

# Über die Hydrolyse der Eiweißstoffe.

II. Abhandlung:

## Die Gelatine.

Von

Zd. H. Skraup,

w. M. k. Akad.

*Mit Unterstützung des Treill-Fonds ausgeführt.*

Aus dem chemischen Institute der Universität in Graz.

(Vorgelegt in der Sitzung am 1. Dezember 1904.)

Vor einiger Zeit habe ich mitgeteilt,<sup>1</sup> daß bei der Hydrolyse des Caseïns mit konzentrierter Salzsäure verschiedene Amidosäuren entstehen, welche bisher nicht beobachtet worden sind. So zwei Diaminodicarbonsäuren: die Diaminoglutarsäure  $C_5H_{12}O_4N_2$  und die Diaminoadipinsäure  $C_6H_{14}O_4N_2$ , dann mehrere Oxyaminosäuren: die Oxyaminobernsteinsäure  $C_4H_7O_5N$ , eine Säure  $C_8H_{16}N_2O_6$ , welche die empirische Zusammensetzung der Dioxydiaminokorksäure hat, eine dreibasische Oxydiaminsäure, die Caseänsäure  $C_9H_{16}O_7N_2$  und die zweibasische Oxydiaminsäure, die Caseïnsäure  $C_{12}H_{16}N_2O_5$ , welche letztere in zwei Formen, einer aktiven und einer inaktiven, vermutlich der racemischen, auftritt.<sup>2</sup>

Wie ich in jener Mitteilung schon bemerkt habe, sind infolge dieser Resultate auch andere Eiweißstoffe in ähnlicher Art in Untersuchung gezogen worden und soll in dieser Ab-

<sup>1</sup> Monatshefte für Chemie, Bd. 25, p. 633 (1904).

<sup>2</sup> Nach Beobachtungen, die während der Korrektur gemacht worden sind, bedürfen die Angaben über die Caseänsäure und die Dioxydiaminokorksäure noch weiterer Untersuchung. Darüber wird später berichtet werden.

handlung mitgeteilt werden, zu welchen Ergebnissen die Untersuchung der Gelatine geführt hat.

Bei den Spaltungsstücken des Caseïns und der Gelatine, wie sie durch Hydrolyse entstehen, wurden bisher schon verschiedene Unterschiede konstatiert. Die wichtigsten sind, daß ersteres Glycocoll nur in Spuren liefert, die vielleicht von einer Verunreinigung herrühren, während letztere Glycocoll, wie ja längst bekannt, in sehr erheblichen Mengen gibt; weiter gibt Caseïn beträchtliche Mengen von Tyrosin, Gelatine aber, wie es scheint, nichts von demselben.

Zu diesen Unterschieden kommen, wie ich gefunden, nun noch folgende. Die Casean- und Caseïnsäure, die aus Caseïn in recht erheblichen Mengen isoliert werden konnten, sind bei der Gelatine nicht nachweisbar, ebensowenig die Diaminoxykorksäure und Oxyaminobernsteinsäure.

Die Diaminoglutarsäure ist in der Gelatine dagegen wieder enthalten, und zwar in viel größerer Menge als im Caseïn.

Ob das gleichzeitige Vorwalten (Gelatine), beziehlich Zurücktreten (Caseïn) von Glycocoll und Diaminoglutarsäure bloß zufällig ist oder auch bei anderen Eiweißstoffen zu beobachten ist, wird sich durch weitere Untersuchungen wohl herausstellen.

Aus der Gelatine ließ sich andererseits eine Säure  $C_{12}H_{25}N_5O_{10}$  isolieren, welche Leimsäure heißen soll, die aus dem Caseïn nicht erhalten worden ist, welche aber den gleichen Kohlenstoffgehalt hat wie die aus dem Caseïn entstehende Caseïnsäure  $C_{12}H_{24}N_2O_5$  und die von E. Fischer und E. Abderhalden<sup>1</sup> aus dem Caseïn isolierte Säure  $C_{12}H_{26}N_2O_5$ .

Bei dem negativen Befunde betreffend das Auftreten der Casean-, Caseïnsäure, Diaminoxykorksäure und Oxyaminobernsteinsäure bei der Gelatine, kommt allerdings mit in Betracht, daß sowohl die Hydrolyse selbst als auch die Trennung der Hydrolyseprodukte in anderer Art vorgenommen wurde als beim Caseïn.

Die Gelatine ist auch in kleinerer Menge (0.5 kg) hydrolysiert worden als das Caseïn (2 kg), so daß möglicherweise

<sup>1</sup> Zeitschr. für physiol. Chemie, 42, 540, 1904.

schon deshalb die auch aus dem Casein nur in sehr kleiner Menge isolierte Oxyaminobernsteinsäure bei der Gelatine übersehen worden ist.

Der verschiedene Gang der Operationen könnte andererseits auch den Nachweis der Leimsäure aus der Gelatine erklären.

Ich halte es aus verschiedenen Gründen aber für wahrscheinlich, daß das abweichende Verhalten der Gelatine in konstitutionellen Verschiedenheiten und nicht in der abweichenden Methode der Verarbeitung gelegen ist. Die Hydrolysierung der Gelatine nach ganz demselben Verfahren wie beim Casein ist übrigens im Gange.<sup>1</sup>

Die Hydrolyse der Gelatine wurde diesmal statt wie beim Casein mit konzentrierter und heißer Salzsäure, mit verdünnter Salzsäure und bei mäßiger Temperatur (39°), aber dafür durch längere Zeit (12 Tage) durchgeführt, also genau unter den Bedingungen, unter welchen Siegfried<sup>2</sup> die Gelatine hydrolysierte und welche ihm das Glutokyrin lieferten.

Dieses geschah aus folgendem Grunde. Die in Wasser relativ leichter löslichen und kristallisierenden Phosphorwolframate aus dem Casein, in welchen wie sich später zeigte, die Diaminoglutar- und Diaminoadipinsäure enthalten sind, zeigten zum Teile die größte Ähnlichkeit mit der Beschreibung, welche Siegfried von dem kristallisierten Phosphorwolframat gibt, welches er aus dem Glutokyrin erhalten hat und es lag seinerzeit nahe, die Siegfried'sche Verbindung zum Vergleiche heranzuziehen.

