten Luftstrom entfernt und die Flüssigkeit noch einige Tage stehen gelassen. Eine nachträgliche Ausscheidung von Krystallen fand nicht mehr statt. Auch als ich die Lösung reichlich mit Wasser verdünnte und auf dem Wasserbade eindampfte, bildete sich keine Krystallhaut und schied sich Nichts aus. Es war danach sehr unwahrscheinlich, dass in ihr Glutaminsäure enthalten war, deren salzsaures Salz ja in starker Salzsäure sehr schwer löslich ist (vergl. die Arbeit

von Hlasiwetz und Habermann). Ich entfernte jetzt die Hauptmasse der Salzsäure durch mehrmaliges Eindampfen auf dem Wasserbade unter jedesmaliger Erneuerung des Wassers. Die dickflüssige Masse erstarrte erst nach mehrwöchentlichem Stehen zu einem sehr weichen Krystallbrei, der, wie eine Probe zeigte, sich auf Thonplatten nur ganz unvollständig von der Mutterlauge trennen liess und dessen directe Verarbeitung mir unzuweckmässig erschien. Er wird daher jetzt in ca. 6 Ltr. Wasser gelöst, die schwarze Lösung zur Entfernung der Salzsäure nach dem Vorschlage von Hlasiwetz und Habermann mit Kupferoxydulschlamm versetzt, bis beim Schütteln ein gelbrother Schaum entsteht; eine vorgängige Erwärmung der Flüssigkeit auf  $50^{\circ}$  erwies sich als unnöthig. Nach dem schnell erfolgenden Absetzen wurde filtrirt, der Rückstand noch 2 Mal mit Wasser ausgekocht und alle Filtrate vereinigt. Aus den so erhaltenen 10 Ltr. dunkelblauer Lösung wird das Kupfer durch  $H_2S$  entfernt und das nur schwach gelb gefärbte Filtrat auf etwa 3 Ltr. eingedampft. Die schon während des Eindampfens beginnende Abscheidung von Krystallen erfolgt reichlicher beim Abkühlen der Flüssigkeit. Sie werden am nächsten Tage abfiltrirt und sehr oft ausgewaschen, wiegen 29 gr. (A). Durch Auskochen des  $CuS$ -Niederschlages mit etwas  $NH_3$ -haltigem Wasser erhielt ich noch 6 gr. derselben Krystalle ( $A_1$ ). Filtrat + Waschwasser werden auf 2 Ltr. eingedampft. Nach 24 Stunden hat sich eine grössere Menge Krystalle abgeschieden (B), die leichter löslich sind, ein lockeres Pulver bilden und lufttrocken 130 gr. wiegen. Ihr Filtrat + Waschwasser scheidet nach dem Eindampfen auf 1 Ltr. wiederum Krystalle ab ( $B_1$ ), die nach dem Auswaschen und Trocknen 67 gr. wiegen. Bei weiterem Eindampfen auf  $\frac{1}{2}$  Ltr. wird die Lösung schon ziemlich dickflüssig und kann nicht mehr völlig durch Absaugen mittelst der Luftpumpe von den ausgeschiedenen Krystallen ( $B_2$ ) getrennt werden.

Die abfiltrirte dickflüssige Mutterlauge derselben wird noch mit etwas Wasser verdünnt und mit dem 6fachen Vol. Alkohol versetzt, worauf sich am Boden eine grössere Menge eines dicken, braungefärbten Oeles ansammelt (C).

