

# Über aus Proteinstoffen bei tiefgreifender Spaltung mit Salpetersäure erhaltene Verbindungen.

## II. Mitteilung.

Von

Carl Th. Mörner.

(Der Redaktion zugegangen am 25. September 1915.)

### Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Einleitung.	
1. Oxalsäure . . . . .	264
Literatur.	
Eigene Versuche.	
Der Ursprung der Oxalsäure.	
2. p-Nitrobenzoesäure . . . . .	278
Literatur.	
Eigene Versuche.	
Ausbeute von Rohsäure.	
Fraktionierung.	
Weitere Bearbeitung der Fraktionen bzw. Isolierung von p-Nitrobenzoesäure.	
Untersuchung der isolierten Säure.	
Der Ursprung der p-Nitrobenzoesäure.	
p-Nitrobenzoesäure als Indikator auf Phenylalanin in Proteinstoffen.	
Anhang (einige Erfahrungen betreffend synthetische p-Nitrobenzoesäure).	
3. Benzoesäure . . . . .	295
4. „X-Säure“ . . . . .	296
Isolierung.	
Elementaranalysen und Identifizierung.	
Reaktionsprodukt der „X-Säure“ bei energischer Einwirkung von rauchender Salpetersäure.	
Der Ursprung der Terephthalsäure.	
Anhang (betreffend das Mg-Salz der Terephthalsäure).	
5. Trinitrophenol (Pikrinsäure) . . . . .	303
Literatur.	
Eigene Versuche.	
Ausbeute von Roh-K-Pikrat.	
Die Reinigung der Substanz.	
Elementaranalysen.	
Der Ursprung der Pikrinsäure.	

## Einleitung.

In einer vorhergehenden Abhandlung<sup>1)</sup> ist über die Entstehung von Methylsulfosäure bei Spaltung verschiedener Proteinstoffe mittels konzentrierter Salpetersäure berichtet worden. Bei den fraglichen Versuchen (I—VII)<sup>2)</sup> wurden die in verschiedenen Stadien der Isolierung der Methylsulfosäure abgetrennten Fraktionen anderer Produkte gesammelt und zwecks weiterer Untersuchung aufgehoben. Diese Fraktionen waren, in jedem einzelnen Versuche:

a) aus der durch Salpetersäure sauren, konzentrierten Reaktionsmischung direkt isolierte Krystallmasse (= «Rohkrystalle»);

b) die durch freiwillige Verdunstung des Äthers, womit die von «Rohkrystallen» befreite, saure Reaktionsflüssigkeit ausgeschüttelt worden war, erhaltene Masse (= «Ätherverdunstungsrest»);

c) die mittels Baryumhydroxyd und Spiritus (Volumenverhältnis zwischen Spiritus und Wasser = 2:1) erhaltene kopiöse Fällung (= «Ba-Spiritusfällung 1»);

d—e) die mittels Baryumhydroxyd und Spiritus (Volumenverhältnis zwischen Spiritus und Wasser = 4:1) später erhaltenen beiden Fällungen (= «Ba-Spiritusfällung 2 bzw. 3»).

Die Resultate, über die im nachstehenden berichtet werden soll, entstammen einer Bearbeitung von «Rohkrystallen» (abgeschlossen), «Ätherverdunstungsrest» (partiell) und «Ba-Spiritusfällung 1» (nur betreffs quantitativer Bestimmung von Oxalsäure.)

### 1. Oxalsäure.

#### Literatur.

Die älteste Angabe darüber, daß Oxalsäure aus Proteinstoff (Eiereiweiß) bei energischer Behandlung mit Salpeter-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 93, S. 175—202 (1914).

<sup>2)</sup> Vers. VII, der Glutin betrifft, bleibt hier der Hauptsache nach unberücksichtigt, da bei diesem Versuch, infolge der vorbereitenden HCl-Hydrolyse des Materials, der Reaktionsverlauf durch die Einwirkung von freiem Chlor in gewissem Grade kompliziert worden ist.

säure gebildet werden kann, rührt von Hatschett<sup>1)</sup> her. Die Tatsache ist des weiteren von mehreren späteren Forschern konstatiert worden, wie Mulder,<sup>2)</sup> Berzelius,<sup>3)</sup> Mühlhäuser,<sup>4)</sup> Nencki und Sieber (Hämoglobin, Casein, Serumeiweiß),<sup>5)</sup> v. Fürth (Casein, Hornspäne),<sup>6)</sup> Habermann und Ehrenfeld (Casein)<sup>7)</sup> und Sadikoff (Kollaine).<sup>8)</sup>

Rücksichtlich der relativen Größe der Oxalsäureausbeute beschränken sich die Angaben im allgemeinen auf Ausdrücke wie «viel Oxalsäure», «reichliche Abscheidung» u. dgl. Bestimmte Zahlenangaben findet man nur bei Habermann und Ehrenfeld, die aus 50 g Casein 15 g direkt isolierte Krystalle von Oxalsäure (entsprechend 21,4% wasserfreier Säure) erhielten, und bei Sadikoff, der bei Arbeit mit Tendo-kollagen, Thioglutan und Glutin für Totaloxalsäure (wasserfrei)<sup>9)</sup> die Maximalwerte 32,3, 41,9 bzw. 46,5% fand. Wie Sadikoff richtig betont, hängt die Menge der in der Reaktionsmischung vorhandenen Oxalsäure von mehreren Faktoren, besonders der Stärke und Menge der Salpetersäure, der Temperatur und der Zeitdauer der Erwärmung, ab, und «bedeutende Schwankungen . . . sind bedingt einerseits durch Zerstörbarkeit der entstandenen Oxalsäure, anderseits durch die kleine und ungleichmäßige Geschwindigkeit der Oxalsäurebildung».

Wenn nachstehend die Resultate meiner eigenen Oxalsäurebestimmungen angeführt werden, geschieht dies unter Berücksichtigung der ebenerwähnten Verhältnisse. Einerseits ist in den vorliegenden Fällen die Salpetersäurebehandlung

<sup>1)</sup> Philosophical Transactions, 1799.

<sup>2)</sup> Jahresber. ü. d. Fortschr. d. physisch. Wissenschaften von Berzelius, Bd. 19, S. 652 (1840).

<sup>3)</sup> Ebenda, S. 655.

<sup>4)</sup> Ann. d. Chemie und Pharmacie, Bd. 90, S. 171—181 (1854).

<sup>5)</sup> Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 18, S. 392—399 (1885).

<sup>6)</sup> Über die Einwirkung von Salpetersäure auf Eiweißstoffe. Straßburg 1899.

<sup>7)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 35, S. 231—239 (1902).

<sup>8)</sup> Biochem. Zeitschr., Bd. 21, S. 35—45 (1909).

<sup>9)</sup> Bestimmt durch Ausfällung als Ca-Salz.

kräftig genug gewesen, um praktisch gesehen maximale Oxalsäurebildung herbeizuführen, andererseits aber muß, während des Fortgangs der Prozedur (besonders während der Konzentrierungsperiode), bereits gebildete Säure teilweise zerstört worden sein, weshalb die in der schließlichen Reaktionsmischung vorhandene, zur Bestimmung kommende Oxalsäure ihrer Menge nach geringer ist als die während der Reaktion insgesamt gebildete. Die angeführten Zahlen, die demnach den Charakter von Mindestwerten besitzen, dürfen wohl nichtsdestoweniger als Beiträge zur Frage nach der Größe der bei der Spaltung von Proteinstoffen mittels konzentrierter Salpetersäure in Wirklichkeit erhaltbaren Ausbeute von Oxalsäure betrachtet werden.

### Eigene Versuche.

Bei den betreffenden Versuchen ist Oxalsäure erhalten worden teils in Form von Krystallen (1), den Hauptteil der «Rohkrystalle» darstellend (a) und (in geringerer Menge) abgeschieden aus dem «Ätherverdunstungsrest» (b), teils in Form von Ca-Salz (2) aus der letztgenannten Fraktion (genauer bestimmt aus der Mutterlauge nach Abscheidung des K-Pikrats) (a) sowie aus «Ba-Spiritusfällung 1» (b), in den beiden letztgenannten Fällen unter Bearbeitung eines kleineren, aliquoten Teils, worauf auf die ganze Fraktionsmenge umgerechnet wurde.

Ad 1, a). In der unter Vermeidung höherer Temperatur als Zimmerwärme sorgfältig getrockneten Masse von «Rohkrystallen» wurde (siehe unten S. 280) die Menge «Roh-p-Nitrobenzoesäure» bestimmt, die von dem Gewicht der «Rohkrystalle» subtrahiert wurde.

Ad 1, b). Die fraglichen Krystalle, mit Äther gewaschen und an der Luft getrocknet, wurden direkt gewogen.

Ad 2, a). Nachdem die Mutterlauge mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen verdünnt worden war, wurde eine kleinere Portion abgemessen, die auf 200 ccm verdünnt wurde. Salpetersäure wurde bis zu kräftiger Kongoreaktion zugesetzt; dabei ausgefallene, braune Flocken wurden entfernt. Ammoniak wurde in geringem Überschuß zugesetzt, darauf die Mischung mit

Essigsäure schwach angesäuert. Die erwärmte Mischung wurde sodann mit Calciumchlorid in Überschuß versetzt. Nach 24 Stunden wurde abfiltriert; die Fällung wurde auf Filter nacheinander mit Wasser, Spiritus, Ammoniak und zuletzt mit Wasser (siedend heiß) gewaschen. Das Ca-Oxalat wurde (durch Auflösung in verdünnter HCl usw.) umgefällt. Titrierung mit  $n_{10}$ -Kaliumpermanganat.

Ad 2,b). Von dem luftgetrockneten, feinpulverisierten Material wurden 5 g abgewogen, die in Wärme mit konzentrierter Natriumcarbonatlösung behandelt wurden. Aus dem mit Essigsäure schwach angesäuerten, angewärmten Filtrat (+ Waschwassr) wurde Ca-Oxalat ausgefällt, wonach so verfahren wurde, wie unter 2,a) angegeben ist.

In jedem Falle wurde schließlich der erhaltene Zahlenwert auf wasserfreie Oxalsäure umgerechnet, worauf, innerhalb jeder der beiden Gruppen («1» bzw. «2») die dahingehörigen a)- und b)-Zahlen addiert wurden.

Tabelle 1.

	Material- menge kg	Oxalsäure (wasserfrei):		
		Absolute Menge		%
		g		
I. Serumeiweiß . . . . .	3,5	1. 884,8	} 1002,2	28,6
		2. 117,4		
II. Hühnereiweiß . . . . .	3	1. 582,6	} 627,0	20,9
		2. 44,4		
III. Casein . . . . .	0,85	1. 214,3	} 222,5	26,5
		2. 8,2		
VI. Ovomucoid . . . . .	0,25	1. 81,7	} 92,1	36,8
		2. 10,4		
V. Hämoglobin . . . . .	1,2	1. 245,4	} 270,2	22,5
		2. 24,8		
VI. Keratin (Schafwolle) . . . .	3	1. 1159,3	} 1228,1	40,9
		2. 68,8		
(VII. Glutin . . . . .	2,5	1a <sup>1)</sup> 715,7		28,6)

<sup>1)</sup> Die 1b)-, 2a)- und 2b)-Werte nicht bestimmt.

Die durchschnittliche Ausbeute an Oxalsäure (wasserfrei) macht, für die Versuche I—VI, 29,4 oder abgerundet 30% aus.

### Der Ursprung der Oxalsäure.

Obwohl die Tatsache, daß Proteinstoffe bei Behandlung mit Salpetersäure zur Entstehung von Oxalsäure Anlaß geben können, schon seit lange bekannt ist, fehlt es doch bisher an jedem Versuch, festzustellen, welche besonderen Gruppen innerhalb des Proteinstoffmoleküls bei dieser Reaktion oxalsäurebildend sind. Zur Beleuchtung dieser Frage schien es mir wichtig, systematisch so viele als möglich von den bisher mit Sicherheit bekannten, primären Proteinstoffspaltungsprodukten, jedes für sich, hinsichtlich eines etwaigen Vermögens, bei Behandlung mit Salpetersäure in Wärme zur Entstehung von Oxalsäure zu führen, zu prüfen. In dieser Beziehung habe ich in der Literatur nichts außer zwei vereinzelt Angaben, beide Tyrosin betreffend, gefunden. Strecker<sup>1)</sup> gibt nämlich an: «Läßt man Salpetersäure kochend auf Tyrosin einwirken, so erhält man . . . beim Abdampfen nur Oxalsäure». Auch Thudichum und Wanklyn<sup>2)</sup> konstatierten reichliche Oxalsäurebildung.

Das für die geplante Untersuchung erforderliche Material — sämtliche hierhergehörige Aminosäuren<sup>3)</sup> (nebst einigen diesen nahestehenden Verbindungen), sowie auch Repräsentanten der prostetischen Gruppen der Proteide umfassend — ist durch Kauf (von Kahlbaum, Berlin), durch Überliefern seitens Kollegen, durch Anwendung der Sammlungen des hiesigen Instituts, sowie durch Selbstdarstellung zusammengebracht worden. Meinen herzlichen Dank für wohlwollendes Entgegenkommen und wertvollen Beistand in dieser Beziehung erlaube ich mir hiermit auszusprechen den Herren Professoren I. Bang, Lund; E. Fischer, Berlin; S. G. Hedin, Upsala; A. Kossel, Heidelberg:

<sup>1)</sup> Ann. d. Chemie u. Pharmacie, Bd. 73, S. 70—80 (1850).

<sup>2)</sup> Journ. of chem. Soc., Bd. 22, S. 277—292 (1869).

<sup>3)</sup> Isoleucin ausgenommen.

P. A. Levene, New-York; K. A. H. Mörner, Stockholm, und S. P. L. Sörensen, Kopenhagen.

Es erwies sich bald als notwendig — bevor die eigentlichen Versuche angestellt wurden — zu versuchen, durch Kontrollversuche den Grad der Resistenz bzw. der Zerstörung der Oxalsäure bei Einwirkung von Salpetersäure näher kennen zu lernen. Erst wenn man diesbezügliche Kenntnis erlangt hatte, war es möglich, an sich selbst notwendigerweise fruchtlose Versuchsanordnungen zu vermeiden.

