

Über das Desamidokasein

von

Zd. H. Skraup und Ph. Hoernes.

Aus dem chemischen Institute der Universität Graz.

(Vorgelegt in der Sitzung am 10. Mai 1906.)

Nach älteren Untersuchungen von H. Schiff¹ und C. Paal² spalten Eiereiweiß, beziehlich Pepton und Glutin, mit salpetriger Säure behandelt, Stickstoff ab. Dasselbe ist nach H. Schrötter³ bei den Albumosen der Fall. Schiff nimmt an, daß der austretende Stickstoff einer CONH₂-Gruppe entstammt, und zwar deshalb, weil der neu entstandene Stoff die Biuretreaktion nicht mehr zeigt. Paal wieder ist der Ansicht, daß Aminogruppen zerstört worden sind. Wir haben ähnliche Untersuchungen mit dem Kasein ausgeführt und werden im hiesigen Institut diese Untersuchungen auch noch auf andere Proteine ausgedehnt.

Die Voraussetzungen hiebei sind folgende: Wird ein Protein mit salpetriger Säure behandelt und hierauf hydrolysiert, so muß aus den entstehenden primären Spaltungsprodukten einmal festzustellen sein, ob die Annahme von Schiff oder die von Paal richtig ist.

Denn wurden lediglich Amidogruppen verändert, dann kann das mit salpetriger Säure zuvor behandelte Protein hydrolysiert keine anderen Amidosäuren etc. geben als das nicht desamidierte. Reagiert die salpetrige Säure ausschließlich, oder aber nebenher mit Aminogruppen, dann werden jene Reste, die hiebei sich umsetzen, voraussichtlich NH₂ gegen OH austauschen

¹ Berl. Ber., 29, II, 1354 (1896).

² Ebenda, 29, 1084 (1896).

³ Monatshefte für Chemie, 9, 211 (1898).

und bei der Hydrolyse werden andere primäre Spaltungsstücke entstehen als bei der Hydrolyse des ursprünglichen Proteïdes. Statt Aminosäuren könnten Oxysäuren, statt Diaminosäuren entweder Dioxysäuren oder Oxyaminoderivate auftreten u. s. w.

Aus diesen desamidierten Spaltungsstücken lassen sich Rückschlüsse auf die Konstitution des Proteïns ziehen, d. h. feststellen, welche seiner Spaltungsstücke nicht in peptidartiger Bindung stehen, sondern derartig verknüpft sind, daß eine oder die andere NH_2 -Gruppe noch frei vorhanden ist.

Um einen Überblick zu erhalten, wurden verschiedene Proteïne bei vollständigem Luftabschluß und unter Bedingungen, bei welchen Hydrolyse ausgeschlossen wäre, mit salpetriger Säure behandelt und der Stickstoff gasometrisch bestimmt.

Es hat sich hiebei gezeigt, daß die so ermittelten Stickstoffmengen viel größer sind, als sich aus der Analyse der Desamidoverbindungen berechnet. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß sekundär doch Hydrolyse stattgefunden hat und Aminosäuren mit salpetriger Säure reagiert haben.

Die Analyse des Desamidokaseïns, welches in dieser Mitteilung beschrieben wird, hat andere Resultate ergeben, als Schiff beim desamidierten Ovalbumin erhalten hat. Die Abnahme im Stickstoffgehalt ist beim Kaseïn eine minimale und innerhalb der Fehlergrenze fallend. Es ist nicht wahrscheinlich, daß neben der Desamidierung eine Nitrosierung stattfindet, denn das Desamidokaseïn gibt die Liebermann'sche Reaktion nicht.

Dafür ist eine merkliche Abnahme im Kohlenstoffgehalt eingetreten. Der Schwefelgehalt hat sich so gut wie nicht geändert, Phosphor ist allerdings zum Teil ausgetreten, aber es ist etwa ein Viertel des ursprünglichen Gehaltes noch vorhanden. Zieht man nun weiter in Betracht, daß regelmäßig drei Viertel des in Reaktion getretenen Kaseïns in Form des Desamidokaseïns erhalten wurden, ist die Annahme berechtigt, daß letzteres nicht durch tiefergehende Spaltung entstanden ist und dem Kaseïn noch recht nahe steht. Ein Vergleich der prozentischen Zusammensetzung und der Atomverhältnisse zwischen Desamidokaseïn und Kaseïn ist im experimentellen Teile gezogen.