Es war ja immerhin möglich, daß nach einer weitergehenden Fraktionierung dieses kristallisierten Phosphorwolframmates aus Gelatine schließlich auch die in ihm enthaltenen organischen Verbindungen in kristallisierter Form zu erhalten sind, so wie es beim Casein geglückt ist und war dabei auch nicht ganz ausgeschlossen, daß das Siegfried'sche Phosphor-

---

<sup>1</sup> Während der Korrektur hat sich diese Vermutung bestätigt.

<sup>2</sup> Sitzungsber. d. kgl. sächs. Ges. d. Wissensch. zu Leipzig, Sitzung vom 2. März 1903.

wolframat, das, wie erwähnt, dem aus Casein enthaltenen so auffallend ähnlich ist, unter anderen die beiden oben genannten Diaminosäuren liefern könne.

Aus diesen Gründen erfolgte die Hydrolyse unter genau denselben Verhältnissen, wie sie Siegfried eingehalten hat. Sie wurde auch so, wie es Siegfried getan, polarimetrisch verfolgt und wurde auch ungefähr in der von ihm angegebenen Zeit ein Stillstand in der Änderung des Drehungsvermögens konstatiert. Nebenher wurden aber auch Proben auf das Verhalten gegen Phosphorwolframsäure gemacht und dabei gefunden, daß die anfangs relativ schwachen und in der Hitze fast unlöslichen Niederschläge mit der Zeit immer reichlicher wurden, daß allmählich beim Erkalten sich über den ersten amorphen Abscheidungen Kristallisationen zeigten und die beim Erkalten der Probe sich abscheidenden kristallinen Flocken immer mehr zunahmen, bis, ziemlich zusammenfallend mit dem optischen Stillstand, eine weitere Zunahme dieser Kristallisationen nicht mehr eintritt, welche ihrer Kristallform nach das Phosphorwolframat des sogenannten Kyrins sein müssen.

Bei diesen Versuchen wurde aber auch noch eine andere Beobachtung gemacht, welche die Verarbeitung der hydrolysierten Flüssigkeit wesentlich erleichterte. Nämlich die, daß bei allmählichem Zusatz von Phosphorwolframsäure in der Hitze, zunächst äußerst schwerlösliche, nahezu amorphe Fällung eintritt und daß erst bei neuerlichem Zusatz die Abscheidung der deutlich kristallisierten Doppelverbindungen erfolgt. Ist diese durch genügenden Zusatz von Phosphorwolframsäure beendet und dampft man das Filtrat sukzessive ein, so erhält man eine Reihe von Kristallisationen, die sich in Form und Löslichkeit von den »Kyrinkristallisationen« wesentlich unterscheiden.

Endlich gibt die Mutterlauge ganz so wie beim Casein auch nach sehr starkem Eindampfen und weiterem Zusatz von Phosphorwolframsäure keine Abscheidung mehr. Diese letzte Mutterlauge wurde in ganz derselben Weise weiter verarbeitet, wie es beim Casein geschah und nach Abscheidung der bekannten Amidosäuren, wie Glutaminsäure in Form der Salzsäureverbindung, wurden durch Kochen mit Kupfercarbonat und Kupferoxyd Kupfersalze dargestellt und diese gleichfalls

ganz so wie beim Casein durch fraktionelles Fälln mit verdünntem und schließlich mit reinem Alkohol und ganz zuletzt mit Äther in Fraktionen zerlegt.

Die erste amorphe Fällung durch Phosphorwolframsäure, einer umständlichen Fraktionierung unterworfen, gab schließlich eine relativ geringe Menge kristallisierter Phosphorwolframate, aus denen zwei kristallisierte organische Verbindungen abgeschieden werden konnten. Nur die eine reichte zur Untersuchung hin und erwies sich als eine Säure der Formel  $C_{12}H_{25}N_5O_{10}$ , die, wie schon früher erwähnt, Leimsäure heißen soll.

Das beim fraktionierten Fälln als zweiter Niederschlag erhaltene kristallisierte Phosphorwolframat, rohe »Kyrinfraktion«, ließ sich beim Umkristallisieren aus heißem Wasser in drei Anteile zerlegen. Der eine Anteil, der in Wasser praktisch unlöslich ist, tritt nur in untergeordneter Menge auf; der zweite, überwiegende, in Wasser schwierig lösliche, ist zweifellos jener, welcher das Siegfried'sche Kyrin enthält. Er kristallisiert in feinen Nadelchen, die meist konzentrisch gruppiert sind. Er wurde vorläufig nicht genauer untersucht. Es wurde nur soviel konstatiert, daß das Glutokyrin in möglichst reinem Zustande keine Biuretreaktion zeigt; in der Zusammensetzung wurden Abweichungen von den Zahlen gefunden, welche Siegfried angegeben hat.

Der leichtest lösliche dritte Anteil besteht aus sehr gut ausgebildeten Säulen. Er dürfte eine einheitliche Verbindung sein, denn er gibt, mit Ammoniak und Ätzbaryt wie üblich zerlegt, beim Eindampfen fast bis zum letzten Tropfen Kristalle von Diaminoglutarsäure.

Ob auch hier, bei der Gelatine, der Diaminoglutarsäure Diaminoadipinsäure beigemischt ist, war mit Sicherheit nicht zu entscheiden. Ein Vergleich mit der Diaminoglutarsäure aus Casein zeigte, daß diese überwiegend Fraktionen vom ungefähren Schmelzpunkte  $243^\circ$  und untergeordnet solche vom Schmelzpunkte  $238^\circ$  liefert, die aus Gelatine aber gerade verkehrt sich verhält. Ob die Diaminoglutarsäure wirklich in zwei isomeren Verbindungen vorliegt, das zu entscheiden, reichte das Material nicht aus.

Sehr bemerkenswert ist, daß die Diaminoglutarsäure aus Gelatine in viel größerer Menge entsteht wie aus Casein.