### Kontrollversuche.

Bei jedem Einzelversuch kam 0,175 g reine, krystallisierte Oxalsäure (entsprechend: 0,125 g wasserfreier Säure<sup>1)</sup>) zur Verwendung. Salpetersäure wurde von 4 verschiedenen Stärken verwendet:

Reine «verd.»	(25 % ig)	10 ccm pro Versuch	(A),
» «konz.»	(60 % ig)	5 » »	(B),
» «absolut.»	(98 % ig) <sup>2)</sup>	5 » »	(C),
Rauchende (spez. Gew. 1,52, halogenfrei, von Kahlbaum <sup>3)</sup> )		5 » »	(D).

Oxalsäure + Salpetersäure wurde in einen Erlenmeyer-Kolben von 50 ccm eingeführt, der die ganze Versuchszeit über mit einem Uhr-glas bedeckt gehalten wurde. Die Erwärmung geschah auf Wasserbad und wurde so geregelt, daß die Temperatur in gewissen Fällen, im Kolbeninhalt gemessen, ca. 90° (Ser. a), in anderen Fällen ca. 80° (Ser. b) betrug; Kontrollversuche ohne besondere Erwärmung wurden auch angestellt. Die Versuchszeit wurde variiert (siehe die besonderen Tabellen!). Schließlich wurde der Kolbeninhalt mit Wasser verdünnt, deutlich ammoniakalisch gemacht, danach mit Essigsäure schwach angesäuert und auf 200 ccm Volumen verdünnt. Erwärmung und Zusatz von Calciumchlorid in Überschuß. Das Ca-Oxalat wurde nach 24 Stunden abfiltriert, gewaschen und mit  $\frac{n}{10}$ -Kaliumpermanganat titriert.

<sup>1)</sup> Die Menge (25 % von 0,5 g betragend) ist mit Rücksicht auf die bei den Hauptversuchen der Regel nach angewandte Materialmenge, 0,5 g, gewählt.

<sup>2)</sup> Diese im Handel schwer erhältliche Säure ist mir in wohlwollender Weise von Herrn Professor S. Schmidt-Nielsen, Trondhjem, zur Verfügung gestellt worden.

<sup>3)</sup> Im folgenden (siehe S. 275) als «Rauchsäure I» bezeichnet.

Tabelle 2.

(Serie a.)

Be- schaffen- heit der Salpeter- säure	Zeit, während welcher Erwärmung auf ca. 90° C. stattgefunden hat											Ohne Er- wärmung; nach 8 Stunden
	Stunden											
	½		1		2		4		8			
	Zurückgebliebene Oxalsäure (wasserfrei):											
	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%
A	0,123	98	0,122	98	0,119	95	0,116	93	0,110	88	0,124	99
B	0,114	91	0,104	83	0,090	72	0,069	55	0,035	28	0,123	98
C	0,067	54	0,035	28	0,008	6	0	—	0	—	0,120	96
D	0,062	50	0,031	25	0,010	8	0	—	0	—	0,123	98

Tabelle 3.

(Serie b.)

Beschaffen- heit der Salpeter- säure	Zeit, während welcher Erwärmung auf ca. 80° C. stattgefunden hat							
	Stunden							
	1		2		4		12	
	Zurückgebliebene Oxalsäure (wasserfrei):							
	g	%	g	%	g	%	g	%
A	—	—	—	—	—	—	0,120	96
B	—	—	—	—	—	—	0,090	72
C	0,069	55	0,034	27	0,010	8	0	—
D	0,067	54	0,033	26	0,009	6	0	—

Ein Blick auf Tab. 2 und 3 zeigt, daß Oxalsäure, obwohl bei gewöhnlicher Temperatur auch gegen stärkste Salpetersäure resistent, bei Erwärmung relativ schnell von 60%iger oder stärkerer Säure zersetzt wird. Daraus geht auch in unverkennbarer Weise hervor, wie wichtig es ist — bei Salpetersäurebehandlung von Aminosäuren usw. zwecks Studiums ihres event. oxalsäurebildenden Vermögens —, je nach der Konzentration der angewandten Salpetersäure die Versuchszeit zu beschränken und die Temperatur in vernünftiger Weise zu regeln. Andernfalls läuft man Gefahr, ein negatives Resultat lediglich deshalb zu erhalten, weil Oxalsäure, obwohl tatsächlich gebildet, bereits vollständig hat zerstört werden können.

Unter Berücksichtigung der so gewonnenen Erfahrungen ist folgender Arbeitsplan für die Hauptversuche aufgestellt worden. Materialmenge in jedem einzelnen Versuch: 0,5 g. Salpetersäure wurde von denselben Qualitäten und in denselben Mengen wie bei den Kontrollversuchen angewandt. In erster Linie wird ein Versuch mit B-Säure<sup>1)</sup> gemacht; wenn hierbei negatives Resultat, wird mit stärkerer Säure (C- oder D-) versucht; ergibt B-Säure positives Resultat, so wird ein Versuch auch mit A-Säure an- gestellt, in allen Fällen, der Regel nach, unter Anwendung einer Temperatur von ca. 90° C.<sup>2)</sup> In einigen Fällen sind Versuche auch bei einer Temperatur von ca. 80° an- gestellt worden.<sup>3)</sup> Vor der Erwärmung wird das Material + Salpetersäure 24 Stunden lang bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen. Die Zeit- dauer der Erwärmung ist folgendermaßen gewählt worden:

Bei Versuchsordnung:	Stunden	4)
A, a)	8	(88)
„ b)	12	(96)
B, a)	4	(55)
„ b)	12	(72)
C, a)	1/2	(54)
„ b)	1	(55)
D, a)	1/2	(50)
„ b)	1	(54)

1) d. h. derselben Art Säure — ca. 60%ige — die bei den oben- erwähnten Proteinstoffversuchen in großem Maßstabe zur Anwendung gekommen ist.

2) Diese Proben werden in den Versuchsprotokollen mit «a» be- zeichnet.

3) Diese Proben werden in den Versuchsprotokollen mit «b» be- zeichnet.

4) Die in Klammern stehenden Zahlen, den Tabellen 2 und 3 ent- nommen, geben die Menge der bei den Kontrollversuchen mit entsprechen- der Anordnung vor Zerstörung bewahrt gebliebener Oxalsäure in Pro- zenten an. Wenn Oxalsäure in beträchtlicherer Menge aus dem Material gebildet wird, muß, bei Anwendung der eben angegebenen Versuchszeiten und Wärmegrade, dieselbe in der Reaktionsmischung nachgewiesen werden können.

Prüfung auf Oxalsäure, event. quantitative Bestimmung derselben, wurde in Übereinstimmung mit dem, was bei den Kontrollversuchen angegeben worden ist, ausgeführt, jedoch wurde das Ca-Oxalat aus ammoniakalischer Flüssigkeit erneut ausgefällt, nachdem die zuerst erhaltene Fällung (aus essigsäuresaurer Flüssigkeit) nacheinander mit Wasser, Spiritus, verdünntem Ammoniak und zuletzt mit Wasser (siedeheißem) gewaschen worden war. In vereinzelt Fällen (z. B. bei Phenylalanin, Phenylaminoessigsäure, Tryptophan, Hämatin) ist bei der Verarbeitung der Reaktionsflüssigkeit auftretende Fällung vor dem schließlichen Calciumchloridzusatz entfernt worden.

In Tabelle 4 finden sich die Resultate angegeben. Diejenigen Fälle, in denen keine Oxalsäurebildung beobachtet worden ist, sind mit «Neg.» bezeichnet: bei positivem Ausfall wird die Menge Oxalsäure (wasserfrei) in Prozenten der angewandten Substanz angeführt.

Tabelle 4.

	A		B		C		D	
	a	b	a	b	a	b	a	b
1. Glykokoll <sup>1)</sup> . . . .	—	—	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Phenylaminoessigsäure <sup>2)</sup> . . . .	—	—	»	—	—	—	»	—
Anilinoessigsäure <sup>3)</sup> . . . .	7	—	20	—	—	—	—	—
Leucylglycin . . . .	—	—	Neg.	—	—	—	Neg.	—
Hippursäure . . . .	—	—	»	—	—	—	»	—
2. Alanin . . . . .	—	—	»	Neg.	Neg.	Neg.	»	Neg.

<sup>1)</sup> Für die Substanzen Nr. 1, 2, 4, 5, 7, 8 und 12 wurde, größerer Gewißheit halber, über das oben angegebene Arbeitsprogramm hinaus, durch direkte Versuche festgestellt, daß sie auch bei A, a)- oder A, b)-Prüfung keine Oxalsäure ergaben.

<sup>2)</sup>  $C_6H_5 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$ . Diese Verbindung ist, in voller Analogie mit der allgemein gebräuchlichen Bezeichnung Phenylalanin, mit dem Namen: Phenylglykokoll zu belegen.

<sup>3)</sup> Diese Verbindung,  $C_6H_5 \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH$ , wird zurzeit gewöhnlich «Phenylglykokoll» genannt, welcher Name jedoch, wie oben erwähnt, zweckmäßigerweise für eine andere Verbindung zu reservieren ist.

Tabelle 4 (Fortsetzung).

	A		B		C		D	
	a	b	a	b	a	b	a	b
3. Serin(-anhydrid) . . . . .	Neg.	Neg.	43	—				
4. Valin . . . . .			Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
5. Leucin . . . . .			„	„	„	„	„	„
(6. Isoleucin . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—)
7. Asparaginsäure . . . . .			Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
8. Glutaminsäure . . . . .			„	„	„	„	„	„
9. Arginin . . . . .			„	—	—	—	„	„
Ornithin . . . . .			„	—	—	—	„	„
Harnstoff . . . . .			„	—	—	—	„	—
Guanidin . . . . .			„	—	—	—	„	—
Kreatin . . . . .	8	—	6	—				
10. Lysin . . . . .			Neg.	—	—	—	Neg.	—
11. Cystin . . . . .	8	9	19	17				
12. Phenylalanin . . . . .			Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
13. Tyrosin . . . . .	21	22	17	20				
14. Tryptophan . . . . .	6	—	14	—				
15. Histidin . . . . .			Neg.	—	—	—	Neg.	Neg.
16. Prolin . . . . .			„	—	—	—	„	„
17. Oxyprolin . . . . .			„	—	—	—	1	3
Glykosamin . . . . .	15	—	20	16				
Chondroitinschwefelsäure . . . . .	7	—	9	—				
Nucleinsäure <sup>1)</sup> . . . . .	11	—	14	—				
(Guanin) . . . . .	3	—	18	22				
Hämatin . . . . .	4	—	18	—				

Von allen den untersuchten, primäre Hydrolyseprodukte des eigentlichen Proteinstoffmoleküls ausmachenden Aminosäuren ist es demnach nur eine geringe Anzahl — Serin, Cystin, Tyrosin und Tryptophan —, bei der es sich gezeigt hat, daß sie bei

<sup>1)</sup> Aus Thymusdrüse.

direkter Behandlung mit konzentrierter (za. 60%iger) Salpetersäure mit Oxalsäurebildung reagieren.<sup>1)</sup> Die Anwendung stärker konzentrierter Säure (98%iger) hat in den geprüften Fällen zu keiner Änderung hierin geführt, was auch nicht der Fall ist, wenn rauchende Säure («Rauchsäure I»)<sup>2)</sup> — auch in erhöhter Menge, 10 ccm und darüber — zur Anwendung kam (nur betreffs Oxyprolin ist bei Anwendung der letztgenannten Säure eine, wenn auch niedriggradige, Oxalsäurebildung konstatiert worden). Für einen kleineren Teil war demnach der Ursprung der bei der Behandlung von Proteinstoffen mit konzentrierter Salpetersäure erhaltenen Oxalsäure klargestellt worden, eine befriedigende Erklärung aber dafür zu erhalten, woher die große Hauptmasse herrührt, schien recht lange nicht gelingen zu wollen. Zwar war es außer allem Zweifel gestellt, daß es sich bei den direkten Proteinstoffversuchen nicht um eine Einwirkung nur von Salpetersäure handelte, sondern daß dabei tatsächlich reichlich auftretende niedrigere Stickstoffoxyde möglicherweise den Reaktionsverlauf, in bezug auf Oxalsäurebildung, in andere Bahnen führen könnten. Das durchweg negative Resultat mit rauchender Salpetersäure schien jedoch einer solchen Annahme zu widersprechen, wodurch zunächst eine Untersuchung der Frage nahegelegt war, ob vielleicht die Oxalsäure, der Hauptsache nach, aus Atomkomplexen herrühren könnte, die, bei Säurehydrolyse, bisher nicht in Form von definierbaren Verbindungen erhalten worden waren.

Ganz unmöglich schien eine solche Annahme nicht, indem:

1. zur Bildung z. B. von 30% Oxalsäure<sup>3)</sup> theoretisch nur 8 von den durchschnittlich 50% C des Proteinstoffes erforderlich sind (zu einem geringeren Teil bereits in den 4 direkt oxalsäurereagierenden Aminosäuren zu Gebote stehend),

2. bei möglichst quantitativer Hydrolysierung gewöhnlicher, komplizierter Proteinstoffe doch stets eine bedeutende Differenz (in gewissem Grade allerdings durch die relative Mangelhaftigkeit der Analysenmethoden

<sup>1)</sup> Die prosthetischen Gruppen der Proteide repräsentierenden Substanzen ergeben durchweg Oxalsäure bei solcher Behandlung.

<sup>2)</sup> Siehe S. 275.

<sup>3)</sup> C-Gehalt: 25,67%.

erklärlich) zwischen der Menge angewandten Proteinstoffs und der Summe isolierter Aminosäuren (in welcher letztgenannter außerdem bei der Hydrolyse aufgenommenes Wasser<sup>1)</sup> enthalten ist) herrscht.

Eine zufällig gemachte Beobachtung hat mich indessen schließlich zur Erkenntnis der Tatsache geführt, daß «rauchende Salpetersäure» von ganz verschiedenartiger Beschaffenheit erhalten werden kann, und daß der Effekt in bezug auf Oxalsäurebildung aus Aminosäuren in hohem Grade durch die Beschaffenheit der angewandten Rauchsäure, in erster Linie ihren Gehalt an niedrigeren Stickstoffoxyden, im wesentlichen Stickstofftetroxyd («Untersalpetersäure») beeinflusst wird.