Von dem Kasein unterscheidet sich das Desamidokasein, abgesehen von der Zusammensetzung, dadurch, daß es auch bei vorsichtigster Darstellung gelb, meist aber gelblichbraun gefärbt und in Mineralsäuren viel schwerer löslich ist. Auch Alkalien lösen schwierig. Bei sehr vorsichtigem Schütteln mit sehr verdünnter Lauge löst es sich zunächst, ein kleiner Überschuß von Lauge fällt das Alkalisalz als gelatinöse Masse aber aus.

Das Desamidokasein gibt keine Biuretreaktion. Dabei kommt freilich in Betracht, daß die Lösung in Alkalien selbst gelblichbraun gefärbt ist. Auch die Millon'sche Reaktion bleibt aus. Damit steht wohl im Zusammenhang, daß unter den Produkten der Hydrolyse Tyrosin nicht auftritt.

Nach energischer Hydrolyse waren ätherlösliche Säuren nicht nachzuweisen. Bei lang anhaltender Extraktion mit Äther gingen in diesen nur sehr geringe Mengen über, die reichlich Stickstoff enthielten und beim Stehen allmählich Kristalle ansetzten, die nach ihren Reaktionen Oxalsäure waren. Ganz dasselbe wurde aber auch beobachtet, als nicht desamidiertes Kasein in derselben Weise geprüft wurde.

Die Hydrolyseflüssigkeit wurde nach der Vorschrift von E. Fischer auf Ester verarbeitet, die durch Äther von den Estern befreite alkalische Flüssigkeit durch Alkohol von anorganischen Salzen befreit und dann mit Phosphorwolframsäure gefällt.

Die Untersuchung der Ester zeigte keine besonders auffallenden Erscheinungen. Nachgewiesen wurde Pyrolidincarbonsäure, Leucin, Aminovaleriansäure. Sehr wahrscheinlich ist das Auftreten von Isoleucin. Glycocoll war nicht mit Sicherheit nachzuweisen. Alanin war nicht aufzufinden. Vermutlich ist ein Unfall daran schuld.

Von Histonbasen wurde Histidin in ungefähr derselben Menge erhalten wie aus dem Kasein selbst, Arginin in viel geringerer; Lysin tritt überhaupt nicht auf. Dieses negative Ergebnis wurde bei wiederholten und verschiedentlich abgeänderten Versuchen immer wieder erhalten.

Glutaminsäure entsteht dafür wieder in derselben Menge wie aus Kasein und dasselbe gilt vom durch Säuren abspalt-

baren Ammoniak. Auch Kasein- und Kaseinsäure wurden ungefähr in derselben Menge erhalten, als sie aus dem Kasein entstehen.

Es wollte nicht gelingen, den Stoff zu isolieren, der durch die Umwandlung des Lysins entsteht, die nach dem Mitgeteilten bei der Einwirkung der salpetrigen Säure anzunehmen ist.

Die angeführten Ergebnisse lassen sowohl in negativer wie in positiver Richtung einige Schlüsse zu.

Das völlige Ausbleiben von Oxysäuren bei der Hydrolyse des desamidierten Kaseins sowohl wie das qualitativ und quantitativ nahezu unveränderte Auftreten der meisten Aminosäuren zeigt, daß diese im Kaseinmolekül in einer Form, bei welcher die Aminogruppe frei vorhanden ist, im allgemeinen nicht gebunden sind, hievon auszunehmen sind aber bestimmt das Lysin, vielleicht ein Teil des Arginins und das Tyrosin.

Dieser negative Befund, das Lysin betreffend, gewinnt an Interesse dadurch, daß er bei der Hydrolyse von Glutin, welches mit salpetriger Säure »desamidiert« worden ist, auch gemacht wurde. Darüber wird gleichzeitig eine besondere Mitteilung gemacht.

Es werden im hiesigen Institute auch andere Proteine in dieser Richtung untersucht.

Experimenteller Teil.