Da die Krystalle  $B_2$  noch viel von ihrer dicken Mutterlauge enthielten, so wurden sie nochmals in  $\frac{1}{2}$  Ltr. Wasser gelöst. Dabei blieb jedoch ein Antheil ungelöst, der aus einer neuen, bisher noch nicht beschriebenen Substanz besteht ( $D$ ). Ihre Menge betrug 1,5 gr. Das Filtrat davon wird auf  $\frac{1}{4}$  Ltr. eingedampft, die bis zum nächsten Tage ausgeschiedenen Krystalle ( $B_3$ ) abfiltrirt und etwas ausgewaschen; sie wiegen trocken 54 gr. Ihre Mutterlauge wird mit dem 6fachen Vol. Alkohol versetzt, es scheidet sich wiederum ein braunes Oel aus ( $C_1$ ), das mit  $C$  vereinigt wurde.  $C + C_1$  wird nochmals in Wasser gelöst, mit dem 6fachen Alkohol gefällt und die klare alkoholische Lösung von dem am Boden angesammelten Oel ( $C_2$ ) abgegossen. Die 3 alkoholischen Mutterlaugen wurden vereinigt und auf 1 Ltr. abdestillirt. Es schieden sich 0,5 gr. der neuen Substanz ( $D$ ) ab. Das Filtrat davon wird auf 300 ccm. eingedampft, bildet nach einigen Stunden einen dicken krystallinischen Brei, Kugeln vermischt mit viel langen Nadeln. Der ganze Brei wird mit 2 Ltr. Alkohol gekocht, worin er sich vollständig löst. Bis zum nächsten Tage erfolgt eine Abscheidung kleiner, kugliger Krystalle ( $B_4$ ), die 60 gr. wiegen. Das alkoholische Filtrat wird abdestillirt, der flüssige Rückstand, in dem sich schon einige Nadeln der Substanz  $D$  abgeschieden hatten, mit dem doppelten Vol. Wasser versetzt; nach einigem Stehen scheidet sich die Substanz  $D$  in etwas grösserer Menge ab, wird abfiltrirt, wiegt 1,5 gr. Das dunkelbraune Filtrat wird eingedampft und auf dem Wasserbade bis zur Gewichtsconstanz getrocknet. Der Rückstand ( $E_1$ ) wiegt 244 gr. Die ölige Substanz ( $C_3$ ) wird nochmals in Wasser gelöst und unter allmählichem Verrühren mit der 6fachen Menge Alkohol versetzt. Von dem abgeschiedenen Oel wird der Alkohol vollständig abgegossen, abdestillirt, der Rückstand auf dem Wasserbad bis zur Gewichtsconstanz getrocknet, wiegt 109 gr. ( $E_2$ ). Das Oel wird nach mehrwöchentlichem Stehen allmählig fest, strahlig-krystallinisch, unter dem Mikroskop sieht man blasse Kugeln, vermischt mit geringen Mengen feiner Krystallgarben. Die Substanz ( $C_4$ ) wiegt in diesem Zustande 180 gr.

Die 1000 gr. Casein haben also bei der Spaltung folgende Substanzmengen ergeben:

Fettsäuren . . . . .	=	34,25 gr.
A . . . . .	=	29 »
A <sub>1</sub> . . . . .	=	6 »
B . . . . .	=	130 »
B <sub>1</sub> . . . . .	=	67 »
B <sub>2</sub> . . . . .	=	54 »
B <sub>4</sub> . . . . .	=	60 »
C <sub>3</sub> . . . . .	=	180 »
D . . . . .	=	3,5 »
E <sub>1</sub> . . . . .	=	244 »
E <sub>2</sub> . . . . .	=	109 »
<hr/>		
S. S. . . . .	=	916,75 gr.

Rechne ich dazu die nicht bestimmten, allerdings verhältnissmässig geringen Mengen flüchtiger Stoffe und ziehe ich die unvermeidlichen Verluste in Betracht, die beim Filtriren der grossen Flüssigkeitsmengen und dem Auswaschen der Niederschläge entstehen, so ist diese Spaltung als eine quantitative anzusehen, es wurden über 91% des angewandten Caseins zurückgewonnen, während die bisher beschriebenen Eiweisspaltungen durch Säuren Substanzmengen lieferten, die weit hinter obiger Menge zurückbleiben.

Was nun die einzelnen Fractionen anlangt, zu deren Beschreibung ich mich jetzt wende, so handelt es sich bei den zuerst abgeschiedenen Krystallen  $A + A_1 = 35$  gr. um Tyrosin. Dasselbe schied sich nicht, wie gewöhnlich, in feinen garbenförmigen Nadeln, sondern in dicken, rosettenförmig gelagerten Prismen ab, und zeichnete sich schon von vorneherein durch grosse Reinheit aus. Um es chemisch rein zu erhalten, dazu bedurfte es gar nicht der üblichen besonderen Reinigungsmethoden, sondern man brauchte es nur aus kochendem Wasser unter Zusatz von etwas Thierkohle umzukrystallisiren; es schied sich dann beim langsamen Abkühlen sogleich in cm. langen, büschelförmig gruppirten, feinen Nadeln aus, die als dicker Brei das ganze Glas erfüllten. Seine Menge betrug über 3,5% des angewandten Caseins (die Fettsäuren natürlich abgerechnet), also erheblich mehr, als man sonst aus

Eiweiss erhält (ca. 2%). Auch aus reinem Pepton erhielt ich es ungefähr in derselben Menge. 150 gr. Pepton lieferten 4,5 gr. Tyrosin. Die wirklich abgespaltene Menge ist noch eine grössere, denn in späteren Krystallfractionen des gespaltenen Caseïns liess sich noch öfters Tyrosin nachweisen; so konnte ich z. B. aus einer Mutterlauge beim Umkrystallisiren des Leucins noch 0,7 gr. Tyrosin gewinnen. Es lohnte vielleicht, zu untersuchen, ob nicht auch Horn bei der Spaltung mit der concentrirtesten Salzsäure erheblich mehr Tyrosin liefert, als nach den bisherigen Methoden.