Nachstehend angeführte, verschiedene Rauchsäuren sind zur Prüfung gekommen:

- |            |      |  |
|------------|------|--|
| Rauchsäure | I.   | Handelsware (von Kahlbaum).  |
| »          | II.  | » (aus schwed. Apotheke).  |
| »          | III. | » (» » » »).   |
| »          | IV.  | Destillat von Handelsware (vor ca. 20 Jahren zubereitet).  |
| »          | V.   | » » » » (frischbereitet, nur das zuerst übergehende Zehntel <sup>2)</sup> ausmachend, unter Kühlung mit dem gleichen Volumen gewöhnlicher, konzentrierter Säure verdünnt). |

Die Rauchsäuren wurden hinsichtlich des spezifischen Gewichts, des Kaliumpermanganatverbrauchs<sup>3)</sup> (= Gehalt an Stickstofftetroxyd), sowie der destruierenden Einwirkung auf Oxalsäure<sup>4)</sup> geprüft. (Siehe Tab. 5!).

Nachdem Versuche, aus einigen, bei Behandlung mit gewöhnlicher konzentrierter Salpetersäure oxalsäurenegativen Aminosäuren Oxalsäure (unter auf mehrfache Weise variiertes Detailanordnung) mit Hilfe von Rauchsäure II hervorzulocken, dasselbe vollständig negative Resultat wie Rauchsäure I ergeben hatten, während bei Anwendung der Rauchsäuren III

<sup>1)</sup> Diese scheinbare Zunahme, die eine entsprechende Verminderung des «Defizits» mit sich bringt, beträgt z. B. betreffs der 5 Monoaminocarbonsäuren, Glykokoll-Isoleucin: 13,6, 11,3, 8,3, 7,4 bzw. 7,4%.

<sup>2)</sup> In unverdünntem Zustande das spezifische Gewicht 1,64 besitzend.

<sup>3)</sup> Bestimmt nach Vorschrift in Fr. Mohrs Lehrb. d. chem.-analyt. Titrimethode, 6. Aufl., Braunschweig 1886, S. 242.

<sup>4)</sup> Geprüft an 0,175 g krystallisierter (= 0,125 g wasserfreier) Oxalsäure; 10 ccm Rauchsäure; Erwärmung auf 80° 1 Stunde lang. Die Zahlen in Tabelle 5, Spalte 3, geben Prozente nicht zerstörte (zurückgebliebene) Oxalsäure an.

Tabelle 5.

	1	2	3
	Spez. Gewicht	$\frac{n}{10}$ -KMnO <sub>4</sub> pro 1 ccm Säure. ccm	Siehe Anm. 4. S. 275. %
Rauchsäure I . . . .	1,52	6,6	42
„ II . . . .	1,51	5,8	47
„ III . . . .	1,51	27,9	66
„ IV . . . .	1,55	35,5	67
„ V . . . .	1,50	71,9	83 <sup>1)</sup>

und IV deutlich positive, wenn auch quantitativ verhältnismäßig schwache Resultate erhalten worden waren, wurde eine systematische Prüfung<sup>2)</sup> mittels Rauchsäure V, als der an Stickstofftetroxyd reichsten und gleichzeitig der wenigst oxalsäuredestruierenden, vorgenommen.

Tabelle 6.

	Erhaltene Oxalsäure %
Glykokoll . . . . .	11
Alanin . . . . .	51
Valin . . . . .	3
Leucin . . . . .	8
Asparaginsäure . . . . .	33
Glutaminsäure . . . . .	5
Arginin . . . . .	21
Lysin . . . . .	19
Phenylalanin <sup>3)</sup> . . . . .	3
Histidin . . . . .	3

<sup>1)</sup> Bei 2-stündiger Erwärmung auf 80° : 75% zurückgebliebene Oxalsäure.

<sup>2)</sup> 0,5 g Substanz, 10 ccm Säure; in Zimmertemperatur 24 Stunden, danach Erwärmung auf 80° 2 Stunden lang, wonach Prüfung auf event. quantitative Bestimmung von Oxalsäure. Nennenswerte Oxalsäurebildung kommt erst während der Behandlung in der Wärme zustande.

<sup>3)</sup> Die Reaktionsmischung bildete, nach Abkühlung, ein Magma von p-Nitrobenzoesäurekrystallen.

Tabelle 6 (Fortsetzung).

	Erhaltene Oxalsäure %
Prolin . . . . .	36
Oxyprolin . . . . .	51
(Leucylglycin . . . . .	15)
(Hippursäure . . . . .	3)
(Asparagin . . . . .	28)
(Ornithin . . . . .	12 <sup>1)</sup> )

Keine Oxalsäure wurde dagegen (außer aus Harnstoff und aus Guanidin) aus Phenylaminoessigsäure (wiederholte Versuche!) erhalten, trotz deren naher Verwandtschaft zu Glykokoll und zu Phenylalanin (die Reaktionsmischung bildete, nach Abkühlung, ein Magma von p-Nitrobenzoesäurekristallen).

Natürlich sind die angeführten Zahlen nicht als absolut rücksichtlich des maximalen Oxalsäurebildungsvermögens der verschiedenen Verbindungen anzusehen, sondern können nur ein Bild davon geben, wie sich die Oxalsäurebildung bei Anwendung der hier benutzten, speziellen Versuchstechnik gestaltet.

Als Hauptresultat der letztangeführten Untersuchung ergibt sich indessen, daß sämtliche untersuchten primären Proteinstoffspaltungsprodukte, jedes für sich geprüft, das Vermögen besitzen, bei Einwirkung von an niedrigeren Stickstoffoxyden reicher, konzentrierter Salpetersäure Oxalsäure zu liefern (wenn auch, wie es scheint, mit verschiedenem Grade von Leichtigkeit). Unter solchen Umständen, und da, wie aufs deutlichste beobachtet werden kann, bei der Behandlung von Proteinstoffen mit konzentrierter Salpetersäure eine intensive, stundenlang anhaltende Bildung von niedrigeren Stickstoffoxyden<sup>2)</sup> — aus-

<sup>1)</sup> Bei dem Versuch wurde eine 0,5 g Ornithin entsprechende Quantität Ornithursäure angewandt.

<sup>2)</sup> Von augenscheinlich weit größerer Mächtigkeit, als bei der oben-erwähnten Versuchsserie experimentell hat erreicht werden können.

gelöst durch gewisse, mit konzentrierter Salpetersäure direkt kräftig reagierende Komplexe (zu denen, unserer gegenwärtigen Kenntnis nach, Serin, Cystin, Tyrosin und Tryptophan zu rechnen sind) — stattfindet, so scheint die Schlußfolgerung berechtigt, daß der wesentliche Ursprung der aus Proteinstoffen erhaltenen, reichlichen Oxalsäuremenge in sämtliche, gegenwärtig bekannte primäre Hydrolysenprodukte zu verlegen ist.<sup>1)</sup>

## 2. p-Nitrobenzoesäure.

### Literatur.

Gelegentlich ihrer Untersuchung von Produkten, entstanden durch Trockendestillation von Drachenblut, erhielten Glénard und Boudault<sup>2)</sup> bei Behandlung des «leichten Öls»<sup>3)</sup> mit Salpetersäure u. a.: «eine in Nadeln krystallisierbare, in kaltem Wasser fast unlösliche, stickstoffhaltige Säure, die Nitrodracylsäure,  $C_{16}H_6O_4 \cdot N_2O_4$ ». In einer vorläufigen Notiz, 20 Jahre später, weisen Wilbrand und Beilstein<sup>4)</sup> die Isomerie zwischen «Nitrodracylsäure» und «Nitrobenzoesäure» (d. h. der m-Säure, der einzigen früher bekannten Form) nach, worauf das Verhältnis in zwei im selben Jahre erschienenen Arbeiten von G. Fischer<sup>5)</sup> und von W. u. B.<sup>6)</sup> des weiteren klargestellt und konstatiert wird.

Die Benennung Para-nitrobenzoesäure, von Fischer eingeführt — zu einem Zeitpunkt, da von «Para-Stellung» im

<sup>1)</sup> Mit Vorbehalt vorläufig für das noch nicht untersuchte Isoleucin.

<sup>2)</sup> Ann. d. Chemie und Pharmacie, Bd. 48, S. 343—344 (1843).

<sup>3)</sup> Wesentlich bestehend aus einem Kohlenwasserstoff, von den Verfassern benannt «Dracyl»; späterer Untersuchung gemäß = Toluol. Wenn in der Literatur, z. B. in Lehrb. d. pharmaz. Chemie von E. Schmidt, 5. Aufl., Bd. 2 (1911), S. 1148, angegeben wird, daß die fragliche Säure «bei der Einwirkung von Salpetersäure auf Drachenblut» entsteht, so ist also die Abfassung allzu kontrahiert, um nicht irreführend zu sein.

<sup>4)</sup> Ann. d. Chemie u. Pharmacie, Bd. 126, S. 255—256 (1863).

<sup>5)</sup> Ann. d. Chemie u. Pharmacie, Bd. 127, S. 137—149 (1863).

<sup>6)</sup> Ann. d. Chemie u. Pharmacie, Bd. 128, S. 257—273 (1863).

Benzolkern noch nicht gesprochen wurde — steht, durch einen reinen Zufall, in Einklang mit der modernen Benzolnomenklatur und hat demnach bis auf unsere Tage unverändert beibehalten werden können. Als Ausgangsmaterial für die Darstellung der Säure in den vorerwähnten Fällen diente Toluol, das mit rauchender Salpetersäure behandelt wurde. Später ist dieselbe Säure aus mehreren verschiedenen Verbindungen, unter Anwendung verschiedener Oxydationsmittel, dargestellt worden. Auf physiologisch-chemischem Gebiet hielt die Säure ihren Einzug durch Jaffé's Entdeckung derselben im Harn nach Verfütterung von p-Nitrotoluol.<sup>1)</sup> Mit der Proteinstoffchemie wurde die p-Nitrobenzoesäure zuerst (1885) von Nencki und Sieber<sup>2)</sup> in Zusammenhang gebracht. Bei Behandlung von Hämoglobin mit rauchender Salpetersäure erhielten sie eine schwerlösliche, krystallisierende Säure, von der sie zunächst annahmen, daß sie ein spezifisches Oxydationsprodukt des mit dem Hämin verbundenen Eiweißstoffes (des Globins) sei. Fortgesetzte Versuche zeigten indessen, daß dieselbe Säure auch aus gewissen anderen Proteinstoffen (Casein und Serumeiweiß) erhalten werden konnte. Durch Elementaranalysen, Schmelzpunktbestimmung usw. wurde mit Gewißheit die Identität der gefundenen Säure mit p-Nitrobenzoesäure festgestellt. Selten ist es in der Geschichte der chemischen Wissenschaft vorgekommen, daß ein klares und deutliches Untersuchungsergebnis, wie das von N. und S., später in so hohem Grade übersehen worden ist, und zwar nicht nur in der Handbuchliteratur,<sup>3)</sup> sondern auch seitens derer, die später mit tiefer Spaltung von Proteinstoffen mittels Salpetersäure gearbeitet haben (v. Fürth, Habermann und Ehrenfeld). Noch erstaunlicher erscheint es jedoch, daß keiner der letztgenannten

<sup>1)</sup> Ber. d. deutsch. Chem. Ges., Bd. 7, S. 1673—1679 (1874).

<sup>2)</sup> a. a. O.; siehe auch: Archiv f. exper. Pathologie u. Pharmakologie, Bd. 20, S. 334—335 (1886).

<sup>3)</sup> z. B. Biochemisches Handlexikon von Abderhalden, Chemie d. Eiweißkörper von Cohnheim, Handbuch der Biochemie von Oppenheimer (die einzige derartige Arbeit — unter den mir zugänglichen —, in der die fragliche Untersuchung N. u. S.'s Beachtung gefunden hat, ist Deskriptive Biochemie von Fränkel).

Forscher bei ihren eigenen Versuchen das Auftreten dieses so charakteristischen Reaktionsprodukts bemerkt hat, besonders was v. Fürth betrifft, der mit einer so reichlichen Materialmenge wie 5 kg sowohl von Casein als von Hornspänen gearbeitet hat. Dies besonders in Anbetracht der Tatsache, daß schon in einem frühzeitigen Stadium der organisch-chemischen Forschung die fragliche Säure offenbar beobachtet (wenn auch nicht identifiziert) worden ist. So berichtet Welter,<sup>1)</sup> daß er bei Behandlung von Rindshaaren mit kochender Salpetersäure «une autre nouvelle substance» beobachtete, die, in Übereinstimmung mit seiner «amer» (= Pikrinsäure), resistent gegen Salpetersäure und löslich in konzentrierter Salpetersäure war, dagegen aber — im Gegensatz zu «amer» — «sans couleur — — — et se laissant de même précipiter par l'eau».

### Eigene Versuche.

#### Ausbeute von Rohsäure.

Zur Isolierung bezw. quantitativen Bestimmung von «Rohp-Nitrobenzoesäure» wurden «Rohkrystalle» (ihrer Hauptmasse nach bestehend aus Oxalsäure) von den verschiedenen Versuchen her, je für sich, mit 10 Gewichtsteilen Wasser geschüttelt, bis die Oxalsäure vollständig in Lösung gegangen war. Das Ungelöste wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen (bis das Waschwasser keine Kongoreaktion mehr gab), ausgepreßt, getrocknet, zuerst bei gewöhnlicher Temperatur, schließlich bei 50° C. und gewogen<sup>2)</sup> (= *Frakt. A*).

Filtrat (+ Waschwasser) wurden wiederholt mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherflüssigkeit wurde verdunsten gelassen. Der Rückstand wurde mit etwas Wasser geschüttelt, bis abgeschiedene Oxalsäurekrystalle vollständig aufgelöst worden waren. Das Ungelöste wurde in Übereinstimmung mit der Hauptportion abfiltriert usw. (= *Frakt. B*). Die Ausbeute findet sich in Tabelle 7 angegeben.

<sup>1)</sup> Ann. de chimie, Bd. 29 (1799), S. 301—305.

<sup>2)</sup> Von dem Gewicht wurde das Gewicht des bei der weiteren Bearbeitung der Fraktion abgeschiedenen Asbests (vom Filter bei der Abscheidung der «Rohkrystalle» herrührend) abgezogen.

Tabelle 7.