In großer Menge treten Phosphorwolframate auf, welche beim Eindampfen der Mutterlauge der zweiten Fällung, der rohen »Kyrinfraktion«, auskristallisieren. Sie sind äußerlich dem Phosphorwolframat der Diaminoglutarsäure sehr ähnlich, geben aber bei der Zerlegung ein molekulares Gemenge von Glycocoll und Diaminoglutarsäure. Dieses ist durch fraktionierte Kristallisation bisher nicht zu zerlegen gewesen, es gelang dieses aber ganz leicht durch die Kupfersalze, von welchen das der Diaminoglutarsäure in Wasser viel leichter löslich ist als das des Glycocolls.

---

### Experimenteller Teil.

500 g reinste Gelatine (Goldmarke) wurden in 5 l Salzsäure von 12·5% gelöst und im Thermostaten auf 39° gehalten. Der Fortgang der Hydrolyse wurde durch Beobachtung des Drehungsvermögens und des Verhaltens gegen Phosphorwolframsäurelösung von 50% gemessen. Im 10 cm-Rohr war die Drehung anfänglich  $-6 \cdot 10^\circ$ , sie war am fünften Tag auf  $-3 \cdot 98$  gesunken, am achten Tag auf  $-3 \cdot 40$  und änderte sich dann nicht mehr merklich. Fast ganz dieselbe Zeit hat Siegfried bei seiner Hydrolyse gebraucht. Da die Lösung sehr bald durch Flocken getrübt und deutlich gelb gefärbt war, wurde die Probe jedesmal mit Tierkohle aufgeköcht, wodurch bis auf einen schwachen Stich ins Gelbe, Entfärbung eintrat.

Nebenher wurden täglich je 5 cm<sup>3</sup> der Lösung kochend mit 10 cm<sup>3</sup> einer 50prozentigen Phosphorwolframsäurelösung vermischt.

In den ersten Tagen fielen in der Hitze halbweiche Harze aus, die in der Kälte erstarrten; die über den Klumpen stehende Flüssigkeit schied beim Stehen aber so gut wie nichts aus.

Späterhin wurden die in der Hitze ausfallenden Teile immer mehr kristallinisch und beim Erkalten fielen aus mikroskopischen Härchen bestehende kristallinische Flocken aus, und um so reichlicher, je länger die Hydrolyse gedauert hatte.

Deren Menge nahm von dem Zeitpunkt nicht mehr merklich zu, in welchem das Drehungsvermögen das Minimum erreicht hatte.

Dieses später ausfallende kristallinische Phosphorwolframat stimmt mit der Beschreibung überein, die Siegfried von dem Phosphorwolframat des Kyrins gibt.

Durch Titrierung mit einer 50prozentigen Lösung von Phosphorwolframsäure einmal in der Hitze, das anderemal in der Kälte wurden die zur Ausfällung des so gut wie unlöslichen Phosphorwolframmates und die zur vollständigen Ausfällung nötigen Mengen ermittelt.

Nach dem Ergebnisse dieses Vorversuches wurden je 1000  $cm^3$  der hydrolysierten Flüssigkeit kochend mit einer gleichfalls kochenden Lösung von 440 g Phosphorwolframsäure in 130  $cm^3$  Wasser vermischt, der ausfallende, anfänglich weiche, bald aber erhärtende Niederschlag heiß abgenutscht und mit etwas heißem Wasser nachgewaschen. Der Niederschlag soll mit I bezeichnet werden.

Das Filtrat, abermals kochend mit derselben Menge Phosphorwolframsäure versetzt, erstarrte beim Stehen über Nacht zu einem Brei mikroskopischer Nadeln, untermischt mit großen, lichtgelben Kristallen, welche letztere nach ihrem Verhalten, insbesondere der leichten Löslichkeit in Wasser und Äther, nichts anderes als freie Phosphorwolframsäure oder eine sehr lockere Doppelverbindung dieser sein können. Das Filtrat dieses Gemenges soll Filtrat 1 heißen.

Das abgesaugte Gemisch wurde mit Wasser angerührt, wobei die gelben Kristalle in Lösung gingen und die weißen eine Formänderung zeigten, und sodann nochmals abgesaugt und gewaschen, was zum Unterschied gegen die frühere Filtration sehr schlecht ging. Der Niederschlag soll II heißen. Beide Filtrate samt den Waschwässern wurden getrennt eingedampft. Das zweite enthielt relativ wenig Substanz. An Äther gab es erhebliche Mengen von freier Phosphorwolframsäure ab; beim sukzessiven Eindampfen gab es dann ganz ähnliche Fraktionen wie das Filtrat 1.

Das Filtrat 1 gab nach starkem Konzentrieren gelbe, blätterige Kristallaggregate, deren Menge 650 g betrug. Kristallisation III.

Die Mutterlauge der Kristallisation III gab eine zweite, geringere, von Harz durchsetzte Kristallisation und das Filtrat von dieser nach neuerlichem Zusatz von Phosphorwolframsäure eine nicht sehr reichliche amorphe Fällung; das Filtrat von dieser wurde am Wasserbade sehr stark und anhaltend eingedampft, wobei Salzsäure entwich. Auf Zusatz von höchst konzentrierter Phosphorwolframsäurelösung trat nun abermals Abscheidung von Kristallen ein, Kristallisation IV, welche der Kristallisation von III in allen Stücken ähnlich waren und 745 g Trockensubstanz enthielten. Die von diesen durch Filtration und Waschen mit Wasser getrennte Mutterlauge gab ein festes Phosphorwolframat nicht mehr. Filtrat V.

Die zwei vorerwähnten amorphen Abscheidungen nach der Kristallisation III ließen sich durch sukzessives Lösen in Wasser in harzige Anteile zerlegen, die ausfielen und in Kristallisationen, die nach dem Wiedereindampfen in mehr oder weniger reiner Form dann anschossen. Diese Kristallisationen hatten schließlich alle Eigenschaften wie die mit III und IV bezeichneten.

Das Filtrat V wurde, wie später beschrieben, in Kupfersalze übergeführt.