Der Schmelzpunkt des Tyrosins lag nach einmaligem Umkrystallisiren bei 295°. Den gleichen zeigte auch ein durch Pancreasverdauung aus Fibrin von mir dargestelltes Tyrosin. (Die Angabe von Beilstein und auch in dem Lehrbuch der physiol. Chemie von Neumeister, Bd. I, S. 25, dass das Tyrosin bei 235° schmelze, beruht wohl auf einem Versehen.)

Die Krystallfractionen B, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> und B<sub>3</sub>, zusammen 321 gr., erwiesen sich als der Hauptsache nach aus Leucin bestehend, das also in der grossen Menge von über 32% aus Eiweiss zu gewinnen war. Vorhanden war es in noch viel grösseren Quantitäten, die zuletzt erhaltenen Portionen E<sub>1</sub> und E<sub>2</sub> enthielten jedenfalls noch sehr viel davon, es liess sich jedoch nur schwer daraus isoliren. Das Leucin war schon verhältnissmässig rein auskrystallisirt und konnte durch mehrmaliges Umkrystallisiren aus heissem Wasser unter Entfärbung mittelst Thierkohle in farblosen Blättchen erhalten werden, die im zugeschmolzenen Rohr bei 292° schmolzen. Eine nähere Untersuchung der Leucinfractionen auf ihnen noch beigemengte andere Stoffe muss ich mir noch vorbehalten.

Von dem grössten Interesse war die Substanz D, die bisher als Spaltungsproduct des Eiweiss noch nicht aufgefunden worden ist. Sie ist nur in verhältnissmässig sehr geringer Menge darstellbar. Aus 1000 gr. Caseïn konnte ich

im Maximum nur 6 gr. an unreiner Substanz gewinnen; allerdings sind noch etwas grössere Mengen davon vorhanden, sie lassen sich aber aus Lösungen, die gleichzeitig viel Leucin enthalten, nur schwer isoliren. Am besten eignet sich zu ihrer Darstellung der folgende Weg: das Tyrosin und Leucin wurden durch fractionirtes Auskrystallisiren möglichst entfernt, die letzte dickliche Mutterlauge mit dem 6fachen Alkohol allmählig verrührt, nach dem Absetzen der ausgefallten öligen Substanz die alkoholische Mutterlauge abdestillirt, der Rückstand nochmals mit viel Alkohol gekocht, worin er sich ganz löst, nach dem Abkühlen von dem ausgeschiedenen Leucin abfiltrirt, das Filtrat wieder bis zur fast völligen Verjagung des Alkohols abgedampft und der Rückstand mit der 2—3fachen Menge Wasser versetzt. Die nöthige Wassermenge muss jedesmal vorsichtig ausprobiert werden, da sowohl bei zu wenig, wie bei zu viel Wasser ein erheblicher Antheil in Lösung bleiben kann. Ist der Wasserzusatz richtig getroffen, so schwimmt nach einigen Stunden auf der Lösung ein dünner Krystallbrei, der aus langen Nadeln besteht. Er wird abfiltrirt und kann jetzt ohne bedeutende Verluste mit kaltem Wasser ausgewaschen werden. So erhält man zunächst aus 1000 gr. Casein etwa 3—4 gr. der Substanz. Ein zweiter Antheil derselben war dem auskrystallisirten Leucin beige-mengt und liess sich auf folgende Weise gewinnen: Das gesammte Leucin wird 2 Mal mit je 1½ Ltr. 96proc. Alkohols ausgekocht, die vereinigten Filtrate abkühlen gelassen, von dem ausgeschiedenen Leucin nach 24 Stunden abfiltrirt, das Filtrat abdestillirt und der Rückstand wie oben vorsichtig mit Wasser versetzt. Es scheiden sich dann etwa 2—3 gr. der Nadeln aus. Mehr wie 6 gr. der noch unreinen Substanz konnte ich aus 1 Kilo Casein nicht darstellen; es scheiden sich zwar in einigen Mutterlaugen noch geringe Mengen aus, sie sind jedoch schwer zu isoliren. Jedenfalls dürfte aber wohl mehr wie 1% im Ganzen aus dem Casein nicht abgepalten sein.