	Roh-p-Nitrobenzoesäure		°/o <sup>1)</sup>
	Absolute Menge		
	g		
I. Serumeiweiß . . . . .	A. 53,2	} 62,1	1,8
	B. 8,9		
II. Hühnereiweiß . . . . .	A. 86,3	} 92,8	3,1
	B. 6,5		
III. Casein . . . . .	A. 15,0	} 17,6	2,1
	B. 2,6		
IV. Ovomuroid . . . . .	A. 1,6	} 1,9	0,8
	B. 0,3		
V. Hämoglobin . . . . .	A. 32,4	} 34,3	2,9
	B. 1,9		
VI. Keratin (Schafwolle) . . . . .	A. 31,0	} 37,4	1,2
	B. 6,4		

Da aus eingehenden, vorbereitenden Versuchen, angestellt an einer schon in den 1890er Jahren aus Hühnereiweiß dargestellten und danach in unbearbeitetem Zustande aufbewahrten, größeren Portion «Roh-p-Nitrobenzoesäure» (60 g), hervorgegangen war, daß darin, außer p-Nitrobenzoesäure (die allerdings die Hauptmasse ausmacht), zwei andere aromatische Verbindungen enthalten sind, und da man außerdem mit der Möglichkeit zu rechnen hatte, daß noch andere solche vorhanden sein konnten, so wurde, zur Erleichterung des Aufsuchens bzw. Trennens der verschiedenen Substanzen, noch weiter vorgenommen eine:

#### Fraktionierung.

*Frakt. A.* Jede solche Fraktion für sich wurde auf folgende Weise behandelt. Die Substanz wurde in 10 Teilen Wasser +  $1\frac{1}{2}$  Teilen 10%igem Ammoniak gelöst.<sup>2)</sup> Die mit Knochenkohle<sup>3)</sup> bei gewöhnlicher Temperatur geschüttelte Lö-

<sup>1)</sup> Berechnet auf die angewandte Proteinstoffmenge.

<sup>2)</sup> Asbestfasern wurden abgetrennt (vgl. Anm. 2, S. 280).

<sup>3)</sup> Diese hielt etwas von der Substanz zurück, was somit verloren ging.

sung wurde filtriert. Aus dem Filtrat mittels verdünnter Salpetersäure ausgefällte Säure wurde abfiltriert, gewaschen und im Exsikkator getrocknet (= Frakt. A, a). Das Filtrat (+ Waschwasser) wurde ammoniakalisiert und auf kleines Volumen eingedampft. Nach Ansäuerung mit verdünnter Salpetersäure, wobei Fällung eintrat, wurde mit Benzol<sup>1)</sup> geschüttelt. Durch Zentrifugieren usw. wurde die Fällung abgetrennt und getrocknet (= Frakt. A, b).<sup>2)</sup>

*Frakt. B.* Wurde in verdünntem Ammoniak gelöst, mit Knochenkohle behandelt und filtriert; das Filtrat wurde mit verdünnter Salpetersäure angesäuert, worauf die Fällung abgetrennt, mit Wasser gewaschen und getrocknet wurde (= Frakt. B, a). Aus dem Waschwasser wurde durch Konzentrierung usw. eine geringe Menge Substanz erhalten (= Frakt. B, b). Das Filtrat von Frakt. B, a) wurde mit Benzol<sup>3)</sup> ausgeschüttelt, wonach durch Konzentrierung usw. eine Substanz in ganz geringer Menge erhalten wurde (= Frakt. B, c).

#### Weitere Bearbeitung der Fraktionen bzw. Isolierung von p-Nitrobenzoesäure.

Aus den vorbereitenden Versuchen hatte sich ergeben, daß die «Rohsäure», außer p-Nitrobenzoesäure, die den weit überwiegenden Bestandteil bildet, in beträchtlicher Menge eine in kochendem Wasser und in Äthylacetat schwererlösliche, bei Erhitzung nicht schmelzende Säure (dieselbe wird im folgenden bis auf weiteres als «X-Säure» bezeichnet) sowie außerdem Benzoesäure, in ganz geringer Menge, enthält. Während bei den Versuchen, p-Nitrobenzoesäure in reiner Gestalt darzustellen, die Benzoesäure keine Schwierigkeiten bereitete, erwies es sich als in hohem Grade schwierig, nur durch wiederholte Umkrystallisierung aus kochendem Wasser

<sup>1)</sup> Worin p-Nitrobenzoesäure fast unlöslich ist, zum Unterschied z. B. von Benzoesäure.

<sup>2)</sup> Aus der Benzollüssigkeit wurde erhalten: «Rohbenzoesäure» (siehe S. 295).

<sup>3)</sup> Das Benzol gab bei weiterer Behandlung «Rohbenzoesäure» (siehe S. 295).

oder durch Fraktionierung mit Äthylacetat als Lösungsmittel<sup>1)</sup> die «X-Säure» vollständig zu entfernen. Als ein wirksames und in der Anwendung bequemes Hilfsmittel hierbei erwies sich die Überführung der p-Nitrobenzoesäure in das Mg-Salz: pro 1 g Substanz wird eine zur Auflösung erforderliche Menge Norm.-Ammoniak (gewöhnlich 6—8 ccm) und ein wenig Wasser hinzugesetzt; die filtrierte und zuletzt mit Wasser auf 15 ccm verdünnte Lösung wird mit 5 ccm konzentrierter Magnesiumchloridlösung<sup>2)</sup> versetzt, wobei bald Krystallbildung eintritt; die nach einigen Stunden abgeschiedenen<sup>3)</sup> und ausgepreßten Krystalle werden aus warmem Wasser (5 Teile) umkrystallisiert. Durch Zersetzung des Magnesiumsalzes mittels verdünnter Salpetersäure und Auswaschen der abgeschiedenen Substanz mit Wasser sowie Trocknen derselben in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Exsikkator bezw. bei 50° C. erhält man p-Nitrobenzoesäure in analysenreiner Gestalt; behufs Erhaltung schön ausgebildeter Krystalle wird schließlich aus verdünntem Spiritus umkrystallisiert (pro 1 g 25 ccm 95 %iger Spiritus; zur warmen Lösung wird 100 ccm kochendes Wasser hinzugesetzt, wonach man die Flüssigkeit möglichst langsam abkühlen läßt.)

*Frakt. A, a (= Hauptfraktion).*

Orientierende Versuche.

1. Schmelzpunktprüfung.

In keinem Falle trat glatte Schmelzung ein; noch bei 250° C. und darüber war ein ungeschmolzener Rest in sämtlichen Proben vorhanden.<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Beim sukzessiven Abdampfen einer derartigen Lösung findet zwar eine Anreicherung von «X-Säure» in den zuerst abgesetzten Krystallfraktionen statt, aber auch die späteren sind «X-Säure»-haltig (die p-Nitrobenzoesäure scheint den Löslichkeitsgrad der «X-Säure» zu erhöhen).

<sup>2)</sup> 25 g krystallisiertes Salz in 100 ccm enthaltend.

<sup>3)</sup> «X-Säure» bleibt in der Mutterlauge zurück (nebst einem geringeren Teil der p-Nitrobenzoesäure).

<sup>4)</sup> Reine p-Nitrobenzoesäure schmilzt glatt bei 238° (Widemann Anm. d. Chemie u. Pharmacie, Bd. 193, S. 202—240 (1878)).

## 2. Acidimetrische Titrierung.

Das dadurch festgestellte Äquivalentgewicht lag in jedem Falle mehr oder weniger unter dem der reinen p-Nitrobenzoesäure.

## 3. Verhalten gegen Äthylacetat.

Proben von je 1 g wurden in Schüttelmaschine mit 40 ccm Äthylacetat behandelt.<sup>1)</sup> In sämtlichen fand sich ein ungelöster, weißer Rest (dem Anschein nach am reichlichsten in I und VI). Die Mischung wurde auf ein kleines Filter genommen, danach Waschen mit 5 ccm Äthylacetat. Wägung nach Trocknen bei 100°:

I. 0,13 g	IV. 0,10 g
II. 0,04 ,	V. 0,03 ,
III. 0,05 ,	VI. 0,24 ,

Die Menge «Roh-X-Säure» betrug also im Mindestfall 3, im Höchstfall 24% von Frakt. A, a); die erhaltenen Werte sind Mindestwerte, da die «X-Säure» teilweise in Lösung geht. Die vereinigten Äthylacetatfiltrate von I, III, V und VI wurden eingedampft; durch Mg-Behandlung usw. lege artis (s. S. 283!) wurde mit Leichtigkeit p-Nitrobenzoesäure mit richtigem Schmelzpunkt (237°) und Äquivalentgewicht (167,7) erhalten. Aus der Mutterlauge von dem Mg-Salz frei gemachte Säure ergab bei Behandlung mit Äthylacetat (im Verhältnis 1 g : 40 ccm) einen ungelösten, weißen Rest (= Rest von «X-Säure»).

## Gewicht der Fraktionen:

I. 39,6 g	IV. 1,2 g
II. 70,8 ,	V. 26,5 ,
III. 10,7 ,	IV. 17,3 ,

Die Fraktionen wurden, jede für sich, mit Äthylacetat (1 g : 40 ccm) behandelt; nach Abscheidung des Ungelösten (= «Roh-X-Säure») wurde die Lösung an freier Luft abdunsten gelassen. Der Abdunstungsrückstand wurde auf die oben angegebene Weise (Mg-Behandlung usw., zuletzt Umkrystallisierung aus verdünntem Spiritus) behandelt, wobei Präparate von reiner, wohlkrySTALLISierter p-Nitrobenzoesäure<sup>2)</sup> erhalten wurden. Bei Bearbeitung von Mutterlauge des Mg-Salzes (Freimachung und Behandlung der Säure mittels Äthylacetats) wurde wieder eine Portion «Roh-X-Säure» erhalten, die, in jedem einzelnen Versuch, mit der zuerst erhaltenen vereinigt wurde.

<sup>1)</sup> p-Nitrobenzoesäure löst sich leicht und vollständig in Äthylacetat, 40 ccm pro 1 g Säure.

<sup>2)</sup> Siehe ferner S. 286.

*Fraktion A, b.*

Gewicht der Fraktionen:

I. 1,4 g	IV. — <sup>1)</sup>
II. 0,5 „	V. — <sup>1)</sup>
III. — <sup>1)</sup>	VI. 0,6 g.

Die Fraktionen wurden, jede für sich, mit Mg behandelt, nach 3 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur auskrystallisiertes Mg-Salz abgeschieden und Säure daraus freigemacht (= Subfrakt. 1). Aus nach 2 Tagen bei ca. 0° des weiteren abgeschiedenen, spärlichen Krystallen von Mg-Salz wurde Säure freigemacht (= Subfrakt. 2). Aus der schließlichen Mutterlauge des Mg-Salzes wurde Säure direkt freigemacht (= Subfrakt. 3).

Schmelzpunktprüfung:

Subfraktion 1: 238—239°.

„ 2: 236—237°.

„ 3: Noch bei 280° nicht geschmolzen, aber stark gesintert.

Mit Deutlichkeit geht hieraus hervor, daß in diesen Fraktionen keine Substanz mit niedrigerem Schmelzpunkt als dem der p-Nitrobenzoesäure, insbesondere nicht die o- und m-Isomeren oder Dinitrobenzoesäure vorhanden war. Die Vortrefflichkeit des Mg-Verfahrens, um bei Reinigung der p-Nitrobenzoesäure rasch die «X-Säure» los zu werden, tritt auch hier zutage.

*Fraktion B, a—c.*

Von den hierhergehörigen Fraktionen wurden die a-, b- und c-Fraktionen je für sich vereinigt, wonach die 3 auf diese Weise erhaltenen Fraktionen je für sich bearbeitet wurden. Aus den beiden erstgenannten wurde mittels Mg-Behandlung usw. in reichlicher Menge p-Nitrobenzoesäure mit richtigem Schmelzpunkt erhalten; nicht dagegen aus der c-Fraktion (deren Menge nur 0,3 g betrug). Auch hier wurde etwas «X-Säure» angetroffen, aber kein Anzeichen der Gegenwart der o- oder der m-Isomeren beobachtet. Auch konnte mit Deutlichkeit keine andere Substanz als die eben angegebenen in der Rest-

<sup>1)</sup> In III—V waren die betreffenden Fraktionen allzu unbedeutend, um weiter untersucht werden zu können.

substanz identifiziert werden, die aus der a)- und der b)-Fraktion nach Entfernung der p-Nitrobenzoesäure und der «X-Säure» erhalten wurde (das Gewicht dieses vorläufig nicht aufgeklärten Restes betrug 2,0 bzw. 0,2 g).

#### Untersuchung der isolierten Säure.

Sämtliche aus der Hauptfraktion dargestellten Präparate bestanden aus schön perlmutterglänzenden, rein hellgelben Blättchen, die jedes Geruchs entbehrten, schwach bitteren Geschmack besaßen, unter kochendem Wasser nicht,<sup>1)</sup> dagegen aber glatt bei ca. 238° C. schmolzen. Äquivalentgewicht, bestimmt durch acidimetrische Titrierung (Indikator: Phenolphthalein): 167—167,5.

#### Elementaranalysen<sup>2)</sup>.

##### Präparat I (19,0 g).

4,620 mg ergaben	8,535 mg CO <sub>2</sub> ,	entsprechend	50,38% C,
4,620 „ „	1,24 „ H <sub>2</sub> O,	„	3,00% H.
4,030 „ „	(721 mm, 16,5° C.)	0,306 ccm N,	entsprechend 8,49% N.

##### Präparat II (46,1 g).

4,354 mg ergaben	8,025 mg C <sub>2</sub> O,	entsprechend	50,27% C,
4,354 „ „	1,195 „ H <sub>2</sub> O,	„	3,07% H.

##### Präparat III (5,6 g).

4,684 mg ergaben	8,62 mg CO <sub>2</sub> ,	entsprechend	50,20% C,
4,684 „ „	1,21 „ H <sub>2</sub> O,	„	2,92% H.

##### Präparat IV (0,35 g).

4,479 mg ergaben	8,23 mg CO <sub>2</sub> ,	entsprechend	50,11% C,
4,479 „ „	1,205 „ H <sub>2</sub> O,	„	3,01% H.

##### Präparat V (16,0 g).

4,531 mg ergaben	8,37 mg CO <sub>2</sub> ,	entsprechend	50,38% C,
4,531 „ „	1,27 „ H <sub>2</sub> O,	„	3,13% H.
4,417 „ „	(721 mm, 17°)	0,334 ccm N,	entsprechend 8,44% N.

<sup>1)</sup> Wie das der Fall bei o- und bei m-Nitrobenzoesäure ist. Schmelzpunkt in Kapillarrohr: 144 bzw. 141°. Die o-Säure hat ausgesprochen süßen Geschmack.

<sup>2)</sup> Die in dieser Abhandlung angeführten C- und H-, sowie die N-Bestimmungen sind, auf meine Veranlassung, gütigst von den Herren Privatdozenten Dr. K. Almström (Upsala) und Dr. H. Lieb (Graz) ausgeführt worden.

