

Ueber Uroferrinsäure.

Von

Dr. O. Thiele.

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts der Universität Leipzig.)
(Der Redaction zugegangen am 9. Januar 1903.)

Nach dem Vorschlage von E. Salkowski¹⁾ hat man zwischen zweierlei Arten von Schwefelverbindungen des Harns zu unterscheiden: dem sauren Schwefel, soweit er in der Form der Sulfate und der Aetherschwefelsäuren abgeschieden wird, und dem nicht oxydirten oder dem neutralen Schwefel, welcher ungefähr 20% des Gesamtschwefels im Harn ausmacht. Hierher gehören der Rhodanwasserstoff und Abkömmlinge des Taurins und Cystins. Auf den Rhodanwasserstoff entfällt etwa nur $\frac{1}{3}$ des gesammten, nicht als Schwefelsäure vorhandenen Schwefels, auf den im normalen menschlichen Harn enthaltenen cystinähnlichen Körper nach den Untersuchungen von Goldmann und Baumann²⁾ nur ein unerheblicher Theil. In Folge dessen lag die Vermuthung nahe, dass ein oder vielleicht auch mehrere Körper, die neutralen Schwefel enthalten, entweder in relativ beträchtlicher Menge, oder aber mit ziemlich hohem Schwefelgehalt im normalen Harn vorkommen müssen.

Bereits im Jahre 1869 glaubte Thudichum³⁾ zwei neue Extractivstoffe, stickstoffhaltige Säuren, im normalen menschlichen Harn gefunden zu haben, die er Kryptophan- und Paraphansäure nannte. Er erhielt dieselben in der Form ihrer

1) Salkowski, Ueber die Entstehung der Schwefelsäure im Organismus. Virchow's Arch., Bd. 58, 1875, S. 472.

2) Goldmann u. Baumann, Zur Kenntniss der schwefelhaltigen Verbindungen des Harns. Diese Zeitschr., Bd. XII, S. 254.

3) Thudichum, Pflüger's Arch., Bd. 15, 1877, S. 433 ff. u. S. 455 ff.

Eisensalze aus Harn, der mit Kalk oder Baryt alkalisch gemacht und auf den vierten Theil seines Volumens concentrirt worden war, durch Fällen mit Eisenchloridlösung. In der Annahme, dass der Schwefel, den er in manchen Präparaten in ziemlich beträchtlicher Menge ermittelte, lediglich von Verunreinigungen herrühre, schrieb er seiner Kryptophansäure eine der Glutaminsäure ähnliche Formel zu, wogegen er aber für die Paraphansäure keine Formel aufstellte. Zugleich machte er darauf aufmerksam, dass in den so hergestellten Eisenniederschlägen noch ein Alkaloid vorhanden sei, dessen Isolirung er in einer späteren Mittheilung veröffentlichen werde. — Trotz eifrigen Suchens ist es mir nicht gelungen, eine diesbezügliche Veröffentlichung von Thudichum zu finden. Vielleicht ist anzunehmen, dass eine solche überhaupt unterblieben ist, zumal kurz nach jener ersten Publication die Kryptophan- und Paraphansäure einer strengen Kritik von Neubauer,¹⁾ der sie nach verschiedenen Untersuchungen als Xanthinkörper bezeichnete, unterworfen wurden.

Lange Zeit darauf versuchten im Jahre 1897 Bondzýnski und Gottlieb²⁾ eine stickstoff-schwefelhaltige Substanz aus dem Harn zu isoliren, die sie Oxyproteinsäure nannten und der sie einstweilen die Formel $C_{13}H_{82}N_{14}SO_{31}$ beileigten. Sie konnten in Folge von Materialmangel die freie Säure selbst nicht darstellen, sondern nur ihr in Wasser lösliches, in Alkohol dagegen unlösliches Barytsalz, und bemerkten ausdrücklich dazu, dass die Analysen des oxyproteinsauren Baryums und zwar einer Reihe von Präparaten aus verschiedenen Darstellungen befriedigende Uebereinstimmungen noch nicht ergaben. Da jedoch die Resultate in nicht allzu weiten Grenzen schwankten, so sollten sie vorläufig zu einer annähernden Charakterisirung der Zusammensetzung genügen.³⁾ Aus dem

1) Neubauer, Analyse des Harns, S. 53. Vergl. auch Pflüger's Arch., Bd. 15, 1877, S. 468. (Nach Thudichum citirt.)

2) Bondzýnski und Gottlieb, Centralbl. f. med. Wissensch., 1897, Nr. 33.

3) Inzwischen erschien: Ueber die Alloxyproteinsäure, von Bondzýnski u. K. Panek. Ber. 1902, Bd. 35, S. 2959.

Barytsalz berechnete sich für die freie Säure ein Gehalt an Stickstoff von 14,82% und an Schwefel von 2,42%. Die Säure gibt zwar keine Biuretreaction, jedoch eine schwache Millon'sche; sie enthält keinen mit alkalischer Bleilösung abspaltbaren Schwefel und wird durch Phosphorwolframsäure und Sublimat nicht, wohl aber durch Mercurinitrat und Mercurisulfat gefällt.

Einen Körper von ähnlicher Zusammensetzung erhielt bald darauf Pregl¹⁾ durch Extraction von zur völligen Trockene eingedampftem Harn mit Alkohol, Fällen mit Baryt und Reinigen mit Phosphorwolframsäure. Auch er konnte nur das Barytsalz der Säure analysiren, dessen Eigenschaften zwar mit denen der Oxyproteinsäure übereinstimmten, während jedoch die procentuale Zusammensetzung erheblichen Schwankungen unterworfen war.

Als ein weiterer Versuch zur Darstellung von Verbindungen mit neutralem Schwefel aus dem Harn muss die Arbeit von Cloetta,²⁾ welche im Schmiedeberg'schen Laboratorium zu Strassburg ausgeführt wurde, über die von ihm so benannte «Uroprotsäure» angesehen werden. Er erhielt das Barytsalz aus dem Harn von Hunden, die reichlich mit Fleisch gefüttert worden waren, und zwar in ziemlich beträchtlicher Menge, aus 41 ca. 2 g. Auf Grund der Analysen von sieben verschiedenen Darstellungen des Barytsalzes — die freie Säure selbst isolirte er nicht, obwohl von einem Mangel an Material bei einer so reichlichen Ausbeute keine Rede sein konnte — schreibt er der Uroprotsäure die Formel $C_{66}H_{116}N_{20}SO_{54} + nH_2O$ zu. Zunächst ist es nicht verständlich, wie Cloetta auf Grund seiner publicirten Analysen zu einer bestimmten Formel gelangt, denn selbst abgesehen davon, dass fast jedes Präparat seine eigene Formel besitzt, zeigt jede einzelne Formel bei genauer Nachrechnung unter Berücksichtigung der gefundenen Procentzahlen eine Zusammensetzung, die mit der von Cloetta aufgestellten in ziemlich grossem Widerspruche steht. Aus den

1) Pregl, Pflüger's Arch., Bd. 75, S. 87.

2) Cloetta, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm., Bd. 40, 1899, S. 29.

einzelnen Präparaten, resp. aus ihrem Gehalte an C, H, N, S, Ba berechnet sich die Formel:

1. $C_{55}H_{105}Ba_3N_{17}SO_{57}$
2. $C_{60}H_{117}Ba_2N_{17}SO_{64}$
3. $C_{69}H_{122}Ba_6N_{21}SO_{56}$
4. $C_{66}H_{131}Ba_5N_{20}SO_{58}$
5. $C_{61}H_{115}Ba_0N_{17}SO_{66}$ (!)
6. $C_{63}H_{121}Ba_5N_{19}SO_{59}$
7. $C_{65}H_{119}Ba_5N_{20}SO_{68}$

Cloetta berechnet:

1. $C_{66}H_{122}Ba_4N_{20}SO_{67} + \frac{1}{2} H_2O$
2. $(C_{66}H_{126}Ba_2N_{18}SO_{70})_2 + C_{66}H_{129}BaN_{19}SO_{69}$
3. $C_{66}H_{108}Ba_6N_{20}SO_{59}$
4. $C_{66}H_{118}Ba_5N_{20}SO_{59}$
5. $C_{66}H_{123}Ba_0N_{19}SO_{70} + \frac{1}{2} H_2O$ (!)
6. $C_{66}H_{118,2}Ba_{5,3}N_{20}SO_{61}$
7. $C_{66}H_{120,2}Ba_{4,3}N_{20}SO_{60}$

Hätte Cloetta seine Formeln stets auf N_{20} , resp. im Präparat Nr. 5 auf N_{19} berechnet, so würde sich ergeben haben:

1. $C_{64,7}H_{123,5}Ba_{3,5}N_{20}S_{1,2}O_{67}$
3. $C_{65,7}H_{116,2}Ba_{5,7}N_{20}SO_{53,3}$
5. $C_{65,2}H_{128,5}Ba_0N_{19}SO_{73,8}$
6. $C_{66,3}H_{122}Ba_{5,3}N_{20}SO_{62}$

Wie gering die Wahrscheinlichkeit für die Existenz dieser Säure als einheitlicher Körper ist, geht auch aus den Procentzahlen des Baryums der 7 Präparate hervor, nämlich:

1. Ba = 18,75 %
2. Ba = 8,94 %
3. Ba = 28,60 %
4. Ba = 24,42 %
5. Ba = 0,00 % (!)
6. Ba = 26,11 %
7. Ba = 22,07 %

Das vollständige Fehlen des Baryums im Präparat Nr. 5 erklärt Cloetta, trotzdem dasselbe «genau wie das vorhergehende» Nr. 4 mit Ba = 24,42% hergestellt wurde, dadurch, dass «diese Substanz wahrscheinlich andere Basen enthielt, auf die bei der Analyse nicht geachtet wurde». Zudem ergibt sich aus den obigen Formeln eine Basicität der Säure von 12—0,

welche Thatsache wohl schon allein zu einem Zweifel am Vorkommen der Uroprotsäure als einheitlicher Körper Anlass geben dürfte.

Mein verehrter Lehrer, Herr Prof. Dr. Siegfried, hatte bereits früher die Beobachtung¹⁾ gemacht, dass sich aus dem phosphatfrei gemachten, mit Ammonsulfat gesättigten Harn ein starker Niederschlag mit ammoniumsulfatgesättigter Eisenammoniakalaunlösung fällen liess, aus dem eine oder mehrere Substanzen von Säurecharakter, die durch Mercurinitrat fällbar sind und keine Biuretreaction geben, erhalten werden können. In Gemeinschaft mit Herrn C. Störmer war er bemüht, aus dem im phosphatfrei gemachten Harn durch Eisenchlorid entstehenden Niederschlag, der schon von Salkowski²⁾ und von Thudichum³⁾ untersucht worden ist, Substanzen von constanter Zusammensetzung zu isoliren. Durch fractionirte Fällung wurde aus dem Substanzgemenge eine Reihe von Silbersalzen erhalten, die sich namentlich durch ihren Schwefelgehalt unterschieden. Die aus den Silbersalzen dargestellten Säuren ähnelten im Verhalten und in ihrer Zusammensetzung der Oxyproteinsäure und der Uroprotsäure. Die Versuche zur Trennung dieser Säuren wurden darauf unter Anwendung der von M. Siegfried⁴⁾ aufgefundenen Eisenfällung in ammoniumsulfatgesättigter Lösung von Herrn v. Cichochski aufgenommen. Sie führten jedoch zu keinem Resultate; worauf ich im Wintersemester 1900/01 die Aufforderung erhielt, die Arbeit von Neuem in Angriff zu nehmen. Da mit Recht aus den früheren Versuchen hervorging, dass dieselben in erster Linie wohl an dem Mangel von Material gescheitert waren, so fing ich die Darstellung sofort im Grossen an und verarbeitete im Laufe der Arbeit ca. 3000 l Harn, den ich Anfangs aus der hiesigen Klinik für Augenkranke, später aber aus der Anstalt für taubstumme Kinder erhielt.

1) M. Siegfried, Diese Zeitschr., Bd. XXVII, 1899, S. 345.

2) Salkowski, Pflüger's Arch., Bd. 2, S. 351; Bd. 16, S. 306.

3) Thudichum, s. Anmerkung auf S. 251.

4) M. Siegfried, Ueber Antipepton, Ber. d. chem. Ges., Bd. 33, 1900, S. 2851 ff. und M. Siegfried, Ueber Antipepton, II. Mittheilung, Diese Zeitschr., Bd. XXXV, S. 165.

Die vorliegende Arbeit wurde nach der von M. Siegfried zur Darstellung von Peptonen ausgearbeiteten «Eisenmethode» durchgeführt. Jedoch mussten in diesem besonderen Falle verschiedene von der eigentlichen Methode abweichende Modificationen vorgenommen werden, um anhaftende Verunreinigungen zu entfernen und die Ausbeute zu erhöhen.

A.

Erste Versuche zur Isolirung der Uroferrinsäure nach M. Siegfrieds „Eisenmethode“.

1. Untersuchung der mit Eisenammoniakalaun hergestellten ersten Fällung.

In Folge der Vorversuche, die von Herrn v. Cichoehsky unter der Leitung von Herrn Prof. M. Siegfried ausgeführt wurden, hatte es sich für vortheilhaft gezeigt, den phosphatfreien Harn bei ammoniakalischer Reaction bis zu einer gewissen Concentration einzudampfen, ihn darauf mit Ammonsulfat zu sättigen und nun den Eisenniederschlag durch Eisenammoniakalaun herzustellen, nachdem aber erst vorher, in Analogie zu der Albumosenentfernung bei der Peptondarstellung, aus der ammoniumsulfatgesättigten Flüssigkeit durch Zusatz von concentrirter Schwefelsäure gewisse Verunreinigungen ausgefällt worden waren.

Ungefähr 500 l Harn wurden zur Entfernung der Phosphorsäure mit einer heissen, gesättigten Chlorbaryumlösung in geringem Ueberschusse versetzt, vom Niederschlag, ohne ihn nachher auszuwaschen, abfiltrirt und das Filtrat vom Chlorbaryum durch Zusatz von Ammonsulfat befreit. Die Flüssigkeit wurde bei fortwährend schwach ammoniakalischer Reaction auf dem Wasserbade bei einer Temperatur von 70—80° zur Concentration 5 : 1 eingedampft, sodann zur Abscheidung schwer löslicher Stoffe über Nacht stehen gelassen und nun mit Schwefelsäure genau neutralisirt. Nachdem die Flüssigkeit mit Ammonsulfat bei 70° gesättigt worden war, wurde solange concentrirte Schwefelsäure zugefügt, bis ein eben entstehender Niederschlag wieder in Lösung ging. Abweichend von den früheren Versuchen fanden diese Abscheidungen zunächst keine Berück-

sichtigung, weil sie erst später, und zwar kurz vor der Umfällung des ersten Eisenniederschlages, entfernt werden sollten. Unter beständigem Rühren mittelst eines elektrischen Rührwerkes wurde zur vollkommen klaren Flüssigkeit ammoniumsulfatgesättigte Eisenammoniakalaunlösung in kleinen Portionen zugegeben, jedoch jeder Ueberschuss des Fällungsmittels vermieden, weil sonst, ähnlich den Peptoneisenniederschlägen, eine sofortige Lösung des in braunen Flocken ausfallenden Niederschlages eingetreten wäre. Die voluminösen Abscheidungen wurden auf einem glatten Filter gesammelt, im Mörser zur Erleichterung des späteren Abnutschens mit festem Ammonsulfat fein zerrieben und nun auf der Nutsche mit der 6fachen Menge an gesättigter Ammonsulfatlösung ausgewaschen. Trotz der Behandlung mit verhältnissmässig viel Waschflüssigkeit (bei einer Probe die 50fache Menge) war es nicht möglich, das mit in den Eisenniederschlag gehende Urobilin gänzlich zu entfernen. Nachdem der abgesaugte Eisenniederschlag mit Wasser angerieben worden war, wurde er bei einer Temperatur von ca. 70° mit starkem Ammoniak unter fortwährendem Rühren solange behandelt, bis er die charakteristische, rothbraune Farbe des Eisenoxydhydrates angenommen hatte. Da das Filtrat in der Regel noch ziemlich beträchtliche Mengen von Eisen enthielt, so wurde es stärker eingeeengt und nochmals mit concentrirtem Ammoniak in der Wärme behandelt. Um allzu grosse Verluste möglichst zu vermeiden, mussten die so erhaltenen Eisenhydroxydniederschläge, welche die Substanz hartnäckig festhielten, mit warmem, ammoniakhaltigem Wasser reichlich ausgewaschen werden. Filtrat nebst Washwasser wurden darauf mit Schwefelsäure neutralisirt und mit Ammonsulfat gesättigt. Nach den Angaben von M. Siegfried¹⁾ wurde zu dem Filtrate solange eine Mischung von 3 Theilen gesättigter Ammonsulfatlösung und 1 Theil concentrirter Schwefelsäure gegeben, als noch ein Niederschlag oder eine Trübung entstand. Anderen Tages wurde filtrirt. Gab das Filtrat weder auf Zusatz der

1) M. Siegfried, Ueber Antipepton. II. Mittheilung, Diese Ztschr., Bd. XXXV.