Es sei bemerkt, daß bei der fraktionellen Kristallisation nahezu aller der erwähnten Phosphorwolframate aus den verschiedenen Mutterlauen durch Äther freie Phosphorwolframsäure, und manchmal in sehr bedeutenden Mengen, zu extrahieren war. Das spricht dafür, daß die anfänglichen Fällungen in säureärmere Doppelverbindungen und in freie Phosphorwolframsäure dissoziieren.

### **Amorphe Fällung I.**

Sie wog trocken 1180 g. Mit viel Wasser gekocht, geht sie allerdings zum großen Teil in Lösung und beim Erkalten der einzelnen Auszüge fallen manchmal Niederschläge aus, die kristallinisch sind. Infolge der geringen Löslichkeit wären zur Aufarbeitung der ganzen Substanzmenge aber außerordentlich große Mengen von Wasser nötig gewesen. Es zeigte sich indessen, daß Alkohol die überwiegende Menge sehr leicht löst.

Die ganze Fällung wurde mit 1·2 l Alkohol am Wasserbade digeriert, wobei bis auf 37 g alles in Lösung ging.

Das alkoholische Filtrat wurde heiß mit demselben Volum heißen Wassers vermischt, worauf beim Erkalten ein schweres Harz und über demselben ein leichtes Pulver ausgefallen war, das 150 g wog. Dem Filtrate wurde die vierfache Menge von heißem Wasser zugefügt, wobei in der Hitze nichts ausfiel, beim Erkalten aber wieder ein Pulver im Gewichte von 80 g.

Beim Eindampfen des nunmehr sehr verdünnt alkoholischen Filtrates fällt wieder ein hellgelbes Harz aus und wenn nach dem Erkalten von diesem abgegossen und sehr stark eingedampft wird, schießen gut ausgebildete Prismen an im Gewicht von 250 g.

Durch Wiederauflösen der einzelnen harzigen Abscheidungen in Alkohol und sukzessives Fällern mit Wasser und schließliches Eindampfen wurden geringere Mengen schwerlöslicher Pulver, vorwiegend Harze, und nur noch eine sehr kleine Menge, etwa 10 g, des in Prismen kristallisierten Phosphorwolframat erhalten.

Aus allen den einzelnen Fraktionen wurden in üblicher Weise durch Lösen in Ammoniak, Fällern mit Baryt und schließlich mit Kohlendioxyd die organischen Anteile isoliert, aber mit Ausnahme der aus dem kristallisierten Phosphorwolframat erhaltenen, blieben alle anderen auch nach wochenlangem Stehen amorph und waren auch sonst nicht in definierte Form zu bringen.

Die aus dem kristallisierten Phosphorwolframat erhaltene organische Verbindung schoß beim längeren Stehen der konzentrierten wässerigen Lösung in Prismen an. Aus der braunen Mutterlauge konnte durch sukzessives und oft wiederholtes Fällern mit Alkohol, Lösen in Wasser, abermaliges Fällern u. s. w. noch ein weiterer kleiner Anteil kristallisiert erhalten werden.

Die vereinigten Kristallisationen, wiederholt aus Wasser umkristallisiert, gaben zunächst Prismen, deren Schmelzpunkt zunächst bei 265 bis 270° lag und sich allmählich auf 290° hob. Dieser schwerer lösliche Anteil war aber viel zu gering, um näher untersucht werden zu können.

Aus den Mutterlaugen wurde beim Eindampfen ein leichter löslicher Teil erhalten, dessen Schmelzpunkt nach mehrmaligem Umkristallisieren schließlich bei 251 bis 253° konstant blieb. Er bildet mikroskopische, lange, dünne Prismen, die ziemlich leicht in heißem Wasser, schwieriger in kaltem löslich sind und von 50prozentigem Alkohol sehr schwer gelöst werden.

Die Säure, welche Leimsäure genannt werden soll, rötet empfindliches Lakmuspapier und schmeckt eben nur wahrnehmbar süßlich. In konzentrierter Salzsäure löst sie sich schwierig, beim freiwilligen Verdunsten hinterbleiben dann Dendriten und Krusten, welche aus mikroskopischen, unregelmäßigen, langen Blättchen bestehen. Die Säure ist kristallwasserfrei.

Die wässrige Lösung wird durch Silbernitrat nicht gefällt. Läßt man nach Zusatz von Ammoniak aber freiwillig verdunsten, so scheidet sich sehr rasch beim Reiben mit dem Glasstab ein schwerlösliches Salz ab, welches aus mikroskopischen, unregelmäßigen Tafeln besteht.

0·1196 g, bei 110° getrocknet, gaben 0·1561 g CO<sub>2</sub> und 0·0729 g H<sub>2</sub>O.

0·1239 g, bei 110° getrocknet, gaben 19·7 cm<sup>3</sup> N bei 22° und 735 mm.

In 100 Teilen:

	Berechnet für <u>C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub></u>	Gefunden
C .....	36·05	35·70
H .....	6·31	6·84
N .....	17·58	17·55

Durch Kochen mit Kupferhydroxyd erhält man das in Lösung tiefblaue Kupfersalz, welches schon beim starken Einengen, noch reichlicher dann beim Erkalten in hellblauen, langen, dünnen Prismen auskristallisiert. Es enthält Kristallwasser, welches beim Trocknen bis auf 130° nur schwierig entweicht. Nach der Analyse enthält die bei 130° getrocknete Substanz noch Wasser. Ob dieses noch als Kristallwasser anzunehmen ist oder ob ein basisches Salz vorliegt, kann vorläufig nicht entschieden werden.

0·1902 g verloren, bei 130° getrocknet, 0·0142 g.

In 100 Teilen:

	Berechnet für $C_{12}H_{19}N_5O_{10}Cu_3 + 5H_2O$	Gefunden
3 H <sub>2</sub> O . . . . .	8·02	8·05

0·1764 g, bei 130° getrocknet, gaben 0·1498 g CO<sub>2</sub>, 0·0564 g H<sub>2</sub>O und 0·0684 g CuO.