## Präparat VI (5,5 g).

4,334 mg	ergaben	8,00 mg	CO <sub>2</sub> ,	entsprechend	50,34% C,
4,334	„	1,18	„	H <sub>2</sub> O,	3,05% H.
4,510	„	(721 mm, 17,5°)	0,343 ccm	N, entsprechend	8,48% N.

Berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> · NO<sub>2</sub> · COOH:

C 50,28%

H 3,02%

N 8,39%

Betreffs der Identität der isolierten Säure mit p-Nitrobenzoesäure kann demnach nicht der geringste Zweifel herrschen.

Die aus der Hauptfraktion in vollkommen reiner Form dargestellte Menge dieser Säure entspricht 0,54, 1,54, 0,66, 0,14, 1,33 bzw. 0,18% des angewandten Proteinstoffmaterials. In Anbetracht einerseits der notorisch großen Verluste bei der Isolierung der Säure aus der genannten Fraktion und der beträchtlichen Menge, die auch in den übrigen Fraktionen angetroffen worden ist, andererseits der relativ untergeordneten Menge der übrigen in «Roh-p-Nitrobenzoesäure» nachgewiesenen Säuren ist es deutlich, daß sich die Menge der bei der Proteinstoff-Salpetersäurebehandlung tatsächlich gebildeten p-Nitrobenzoesäure weit treuer in den oben angeführten Werten für «Roh-p-Nitrobenzoesäure» (0,8—3,1%) abspiegelt, zumal wenn man in Betracht zieht, daß ein Teil dieser Säure in der ursprünglichen, sauren Reaktionsflüssigkeit gelöst zurückbleibt (und bei der fortgesetzten Behandlung dieser letzteren in den «Ätherverdunstungsrest» übergeht). Von Nencki und Sieber<sup>1)</sup> wird die Ausbeute der rohen Säure zu 0,6—1,5% angegeben.

## Der Ursprung der p-Nitrobenzoesäure.

Hierüber ist bisher nichts festgestellt worden. Natürlich liegt es hierbei am nächsten, an die beiden Proteinstoffbausteine zu denken, die der aromatischen Serie angehören. Von

<sup>1)</sup> A. a. O.

diesen wurde der eine, das Tyrosin — das ja mit Leichtigkeit, u. a. unter Oxalsäurebildung durch konzentrierte Salpetersäure (60%ige) zerlegt wird — bei 3 verschiedenen Versuchen<sup>1)</sup> mit vollständig negativem Resultat geprüft.

Zunächst konnte auch aus Phenylalanin, bei dessen Behandlung in Wärme mit Salpetersäure der ebengenannten Art — wobei keine sichtbare Reaktion eintrat — nichts von dem gesuchten Nitroprodukt herausgewonnen werden, weshalb dessen Auftreten bei Proteinstoffspaltung mittels solcher Säure ein Rätsel zu bleiben schien. Mit Rücksicht auf den Umstand, daß bei dem letztgenannten Prozeß eine reichliche Entwicklung von niedrigeren Stickstoffoxyden zustande kommt, wurde bei erneutem Versuch mit Phenylalanin + 60%iger Salpetersäure eine aliphatische, unter Oxalsäurebildung oxydierbare Substanz (Amylum) hinzugesetzt,<sup>2)</sup> und damit war das Ziel erreicht: p-Nitrobenzoesäure ließ sich mit Leichtigkeit aus einer solchen Reaktionsmischung isolieren. Derselbe Effekt wurde auch bei Anwendung von rauchender Salpetersäure direkt erhalten, ja, auch mittels «absoluter» (98%iger) Säure (wenn auch in weniger reichlicher Ausbeute). In sämtlichen 5 angestellten Versuchen, alle mit positivem Resultat, war die Isolierung die einfachstmögliche: die Säure,<sup>3)</sup> in Goochtiiegel abgesaugt und nacheinander mit 60%iger, 25%iger Salpetersäure und Wasser gewaschen, zeigte nach nur einmaliger Umkrystallisierung aus warmem, verdünntem Spiritus richtigen Schmelzpunkt<sup>4)</sup> und stimmte in allen übrigen geprüften Verhältnissen mit reiner p-Nitrobenzoesäure überein. Zwei Präparate wurden Elementaranalyse unterzogen, das eine (Präp. 1)

<sup>1)</sup> Über diese wird, in anderem Zusammenhange, weiter unten (S. 306) berichtet.

<sup>2)</sup> Pro 1 g Phenylalanin: 1 g Amylum, 20 ccm Säure; im Erlenmeyer-Kolben bei Zimmerwärme 24 Stunden, auf Wasserbad 2 × 10 Stunden.

<sup>3)</sup> In den 3 Versuchen mit 60%iger Säure + Amylum und mit einer Substanzmenge von 1, 1½ bzw. 10 g war die Ausbeute von Rohsäure (in getrocknetem Zustande) 0,26, 0,48 bzw. 3,88 g, entsprechend 26, 32 bzw. 39% des Phenylalanins.

<sup>4)</sup> Also hier keine Bildung von «X-Säure»; auch wurde keine Benzoesäure beobachtet.

mit 60%iger Salpetersäure + Amylum, das andere (Präp. 2) mit rauchender Säure dargestellt.

Präparat 1.

4,633 mg	ergaben	8,565 mg CO <sub>2</sub> ,	entsprechend	50,42 % C,
4,633	»	1,24	» H <sub>2</sub> O,	3,00 % H.
6,020	»	(736 mm, 18°)	0,451 ccm N,	entsprechend 8,26 % N.

Präparat 2.

4,608 mg	ergaben	8,47 mg CO <sub>2</sub> ,	entsprechend	50,13 % C,
4,608	»	1,26	» H <sub>2</sub> O,	3,06 % H.

Die Übereinstimmung mit den berechneten Werten (siehe S. 287) ist demnach befriedigend.

Der Ursprung der aus Proteinstoffen erhältlichen p-Nitrobenzoesäure ist demnach in dem Phenylalanin zu erblicken.

Auch aus dem nächst niedrigeren Homologen zu Phenylalanin, Phenylglykokoll (Phenylaminoessigsäure),<sup>1)</sup> wurde, bei analoger Behandlung, p-Nitrobenzoesäure erhalten. Die Rohsäureausbeute war reichlich (4,42 g aus 10 g), aber beträchtlich mit Benzoesäure verunreinigt (schmolz partiell bereits bei 205°, total bei 212°).<sup>2)</sup> Durch das Mg-Verfahren wurde Nitrobenzoesäure mit richtigem Schmelzpunkt erhalten.

Elementaranalyse:

4,296 mg	ergaben	7,87 mg CO <sub>2</sub> ,	entsprechend	49,96 % C,
4,296	»	1,235	» H <sub>2</sub> O,	3,22 % H.
5,090	»	(739 mm, 18°)	0,371 ccm N,	entsprechend 8,31 % N.

Mit Rücksicht auf den chemischen Verlauf bei der Bildung von p-Nitrobenzoesäure aus Phenylalanin könnte es sich denken lassen, daß in erster Linie Benzoesäure abgespalten wird, die danach nitriert wird. Übereinstimmende Beobachtungen von Griebß<sup>3)</sup> und Hollemann<sup>4)</sup> über die Nitrierung von Benzoesäure besagen indessen, daß dabei in weit überwiegender Menge m-Säure gebildet wird, während die p-Säure

<sup>1)</sup> Vgl. Anm. 2, S. 272.

<sup>2)</sup> Bei fortgesetzter, langsamer Konzentrierung der sauren Reaktionsflüssigkeit wurde eine noch benzoessäurereichere Fraktion von 0,5 g erhalten. Anzeichen der Gegenwart von «X-Säure» wurden dagegen nicht beobachtet, auch war Oxalsäure nicht vorhanden.

<sup>3)</sup> Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 8, S. 526—529 (1875).

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. physik. Chemie, Bd. 31, S. 79—96 (1899).

nur mit einzigem Prozent an der Gesamtausbeute beteiligt ist. Benzoesäure als Zwischenglied bei dem fraglichen Prozeß kann demnach ganz ausgeschlossen werden, weshalb der Eintritt der Nitrogruppe auf mehr direktem Wege geschehen muß.

#### **p-Nitrobenzoesäure als Indikator auf Phenylalanin in Proteinstoffen.**

Im vorhergehenden ist der Nachweis geführt worden, daß Phenylalanin imstande ist, p-Nitrobenzoesäure zu liefern. Unter solchen Umständen, und da keiner der übrigen, gegenwärtig bekannten Proteinstoffbausteine, ihrer Konstitution zufolge, dieselbe Eigenschaft besitzen kann, erscheint es gerechtfertigt — wenigstens bis auf weiteres —, das Auftreten von p-Nitrobenzoesäure bei der Salpetersäurebehandlung von Proteinstoffen als Indikator der Gegenwart von Phenylalanin in demselben Proteinstoff zu betrachten. Der Nachweis von p-Nitrobenzoesäure ist, besonders mit Hilfe des von mir oben angegebenen Mg-Verfahrens, eine leichte Aufgabe und aller Wahrscheinlichkeit nach sicherer durchführbar als das Isolieren des Phenylalanins selbst, wenn dessen Menge verhältnismäßig gering ist. Unter solchen Verhältnissen muß es von Interesse sein, in der fraglichen Hinsicht genauer solche Proteinstoffe zu untersuchen, aus denen es bisher, bei direkten Versuchen, nicht gelungen ist, mit Sicherheit Phenylalanin zu isolieren (nach Abderhalden und Mitarbeitern),<sup>1)</sup> nämlich Keratin aus Schafwolle, Pferdehaaren und Gänsefedern, Ichthylepidin sowie Spongin. Betreffs Schafwolle ist dies hier bereits geschehen, betreffs anderer diesbezüglicher Stoffe sind Vorbereitungen dazu von mir getroffen worden.

In solchen Fällen scheint, dem gegenwärtigen Stande unserer Kenntnisse gemäß, dem Nachweis von p-Nitrobenzoesäure, wo ein solcher vorliegt, größere Beweiskraft als dem negativen Resultat bei Versuchen,

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 46, 48 und 52.

direkt das Phenylalanin zu isolieren, zuerkannt werden zu müssen.<sup>1)</sup>

**Anhang (einige Erfahrungen, betreffend synthet. p-Nitrobenzoesäure).**

Nachstehend seien Angaben über einige die p-Nitrobenzoesäure betreffende Verhältnisse zur Ergänzung, event. Berichtigung bisher vorliegender Literaturangaben geliefert. Das Versuchsmaterial stammt von Kahlbaum her und ist einer weiteren Umkrystallisierung unterzogen worden.

*Löslichkeit.*

a) In organischen Lösungsmitteln.

Löst sich bei gewöhnlicher Temperatur reichlich in Aceton, Alkohol, Äthylacetat, Pyridin sowie auch in Äther und in Eisessig, unbedeutend in Epichlorhydrin und in Chloroform, nur spurenweise oder nicht wahrnehmbar (auch bei Kochen) in Benzol, Kohlentetrachlorid, Ligroin und in Petroleumäther. Aus Aceton- oder Äthylacetatlösung wird die Substanz bei Zusatz von Ligroin oder Petroleumäther ausgefällt.

Eine bei + 17° C. gesättigte Äthylacetatlösung enthält, pro 100 ccm, 2,8 g.

b) In Wasser.

100 ccm bei + 17° gesättigter Lösung enthalten: 0,013 g.<sup>2)</sup>

Bei Kochen ist der Löslichkeitsgrad ca. 1 : 300.

c) In Salpetersäure.

20 % ige. 100 ccm bei + 17° gesättigte Lösung enthält:	0,033 g,
30 % ige. 100 „ „ 17° „ „ „	0,039 „
60 % ige. 100 „ „ 17° „ „ „	0,085 „

<sup>1)</sup> Es scheint sogar die Möglichkeit nicht ganz ausgeschlossen, daß man eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Phenylalanin in Proteinstoffen, auf die hier fragliche Reaktion gegründet, ausarbeiten könnte, nachdem dieselbe im Hinblick auf dieses Ziel des weiteren sondiert worden wäre.

<sup>2)</sup> Die Lösung bereitet durch langdauernde Behandlung übersättigter Lösung in Schüttelmaschine und Abfiltrierung auskrystallisierter Substanz. In Beilsteins Handbuch wird die Löslichkeit bei + 20° C. zu 0,04 : 100 angegeben.

*Verhalten bezüglich des Sublimierungsverlustes bei Erhitzung.*

Bei 100° C. nach	6 Stunden	Prozente <sup>1)</sup>
› 100° › › weiteren	12 › ›	0,2,
› 100° › › ›	12 › ›	0,3,
› 150° › › ›	3 › ›	8,6,
› 150° › › ›	3 › ›	8,0.

Zum Trocknen von p-Nitrobenzoesäure, bei quantitativen Versuchen, muß also eine Temperatur niedriger als 100° angewandt werden, z. B. 50—75°.

*Verhalten gegen Ferrichlorid.*

Eine nicht allzu stark verdünnte, wässrige Lösung der freien Säure<sup>2)</sup> oder eine solche mit Alkali neutralisierte Lösung ergibt mit Ferrichlorid eine hell lachsfarbene (mangansulfidähnliche) Fällung, also eine Fällungsreaktion von für das Auge derselben Art wie die, welche als eine Identitätsreaktion auf Benzoesäure angegeben zu werden pflegt. Diese Reaktion ist indessen wenig charakteristisch, indem sie, wie eine von mir angestellte Prüfung ergeben hat, auch einer großen Anzahl anderer aromatischer Säuren zukommt, nämlich u. a.: der m- und o-Nitrobenzoesäure, sämtlichen 3 Nitrozimtsäuren,<sup>3)</sup> der Phenylelessigsäure, der o-Nitrophenylelessigsäure, sämtlichen 3 Phthalsäuren und der Nitroterephthalsäure, entweder bei direkter Prüfung der wässrigen Lösung oder, wenn dabei negativer Ausfall, bei Prüfung einer neutralisierten Lösung.

*Betreffend Mg-Salz.*

Bei Zusatz von löslichem Mg-Salz (z. B. -chlorid, -sulfat) zu einer neutralen Lösung von p-Nitrobenzoesäure in verdünntem Ammoniak oder Natriumhydroxyd setzen sich allmählich schön glänzende, schwach gelbe Krystalle (dicke, rhom-

<sup>1)</sup> Berechnet auf die ursprüngliche Substanzmenge.

