

247. Stefan Goldschmidt und Christian Steigerwald: Über den Abbau von Proteinen durch Hypobromit.

[Aus d. Chem. Institut d. Techn. Hochschule Karlsruhe.]
(Eingegangen am 8. Mai 1925.)

In fast allen neueren Arbeiten¹⁾, die sich mit dem Konstitutionsproblem der Proteine befassen, ist betont worden, daß die Verkettung der Aminosäuren durch Polypeptid-Bindung, die von Emil Fischer begründet worden ist, nicht ausschließlich die mannigfachen Reaktionen der Eiweißstoffe zu erklären vermag. Man hat deshalb versucht, am Modell-Schema den Beweis für andersartige Verkettungen, die zwischen mehreren Aminosäuren eintreten können, experimentell zu begründen. Dieser Weg ist in neuerer Zeit von Abderhalden²⁾, Karrer³⁾, und mit besonderem Erfolge von Bergmann⁴⁾ beschritten worden, der zuerst auf die Wichtigkeit der Amino-oxy-säuren für diese Frage hingewiesen hat.

Aber trotz der Wichtigkeit, die diese Arbeiten für die konstitutiven Probleme der Protein-Chemie besitzen, ist es doch nötig, durch neue Abbaumethoden neue Gesichtspunkte für das gleiche Problem beizubringen und eventuell die nur am Modell-Schema studierten möglichen Verkettungen zu beweisen. Allerdings müssen diese Methoden so gestaltet werden, daß eine primäre Veränderung der Eiweißkörper ebenso wie eine sekundäre Verkettung primärer Spaltstücke unwahrscheinlich wird. Deshalb sind in den interessanten Arbeiten Troensegaards⁵⁾ die aus der Acylierung der Proteine und der reduktiven Spaltung der Acetylkörper gezogenen konstitutiven Schlüsse sehr zweifelhaft; denn schon die recht rohe Acetylierungsmethode bietet keinerlei Gewähr dafür, daß nicht weitgehende sekundäre Veränderung der Proteine dabei eingetreten ist. Auch die Isolierung verschiedener Diketo-piperazine bei der Hydrolyse von Proteinen durch Abderhalden⁶⁾ und andere⁷⁾ kann keinen exakten Nachweis für das genaue Auftreten dieser Ringsysteme bilden, weil der Abbau sich unter Bedingungen vollzieht, unter denen diese Ringe sekundär entstehen können⁸⁾.

Auf der Suche nach milden Abbaumethoden für Proteine haben wir gefunden, daß diese durch Hypobromit schon unter sehr zarten Bedingungen bei 0° angegriffen werden. Daß Proteine überhaupt mit Hypobromit reagieren, hat bereits Zd. Skraup⁹⁾ festgestellt, der mit Knopscher Bromlauge bei Zimmertemperatur arbeitete. Die Resultate dieser Untersuchung kann man dahin zusammenfassen, daß aus verschiedenen Proteinen ein etwa gleicher Teil des Amino-Stickstoffs als Stickstoff abgespalten wird, und daß als stickstoff-freie Spaltstücke Fettsäuren, wie Essigsäure, Propionsäure, Bernsteinsäure usw., auftreten. Wir haben es für zweckmäßig gehalten, vor einer präparativen Durcharbeitung dieses Abbaus seinen zeitlichen Verlauf unter präzisierten Bedingungen fest-

¹⁾ s. bes. Bergmann, *Naturwissenschaften* **1924**, 1156; Oppenheimer, *Handbuch d. Biochemie* **1924**, Bd. I, 596 (Abderhalden).

²⁾ H. **129**, 143. ³⁾ *Helv.* **7**, 763 [1924], **6**, 1108 [1923].

⁴⁾ *Literatur* s. Bergmann, l. c., ferner H. **143**, 108 [1925].

⁵⁾ H. **112**, 86 [1920], **127**, 137 [1923].

⁶⁾ H. **132**; s. auch *Handbuch d. Biochemie*, l. c. ⁷⁾ *Bio. Z.* **134**, 241.

⁸⁾ Brigl, B. **56**, 1887 [1923]. ⁹⁾ M. **28**, 605 [1907].

zulegen; dies läßt sich ja leicht durch titrimetrische Bestimmung des zerstörten Hypobromits erreichen.