Das Kasein ist in Wasser und verdünnten Mineralsäuren sehr schwer löslich, infolgedessen war es von vornherein wahrscheinlich, daß salpetrige Säure auf in Wasser oder verdünnten Säuren suspendiertes Kasein schwer einwirken wird. Es läßt sich mit Hilfe von Essigsäure aber unschwer und unter Bedingungen in Lösung bringen, bei welchen eine Hydrolyse nur ganz untergeordnet eintreten wird. Dies wurde zuerst dadurch erreicht, daß 100 g Kasein mit 140 cm^3 Eisessig unter starkem Schütteln übergossen, dann eine halbe Stunde am Wasserbad erwärmt, dann 2 l kochendes Wasser zugefügt und unter häufigem Umschütteln erwärmt wurde. Es ging dann fast alles in Lösung. Später stellte es sich als vorteilhafter heraus, das Kasein in die 2 l kalten Wassers unter möglichst heftigem

Schütteln allmählich einzutragen, dann den Eisessig zuzufügen, worauf dann bei schwachem Erwärmen in viel kürzerer Zeit Lösung eintrat.

Nach völligem Erkalten wurden im Verlauf einer Stunde 80 g Natriumnitrit in 1 l Wasser gelöst, langsam zufließen gelassen, wobei der Kolben verschlossen gehalten und ein langsamer Kohlendioxydstrom durch die Flüssigkeit geleitet wurde. Schon nach Zutropfen von wenig Nitrit fiel ein weißer Körper aus, der sich aber wie die Flüssigkeit nach einigem Stehen gelb färbte. Dabei trat erhebliche Gasentwicklung ein.

Es wurde 4 Stunden stehen gelassen und dann am Wasserbad so lange erwärmt, bis die Gasentwicklung völlig zu Ende war. Starkes Schäumen machte sehr große (10 l fassende) Kolben nötig.

Beim Erwärmen färbte sich Niederschlag und Flüssigkeit bedeutend dunkler, der erstere wurde körnig. Es wurde sodann noch heiß auf Leinwand abgesaugt, zuerst mit heißem, dann mit kaltem Wasser gewaschen, bis das Filtrat nicht mehr gegen Lackmuspapier reagierte. Das noch mit Alkohol gewaschene Reaktionsprodukt (aus 100 g Kasein in der Regel 70 g) wurde an der Luft getrocknet.

Aus dem gelblichen Filtrat gelang es, weder durch Aus-salzen mit Ammonsulfat noch durch Fällern mit Phosphor-wolframsäure Stoffe zu isolieren. Ausäthern sowie Versuche, auf dem Wege einer Benzoylverbindung definierbare Körper zu isolieren, gaben ebensowenig Resultate.

Das Reaktionsprodukt enthält noch etwas Fett aus dem Ausgangsmaterial.¹

1·654 g Substanz gaben, mit ausgeglühtem Quarzsand zerrieben und 2 Stunden lang im Soxhletapparat mit Äther extrahiert, 0·0060 g Fett.

In 100 Teilen:

Fett.....0·362.

¹ Käufliches Kasein (Hammarsten) gab beim Extrahieren mit Äther erhebliche Mengen Fett ab.

300 g Kasein gaben 2·25 g Fett.

In 100 Teilen:

Fett.....0·75.

In der Folge wurde das käufliche Kasein vor der Nitrierung dreimal mit der fünffachen Menge Äther auf der Maschine je eine Stunde geschüttelt, worauf neuer Äther beinahe keinen Rückstand hinterließ.

3·2548 *g* derart behandeltes Kasein gaben beim Extrahieren 0·0022 *g* Rückstand.

In 100 Teilen:

Rückstand.....0·067.

Der aus entfettetem Kasein mit salpetriger Säure erhaltene Körper gab folgenden Wert: 2·5826 *g* gaben 0·0019 *g* ätherlösliche Substanz.

In 100 Teilen:

Rückstand.....0·073.

Zu den Analysen wurde bei 100° im Vakuum getrocknet. Die Verbrennung wurde nach Lippmann-Fleißner vorgenommen, die Substanz im Schiffchen mit Blei-Kaliumchromat gemischt.

0·3427 *g* gaben 0·6401 *g* CO₂ und 0·2100 *g* H₂O.

0·4402 *g* gaben 60·8 *cm*³ feuchten N bei *t*=20° und 730 *mm*.

