

## Über Bildung von Basen aus Eiweiss.

Von  
Prof. Dr. **Rudolf Cohn.**

(Labor. f. exper. Pharmacologie und med. Chemie. Königsberg i. Pr.)

(Der Redaction zugegangen am 2. März 1900.)

Im XXII. Bande der Zeitschr. f. physiol. Chemie, S. 153 bis 175 habe ich über eine quantitative Eiweisspaltung durch Salzsäure berichtet und dabei eines in geringen Mengen auftretenden Spaltungsproduktes Erwähnung gethan, das ich als ein Pyridinderivat glaubte ansprechen zu dürfen. Es handelte sich um einen in schönen Nadeln vom Schmelzpunkt  $295^{\circ}$  krystallisirenden, äusserst leicht und charakteristisch sublimirenden Körper, der in Wasser sehr schwer, in heissem Alkohol leicht löslich war, von conc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , besonders beim Erwärmen, mit Leichtigkeit gelöst wurde und aus der Lösung auf Wasserzusatz wieder unverändert ausfiel, eine Eigenschaft, die sich als sehr geeignet erwies, um ihn von fremden Beimengungen, vor Allem Leucin, zu trennen. Auch sonst war er sehr widerstandsfähig gegen starke Säuren und Alkalien. Bei der Zinkstaubdestillation lieferte er anscheinend etwas Pyridin und aus den Analysen berechnete ich als wahrscheinliche Formel  $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}$ .

Kurz nach meiner Veröffentlichung erhielt ich von Herrn Prof. Ritthausen hierselbst und von Herrn Prof. Erlenmeyer in Aschaffenburg Zuschriften, in denen sie mich auf die grosse Ähnlichkeit meines Pyridinderivates mit der sog. Bopp'schen Substanz, dem späteren Leucinimid der Autoren, hinwiesen und

eine Durchsicht der Originalliteratur<sup>1)</sup> sowohl, wie auch ein im Ritthausen'schen Laboratorium von mir vorgenommener Vergleich meiner Substanz mit etwas sog. Leucinimids, das von viele Jahre zurückliegenden Eiweisspaltungsversuchen her noch aufbewahrt war, überzeugten mich, dass beide Körper wohl in der That als identisch anzusehen seien.

Nun habe ich zunächst bei der Untersuchung gar nicht auf den Gedanken kommen können, dass es sich bei dem Körper etwa um Leucinimid handelte, denn meine Analysen stimmten nur auf einen Körper mit 5 C-Atomen, ausserdem aber wird das Leucinimid als Spaltungsprodukt der Eiweisskörper in den gebräuchlichen Lehrbüchern entweder gar nicht erwähnt, oder nur höchst ungenau beschrieben, speciell ist nirgends, auch nicht einmal in den Originalarbeiten, ein Schmelzpunkt angegeben, nach dem ich mich hätte richten können.

Es war nun aber weiter die Frage, ist denn der von den früheren Autoren als Leucinimid bezeichnete Körper überhaupt Leucinimid? Selbst die neuste Veröffentlichung von Ritthausen<sup>2)</sup> lässt dies noch im Unklaren. Ritthausen machte nochmals eine Analyse des von früher her in seinem Besitze befindlichen sog. Leucinimids. Dasselbe scheint von ihm nicht weiter gereinigt zu sein, speciell nicht durch conc.  $H_2SO_4$ , wie durchaus erforderlich ist, wenigstens werden darüber keine Angaben gemacht. Die Analyse, die Ritthausen anführt, ergiebt für

1) Bopp, F., Einiges über Albumin, Casein und Fibrin. *Annal.* Bd. 69. S. 16.

Erlenmeyer und Schöffler, *Krit. Zeitschr. f. Chem.* 1859. 333.

Hesse, O., Beiträge zur Kenntniss der Fäulnissproducte von Bierhefe. *Journ. f. pract. Chem.* Bd. 70. S. 34.

Hesse, O. und H. Limpricht, Notiz über das sogenannte Leucinsäurenitril. *Annal.* Bd. 116. S. 201.

Erlenmeyer, F., Ueber das sog. Leucinsäurenitril und die Aminosäuren der Glycolsäurereihe. *Annal.* Bd. 119. S. 17.

Hlasiwetz und Habermann, Ueber die Proteinstoffe. Erste Abhandlung. *Annal.* Bd. 159. S. 328.

Ritthausen, H., Die Eiweisskörper der Getreidearten, Hülsenfrüchte und Oelsamen. Bonn, 1872. S. 222.

2) *Berl. Ber.* XXIX. 2109—2110.

die Formel des Leucinimids  $C_6H_{11}NO$  über 1% C zu wenig, für N 0,6% zu viel. Am Schlusse seiner kurzen Mittheilung enthält sich Ritthausen leider eines jeden Urtheils über den fraglichen Gegenstand.

Bei dieser Sachlage erschien es mir daher geboten, in eine erneute Untersuchung über die Natur der fraglichen Substanz einzutreten, und will ich in Folgendem über die zu dem Zwecke angestellten Versuche berichten.

Zunächst ging ich an die Darstellung von wirklichem Leucinimid, um seine Eigenschaften mit denen des Pyridinderivates vergleichen zu können. Ein Leucinimid ist von Kohler<sup>1)</sup> aus synthetischem Leucin, der aus Valeraldehyd-Ammoniak, Blausäure und Salzsäure nach Limpricht gewonnenen  $\alpha$ -Amidoisobutyllessigsäure, durch Erhitzen im trocknen Salzsäurestrom auf  $220 - 230^\circ$  dargestellt worden. Da es sich aber hier nur darum handeln konnte, dass das von mir als Pyridinderivat angesprochene fragliche Leucinimid, wenn es solches sein sollte, sich höchstwahrscheinlich nur aus dem bei der Eiweisspaltung durch Salzsäure entstandenen Leucin gebildet haben konnte, so durfte ich zur Darstellung des Leucinimids nur solches Leucin und nicht irgend ein beliebiges synthetisches nehmen.