Mischung von Ammonsulfatlösung und Schwefelsäure, noch von ammoniakalischer, gesättigter Ammonsulfatlösung eine Ausscheidung oder Trübung, so wurde die saure Reaction durch ammoniakalische, gesättigte Ammonsulfatlösung bis zur schwach sauren abgestumpft. Andernfalls wurde noch so lange ammon-sulfatgesättigte Schwefelsäure oder ammon-sulfatgesättigtes Ammoniak hinzugegeben, bis nach Filtriren der Punkt erreicht war, bei welchem weder durch Erhöhung der sauren Reaction noch durch deren Verminderung eine Ausscheidung erfolgte». Aus der mit ammon-sulfatgesättigtem Ammoniak neutralisirten und mit ammon-sulfatgesättigter Schwefelsäure schwach angesäuerten Lösung wurde unter Umrühren durch Zusatz von ammon-sulfatgesättigter Eisenammoniakalaunlösung unter Vermeidung eines Ueberschusses der erste Eisenniederschlag wieder ausgefällt. Dieser so ungefällte Eisenniederschlag wurde zur völligen Abscheidung über Nacht stehen gelassen, am folgenden Tage auf einem glatten Filter gesammelt und nun auf der Nutsche mit gesättigter Ammonsulfatlösung bis zur gänzlichen Chlorfreiheit ausgewaschen. Die Zersetzung dieses Niederschlages geschah, genau wie bereits oben erwähnt, bei Wasserbadtemperatur vermittelt starkem Ammoniak.

Das Filtrat vom Eisenhydroxydniederschlag wurde nunmehr mit Salpetersäure neutralisirt und so lange mit wässriger Mercurinitratlösung versetzt, bis ein Tropfen der Flüssigkeit auf dem Uhrglase mit Barytwasser soeben eine Gelbfärbung gab. Hierauf wurde die ganze Flüssigkeitsmenge mit Ammoniak neutralisirt. — Später stellte sich jedoch heraus, dass es zweckmässiger ist, das Filtrat vom Eisenhydroxydniederschlag mit Schwefelsäure zu neutralisiren, die Fällung mit Quecksilber-sulfatlösung vorzunehmen und die Flüssigkeit mit Barytlösung abzustumpfen, weil sich die Salpetersäure nur sehr schwer aus den Substanzen entfernen lässt. — Die voluminösen Quecksilberniederschläge wurden abgesaugt, mit warmem Wasser tüchtig ausgewaschen und im Mörser mit Wasser fein zerrieben. Die sich in einer Stöpselflasche befindende Suspension wurde tagsüber mit Schwefelwasserstoff behandelt. Am Abend wurde die Flasche zugestöpselt, um am andern Morgen zu

prüfen, ob die Flüssigkeit noch stark nach Schwefelwasserstoff roch. War dies nicht der Fall, so wurde ein weiteres Einleiten des Gases vorgenommen, bis die Zersetzung schliesslich eine vollständige geworden war. Aus dem Filtrate des Quecksilbersulfidniederschlages wurde der demselben noch anhaftende Schwefelwasserstoff durch Einleiten von Luft vertrieben und vom abgeschiedenen Schwefel abfiltrirt. Da die Flüssigkeit noch geringe Mengen von Schwefelsäure enthielt, die in Folge des Einleitens von Schwefelwasserstoff entstanden waren, so wurde Barytlösung in geringem Ueberschusse zugefügt und letzterer wieder mit wenig Ammoncarbonatlösung entfernt.

Ein Eindampfen der Flüssigkeit auf dem Wasserbad hatte sich nicht als vorthellhaft erwiesen, da mit zunehmender Concentration ziemlich beträchtliche Abscheidungen stattfanden, deren Entstehung durch Einengen im Vacuum vermieden wurde. Der auf diese Weise erhaltene, durchsichtig klare, aber dunkel gefärbte Syrup wurde mit genügend Eisessig versetzt, um alles Ammonsalz in Ammonacetat und freie Säure überzuführen, und nun so lange absoluter Alkohol zugefügt, bis eben eine dauernde Trübung entstand, von der abfiltrirt wurde. Unter fortwährendem Umrühren eines Gemisches von 2 Theilen Alkohol und 1 Theil Aether wurde das Filtrat eingetropt, wobei sich ein äusserst voluminöser, gelbflockiger Niederschlag abschied. Derselbe wurde abgesaugt, mit dem Gemisch von Alkohol und Aether wiederholt ausgewaschen und darauf im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet.

Aus den verarbeiteten 500 l Harn wurden 3 g Substanz gewonnen, die jedoch fast 4% Asche enthielt und so zerfliesslich war, dass man sie nur kurze Zeit an der freien Luft aufbewahren konnte. Im Gegensatze zu dem Syrup, aus dem die Substanz erhalten wurde, gab dieselbe keine Miltonsche Reaction mehr, sie röthete blaues Lackmuspapier ziemlich intensiv und hatte einen scharfen und bitteren Geschmack.

Da die Substanz selbst in Folge ihres hohen Aschegehaltes, der aus Kalium und Natrium bestand, zur Analyse nicht verwendet werden konnte, so wurde durch Darstellen von Salzen eine Herabminderung des Aschegehaltes versucht, um durch

eine Verbrennung einen Anhaltungspunkt für die Zusammensetzung des Körpers zu erlangen. Zu diesem Zwecke wurde 1 g der Substanz in wenig Wasser gelöst, die Flüssigkeit mit etwas Ammoniak neutralisirt und so lange Alkohol zugegeben, bis eben eine Trübung entstand, die durch ein paar Tropfen Wasser wieder in Lösung gebracht wurde. Auf Zusatz von alkoholischer Silbernitratlösung fiel ein dickflockiger Niederschlag aus, der sofort abgesaugt und mit 96%igem Alkohol ausgewaschen wurde. Das Silbersalz Ag I. gelangte darauf im Vacuum über Schwefelsäure zur Gewichtskonstanz.

Auf ähnliche Weise wurde aus einem weiteren Gramm Substanz mittelst alkoholischer Zinkacetatlösung ein Zinksalz Zn I. dargestellt.

1. Silbersalz. Ag I.		Substituirt man für Ag Wasserstoff, so resultirt:
0.2194 g gaben 0.1780 g CO ₂ ;	C = 22.13%	C = 41.46%
0.2194 „ „ 0.0507 g H ₂ O;	H = 2.60%	H = 4.85%
0.3984 „ „ an fr. Stickstoff (bei 14° und 759 mm) 30,3 cem;	N = 9.04%	N = 16.97%
0.2194 g hinterliessen beim Ver- aschen 0.1033 g Silber;	Ag = 47.08%	
2. Zinksalz. Zn I.		Substituirt man für Zn Wasserstoff, so resultirt:
Darstellung a.		
0.1550 g gaben 0.2026 g CO ₂ ;	C = 35.65%	C = 43.61%
0.1550 „ „ 0.0526 g H ₂ O;	H = 3.80%	H = 4.64%
0.3434 „ „ nach dem Veraschen 0.0928 g ZnO;	Zn = 19.53%	
0.1566 g verbrauchten 11.3 cem $\frac{1}{10}$ N—H ₂ SO ₄ ;	N = 10.11%	N = 12.33%
Darstellung b.		
0.2004 g gaben 0.2546 g CO ₂ ;	C = 34.66%	C = 42.32%
0.2004 „ „ 0.0610 g H ₂ O;	H = 3.41%	H = 4.18%
0.4470 „ „ beim Veraschen 0.1188 g ZnO;	Zn = 21.35%	
0.2938 g gaben an fr. Stickstoff (bei 14° und 759 mm) 25.6 cem;	N = 10.33%	N = 12.63%
Für Zn I.a ist C:N = 3,54: für Zn I.b C:N = 3,35.		

Wie aus diesen Procentzahlen hervorgeht, unterliegen die Analysenwerthe noch ziemlich bedeutenden Schwankungen, welche besonders deutlich werden, wenn man die auf Asche-

freiheit bezogenen Zahlen mit einander vergleicht, und es hat den Anschein, als ob das Silber- und das Zinksalz Fractionen von zwei oder vielleicht auch mehreren Körpern von ähnlicher Zusammensetzung sind. Eine quantitative Schwefelbestimmung konnte in Folge von Mangel an Material leider nicht ausgeführt werden, doch wurde das Vorhandensein von Schwefel durch die « Schwefeltrockenprobe »¹⁾ deutlich erwiesen.

II. Darstellung und Untersuchung eines zweiten Eisenniederschlags aus dem Filtrat der ersten Fällung.

Da die Ausbeute an Substanz aus dem eben besprochenen Eisenniederschlage nur 3 g betrug, so lag die Vermuthung nahe, dass in dem Filtrat desselben vielleicht noch ziemlich beträchtliche Mengen vorhanden wären. In Folge dessen wurde nach der von M. Siegfried ausgearbeiteten Methode²⁾ zur Darstellung von Peptoneisenniederschlägen ein zweiter Eisenniederschlag aus dem ammoniumsulfatgesättigten Filtrat des ersten gewonnen: jedoch wurde in diesem Falle von der ebenfalls vorgeschriebenen « Zwischenfällung » Abstand genommen.

Zur weiteren Behandlung wurde das Filtrat des ersten Eisenniederschlags zunächst mit ammoniumsulfatgesättigter Ammoniaklösung bis zur schwach sauren Reaction abgestumpft und darauf so lange von einer ammoniumsulfatgesättigten Eisenammoniakalaunlösung unter Vermeidung eines Ueberschusses zugefügt, als noch ein weiterer Niederschlag entstand. Die ganze Flüssigkeit wurde hierbei mittelst eines elektrischen Rührers kräftig durchgerührt. Dies abwechselnde Abstumpfen mit ammoniumsulfatgesättigtem Ammoniak und Eintragen von ammoniumsulfatgesättigter Eisenammoniakalaunlösung wurde so oft wiederholt, bis weder auf Zusatz des einen Reagens noch des anderen eine Ausscheidung in der Flüssigkeit erfolgte. Bei der Vornahme dieser Fällung wurde scharf darauf geachtet, dass die Reaction niemals neutral oder gar alkalisch wurde.

¹⁾ M. Siegfried, Ueber Antipepton, I. Mittheilung, Diese Zeitschrift, Bd. XXVII.

²⁾ M. Siegfried, Ueber Antipepton, II. Mittheilung, Diese Zeitschrift, Bd. XXXV.

Nachdem sich der so gewonnene Eisenniederschlag vollständig abgesetzt hatte, wurde er auf glattem Filter abfiltrirt, im Mörser mit festem Ammonsulfat fein zerrieben und auf der Nutsche unter Vermeidung der Entstehung von Rissen bis zur völligen Chlorfreiheit ausgewaschen. Darauf wurde er mit gesättigter Ammonsulfatlösung im Mörser zu einem dünnen Brei zerrieben und durch Zusatz von concentrirter Schwefelsäure unter fortwährendem Abkühlen gelöst. Aus dieser Lösung wurde dann der Eisenniederschlag mittelst starkem Ammoniak, das bis zur schwach sauren Reaction zugefügt wurde, wieder ausgefällt. Da jedoch dieser Niederschlag bedeutend geringer nach der Umfällung war, als er es vorher gewesen, so wurde aus seinem Filtrat, wie bereits oben beschrieben, durch abwechselndes Eintragen von Eisenammoniakalaun und Abstumpfen mit Ammoniak ein neuer Niederschlag gewonnen, der sich in schönen hellbraunen Flocken rasch zu Boden setzte. Er wurde zum vorigen gethan, um nun beide zusammen auf der Nutsche nochmals mit gesättigter Ammonsulfatlösung auszuwaschen. Die Zersetzung dieses Eisenniederschlages geschah genau nach der im ersten Versuch erwähnten Methode, doch wurde diesmal die Quecksilberfällung sofort mit Mercurisulfat vorgenommen. Das vollkommen von Schwefelsäure befreite Filtrat des mit Schwefelwasserstoff zerlegten Quecksilberniederschlages wurde im Vacuum zur Syrupdicke eingeengt und dieser Syrup in wenig Eisessig gelöst. Zu der so erhaltenen Flüssigkeit wurde darauf absoluter Alkohol bis zur beginnenden, dauernden Trübung gefügt, diese letztere wieder durch wenig Wasser in Lösung gebracht und nun die filtrirte Flüssigkeit in ein Gemisch von 2 Theilen Alkohol und 1 Theil Aether unter kräftigem Durchrühren desselben eingetropt. Die Substanz, welche sich in gelblichweissen Flocken abschied, wurde auf der Filterplatte gesammelt, tüchtig ausgewaschen und im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet.

Auch hier war die Ausbeute nur eine sehr geringe, denn sie betrug kaum die Hälfte der aus dem ersten Eisenniederschlag erhaltenen; zudem war ihr Aschegehalt ein ziemlich hoher, so dass die Analysirung der Säure nur in der Form

ihrer Salze vor sich gehen konnte. Erfreulicher Weise wurde der Aschegehalt der Substanz durch die Darstellung von Salzen auf ein Minimum herabgemindert, wie aus folgendem Versuche erhellt:

Ungefähr 0,5 g wurden in 90%igem Alkohol gelöst. Die Flüssigkeit wurde durch alkoholisches Ammoniak neutralisirt und aus ihr durch Zusatz von alkoholischem Kupferacetat ein in hellgrünen Flocken ausfallendes Kupfersalz dargestellt. Nachdem dasselbe mit 96%igem Alkohol gehörig ausgewaschen worden war, wurde es in Wasser unter Zugabe von etwas Essigsäure gelöst und das Kupfer durch Einleiten von Schwefelwasserstoff entfernt. Das vom anhaftenden Schwefelwasserstoff durch Einleiten von Luft befreite Filtrat des Kupfersulfids wurde auf dem Wasserbade bei ca 50° zur Syrupconsistenz eingeeengt und nun durch Zusatz eines Gemisches, das aus gleichen Theilen Alkohol und Aether bestand, die freie Säure wieder ausgefällt. Trotz wiederholten Auswaschens des Kupfersulfids war die Ausbeute der auf diese Weise umgefällten Substanz so gering, dass eine Analyse leider nicht ausgeführt werden konnte, doch zeigte der Körper beim Verbrennen auf dem Platinblech einen nur ganz unbedeutenden Ascherückstand.