In 100 Teilen:

	Berechnet für $C_{12}H_{19}N_5O_{10}Cu_3 + 2H_2O$	Gefunden
C . . . . .	23·22	23·21
H . . . . .	3·72	3·58
Cu . . . . .	30·78	31·05

Bei der großen Schwierigkeit, Amidosäuren rein darzustellen, kann die aufgestellte Formel nur mit Vorbehalt gegeben werden.

### Niederschlag II (Kyrinfraktion).

Nach einer Trockenprobe enthielt er 852 g Trockensubstanz. Er löst sich bis auf einen kleinen Rest in etwa der vierfachen Menge Wasser. Da die kochend gesättigte Lösung aber auch im Heißwassertrichter bei der geringsten Abkühlung Kristalle abscheidet, die das Filter sofort verstopfen, muß beim Umkristallisieren viel mehr Wasser genommen und das Filtrieren mit einem stark vorgewärmten Siebtrichter vermittels der Saugpumpe vorgenommen werden. Um Verstopfen zu vermeiden, empfiehlt es sich, das Filtrierpapier jedesmal zu erneuern, wenn der Inhalt des Buchner'schen Siebfilters einmal durchgelaufen ist.

Nach dem Erkalten des Filtrates erhält man kristallinische Flocken, die unter dem Mikroskope die schon von Siegrfid beschriebenen Aggregate von Härchen zeigen. Die Kristallisation war auf 235 g Trockensubstanz vermindert. Das Filtrat wurde zur Kristallisation gedampft und lieferte eine Kristallisation II B, die später beschrieben wird.

Bei nochmaligem Umkristallisieren der 235 g verminderte sich die Menge nur mehr auf 215 g.

Diese von fremden Stoffen deshalb vermutlich so gut wie freie Kristallisation wurde zur vorläufigen Orientierung nach dem Trocknen bei 75° analysiert.

0·8276 g gaben 0·1625 g CO<sub>2</sub> und 0·0683 g H<sub>2</sub>O.

0·7802 g gaben 19·7 cm<sup>3</sup> N bei 17·5° und 723·5 mm.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Mittel der Analysen von Siegfried
C .....	5·36	6·27
H .....	0·92	1·20
N .....	3·55	3·14

Bis auf den Kohlenstoffgehalt findet Übereinstimmung zwischen meiner und Siegfried's Analyse statt.

Die Untersuchung der Verbindung, in welcher das Kyrin vorhanden sein muß, ist noch nicht abgeschlossen. Ich füge heute nur zu, daß es mir nicht gelungen ist, das Sulfat des Kyrins in filtrierbarer Form zu erhalten und daß nach weitergetriebener Reinigung das Kyrin die von Siegfried beobachtete Biuretreaktion nicht gab.

### Kristallisation II B (Phosphorwolframat der Diaminoglutarsäure).

Die Mutterlauge vom ersten Umkristallisieren des rohen Kyrinwolframmates gabeingedampft reichliche Kristallmengen, die aus mikroskopischen, viereckigen, schmalen Tafeln bestehen. Trocken wogen sie 280 g. Ihre Mutterlauge schied, mit Wasser verdünnt, ein Harz aus; die von diesem abgegossene Flüssigkeit gab an Äther freie Phosphorwolframsäure ab und, neuerdings abgedampft, eine neuerliche Kristallisation, die, in Wasser aufgelöst, wieder ein schwerlösliches Pulver abschied, dessen Filtrat nun beim Eindampfen dann wieder teilweise kristallisierte.

Es sei an dieser Stelle bemerkt, daß diese Aufeinanderfolge von Fraktionen bei allen den Mutterlauen, die im Laufe

der Untersuchung der verschiedenen Phosphorwolframate entstan- den und die fast alle aufgearbeitet wurden, zu beob- achten war.

Die oben erwähnte, 280 g wiegende Kristallisation löst sich in heißem Wasser recht leicht, viel leichter wie das Kyrin-Phosphorwolframat, und zwar etwa in dem dreifachen Gewicht, bis auf eine geringe Menge eines weißen, fast unlös- lichen Pulvers, das bei mehrmaligem Umkristallisieren sich zwar verringerte, aber immer wieder auftrat.

Die umkristallisierte Substanz hatte ihr Aussehen kaum verändert. Sie wurde in Ammoniak gelöst, mit reinem Ätz- baryt ausgefällt, das Filtrat vom phosphorwolframsauren Baryt mit Kohlendioxyd vom überschüssigen Ätzbaryt befreit und endlich zu mäßig dickem Sirup eingedampft.

Dieser kristallisierte nach kurzem Stehen. Die Prismen ließen sich mit 50prozentigem Weingeist von der Mutterlauge befreien, die eingedampft eine zweite und dritte Kristallisation lieferte.

Die erste Kristallisation besaß nach dem Umlösen aus heißem Wasser den Schmelzpunkt 240 bis 247° und ähnelte im Aussehen der Diaminoglutarsäure, welche ich aus Casein erhalten habe.

Vor der Analyse wurde sie nochmals aus Wasser um- kristallisiert und hatte dann den Schmelzpunkt 238 bis 242°.

0·2053 g, bei 105° getrocknet, gaben 0·2819 g CO<sub>2</sub> und 0·1289 g H<sub>2</sub>O.

0·1792 g, bei 105° getrocknet, gaben 26·6 cm<sup>3</sup> N bei 18° und 733 mm.

In 100 Teilen:

	Berechnet für <u>C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub></u>	<u>Gefunden</u>
C .....	37·0	37·45
H .....	6·1	7·02
N .....	17·2	16·80

Die aus dem Phosphorwolframat *II B* gewonnene Diamino- glutarsäure kristallisierte bis auf einen sehr kleinen Rest. Man kann deshalb annehmen, daß das Phosphorwolframat, von kleinen Verunreinigungen abgesehen, ein einheitlicher Kör- per sei.

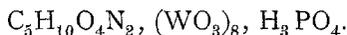
Da über die Zusammensetzung von Phosphorwolframaten der Amidosäuren sehr wenig bekannt ist, wurde eine Analyse ausgeführt.