7 g reines Leucin (dasselbe war durch Caseinspaltung mittelst HCl erhalten, vielfach umkrystallisirt, farblos, zur Entfernung etwaiger Spuren des Pyridinderivates noch 2 Mal mit Alkohol ausgekocht, schmolz bei  $273^\circ$  im zugeschmolzenen Röhrchen) werden nach den von Kohler für die Darstellung von Leucinimid aus synthetischem Leucin gemachten Angaben im Oelbad in einem trocknen Kolben unter Durchleiten eines langsamen Stromes trockner Salzsäure allmählich bis  $220 - 230^\circ$  erhitzt und bei der Temperatur gehalten, bis es vollständig geschmolzen war. Das Schmelzen begann bei  $215^\circ$  und ging ziemlich langsam von Statten unter Bräunung und Aufschäumen und reichlichem Uebergang von amyalkoholähnlich riechenden

<sup>1)</sup> Kohler, A., Ueber eine neue Verwandlung des Leucins. *Annal.* Bd. 134. S. 367.

Tröpfchen durch das Abzugsrohr. Nach dem Abkühlen wurde der strahlig-krystallinisch erstarrte Rückstand 2 Mal mit etwa 50 cem. 96<sup>o</sup>/eigen Alkohols ausgekocht, worin sich noch nicht Alles gelöst hatte. Die hellbraun gefärbte Lösung roch stark nach Amylalkohol. Beim Abkühlen schied sich nichts aus, nach dem Verjagen des Alkohols blieb ein mit wenig Harz vermengter krystallinischer Rückstand, der aus Nadeln bestand (A). Der durch den kochenden Alkohol noch nicht gelöste Rückstand wurde mit etwa 100 cem. Wasser längere Zeit ausgekocht, es löste sich darin nur ein Theil, beim Abkühlen schied sich aus der Lösung (B) bis zum nächsten Tage nichts aus. Der in Wasser unlösliche Rückstand löste sich jetzt leicht in wenig kochendem Alkohol, aus dem sich beim Abkühlen breite, verästelte Nadeln ausschieden, die abgesogen und mit wenig Alkohol ausgewaschen wurden. Sie sind schneeweiss, sublimiren ohne Rückstand in wolligen Flocken, schmelzen bei 260<sup>o</sup>.

Der Rückstand A wird mit einem Theil der wässrigen Lösung B ausgekocht, die ganze Lösung B auf 50 cem. eingedampft. Es scheiden sich wenig amorphe Lamellen aus, die sich nach dem Umkrystallisiren aus Alkohol als identisch mit den eben erwähnten Nadeln erwiesen. Das wässrige Filtrat erstarrt nach dem Eindampfen zu einem Brei von spitzen Blättchen. Durch Behandlung mit Ag<sub>2</sub>O wurden daraus 4<sup>1</sup>/<sub>2</sub> g Leucin zurückgewonnen.

Der aus Nadeln bestehende Alkoholrückstand A, welcher 1 g wog, wurde 3 Mal aus Alkohol umkrystallisirt, das erste Mal unter Entfärbung mit etwas Thierkohle. Man erhält lange, stark gebogene, ährenförmig gruppirte, feine und breitere Nadeln, deren Schmelzpunkt, der sich nach dem Umkrystallisiren nicht mehr änderte, bei 262<sup>o</sup> lag. Sie sublimiren sehr leicht in wolligen Flocken, ähnlich dem Pyridinderivat. Von diesem unterscheiden sie sich durch den um 33<sup>o</sup> niedrigeren Schmelzpunkt, leichtere Löslichkeit in Alkohol, anscheinend noch schwerere in Wasser, leichtere Löslichkeit in Aether. Trocken zerrieben zeigt die Substanz electrische Eigenschaften.

N. Bestimmung.

0.1826 g (hatte bei 105° nicht abgenommen) gab 19.5 ccm. N bei 12° C. und 754 mm. Bar.  $N = 0.02296320 = 12.57\%$ .

Leucinimid,  $C_6H_{11}NO$ , verl. N = 12.39%.

Es handelt sich hier also bestimmt um Leucinimid. Dasselbe zeigt aber durchaus andere Eigenschaften, als das Pyridinderivat, wengleich eine gewisse Aehnlichkeit der beiden Körper nicht zu verkennen ist. Das Pyridinderivat ist also entweder kein Leucinimid, oder es ist noch mit irgend etwas verunreinigt resp. chemisch verbunden, eine Annahme, für die keine Veranlassung vorliegt, oder aber es ist ein Isomeres des aus Leucin künstlich dargestellten Leucinimids. In diesem Falle müsste man zwei isomere Leucine im Eiweissmolekül annehmen, von denen nur das eine, in geringeren Mengen vorhandene, schon bei der Eiweisspaltung durch Salzsäure in Leucinimid übergeht.

Der Rest des schon 3 Mal aus Alkohol umkrystallisirten, zu obiger Analyse benutzten Leucinimids wurde in gleicher Weise, wie ich es beim Pyridinderivat gethan, in conc.  $H_2SO_4$  gelöst, durch Wasserzusatz wieder ausgefällt, abfiltrirt, ausgewaschen, getrocknet und aus Alkohol umkrystallisirt. Es schieden sich gerade, lange, feine und breite Nadeln aus, die wiederum bei 262° schmolzen.

Um die Natur des Körpers  $C_5H_7NO$  als eines Pyridinderivates sicher zu stellen, wollte ich nochmals eine Reduction einer grösseren Menge durch Zinkstaub vornehmen. Zu dem Zwecke unterwarf ich 3 g der vollständig gereinigten Substanz der Zinkstaubdestillation im H-Strome. Dieselbe verunglückte indess, da sich das Rohr durch die dicken Sublimationswolken stets verstopfte und die gebildeten Dämpfe rückwärts in die zum Trocknen des H benutzte  $H_2SO_4$  destillirten. Es war jedoch nach Unterbrechung der Destillation Pyridin oder ein ihm jedenfalls sehr nahe stehender Körper durch den Geruch im ganzen Zimmer deutlich nachweisbar. Durch Auskochen des Zinkstaubs mit Alkohol liess sich noch 0,8 g der Substanz zurückgewinnen, an der deutlich der Pyridingeruch haftete.