Die Substanz zeigte folgende Eigenschaften: in Wasser ist sie sehr schwer löslich, beim Kochen löst sie sich zwar

in sehr viel Wasser allmählig auf, scheidet sich aber dann nur sehr unvollkommen wieder aus, sodass man dabei mit grossen Verlusten arbeitet. Sie krystallisirt daraus nach dem Entfärben mit Thierkohle in über cm. langen, fächerförmig gruppirten Nadeln, die unter dem Mikroskop aussahen, als ob sie aus dünnen Fasern wie ein Tau zusammengeflochten waren; ausserdem zeigten sie bambusrohrähnliche Segmentirungen. In Aether sind sie unlöslich. Am zweckmässigsten erwies es sich, sie aus kochendem 96 proc. Alkohol umzukrystallisiren. Sie lösen sich darin verhältnissmässig leicht und scheiden sich beim Abkühlen ohne zu grosse Verluste in farblosen, feinen, etwa cm. langen Nadelbüscheln wieder aus, die unterm Mikroskop fächer- oder garbenförmig gruppirt sind. Sie schmelzen bei  $295^{\circ}$  und sublimiren mit einer ganz ungewöhnlichen Leichtigkeit. Im Reagensglas vorsichtig erhitzt, sublimirt die Substanz unzersetzt explosionsartig, erfüllt als dicke Haut, welche noch durch einen Stiel pilzartig mit dem nicht sublimirten Rest zusammenhängt, das ganze Lumen des Glases. Selbst im Platinlöffel erhält man ein Sublimat, das den ganzen Löffel ausfüllt. Bei sehr schnellem Erhitzen tritt theilweise Zersetzung ein, es entwickeln sich sauer reagirende Dämpfe, die blausäureähnlich riechen. Die Substanz ist N-haltig, von neutraler Reaction und zeigt ganz indifferente Eigenschaften. Weder in Säuren noch in Alkalien löst sie sich, selbst beim Erhitzen anscheinend nur in soweit, als sie sich in derselben Menge Wasser lösen würde. Beim Erkalten scheidet sie sich unverändert aus. In heisser Salpetersäure löst sie sich und wird beim Abdampfen unverändert wiedergewonnen. Von concentrirter Schwefelsäure wird sie ohne Zersetzung in der Kälte leicht gelöst, selbst Erhitzen mit ihr gegen  $100^{\circ}$  verträgt sie; nach dem Verdünnen der Lösung mit Wasser fällt sie unverändert wieder aus. Saize der Substanz liessen sich nicht darstellen.

Zu den Analysen wurde sie zunächst mehrmals, wenn nöthig unter Entfärbung mit Thierkohle, aus kochendem 96 proc. Alkohol umkrystallisirt; sie bildete verfilzte, blendend-weiße Nadeln, die bei  $296^{\circ}$  schmolzen. Krystallwasser ent-

hielt sie nicht; bei  $105^{\circ}$  getrocknet nahm sie nicht an Gewicht ab.

0,2019 gr. gaben  $0,1350 \text{ H}_2\text{O} = 0,015 \text{ H} = 7,4\%$  und  $0,4598 \text{ CO}_2 = 0,1254 \text{ C} = 62,1\%$ .

0,2006 gr. gaben  $\text{N} = 23,3 \text{ cbcm. bei } t = 11^{\circ} \text{ und } \text{Ba} = 771 \text{ mm.}$   
 $\text{N} = 0,02818834 \text{ gr.} = 14,1\%$ .

Daraus berechnet sich die Formel  $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}$ , welche verlangt:

Verl.:	Gef.:
C = 61,9 %	62,1 %
H = 7,2 »	7,4 »
N = 14,4 »	14,1 »

Ich kann jedoch nicht verschweigen, dass ich bei einer Reihe von Analysen, die ich zur Sicherstellung der Formel noch machte, stets zu viel Wasserstoff fand, während C und N stimmten. Die erhaltenen Zahlen sind folgende:

0,2015 gr. gaben  $0,1737 \text{ H}_2\text{O} = 0,0193 \text{ H} = 9,6\%$  und  $0,4613 \text{ CO}_2 = 0,1258 \text{ C} = 62,4\%$ .

0,2008 gr. gaben  $0,1650 \text{ H}_2\text{O} = 0,01833 \text{ H} = 9,1\%$  und  $0,4588 \text{ CO}_2 = 0,12513 \text{ C} = 62,3\%$ .