Die Gedanken, die uns dabei gelehrt haben, waren folgende: Einmal hofften wir, für jedes einzelne der untersuchten Proteine eine charakteristische Kurve festzulegen, von der jeder einzelne Punkt reproduzierbar war. Dadurch erwarteten wir, ein analytisches Mittel zu erhalten, das gestattete, Proteine und auch eventuelle Spaltstücke voneinander scharf zu unterscheiden. Dann vermuteten wir, daß uns die Beobachtung des zeitlichen Verlaufs einen Anhalt dafür geben würde, wo die Einwirkung des Hypobromits für präparative Versuche zu unterbrechen ist.

Ergebnisse.

Die Kurven auf S. 1348, die eine Auswertung der Versuchsergebnisse enthalten, zeigen, daß die bis jetzt untersuchten Proteine, die Gelatine, das Casein und das Albumin, sich in ihrem Reaktionsverlauf gegenüber Hypobromit charakteristisch unterscheiden. Sie sind alle so gewonnen, daß in einer Mischung einer 1-proz. Lösung des Proteins mit sehr viel überschüssiger Hypobromit-Lösung, durch Entnahme gemessener Mengen nach bestimmten Zeiten und Titration derselben mit Thiosulfat nach Versetzen mit angesäuerter Jodkalium-Lösung, der Verbrauch an Hypobromit bestimmt wurde. Die einzelnen Punkte bedeuten also den in ccm einer $n/_{10}$ -Hypobromit-Lösung ausgedrückten Verbrauch für 0.1 g Protein. Die Kurven sind beim Albumin und Casein unabhängig von deren Geschichte (deren Alter). Bei der Gelatine, die ja ihren Dispersitätsgrad beim Stehen verändert, verbrauchen frische Lösungen mehr Hypobromit als alte; durch Erwärmen läßt sich der Zustand der frischen Lösung wiederherstellen. Ob diese eigenartige Erscheinung nur durch die Veränderung der Teilchengröße zu deuten ist, oder ob dabei auch labile chemische Veränderungen der Gelatine eine Rolle spielen, diese Frage wollen wir zunächst noch unberührt lassen. Der Hypobromit-Verbrauch ist schon nach sehr kurzer Zeit z. B. 2 Min. sehr erheblich; dies kann man am besten sehen, wenn man umrechnet, welches Äquivalentgewicht an Protein nach dieser Zeit einem verbrauchten Molekül Hypobromit entspricht. Dies ist bei Gelatine 460, bei Casein 320, bei Albumin 290. Die bis jetzt ausgeführten Versuche¹⁰⁾ lassen erwarten, daß es möglich sein wird, für jedes Protein eine charakteristische Hypobromit-Zahl zu erhalten, die gestattet, die so wenig definierten analytischen Größen der Proteine durch eine neue Zahl zu vermehren.

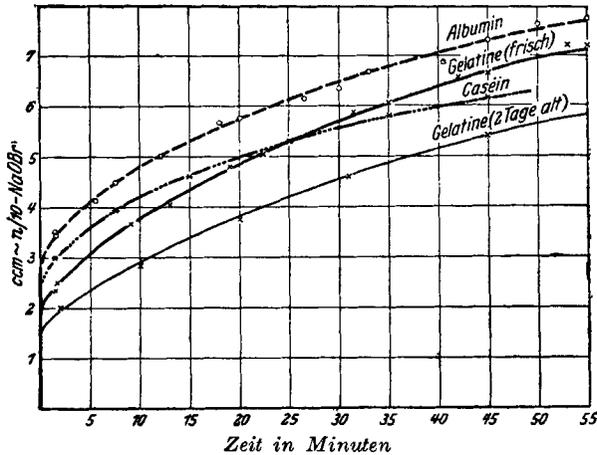
Theoretische Deutung der Resultate.