Da ich mir genügendes Material zu weiteren Reductions-

versuchen mittelst Zinkstaubdestillation nur sehr schwer hätte beschaffen können, denn die Ausbeute an reiner Substanz betrug nur 1—2 g für 1 Kilo Casein und erforderte die Arbeit von 1—2 Monaten, so versuchte ich jetzt durch eine Reduction auf nassem Wege mittelst metallischen Natriums in alkoholischer Lösung zum Ziele zu gelangen. Zu dem Zwecke löste ich 2 g des fast absolut reinen Pyridinderivates (dasselbe war ein Mal aus Alkohol, ein Mal aus conc.  $H_2SO_4$  und dann nochmals aus Alkohol umkrystallisirt, fast schneeweiss) in 250 cem. absoluten Alkohols in einem geräumigen Kolben mit aufgesetztem weiten Liebig-Kühler auf dem Wasserbade und warf in die klare kochende Lösung kleine Stückchen metallisches Na durch den Kühler hindurch, bis keine Einwirkung mehr stattfand. Nach Zufügung von so viel absolutem Alkohol, dass sich nach einigem Kochen alles Na löste, wurde mit der gleichen Menge Wasser verdünnt. Es fiel dabei nichts aus, während, wenn man in einer Probe noch etwas unverändertes Pyridinderivat auflöste, dieses auf Wasserzusatz sofort ausgefällt wurde. Es war also jedenfalls eine Veränderung des Pyridinderivates eingetreten. Am nächsten Tage wurde der gesammte Alkohol aus dem Wasserbade abdestillirt. Das Destillat reagirte nur äusserst schwach alkalisch, hinterliess nach dem Ansäuern mit HCl und Abdampfen zur Trockne nur einen minimalen, bräunlichen Rückstand, der einen intensiven tabakähnlichen Geruch zeigte. Zu einer Untersuchung reichte die Menge nicht aus.

Die das Reductionsprodukt enthaltende, wässrige alkalische Lösung wurde nun 2 Mal mit Aether extrahirt. Eine kleine Probe des Aetherauszugs hinterliess, im Schälchen verdunstet, einen stark alkalischen Rückstand, dessen Geruch stark basisch, piperidinähnlich war. Daneben war aber auch deutlicher Geruch nach Acetamid vorhanden. Der Rückstand war nicht krystallinisch. Als zu dem mikroskopischen Präparat vom Rande her etwas HCl zugesetzt wurde, schossen nach einiger Zeit lange Nadeln in Rosettenform an. Der kleine Aetherrückstand wurde darauf mit Wasser verrührt, ein Theil auf dem Uhrglas mit einem Tropfen HCl und einem Tropfen  $PtCl_4$  versetzt. Sofort schied sich ein krystallinisches Pt-Salz aus, mikroskopische

Blättchen. Pikrinsäure lieferte mit dem übrigen Rest nur eine amorphe Fällung.

Nach diesen Vorproben wurden die beiden vereinigten Aetherauszüge bis auf ca. 30 ccm. abdestillirt. Bis zum nächsten Tage haben sich geringe Mengen Krystalle, anscheinend unveränderte Substanz, abgeschieden, von denen abfiltrirt wurde. Hierauf wird der Aether fast ganz abdestillirt. Es bleibt ein hellbrauner Syrup von eigenartigem Geruch, stark alkalischer Reaction. Er wird in ein kleines Becherglas gegossen und die letzten Spuren Aether langsam an der Luft verdunsten gelassen.

Die letzten, im Destillationskölbchen haften gebliebenen Reste des Aetherrückstandes werden mit etwas Wasser übergossen, die trübe gewordene Flüssigkeit mit 2 Tropfen HCl versetzt, filtrirt, mit etwas Wasser nachgewaschen und das fast klare, saure Filtrat mit alkoholischem  $\text{PtCl}_4$  versetzt. Es scheidet sich sofort ein Pt-Salz aus, mikroskopisch feine gezähnte Blättchen. Dieselben werden nach einigen Stunden abfiltrirt, mit Alkohol und Aether ausgewaschen. Das Salz ist so schwer in Alkohol und Wasser löslich, dass es sich nicht umkrystallisiren lässt.

0.1366 g (bei  $105^\circ$  getr., wobei es nur 0.0006 g verloren hatte) gaben  
0.0441 g Pt = 32.3%.  $(\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}.\text{HCl})_2\text{PtCl}_4$  verl. Pt = 32.2%.

Die Hauptmasse der Base, welche starke Nebel bildet, wenn man einen mit HCl befeuchteten Glasstab darüberhält, wurde nun mit Wasser übergossen, mit HCl bis zur bleibenden sauren Reaction versetzt, wobei eine geringe Menge harzig ungelöst blieb, und filtrirt. Von einem kleinen Theil des klaren Filtrats wurde nochmals ein Pt-Salz gemacht.

0.1545 g (bei  $105^\circ$  getr., war wasserfrei) gaben 0.0502 g Pt = 32.5%.

Der ganze Rest des Filtrats wurde auf dem Wasserbade etwas eingeengt, nochmals filtrirt und weiter eingedampft, bis an der Oberfläche Krystallbildung begann. Verfärbung trat dabei nicht ein. Das salzsaure Salz schied sich, trotzdem bis auf ein sehr kleines Volumen eingedampft war, nur in geringen Mengen aus. Es war in Wasser leicht löslich. Es wurde nun mit seiner Mutterlauge in Alkohol im Ueberschuss durch Er-

wärmen klar gelöst, filtrirt und zur heissen Lösung Aether zugesetzt, ohne dass eine Trübung eintrat. Nach 6 Stunden hatten sich allmählich aus Nadeln bestehende, farblose Krystalldrusen abgeschieden. Sie werden am nächsten Tage abfiltrirt, mit einem Gemisch aus Alkohol und Aether, zuletzt mit reinem Aether ausgewaschen, wiegen 0,1 g. Das Filtrat wird darauf mit Aether bis zur bleibenden Trübung versetzt, worauf eine zweite Krystallisation eintrat, die aus mikroskopisch kleinen spitzen Nadeln bestand, im Ganzen 0,08 g. Durch weiteren Aetherzusatz zum Filtrat erhält man nur noch eine minimale Abscheidung. Die ersten beiden Fractionen verhalten sich gleich, schmelzen noch nicht bei 300°, sublimiren ähnlich wie Leucinimid. Sie werden beide vereinigt und davon eine N-Bestimmung nach Dumas gemacht, die indes wegen eines zu spät bemerkten Fehlers im Gasabsorptionsapparat missglückte, bevor noch die Substanz verbrannt wurde. Ihr Gemenge mit CuO wurde mit viel Wasser übergossen, am nächsten Tage abfiltrirt, etwas gelöstes Cu durch H<sub>2</sub>S entfernt und das Filtrat auf 1—2 ccm. eingedampft. Der krystallinische Rückstand war jetzt auffallender Weise sowohl in heissem Wasser, wie in Alkohol sehr schwerlöslich, ein Theil ging gar nicht in Lösung; er bestand mikroskopisch aus radiär gruppirten Büscheln sehr langer, breiter Nadeln, die bei 300° noch nicht schmolzen. Die Substanz hatte sich in nicht aufzuklärender Weise verändert.