Das Präparat verlor, an der Luft trocken geworden, bei 78° erwärmt, so gut wie nichts an Gewicht.

1·0934 g gaben 0·1278 g CO<sub>2</sub> und 0·0678 g H<sub>2</sub>O.

0·8699 g gaben 10·7 cm<sup>3</sup> N bei 17° und 733 mm.

Diese Zahlen passen am besten auf eine Formel



	Berechnet	Gefunden
C <sub>3</sub> .....	3·13	3·19
H <sub>10</sub> .....	0·52	0·69
N <sub>2</sub> .....	1·46	1·37

Es braucht nicht besonders hervorgehoben zu werden, daß die ermittelten Zahlen wenig von jenen abweichen, die für ähnliche Formeln aber mit 7 oder 9 Mol. WO<sub>3</sub> sich berechnen.

### Kristallisation III.

Die Kristalle, unregelmäßige Tafeln, lösen sich in heißem Wasser sehr leicht; wird soviel kaltes Wasser zugefügt, daß die gesamte Wassermenge etwa das vier- bis fünffache der festen Substanz beträgt, so fällt ein Harz aus, das manchmal in Nadeln sich umwandelt. Die Lösung wurde bis zur reichlichen Kristallisation eingedampft, die nach dem Erkalten abgeschiedenen Kristalle nochmals aus Wasser umkristallisiert und dann in Form glänzender Kristalle erhalten, die unter dem Mikroskop Tafeln oder Prismen von unregelmäßiger Form zeigten.

Die beim Umkristallisieren entstehenden Mutterlaugen gaben eingedampft neuerliche, mehr amorphe Abscheidungen, die, in geeigneter Weise in Wasser gelöst, wieder Harze abgeschieden, deren Mutterlauge sodann wieder neue, der Hauptfraktion ganz ähnliche Kristallisationen gaben.

Die durch Umkristallisieren gereinigte Hauptfraktion wurde in Ammoniak gelöst und dann durch Ätzbaryt, sodann mit Kohlendioxyd ausgefällt. Nach dem Eindampfen erstarrte die Flüssigkeit zu einem harten Brei von Kristallen, die abgesaugt und mit 50prozentigem Weingeist von der Mutterlauge befreit wurden. Das Umkristallisieren gelingt am besten derart, daß zur sehr konzentrierten, heißen, wässerigen Lösung das gleiche Volum Alkohol gefügt wird. Man erhält so blendend weiße Kriställchen, die unter dem Mikroskope sich als lange, schief übereinandergeschobene Prismen erweisen. Sintern bei 220°, sodann Bräunung, Schmelzen unter Gasentwicklung bei 238°.

0·2368 g, bei 110° getrocknet, gaben 0·2966 g CO<sub>2</sub> und 0·1374 g H<sub>2</sub>O.

0·1730 g, bei 110° getrocknet, gaben 27·9 cm<sup>3</sup> N bei 18·5° und 724·5 mm.

In 100 Teilen:

	Berechnet für $C_9H_{18}N_4O_8$	Gefunden
C .....	34·80	34·16
H .....	5·84	6·49
N .....	18·10	18·02

Wie weiter unten noch gezeigt wird, läßt sich diese Verbindung in Glycocoll und Diaminoglutarsäure zerlegen und als salzartige Verbindung beider Amidosäuren auffassen.

#### Kristallisation IV.

Diese enthält im wesentlichen dieselben Phosphorwolframate wie die Kristallisation III, ist aber mit mehr Harzen verunreinigt. Die Kristalle lösen sich nahezu im gleichen Wassergewicht. Die hier sehr reichliche Harzfällung ist beendet, wenn im ganzen das fünffache Wassergewicht zugesetzt ist. Das abgeschiedene Harz ist bis auf eine kleine Menge eines sandigen Pulvers in Alkohol sehr leicht löslich.

Die vom Harz abgeessene wässrige Lösung erstarrt, stark konzentriert, zu Kristallen, die beim Waschen mit Wasser teilweise verharzen und in heißem Wasser nur unvollständig löslich sind. Die hiebei eintretende Lösung eingedampft, gibt

nun Kristalle, die in Wasser nahezu völlig sich auflösen, im Äußeren der Kristallisation III vollkommen ähneln und in ammoniakalischer Lösung im Ätzbaryt zersetzt, wie früher beschrieben wurde, ganz dieselbe organische Verbindung lieferten.

Sie sinterte und bräunte sich von 230° an, schmolz unter Gasentwicklung bei 240 bis 242°, also etwas höher wie die aus der Kristallisation III, zeigte aber weder in Kristallform noch in Löslichkeit einen Unterschied und hatte auch dieselbe Zusammensetzung.

0·2035 g, bei 110° getrocknet, gaben 0·2550 g CO<sub>2</sub> und 0·1159 g H<sub>2</sub>O.

0·1448 g, bei 110° getrocknet, gaben 23 cm<sup>3</sup> N bei 18·5° und 727 mm.

In 100 Teilen:

	Berechnet für <u>C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub></u>	Gefunden
C .....	34·80	34·17
H .....	5·84	6·37
N .....	18·10	18·11

Die Mutterlauge der Rohkristallisation wurde mit jener von der Rohkristallisation aus Phosphorwolframat III vereinigt eingedampft. Bis auf einen geringen Rest kristallisierte alles. Diese zweite Rohkristallisation, durch Umkristallisieren gereinigt, bestand wieder aus mikroskopischen, schmalen Blättern, die häufig zu unregelmäßig angeordneten Kristallen vereinigt sind.

Es trat wieder bei 220° Braunfärbung auf und das Schmelzen erfolgte umter Gasentwicklung bei 238 bis 239°.

Die Zusammensetzung der bei 110° getrockneten Kristalle war fast dieselbe wie bei den ersten Anschüssen.

0·1923 g gaben 0·2488 g CO<sub>2</sub> und 0·1134 g H<sub>2</sub>O.

0·1492 g gaben 23·3 cm<sup>3</sup> N bei 18·5° und 732 mm.