<sup>2)</sup> Wegen der äußerst geringen Löslichkeit der p-Nitrobenzoesäure in Wasser wurde bei der Prüfung eine in Siedewärme gesättigte Lösung angewandt.

<sup>3)</sup> Die Zimtsäure selbst gibt dagegen (nach Neutralisierung) hochgelbe (bleichromatähnliche) Fällung.

boedrische Tafeln) ab, auch bei so geringer Konzentration wie der bei Anwendung von  $\frac{1}{10}$ -Alkali erhaltenen.<sup>1)</sup>

Mg-Salz von p-Nitrobenzoesäure, dargestellt durch Schütteln der Säure mit Magnesia usta, wird zuerst (nur hinsichtlich der Krystallform) von Wilbrand und Beilstein<sup>2)</sup> erwähnt. Die Krystallform (•trikline Krystalle•) wird flüchtig in einer krystallographischen Arbeit von Mügge<sup>3)</sup> berührt, der in einem späteren Aufsatz<sup>4)</sup> die einzige, bisher erschienene Angabe über den Krystallwassergehalt, 7 Mol. (nach einer Analyse von Grünling, liefert.<sup>5)</sup>

Unter Beobachtung des auf S. 283 angegebenen Verfahrens wurden 2 Mg-Salzportionen dargestellt, die, nach Absaugen in Goochtiigel, unmittelbar zwischen einigemal gewechseltem Filtrierpapier im Laufe einer Stunde gepreßt und danach im  $H_2SO_4$ -Exsikkator  $1\frac{1}{2}$  Stunde (Präp. 1) bzw.  $\frac{1}{2}$  Stunde (Präp. 2) lang aufbewahrt wurden; von den so vollkommen trockenen Krystallen wurde unverzüglich eine bestimmte Quantität abgewogen und dann weiter behandelt:

Tabelle 8.

	Gewichtsverlust, insgesamt. Prozente				Berechnet für Salz mit Krystallwasser:	
	Präparat 1 <sup>6)</sup>		Präparat 2 <sup>7)</sup>		Mol.	%
In $H_2SO_4$ -Exsikkator bei gewöhnlicher Temperatur .	14 Tage	26,12	—	—	7	26,14
In Trockenschrank bei 100° C.	7 Stdn.	26,95	31 Stdn.	26,90	—	—
Danach bei 125° C. . . . .	—	—	18 „	27,50	$7\frac{1}{2}$	27,49
„ „ 150° C. . . . .	10 Stdn.	28,00	22 „	28,14	8	28,80

<sup>1)</sup> Entsprechend ca.  $1\frac{1}{2}$  % der Säure (Schütteln der Mischung befördert die Entstehung der Krystalle).

<sup>2)</sup> a. a. O.

<sup>3)</sup> Jahresber. f. Chemie, 1879, S. 678.

<sup>4)</sup> Jahresber. f. Chemie, 1880, S. 375.

<sup>5)</sup> Diese, dem Original gemäß, ausdrücklich für die Para-Verbindung geltende Angabe wird in Beilsteins Handbuch, unrichtigerweise, der Meta-Verbindung zugeschrieben!

<sup>6)</sup> Angew. Quantität: 1,6842 g.

<sup>7)</sup> Angew. Quantität: 0,5418 g.

Die bei dem Trocknungsversuch von Präp. 1 angewandte Portion ergab, bei Abrauchen mit Schwefelsäure und nachfolgender gelinder Glühung: 0,4061 g  $\text{MgSO}_4$ , entsprechend 0,08215 g oder 4,88% Mg. (Für Salz mit 8 Mol. Krystallwasser berechnet: 4,87%).<sup>1)</sup>

Aus vorstehendem kann der Schluß gezogen werden, daß das Mg-Salz der p-Nitrobenzoesäure mit 8 Mol. Wasser krystallisiert, wovon 7 bei Aufbewahrung im  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Exsikkator weggehen können; bei 100° geht, auch bei langdauernder Einwirkung, nur ein kleinerer Teil des übriggebliebenen Wassermoleküls weg, bei 125° ca. die Hälfte davon. Das restierende  $\frac{1}{2}$  Molekül läßt sich auch nicht bei 150° vollständig austreiben.

*Das Verhalten einiger der p-Nitrobenzoesäure nahe-  
stehender Säuren bei dem Mg-Verfahren.*

Portionen von je 1 g wurden lege artis mit Mg behandelt.<sup>2)</sup>

1. Benzoesäure.
2. o-Nitrobenzoesäure.
3. m-                    ,
4. 1, 2, 4-Dinitrobenzoesäure.
5. 1, 3, 5-             ,
6. Phenyllessigsäure.
7. o-Nitrophenyllessigsäure.
8. Terephthalsäure.
6. Nitroterephthalsäure.
10. (Zur Kontrolle). p-Nitrobenzoesäure.

In 10 trat bei Zimmerwärme Krystallbildung fast unmittelbar ein. In 3 kam es, in Zimmerwärme, zu keiner Krystallbildung innerhalb 3 Stunden; am folgenden Tage wurde eine ganz spärliche Kruste auf dem Gefäßboden wahrgenommen; bei Aufbewahrung im Kühlzimmer während 2 Tagen reichlichere Abscheidung. In sämtlichen übrigen Proben trat keine Abscheidung ein, nicht einmal bei Aufbewahrung im Kühlzimmer während 2 Tagen. In der auf angegebene Weise ausgeführten Mg-Behandlung hat man also ein Mittel, p-Nitrobenzoesäure von gewissen anderen, aromatischen Säuren zu trennen. Innerhalb der Gruppe: Benzoesäure und ihren 3 isomeren Mononitrosäuren erweist sich das Mg-Salz der p-Nitrosäure als das schwerstlösliche.

<sup>1)</sup> Für Salz mit 7 Mol. berechnet: 5,05%.

<sup>2)</sup> Siehe S. 283.

### 3. Benzoesäure.

Mühlhäuser<sup>1)</sup> erwähnt, daß er bei Salpetersäurebehandlung von Proteinstoffen und darauffolgender Destillation eine geringe Menge von Benzoesäure erhalten habe. Auch Habermann und Ehrenfeld<sup>2)</sup> glauben in dem Destillat von einer Dampfstrombehandlung der salpetersäuresauren Caseinreaktionsflüssigkeit her Spuren derselben Säure nachgewiesen zu haben, teils durch den charakteristischen Geruch, teils durch die Entstehung eines flockigen Niederschlags von isabellgelber Farbe bei Zusatz von Ferrichlorid.

Die bei Bearbeitung der A- und B-Fractionen von Roh-p-Nitrobenzoesäure erhaltenen Benzollösungen (vereinigt) wurden mit ein wenig verdünntem Ammoniak ausgeschüttelt. Aus der ammoniakalischen, filtrierten Flüssigkeit wurde die Säure mittels verdünntem HNO<sub>3</sub> ausgefällt, abfiltriert, mit einer spärlichen Menge Wasser gewaschen, ausgepreßt und getrocknet (= Roh-Benzoesäure); Gewicht: 4,4 g. Die Substanz wurde mit Chloroform aufgenommen, das, nach Abfiltrierung des ungelösten Restes, an der freien Luft verdunsten gelassen wurde. Die nach Benzoesäure riechende Masse wurde aus warmem Wasser unter Anwendung von Knochenkohle auskrystallisiert; zweimalige Umkrystallisierung. Das erhaltene Präparat (Gewicht: 1,1 g) bestand aus weißen, dünnen Krystallblättern, besaß den eigenartigen Geruch der Benzoesäure (stärker wahrnehmbar bei Erwärmung auf dem Wasserbad), gab mit Methylalkohol und konzentrierter Schwefelsäure rein und intensiv den leicht erkennbaren Geruch des Methylbenzoats und mit Ferrichlorid eine hell lachsfarbene Fällung, was zusammengenommen sicherstellte, daß Benzoesäure vorlag.<sup>3)</sup>

In Anbetracht der Reichlichkeit des bearbeiteten Protein-stoffmaterials kann wohl mit Recht gesagt werden, daß Benzoe-

<sup>1)</sup> A. a. O., S. 171.

<sup>2)</sup> A. a. O., S. 237.

<sup>3)</sup> Daß es, trotz aller Sorgfalt, nicht gelungen war, dieselbe in völlig analysenreiner Form zu erhalten, zeigte sich jedoch bei der Schmelzpunktbestimmung, indem die Substanz nicht völlig glatt bei + 119—120° C. schmolz (der Schmelzpunkt reiner Benzoesäure: 121,5°), und die beim Schmelzen entstehende Flüssigkeit etwas opak war.

säure in «Roh-p-Nitrobenzoesäure» wenig mehr als spurenweise nachgewiesen worden ist. Hieraus den Schluß zu ziehen, daß Benzoesäure in keinem beträchtlicheren Maße während der Proteinstoff-Salpetersäurebehandlung gebildet worden wäre, dürfte jedoch verfrüht sein, denn erstens muß diese leichtflüchtige Säure sich teilweise (und in unkontrollierter Menge) während der stürmischen Reaktionsprozesse und während der fortgesetzten Konzentrierung bei Wasserbadwärme verflüchtigt haben, und ferner liegt es in der Natur der Sache, daß ein Teil in der Mutterlauge der «Rohkrystalle» gelöst bleiben muß.<sup>1)</sup>

Da Benzoesäurebildung bei meinen Versuchen weder bei Salpetersäurebehandlung von Phenylalanin noch bei solcher von Tyrosin beobachtet worden ist,<sup>2)</sup> muß die Frage nach dem genaueren Ursprung der Benzoesäure offen gelassen werden. Da Phenylglykokoll (Phenylaminoessigsäure) bei solcher Behandlung Benzoesäure ergibt,<sup>3)</sup> so kann das Auftreten von Benzoesäure bei der entsprechenden Behandlung von Proteinstoffen doch Veranlassung geben, in Mischungen von Proteinstoffhydrolysenprodukten der genannten, bisher nicht nachgewiesenen Aminosäure besonders nachzuspüren.

#### 4. «X-Säure».

##### Isolierung.

Bei der Bearbeitung der von den verschiedenen Versuchen herstammenden «Roh-p-Nitrobenzoesäure» wurde «Roh-X-Säure» in folgenden Mengen gewonnen:

I. Serumeiweiß	6,0 g, entspr., in Proz. des Proteinstoffmaterials :	0,17
II. Hühnereiweiß	3,1 » » » » » » »	0,10
III. Casein	0,6 » » » » » » »	0,07
IV. Ovomuroid	0,2 » » » » » » »	0,08
V. Hämoglobin	1,2 » » » » » » »	0,10
VI. Keratin(Schafwolle)	4,7 » » » » » » »	0,16
Summa: 15,8 g		

<sup>1)</sup> Diesen Teil kann man bei der weiteren Untersuchung des «Ätherverdunstungsrestes» anzutreffen erwarten.

<sup>2)</sup> Siehe S. 288, Anm. 4 und S. 307.

<sup>3)</sup> Siehe S. 289.

Sämtliche 6 Portionen stellten fast weiße Pulver dar, die bei Erhitzung sich vollständig verflüchtigten, ohne vorhergehende Schmelzung. Sie wurden, je für sich, in verdünntem Ammoniak gelöst; die Lösung wurde mit Knochenkohle geschüttelt und filtriert; unter Umrühren wurde Calciumchloridlösung hinzugesetzt,<sup>1)</sup> wobei, in jedem Falle, weißes, mikrokrystallinisches Ca-Salz unmittelbar auszufallen begann (platte, teilweise zugespitzte Nadeln, meistens in Rosetten). Aus den nach 24 Stunden vereinigten, gefällten Mischungen wurde das Ca-Salz abgeschieden, in Zentrifuge mit Wasser gewaschen und in Wärme mit verdünnter Salpetersäure zersetzt. Die abgetrennte, mit Wasser ausgewaschene und getrocknete freie Säure wurde aus warmem, verdünntem Spiritus<sup>2)</sup> umkrystallisiert, abgetrennt und in  $H_2SO_4$ -Exsikkator getrocknet: «X-Säure», Präp. 2 (7,6 g). Auf gleiche Weise war aus «Rohsäure», erhalten bei auf S. 281 erwähnten orientierenden Versuchen mit Material von Hühnereiweiß, eine andere, kleinere Portion, Präp. 1, dargestellt worden. Eine Portion von Präp. 2 wurde nochmals aus verdünntem Spiritus, danach aus kochendem Amylalkohol (1 : 200) umkrystallisiert usw.; die dabei erhaltenen zwei Fraktionen sind im folgenden bezeichnet als: Präp. 3 und Präp. 4.

### Elementaranalysen und Identifizierung.

#### Präparat 1.

a)	3,150 mg	ergaben	6,61 mg	$CO_2$ ,	entsprechend	57,23 %	C,
	3,150	»	1,07	» $H_2O$ ,	»	3,80 %	H.
b)	4,395	»	9,23	» $CO_2$ ,	»	57,28 %	C,
	4,395	»	1,43	» $H_2O$ ,	»	3,64 %	H.

#### Präparat 2.

4,397 mg	ergaben	9,20 mg	$CO_2$ ,	entsprechend	57,07 %	C,
4,397	»	1,425	» $H_2O$ ,	»	3,63 %	H.

<sup>1)</sup> Auf 1 g Substanz: 5 ccm Ammoniak (10 % ig), 50 ccm Wasser; 10 ccm Calciumchloridlösung (enthaltend 25 g kryst. Salz in 100 ccm).

<sup>2)</sup> Auf 1 g Substanz, gelöst in 250 ccm kochendem 95 % igem Spiritus, wurde 1 Liter kochendes Wasser hinzugesetzt: die auskrystallisierte Säure (äußerst feine Nadeln) wurde nach einem oder ein paar Tagen abgetrennt.