In einem zweiten Reductionsversuche wurden 1,7 g des Pyridinderivates in gleicher Weise verarbeitet. Der Aetherrückstand wurde mit Wasser und einigen Tropfen HCl bis zur schwach sauren Reaction versetzt, von dem ungelösten Harz abfiltrirt, das Filtrat eingeeengt, nochmals filtrirt und auf 1 bis 2 ccm. eingedampft, dann in Alkohol durch Erwärmen gelöst, und die klare Lösung bis zur beginnenden bleibenden Trübung mit Aether versetzt. Es scheidet sich 0,135 g des salzsauren Salzes aus. Das Filtrat gibt mit Aether nur noch eine geringe Ausscheidung. Dieselbe wird zusammen mit der letzten des vorigen Versuches abfiltrirt, die vereinigten Filtrate auf etwa 2 ccm. abdestillirt und nochmals mit Aether gefällt. Die Ausscheidung wurde abfiltrirt, nochmals in Alkohol heiss gelöst

und mit Aether gefällt. Man erhält 0,1 g, die mit den 0,135 g vereinigt werden.

0,2142 g (bei 110° getr.) gaben  $N = 19,9$  ccm., bei  $t = 10,5^\circ$  und Bar. = 772 mm.  $N = 0,02416258$  g = 11,3%  $C_6H_{13}N.HCl$  verl.  $N = 10,3\%$ .

Ob das salzsaure Salz schon hinreichend rein gewesen war, hatte nicht mit Sicherheit festgestellt werden können.

Die nach der letzten Abscheidung des salzsauren Salzes erhaltene wässerig-alkoholisch-ätherische Mutterlauge wurde vollständig abdestillirt. Es blieb ein dicker, hellbraun gefärbter Syrup, der nach mehrtägigem Stehen nicht fest wurde. Er wurde in Wasser unter Zusatz von etwas HCl gelöst, filtrirt und die Lösung vollständig mit alkoholischem  $PtCl_4$  ausgefällt. Es entstand ein reichlicher Niederschlag, kleine, unregelmässige Blättchen. Das Salz wurde abfiltrirt und mit Wasser ausgewaschen. Nach über 10maligem Auswaschen enthielt das Waschwasser noch HCl und es schien sich ein Theil des Salzes zu lösen, weshalb das Auswaschen zunächst unterbrochen wurde. Es wurde darauf 2 Mal mit je 100 ccm. Wasser ausgekocht, die Filtrate, aus denen sich nichts ausschied, auf 10 ccm. eingedampft, lieferten nur eine geringe Menge Blättchen, die zur Analyse nicht ausreichten. Von einem Theil des ausgekochten Pt-Salzes wurde eine Pt-Bestimmung gemacht.

0,2144 g gaben 0,0695 Pt = 32,4%  $(C_6H_{13}N.HCl)_2PtCl_4$  verl. Pt = 32,2%.

Der Rest des Salzes — 0,43 g — wurde in kochendem Wasser gelöst, wozu  $\frac{3}{4}$  l. erforderlich war. Beim Abkühlen schied sich aus der klaren, schwach gelblichen Lösung nichts aus. Beim Eindampfen zersetzte sie sich unter Schwarzfärbung.

Zur weiteren Durchführung des Vergleiches zwischen Pyridinderivat und Leucinimid stellte ich zunächst an einer geringen Menge des letzteren ebenfalls einen Reductionsversuch an. 1,9 g reines Leucinimid (Schmelzpunkt 262°) werden in 200 ccm. absoluten Alkohols gelöst — die Lösung vollzog sich viel leichter als die des Pyridinderivats —, mit Na reducirt, darauf mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und der Alkohol abdestillirt, die alkalische Lösung mit Aether extrahirt, die Aetherauszüge abdestillirt, der letzte Aetherrest an der Luft

verdunsten gelassen. Es bleibt ein stark alkalischer, flüssiger Rückstand. 3 Tropfen davon werden in Wasser unter Zusatz von HCl bis zur schwach sauren Reaction gelöst, filtrirt, mit wässeriger  $\text{PtCl}_4$ -Lösung versetzt. Auf Alkoholzusatz scheidet sich das Platinsalz aus.

0,0625 g (bei  $110^\circ$  getr.) gaben 0,0201 Pt = 32,2%.  
( $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N} \cdot \text{HCl}$ )<sub>3</sub> $\text{PtCl}_4$  verl. Pt = 32,2%.

Um die Eigenschaften der Base besser studiren zu können, suchte ich sie nun durch Destillation zu reinigen. Bis  $90^\circ$  gingen nur einige Tropfen, der Hauptsache nach anhaftende Spuren Aether und Feuchtigkeit, über, dann stieg das Thermometer schnell auf  $230^\circ$ , und zwischen  $240$  und  $245^\circ$  ging die Hauptmasse über. Es ist eine klare, schwach gelbliche, dicke Flüssigkeit von stark alkalischer Reaction und eigenthümlichem basischen Geruch, die nach längerem Stehen einige Krystalle, mikroskopisch grosse Tafeln, absetzte. Aus der Base (10 Tropfen) wurde in derselben Weise, wie beim Pyridinderivat angegeben, das salzsaure Salz hergestellt, dasselbe zeigte die gleichen Eigenschaften. Zu einer Analyse war die Menge zu gering.

Von dem im Siedekölbehen verbliebenen minimalen Rest der Base wird noch ein Pt-Salz gemacht.

0,1296 g (bei  $110^\circ$  getr.) gaben 0,0415 g Pt = 32,0%.