Wenn man sich von der Einwirkung des Hypobromits ein Bild machen will, so wird man erst folgende Frage beantworten müssen: Ist die Einwirkung des Hypobromits spezifisch für die Proteine selbst, oder überlagern sich bei der in alkalischem Medium sich abspielenden Reaktion zwei Vorgänge, die hydrolytische Spaltung der Proteine und die sekundäre Einwirkung des Hypobromits auf die entstandenen freien Amidogruppen?¹¹⁾ Der Verlauf nach der letzten Annahme wird schon durch die

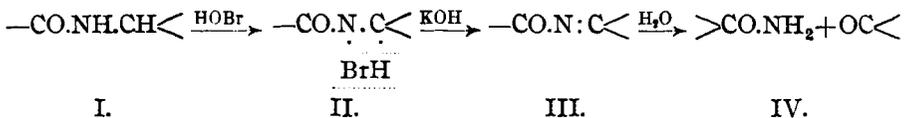
¹⁰⁾ Diese sind nur als Vorversuche zu betrachten; sie werden an besonders gereinigtem Material nochmals überprüft.

¹¹⁾ Aminosäuren reagieren mit Hypobromit sehr rasch, vergl. Langheld, B. 42, 392, 2360 [1909].

Betrachtung der Reaktionskurven unwahrscheinlich; denn ein erheblicher Teil des Hypobromits wird schon in außerordentlich schneller Reaktion verbraucht; erst die weitere Einwirkung auf die Primärprodukte vollzieht sich langsam. Wir haben aber die Möglichkeit sekundärer Einwirkung noch mit Sicherheit ausschließen können. Denn der Verlauf der Einwirkung wird nicht geändert dadurch, daß man die Lösung vor dem Zusatz des Hypobromits mehrere Stunden mit Natronlauge bei 0° stehen läßt. Die Hydrolyse kann also innerhalb dieser Reaktionsdauer keine Rolle spielen. Welche Gruppen sind es also, die den Angriff des Hypobromits vermitteln?



Der Angriff kann an den vorhandenen freien Amidgruppen erfolgen; deren Zahl aber ist auf Grund der van-Slyke-Bestimmung sehr klein¹²⁾. Es kann partielle Oxydation und Kern-Halogenierung eintreten; auch diese Reaktion wird unter den ganz außerordentlich milden Bedingungen kein großes Ausmaß einnehmen können. Es bleibt also nur die Möglichkeit, daß das Hypobromit in der Hauptsache zunächst an den sekundären Imidogruppen etwa nach folgendem Schema angreift, dessen Aufstellung für uns den Ausgangspunkt der experimentellen Untersuchungen bildete:



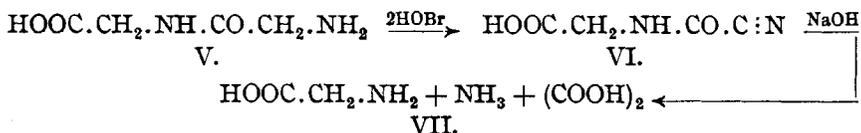
Dabei sollte es gleichgültig sein, ob diese Bindung in polypeptid-artiger Verkettung oder in Diketo-piperazinen und anderen Ring-systemen, vielleicht noch unbekannter Art vorkommt.

Hypobromit und Polypeptide und Diketo-piperazine.

Bei den Proteinen selbst wird der Einblick, welche der verschiedenen Bindungsarten in Reaktion treten, schwierig sein. Wir haben deshalb be-

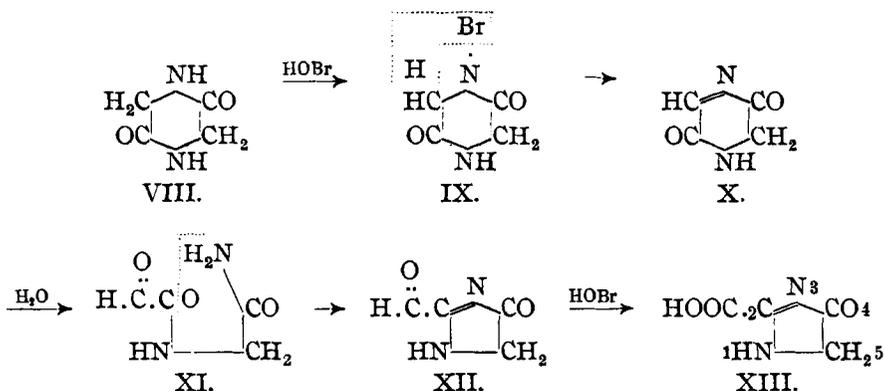
¹²⁾ Handbuch d. Biolog. Arbeitsmethoden: Eiweiß und Eiweiß-Abbauprodukte S. 281.