Aus der noch übrig bleibenden Menge von ca. 1 g der aus dem zweiten Eisenniederschlag erhaltenen Ausbeute wurde nach der bereits früher erwähnten Methode mittelst alkoholischer Zinkacetatlösung ein Zinksalz gewonnen: Zn II.

Zinksalz Zn II.		Substituirt man für Zn Wasserstoff, so resultirt:	
0,1882 g gaben 0,2315 g CO ₂ :	C = 34,41 %	C = 42,04 %	
0,1882 „ „ 0,0614 „ H ₂ O:	H = 3,65 %	H = 4,58 %	
0,1569 „ verbrauchten 12,1 ccm $\frac{1}{10}$ N—H ₂ SO ₄ :	N = 10,56 %	N = 13,32 %	
0,3822 g gaben beim Veraschen 0,0976 g ZnO:	Zn = 20,52 %		

Hieraus berechnet sich für C:N = 3,16.

Ein Vergleich der einzelnen Procentzahlen von der auf Aschefreiheit berechneten Substanz der Zinksalze: Zn I.a, Zn. I.b und Zn II. lässt eine gewisse Uebereinstimmung erkennen.

B.

**Darstellung der Säure aus dem alkoholischen Extract
von eingedampftem Harn nach vorheriger Reinigung dieser Extraction
durch Ausfällen eines Eisenniederschlages.**

I. Versuch.

Wegen der so ausserordentlich geringen Ausbeute, die bisher aus den Eisenniederschlägen erhalten wurde, war es vor der Hand nicht möglich gewesen, eine wirkliche Charakterisirung der Säure durch genaue Analysen zu bewirken. Vor Allem wurde jetzt darauf Gewicht gelegt, eine gute Ausbeute zu gewinnen und den Gehalt an Asche, der trotz langen Auswaschens der Niederschläge mit gesättigter Ammonsulfatlösung in den Substanzen verblieb, herabzumindern. Da auch die Beobachtung gemacht wurde, dass mit steigender Temperatur beim Eindampfen des Harns auch eine entsprechende Zunahme der mit concentrirter Schwefelsäure aus der ammon-sulfatgesättigten Flüssigkeit ausfällbaren Verunreinigungen erfolgte, und dass die Säure selbst in 70—80%igem Alkohol ausserordentlich leicht löslich war, so konnten demgemäss einige, von der eigentlichen Eisenmethode abweichende Modificationen in diesem Falle vorgenommen werden. Besonders war durch eine eventuelle alkoholische Extraction die Aussicht vorhanden, die Menge der der Substanz bisher anhaftenden Verunreinigungen, sowohl organischer wie anorganischer Natur, zu reduciren, zumal auch dadurch das Ausfällen der äusserst voluminösen Phosphatniederschläge leicht vermieden werden konnte. Zur Darstellung der Säure wurde nunmehr folgender Weg eingeschlagen:

Ungefähr 150 l Harn wurden bei schwach ammoniakalischer Reaction auf dem Wasserbade bei einer Temperatur von 40 bis 50° zu Syrupconsistenz eingeeengt und sodann mit 8 l 75%igem Alkohol unter Erwärmen zweimal extrahirt. Gelegentlich der Untersuchung einer Probe dieses alkoholischen Extractes zeigte es sich, dass aus demselben, nach vorheriger Verdünnung mit der gleichen Menge Wasser, mittelst wässriger Eisenammoniakalaunlösung ein grauschwarzer Niederschlag ge-

fällt werden konnte, der sich jedoch nach weiterem Zusatz von Alkohol zum Theil wieder löste. Es zeigte sich, dass diese Eisenfällung hauptsächlich den Rest der mit in den alkoholischen Extract gegangenen Phosphate enthielt, und dass in ihr noch ein oder mehrere Körper organischer Natur zu finden waren, die aber vorläufig nicht weiter identificirt wurden. Jedenfalls soll die Untersuchung dieser Substanzen später an anderer Stelle weiter fortgesetzt werden.

Da die Fällung dieses Eisenniederschlages ein gutes Reinigungsmittel der Säure an die Hand gab, so wurde demnach das ganze Extract mit der gleichen Menge an Wasser verdünnt und nun so lange von einer wässerigen Eisenammoniakalaunlösung zugesetzt, bis nur eben noch ein Niederschlag entstand. Auch hierbei musste jeder Ueberschuss des Fällungsmittels vermieden werden, da ein Theil des sich bildenden Niederschlages bei weiterem Zufügen von Eisenammoniakalaunlösung wieder in Lösung ging. Nachdem vom Eisenniederschlage abgesaugt und die Flüssigkeit vom Alkohole durch Erwärmen auf dem Wasserbade bei 40° befreit worden war, wurde die letztere bei gleicher Temperatur mit Ammonsulfat gesättigt und über Nacht erkalten gelassen. Vom ungelösten Ammonsulfat und sonstigen Ausscheidungen wurde abfiltrirt und darauf die Entfernung der mit Schwefelsäure ausfällbaren Schmieren genau nach der bereits im Anfange erwähnten Methode vorgenommen. Zur vollständigen Absetzung dieser Verunreinigungen musste die Flüssigkeit gewöhnlich 2 bis 3 Tage lang stehen, worauf sie sich aber dann klar filtriren liess. Das Filtrat wurde mit ammoniumsulfatgesättigtem Ammoniak genau neutralisirt, sodann mit 3 Tropfen concentrirter Schwefelsäure versetzt, um die Reaction schwach sauer zu machen, und nun durch portionsweisen Zusatz von ammoniumsulfatgesättigter Eisenammoniakalaunlösung unter andauerndem Rühren mittelst eines elektrischen Rührwerkes die Ausfällung des Eisenniederschlages bewirkt. Nachdem derselbe abfiltrirt, auf die Nutsche gebracht und mit der 5fachen Menge seines Gewichtes an gesättigter Ammonsulfatlösung ausgewaschen worden war, wurde er mit kalter, verdünnter Schwefelsäure im Mörser

fein zerrieben und nach etwa 5 stündigem Rühren unter weiterem Zusatz von Schwefelsäure vollständig in Lösung gebracht. Die Flüssigkeit wurde mit der 4fachen Menge ihres Volumens an Wasser verdünnt, auf dem Wasserbade gelinde erwärmt und mit starkem Ammoniak vom Eisen befreit. Das ausgeschiedene Eisenhydroxyd wurde abgenutscht und längere Zeit mit warmem, ammoniakhaltigem Wasser ausgewaschen, worauf Filtrat wie Waschwasser neutralisirt und mit Ammonsulfat wiederum gesättigt wurden. Durch vorsichtiges Zusetzen von ammoniumsulfatgesättigter Schwefelsäure wurden die letzten, geringen Reste der Schmierer entfernt, worauf nunmehr der Eisenniederschlag bei schwach saurer Reaction wieder ausgefällt wurde. Als sich dieser hellbraune, feinflockige Niederschlag abgesetzt hatte, wurde er auf glattem Filter abfiltrirt, im Mörser mit festem Ammonsulfat zerrieben und auf der Nutsche mit gesättigter Ammonsulfatlösung bis zur Chlorfreiheit ausgewaschen. Im Gegensatz zu früher geschah die Zersetzung des umgefällten Eisenniederschlags diesmal mit verdünnter Schwefelsäure. Durch Einrühren fein gepulverten Aetzbaryts wurden Schwefelsäure und Eisen gefällt. Das Filtrat des so erhaltenen Niederschlages wurde mittelst Ammoncarbonat vom überschüssigen Baryt befreit, der Niederschlag aber selbst mit Ammoncarbonat längere Zeit auf dem Wasserbade bei ca. 60° erwärmt. Darauf wurde er auf der Nutsche abgesaugt und wiederholt mit warmem Wasser ausgewaschen. — Ueberhaupt ist auf ein gutes und reichliches Auswaschen der Barytniederschläge besonderes Gewicht zu legen, da dieselben sehr hartnäckig Substanz zurückhalten und so in erster Linie an eventuellen, geringen Ausbeuten Schuld tragen.

Das Eindampfen der die Säure als Ammonsalz gelöst enthaltenden Flüssigkeit, die vollkommen frei von Eisen und Baryum war, wurde im Vacuum vorgenommen, wobei aber scharf darauf geachtet wurde, dass die Temperatur nie über 40° stieg. Der auf diese Weise erhaltene Syrup, welcher zwar vollständig klar war, aber eine rothbraune Färbung besass, wurde mit der genügenden Menge an Eisessig, um alles Ammonsalz zu zerlegen, versetzt, mit Alkohol so lange verdünnt, bis

eine dauernde Trübung eintrat und nun die nochmals filtrirte Flüssigkeit in ein Gemisch von 2 Theilen Alkohol und 1 Theil Aether unter kräftigem Umrühren eingetropft. Die in schönen hellgelben Flocken ausfallende Substanz wurde auf der Filterplatte gesammelt, wiederholt mit jener Mischung von Alkohol und Aether ausgewaschen und im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet. Mittelst der Kakodylreaction wurde die Substanz auf die Anwesenheit von etwa noch vorhandenem Ammonacetat geprüft; jedoch zeigte es sich, dass dies letztere durch das Auswaschen vollständig entfernt worden war. Die Ausbeute belief sich auf fast 4 g.

Nachdem die Säure nochmals in 75%igem Alkohol gelöst und aus einem Gemisch von 2 Theilen Aether und 1 Theil Alkohol umgefällt worden war, wurde sie in ziemlich rein weisser Farbe erhalten; doch war bei einer etwas concentrirteren Lösung wieder jene rothbraune Farbe zu bemerken. Da dies zur Vermuthung Anlass gab, dass die Substanz noch irgend welche Verunreinigungen enthielt, so wurde sie vor Allem auf Harnindican geprüft mittelst Zusetzen von rauchender, eisenhaltiger Salzsäure und darauffolgendem Ausschütteln mit Chloroform: die Reaction ergab ein vollkommen negatives Resultat. In ihrem sonstigen Verhalten zeigte die Substanz die nämlichen Eigenschaften der bereits im Abschnitt A besprochenen Körper, dagegen war aber ihr Gehalt an Asche so gering, dass derselbe bei einer Analysirung der Säure nicht weiter in Betracht gezogen zu werden brauchte.

Analyse der ungefällten Substanz:

0.1830 g gaben 0.2986 g CO_2 ; C = 44.50%

0.1830 » » 0.0972 » H_2O ; H = 5.95%

0.1517 » » an tr. Stickstoff

(bei 24° und 750 mm) 17.6 ccm; N = 13.16%

0.4510 g gaben nach der Natron-

Salpeterschmelze 0.1326 g BaSO_4 ; S = 4.04%

Hieraus berechnet sich für C : N = 3.38.

Verglichen mit den Analysen der auf Metallfreiheit berechneten Werthe der Zinksalze aus den vorhergehenden Darstellungen, ergibt sich wieder die ungefähre Uebereinstim-

mung der einzelnen Quotienten C:N, während jedoch die entsprechenden Procentzahlen selbst oft Schwankungen bis zu 2% unterliegen.

II. Versuch.

Um zu entscheiden, ob die durch Ammonsulfat bei Gegenwart von Schwefelsäure aussalzbaren Schmierer etwa beim Eindampfen des Harnes unter gewöhnlichem Drucke sich bildeten, wurden ungefähr 50 l Harn bei seiner normalen, schwach sauren Reaction im Vacuum bei einer Temperatur von 35° bis zur vollständigen Trockene eingedampft. Hierbei machte sich aber die unangenehme Erscheinung bemerkbar, dass mit zunehmender Concentration auch das Einengen immer schwieriger wurde, da besonders bei jedem neuen Einsaugen von frischem Harn ein so enormes Schäumen auftrat, dass ein Uebersteigen der Flüssigkeit in den Kühler oft unvermeidlich war. Offenbar war diese Methode des Eindampfens von Harn bei einer Darstellung der Säure im Grossen kaum verwendbar. Der zuletzt erhaltene feste Harnrückstand wurde möglichst fein zerkleinert und darauf mit 75% igeim Alkohol in der Wärme zweimal extrahirt. Die Substanz selbst wurde dann genau nach der im vorhergehenden Versuche beschriebenen Methode gewonnen. Es stellte sich nunmehr heraus, dass sich die relative Menge der mit concentrirter Schwefelsäure ausfällbaren Schmierer nicht verändert hatte, und dass auch eine verhältnissmässige Erhöhung der Ausbeute kaum zu verzeichnen war. Es wurden aus dieser Darstellung nur ca. 1/2 g gewonnen, die nur zu einer Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffbestimmung ausreichten, während der Gehalt an Schwefel nicht ermittelt werden konnte.

Analyse dieser Substanz:		Auf Aschefreiheit berechnet:	
	Aschegehalt = 0,78%		
0,2165 g ^o gaben 0,3403 g CO ₂ ;	C = 42,87%	C = 43,21%	
0,2165 „ „ 0,1017 „ H ₂ O;	H = 5,27%	H = 5,32%	
0,2347 „ „ an tr. Stickstoff			
(bei 18° und 746 mm) 27,6 ccm;	N = 13,54%	N = 13,65%	
Hieraus berechnet sich für C:N = 3,17.			

C.

Entfernung der letzten Verunreinigungen und schliessliche Ausarbeitung der Methode.*Hauptdarstellung von Substanz aus 1500 l Harn.*

In Folge der noch ziemlich grossen Schwankungen, welche die Procentzahlen der bisher ausgeführten Analysen aufwiesen, besonders aber auch wegen der nur in so geringer Menge erhaltenen Ausbeute der einzelnen Darstellungen war natürlich eine wirkliche Isolirung und genaue Charakterisirung der Substanz vollkommen ausgeschlossen gewesen. Immerhin konnte jedoch aus den angestellten Versuchen ersehen werden, dass jedenfalls ein einheitlicher Körper vorlag, der wahrscheinlich nur durch geringe Beimengungen verunreinigt war; und es ergab sich somit die Aufgabe, zunächst in genügender Weise Material zu gewinnen, dass zu einer eingehenderen Untersuchung der Substanz geschritten werden konnte.