Um die aus dem Pyridinderivat durch Reduction zu gewinnende Base in grösseren Mengen zu erhalten und dann durch Destillation zu einem reinen Produkt zu gelangen, das ich bisher immer noch nicht in Händen gehabt, unterwarf ich jetzt 4,8 g desselben (es war aus conc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und dann einmal aus Alkohol umkrystallisirt, noch etwas grau gefärbt) der Reduction. Zur Lösung waren 800 cem. kochenden absoluten Alkohols erforderlich, zum Schluss wurden, um die letzten Reste des zugesetzten Na zu lösen, noch 50 cem. absoluten Alkohols zugefügt. Hierauf wurde mit der gleichen Menge Wasser versetzt, am nächsten Tage der Alkohol abdestillirt und die schwach bräunliche Lösung 3 Mal mit Aether extrahirt. Die Aetherauszüge riechen sehr stark nach Acetamid, was beim Leucinimid nicht beobachtet wurde. Der Aether wurde

nach dem Klären und Filtriren abdestillirt, der letzte Rest im Becherglas an der Luft verdunsten gelassen. Der Rückstand, in dem sich noch geringe Mengen unveränderter Substanz abgeschieden hatten, wog am nächsten Tage 2,2 g. Er wird aus einem ganz kleinen Siedekölbchen abdestillirt. Nachdem der erste Antheil unter  $100^{\circ}$  übergegangen, stieg das Thermometer schnell über  $235^{\circ}$ , und die Hauptmasse ging bei  $245$  bis  $250^{\circ}$  über. Sie bildet eine schwach gelblich gefärbte, dicke Flüssigkeit von stark basischem Geruch, ähnlich demjenigen der Leucinimidbase, von der die Substanz auch in ihren sonstigen Eigenschaften nicht zu unterscheiden war.

Da die Ausbeute an der Base aus dem Pyridinderivat keine quantitative war (kaum 50%), so suchte ich eventuell vorhandene Nebenprodukte zu gewinnen. Die nach dem dreimaligen Ausschütteln mit Aether zurückbleibende wässrige, stark alkalische Flüssigkeit wurde mit HCl unter Vermeidung eines grösseren Ueberschusses angesäuert. Nach dem Abkühlen und Stehen über Nacht schieden sich auf der Oberfläche schwimmende, kleine, farblose Krystallwärtchen aus, die in Aether löslich sind. Sie bilden unterm Mikroskop Aggregate von gezähnten Blättchen. Die ganze, schwach nach Buttersäure riechende Flüssigkeit, an deren Boden sich noch eine dunkelbraune, amorphe Masse abgeschieden, die nicht in Aether löslich ist, wird 3 Mal mit Aether extrahirt, die Aetherauszüge abdestillirt, der letzte Rest im Becherglase an der Luft verdunsten gelassen, dann im Exsiccator getrocknet. In einem Vorversuch hatte ich mich an einer kleinen Probe des Aetherextractes überzeugt, dass sein Rückstand krystallisirte, sich in verdünnter Natronlauge leicht löste: aus der Lösung fiel beim Ansäuern mit HCl die Substanz in sehr kleinen, mikroskopischen Krystallen aus, die sich bei weiterem Zusatz von HCl wieder auflösten. Der gesammte Aetherrückstand wiegt nach mehrtägigem Stehen im Exsiccator 0,65 g. Er wird in verdünnter NaOH heiss gelöst, das gelbliche Filtrat vorsichtig mit verdünnter HCl versetzt, so lange noch etwas ausfiel. Die Krystalle bestanden unterm Mikroskop aus garbenförmigen Büscheln kleiner Nadeln, daneben zeigte sich noch eine staub-

förmige Trübung. Am nächsten Tage wurden die Krystalle von der noch trüben Mutterlauge, welche auf HCl-Zusatz nur noch eine minimale Ausscheidung gab, abfiltrirt und mehrmals mit kaltem Wasser ausgewaschen. Sie sind schwach gelblich gefärbt, lösen sich sehr schwer in kochendem Wasser, schmelzen trocken erhitzt zu öligen Tropfen, die bald wieder krystallinisch erstarren. Sie wiegen 0,2 g. Aus kochendem Wasser, von dem verhältnissmässig erhebliche Mengen zur Lösung erforderlich waren, scheiden sie sich in farblosen Blättchen aus, unter dem Mikroskop grosse, dünne, rechteckige, übereinandergeschobene Tafeln, die bei  $128^{\circ}$  schmelzen und N-haltig sind. Für eine Analyse war die Menge, 0,08 g, zu gering. Nach ihren Eigenschaften handelt es sich möglicher Weise um eine Amidosäure.

Nach Entfernung dieser Säure durch Ausschüttelung mit Aether wurde, um das immer noch bestehende Deficit gegen die angewandten 4,8 g des Pyridinderivates aufzudecken, die schwach salzsaure wässrige Lösung eingedampft — es ging dabei ein Theil verloren —, von den zunächst ausgeschiedenen grossen Kochsalzmengen abfiltrirt, mit Alkohol nachgewaschen, das Filtrat bis fast zur Trockne verdampft, der Rückstand mit 50 cm. Alkohol verrieben, von dem Kochsalz abfiltrirt, die alkoholische Lösung zur Trockne verdampft und durch häufig wiederholte Aufnahme mit kaltem absoluten Alkohol und Abdampfen zur Trockne fast die gesammte NaCl-Menge entfernt. Man erhielt zuletzt einen Rückstand, der sich in Wasser löste, mit  $\text{PtCl}_4$  und mit Jodwismuthjodkalium Fällungen gab. Er enthielt noch etwas von der Base (0,05 g), nach deren Entfernung ein fast Cl-freier Rückstand gewonnen wurde, der einige dg wog und nicht zum Krystallisiren zu bringen war. Eine Entscheidung über die Natur desselben konnte nicht herbeigeführt werden.