1·6447 *g* gaben nach Osborne¹ 0·0830 *g* BaSO₄ und 0·0261 *g* Mg₂P₂O₇.

1·3758 *g* gaben 0·0230 *g* Mg₂P₂O₇.

In 100 Teilen:

	Gefunden				Für Kasein in Cohnheim's Lehrbuch der Eiweißchemie angegebene Zahlen
C	50·94	—	—	—	52·96 bis 54·0
H	6·85	—	—	—	7·04 » 7·13
N	—	15·09	—	—	15·6 » 15·91
S.....	—	—	0·69	—	0·75 » 0·82
P.....	—	—	0·44	0·47	0·847

Eine Untersuchung auf lose gebundenem Schwefel nach Osborne¹ ergab quantitativ kein positives Resultat.

5 *g* des analysierten Desamidokaseins wurden mit je 100 *cm*³ 96 prozentigem Alkohol durch je eine Stunde dreimal

¹ Thomas Osborne, Zeitschrift für analytische Chemie, 1902, p. 25 und 26.

ausgekocht. Die gelb gefärbten alkoholischen Lösungen gaben, eingedampft, folgende Rückstände: 0·0685 g, 0·0440 g, 0·0110 g.

Der ausgekochte Körper wurde zu den Analysen bei 135° im Vakuum getrocknet. Verbrannt wurde im offenen Rohr im Erlenmeyerofen; Substanz im Schiffchen mit Blei-Kaliumchromat gemischt.

0·2532 g gaben 0·4801 g CO₂ und 0·1593 g H₂O.

0·2327 g gaben 0·4436 g CO₂ und 0·1438 g H₂O.

0·2731 g gaben 36·7 cm³ N über 50% KOH bei t = 17° und 721·5 mm.

2·0117 g gaben 0·1202 g BaSO₄ und 0·0142 g Mg₂P₂O₇.

1·9312 g gaben 0·1050 g BaSO₄.

2·4682 g gaben 0·0236 g Mg₂P₂O₇.

In 100 Teilen:

C	51·71	51·99	—	—	—
H	7·04	6·91	—	—	—
N	—	—	15·19	—	—
S	—	—	—	0·824	0·746
P	—	—	—	0·196	0·266

Durch das Auskochen mit Alkohol ist der Kohlenstoffgehalt etwas gestiegen, der Phosphorgehalt erheblich gefallen, während die übrigen Bestandteile kaum geändert worden sind.

Die Analysen, die mit dem mit Alkohol ausgekochten Material ausgeführt sind, verdienen natürlich mehr Zutrauen.

Rechnet man nun aus der prozentischen Zusammensetzung des Desamidokaseins das Atomverhältnis, bezogen auf Schwefel = 1 und rechnet man dasselbe für das Kasein, indem man dabei das Mittel der Zahlen, wie sie in Cohnheim's »Eiweißkörper« aufgenommen sind, zu Grunde legt, so erhält man

Kasein C 222, H 353, N 56, P 1·5, O 68, S 1,
Desamidokasein C 216, H 349, N 54, P 0·4, O 78, S 1.

Aus dem Vergleich der zwei Zahlenreihen geht hervor, daß eigentlich nur im Phosphorgehalt eine wesentliche Änderung eingetreten ist. Der Kohlenstoff- und der Wasserstoff-

gehalt ist fast unverändert, der Sauerstoffgehalt aber etwas gestiegen. Der Stickstoffgehalt ist so wenig gefallen, daß der Abfall innerhalb der Versuchsfehler liegt. Es wäre deshalb der Name Desamidokasein nicht begründet, wenn nicht der Umstand, daß ein normales Spaltungsprodukt des Kaseins, das Lysin, im Desamidokasein nicht vorhanden ist, am einfachsten durch eine Desamidierung zu erklären wäre.

Aus der Zusammensetzung des Desamidokaseins geht weiter hervor, daß es dem Kasein noch ziemlich nahe stehen dürfte.

Bei seiner Darstellung wird es in Mengen von 70% des angewendeten Kaseins erhalten. Ob die fehlenden 30% darauf zurückzuführen sind, daß ein leichter lösliches Nebenprodukt entsteht, welches noch albuminoiden Charakter hat, oder ob sekundär tiefergehende Hydrolyse eingetreten, ist mit Sicherheit nicht zu entscheiden. Der Verlauf einiger gasometrischer Versuche spricht für die letztere Annahme.