Zu diesem Zwecke wurden ungefähr 1500 l Harn, die ich aus der hiesigen Anstalt für taubstumme Kinder erhielt, auf dem Wasserbade bei 40—50° unter Zusatz von etwas Ammoniak auf ca. 60 l concentrirt. Um eine eventuell eintretende Fäulniss des eindampfenden Harns zu verhindern, wurde stets Chloroform oder Thymol in geringen Mengen zugefügt. Der so gewonnene, dickflüssige Syrup wurde portionsweise mit 80 l 90%igen Alkohols bei gewöhnlicher Temperatur 3 Stunden lang kräftig durchgerührt, worauf die Flüssigkeit abgesaugt und der Niederschlag nochmals mit der doppelten Menge seines Gewichtes an 60%igem Alkohol extrahirt wurde. Zur Vermeidung allzu grosser Flüssigkeitsquantitäten wurde zunächst der weitaus grösste Theil des Alkohols durch Erwärmen auf dem Wasserbade bei mässiger Temperatur entfernt. Das vorher mit Schwefelsäure genau neutralisirte Extract wurde zur guten und vollständigen Abscheidung des mit wässriger Eisenammoniakalaunlösung auszufällenden Eisenniederschlages genügend mit Wasser verdünnt, um nunmehr die eben erwähnte Fällung vorzunehmen. Die weitere Verarbeitung der Flüssigkeit

wurde dann nach derselben Methode durchgeführt, wie sie gleich im Anfange des Haupttheils B, Versuch I beschrieben worden ist. Hierzu sei die Bemerkung eingefügt, dass zur vollständigen Sättigung der Flüssigkeit, vor der Herstellung des mit ammoniumsulfatgesättigter Eisenammoniakalaunlösung ausfallenden Eisenniederschlags, ungefähr 100 kg Ammonsulfat erforderlich waren. Der bis zur Chlorfreiheit mit gesättigter Ammonsulfatlösung ausgewaschene Eisenniederschlag, der die Substanz enthielt, wurde auch diesmal mit verdünnter Schwefelsäure gelöst und dann durch gelindes Erwärmen mit starkem Ammoniak vom Eisen befreit. Filtrat wie Waschwasser des Eisenhydroxydniederschlags, die zusammen 70 l betrugten, wurden nach vorheriger Neutralisation mit etwa 50 kg Ammonsulfat wieder gesättigt, worauf die bei der ersten Fällung noch zurückgebliebenen Reste der mit concentrirter Schwefelsäure auszuscheidenden Schmierer entfernt wurden. Dieselben fielen diesmal in grossen, weissen Flocken aus, die sich jedoch sehr schnell gelb bis gelbbraun färbten. Sie wurden auf glattem Filter gesammelt, um sie einer etwas eingehenderen Untersuchung zu unterwerfen, von der später noch berichtet werden wird. Der darauf bei schwach saurer Reaction mittelst ammoniumsulfatgesättigter Eisenammoniakalaunlösung wieder ausgefällte Eisenniederschlag wurde nun, nachdem er auf der Nutsche nochmals mit gesättigter Ammonsulfatlösung ausgewaschen worden war, mit der gerade ausreichenden Menge von 50%iger Schwefelsäure unter längerem Durchrühren gelöst.

Da es sich herausgestellt hatte, dass die sehr voluminösen Barytniederschläge, durch die das Eisen und die Schwefelsäure bisher entfernt wurden, trotz andauernden Auswaschens hartnäckig Substanz zurückhielten, so wurde zu ihrer Umgehung ein vollständig neues Verfahren zur Darstellung der freien Säure aus ihrem Eisenniederschlage in Anwendung gebracht:

Die schwefelsaure Flüssigkeit, welche den umgefällten Eisenniederschlag gelöst enthielt, wurde mit dem doppelten Volumen von 96%igem Alkohol im Scheidetrichter kräftig durchgeschüttelt. Nach kurzer Dauer bildeten sich beim Stehenlassen zwei Schichten, deren untere abgelassen und zum zweiten

Male mit 50%iger Schwefelsäure zur gänzlichen Lösung etwa noch nicht zersetzter Partikelchen verrührt, worauf die Flüssigkeit nochmals mit 96%igem Alkohol im Verhältniss 1:2 ausgeschüttelt wurde. Ein drittes Ausschütteln mit Alkohol erwies sich für überflüssig. Die so gewonnenen oberen alkoholischen Schichten wurden zusammen mit concentrirtem Ammoniak bis zur neutralen Reaction versetzt, wodurch ein gelblich-weisser Niederschlag, der zum grössten Theile aus Ammonsulfat bestand, ausgefällt wurde. Derselbe wurde abgesaugt und mit schwach ammoniakalischem 90%igen Alkohol drei Mal ausgewaschen. Filtrat wie Waschlüssigkeit wurden dann durch Vacuumdestillation vom Alkohol befreit. Die zurückbleibende, wässrige Flüssigkeit enthielt nur noch geringe Mengen von Schwefelsäure und Eisen. Wenn man bedenkt, dass zur eventuellen Zersetzung des ungefällten Eisenniederschlags bei dieser Darstellung aus 1500 l Harn den früheren Versuchen gemäss ungefähr 8 kg Baryumhydroxyd erforderlich gewesen wären, und dass die bei der eben beschriebenen Extractionsmethode noch vorhandenen Reste von Schwefelsäure mit 5 g Baryt entfernt werden konnten, so liegt der Vortheil dieses letzteren Verfahrens auf der Hand.

Da das ebenfalls noch in geringen Mengen anwesende Eisen in der Oxydulform vorlag, so konnte es natürlich in der gewöhnlichen Weise mit Ammoniak nicht entfernt werden. Eine vorherige Oxydation mit Salpetersäure etc. war selbstverständlich ausgeschlossen, weil ja auch dadurch die Substanz selbst irgend welche Veränderungen erleiden musste. Es wurde nunmehr eine Ausfällung mittelst Baryumcarbonat versucht, zu welchem Zwecke zur abgekühlten Flüssigkeit etwa 60 cem Barytlösung gegeben wurden, um sofort Kohlensäure bis zur neutralen Reaction einzuleiten. Aber trotz langen Stehenlassens konnte nur ein Theil des Eisens abgeschieden werden, während von der Entfernung dieses letzten Restes, der allerdings nach vorhergehender Oxydation mit Salpetersäure nur eine schwache Grünfärbung auf Zusatz von Ferrocyankalium hervorrief, einstweilen abgesehen werden musste. Nachdem die Flüssigkeit durch Zufügen von Ammoncarbonat vom Baryum

befreit worden war, wurde sie im Vacuum zur Syrupconsistenz eingeengt. Dieser dunkel gefärbte, aber ganz klare Syrup, welcher ungefähr 250 ccm betrug, wurde mit dem zehnten Theil seines Gewichtes an Eisessig versetzt und dann sofort, also ohne ihn vorher mit Alkohol zu verdünnen, unter kräftigem Umrühren in ca. 10 l absoluten Alkohols langsam eingetroppt. Die Substanz, welche sich in hellbraunen Flocken rasch zu Boden setzte, wurde abgesaugt, mit Alkohol tüchtig ausgewaschen und im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet; es ergab sich eine Ausbeute von 30 g: Substanz Z.

Der Aschegehalt betrug 1,50% Fe.

Analysen von Substanz Z.		Auf Aschefreiheit berechnet:	
a	0,2036 g gaben 0,3302 g CO ₂ :	C = 44,23%	C = 45,21%
	0,2036 „ „ 0,1118 „ H ₂ O:	N = 6,15%	H = 6,29%
	0,1936 „ „ an tr. Stickstoff		
	(bei 12° und 770 mm) 19,7 ccm:	N = 12,31%	N = 12,53%
b	0,2223 g gaben 0,3608 g CO ₂ :	C = 44,28%	C = 45,16%
	0,2223 „ „ 0,1224 „ H ₂ O:	H = 6,17%	H = 6,31%
	0,1370 „ „ an tr. Stickstoff		
	(bei 12° und 754 mm) 13,8 ccm:	N = 11,95%	N = 12,20%
	0,4063 g gaben nach d. Natron-		
	Salpeterschmelze 0,1026 g		
	BaSO ₄ :	S = 3,47%	S = 3,52%
	a) C : N = 3,61; b) C : N = 3,70.		

I. Darstellung der Präparate.

Darstellung von reiner Substanz aus dem methyl-alkoholischen Extract der Rohsubstanz Z.

Da natürlich diesen auf Aschefreiheit berechneten Procentzahlen bei einem Aschegehalt von 1,50% nicht allzu grosses Gewicht beigelegt werden konnte; so musste in erster Linie versucht werden, das Eisen auf irgend eine Art und Weise zu entfernen. Nach mancherlei erfolglos verlaufenen Versuchen wurde schliesslich eine Methode aufgefunden, welche neben einer ganz bedeutenden Herabminderung des Aschegehaltes zugleich auch eine Reinigung der Substanz von organischen Beimengungen ermöglichte.

Auf Grund der Beobachtung, dass sich der weitaus grösste Theil der aus der Hauptdarstellung erhaltenen Substanz Z in Methylalkohol löste, wurde ein Theil derselben fein gepulvert und mit wasserfreiem Methylalkohol, der zu diesem Zwecke mit Natriumsulfat getrocknet worden war, auf dem Wasserbade drei Mal extrahirt. Die intensiv braunroth gefärbte Flüssigkeit wurde auf den dritten Theil ihres Volumens eingeeengt und dann vollständig erkalten gelassen, wobei noch geringe Abscheidungen stattfanden. Von diesen wurde abfiltrirt und die Flüssigkeit in absoluten Aether unter Umrühren eingetropft: die Substanz schied sich in schönen, fast rein weissen Flocken aus. Die abgeschiedenen Flocken wurden auf der Filterplatte gesammelt, mit wasserfreiem Aether ausgewaschen und im Vacuum über Schwefelsäure ca. 8 Tage hindurch getrocknet. Dies verhältnissmässig lange Trocknen war unbedingt erforderlich, da sonst die der Substanz noch anhaftenden geringen Mengen von Aether hinreichten, dieselbe in Folge des Feuchtigkeitsgehaltes der Luft zerfliessen zu lassen. Während die so gewonnene Substanz nur Spuren von Asche enthielt, war der Aschegehalt ihres in Methylalkohol unlöslichen Rückstandes auf 3,7% gestiegen. Auf die Analysen des nunmehr gereinigten Körpers wird später zurückgekommen werden, jedoch mögen an dieser Stelle noch einige Bemerkungen über den in Methylalkohol nicht löslichen Theil der Substanz Z gestattet sein. Um zu entscheiden, ob diese Unlöslichkeit des Rückstandes entweder von seinem verhältnissmässig hohen Aschegehalt herrührte, oder ob dieselbe dadurch bedingt war, dass ein Körper von anderer Zusammensetzung vorlag, konnte nur eine diesbezügliche Elementaranalyse Aufschluss geben. Zu diesem Zwecke musste aber vorher der Gehalt an Eisen bedeutend reducirt werden und zwar nach einem Verfahren, das auf einer der nächstfolgenden Seiten eingehender beschrieben werden wird.

Analysen s. S. 280.

Analyse des Rückstandes:		Auf Aschefreiheit berechnet:
	Aschegehalt = 0,65% Fe	
0,1834 g gaben	0,2701 g CO ₂ ; C = 40,17%	C = 40,43%
0,1834 " "	0,0937 " H ₂ O; H = 5,73%	H = 5,76%
0,1834 " "	an Ascherückstand:	
	0,0016 g Fe ₂ O ₃ ; Asche = 0,65% Fe	
0,1909 g gaben an tr. Stickstoff (bei 17° und 742 mm)	23,0 ccm; N = 13,85%	N = 13,94%
0,2344 g gaben nach der Natron- Salpeterschmelze	0,0729 g BaSO ₄ ; S = 4,27%	S = 4,30%
	C : N = 2,90.	

Dieser Quotient C : N = 2,90 zeigte im Vergleich mit den früher gefundenen den niedrigsten Werth, und es erschien daher die Annahme gerechtfertigt, dass die Schwankungen der betreffenden Quotienten aus den Procentzahlen der bis jetzt dargestellten Präparate von verhältnissmässig kleineren oder grösseren Beimengungen dieses Körpers herrührten.

Der Rückstand selbst löste sich sehr leicht in Wasser auf; durch Zusatz von etwas Barytwasser entstand eine leichte Trübung, die aber nach dem Zufügen von einem Tropfen Salzsäure sofort wieder verschwand; ein Umstand, der in diesem Rückstande kein Individuum, sondern ein Gemenge von verschiedenen Körpern vermuthen liess. Diese Annahme bestätigte sich denn auch später durch die erfolglos verlaufenden Versuche, aus diesem Rückstande durch Umfällen einen einheitlichen Körper zu gewinnen.

Darstellung von reiner Substanz aus dem alkoholischen Filtrat der Rohsubstanz Z.

Die alkoholische Mutterlauge der Substanz Z, welche ungefähr 12 l betrug, wurde portionsweise unter kräftigem Umrühren mit 45 l absolutem Aether vermischt, wodurch sich eine zweite Menge Substanz in grossen, hellgelben Flocken abschied. Da dieselben jedoch Neigung zum Verschmieren zeigten, wurde die Flüssigkeit, sobald sich der Niederschlag am Boden zusammengeballt hatte, sofort abgegossen, um die Substanz mit einem Gemisch von 2 Theilen absoluten Aethers und 1 Theile Alkohol zu überdecken und tüchtig durchzu-

schütteln. Sie wurde auf dem Filter gesammelt, mit Alkohol und Aether im Verhältniss 1:1 gemischt, wiederholt ausgewaschen und im Vacuum über Schwefelsäure 8 Tage lang getrocknet. Ihre Farbe war bedeutend heller als die der Rohsubstanz Z, doch betrug ihr Aschegehalt 2,8% Eisen. Es ergab sich eine Ausbeute von 10 g: Substanz Y.

Analyse von Substanz Y:		Auf Aschefreiheit berechnet:	
a) 0.1126 g gaben 0.1878 g CO ₂ :	C = 45.49%	C = 46.78%	
0.1126 » » 0.0594 » H ₂ O:	H = 5.91%	H = 6.08%	
0.1404 » » an tr. Stickstoff			
(bei 11.5° und 765 mm) 13.3 ccm:	N = 11.44%	N = 11.77%	
b) 0.1410 g gaben 0.2350 g CO ₂ :	C = 45.48%	C = 46.75%	
0.1410 » » 0.0770 » H ₂ O:	H = 6.12%	H = 6.29%	
0.1004 » » an tr. Stickstoff			
(bei 11.5° und 765 mm) 9.6 ccm:	N = 11.55%	N = 11.88%	
0.5651 g gaben nach der Natron-			
Salpeterschmelze 0.1317 g BaSO ₄ :	S = 3.20%	S = 3.29%	
a) C:N = 3,97; b) C:N = 3,93.			

Der ziemlich beträchtliche Gehalt an Kohlenstoff, der in dem verhältnissmässig hohen Quotienten C:N zum Ausdruck kommt, rührte wohl hauptsächlich daher, dass die zur Analyse verwendete Substanz trotz langen Trocknens im Vacuum über Schwefelsäure doch nicht gänzlich vom anhaftenden Aether befreit werden konnte.

Da zu einer genauen Analyse eine Verminderung des Aschegehaltes der Substanz unbedingt nothwendig war, so wurde der Körper nach jenem Verfahren behandelt, das bereits gelegentlich der Entfernung des Eisens aus dem in Methylalkohol unlöslichen Rückstand der Rohsubstanz Z kurz angedeutet worden ist:

Es wurden ca. 4.8 g mit 150 ccm trockenem Methylalkohols bei Wasserbadtemperatur extrahirt. Vom geringen Rückstande, der nur 0,4 g betrug, wurde abfiltrirt und zur Flüssigkeit von einer frisch bereiteten, farblosen, alkoholischen Schwefelammonlösung (3 Theile Methylalkohol + 1 Theil Aethylalkohol, in dies Gemisch zuerst trockenes Ammoniakgas, dann Schwefelwasserstoff eingeleitet) tropfenweise bei guter Kühlung so viel zugesetzt, bis eine Probe des Filtrates nur noch eine minimale

Eisenreaction ergab. — Ein Ueberschuss von Schwefelammonium ist sorgfältig zu vermeiden, weil sonst leicht eine Addition von Schwefel eintritt (s. S. 285). — Vom abgeschiedenen Ferrosulfid wurde sofort abfiltrirt und die Flüssigkeit mit 1 cem Eisessig versetzt, um das Ammonsalz, welches sich in Folge der Behandlung mit Schwefelammonium gebildet hatte, wieder zu zerlegen. Die freie Säure wurde dann aus einem Gemisch von 800 cem Aether und 500 cem Aethylalkohol ausgefällt, zunächst mit Alkohol + Aether und dann zuletzt mit Essigester ausgewaschen. Letzteres Verfahren hatte sich als besonders vortheilhaft erwiesen, weil hierdurch die Substanz nach dem Trocknen im Vacuum über Schwefelsäure viel weniger hygroskopisch erhalten wurde. Die Ausbeute belief sich auf 4,0 g; der Aschegehalt war von 2,8% auf 0,52 herabgesunken. Von den Analysen wird später ausführlicher berichtet werden.