## Präparat 3.

a) 3,559 mg	ergaben	7,40 mg	CO <sub>2</sub> ,	entsprechend	56,71 %	C,
3,559	›	›	›	›	›	›
›	›	›	›	›	›	›
b) 4,228	›	›	›	›	›	›
›	›	›	›	›	›	›
›	›	›	›	›	›	›
›	›	›	›	›	›	›

## Präparat 4.

4,473 mg	ergaben	9,38 mg	CO <sub>2</sub> ,	entsprechend	57,19 %	C,
4,473	›	›	›	›	›	›
›	›	›	›	›	›	›
›	›	›	›	›	›	›

Übriggebliebene Reste von den Präp. 2, 3 und 4 (vereinigt) wurden aufs neue in Ca-Salz übergeführt, das mittels verdünnter HCl zersetzt wurde, welcher Prozeß noch einmal wiederholt wurde (= Präp. 5):

a) 4,107 mg	ergaben	8,63 mg	CO <sub>2</sub> ,	entsprechend	57,31 %	C,
4,107	›	›	›	›	›	›
›	›	›	›	›	›	›
b) 3,104	›	›	›	›	›	›
›	›	›	›	›	›	›
›	›	›	›	›	›	›
›	›	›	›	›	›	›

Berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>·(COOH)<sub>2</sub>:

C 57,81 %

H 3,60 %

Die physikalischen Eigenschaften der «X-Säure» (u. a. Krystallisationsweise, außerordentliche Schwerlöslichkeit in Wasser, Verhalten gegen organische Lösungsmittel, Abwesenheit von Geschmack, Sublimierbarkeit ohne vorhergehende Schmelzung), ihre chemischen Eigenschaften (Bildung von sehr schwerlöslichem Ca-Salz, Resistenz gegen konzentrierte Schwefelsäure, Ausfallen des Mg-Salzes aus kochender Lösung und allmählich geschehende Wiederauflösung bei Zimmerwärme, die Unveränderlichkeit der Säure bei Eintrocknen mit 60%iger Salpetersäure, Übergehen in eine in Wasser leichtlösliche, farblose Nitrosäure bei energischer Behandlung mit rauchender Salpetersäure<sup>1)</sup> usw.), sowie ferner die elementare Zusammensetzung stellen es außer allem Zweifel, daß hier Benzol-1,4-Dicarbonsäure, gewöhnlich Terephthalsäure<sup>2)</sup> genannt, vorliegt.

<sup>1)</sup> Siehe S. 299.

<sup>2)</sup> Die Säure in völlig reiner Gestalt zu erhalten, ist bis auf weiteres nicht gelungen, infolge einer derselben zäh anhaftenden, geringeren Verunreinigung (wahrscheinlich Terephthalsäureamid, das in bezug auf Schwer-

## Reaktionsprodukt der „X-Säure“ bei energischer Einwirkung von rauchender Salpetersäure.

Als Material wurden Portionen von Präp. 2 verwendet; die bei den Versuchen angewandte Salpetersäure (60%ige, wie auch rauchende) war umdestilliert, vollkommen schwefelsäurefrei.

*Vers. 1* (zur Orientierung).

60%ige Säure. Eine Portion von 0,2100 g wurde in Porzellanschale auf dem Wasserbad mit 5 ccm Säure eingedampft (danach 24 Stunden lang in  $H_2SO_4$ -Exsikkator): keine Gewichtszunahme. Das Verfahren wiederholt: Gewichtszunahme um 0,0003 g; aufs neue wiederholt: weitere Gewichtszunahme um 0,0008 g. Die Gewichtszunahme demnach minimal. Die Substanz dem Anschein nach unverändert, andauernd nicht schmelzbar bei Erhitzung; nach Aufnehmen mit Wasser keine Kongo-reaktion; keine Gelbfärbung durch höhere Nitroprodukte.

Rauchende Säure. Eine Portion von 0,2019 g (im übrigen gleiche Anordnung wie im vorigen Fall). Gewichtszunahme: 0,0100, 0,0159 bzw. 0,0199 = insgesamt 0,0458 g, entsprechend 22,7%. Der Verdunstungsrest, krystallinisch, weiß (mit einem citronengelb gefärbten Rande), schmilzt bei Erhitzung, ist kongosauerreagierend.<sup>1)</sup>

*Vers. 2.* Reaktionsprodukt (1,65 g) von Behandlung mit rauchender Salpetersäure her löste sich (leicht und vollständig) bei Erwärmung mit 10 Teilen Wasser. Bei Abkühlung ent-

---

löslichkeit in Wasser und in organischen Lösungsmitteln der Terephthalsäure ähnelt), welche Verunreinigung sich durch die nicht absolute N-Freiheit der erhaltenen Präparate, etwas zu niedrigen C-Gehalt und, bei acidimetrischer Titrierung, etwas zu hohes Äquivalentgewicht zu erkennen gibt.

<sup>1)</sup> In einem anderen Versuche (ausgeführt in Erlenmeyer-Kolben mit Uhrglas) wirkte die Säure jedesmal 10 Stunden lang ein; zuletzt Abdampfung in Schale usw. Bei dieser intensiveren Einwirkung betrug die zum Schluß konstatierte Gewichtszunahme nur 15,2%; woraus eine sekundäre, partielle Destruktion des zuerst gebildeten Produkts hervorgeht (bei kompletter und unkomplizierter Mononitrierung reiner Terephthalsäure berechnet sich die Gewichtszunahme zu 27,1%).

standene reichliche Krystallabscheidung<sup>1)</sup> wurde abgetrennt, ausgepreßt und aus kochendem Wasser (10 Teile) umkrystallisiert. Ausbeute: 1,23 g (Frakt. 1). Aus der Mutterlauge wurden weitere 2 kleinere, krystallinische Fraktionen abgetrennt. Der Schmelzpunkt bewegte sich für die 3 Fraktionen zwischen 261 im Minimum und 264° C. im Maximum.

Frakt. 1 wurde näher untersucht.

Sehr leichtlöslich in Alkohol und in Äther. Löst sich in konzentrierter Schwefelsäure ohne Färbung. Reduziert nicht Kaliumpermanganat in alkalischer Flüssigkeit (= frei u. a. von Fumarsäure). Gibt in Wasser sehr leichtlösliches K-Salz. Die wässerige Lösung kongosauer und stark sauer schmeckend (mit bitterem Nachgeschmack), wird nicht gefällt von Silbernitrat, Merkurichlorid, Kuprisulfat, Calciumchlorid, Kalkwasser (bis zu neutraler Reaktion), Baryumchlorid + Ammoniak + Spiritus (= Bernsteinsäure abwesend) oder Bromwasser; gibt dagegen Fällung mit Merkuronitrat, Bleiacetat (schön krystallinisch) und Ferrichlorid (hell lachsfarben).

#### Elementaranalysen.

4,407 mg	ergaben	7,40 mg CO <sub>2</sub> ,	entsprechend	45,80 % C,	
4,407	„	0,95 „ H <sub>2</sub> O,	„	2,41 % H.	
4,400 mg	ergaben	7,37 mg CO <sub>2</sub> ,	entsprechend	45,68 % C,	
4,400	„	0,97 „ H <sub>2</sub> O,	„	2,47 % H.	
6,167	„	(756 mm. 17,5° C.)	0,379 ccm N,	entsprechend 7,18 % N.	
4,211	„	(756 „ 16,5° C.)	0,257 „	„	7,16 % N.

Berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> · (COOH)<sub>2</sub>:

C	45,99 %
H	2,39 %
N	6,64 %.

Die allgemeinen Eigenschaften des Reaktionsprodukts (übereinstimmend mit denen bei aus synthetischer Terephthalsäure auf entsprechende Weise dargestellter Substanz), wie auch seine Zusammensetzung zeigen, daß dasselbe (wenigstens der Hauptsache nach<sup>2)</sup>) Nitro-Benzol-1,4-Dicarbon-säure (= Nitroterephthalsäure) darstellt.

<sup>1)</sup> Bildete blumenkohlähnliche Aggregate von feinen Nadeln.

<sup>2)</sup> In gewissem Grade mit einem N-reicheren Produkt gemengt.

## Der Ursprung der Terephthalsäure.

Der konstante Fund von Terephthalsäure<sup>1)</sup> in dem bei Salpetersäurebehandlung von verschiedenartigem Proteinstoffmaterial erhaltenen Reaktionsgemisch ist — als unerwartet und bis auf weiteres nicht näher erklärlich — von mir mit gewisser Skepsis aufgenommen worden, nicht was die Tatsache selbst betrifft, wohl aber hinsichtlich des näheren Ursprungs der gefundenen Säure. Nachdem ein erster Verdacht, daß die Substanz von einer zufälligen Verunreinigung in der angewandten Salpetersäure herrühren könnte, durch direkte Prüfung als grundlos erwiesen worden war,<sup>2)</sup> erhob sich der Zweifel, ob die Terephthalsäure als bei der Zerspaltung von Proteinstoffmolekül aufzufassen ist (1), oder ob sie ihren Ursprung in einer in dem angewandten Proteinstoffmaterial vorhandenen anderen Substanz hat (2). Zugunsten der letzteren Alternative könnte angeführt werden, daß das angewandte Proteinstoffmaterial, obwohl in jedem Falle sorgfältig von wasserlöslichen Verunreinigungen befreit, in den meisten Fällen nicht frei von Lipoiden gewesen ist, unter welchen Cholesterin vorhanden gewesen sein kann, eine Verbindung, die, nach Windaus und Stein,<sup>3)</sup> als «ein kompliziertes Terpen» zu charakterisieren ist. Für die erstgenannte Alternative spricht

<sup>1)</sup> Zuerst dargestellt aus Terpentinöl (woher der Name) und anderen flüchtigen Ölen, enthaltend dem Cymol,  $C_6H_4 \begin{matrix} \swarrow CH_3^{(1)} \\ \searrow C_2H_7^{(4)} \end{matrix}$ , nahe verwandte

Terpene. Generell wird diese Säure, wie bekannt, bei Oxydation von Benzolderivaten gebildet, die zwei C-haltige Seitenketten in p-Stellung enthalten, z. B. Cymol, p-Xylol:  $C_6H_4 \begin{matrix} \swarrow CH_3^{(1)} \\ \searrow CH_3^{(4)} \end{matrix}$ , p-Toluylsäure:  $C_6H_4 \begin{matrix} \swarrow CH_3^{(1)} \\ \searrow COOH^{(4)} \end{matrix}$ , u. a.

<sup>2)</sup>  $\frac{1}{2}$  l der genannten Säure ergab bei vollständiger Eindampfung auf Wasserbad einen geringen Rückstand, in welchem nicht einmal Spuren von Terephthalsäure zu entdecken waren. Übrigens wurde «X-Säure», ebenso wie bei den hier fraglichen 6 Versuchen, in «Roh-p-Nitrobenzoesäure», in den 1890er Jahren unter Anwendung einer anderen Partie Salpetersäure dargestellt, angetroffen.

<sup>3)</sup> Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 37, S. 3699—3708 (1904).

dagegen in seiner Weise, daß Windaus,<sup>1)</sup> der eingehend die Verhältnisse bei der Oxydierung des Cholesterins mit Salpetersäure studiert hat, nicht dabei Terephthalsäure oder Nitroterephthalsäure angetroffen hat, und daß unter dem von mir angewandten Proteinstoffmaterial sich eines befand,<sup>2)</sup> das, obwohl durch besondere, sorgfältige Behandlung von Lipoiden gereinigt, in Übereinstimmung mit allen übrigen die fragliche Säure entstehen läßt. In diesem Zusammenhange ist es nicht ohne Interesse, daß Baumann<sup>3)</sup> aus einem Proteinstoff-Baustein, Cystin, (durch Baryumhydroxydeinwirkung) eine Säure dargestellt hat, die, aller Wahrscheinlichkeit nach, Methylterephthalsäure (Üvitinsäure) repräsentierte. Obwohl die vorliegenden Verhältnisse demnach keine bestimmte Entscheidung der Frage erlauben und, wie bereits angedeutet, die Bildungsweise bis auf weiteres nicht klar ist,<sup>4)</sup> so scheint mir doch die Annahme, daß die gefundene Terephthalsäure von dem Proteinstoffmolekül selbst herrührt, einen größeren Grad von Wahrscheinlichkeit zu besitzen als die entgegengesetzte Annahme.

Jedenfalls ist das hier konstatierte Auftreten von Terephthalsäure — zuvor erhalten bei Oxydierung von im Pflanzenreiche vorkommenden oder von synthetisch dargestellten Stoffen — als Oxydationsprodukt von animalischem Material von Interesse und verdient ein fortgesetztes Studium.

#### Anhang (betreffend das Mg-Salz der Terephthalsäure).

Einige Versuche hierzu wurden mit synthetischem Präparat (von Kahlbaum bezogen) ausgeführt.

*Vers. 1.* Terephthalsäure (1 Teil) + Magnesia usta (1 Teil) + Wasser (25 Teile) wurden mittels Maschine ein paar Stunden lang geschüttelt, worauf filtriert wurde. Das

<sup>1)</sup> «Über Cholesterin». Habilitationsschrift, Freiburg i. Br. 1903. Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 36, S. 3752—3758 (1904).

<sup>2)</sup> Casein nach Hammarsten, bezogen von Kahlbaum.

<sup>3)</sup> Ber. deutsch. d. chem. Ges., Bd. 15, S. 1731—1735 (1882).

<sup>4)</sup> Unter anderem ist festgestellt worden, daß weder Tyrosin, noch Phenylalanin oder Tryptophan, jedes für sich, und ebenso auch nicht eine Mischung der beiden erstgenannten, bei Salpetersäurebehandlung Terephthalsäure ergibt.

klare, schwach alkalisch reagierende Filtrat ergab bei einige Minuten dauerndem Aufkochen eine schön krystallinische, weiße Fällung (Prismen in Rosetten oder hexagonalen Tafeln), die im Laufe einiger Tage, unter bisweilen vorgenommenem Umschütteln in geschlossenem Gefäß, bei gewöhnlicher Temperatur wieder in Lösung ging. Die Prozedur wurde mit dem gleichen Resultat wiederholt. Ein anderer Teil des Filtrats ergab bei Verdunstung im  $H_2SO_4$ -Exsikkator eine weiße, sandartig harte, geschmacklose Krystallkruste, die, mit Wasser übergossen, sich vollständig innerhalb 24 Stunden löste; die Lösung verhielt sich bei Erwärmung usw. gleich der vorhererwähnten.

*Vers. 2.* Bei Mg-Behandlung auf zuvor beschriebene Weise<sup>1)</sup> blieb die Mischung klar, sogar bei 2 Tage dauernder Aufbewahrung im Kühlzimmer; bei Aufkochen trat dagegen binnen kurzem sehr reichliche krystallinische Fällung ein. Das Mg-Salz der Terephthalsäure zeigt also ein z. B. dem Ca-Salz der Citronensäure analoges Verhalten: es ist bedeutend schwerer löslich in warmem als in kaltem Wasser.