Ich krystallisirte die Substanz noch mehrmals um und erhielt dann folgende Werthe:

0,2048 gr. gaben  $0,1753 \text{ H}_2\text{O} = 0,01948 \text{ H} = 9,5\%$  und  $0,4701 \text{ CO}_2 = 0,12821 \text{ C} = 62,6\%$ .

0,1816 gr. gaben  $\text{N} = 20,8 \text{ cbcm. bei } t = 9^{\circ} \text{ und } \text{Ba} = 763 \text{ mm.}$   
 $\text{N} = 0,02511808 = 13,8\%$ .

N-Bestimmung nach Kjeldahl:

0,1863 gr. gaben  $\text{NH}_3$  entsprechend  $19,3 \text{ cbcm. } \frac{1}{10} \text{ Normalnatronlauge}$   
 $= 0,02702 \text{ N} = 14,5\%$ .

In der Annahme, dass der Substanz immer noch etwas Leucin anhaften könnte, das sich wegen seiner Schwerlöslichkeit in Alkohol durch das Umkrystallisiren aus diesem Lösungsmittel nicht entfernen liess, benutzte ich ihre Eigenschaft, von concentr. Schwefelsäure nicht angegriffen zu werden, zu ihrer Reinigung und absolut sicheren Trennung von Leucin, das als in Wasser leicht lösliches schwefelsaures Salz nach dem Verdünnen der Schwefelsäure mit Wasser in Lösung bleiben

musste. Ich löste also den Körper in nicht zu viel concentr. Schwefelsäure in der Kälte auf, es trat nur ganz schwache Gelbfärbung ein, filtrirte klar durch Glaswolle und goss die Lösung in etwa die 5fache Menge Wasser. Die Substanz schied sich sofort aus und wurde nach dem Abkühlen, Abfiltriren und gründlichen Auswaschen mit Wasser 2 Mal aus Alkohol umkrystallisirt. Sie schmolz bei  $195^{\circ}$ . Auch ihre Analyse ergab zu hohen H-Gehalt.

$$0,2052 \text{ gr. gaben } 0,1580 \text{ H}_2\text{O} = 0,01755 \text{ H} = 8,5 \% \text{ und } 0,4667 \text{ CO}_2 \\ = 0,1273 \text{ C} = 62,0 \%$$

Worauf die grossen Schwankungen im H-Gehalt beruhen, vermag ich nicht zu sagen, ich beabsichtige, wenn mir mehr Substanz zu Gebote steht, die Analysen nochmals zu wiederholen, bis dahin möchte ich die Formel  $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}$  für die wahrscheinlichste halten. Eine Moleculargewichtsbestimmung der Substanz nach der Beckmann'schen Siedemethode führte zu keinem Resultate, weil sich bei ihrer Ausführung zeigte, dass die Substanz in ganz absolutem Alkohol merkwürdigerweise sehr schwerlöslich war. In dem ersten Versuche ging von dem angewandten halben Gramm trotz stundenlangen Siedens überhaupt nur ein kleiner Theil in Lösung, in einem zweiten dauerte es 3 Stunden, bis sich 0,192 gr. in 32,3 gr. Alkoh. abs. gelöst hatten, und es trat keine ganz constante Siedepunktserhöhung ein.

Der geringe H-Gehalt im Verhältniss zum hohen C-Gehalt und die grosse Widerstandsfähigkeit der Substanz wiesen darauf hin, dass wir es mit einem ringförmig constituirten Körper zu thun haben, und das Verhalten gegen concentr. Schwefelsäure, das unveränderte Ausfallen aus ihr beim Verdünnen mit Wasser, machte es wahrscheinlich, dass der N nicht in der Seitenkette, etwa als Amidogruppe, sondern im Kern enthalten sei, und legte so die Vermuthung nahe, dass hier ein Pyridinderivat vorliege. Zur sicheren Entscheidung dieser Frage glühte ich 1 gr. der fast reinen Substanz im Wasserstoffstrom mit Zinkstaub und fing das Destillat unter starker Eiskühlung auf. Ich erhielt dabei ca. 2 Tropfen reines Pyridin, wodurch die Frage nach der Constitution des

Körpers mit einem Schlage beantwortet war. Nehmen wir bis auf Weiteres die von mir berechnete Formel  $C_7H_7NO$  als die richtige an, so hätten wir in diesem Spaltungsproduct des Eiweiss ein Dihydrooxypyridin vor uns. Es ist damit zum ersten Male der Nachweis geliefert, dass in die Constitution des Eiweissmolecüls auch der Pyridinring eintritt. Auf die wichtige theoretische Bedeutung dieses Nachweises, z. B. mit Bezug auf die Bildung der meisten Alkaloide, die ja zum grössten Theile Pyridinderivate sind, aus Eiweiss, brauche ich hier wohl nicht weiter hinzuweisen.