gonnen, die Einwirkung von Hypobromit an Modellen, zunächst an Polypeptiden und Diketo-piperazinen zu studieren. Als erstes wichtiges Resultat können wir feststellen, daß die $-NH.CO$ -Bindung der Polypeptide mit Hypobromit im angegebenen Sinne nicht in Reaktion tritt. Wir schließen das aus folgenden Tatsachen: Während Glykokoll durch Bromlauge rasch und vollständig bis zu Kohlensäure und Stickstoff abgebaut wird, verbraucht Glycyl-glycin nur etwa 2 Mol. davon rasch ohne Stickstoff-Entwicklung:



Dieser Reaktionsverlauf ist sehr wahrscheinlich, denn wir haben festgestellt, daß nach Verseifung des noch nicht isolierten Zwischenproduktes (VI) Oxalsäure und Ammoniak als Spaltstücke auftreten. In voller Übereinstimmung damit wird Benzoyl-glykokoll, Benzoyl-alanyl-glycin von Hypobromit erst nach vielen Stunden ganz langsam angegriffen. Dieses Ergebnis wird natürlich noch an weiteren Beispielen zu bestätigen sein¹³⁾.

Im Gegensatz dazu setzen sich Diketo-piperazine mit Bromlauge rasch um. Das Diketo-piperazin selbst liefert dabei unter Verbrauch von 2 Mol. Hypobromit einen Körper von der Zusammensetzung $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_3\text{N}_2$, der sich der Reaktionsflüssigkeit, nach dem Ansäuern und Eindampfen, mit Äther entziehen läßt. Er enthält eine Carboxylgruppe, die sich mit $n/_{10}$ -Natronlauge titrieren läßt und eine bewegliche Methylengruppe, die mit Diazoniumchlorid kuppelt. Er kann also seiner Entstehung nach nur eine 4-Imidazol-2-carbonsäure (XIII) sein, die sich unter Ringverengung wohl folgendermaßen bildet und ein Homologes des von Finger aus Imino-essigester und Glycin-ester erhaltenen 2-Methyl-4-imidazolons darstellt¹⁴⁾.



¹³⁾ Auch Alanyl-glycin wird, wie wir qualitativ festgestellt haben, nicht an der $-NH.CO$ -Bindung angegriffen.

¹⁴⁾ J. pr. [2] 76, 94.

Die Ausbeute an der Carbonsäure beträgt nur etwa 20%. Dies liegt an ihrer außerordentlichen Empfindlichkeit gegen Alkali; denn schon ihr Natriumsalz spaltet in wäßriger Lösung beim Stehen rasch Blausäure ab; auch wird sowohl Zwischenprodukt XI¹⁵⁾, das eine freie Amidogruppe hat, als auch die Carbonsäure selbst mit Hypobromit weiterreagieren, wie die zeitliche Verfolgung des Hypobromit-Verbrauchs lehrt.

Die glatte Reaktion der Diketo-piperazine ist nicht auf das Glycin-anhydrid selbst beschränkt. Wir haben im Vorversuch bereits festgestellt, daß auch Alanin-anhydrid unter schnellem Verbrauch von 2 Mol. Bromlauge reagiert. Diketo-piperazine und Polypeptide unterscheiden sich also charakteristisch in ihrem Verhalten gegen Hypobromit. Wenn sich also Proteine mit Bromlauge umsetzen, so können es nicht die Polypeptid-Bindungen sein, die diese Reaktion vermitteln. Die Wahrscheinlichkeit, daß es Diketo-piperazin-Ringe sind, ist außerordentlich groß wegen des völlig analogen Verhaltens, das diese Ringe und die Proteine beim Hypobromit-Abbau zeigen. Der exakte Beweis dafür aber wird erst bei der präparativen Durcharbeitung des Abbaus an Proteinen zu erbringen sein.

Dem Kuratorium der Japan-Stiftung sind wir für die Gewährung von Mitteln für die vorliegenden Untersuchungen zu ehrerbietigstem Danke verpflichtet.

Beschreibung der Versuche.

Herstellung der Bromlauge.