Gewogene Mengen von Kasein wurden in essigsäurehaltigem Wasser in einem Kolben gelöst, der mit einem Kohlensäureapparat in Verbindung stand und in den durch einen Tropftrichter Nitritlösung zugefügt werden konnte. Ein Entbindungsrohr tauchte unter ein mit konzentrierter Kalilauge gefülltes Meßrohr.

Die Luft wurde zunächst mit Kohlensäure verdrängt, hierauf die Nitritlösung zugegeben, nach einiger Zeit im Wasserbade erwärmt und schließlich der Kolbeninhalt durch Kohlensäure wieder vollständig verdrängt.

Die in der Gasburette aufgefangene Luftart wurde mit einer gesättigten Eisenvitriollösung geschüttelt, bis keine Raumbahnabnahme eintrat.

0·6780 g trockenes Kasein, in 50 cm^3 Wasser und 1 cm^3 Eisessig gelöst, mit 0·3 g Natriumnitrit in 10 cm^3 Wasser versetzt, gaben 96 cm^3 Gas, nach dem Schütteln mit Eisenvitriol betrug es 29·6 cm^3 bei 26° und 733 mm = 0·0287 g N.

Die Hälfte desselben stammt von der salpetrigen Säure her; aus dem Kasein sind also 0·0144 g, das sind 2%, des Kaseins und 13% dessen Gesamtstickstoffs ausgetreten.

Bei einem zweiten Versuch wurden in derselben Weise 0·3776 g Kasein mit 0·6 g, also viel mehr Natriumnitrit behandelt. Gas über Kalilauge war

108 cm^3 , nach Absorption mit Vitriol 10·8 cm^3 bei 26° und 731 mm Druck. Daraus berechnet sich 1·5% Stickstoff, auf das Kasein berechnet: 9·9% des Gesamtstickstoffs.

Da das Desamidokasein fast denselben Stickstoffgehalt hat wie das Kasein, kann der hohe Betrag von abspaltbarem Stickstoff nur auf sekundäre Reaktionen zurückgeführt werden.

Auch bei anderen Proteiden fanden wir einen so hohen Betrag von gasometrisch aufgefangenem Stickstoff.

Desamidokasein ist hell gelbbraunlich, mitunter aber auch dunkler. Frisch dargestellt und noch feucht ist es meist heller gelb gefärbt, beim Trocknen verschwindet der gelbe Farbenton und tritt die bräunliche Färbung hervor.

Es gibt weder Biurettreaktion noch die Millon'sche Reaktion und unterscheidet es sich vom unveränderten Kasein auch durch die erheblich verringerte Löslichkeit in Alkalien und Säuren. Die Liebermann'sche Reaktion mit konzentrierter Salzsäure tritt ein, jedoch mit entschiedener Braunfärbung der Flüssigkeit. Erst nach längerem Kochen mit konzentrierter Salzsäure ist kein Unterschied mit Kasein mehr wahrzunehmen.

Das Desamidokasein löst sich in verdünnter Natronlauge schwierig mit gelbbrauner Farbe auf, bei weiterem Zusatz von Lauge erstarrt die Flüssigkeit zu einer bräunlichen Gallerte, welche wohl als das Natronsalz anzusehen ist.

Hydrolyse des Desamidokaseins.

170 g wurden mit 1275 cm^3 36 prozentiger Salzsäure am kochenden Wasserbade 12 Stunden lang hydrolysiert, von der überschüssigen Säure durch Destillation unter vermindertem Druck größtenteils befreit und mit Wasser auf 500 cm^3 verdünnt. Es wurde sodann fünfmal, im ganzen mit 1200 cm^3 Äther ausgeschüttelt. Der Äther hinterließ 1·52 g Rückstand, der im wesentlichen aus Oxalsäure bestand, was durch die Bildung des unlöslichen Kalksalzes ermittelt wurde. Kleine Mengen von Oxalsäure traten auch auf, als Kasein als solches mit Salzsäure hydrolysiert und, wie oben beschrieben, behandelt wurde.