In 100 Teilen:

	Berechnet für <u>C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub></u>	Gefunden
C .....	34·80	35·29
H .....	5·84	6·59
N .....	18·10	17·62

Nachdem die verschiedenen Fraktionen weder in der Zusammensetzung noch in anderen Eigenschaften erhebliche Abweichungen zeigen, muß die vorliegende Substanz wohl als einheitlich aufgefaßt werden. Sie läßt sich unschwer in Glycocoll und Diaminoglutarsäure zerlegen und muß wegen der berechneten Zusammensetzung als eine salzartige Verbindung von 2 Mol. Glycocoll und 1 Mol. der Diaminoglutarsäure  $2(\text{C}_2\text{H}_4\text{NO}_2) + \text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$  betrachtet werden.

Solche salzartige Verbindungen von zwei verschiedenen Amidosäuren sind auch schon von E. Fischer beschrieben worden.

Die Zerlegung gelingt leicht durch Überführung in das Kupfersalz. Dampft man die mit Kupferoxyd in der Hitze gesättigte dunkelblaue Lösung sehr stark ein, so kristallisiert ein hellblaues Kupfersalz aus. Dieses ist durch vorsichtiges Anrühren mit Wasser leicht in einen schwerlöslichen und sehr leichtlöslichen Anteil zu trennen.

Der schwerlösliche aus Wasser umkristallisiert, ist nach Eigenschaften und Zusammensetzung das Kupfersalz des Glycocolls. Es bildet lichthimmelblaue Blättchen, die auf der Tonplatte getrocknet, veilchenviolett werden.

0·2486 g verloren, bei 130° getrocknet, 0·0191 g.

In 100 Teilen:

	Berechnet für $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{N}_2\text{Cu} + \text{H}_2\text{O}$	Gefunden
$\text{H}_2\text{O}$ .....	8·26	7·68

0·2296 g Trockensubstanz gaben 0·1947 g  $\text{CO}_2$ , 0·0782 g  $\text{H}_2\text{O}$  und 0·0860 g  $\text{CuO}$ .

In 100 Teilen:

	Berechnet für $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{N}_2\text{Cu}$	Gefunden
C .....	22·60	23·13
H .....	3·78	3·81
Cu .....	30·05	29·93

Das leichtlösliche Kupfersalz, sehr stark eingedampft, hinterließ eine strahlige Masse, die abgesaugt, mit wenig Wasser und dann mit verdünntem Weingeist gewaschen, sodann mit einer zur Lösung unzureichenden Menge Wasser in Lösung gebracht und abermals zur Kristallisation gedampft wurde. Das so erhaltene Präparat, Nadeln, die feucht dunkelblau, trocken lichter sind, zeigte in Form und Löslichkeit im Wasser die größte Ähnlichkeit mit dem Kupfersalz der Diaminoglutarsäure aus Casein.

0·2596 g, bei 130° getrocknet, gaben 0·2523 g CO<sub>2</sub>, 0·0956 g H<sub>2</sub>O und 0·0906 g CuO.

In 100 Teilen:

	Berechnet für <u>C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>·O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>Cu</u>	<u>Gefunden</u>
C .....	26·82	26·51
H .....	3·60	4·11
Cu .....	28·42	27·88

Die durch Zerlegung des leichter löslichen Kupfersalzes mit Schwefelwasserstoff erhaltene Säure zeigte im allgemeinen Übereinstimmung mit der Diaminoglutarsäure aus Casein.

Um die zwei Säuren verschiedener Abstammung sicherer vergleichen zu können, wurden beide einer systematischen fraktionellen Kristallisation unterworfen. Bei dieser zeigte es sich, daß die Säure aus Casein in zwei Hauptfraktionen zu zerlegen ist, von denen eine, wie seinerzeit schon angegeben wurde, bei 238° schmilzt, die andere aber höher, und zwar konstant bei 243 bis 244°.

Die höher schmelzende Fraktion tritt in größerer Menge auf wie die niedriger schmelzende und ist dieser in allen Stücken sonst nahezu gleich, vielleicht nur etwas schwerer löslich.

0·1420 g, bei 110° getrocknet, gaben 0·1896 g CO<sub>2</sub> und 0·0843 g H<sub>2</sub>O.

In 100 Teilen:

	Berechnet für <u>C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub></u>	<u>Gefunden</u>
C .....	37·00	36·41
H .....	6·04	6·64

Die Diaminoglutarsäure aus Gelatine hat nach oft wiederholtem Umkristallisieren in der schwerstlöslichen Fraktion den Schmelzpunkt  $280^{\circ}$  und wäre es daher nicht unmöglich, daß auch aus Gelatine die Diaminoadipinsäure entstanden ist.

Die leichter löslichen Fraktionen zeigen meistens den konstanten Schmelzpunkt  $238^{\circ}$ , manchmal aber auch  $243^{\circ}$ .

Ob man berechtigt ist, das Auftreten zweier isomerer Diaminoglutarsäuren anzunehmen, müssen Versuche mit größeren Substanzmengen zeigen, die in Vorbereitung stehen.

Es wurde schließlich das optische Drehungsvermögen der Säure vom Schmelzpunkte  $243^{\circ}$  aus Casein und der Säure vom Schmelzpunkte  $238^{\circ}$  aus Gelatine in 20prozentiger Salzsäure festgestellt.

Säure aus Casein:

$$p = 3.08, \quad d \frac{26}{4} = 1.1093, \quad \alpha = +0.25^{\circ}, \quad (\alpha)_D = +10.0^{\circ}.$$

Säure aus Gelatine:

$$p = 4.43, \quad d \frac{26}{4} = 1.1097, \quad \alpha = +0.21^{\circ}, \quad (\alpha)_D = +8.4^{\circ}.$$

Die Differenz ist so gering, daß sie für eine Verschiedenheit der Säure nicht in Betracht kommen kann.