Da mein Vorrath an dem Pyridinderivat zu Ende ging und die Darstellung desselben in grösseren Mengen mit erheblichen Schwierigkeiten verknüpft war, so beschränkte ich mich darauf, grössere Mengen der Base aus dem leichter zu beschaffenden Leucinimid darzustellen, um zunächst die Eigen-

schaften und Zusammensetzung derselben genau festzustellen. Zu dem Zwecke reducirte ich in einem ersten Versuche 7,1 g reines Leucinimid in 400 cem. absoluten Alkohols in der gewöhnlichen Weise. Nach Abdestilliren des Alkohols wurde die wässerige alkalische Lösung 3 Mal mit Aether extrahirt, der Aetherrückstand wog exsiccator trocken 5,1 g. Er wurde nun nochmals in wenig Aether gelöst, von etwas ausgeschiedenem unveränderten Leucinimid abfiltrirt, das klare Filtrat im Siedekölbchen erst auf dem Wasserbade von Aether möglichst befreit, dann der fractionirten Destillation unterworfen. Nachdem bis 90° etwa 1 cem. übergegangen war, stieg das Thermometer bis 225° und jetzt destillirte eine dicke Flüssigkeit über, während das Thermometer allmählich bis 298° stieg, ohne constant zu werden. Ein kleiner Rest blieb im Siedekölbchen zurück. Das gelbliche, dickflüssige Destillat wog 3 g. Die Base hat einen äusserst bitteren, brennenden, ätzenden Geschmack, der dem concentrirten KOH an die Seite zu stellen war. Sie wurde nach einigem Stehen zum Theil krystallinisch, bildete nach mehreren Tagen einen dicken Krystallbrei. Es wurde nun versucht, durch nochmalige Destillation zu einer Fraction von constantem Siedepunkt zu gelangen, indessen war dies nicht zu erreichen, das Meiste ging zwar bei 250 bis 260° über, aber das Thermometer stieg doch ganz allmählich bis 275°. Das gewonnene Destillat wog 2,2 g. Dasselbe war nach einigen Tagen von Krystallen erfüllt, dicke, breite Nadeln. Das Glas liess sich umkehren, ohne dass die Masse sich bewegte. Es wurde nun die ganze Menge in das salzsaure Salz übergeführt, ein Theil wurde durch Auskrystallisiren aus wässriger Lösung, das Uebrige durch Fällung mit Alkohol und Aether gewonnen. Ich erhielt jedoch nur 0,6 g, der grössere Rest blieb in der Mutterlauge gelöst, die beim Verdunsten einen allmählich krystallisirenden Rückstand hinterliess, aus dem nach nochmaligem Lösen in Alkohol und Fällen mit Aether nichts auskrystallisirte. Das salzsaure Salz schmolz noch nicht bei 300°.

In ähnlicher Weise wie bei dem Pyridinderivat gewann

ich auch hier neben der Base noch eine Säure von den Eigenschaften einer Amidosäure, die N-haltig, in Wasser sehr schwer löslich war: es schieden sich nach dem Umkrystallisiren aus kochendem Wasser feine, unregelmässige Tafeln und Blättchen ab, die bei 126° schmolzen. Ob beide Säuren identisch waren, konnte ich nicht entscheiden, zu einer Analyse war nicht genügendes Material vorhanden.

Bei einer erneuten Darstellung von Leucinimid erwies es sich, behufs Erzielung einer grösseren Ausbeute, die bisher immer noch sehr viel zu wünschen übrig liess, nach mehrfachem Ausprobiren am besten, das Leucin unter Durchleitung trockener HCl bis 235—240° im Oelbade zu erhitzen und etwa 15 Minuten bei dieser Temperatur zu lassen. Es ging von 220° ab etwas Wasser und geringe Mengen einer scharf riechenden, an Amylalkohol erinnernden Flüssigkeit über. Im Hals des Kolbens sammelte sich ein reichliches Sublimat an. Der Kolbeninhalt wurde nach dem Abkühlen mit mehreren Portionen Alkohol auf dem Wasserbade ausgekocht, es musste sehr anhaltend gekocht werden, um Alles in Lösung zu bringen. Bis zum nächsten Tage hatte sich aus den vereinigten Lösungen ein reichlicher Krystallbrei ausgeschieden, der schon aus fast reinem Leucinimid bestand. Dasselbe wurde abfiltrirt und mit Alkohol ausgewaschen. Das Filtrat lieferte nach dem Einengen noch eine zweite Abscheidung, deren Filtrat nur noch Schmierer lieferte, die zwar noch Leucinimid enthielten, dasselbe war aber nur schwer zu isoliren. Es wurden stets Portionen von 10—15 g Leucin gesondert verarbeitet, weil bei Anwendung grösserer Mengen Leucin auf einmal die Ausbeute erheblich verschlechtert zu werden schien. Aus 46 g Leucin erhielt ich ca. 15 g Leucinimid, die nach Entfernung von etwas beigemengtem salzsauren Leucin durch Auskochen mit Wasser 14 g reines Leucinimid lieferten. Weitere 90 g Leucin, in Portionen zu 15 g verarbeitet, ergaben 23 g Leucinimid. Die Gesamtausbeute betrug also noch nicht 30%. Sämmtliche alkoholischen letzten Mutterlaugen wurden vereinigt, zum Syrup eingedampft und zum Krystallisiren stehen

gelassen. Nach vielen Monaten hatte erst eine geringe Abscheidung von Krystallen stattgefunden, deren Isolirung vorläufig aussichtslos erschien.

Es werden nun 30 g Leucinimid in 3 Portionen zu je 10 g mit metallischem Na in der üblichen Weise reducirt. Nach dem Verdünnen mit Wasser und Abdestilliren des Alkohols wurden die 3 Portionen gesondert je 4 Mal mit grossen Mengen Aether extrahirt, die 12 vereinigten Extracte 24 Stunden über Aetzkali entwässert und dann abdestillirt. Der Rückstand wiegt nach dem Trocknen im Exsiccator neben Paraffin 13 g. Die Base wird fractionirt, das Thermometer steigt ganz allmählich von 220–300°, sodass wiederum kein bestimmter Siedepunkt anzugeben ist, wahrscheinlich findet theilweise Zersetzung statt. Die gesondert aufgefangene anscheinend reinste Hauptfraction, die von 220–270° überging, wiegt 5,2 g. 3,4 g davon werden in das salzsaure Salz verwandelt. Sie werden mit 10 cem. Wasser und mit HCl zunächst in der Kälte versetzt. Es tritt dabei Blaufärbung ein, die bei noch nicht genügendem HCl-Zusatz nach dem Umrühren immer wieder verschwindet. Da sich ein Theil des Salzes schon auszuschcheiden beginnt, werden noch 50 cem. Wasser zugesetzt, mit HCl stark übersättigt und gekocht. Es löst sich fast Alles, die Blaufärbung verschwindet. Die heiss filtrirte Lösung, aus der sich nichts ausscheidet, wird nach 5 Stunden nochmals filtrirt und fractionirt in 3 Portionen eingedampft, die zusammen 2,2 g salzsaures Salz lieferten. Da dasselbe sich als in starker Salzsäure schwer löslich erwies, so benutzte ich diese Eigenschaft, um es aus conc. HCl, die mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt war, umzukrystallisiren. Nach zweimaligem Umkrystallisiren erhielt ich 1,1 g, die zu den Analysen benutzt wurden. Aus der gesammten Mutterlauge wurde ein Pt-Salz dargestellt. Ich erhielt 2,7 g desselben in hellgelben, dünnen Blättchen.