## 5. Trinitrophenol (Pikrinsäure).

### Literatur.

Pikrinsäure (zuerst von Woulfe 1771 aus Indigo erhalten) wurde bereits im Jahre 1799 von Welter<sup>2)</sup> aus Protein-stoffmaterial (Seide, Rindshaaren) durch Salpetersäurebehandlung dargestellt. Auch aus Schafwolle ist dieselbe Säure frühzeitig dargestellt worden.<sup>3)</sup> Diese Tatsache ist indessen in der biologisch-chemischen Handbuchliteratur<sup>4)</sup> ganz unbeachtet geblieben. Inouye<sup>5)</sup> erwähnt, im Zusammenhang mit dem

<sup>1)</sup> Siehe S. 283.

<sup>2)</sup> A. a. O. Die Säure wird von W. schlecht und recht als «amor» bezeichnet; in der deutschen Literatur findet man demzufolge auch das Pikrinsäuresynonym: «Weltersches Bitter».

<sup>3)</sup> Nach Angabe z. B. in Dammers Chem. Handwörterbuch (1876). Die Originalangabe wiederzufinden, ist mir jedoch, trotz eifrigen Suchens, nicht gelungen.

<sup>4)</sup> Z. B. Abderhaldens Biochem. Lexikon, Oppenheimers Handb. d. Biochemie.

<sup>5)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 81, S. 80—95 (1912).

Studium der Xanthoproteinsäurereaktion, daß er keine Pikrinsäure bei Behandlung von Seide mit konzentrierter Salpetersäure bei niedriger Temperatur beobachtet habe, läßt aber die Frage offen, ob «bei einem eingreifenden Verfahren, wie es von Welter angewandt worden ist, Pikrinsäure entsteht». Ganz kürzlich führt Eigenberger in einem Aufsatz über die Urease der Sojabohne<sup>1)</sup> an: «Der aromatische Kern (den Eiweißstoffen des wässerigen Extraktes angehörig) läßt sich durch Salpetersäure zu Pikrinsäure nitrieren, wodurch eine leicht zeisiggelbe Färbung auftritt, die auf Kalilaugezusatz in Orange umschlägt.» Aus dem Zusammenhang ist es indessen offenbar, daß E. die genannte Säure nicht isoliert und identifiziert hat, sondern den zitierten Satz lediglich als eine Umschreibung für die Xanthoproteinsäurereaktion anwendet, die im übrigen sich auf eine nicht haltbare Supposition gründet.<sup>2)</sup> Schließlich sei konstatiert, daß weder Habermann und Ehrenfeld<sup>3)</sup> noch v. Fürth<sup>4)</sup> — letzterer ungeachtet der Bearbeitung, wie oben, in anderem Zusammenhang, betont worden ist, kolossaler Materialmengen — etwas von dem Auftreten von Pikrinsäure bei tiefgreifender Spaltung verschiedener Proteinstoffe zu berichten haben.

### Eigene Versuche.

#### Ausbeute von Roh-K-Pikrat.

Dieses wurde aus dem «Ätherverdunstungsrest» (siehe S. 264) dadurch erhalten, daß derselbe mit wenig Wasser aufgenommen wurde, worauf unter Umrühren feinpulverisiertes Kaliumbicarbonat in leichtem Überschuß nach und nach hinzugesetzt, der entstandene krystallinische Niederschlag nach einigen Tagen abgetrennt und mit etwas Wasser durch Zen-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 93, S. 370—377 (1915).

<sup>2)</sup> Daß von einer Beteiligung der Pikrinsäure an der Xanthoproteinsäurereaktion nicht die Rede sein kann, hat bereits Inouye deutlich betont. Diese Bemerkung steht in völligem Einklang mit von Verfasser wiederholt gemachten Erfahrungen.

<sup>3)</sup> A. a. O.

<sup>4)</sup> A. a. O.

trifugieren gewaschen,<sup>1)</sup> ausgepreßt und getrocknet wurde. Die Ausbeute, auch in freie Säure umgerechnet,<sup>2)</sup> findet sich in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9.

	Roh-k-Pikrat		Entsprech.
	Absol. Menge	%	Pikrinsäure
	g		%
I. Serumeiweiß . . . . .	22,0	0,63	0,54
II. Hühnereiweiß . . . . .	24,8	0,83	0,71
III. Casein . . . . .	8,1	0,95	0,81
IV. Ovomuroid . . . . .	1,4	0,56	0,48
V. Hämoglobin . . . . .	9,4	0,78	0,67
VI. Keratin (Schafwolle) . . .	16,8	0,56	0,48

#### Die Reinigung der Substanz.

Sämtliche Roh-K-Pikratportionen wurden zweimal aus kochendem Wasser, unter Anwendung von Knochenkohle, umkrystallisiert, wonach sie rein gelbe, glitzernde Nadeln bildeten. Die erhaltenen Präparate wurden teilweise zur Darstellung freier Säure verwendet; diese letztere bestand aus hellgelben, glänzenden, intensiv bitter schmeckenden Krystallblättchen, sämtlich mit Schmelzpunkt bei ca. 122° C.

#### Elementaranalysen.

- I. 0,7435 g K-Salz ergaben 0,2390 g  $K_2SO_4$ , entsprechend 14,44% K.  
3,193 mg freie Säure ergab. (761 mm, 21°) 0,505 ccm N, entspr. 18,39% N.
- II. 0,7153 g K-Salz ergaben 0,2296 g  $K_2SO_4$ , entsprechend 14,41% K.
- III. 0,5989 g » » 0,1910 g  $K_2SO_4$ , » » 14,32% K.  
4,029 mg » » (753 mm, 20°) 0,549 ccm N, entspr. 15,73% N.

<sup>1)</sup> Die Mutterlauge wurde, nachdem eine kleinere Portion zur quantitativen Oxalsäurebestimmung angewandt worden, behufs späterer Untersuchung aufbewahrt.

<sup>2)</sup> Die fraglichen Zahlen müssen den wahren Verhältnissen sehr nahe kommen, da in dem Rohpikrat als einzige Verunreinigung in geringer Menge adsorbierter, wahrscheinlich von Tryptophan herrührender rotbrauner Farbstoff angetroffen wurde.

IV. 0,4343 g K-Salz	ergaben	0,1389 g $K_2SO_4$ ,	entsprechend	14,36% K.
3,882 mg	»	(753 mm, 20°)	0,522 ccm N,	entspr. 15,52% N.
V. 0,6034 g	»	0,1946 g $K_2SO_4$ ,	entsprechend	14,48% K.
3,415 mg	»	(757 mm, 22°)	0,456 ccm N,	entspr. 15,39% N.
VI. 0,7212 g	»	0,2344 g $K_2SO_4$ ,	entsprechend	14,59% K.
3,193 mg freie Säure	ergab.	(760 mm, 22°)	0,515 ccm N,	entspr. 18,42% N.

Berechnet für  $C_6H_3(NO_2)_3 \cdot OK$ :

K 14,65%

N 15,73%

Berechnet für  $C_6H_3(NO_2)_3 \cdot OH$ :

N 18,35%

### Der Ursprung der Pikrinsäure.

Bei den Versuchen über Behandlung von Tyrosin und Phenylalanin (wie auch Phenylaminoessigsäure) mit Salpetersäure, die im Zusammenhang mit p-Nitrobenzoesäure<sup>1)</sup> erwähnt worden sind, wurde in dem Reaktionsgemisch auch nach Pikrinsäure gesucht. Von den genannten Substanzen ist Tyrosin zuvor bezüglich Pikrinsäurebildung bei derartiger Behandlung untersucht worden, nämlich von Thudichum und Wanklyn,<sup>2)</sup> die jedoch ihrer ausdrücklichen Angabe nach in dieser Beziehung zu negativem Resultat gelangt sind.

### Tyrosin.

Nach einem vorbereitenden Versuch mit 2 g wurden zwei Versuche in größerem Maßstabe angestellt. In jedem der beiden Versuche: 10 g Tyrosin + 100 ccm 60%ige Salpetersäure;<sup>3)</sup> in Kolben 24 Stunden lang bei Zimmerwärme; auf Wasserbad  $2 \times 10$  (Vers. 1) bzw. 10 (Vers. 2) Stunden.

Vers. 1. Das Reaktionsgemisch wurde auf dem Wasserbad auf 10 ccm Volumen eingeeengt, in den Eisschrank gesetzt (wobei sich hellgelbe Krystalle in dünnflüssiger, schön gelber Flüssigkeit bildeten<sup>4)</sup>), danach Absaugung, Waschen mit kleinen

<sup>1)</sup> S. 288.

<sup>2)</sup> A. a. O., S. 289.

<sup>3)</sup> Auf 0° abgekühlt, zwecks Verhütung allzu heftiger Initialreaktion.

<sup>4)</sup> Während der langdauernden Behandlung in Wärme war Oxalsäure zum allergrößten Teil zerstört worden.

Portionen Wasser, Auspressen usw. (Gewicht 0,32 g); Umkrystallisierung aus kochendem Wasser (= Präp. 1); Schmelzpunkt: 122°. Aus der Mutterlauge wurde eine weitere Portion Krystalle erhalten (Gewicht 0,25 g); Umkrystallisierung, Schmelzpunkt: 122°. Durch Ausschütteln mit Benzol wurde eine dritte Portion erhalten (Gewicht 0,14 g).

Vers. 2. Das Reaktionsgemisch wurde in Zimmerwärme durch kräftigen Luftstrom während mehrerer Tage konzentriert. Durch Behandlung der abgeschiedenen Krystalle<sup>1)</sup> bzw. der Mutterlauge mit Benzol usw. wurden insgesamt 0,84 g erhalten.<sup>2)</sup> Nach Umkrystallisierung Schmelzpunkt 122° C. (= Präp. 2).

#### Elementaranalysen.

##### Präparat 1.

4,452 mg	ergaben	5,14 mg CO <sub>2</sub> ,	entsprechend	31,49% C,
4,452	„	0,58 „ H <sub>2</sub> O,	„	1,46% H.
4,284	„	(727 mm, 15°) 0,687 ccm N,	entsprechend	18,18% N.

##### Präparat 2.

4,448 mg	ergaben	5,12 mg CO <sub>2</sub> ,	entsprechend	31,39% C,
4,448	„	0,56 „ H <sub>2</sub> O,	„	1,41% H.
3,875	„	(732 mm, 22°) 0,635 ccm N,	entsprechend	18,26% N.

Berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>(NO<sub>2</sub>)<sub>3</sub> · OH:

C	31,43%
H	1,32%
N	18,35%.

Mit Rücksicht auf das Aussehen, den intensiv bitteren Geschmack, den Schmelzpunkt, die Löslichkeitsverhältnisse, die Fällbarkeit durch Nitron, die Bildung von schwerlöslichem, explosivem K-Salz sowie auf die Resultate der Elementaranalysen ist es offenbar, daß 2-, 4-, 6-Trinitrophenol (= Pikrinsäure) vorliegt. Die Totalausbeute entspricht 7,1 bzw. 8,4% des angewandten Tyrosins.

#### Phenylalanin.

Aus der salpetersäuresauren Reaktionsflüssigkeit (nach der Entfernung von Roh-p-Nitrobenzoesäure) von dem auf S. 288 erwähnten Versuch (10 g Phenylalanin) her wurde durch

<sup>1)</sup> Diese bestanden teilweise aus Oxalsäure.

<sup>2)</sup> Benzoesäure wurde nicht gebildet.

Ausschütteln mit Äther, Behandlung des Ätherverdunstungsrestes mit Benzol und Versetzen des Benzolverdunstungsrestes mit Kaliumcarbonat krystallinisches K-Salz (Gewicht 0,5 g) erhalten, woraus nach Umkrystallisierung aus kochendem Wasser (+ etwas Knochenkohle) die Säure freigemacht wurde usw.

4,488 mg	ergaben	5,15 mg CO <sub>2</sub> ,	entsprechend	31,30 % C,
4,488	„	0,58 „ H <sub>2</sub> O,	„	1,45 % H.
4,740	„	(727 mm, 18°) 0,770 ccm N,	entsprechend	18,23 % N.

Zusammensetzung und sonstige Eigenschaften machen es völlig klar, daß auch hier Pikrinsäure vorliegt. Die Ausbeute entspricht 4,3% des Ausgangsmaterials.

### *Phenylaminoessigsäure.*

Aus der Reaktionsflüssigkeit von 10 g her wurde auf analoge Weise eine geringe Menge (0,2 g) gelbes K-Salz isoliert, das nach Umkrystallisierung das Aussehen von K-Pikrat hatte, und dessen freigemachte Säure bei 122° schmolz, weshalb auch hier Pikrinsäure gebildet worden sein dürfte.

### *Tryptophan.*

3 g + 30 ccm 60%ige Salpetersäure wurden zuerst bei Zimmerwärme 24 Stunden lang, danach bei 80° 4 Stunden lang behandelt. Die dunkel-orangefarbene Flüssigkeit ergab bei Verdünnung mit 10 Volumen Wasser einen reichlichen, flockigen, hochgelben Niederschlag, der, nach 24stündiger Aufbewahrung im Eisschrank, abgetrennt wurde.<sup>1)</sup> Aus dem Filtrat wurde durch Ausschütteln mit Benzol usw. und Behandlung mit Kaliumcarbonat eine kleine Portion von schön krystallisiertem, citronengelbem K-Salz (Gewicht 0,07 g) erhalten. Die freigemachte, hellgelbe Krystallblättchen bildende Säure (Schmelzpunkt 120°) wurde analysiert:

3,438 mg ergaben (758 mm, 21°) 0,548 ccm N, entsprechend 18,46% N.

Somit ist auch aus Tryptophan, wenn auch in geringer Menge, Pikrinsäure erhalten worden.

<sup>1)</sup> Gewicht, nach Exsikkatortrocknung, 1,2 g. Die Substanz rasch und vollständig löslich in Äthylacetat, schon in 5 Teilen (Terephthalsäure demnach abwesend); die Lösung gab mit Benzol oder Petroleumäther unmittelbar hochgelbe Fällung.

Aus den oben angegebenen Versuchsergebnissen geht deutlich hervor, daß aus Proteinstoff gebildete Pikrinsäure zunächst von den beiden bekannten aromatischen Bausteinen, Tyrosin und Penylalanin, und zu einem geringeren Teil, auch vom Tryptophan herühren<sup>1)</sup> kann.

<sup>1)</sup> Aus keinem anderen Proteinstoffbaustein ist Pikrinsäure erhalten worden, insbesondere nicht aus Histidin, Prolin und Oxyprolin, bei Bearbeitung eines mit «Rauchsäure V» (siehe S. 275) erhaltenen Reaktionsgemisches von Substanzmengen im Betrage von 0,5 g.

---