Darstellung eines Bleisalzes aus dem Filtrat der Substanz Y und Wiedergewinnung der freien Säure.

Da eine Probe der alkoholisch-ätherischen Mutterlauge der Substanz Y nach dem Eindampfen auf dem Wasserbade einen ziemlich beträchtlichen Rückstand hinterliess, so wurde dieses Filtrat durch Vacuumdestillation auf den dritten Theil seines ursprünglichen Volumens concentrirt, wodurch der weitaus grösste Theil des Aethers entfernt wurde. Nachdem die Flüssigkeit durch alkoholisches Ammoniak neutralisirt worden war, konnte aus ihr mittelst alkoholischer Bleiacetatlösung ein in rein weissen Flocken ausfallendes Bleisalz gewonnen werden. Das Filtrat desselben erzeugte zwar mit alkoholischer Bleiacetatlösung keinen weiteren Niederschlag, wohl aber entstand ein solcher, wenn mit einigen Tropfen alkoholischen Ammoniaks abgestumpft wurde, selbst bei noch stark saurer Reaction der Flüssigkeit. In Folge dessen wurde nunmehr zurückneutralisirt und abwechselnd bald alkoholische Bleiacetatlösung, bald alkoholisches Ammoniak eingetragen, als noch eine neue Abscheidung jener weissen Flocken zu bemerken war. Natürlich musste hierbei, um ein eventuelles Mitausfallen von basischem Bleiacetat zu verhindern, eine stets neutrale oder schwach

saure Reaction der Flüssigkeit beobachtet werden. Um diese letztere genau zu erkennen, wurde nach jedem neuen Zufügen von alkoholischem Ammoniak das Filtrat der Bleifällung auf seine Reaction hin mittelst Alkannalösung geprüft, und zwar wurde jedesmal nur soviel Ammoniak eingetragen, bis eben eine schwache, violette Färbung der Flüssigkeit bemerkt werden konnte. Auf diese Weise wurden noch ungefähr 50 g an trockenem Bleisalze gewonnen.

Nachdem dasselbe auf der Filterplatte abgesaugt und mit 96^o/oigem Alkohol gründlich ausgewaschen worden war, wurde es in ziemlich viel Wasser suspendirt und durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Bleisulfid wurde abfiltrirt, mit warmem, schwefelwasserstoffhaltigem Wasser längere Zeit hindurch ausgewaschen und nun Filtrat nebst Waschwasser vom anhaftenden Schwefelwasserstoff durch Einleiten von Luft befreit. Die gesammte Flüssigkeitsmenge wurde darauf im Vacuum zum Syrup eingedampft. Ein zuerst beabsichtigtes Einengen bis zur Trockne erwies sich leider als unausführbar, da selbst bei einem Steigern der Temperatur auf 60^o kein Wasser vom Syrup mehr überging. Auch ein fast 10-stündiges Trocknen im Kohlensäurestrom hatte nur wenig Erfolg. In Folge dessen wurde nunmehr der braunroth gefärbte Syrup in nicht allzuviel Methylalkohol, der über Natriumsulfat getrocknet worden war, gelöst. Die Substanz wurde sodann durch Eintropfen ihrer methylalkoholischen Lösung in absoluten Aether wieder ausgefällt. Sie schied sich in sehr grossen, weissen Flocken ab und zeigte die Tendenz, zu verschmieren; deshalb wurde die Flüssigkeit, sobald sich der Niederschlag zu Boden gesetzt hatte, schnell abgegossen, die Substanz aber sofort wieder mit wasserfreiem Aether überschichtet und mit dem Glasstabe so gut als möglich zerkleinert. Sie wurde auf der Filterplatte gesammelt, mit trockenem Aether reichlich ausgewaschen und im Vacuum getrocknet. Die Ausbeute belief sich auf ungefähr 16 g; die Substanz selbst besass eine weisse Farbe, ihr Aschegehalt betrug noch nicht 0,5%. Um sie analysenrein zu erhalten, wurde sie nochmals in wasserfreiem Methylalkohol gelöst und durch Zusatz von Aether wieder aus-

geschieden. Diesmal setzte sie sich äusserst feinflockig ab, ohne auch nur im Geringsten zu verschmieren, und wurde sofort auf der Filterplatte gesammelt. Nach dem Auswaschen mit Aether und zuletzt mit etwas Essigester gelangte sie im Vacuum über Schwefelsäure zur Trockne. Sie wurde als Substanz X bezeichnet.

Neue Darstellung der Säure aus 2501 Harn.

2501 Harn wurden unter den nämlichen Bedingungen, wie sie bei der Hauptdarstellung ausführlicher beschrieben worden sind, zum Syrup eingeengt. Genau nach jener Methode wurde dann auch die weitere Verarbeitung des Harnsyrups bis zur Gewinnung des durch Eisenammoniakalaun aus ammoniumsulfatgesättigter Lösung ausfällbaren Eisenniederschlags, sowie dessen Umfällung vorgenommen. Im Gegensatz zu früher wurde jedoch diesmal der mit verdünnter Schwefelsäure zersetzte, umgefällte Eisenniederschlag zur Gewinnung des Ammonsalzes der Säure nicht im Scheidetrichter mit dem doppelten Volumen von 96%igem Alkohol ausgeschüttelt, sondern ungefähr mit der 5fachen Menge seines Gewichtes an absolutem Alkohol, der schwach ammoniakalisch gemacht worden war, 2 Stunden lang verrührt. Vom abgeschiedenen Niederschlage wurde abgesaugt und das Filtrat zur Verjagung des Alkohols concentrirt. Nachdem der letzte Rest von Schwefelsäure durch einige Cubikcentimeter Barytlösung und ein eventueller Ueberschuss wieder durch etwas kohlen-saures Ammon entfernt worden war, wurde nunmehr die Flüssigkeit im Vacuum zur Trockne eingedampft. Der ca. 10 g betragende Rückstand wurde mit wasserfreiem Methylalkohol, der mit 2—3 ccm Eisessig versetzt worden war, extrahirt und die nochmals filtrirte Flüssigkeit in ein Gemisch von gleichen Theilen Alkohol und Aether unter gutem Umrühren langsam eingetropft. Die in schönen, gelblich bis weissen Flocken ausfallende Substanz wurde auf die Filterplatte gebracht, zunächst mit Alkohol + Aether (1:1), dann mit Essigester ausgewaschen und im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet. Sie wurde auf diese Weise, ohne vorher nochmals umgefällt zu werden, vollkommen ana-

lysenrein erhalten: ihr Aschegehalt bestand nur aus ganz geringen Mengen von Eisen. Eine Probe des Körpers löste sich glatt in absolutem Methylalkohol auf, ein Zeichen, dass die Säure nicht mehr mit jener Substanz, der der niedrige Quotient C:N eigenthümlich war, verunreinigt sein konnte.

II. Analysen der einzelnen Präparate.

Die Substanz machte bei der Analyse die nämlichen Schwierigkeiten, auf die bereits Mühle¹⁾ gelegentlich der Analysen des Amphopeptons aufmerksam gemacht hat.

Trotz eines dreiwöchigen Aufbewahrens des Körpers im Vacuum über Schwefelsäure war es nicht möglich, den Alkohol, welcher vielleicht in der Form von Krystallalkohol vorhanden war, gänzlich zu entfernen. Ebenso erwies sich ein Trocknen bei 70° wegen der leichten Zerfliessbarkeit der Substanz als unausführbar — ein Trocknen über 70° war in Folge eintretender Zersetzungen überhaupt ausgeschlossen. Um diesen Uebelständen abzuweichen, wurde die zu analysirende, frisch gefällte Säure jedesmal erst 10—14 Tage lang im Vacuum über Schwefelsäure aufbewahrt und dann erst im Trockenschrank bei 70° zur Gewichtskonstanz gebracht, die gewöhnlich nach Verlauf von weiteren 8 Tagen erreicht war.

Die Kohlenstoff-Wasserstoffbestimmungen wurden mit Kupferoxyd und Bleichromat ausgeführt.

Zur Ermittlung des Schwefelgehaltes wurden fast immer 0,4—0,5 g verwendet. Um eine Addition von Schwefel zu vermeiden, welche während eines langen Aufbewahrens im Trockenschranke durch die Verbrennungsgase der darunter befindlichen Gasflamme hätte eintreten können, wurde die Substanz ohne vorheriges Trocknen mit Actznatron, das aus Natrium hergestellt worden war, im Silbertiegel über der Spiritusflamme unter allmählichem Zusatz von Kaliumnitrat verschmolzen. Die weisse Schmelze wurde in der Porzellanschale zweimal mit Salzsäure zur Trockne eingedampft, der

¹⁾ Mühle, Versuche zur Reindarstellung des Amphopeptons. Inaugural-Dissertation, Leipzig. 1901.

Rückstand in Wasser gelöst, mit etwas Salzsäure versetzt und siedend mit Chlorbaryum gefällt. Das genaue Gewicht der verbrannten Substanz wurde dadurch bestimmt, dass eine zweite, kleinere Menge der Säure getrocknet und aus der sich ergebenden Gewichtsabnahme die der Analysesubstanz berechnet wurde.

Zur Analyse gelangten die in ihrer Darstellung bereits beschriebenen Präparate 1—4. Ausserdem wurde noch ein Theil des aus dem methylalkoholischen Extract der Rohsubstanz Z gewonnenen Präparates aus einem Gemisch von gleichen Theilen Aethylalkohol und Essigester umgefällt und analysirt. Diese Umfällung ist deshalb massgebend, weil bei ihr ein wesentlicher Theil der Substanz in der Mutterlauge verblieb.

I. A. Substanz aus dem methylalkoholischen Extract der Rohsubstanz Z. (Seite 273.)

a) Aschegehalt: nur in Spuren.

0,2046 g gaben 0,3392 g CO ₂ ;	C = 45,20%
0,2046 „ „ 0,1150 „ H ₂ O;	H = 6,29%
0,2006 „ „ an tr. Stickstoff (bei 11° und 758 mm) 21,2 ccm;	N = 12,67%
0,1842 g gaben an tr. Stickstoff (bei 11° und 758 mm) 19,5 ccm;	N = 12,69%
0,3758 g gaben nach der Natronsalpeterschmelze 0,0986 g BaSO ₄ ;	S = 3,61%

b) Aschegehalt: 0,0009 g auf 0,2479 g.

0,2479 g gaben 0,4135 g CO ₂ ;	C = 45,49%
0,2479 „ „ 0,1378 „ H ₂ O;	H = 6,23%
0,1365 „ „ an tr. Stickstoff (bei 19° und 743 mm) 14,8 ccm;	N = 12,39%

Auf Aschefreiheit berechnet:

C = 45,59%
H = 6,26%
N = 12,41%

I. B. Dieselbe Substanz umgefällt. (Seite 280.)

a) Aschegehalt: 0,0007 g auf 0,2382 g.

0,2382 g gaben 0,3945 g CO ₂ ;	C = 45,17%
0,2382 „ „ 0,1244 „ H ₂ O;	H = 5,86%
0,2351 „ „ an tr. Stickstoff (bei 16° und 752 mm) 24,5 ccm;	N = 12,18%

Auf Aschefreiheit berechnet:

C = 45,30%
H = 5,87%
N = 12,20%

b) Aschegehalt: 0,0008 g auf 0,2340 g.

0,2340 g gaben 0,3872 g CO ₂ ;	C = 45,13%
0,2340 „ „ 0,1237 „ H ₂ O;	H = 5,96%
0,2182 „ „ an tr. Stickstoff (bei 13° und 754 mm) 22,8 ccm;	N = 12,37%
0,4126 g gaben nach der Natronsalpeterschmelze 0,1062 g BaSO ₄ ;	S = 3,53%

C = 45,26%
H = 5,98%
N = 12,41%

S = 3,54%

II. Gereinigte Substanz Y. (Seite 276.)

		Auf Aschefreiheit berechnet:	
a) Aschegehalt: 0,0012 g auf 0,2570 g.			
0,2570 g	gaben 0,4246 g CO ₂ ;	C = 45,06%	C = 45,28%
0,2570 »	» 0,1387 » H ₂ O;	H = 6,05%	H = 6,08%
0,1880 »	» an tr. Stickstoff (bei		
15° und 751 mm)	19,3 ccm;	N = 12,02%	N = 12,09%
0,4104 g	gaben nach der Natron-		
	Salpeterschmelze 0,0956 g BaSO ₄ ;	S = 3,20%	S = 3,25%
b) Aschegehalt: 0,0012 g auf 0,2342 g.			
0,2342 g	gaben 0,3878 g CO ₂ ;	C = 45,16%	C = 45,29%
0,2342 »	» 0,1239 » H ₂ O;	H = 5,93%	H = 5,96%
0,2056 »	» an tr. Stickstoff (bei		
15° und 751 mm)	20,9 ccm;	N = 11,91%	N = 11,97%

III. Substanz aus der Bleifällung. (Seite 277.)

		Auf Aschefreiheit berechnet:	
a) Aschegehalt: 0,0011 g auf 0,2956 g.			
0,2956 g	gaben 0,4865 g CO ₂ ;	C = 44,89%	C = 45,07%
0,2956 »	» 0,1627 » H ₂ O;	H = 6,17%	H = 6,20%
0,2009 »	» an tr. Stickstoff (bei		
14° und 739 mm)	21,3 ccm;	N = 12,26%	N = 12,31%
0,4093 g	gaben nach der Natron-		
	Salpeterschmelze 0,1032 g BaSO ₄ ;	S = 3,47%	S = 3,48%
b) Aschegehalt: 0,0010 g auf 0,2582 g.			
0,2582 g	gaben 0,4252 g CO ₂ ;	C = 44,92%	C = 45,09%
0,2582 »	» 0,1450 » H ₂ O;	H = 6,29%	H = 6,32%
0,1594 »	» an tr. Stickstoff (bei		
15° und 757 mm)	16,4 ccm;	N = 12,15%	N = 12,19%

IV. Substanz der neuen Darstellung. (Seite 278.)

		Auf Aschefreiheit berechnet:	
a) Aschegehalt: 0,0013 g auf 0,2207 g.			
0,2207 g	gaben 0,3638 g CO ₂ ;	C = 44,96%	C = 45,22%
0,2207 »	» 0,1191 » H ₂ O;	H = 6,05%	H = 6,08%
0,2457 »	» an tr. Stickstoff (bei		
24° und 759 mm)	26,6 ccm;	N = 12,42%	N = 12,49%
b) Aschegehalt: 0,0014 g auf 0,2312 g.			
0,2312 g	gaben 0,3805 g CO ₂ ;	C = 44,90%	C = 45,17%
0,2312 »	» 0,1232 » H ₂ O;	H = 5,97%	H = 6,01%
0,2164 »	» an tr. Stickstoff (bei		
24° und 759 mm)	23,1 ccm;	N = 12,36%	N = 12,42%
0,4244 g	gaben nach der Natron-		
	Salpeterschmelze 0,1020 g BaSO ₄ ;	S = 3,31%	S = 3,33%

Wie aus diesen Analysen ersichtlich, ist der Aschegehalt aller Präparate sehr gering; nur in dem zuletzt dargestellten steigt er bis zu 0,60%.