Die grössten Schwierigkeiten stellten sich der Untersuchung der öligen Säure ( $C_7$ ) entgegen, die identisch ist mit der ursprünglich aus Amyloid erhaltenen (s. o.). Sie ist, wie schon erwähnt, in Wasser leicht löslich, in Alkohol unlöslich. In wässriger Lösung dreht sie schwach links, in stark salzsaurer Lösung sehr stark rechts. Da es mir in keiner Weise gelang, sie krystallisirt zu erhalten und da ich vorläufig keine Anzeichen dafür hatte, dass ein einheitlicher und reiner Körper vorlag, so stellte ich zunächst wieder daraus das Kupfersalz dar. 40 gr. der Säure, die ich in einem Spaltungsversuch aus 325 gr. Casein gewonnen hatte und die durch mehrfach wiederholtes Auflösen in Wasser und Ausfällen durch Alkohol gereinigt waren, wurden in etwa 2 Ltr. Wasser gelöst, frisch gefälltes Kupferoxydhydrat eingetragen und gekocht, bis sich Nichts mehr löste, und das tief dunkelblaue Filtrat zu einem dicken Syrup eingedampft, aus dem Nichts auskrystallisirte. Darauf mit Alkohol übergossen, wird es bis zum nächsten Tage fest; man erhielt 35 gr. trockenes Kupfersalz; einige Gramm liessen sich noch aus dem eingedampften und wiederum mit Alkohol übergossenen Filtrat gewinnen. Ich krystallisirte nun das Kupfersalz aus Phenol und Alkohol um. Die 35 gr. wurden in  $\frac{1}{2}$  Ltr. conc. flüssigen Phenols heiss gelöst und mit 1 Ltr. Alkohol absol. versetzt. Der zunächst flüssige Bodensatz wird bald fest, krystallinisch, er wog 20 gr. Aus der Mutterlauge lässt sich die Substanz als solche wiedergewinnen, wenn man sie mit sehr viel Wasser

verrührt, in welches das Kupfersalz übergeht, während fast das ganze Phenol, etwas roth gefärbt, ausfällt. Durch die wässrig-alkoholische, phenolhaltige Lösung wird  $H_2S$  geleitet und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand erstarrt krystallinisch von ausgeschiedenem Phenol. Er wird mit Alkohol übergossen, in dem sich das Phenol löst, während die ölige Säure zurückbleibt. Sie wurde nach gründlichem Abwaschen mit Alkohol in wenig Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt, das ausgeschiedene braune Oel wiederum in Wasser gelöst, mit Thierkohle entfärbt, das farblose Filtrat nochmals mit Alkohol gefällt; es scheidet sich ein farbloses Oel ab, das nach dem Uebergiessen mit frischem Alkohol lackartig fest wird und selbst nach monatelangem Stehen nicht krystallisirt.

Die 20 gr. des krystallinischen Kupfersalzes wurden in 1 Ltr. Wasser gelöst und fractionirt mit Alkohol gefällt, der erste Zusatz geschah bis zur eben beginnenden bleibenden Trübung. Bis zum nächsten Tage schieden sich am Glase festhaftende, etwa 1 mm. grosse Krystallwärzchen ab, die mikroskopisch aus sternförmig dicht verästelten, langen, feinen Nadeln bestanden; daneben hatte sich eine Menge braungefärbter Verunreinigungen ausgeschieden. Eine gleiche Krystallausscheidung erhielt ich, als ich das Filtrat nochmals mit Alkohol bis zur beginnenden bleibenden Trübung versetzte. Die Krystalle wurden aus kochendem Wasser, in dem sie sich jetzt schwer lösten, umkrystallisirt, schieden sich nach dem Abkühlen als lange, äusserst feine, garbenförmig nach Art des Tyrosins gelagerte Nadeln aus. Nach nochmaligem Umkrystallisiren erhielt ich im Ganzen 1 gr. davon. Ihr Aussehen erinnerte an dasjenige des asparaginsäuren Kupfers, wie es von Hofmeister (Liebig's Annal., Bd. 189, S. 20) beschrieben wird. Diese Vermuthung wurde durch folgende Analysen bestätigt:

1. 0,2685 gr. des lufttrockenen Salzes gaben 0,0772 Cu O = 0,0615 Cu = 22,9 %.