### Kupfersalze.

Die Mutterlauge der Phosphorwolframate, die auch mit höchstkonzentrierter Phosphorwolframsäurelösung keine Abscheidung mehr gab, wurde mit Ätzbaryt ausgefällt, das Filtrat vom Barytniederschlag durch Kohlensäure von überschüssigem Baryt und durch Schwefelwasserstoff von Kupfer befreit, welches aus den bei den früheren Operationen verwendeten Kupfergefäßen stammte.

Durch wiederholtes Eindampfen wurde das in Lösung befindliche Chlorbaryum möglichst abgeschieden. Beide aufeinanderfolgende Fraktionen des Baryumchlorids lösten sich in Wasser so gut wie vollständig. Die leichten Trübungen, die auftraten, gaben keine Tyrosinreaktionen.

Die dicke Mutterlauge, die vom Chlorbaryum abgesaugt worden war, wurde nun mit Schwefelsäure genau ausgefällt. Das Filtrat vom Baryumsulfat stark eingedampft, schied eine Kristallisation ab, welche alle Eigenschaften der Salzsäureverbindung der Glutaminsäure hatte.

Das Filtrat von dieser wurde in einem trockenen Luftstrom zum konstanten Gewicht eingedampft und hinterließ 57 g eines Sirups, der in wenig absolutem Alkohol in der Hitze sich löste, bei weiterem Zusatz von Alkohol aber ein kristallinisches Pulver abschied, welches gleichfalls salzsaurer Glutaminsäure gleich.

Eine amorphe Abscheidung wie beim Casein, welche die Oxyaminobernsteinsäure enthielt, zeigte sich bei der Gelatine nicht.

Die alkoholische Lösung wurde von Alkohol befreit und kochend mit Kupfercarbonat und schließlich mit gefällttem Kupferoxyd neutralisiert. Sie färbte sich dunkelblau und wurde genau so wie es seinerzeit beim Casein beschrieben worden ist, durch Behandlung mit Alkohol in drei Hauptfraktionen zerlegt. Zunächst fällt auf Zusatz von Alkohol ein blaugrünes Salz aus. Das Filtrat von diesem zur Trockene gedampft und mit absolutem Alkohol angerührt, scheidet ein graugrünes Salz ab, die Hauptmenge geht aber in Lösung, während beim Casein relativ wenig in absolutem Alkohol lösliche Kupfersalze auftreten.

Das blaugüne und das graugüne Salz wurden durch wiederholtes Lösen in Wasser und Wiederausfällen mit Alkohol gereinigt, wobei ersteres so wie beim Casein wasserunlösliche Salze abschied, die deutlich kristallinisch und lichtweißlichgrün gefärbt waren.

Das blaugüne Salz ist in verdünntem Alkohol leichter löslich wie die analoge Verbindung aus Casein und anders gefärbt; auch das grüne ist weniger lebhaft grün gefärbt und hat die Tendenz, in schwarzgrünen Harzmassen auszufallen.

Beide wurden schließlich mit Schwefelwasserstoff von Kupfer und sodann mit Silberoxyd von Chlor befreit.

### Säure aus blaugrünem Kupfersalz.

Sie dunstete zu einem Sirup ein, der allmählich vereinzelte Kristalle zeigte und beim Umrühren zu einem Kristallbrei erstarrte, der bald steinhart wurde.

In einer Glasglocke über Wasser gestellt, erweichte die Masse; sie wurde auf Pappe, die aus Schleicher-Schüll'schem Filtrierpapier bereitet war, aufgestrichen, welche die Mutterlauge aufsaugte, als sie in eine feuchte Luft haltende Glasglocke gestellt wurde. Die nahezu rein weißen Kristalle wurden mit Tierkohle aus Wasser öfters umkristallisiert und bildeten dann mikroskopische Nadelchen, die zu blätterartigen Aggregaten verwachsen waren.

Im Kapillarrohr erhitzt, sintern sie bei  $210^{\circ}$ , schäumen bei  $220^{\circ}$  auf, ohne zu schmelzen. Die lichtbräunliche Masse bläht sich bei  $270^{\circ}$  wieder auf, ist aber bei  $290^{\circ}$  noch nicht geschmolzen.

0.0868 g, bei  $110^{\circ}$  getrocknet, gaben 0.1145 g  $\text{CO}_2$  und 0.0336 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_4\text{N}$
C .....	36.01	36.09
H .....	4.33	5.26

Die Säure hat die Zusammensetzung der Asparaginsäure und ist bestimmt verschieden von der Caseinsäure, welche in dem aus Casein erhaltenen blaugrünen Kupfersalz enthalten ist.

### Säure aus graugrünem Kupfersalz.

Das Kupfersalz mit Schwefelwasserstoff zersetzt und dann mit Silberoxyd von Salzsäure befreit, lieferte eine Säure, die aus der zum Sirup gedampften Lösung nach einigen Tagen zum geringen Teil auskristallisierte. Ein großer Teil blieb amorph.

Die Kristalle sind in kaltem Wasser recht leicht, in heißem Wasser nicht viel reichlicher, schwierig in 50prozentigem Weingeist, nicht in absolutem Alkohol löslich. Sie wurden mit Tierkohle entfärbt und wiederholt aus der bis zum Beginn der

Kristallisation eingedampften Lösung durch Zusatz des gleichen Volums Alkohol zum Auskristallisieren gebracht. Sie sintern unter Dunkelfärbung bei 240° und schmelzen unter Gasentwicklung bei 248°.

0·1157 *g*, bei 103° getrocknet, gaben 0·1358 *g* CO<sub>2</sub> und 0·0634 *g* H<sub>2</sub>O.

0·1101 *g* gaben 18·3 *cm*<sup>3</sup> N bei 18° und 732 *mm* B.

In 100 Teilen:

	Berechnet für Glycocoll	Gefunden
C .....	31·96	32·02
H .....	6·71	6·13
N .....	18·70	18·78

Die Gelatine liefert demnach die Caseinsäure, wie sie aus dem Casein entsteht, nicht. Das Kupfersalz aus Gelatine, welches nach seiner Abscheidung und seinen Löslichkeitsverhältnissen mit dem aus Casein vergleichbar wäre, enthält überwiegend Glycocoll.