In 1.5 l 0.5-n. Natronlauge läßt man unter kräftigem Rühren bei 0° 16 ccm Brom eintropfen (Einlaufmündung des Tropftrichters in die Flüssigkeit eintauchen lassen!). Die so dargestellte Bromlauge ist in bezug auf unterbromige Säure ca. $\frac{1}{5}$ -normal, in bezug auf überschüssige Natronlauge $\frac{1}{10}$ -normal; sie hält sich bei 0° mehrere Tage fast unverändert. Den sehr kleinen Gehalt an Bromat bestimmt man, indem man 10 ccm der Lösung in 40 ccm gesättigte wäßrige Phenol-Lösung einlaufen läßt und nach dem Zufügen von angesäuerter Jodkalium-Lösung mit Thiosulfat das ausgeschiedene Jod titriert. Der Gehalt an freier Natronlauge läßt sich ermitteln, indem man nach Zerstörung der unterbromigen Säure durch Wasserstoffsperoxyd mit n_{10} -Salzsäure titriert.

Einwirkung von Hypobromit auf Gelatine.

a) 1 g käufliche Gelatine wird unter ganz gelindem Anwärmen in 100 ccm Wasser gelöst. Von dieser Lösung wurden 20 ccm entnommen und nach dem Abkühlen auf 0° mit 20 ccm 0.5-n. oder 2-n. Natronlauge und rasch mit 40 ccm obiger Bromlauge, alles bei 0°, versetzt. Auch während des ganzen Versuches befindet sich die Reaktionslösung in einem Thermostaten von 0°. Zur Titration entnimmt man nach angegebenen Zeiten je 10 ccm der Lösung, die in einem auf 0° gekühlten Gefäß mit angesäuerter Jodkalium-Lösung versetzt werden. Das ausgeschiedene Jod wird mit Thiosulfat zurücktitriert. Der Gehalt an Bromat bzw. gebundenem Brom wird wie oben bestimmt und ist von den erhaltenen Werten abgezogen.

¹⁵⁾ Ob dieses oder ein symmetrisches Zwischenprodukt entsteht, ist noch nicht sicher; wir hoffen, den sehr instabilen, beim Eintragen des Hypobromits beobachteten Körper noch zu fassen.

Zeit ¹⁶⁾	1.75	13	22.5	35	45	55	65	Min.
Verbraucht n_{10} -NaOBr . . .	2.50	4.06	5.05	6.06	6.66	7.14	7.55	ccm.
Zeit	2	11	21	31	42	52	65	Min.
Verbraucht n_{10} -NaOBr . . .	2.53	4.03	5.19	6.08	6.8	7.36	8.04	ccm.

b) Der gleiche Versuch wurde nur mit Gelatine-Lösungen ausgeführt, die 1 und 2 Tage alt waren.

1 Tag alt (über Nacht in Eis).

Zeit	2	10	20	41	52	65	Min.
Verbraucht n_{10} -NaOBr . . .	2.26	3.58	4.44	5.75	6.45	6.93	ccm.

2 Tage alt.

Zeit	2	10	20	31	45	60	Min.
Verbraucht n_{10} -NaOBr . . .	2.01	2.86	3.77	4.60	5.38	6.38	ccm.

c) Die 2 Tage alte Lösung wurde schwach angewärmt und dann derselbe Versuch wiederholt.

Zeit	2	10	20	30	50	60	Min.
Verbraucht n_{10} -NaOBr . . .	2.39	4.05	4.99	5.80	6.72	7.60	ccm.

Einwirkung auf Casein.

Man schlämmt 1 g Casein (Hammarsten) in 99 ccm Wasser auf und gibt von Zeit zu Zeit einige Tropfen 2-n. Natronlauge zu. Nach Zusatz von 1 ccm ist alles Casein in Lösung gegangen. Zur Titration werden von dieser Lösung 20 ccm entnommen und wie bei der Gelatine weiter behandelt. Das Fortschreiten des Abbaus kann man auch beim Ansäuern der Lösung mit Salzsäure verfolgen, denn der dadurch erzeugte Niederschlag verschwindet nach $\frac{1}{2}$ -stdg. Einwirkung des Hypobromits völlig. Der Verlauf der Kurve ändert sich nicht, gleichgültig, ob man unter Zusatz von Natronlauge arbeitet oder nicht.

a) Zusatz von 20 ccm 5-n. Natronlauge.

Zeit	1.75	7	20	33	45	65	Min.
Verbraucht n_{10} -NaOBr . . .	2.93	4.01	4.9	5.46	6.00	6.62	ccm.

b) Zusatz von 20 ccm Wasser, keine Natronlauge.