Den Analysen gemäss wurde für die Säure als einfachste Molekularformel aufgestellt: $C_{35}H_{56}N_8SO_{19}$.

Nach ihrer Darstellungsmethode wurde sie bezeichnet als:
„Uroferrinsäure“.

Folgende Tabelle veranschaulicht, dass die empirisch gefundenen Procentzahlen den aus der Formel $C_{35}H_{56}N_8SO_{19}$ berechneten entsprechen:

	Gef. Procente:										Ber. Procente:
	I. A.		I. B.		II.		III.		IV.		
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	
C	45.20	45.59	45.30	45.26	45.28	45.29	45.07	45.09	45.22	45.17	45.45 %
H	6.29	6.26	5.87	5.98	6.08	5.96	6.20	6.32	6.08	6.01	6.08 %
N	12.68	12.41	12.20	12.41	12.09	11.97	12.31	12.19	12.49	12.42	12.12 %
S	3.61	—	—	3.54	3.25	—	3.48	—	—	3.33	3.46 %

Die Analysen der aus den verschiedensten Darstellungen stammenden Präparate ergaben übereinstimmende Werthe. Die aus dem Bleisalz gewonnene freie Säure zeigte in Bezug auf die übrigen analysirten Präparate die gleichen Procentzahlen; auch war die Zusammensetzung der Substanz nach dem Umfällen dieselbe geblieben. Aus diesen Gründen muss die Uroferrinsäure als einheitlicher Körper bezeichnet werden. Dementsprechend wurde auch die Constanz ihres Baryum- und Zinksalzes erwiesen.

III. Darstellung und Analyse von Salzen.

A. Das Zinksalz.

Es wurde jedesmal ca. 1 g Uroferrinsäure in wenig Wasser gelöst und mit frisch geschlemmtem, alkalifreiem Zinkoxyd fünf Minuten lang gekocht. Nachdem das Filtrat auf dem

Wasserbade eingeeengt worden war, wurde es in absoluten Alkohol eingetroppt, wodurch sich das Zinksalz in feinen, weissen Flocken abschied. Dieselben wurden auf der Filterplatte gesammelt, mit absolutem Alkohol ausgewaschen und im Vacuum über Schwefelsäure zwei Tage lang getrocknet. Die einzelnen Präparate wurden dann im Trockenschrank bei 70° zur Gewichtconstanz gebracht. Während bei der ersten Darstellung das Einengen des Filtrates auf dem Wasserbade geschah, wurde es später durch Destillation im Vacuum vorgenommen: Die Analysen zeigten bei diesem letzteren Verfahren im Vergleich mit den berechneten Procentzahlen bessere Uebereinstimmungen.

1. Darstellung:

- a) 0,2094 g gaben nach dem Abrauchen mit verdünnter Salpetersäure 0,0472 g ZnO; Zn = 18,01 %
 b) [0,2020 g gaben an tr. Stickstoff bei 14° und 752 mm 15,9 ccm; N = 9,32 %]
 c) [0,1980 g gaben an tr. Stickstoff bei 13° und 750 mm 15,7 ccm; N = 9,35 %]

2. Darstellung:

- a) 0,2111 g gaben an tr. Stickstoff bei 16° und 755 mm 17,5 ccm; N = 9,75 %
 b) 0,3213 g gaben nach dem Abrauchen 0,0692 g ZnO; Zn = 17,31 %
 c) 0,2006 g gaben an tr. Stickstoff bei 18° und 748 mm 17,2 ccm; N = 9,87 %

3. Darstellung:

- a) 0,2846 g gaben nach dem Abrauchen 0,0610 g ZnO; Zn = 17,22 %
 b) 0,2372 g gaben an tr. Stickstoff bei 19° und 747 mm 19,8 ccm; N = 9,59 %

B. Das Barytsalz.

Zur Gewinnung des Baryumsalzes wurde die abgekühlte, wässrige Uroferrinsäurelösung mit überschüssigem Barytwasser versetzt und sofort Kohlensäure eingeleitet. Darauf wurde aufgeköcht, vom Baryumcarbonat abfiltrirt, das Filtrat im Vacuum eingeeengt und das Barytsalz mit Alkohol gefällt. Bei diesem Verfahren muss vor Allem beachtet werden, dass das Einleiten von Kohlensäure möglichst schnell und auch nur bis zur schwach alkalischen oder höchstens neutralen Reaction

geschieht, weil sonst leicht Zersetzungen eintreten, welche die Darstellung von constanten Präparaten verhindern.

1. Darstellung:

0,2682 g gaben nach dem Veraschen und Abrauchen mit verdünnter Schwefelsäure 0,1427 g BaSO_4 ; Ba = 31,32 %

2. Darstellung:

0,2283 g gaben 0,1203 g BaSO_4 ; Ba = 31,03 %

3. Darstellung:

a) 0,2302 g gaben 0,1198 g BaSO_4 ; Ba = 30,63 %

b) 0,2681 g erforderten 15,8 ccm $\frac{1}{10}$ N- H_2SO_4 ; N = 8,09 %

c) 0,2891 g erforderten 17,3 ccm $\frac{1}{10}$ N- H_2SO_4 ; N = 8,20 %

Die nachfolgenden beiden Tabellen zeigen, dass die gefundenen Procentzahlen der Baryum- und Zinksalze mit den aus der Formel berechneten gut übereinstimmen:

A. Zinksalz.

	Gefundene Procente			Berechnet für $\text{C}_{35}\text{H}_{50}\text{N}_8\text{SO}_{19}\text{Zn}_3$
	I.	II.	III.	
Zn	18,01 %	17,31 %	17,22 %	17,61 %
N	—	9,75 % u. 9,87 %	9,59 %	10,05 %

B. Baryumsalz.

	Gefundene Procente			Berechnet für $\text{C}_{35}\text{H}_{50}\text{N}_8\text{SO}_{19}\text{Ba}_3$
	I.	II.	III.	
Ba	31,32 %	31,03 %	30,69 %	30,99 %
N	—	—	8,09 % u. 8,20 %	8,41 %

Aus diesen Analysenwerthen folgt, dass die Uroferrinsäure, auf die einfache Formel berechnet, eine 6basische Säure ist.

IV. Eigenschaften der Uroferrinsäure.

a) Allgemeines Verhalten.

Die Säure ist durch Aether gefällt ein lockeres, weisses Pulver, das, wenn es vom anhaftenden Aether vollständig befreit, nur wenig hygroskopisch ist, sich jedoch äusserst leicht

in Wasser, gesättigter Ammonsulfatlösung und auch in trockenem Methylalkohol löst. Während verdünnte Lösungen eine gelbliche Farbe besitzen, geht dieselbe bei grösserer Concentration in ein dunkles Braunroth über. In absolutem Alkohol ist die Uroferrinsäure schwer löslich; dagegen löst sie sich überhaupt nicht in Benzol, Chloroform, Aether, Essigester und Petroläther. Bei den bisher angestellten Versuchen ist sie noch nicht im krystallisirten Zustande erhalten worden.

Ihr Schwefelgehalt wird selbst durch eine längere Behandlung mit Schwefelwasserstoff nicht verändert. Wohl aber erfährt der Procentgehalt an Schwefel eine wesentliche Erhöhung, wenn eine Lösung der Säure mit verhältnissmässig viel Schwefelammon behandelt wird; so wurde gelegentlich eines Versuchs eine Zunahme von 3,47% auf 5,64% festgestellt. Wie später noch ausführlicher berichtet werden wird (s. S. 297), kann ungefähr die Hälfte des Schwefels durch ein längeres Kochen mit starker Salzsäure als Schwefelsäure abgespalten werden. In dieser Hinsicht zeigte die Uroferrinsäure das Verhalten einer Aetherschwefelsäure.

Die Substanz reagirt stark sauer: blaues Lackmuspapier wird scharf ziegelroth gefärbt. Sie zerfliesst sofort auf der Zunge und hinterlässt einen eigenthümlichen, bittern und unangenehmen Geschmack. Das Zink- und Baryumsalz, die beide in Wasser sehr leicht löslich sind, werden von absolutem Alkohol aus concentrirten, wässrigen Lösungen in rein weissen Flocken gefällt.

Bereits früher wurde erwähnt, dass die Säure beim Eindampfen auf dem Wasserbade Veränderungen erleidet, indem Körper gebildet werden, die aus ammoniumsulfatgesättigter Lösung durch Zusatz von concentrirter Schwefelsäure ausgeschieden werden können, sich in dieser Beziehung also ganz wie Albumosen verhalten, aber zum Unterschied von denselben weder Millon'sche noch Biuretreaction geben (s. später S. 288 f.).

b) Das Molekulargewicht

der Uroferrinsäure, welches sich aus der Formel $C_{35}H_{56}N_8SO_{19}$ zu 924 berechnet, konnte trotz aller Bemühungen leider nicht

experimentell festgestellt werden. Die verschiedensten Versuche zur Bestimmung der Siedepunktserhöhung mit Methylalkohol als Lösungsmittel und der Gefrierpunktserniedrigung in wässriger Lösung nach Beckmann waren sämtlich erfolglos und zeigten unter sich die widersprechendsten Werthe. Eine zur einigermaassen befriedigenden Erklärung dieser Thatsache angestellte Untersuchung der elektrischen Leitfähigkeit der Uroferrinsäure ergab, dass die Säure bei jenen angewendeten Concentrationen ungefähr zu $\frac{1}{5}$ dissociirt sein musste.

c) Die Säure gibt folgende Reactionen:

1. Millon'sche Reactionen stets negativ. Es entsteht beim Zusatz des Reagens eine Fällung, dieselbe wird beim Kochen nur bräunlich, nie aber röthlich gefärbt.

2. Biuretreaction stets negativ.

3. Adamkiewicz' und Xanthoproteinreaction stets negativ.

4. Molisch'sche Probe stets negativ.

5. Alkalische Bleiacetatlösung spaltet selbst bei langem Kochen keinen Schwefel ab.

6. Phosphorwolframsäure erzeugt im Gegensatze zu den von M. Siegfried¹⁾ isolirten Antipeptonen α und β schon in sehr verdünnten, wässrigen Lösungen weisse, voluminöse Niederschläge. Hierin unterscheidet sich auch die Uroferrinsäure von der in der Einleitung erwähnten Oxyproteinsäure,²⁾ die mit Phosphorwolframsäure überhaupt keine Fällungen gibt.

7. Quecksilbersulfat und Quecksilbernitrat erzeugen auch schon in stark verdünnten, wässrigen Lösungen bedeutende, in weissen Flocken ausfallende Niederschläge, dagegen verursachen

8. Quecksilberchlorid und Pikrinsäure keine Fällungen.

9. Auf Zusatz von Eisenchlorid, Silbernitrat und Bleiacetat tritt erst bei ziemlich concentrirten Lösungen eine Trübung ein.

¹⁾ M. Siegfried. Ueber Antipepton. II. Mittheilung, Diese Zeitschrift, Bd. XXXV.

²⁾ S. Anmerkung auf Seite 253.

10. Metaphosphorsäure ruft weder eine Fällung, noch eine Trübung hervor.

11. Im Gegensatz zu der zuweilen im Harn vorkommenden Chontroidinschwefelsäure ruft eine wässrige Uroferinsäurelösung weder unmittelbar noch auf Zusatz von Essigsäure in Eiweisslösungen eine Trübung oder Fällung hervor.

d) Die Farbe der Säurelösung.

Die nochmalige Prüfung einer ziemlich beträchtlichen Menge von Uroferrinsäure auf geringe Verunreinigungen, als Harnindikan etc., welche die Farbe der Säurelösungen vielleicht hätten verursachen können, ergab auch hier wieder ein negatives Resultat (s. S. 267). Das gewöhnliche Entfärbungsverfahren durch Behandeln einer wässrigen Lösung mit Thierkohle bei gewöhnlicher Temperatur erwies sich als unausführbar, weil fast die Gesammtmenge der angewendeten Substanz in der Thierkohle zurückblieb. In Folge der leichten Zersetzlichkeit der Uroferrinsäure konnte auch ein Kochen ihrer wässrigen Lösung mit Thierkohle nicht vorgenommen werden. Um zu entscheiden, ob die Farbe der Säurelösung eigenthümlich sei oder nicht, wurde

1. die Uroferrinsäure in Methylalkohol gelöst; mit Thierkohle einige Zeit lang gekocht, filtrirt und die Substanz mit Aether wieder ausgefällt. Nachdem sie abgesaugt und getrocknet worden war, zeigte ihre Lösung noch die nämliche Färbung als vorher.

2. Ebenso vermochte eine Behandlung mit frisch bereitetem Wasserstoffsperoxyd keine Entfärbung zu bewirken; im Gegentheil, die rothe Farbe der Lösung wurde noch intensiver.

3. Nunmehr wurden ungefähr 0,3 g Substanz in 2 ccm Wasser gelöst und mit 1 ccm Hydrazinlösung versetzt; auch hierdurch war eine Aenderung der ursprünglichen Farbe nicht zu ermöglichen; dieselbe blieb auch weiter bestehen trotz Erwärmens auf dem Wasserbade und längeren Stehenlassens der Flüssigkeit.

4. Endlich wurden ungefähr 1 g Uroferrinsäure in 15 ccm Wasser gelöst, mit etwas verdünnter Schwefelsäure versetzt

und zur Flüssigkeit verdünnte Baryumpermanganatlösung portionsweise solange zugegeben, bis das Filtrat eben schwach rosa gefärbt erschien. Nachdem dies letztere mittelst frisch dargestellter Barytlösung mangan- und schwefelsäurefrei gemacht worden war, wurde zur Ausfällung des überschüssigen Baryts Kohlensäure bis zur neutralen Reaction der Flüssigkeit eingeleitet. Darauf wurde aufgeköcht, vom Baryumcarbonat abfiltrirt, das Filtrat im Vacuum zum Syrup, der fast farblos aussah, eingeeengt und durch Zusatz von absolutem Alkohol das Baryumsalz gefällt. Da die Ausbeute trotz jedesmaligen Absaugens der Niederschläge und wiederholten Auswaschens derselben mit warmem Wasser nur 0,25 g betrug, so konnte bloss eine Baryumbestimmung ausgeführt werden:

0,2345 g gaben nach dem Abrauchen mit verdünnter Schwefelsäure
 0,1582 g BaSO_4 ; Ba = 39,71 %.

Offenbar war durch dieses Verfahren die Entfärbung der Substanz lediglich auf Kosten ihrer Zusammensetzung geschehen, denn in Anbetracht des gewöhnlichen Procentgehaltes von 30,99 % Ba des Barytsalzes musste zweifellos eine Zersetzung stattgefunden haben.

e) Optisches Verhalten.

Die Uroferrinsäure ist optisch activ, sie dreht die Ebene des polarisirten Lichtstrahls nach links. In Folge der störenden Färbung auch nur einigermaassen concentrirterer Lösungen musste von einer genauen Bestimmung ihres specifischen Drehungsvermögens Abstand genommen werden.