Das lufttrockene Salz  $C_4 H_5 Cu NO_4 + 4\frac{1}{2} H_2 O$  verl. Cu = 22,9 %.

2. 0,1878 gr. gaben 8,9 cbcm. N bei 13° und 754 mm. B.

N = 0,01043436 = 5,5 %; obige Formel verl. N = 5,1 %.

3. 0,1708 gr. des exsiccatorrockenen Salzes gaben 0,0545 CuO = 0,04346 Cu = 25,4 %.

Das exsiccatorrockene Salz  $C_4H_5CuNO_4 + 3H_2O$  verl. Cu = 25,4 %.

Das charakteristische Aussehen der Krystalle, ihre Schwerlöslichkeit in Wasser und die ausgeführten Analysen beweisen, dass es sich asparaginsaures Kupfer handelt. Es ist also der öligen Säure etwas Asparaginsäure beigemischt, allerdings in anscheinend sehr geringen Mengen. Auch die Leucinfractionen enthalten noch etwas Asparaginsäure, die man in ihnen nachweisen kann, wenn man die beim Umkrystallisiren des Leucins erhaltenen Mutterlaugen nach den Angaben von Hlasiwetz und Habermann mit basisch essigs. Blei fällt, den Niederschlag mit  $H_2S$  zerlegt, das Filtrat einengt und mit essigs. Kupfer versetzt. Es scheidet sich dann nach einiger Zeit asparaginsaures Kupfer aus. Wie gross die bei der vorliegenden Spaltung im Ganzen gebildete Asparaginsäuremenge ist, habe ich bisher noch nicht bestimmt.

Das wässrig-alkoholische Filtrat von dem asparaginsäuren Kupfer, welches noch das leichtlösliche Kupfersalz der öligen Säure enthielt, wurde nach Abgiessen von einer harzigen Fraction, die durch weiteren geringen Alkoholzusatz ausgefällt war, mit einem Ueberschuss von Alkohol versetzt; nach einigem Stehen scheiden sich mikroskopisch kleine, kuglige Krystallaggregate mit radiärer Streifung aus. Die abfiltrirten und lufttrockenen blassblauen Krystalle wiegen 6 gr. Sie sind sehr leicht in Wasser löslich. Sie werden in 100 ccm. Wasser gelöst, filtrirt, mit der gleichen Menge Alkohol versetzt, wobei noch keine Trübung eintritt. Bis zum nächsten Tage scheidet sich ein Krystallbrei aus, der aus mikroskopisch kleinen Kugeln ohne deutliche Streifung besteht. Ihre Menge betrug 1,5 gr.

1. 0,2521 gr., bei 105—110° getrocknet, gaben 0,2428 gr. Verl. = 0,0093 = 3,7 %  $H_2O$ .

0,2428 gaben 0,1056  $H_2O$  = 0,01173 H = 4,8 % und 0,2260  $CO_2$  = 0,06164 C = 25,4 %.

2. 0,2807 gr., bei 105—110° getrocknet, gaben 0,2678. Verl. = 0,0129 = 4,6 %  $H_2O$ .

0,2678 gaben N = 29,3 ccm. bei  $t = 10,5^\circ$  und Ba = 761 mm. N = 0,03506038 = 13,1 %.

3. 0,3582 gr., bei 105–110° getrocknet, gaben 0,3399. Verl. = 0,0183  
= 5,1%  $H_2O$ .

0,3399 gaben 0,0818  $CuO$  = 0,06523  $Cu$  = 19,2%.

Daraus berechnet sich die Formel  $C_7H_{16}N_3O_8Cu + H_2O$ ,  
welche verlangt  $H_2O = 5,1\%$  und vom wasserfreien Salz:

Verl.	Gef.
C = 25,2%	25,4%
H = 4,8 %	4,8 %
N = 12,6 %	13,1 %
Cu = 18,9 %	19,2 %

Die freie Säure könnte danach die Zusammensetzung  $C_7H_{16}N_3O_8$  haben, vorausgesetzt, dass es sich um das normale Kupfersalz handelt. Was das für eine Säure ist und ob nicht doch noch ein Gemenge vorliegt, das zu entscheiden muss weiteren Versuchen vorbehalten bleiben, die schon im Gange sind. So viel scheint mir schon jetzt sicher zu sein, dass Glutaminsäure, das Hauptspaltungsproduct des Eiweiss beim Kochen mit Salzsäure und Zinnchlorür nach Hlasiwetz und Habermann, darin nicht enthalten ist. Die ölige Säure löst sich leicht in conc. Salzsäure und ich bekam niemals dabei eine Abscheidung der in Salzsäure schwerlöslichen salzsauren Glutaminsäure. Sie scheint sich nach Allem bei diesem Spaltungsversuch überhaupt nicht gebildet zu haben<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Anmerkung während der Correctur. Obige Sätze kann ich nicht in vollem Umfange aufrecht erhalten, da es mir bei weiteren Reinigungsversuchen der öligen Säure, über die später noch genauer berichtet werden soll, doch gelungen ist, in ihr ganz geringe Mengen Glutaminsäure nachzuweisen. Als ich nämlich 140 gr. der von verschiedenen Verunreinigungen, hauptsächlich anorganischer Natur, befreiten Säure in einem grossen Ueberschuss von Salzsäure löste, zu einem mässig dicken Syrup eindampfte und 8 Tage stehen liess, bildete sich allmählig ein geringer Bodensatz, der aus langen Nadeln bestand. Er wurde durch Glaswolle abfiltrirt, mit reiner rauchender Salzsäure ausgewaschen und auf einer Thonplatte abgesogen. Die jetzt fast farblose Krystallmasse, welche 0,5 gr. wog, löste sich sehr leicht in Wasser; die Lösung wurde noch durch etwas Thierkohle entfärbt und das farblose Filtrat auf etwa 3 cbcm. eingedampft. Es wurde fest, bestand mikroskopisch aus grossen unregelmässigen Tafeln. Sie wurden nochmals in Wasser gelöst, die Salzsäure durch  $Ag_2O$  entfernt, das Filtrat mit  $H_2S$  entsilbert und das farblose Filtrat eingedampft. Es scheiden sich makroskopisch grosse,

Es liesse sich vielleicht noch der Versuch machen, ob sie aus der öligen Säure etwa secundär durch Kochen mit Salzsäure und Zinnchlorür abgespalten wird, was demnächst ausgeführt werden soll.

Die beiden Fractionen E<sub>1</sub> und E<sub>2</sub> im Gesamtgewicht von  $244 + 109 = 353$  gr. aus 1000 gr. Casein habe ich bisher noch nicht untersucht. Dieselben müssten neben Leucin und etwaigen anderen Substanzen — es scheint z. B. eine in Alkohol leicht lösliche Säure darin zu sein. — die Drechsel'schen Basen enthalten, auf deren Vorhandensein ich sie demnächst zu prüfen gedenke. Das Gleiche soll auch bezüglich schwefelhaltiger Producte (Cystin, Cystein, Thiomilchsäure etc.) erfolgen.

Schliesslich erwähne ich noch, dass ich in einem besonderen Versuch, der mit reinem Pepton angestellt wurde, die Ammoniakmenge bestimmte, die beim Kochen mit der conc. Salzsäure abgespalten wird. Das Ammoniak wurde nach dem Uebersättigen mit NaOH abdestillirt und in verd. Salzsäure aufgefangen. Aus 100 gr. Pepton erhielt ich 6 gr. des salzsauren Salzes, das aus reinem Salmiak, ohne Beimengung substituirtter Aminbasen, bestand, wie eine Bestimmung des aus ihm dargestellten Platinsalzes ergab.

0,1666 gr. gaben 0,0738 Pt = 44,3 %.

Platinsalmiak verl. Pt = 44,1 %.

Das Pepton lieferte also 2 % Ammoniak.

farblose, harte Tetraeder und Tafeln aus, die nach 3maligem Umkrystallisiren nach Art des salpetersauren Harnstoffs übereinandergeschobene Tafeln bilden, die bei 202° schmelzen (Glutaminsäure schmilzt bei 202,5°), sauer reagiren, N-haltig sind, nicht sublimiren. Es sind im Ganzen 0,25 gr., die zu einer N-Bestimmung nach Dumas benutzt werden.

0,1754 gr. (bei 105° getrocknet, wobei kein Wasserverlust eintrat) gab 14,7 cbcm. N bei  $t = 13^\circ$  und  $Ba = 758$  mm.  $N = 0,01732689 = 9,8\%$ . Glutaminsäure verl. N = 9,5%.

Es handelt sich also um Glutaminsäure. Eine geringe Menge der Substanz, in einigen Tropfen Salzsäure gelöst, schied nach dem Abkühlen grosse, vierseitige Prismen von dem charakteristischen Aussehen der salzsauren Glutaminsäure aus.