Zeit	1.5	7.5	15	25	45	60	Min.
Verbraucht n_{10} -NaOBr . . .	2.96	3.96	4.61	5.29	6.15	6.71	ccm.

Einwirkung auf Albumin.

Kahlbaumsches Eier-Albumin wird mehrere Stunden mit Äther extrahiert. Von dem so vorbereiteten Albumin werden 2.2 g in 200 ccm Wasser, das durch eine Rührvorrichtung in starker Bewegung gehalten wird, innerhalb $\frac{1}{2}$ Stde. eingetragen, indem man durch Einstäuben mit einem Spatel das Zusammenballen des Albumins verhindert. Man rührt noch $\frac{1}{2}$ Stde. weiter und zentrifugiert dann die trübe Lösung. Dann filtriert man und bringt schließlich die abgesetzten Anteile auf das Filter, trocknet dieses und wägt zurück (ca. 0.2 g). Das Filtrat wird eventuell so verdünnt, daß 1 g Albumin in 100 ccm Wasser gelöst ist. Im übrigen verfährt man wie oben.

a) Zusatz von 20 ccm Wasser, keine Natronlauge.

Zeit	1.5	7.5	18.5	30	45	60	Min.
Verbraucht n_{10} -NaOBr . . .	3.49	4.49	5.64	6.35	7.28	8.09	ccm.

¹⁶⁾ Die in Kontroll-Bestimmungen eingetragenen Werte sind nur in den Kurven wiedergegeben.

b) Zusatz von 20 ccm 5-n. Natronlauge.

Zeit	1.5	10	18.5	30	45	61	Min.
Verbraucht n_{10} -NaOBr . . .	3.21	4.47	5.11	5.82	6.5	7.21	ccm.

Einwirkung auf Glykokoll.

0.2 g Glykokoll in 40 ccm Wasser werden auf 0° gekühlt und dann rasch 80 ccm n_{10} -Hypobromit zugesetzt. Nach angegebenen Zeiten entnimmt man je 10 ccm der Lösung, die sich ständig bei 0° befindet und titriert wie oben.

Zeit	1.5	5	11.5	28.5	Min.
Verbraucht n_{10} -NaOBr . . .	66.88	85.37	106.7	118.1	ccm.

Ber. für 1 Mol. NaOBr 26.67 ccm, für 4.5 Mol. 120.0 ccm.

Einwirkung auf Hippursäure.

0.2 g Hippursäure, 40 ccm Wasser, 20 ccm 0.05-n. Natronlauge, 20 ccm n_{10} -Hypobromit, sonst wie früher.

Nach 19 Stdn. verbraucht 1.89 ccm Hypobromit.

Ber. für 1 Mol. 13.6 ccm.

b) wie unter a, nur anstatt 40 ccm Wasser 40 ccm n_{10} -Natronlauge.

Verbraucht nach 4 Stdn. 1.29 ccm Hypobromit, nach 19 Stdn. 8.69 ccm.

Einwirkung auf Glycyl-glycin.

2 g Glycyl-glycin-Chlorhydrat werden in möglichst wenig Wasser gelöst, mit Natronlauge bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt und auf 0° gekühlt. Dann gibt man 240 ccm n_{10} -Hypobromit von 0° langsam zu. Die Lösung gast fast gar nicht. Nachdem alle Bromlauge verbraucht ist (Kontrolle), erwärmt man auf dem Wasserbade, bis kein Ammoniak mehr entweicht. Dann säuert man mit Essigsäure an und versetzt mit Calciumacetat. Nachdem der feinpulvrige Niederschlag (0.75 g) abfiltriert ist, engt man etwas ein und versetzt mit wässriger Kupferacetat-Lösung. Die Flüssigkeit färbt sich dabei tiefblau.

Zeitlicher Verlauf: 0.2 g Hydrochlorid, 58 ccm Wasser, 42 ccm Hypobromit, sonst wie früher.

Verbraucht nach 2 Min. 24.54 ccm n_{10} -Hypobromit, nach 10 Min. 25.79 ccm, nach 35 Min. 30.89 ccm.

Ber. für 2 Mol. NaOBr 24.00 ccm.

Einwirkung auf Benzoyl-alanyl-glycin.