Es zeigte sich, dass eine ca. 0,43 %ige wässrige Lösung, die gerade noch zur Polarisation verwendbar war, im Halbschattenapparate im 10 cm-Rohr bei 18° um $0,13^\circ$ nach links drehte. Hieraus würde sich das specifische Drehungsvermögen der Uroferrinsäure annähernd berechnen zu:

$$[\alpha_D]^{18} = -32,5.$$

V. Untersuchung der durch Schwefelsäure aus gesättigter Ammonsulfatlösung des Harns ausfällbaren Substanzen.

Schon gelegentlich der Darstellung von Uroferrinsäure aus 1500 Liter Harn wurde darauf aufmerksam gemacht, dass die

durch concentrirte Schwefelsäure, welche mit gesättigter Ammonsulfatlösung entsprechend verdünnt worden war, aus dem ammonsulfatgesättigten Harnextract ausfällbaren Substanzen damals (s. S. 270) in besonders feinflockiger Form erhalten wurden, was zu einer etwas eingehenderen Untersuchung derselben anregte.

Die Flocken wurden auf einem glatten Filter gesammelt und mit schwach angesäuarter, gesättigter Ammonsulfatlösung ausgewaschen. Es zeigte sich bald, dass der ammonsulfathaltige Niederschlag aus zwei gänzlich von einander verschiedenen, organischen Körpern bestand: Der eine löste sich sehr leicht in kaltem Wasser auf, der andere war darin schwer löslich. Um diese Substanzen von einander zu trennen, wurden die Flocken auf der Filterplatte mit eiskaltem Wasser bis zur vollkommenen Schwefelsäurefreiheit ausgewaschen. Die nicht mit in Lösung gegangene, schwach bräunlich gefärbte Substanz löste sich äusserst leicht in heissem Wasser, in Alkohol und in Aether. Sie wurde zunächst durch Kochen mit Thierkohle entfärbt, um darauf die nunmehr farblose Flüssigkeit auf dem Wasserbade zu concentriren. Beim Erkalten schieden sich Krystalle in schönen, weissglänzenden Blättchen aus, die nochmals aus 50%igem Alkohol umkrystallisirt wurden. Durch Erhitzen sublimirten sie und erwiesen sich auch in ihrem sonstigen Verhalten als Benzoessäure: ihr Schmelzpunkt lag bei 121,5°.

Der in kaltem Wasser lösliche Theil wurde zur Abscheidung des grössten Theiles des noch darin enthaltenen Ammonsulfats auf dem Wasserbade stark eingeengt: hierbei setzte sich auch der andere Bestandtheil des zu untersuchenden Niederschlages als zähe, klebrige Masse an den Wänden der Porzellanschale ab. Diese Schmierer wurden sorgfältig gesammelt, in nicht zu viel Wasser gelöst und die geringen Mengen von Schwefelsäure durch Baryt entfernt. Nachdem der überschüssige Baryt durch etwas kohlen-saures Ammon wieder ausgefällt worden war, wurde das Filtrat auf dem Wasserbade zum Syrup concentrirt. Derselbe wurde mit dem fünfzehnten Theile seines Gewichtes an Eisessig versetzt,

filtrirt und in absoluten Alkohol unter Umrühren eingetroppt. Die sich in feinen, hellbraunen Flocken abscheidende Substanz wurde auf die Filterplatte gebracht, mit Alkohol tüchtig ausgewaschen, um auch noch die letzten Reste von etwa anhaftender Benzoesäure zu entfernen, und im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet. Der so gewonnene Körper zeigte grosse Aehnlichkeit mit der Uroferrinsäure, jedoch war er in absolutem Aethylalkohol so gut wie gar nicht, in Methylalkohol dagegen schwer löslich.

Analyse der Substanz:		Auf Aschefreiheit berechnet:
	Aschegehalt = 0.9 %	
a) 0.3080 g gaben 0.5740 g CO ₂ ;	C = 50.83 %	C = 51.28 %
0.3080 „ „ 0.1620 „ H ₂ O;	H = 5.89 %	H = 5.94 %
0.2622 „ „ an tr. Stickstoff		
(bei 14° u. 747 mm) 27.7 ccm;	N = 12.35 %	N = 12.46 %
b) 0.2312 g gaben 0.4286 g CO ₂ ;	C = 50.57 %	C = 51.02 %
0.2312 „ „ 0.1268 „ H ₂ O;	H = 6.14 %	H = 6.20 %
0.2266 „ „ an tr. Stickstoff		
(bei 14° u. 747 mm) 25.0 ccm;	N = 12.90 %	N = 13.02 %
0.4557 g gaben nach d. Natron-Salpeterschmelze 0.0618 g BaSO ₄ ;	S = 1.86 %	S = 1.88 %

Da sich auch diese Substanz als ziemlich starke Säure erwies, so wurde aus ihr ein Zinksalz nach der früher erwähnten Methode dargestellt:

0.3288 g gaben nach dem Veraschen und Abrauchen mit verdünnter Salpetersäure 0.0432 g ZnO;	Zn = 10.56 %
0.2785 g gaben an tr. Stickstoff (bei 14° und 752 mm) 25.8 ccm;	N = 10.91 %

Die Substanz wurde in Methylalkohol gelöst und durch Zusatz von absolutem Aethylalkohol wieder gefällt. Ein Theil dieser umgefällten Säure wurde zu Analysen, der andere zur Herstellung eines Zinksalzes verwendet.

Analyse der umgefällten Substanz:

Aschegehalt: nur in Spuren!		
a) 0.2698 g gaben 0.4950 g CO ₂ ;		C = 50.48 %
0.2698 „ „ 0.1404 „ H ₂ O;		H = 5.88 %
0.2348 „ „ an tr. Stickstoff (bei 16° und 750 mm) 26.0 ccm;		N = 12.89 %
0.4140 „ „ nach der Natron-Salpeterschmelze 0.0606 g BaSO ₄ ;		S = 2.13 %

b) 0,1801 g gaben	0,3349 g CO ₂ ;	C = 50,72%
0,1801 „ „	0,0976 „ H ₂ O;	H = 6,07%
0,2158 „ „	an tr. Stickstoff (bei 18° und 749 mm)	
	24,6 ccm;	N = 13,16%

Analyse des Zinksalzes der umgefällten Substanz:

a) 0,2192 g gaben	nach dem Veraschen 0,0301 g ZnO; Zn = 11,03%
b) 0,2407 „ „	an tr. Stickstoff (bei 15° und 743 mm)
	23,4 ccm;
	N = 11,26%

Für die freie Säure ergeben sich als mittlere Analysenwerthe:

$$C = 50,87\%; \quad H = 6,02\%.$$

$$N = 12,89\%; \quad S = 2,01\%.$$

Es wäre durchaus verfrüht, aus diesen gefundenen Procentzahlen eventuell eine Formel für die Säure aufzustellen. Wenn auch gegen die Annahme eines vielleicht vorliegenden Gemisches von mehreren Körpern die Thatsache spricht, dass sich die Zusammensetzung der Substanz nach dem Umfällen nur unwesentlich verändert hat, so fehlten doch vorläufig jede weiteren Mittel, um die Säure als Individuum bezeichnen zu können.

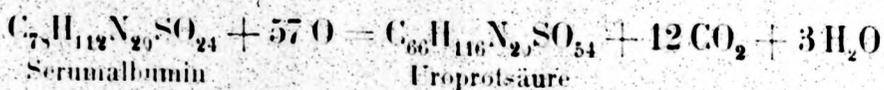
VI. Spaltungsversuche.

Durch die Spaltungsversuche sollte vor Allem die Frage beantwortet werden, ob die Uroferrinsäure in Beziehung zu den Eiweisskörpern steht, und es war zu vermuthen, wenn es gelingen sollte, charakteristische Eiweisspaltungsproducte zu isoliren, dass sie in Folge von mangelhafter Oxydation der Proteinsubstanzen gebildet worden sei.

Cloetta¹⁾ hatte bei der Spaltung seiner Uroprotsäure einfache Producte, als Ammoniak, Kohlensäure und Ameisensäure, nachgewiesen. Daneben fand er noch einen hochmolekularen Körper, der den zuerst von Schmiedeberg mit dem Namen «Melanine» bezeichneten Substanzen ähnelte und ausser Stickstoff noch Schwefel enthielt. Diese bei der Spaltung gewonnenen Resultate hatten Cloetta genügt, seine Uroprotsäure als einen «directen Eiweissabkömmling» zu bezeichnen, der durch eine «sehr intensive Oxydation» entweder aus einem

1) Cloetta, Arch. f. exper. Pathol. und Pharm. Bd. 40, S. 36 ff.

Albumin oder einem Globulin entstanden ist. Besonders wird auf die nahe Beziehung, in der die Uroprotsäure zum Serumalbumin steht, durch die Gleichung:



aufmerksam gemacht.

Wie aus den nachfolgenden Spaltungsversuchen deutlich zu erschen ist, kann im Gegensatz zur Cloetta'schen «Uroprotsäure» die von mir aufgefundene Uroferrinsäure nicht als ein directer Eiweissabkömmling bezeichnet werden, sondern höchstens als ein eiweissähnlicher Körper, d. h. die Uroferrinsäure ist wahrscheinlich aus der Zertrümmerung des grossen Eiweissmoleküls hervorgegangen, jedoch unter Verlust gewisser, den echten Eiweisskörpern und ihren directen Abkömmlingen, als Albumosen und Peptonen, besonders eigenthümlichen Atom-complexe.

Der erste Spaltungsversuch sollte nur als eine Orientirung dienen und wurde unter Anlehnung an die Arbeiten von Kossel und Kutscher und M. Siegfried ausgeführt.

A. Spaltung von 5 g Uroferrinsäure mit Salzsäure im Bombenrohr.

5 g Uroferrinsäure wurden mit der dreifachen Menge an starker Salzsäure (spec. Gew. = 1,12) im Bombenrohr bei 115° ungefähr 7 Stunden lang erhitzt. Beim Oeffnen des Rohres zeigte es sich, dass geringe Mengen von Kohlensäure vorhanden waren. In der Flüssigkeit, welche einen intensiven Geruch nach geschwefelten Producten, wie z. B. Aethylsulfid besass, hatten sich ziemlich beträchtliche Mengen jener sog. Melaninstoffe abgeschieden. Nachdem die Flüssigkeit mit der zehnfachen Menge Wasser verdünnt worden war, wurde sie filtrirt und ein Theil des Filtrates zur Prüfung auf Ameisensäure mit Wasserdämpfen überdestillirt. Eine Probe des Destillates wurde mit frisch gefälltem, sorgfältigst ausgewaschenem Quecksilberoxyd in der Kälte kurze Zeit geschüttelt, darauf schnell filtrirt und zur Ausscheidung jener charakteristischen, weissen Krystallblättchen von ameisensaurem Quecksilber-

oxydul einige Zeit stehen gelassen und nun die Flüssigkeit zum längeren Sieden erhitzt. Aber trotzdem dieser Versuch öfters wiederholt wurde, so konnte doch weder eine Krystallbildung, noch eine Abscheidung von metallischem Quecksilber wahrgenommen werden: ein sicheres Zeichen, dass keine Ameisensäure vorhanden war. -- Der Rest des Destillates wurde mit Aether ausgeschüttelt. Nach dem Verdunsten der ätherischen Lösung zeigte sich nicht der geringste Rückstand, ein Beweis, dass bei der Spaltung keine mit Wasserdämpfen flüchtige und in Aether lösliche Producte gebildet worden waren.

Die salzsaure, verdünnte Zersetzungsflüssigkeit wurde mit Phosphorwolframsäurelösung unter Vermeidung jeglichen Ueberschusses ausgefällt, der Niederschlag abgesaugt und mit kalter, 5%iger Schwefelsäure bis zur Chlorfreiheit ausgewaschen.

a) Der Phosphorwolframsäureniederschlag,

der amorph ausgefallen war und auch durch Kochen in Wasser und längeres Stehenlassen der Flüssigkeit nicht krystallisirt erhalten werden konnte, welcher Umstand schon auf die Abwesenheit der Hexonbasen schliessen liess, wurde unter gelindem Erwärmen und Zusetzen von etwas Ammoniak in nicht zu viel Wasser gelöst. Zu dieser Lösung wurde Barythydrat in kleinem Ueberschuss gegeben, das Filtrat durch Kohlensäure vom Baryt befreit und auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft. Die ammoniakfreie, wässrige Lösung des Rückstandes wurde zur Untersuchung auf Hexonbasen so lange mit Silbernitrat versetzt, als eine Probe der Flüssigkeit mit Barytwasser eben eine Gelbfärbung hervorrief. Hierbei war in geringen Mengen ein flockiger Niederschlag entstanden, der sich auf Zusatz von ammoniakalischem Silbernitrat noch etwas vermehrte. Dieser feinflockige Niederschlag wurde selbst nach längerem Stehen nicht krystallinisch: er wurde abgesaugt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt und das Filtrat vom Silbersulfid auf dem Wasserbade eingeeengt. Alle Bemühungen, aus dem allerdings nur sehr geringen Syrup eventuell auch durch Zusatz von Alkohol Krystalle zu erhalten, waren erfolglos, und es erschien, als

ob diese Silberfällung in Folge der Anwesenheit von noch nicht vollständig zersetzter Substanz erhalten worden war.

Zur weiteren Prüfung auf Arginin, Histidin und Lysin wurde das stark silberhaltige Filtrat dieser Silberfällung mit fein gepulvertem Baryt in der Kälte gesättigt, der entstandene dunkel gefärbte Niederschlag sofort abgesaugt und wiederholt mit Barytwasser ausgewaschen. Er wurde darauf in Wasser suspendirt und nach Zusatz von Salzsäure und Schwefelsäure anhaltend geschüttelt. Das Filtrat vom Chlorsilber und Baryumsulfat gab auf Zusatz von Phosphorwolframsäure auch nicht die geringste Trübung: ein Zeichen der Abwesenheit von Arginin und Histidin.

Auch das Filtrat der Silberbarytfällung wurde mit Schwefelsäure und Salzsäure versetzt und filtrirt. Auf Zusatz von Phosphorwolframsäure fiel ein weisser, amorpher Niederschlag aus, der wie bereits vorhin beschrieben zersetzt wurde. Das vom überschüssigen Baryt befreite Filtrat wurde auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft und ein Theil des Rückstandes auf Xanthinbasen untersucht. Zu diesem Zwecke wurde derselbe im Porzellanschälchen mit Salpetersäure zur Trockne eingedampft und darauf mit Natronlauge befeuchtet; jedoch war jene charakteristische Xanthinreaction in diesem Falle nicht zu beobachten.

Der andere Theil des Rückstandes wurde zum Nachweis von Lysin mit der fünffachen Menge an festem Platinchlorid in möglichst wenig Wasser gelöst, die Flüssigkeit filtrirt und mit Alkohol und Aether bis zur beginnenden Trübung versetzt, worauf über Nacht an einem kalten Orte zur Abscheidung von Lysinplatinchloridkrystallen stehen gelassen wurde. Am folgenden Morgen war nur ein geringer Bodensatz zu bemerken, und es wurde deshalb zu der vollkommen klaren Flüssigkeit wieder etwas Aether gegeben und stehen gelassen. Nachdem dieses Verfahren öfters wiederholt worden war, hatten sich endlich nach Verlauf von 6 Tagen einige kleine Krystalle abgesetzt, die aber keine Aehnlichkeit mit den sonst so charakteristischen Lysinplatinchloridkrystallen besaßen. Um ihre Menge zu erhöhen, wurde die Flüssigkeit abgossen, mit

diesen Krystallen geimpft und zur weiteren Krystallisation sich selbst überlassen: eine Vermehrung der eingepfropften Krystalle konnte jedoch auf keine Weise erzielt werden.

b) Das Filtrat vom Phosphorsäureniederschlag.