Nach der Extraction der 13 g Base aus dem Reductionsgemisch wird mit HCl neutralisirt, nach 24 Stunden filtrirt, auf den vierten Theil eingeeengt, schwach mit HCl angesäuert und mit Aether extrahirt. Ein Theil der beim Ansäuern ausge-

schiedenen Masse löste sich nicht in Aether, wird abfiltrirt. Die Aetherextracte hinterlassen 4 g zäher, stechend sauer riechender Flüssigkeit, die nach Monaten noch nicht krystallisirt.

Aus der nach Erschöpfung mit Aether restirenden, grosse Massen NaCl enthaltenden Flüssigkeit erhält man durch oft wiederholtes Eindampfen und Behandeln mit Alkohol und absolutem Alkohol in der früher geschilderten Weise einen zähflüssigen Lack, der nach dem Trocknen bei 100° 9,5 g wiegt und nicht krystallisirt. Eine nähere Untersuchung der bei der Reduction des Leucinimids gewonnenen Nebenprodukte konnte bisher noch nicht vorgenommen werden.

#### Analyse des salzsauren Salzes der Base.

##### 1.) Cl.-Bestimmung.

0,2236 (bei 100—105° getr.) wurden in kochendem Wasser klar gelöst, 3 Tropfen HNO<sub>3</sub> zugesetzt, mit AgNO<sub>3</sub>-Lösung heiss ausgefällt, nochmals aufgeköcht und nach dem Absetzen heiss filtrirt. Aus dem Filtrat schied sich sofort das salpetersaure Salz der Base in feinen Blättchen aus, Spuren davon auch schon auf dem Filter, die durch das Auswaschen mit heissem Wasser in Lösung gebracht wurden. Dann wurde die Bestimmung in üblicher Weise zu Ende geführt. Man erhielt  $\text{Ag Cl} = 0,2323 = 0,05747 \text{ Cl.} = 25,7\%$ .

Das zurückgewonnene salpetersaure Salz, mehrfach mit verdünnter HNO<sub>3</sub> ausgewaschen, wog trocken 0,22 g, hatte sich also fast quantitativ ausgeschieden. Ueberhaupt scheint es noch schwerer löslich in HNO<sub>3</sub> zu sein, als das salzsaure Salz in HCl. Löst man letzteres in Wasser und setzt HNO<sub>3</sub> zu, so scheidet sich das salpetersaure Salz aus, welches feine Nadeln und Blättchen bildet.

2.) 0,2063 g (bei 100—105° getrocknet) gab 0,1915 H<sub>2</sub>O = 0,0213 H = 10,3% und 0,4002 CO<sub>2</sub> = 0,10915 C = 52,9%.

Das Salz verbrannte äusserst schwer.

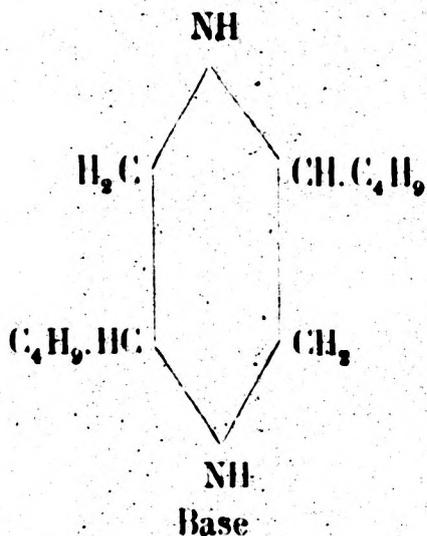
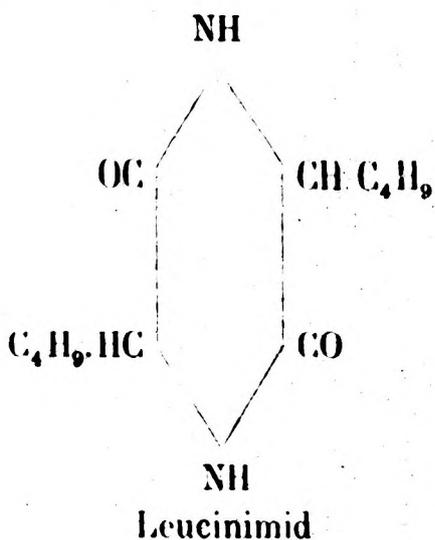
Die Analysen führen zu der Formel  $C_6H_{13}N.HCl$ , welche verlangt

	gef.
C = 53,1%	C = 52,9%
H = 10,3%	H = 10,3%
Cl = 26,2%	Cl = 25,7%

Es war nun von vorneherein unwahrscheinlich, dass eine Base mit den beschriebenen Eigenschaften, vor Allem mit dem hohen Siedepunkt, die einfache Formel  $C_6H_{13}N$  besitze, und es erwies sich daher als nothwendig, ihr Molekulargewicht zu bestimmen. Da die Base selbst nicht in hierfür genügend reinem Zustande zu erhalten war, bestimmte ich das Molekulargewicht ihrer Muttersubstanz, des Leucinimids, nach der Raoult'schen Methode und fand dabei genau das doppelte Gewicht.