Benzoylverbindung: 1.4 g Alanyl-glycin werden in 15 ccm Wasser gelöst und 7 g Bicarbonat zugefügt. Unter starkem Umschütteln trägt man allmählich bei Zimmertemperatur 4.0 g Benzoylchlorid ein und schüttelt solange, bis der Geruch nach dem Chlorid verschwunden ist. Nach dem Ansäuern mit Salzsäure und Waschen mit Wasser und Äther wird im Exsiccator getrocknet. Dann laugt man 5–6-mal mit Äther aus und krystallisiert aus der 20-fachen Menge heißen Wassers um. Die Substanz schmilzt bei 161°, nachdem bei 159° Sinterung eingetreten ist.

2.779 mg Sbst.: 0.267 ccm N (12°, 750 mm).

$C_{12}H_{14}O_4N_2$. Ber. N 11.2. Gef. N 11.36.

Titration: 0.2 g Subst. in 72 ccm Wasser und 8 ccm n_{10} -Natronlauge, 40 ccm n_{10} -Hypobromit.

Verbraucht nach 35 Min. 0.31 n_{10} -Hypobromit, nach 2 Stdn. 1.85 ccm.

Ber. für 1 Mol. 8.0 ccm.

Einwirkung auf Diketo-piperazin.

a) Zeitlicher Verlauf: 0.2 g Diketo-piperazin, 40 ccm Wasser, 120 ccm n_{10} -Hypobromit (ca. 13 Mol.) bei 0° ; sonst wie immer.

Zeit	1.5	7	20	60	90	120 ¹⁷⁾ Min.
Verbraucht n_{10} -NaOBr . . .	46.8	52.00	55.30	66.00	75.2	109.3 ccm.

Ber. für 2 Mol. NaOBr 35.0 ccm, für 3 Mol. 52.5 ccm.

b) Darstellung der 4-Imidazolone-2-carbonsäure: 4 g Diketo-Verbindung werden in 200 ccm Wasser gelöst und auf -2° abgekühlt. Dann werden 525 ccm n_{10} -Hypobromit, die ebenfalls auf -2° gekühlt sind, zugefügt, wodurch sich die Temperatur auf 0° erhöht. Beim Zusammengießen bildet sich ein weißer Niederschlag, der aber beim Umschütteln sofort wieder verschwindet; dann bleibt die Lösung ca. 1 Min. klar, trübt sich nun aber wieder schwach; die Trübung ist nach 5 Min. wieder völlig verschwunden. Man läßt 2 Stdn. in Eis stehen, dann ist das Hypobromit fast völlig verschwunden. Nun säuert man mit 2-n. Salzsäure an und destilliert bei gutem Vakuum auf 50—70 ccm ab. Nachdem man 10-mal mit Äther ausgeschüttelt hat, hinterläßt der Äther beim Abdestillieren ein Öl, das beim Anreiben mit einem Glasstab strahlig krystallin erstarrt. 0.8 g. Eventuell trocknet man noch kurz über Schwefelsäure.

Zur Reinigung wird der Körper in wenig warmem Essigester gelöst und mit dem gleichen Volumen Benzol versetzt. Nach dem Abfiltrieren und Erkalten krystallisiert die Substanz in fast völlig weißen, glänzenden Platten. Sie löst sich in allen organischen Lösungsmitteln, ausgenommen Äther, Essigester und Alkohol, sehr schwer, in Wasser ist sie spielend löslich. Sie schmilzt bei 113° unter Gasentwicklung (Kohlensäure), nachdem schon bei 110° Sintern eingetreten ist. Mit Diazoniumchlorid kuppelt sie unter Bildung eines gelben Azofarbstoffes. Leitet man in die ätherische Lösung Salzsäuregas ein, so fällt das Chlorhydrat aus. Die mit Natronlauge neutralisierte Lösung zeigt nach längerem Stehen starken Geruch nach Blausäure.

Mikroanalysen:

4.142 mg Subst.: 5.796 mg CO_2 , 1.314 mg H_2O . — 3.470 mg Subst.: 0.661 ccm N (18° , 753 mm).

$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_3\text{N}_2$. Ber. C 37.5, H 3.1, N 21.9. Gef. C 38.18, H 3.55, N 22.08.

0.100 g Subst. verbrauchten 7.64 ccm n_{10} -Natronlauge; ber. 7.81 ccm.

¹⁷⁾ Gasentwicklung (N) zwischen 90 und 120 Min.