Nach dem Entfernen der Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure mit Barythydrat und Wiederausfällen eines eventuellen Ueberschusses durch kohlensaures Ammon wurde die Flüssigkeit auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft und ihr Rückstand in Wasser unter Zugabe von etwas Salpetersäure gelöst. Um alles Chlor auszufällen, wurde die schwach salpetersaure Flüssigkeit mit Silbernitrat im grossen Ueberschusse versetzt, vom Chlorsilber abgesaugt und mit Ammoniak neutralisirt. Nach dem Verfahren, welches M. Siegfried¹⁾ zur Abscheidung von Glutaminsäure und Asparaginsäure angewendet hat, wurde zur Flüssigkeit abwechselnd Silbernitratlösung und ammoniakalische Silbernitratlösung gefügt, wodurch ein geringer, feinflockiger Niederschlag, der sich aber bald schwärzte, ausfiel. Er wurde abfiltrirt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das zum Syrup eingeeengte Filtrat des Silbersulfids erstarrte nach einiger Zeit krystallinisch in feinen Blättchen: doch liess sich in Folge der geringen Ausbeute ein Nachweis einer jener beiden Säuren leider nicht ermöglichen.

Das Filtrat dieser Silberfällung wurde mit farblosem Schwefelammon entsilbert und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit absolutem Alkohol am Rückflusskühler wiederholt extrahirt und der in Alkohol unlösliche Theil in etwas Wasser gelöst, mit Thierkohle entfärbt und in siedenden Alkohol gegossen. Beim Erkalten der Flüssigkeit setzten sich weisse Flocken ab, aber auch hier wieder in so geringer Menge, dass eine Analyse nicht ausgeführt werden konnte.

Aus der alkoholischen Lösung des Rückstandes wurde nach vorheriger Neutralisation mit alkoholischem Ammoniak durch Zusatz von alkoholischem Silbernitrat ein Silbersalz

1) M. Siegfried, Ueber Antipepton. II. Mitteilung. Diese Zeitschr., Bd. XXXV.

erhalten. Dasselbe wurde abgesaugt, mit absolutem Alkohol bis zur Silberfreiheit des Filtrates ausgewaschen und im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet, bis Gewichtsconstanz erreicht war. Die Ausbeute betrug ca. 2 g.

Analyse des Silbersalzes:

0,2113 g gaben 0,1018 g Ag: Ag = 48,18 %

0,2113 „ „ 0,1480 „ CO₂: C = 19,10 %

0,2113 „ „ 0,0576 „ H₂O: H = 3,06 %

0,2389 „ „ an tr. Stickstoff

(bei 19° u. 749 mm: 14,6 ccm: N = 7,04 %.

Eine einfache Formel lässt sich aus diesen Procentzahlen nicht berechnen.

B. Spaltung von ca. 23 g Uroferrinsäure durch Kochen mit Salzsäure und Zinnchlorür.

Es wurden 22,7 g Uroferrinsäure, die 20,2 g trockner Substanz entsprachen, mit 70 g starker Salzsäure (D = 1,12) und 30 g Zinnchlorür 78 Stunden lang am Rückflusskühler mit Unterbrechungen gekocht.

Auch diesmal machte sich der schon bei der ersten Spaltung erwähnte intensive Geruch bemerkbar, doch verschwand derselbe nach ungefähr 24-stündigem Kochen. Ein über den Rückflusskühler gehaltenes, angefeuchtetes Bleipapier begann sich nach einiger Zeit zu bräunen. Diese Entwicklung von allerdings nur geringen Mengen von Schwefelwasserstoff war insofern bemerkenswerth, als die Uroferrinsäure keinen mit alkalischer Bleiacetatlösung bei Abwesenheit von Reductionsmitteln abspaltbaren Schwefel enthält.

Nachdem der Kochprocess beendet war, wurde die Flüssigkeit, in welcher wieder jene Melaninstoffe beobachtet werden konnten, erkalten gelassen und dann so lange mit Wasser verdünnt, bis keine weitere Abscheidung dieser braunen Substanz mehr stattfand. Die Melanine wurden abgesaugt, mit Wasser ausgewaschen und zwecks einer Untersuchung ihres Stickstoff- und Schwefelgehaltes bei 100° zur Gewichtsconstanz gebracht. Die Ausbeute belief sich auf 2,5 g.

0,2392 g verbrauchten 7,8 ccm $\frac{1}{10}$ N—H₂SO₄: N = 4,48 %.

Zur Ermittlung des Schwefelgehaltes wurden 0,5968 g mit Natron und Salpeter verschmolzen, die Schmelze in Wasser gelöst, mit Salzsäure zweimal eingedampft und die Lösung dieses Rückstandes heiss mit Chlorbaryum gefällt: Die Flüssigkeit zeigte auch nicht die geringste Trübung. Hierdurch war der Beweis erbracht worden, dass das untersuchte Melanin keinen Schwefel enthielt.

Das Filtrat von den Melaninen wurde im Maasskolben zum Liter aufgefüllt und hiervon 40 ccm, die 0,8060 g zersetzter Substanz entsprachen, zur Prüfung auf Schwefelsäure heiss mit Baryumchlorid gefällt.

0,8060 g gaben 0,1072 g BaSO_4 ; S = 1,82%.

Demnach war also ungefähr die Hälfte des in der Uroferrinsäure enthaltenen Schwefels durch die Zersetzung mit Salzsäure und Zinnchlorür als Schwefelsäure abgespalten worden.

Zur Untersuchung auf Ammoniak wurden weitere 40 ccm der Zersetzungsflüssigkeit mit Magnesia usta¹⁾ destillirt: Die in den 40 ccm gelösten 0,8060 g erforderten 30,5 ccm $\frac{1}{10}$ N— H_2SO_4 ; N = 5,20%. Da jedoch die Vermuthung nahe lag, dass bei dieser Bestimmung auch vielleicht durch die Spaltung gebildete organische Basen wie Methylamin etc. mit in Rechnung gezogen sein könnten, so wurde das Destillat der Ammoniakbestimmung mit Natronlauge überdestillirt und das entweichende Gas in Salzsäure aufgefangen. Die noch ziemlich

1) Anmerkung von M. Siegfried. Wie aus Versuchen, über die demnächst Herr Fr. Müller berichten wird, hervorgeht, wird bei der Destillation mit Magnesia usta, die auch noch nach dem Glühen im Platintiegel carbonathaltig ist, Kohlensäure abgespalten und, namentlich wenn bei der Destillation das Destillationsrohr in das Destillat eintaucht, von diesem absorbirt. Hierdurch entstehen ganz wesentliche Fehler bei der Titration, die durch anhaltendes Kochen des Destillates vor der Titration zu vermeiden sind. Da bei der hier mitgetheilten Bestimmung das Destillat vor der Titration nicht gekocht wurde, ist die hier ermittelte Ammoniakmenge zu niedrig gefunden.

Ob und inwieweit die von den verschiedensten Autoren veröffentlichten Ammoniakbestimmungen mittelst Magnesiadestillation fehlerhaft sind, darüber können nur die Mittheilungen der betreffenden Verfasser über die Art der Ausführung der Bestimmung entscheiden.

stark saure Flüssigkeit wurde auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft, ihr Rückstand, der in absolutem Alkohol unlöslich war, in etwas Wasser gelöst und mit Platinchloridlösung versetzt. Nach einiger Zeit fielen die charakteristischen Platinsalmiakkrystalle aus. Um eine möglichst vollständige Abscheidung derselben zu bewirken, wurde zur Flüssigkeit das gleiche Volumen Alkohol gefügt.

0,2632 g gaben beim Glühen 0,1165 g Pt; Pt = 44,26%.

Aus der Formel $\text{PtCl}_4 \cdot 2 \text{NH}_4\text{Cl}$ berechnet sich 43,98% Pt.

Somit waren bei der Spaltung der Uroferrinsäure 5,20% ihres Gesamtstickstoffs als Ammoniak gebildet worden.

Die übrigen 920 ccm wurden auf etwa 3 l verdünnt, so dass ungefähr eine 2–3%ige salzsaure Lösung vorhanden war, in die zur völligen Ausscheidung des Zinns Schwefelwasserstoff eingeleitet wurde. Vom Zinnsulfid wurde abfiltrirt, der Niederschlag dreimal ausgekocht und Filtrat nebst Waschwasser zum halben Liter eingengt. Die nochmals filtrirte Flüssigkeit wurde auf 50° abgekühlt und dann so lange mit Phosphorwolframsäurelösung versetzt, bis keine Trübung mehr entstand. Dieser Niederschlag wurde nach 4stündigem Stehenlassen der Flüssigkeit abgesaugt und mit kalter 5%iger Schwefelsäure bis zur Chlorfreiheit ausgewaschen.

a) Der Phosphorwolframsäureniederschlag.

Verschiedene Versuche, denselben zum Krystallisiren zu bringen, waren erfolglos. Er wurde nunmehr nach der Methode, wie sie im ersten Spaltungsversuch beschrieben worden ist, zersetzt und die barytfreie Flüssigkeit zur Trockne eingedampft. Es zeigte sich, dass der grössere Teil des Rückstandes in Wasser und selbst in rauchender Salzsäure unlöslich war. Nachdem er abfiltrirt worden war, löste er sich leicht in Ammoniak auf und konnte aus dieser Lösung durch Zusatz von Salzsäure im Ueberschuss wieder ausgefällt werden; in seinem ganzen Verhalten erwies er sich als der Rest der noch in der Zersetzungsflüssigkeit vorhandenen Melanine. Das stark salzsaure Filtrat wurde zur völligen Trockne wieder eingedampft und der so gewonnene Rückstand mit kaltem, ab-

solutem Alkohol extrahirt. Die alkoholische Lösung wurde mit einer gleichfalls alkoholischen Lösung von Platinechlorid, die sehr concentrirt war, im Ueberschusse versetzt und der sich in geringen Mengen abscheidende Platinniederschlag abfiltrirt. Durch eine Analyse wurde er als Platinsalmiak identificirt. Sein Filtrat wurde mit noch mehr Alkohol verdünnt und an einem kalten Orte stehen gelassen. Als am folgenden Tage noch keine Krystallisation eingetreten war, wurde zur Flüssigkeit Aether bis zur beginnenden Trübung gefügt und das Gefäß wieder einen Tag stehen gelassen. Nachdem dieses Verfahren fast 3 Wochen lang täglich wiederholt wurde, konnte zwar im Laufe der Zeit eine Zunahme der sich am Boden absetzenden Verschmierungen beobachtet werden, aber eine Bildung von Krystallen war nicht zu bemerken.

Da auf diese Weise keine Lysinplatinechloridkrystalle erhalten werden konnten, so wurde die Flüssigkeit nebst ihren Abscheidungen auf dem Wasserbade eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und das Platin durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in der Wärme entfernt. Das Filtrat wurde zum Syrup eingeeengt. Dieser letztere, welcher kaum 0,3 g Trockensubstanz enthalten konnte, wurde in 50%igem Alkohol gelöst, mit einigen Tropfen Natronlauge neutralisirt und mit alkoholischer Pikrinsäurelösung versetzt. Aber auch hierdurch war es nicht möglich, Lysin in der Form seines sonst so sicher darzustellenden Pikrates nachzuweisen.

Das Resultat dieser Versuche war demnach, dass zwar bei der Spaltung eine geringe Menge von organischen Basen sich gebildet hatte, aus welcher aber keine der bekannten Hexonbasen isolirt werden konnte.

b) Das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag wurde zur Entfernung der überschüssigen Phosphorwolframsäure und der Schwefelsäure mit heisser Barytlösung im kleinen Ueberschusse versetzt und ein Theil des abgesaugten und ausgewaschenen Barytniederschlages mit verdünnter Essigsäure gekocht und das Filtrat hiervon zur Prüfung auf Oxalsäure

mit Chlorcalciumlösung versetzt: die Reaction verlief vollständig negativ. Der Ueberschuss von Baryt, welcher noch in der vom Barytniederschlage abgesaugten Flüssigkeit vorhanden war, wurde mit Schwefelsäure genau ausgefällt und das Filtrat auf dem Wasserbade eingeengt. Als die Concentration ziemlich vorgeschritten war, zeigte es sich, dass beim Abkühlen der salzsauren Flüssigkeit feine Blättchen ausfielen, die, unter dem Mikroskop betrachtet, die Form von rhombischen Tafeln besaßen. In dieser Beziehung ähnelten sie der Benzoesäure: auch war jener eigenthümliche, zum Niesen und Husten reizende Geruch während des nunmehr erfolgenden Eindampfens der Flüssigkeit zur Trockne bemerkbar. Der Rückstand betrug fast 10 g. Er löste sich beim Erwärmen glatt in absolutem Aethylalkohol, aus dessen Lösung unter Abkühlen und Zusetzen von alkoholischem Ammoniak reichliche Abscheidungen stattfanden. Nachdem diese letzteren abgesaugt und mit kaltem 96%igen Alkohol ausgewaschen worden waren, wurden sie in Wasser gelöst und durch Kochen mit Thierkohle entfärbt. Die farblose Flüssigkeit wurde darauf mit starker Salzsäure zur Trockne eingedampft, der Rückstand wieder in Alkohol gelöst und durch Zufügen von alkoholischem Ammoniak die in schönen weissen Flocken sich abscheidende Substanz wieder ausgefällt. Aus dem noch stark gefärbten Filtrat dieser nunmehr gereinigten Abscheidungen wurde auf dieselbe Weise eine zweite Ausbeute erhalten, die wie die erste nach dem Umfällen vollkommen frei von Chlor war. Alle Versuche, die Substanz zu krystallisiren, misslangen. Aus ihrer wässerigen und mit Alkohol bis zur beginnenden Trübung versetzten Lösung wurde nunmehr mittelst alkoholischer Kupferacetatlösung ein in schönen hellblauen Flocken ausfallendes Kupfersalz gewonnen. Nachdem dasselbe abgesaugt und mit 96%igem Alkohol ausgewaschen worden war, wurde es unter gelindem Erwärmen in der genügenden Menge Wasser gelöst, wobei aber ein geringer grüngelbter Rückstand, der wahrscheinlich aus basischem Salz bestand, verblieb. Die lasurblaue Flüssigkeit wurde mit Alkohol bis zur starken Trübung versetzt und über Nacht an einem kalten Orte stehen gelassen:

am andern Morgen hatte sich asparaginsaures Kupfer in den charakteristischen, hellblauen Blättchen zu Drüsen vereinigt ausgeschieden. Die Krystalle wurden gesammelt, mit 50%igem Alkohol tüchtig ausgewaschen und bei 115° zur Gewichtsconstanz getrocknet.

Analyse des asparaginsauren Kupfers:

0.1801 g gaben 0.0734 g CuO; Cu = 32.56%
 0.2212 g gaben an tr. Stickstoff bei 21° und
 754 mm 13.6 ccm; N = 7.10%

Für $C_4H_5NO_4Cu$ berechnen sich:

Cu = 32.63%; N = 7.19%

Demnach war also mit Sicherheit von den Amidosäuren Asparaginsäure nachgewiesen worden.