Es wurden angewandt 13,4915 g Phenol: 0,3419 g Substanz. (Dieselbe war mehrmals aus Alkohol umkrystallisirt, dann in conc.  $H_2SO_4$  gelöst, durch Glaswolle filtrirt, mit Wasser ausgefällt, dann noch 3 Mal aus Alkohol umkrystallisirt, hatte den Schmelzpunkt  $262^\circ$ .) Sie löste sich leicht in Phenol beim schwachen Erwärmen. Die Depression des Schmelzpunktes betrug  $0,86^\circ$ . Daraus berechnet sich  $M = \frac{c. p.}{t} = \frac{76. 2,53}{0,86} = 224$ .  $C_{12}H_{22}N_2O_2$  verlangt  $M = 226$ .

Am einfachsten erklären sich die Zusammensetzung und die Eigenschaften des bisher sogenannten Leucinimids und der daraus durch Reduction gewonnenen Base, wenn wir für beide eine ringförmige Constitution annehmen, sodass wir folgende Formeln erhalten:



Das Leucinimid wäre danach ein Dioxydibutyldiäthylendiamin und die Base ein Dibutyldiäthylendiamin, also ein Piperazinderivat, und mit einem solchen theilt sie auch die Eigenschaft, reichliche Mengen Harnsäure zu lösen. Ferner gibt sie die für Piperazinderivate charakteristische Reaction mit Jodwismuthjodkalium; noch in äusserst starker Verdünnung bildet sich damit ein röthlicher Niederschlag, der zuweilen aus rosettenförmig gruppirten prismatischen Krystallen bestand.

Mit der Base stellte ich folgende Thierversuche an:

0,15 g ihres salzsauren Salzes wurden in 10 cem. Wasser gelöst und bei einem Kaninchen ein Blutdrucksversuch gemacht. Als 5 cem. der Lösung in einen Ast der v. jugularis langsam eingespritzt waren, sank plötzlich der Blutdruck auf 0, Herzschlag und Athmung standen still und liessen sich nicht wieder hervorrufen. Das Herz enthielt nur flüssiges Blut.

1 cem. der Lösung, einem Frosch subcutan injicirt, war wirkungslos. 3,5 cem., enthaltend 0,0525 des salzsauren Salzes, einem Kaninchen Nachmittags 6 $\frac{1}{2}$  Uhr subcutan injicirt, waren ebenfalls ohne Wirkung. Der bis zum nächsten Vormittage 11 Uhr entleerte und ausgedrückte Urin enthielt kein Eiweiss, reducirte auch nicht. Er wurde stark alkalisch gemacht und mit Aether extrahirt; der Aetherrückstand reagirte stark alkalisch, gab starke Nebel mit HCl. Seine Lösung in verdünnter HCl gab mit Dragendorff's Reagens eine Fällung und mit PtCl<sub>4</sub> ein reichliches Pt-Salz, kleine spitze Blättchen.

0,0370 g (bei 100–105° getrocknet) gaben 0,0119 Pt = 32,2%.

Die Base wird also unverändert und zwar in grossen Mengen ausgeschieden.

Ueerblicken wir das Resultat der mitgetheilten Versuche, so unterliegt es wohl keinem Zweifel, dass meine frühere Auffassung, das bei der Eiweiss-spaltung durch Säuren in geringen Mengen entstehende eigenthümliche Produkt sei ein Pyridin-

derivat, nicht mehr aufrecht zu erhalten ist. Andererseits kann es auch nicht, wie man bisher geglaubt hat, dasjenige Leucinimid sein, welches sich aus dem bei der Eiweisspaltung durch Säuren in grossen Mengen entstehenden Leucin bildet, da dasselbe andere Eigenschaften, speciell einen um  $33^{\circ}$  niedrigeren Schmelzpunkt zeigt. Die Annahme, dass es sich um dieses, aber noch durch irgend etwas verunreinigtes Leucinimid handelt, ist wohl von der Hand zu weisen, da ein solches einmal höchstwahrscheinlich einen niedrigeren und nicht um  $33^{\circ}$  höheren Schmelzpunkt als den des Leucinimids von  $262^{\circ}$  haben würde, und da es mir ferner auf keine Weise gelungen ist, eine solche Verunreinigung, weder durch häufig wiederholtes Umkrystallisiren aus Alkohol und conc.  $H_2SO_4$ , noch auch durch fractionirtes Auskrystallisirenlassen aus Alkohol nachzuweisen. Auch aus seiner Lösung in heisser conc.  $HNO_3$  und heisser concentrirter Kalilauge, worin er sich schwer löste, fiel der Körper unverändert mit dem Schmelzpunkt  $295^{\circ}$  wieder aus. Weshalb ich keine genau stimmenden Analysen erhielt, bin ich auch jetzt noch nicht in der Lage, anzugeben, noch neuerdings mit der grössten Sorgfalt vorgenommene Analysen ergaben für die Formel  $C_6H_{11}NO$  0,8 resp. 0,9% C zu wenig, während der H stimmte. Auch Ritthausen<sup>1)</sup> erhielt über 1% C zu wenig.

Am meisten Wahrscheinlichkeit hat für mich die Annahme, dass das fragliche Produkt ein Isomeres desjenigen Leucinimids ist, welches aus dem bei der Eiweisspaltung in grossen Massen auftretenden Leucin durch Einwirkung trockner Salzsäure bei etwa  $230^{\circ}$  zu erhalten ist und aus einem diesem Leucin in geringen Mengen beigemengten isomeren Leucin schon beim blossen Kochen mit wässriger Salzsäure sich bildet. Ferner hat sich das Leucinimid, dessen Formel zu verdoppeln ist, als ein Derivat des Diäthylendiamins erwiesen, und es ist von Interesse, mit welcher Leichtigkeit aus Leucinimid resp. Leucin, also auch aus Eiweiss, die oben beschrie-

1) l. c.

benen Basen, Derivate des Diäthylendiamins, gebildet werden können, besonders mit Rücksicht darauf, dass auch ein im normalen Stoffwechsel vorkommender Körper, das Spermin, wenn es auch nicht, wie man früher annahm, Diäthylendiamin selber ist, so doch vielleicht zu ihm in naher Beziehung steht. Schliesslich wäre auch noch daran zu erinnern, dass die Imide anderer Amidosäuren, wie Glycocoll und Alanin, ebenfalls die doppelte Formel besitzen und daher gleichfalls analoge Basen liefern könnten, und es dürfte sich so vielleicht die Aussicht eröffnen für eine allgemeinere Erklärung der Bildungsweise derartiger im Thierkörper auftretender Basen.