Das durch Ausäthern von der Oxalsäure befreite Hydrolysierungsgemisch wurde mit Wasserdampf destilliert und dabei

sechs Destillate von je zirka 500 cm^3 aufgefangen. Sie reagierten sauer und enthielten Salzsäure.

Die sauren Lösungen wurden mit gefällttem reinen Kalziumcarbonat neutralisiert und eingedampft. Dabei wurden sehr geringe Mengen kristallisierender Substanzen erhalten, die sich als anorganisch erwiesen.

1 *kg* Kasein wurde auf Desamidokasein verarbeitet und dieses (700 *g*) in fünf Teilen mit je 1.5 *l* rauchender Salzsäure durch 12 Stunden auf kochenden Wasserbädern hydrolysiert. Im Vakuum wurde der größte Teil der Salzsäure abdestilliert, dann der übrigbleibende Sirup mit 3 *l* 96prozentigem Alkohol aufgenommen und mit Salzsäuregas verestert. Nach Wiederholen dieser Operation mit absolutem Alkohol wurden die in Äther löslichen Ester nach dem von Fischer¹ angegebenen Verfahren abgetrennt und unter vermindertem Druck fraktioniert destilliert. Destilliert wurde zunächst aus dem Wasser-, dann aus dem Ölbad; die Vorlage wurde mit Äther und fester Kohlensäure gekühlt. Die vereinigten Ätherrückstände wogen 284 *g*. Es ergaben sich folgende Fraktionen:

	Druck	Temperatur	Gewicht
I.....	32 <i>mm</i>	bis 35°	27 <i>g</i>
II.....	21	35 bis 55°	14
III.....	12	55 > 80	17
IV.....	12	80 > 90	75
V.....	16	90 > 110	15
VI.....	20	110 > 120	7
VII.....	20	120 > 130	4
Summe der destillierten Ester.....			159 <i>g</i>
Rückstand.....			80 <i>g</i>

E. Fischer² erhielt aus 1 *kg* Kasein folgende Fraktionen bei 10 *mm* Druck:

¹ E. Fischer, Zeitschrift für physiol. Chemie, 33, 151.

² E. Fischer, ebenda, 33, 155.

		Aus Desamidokasein berechnet sich für 1000 Teile	
40 bis	55°	14 g	bis 35° 38 g
55 >	65	14	35 > 55 20
65 >	80	25	55 > 80 25
80 >	85	165	80 > 90 107
85 >	110	18	90 > 100 21
110 >	120	40	110 > 120 10
120 >	130	28	120 > 130 6
130 >	160	8	
Summe . . .		312 g	227 g

Wenn man in Rücksicht zieht, daß die von E. Fischer angegebenen Ausbeuten nur bei ganz besonders sorgfältigem Arbeiten zu erzielen sind und in der Regel nicht erreicht werden, so kommt die Minderausbeute beim Desamidokasein nicht besonders in Betracht. Die relativen Mengen stehen im wesentlichen in Übereinstimmung.

Die so erhaltenen Esterfraktionen wurden kochend verseift, und zwar I bis III durch sechsständiges Kochen mit Wasser, IV und V mit überschüssigem Baryumhydroxyd.

Esterfraktion I.

Sie enthielt überwiegend Alkohol und Äther. Die nach dem Verseifen mit 135 cm^3 Wasser eingedampfte Lösung hinterließ einen kristallisierenden Rückstand von 1.7 g.

Dieser wurde in der dreifachen Menge absoluten Alkohols gelöst und mit Salzsäuregas in der Kälte gesättigt.¹ Beim Stehenlassen in Eis zeigte sich aber nur äußerst geringe Kristallisation, die nicht einmal zur Bestimmung des Schmelzpunktes ausreichte, wodurch das Fehlen erheblicherer Mengen von salzsaurem Glycocollester erwiesen erscheint. Vermutlich war Alanin der Hauptbestandteil. Durch einen Unfall war die weitere Untersuchung unmöglich geworden.

Esterfraktion II.

Sie wurde mit 70 cm^3 Wasser verseift. Die eingedampfte Lösung hinterließ 3 g Kristalle, die, umkristallisiert, eine Kristallisation von 282° Schmelzpunkt gaben, die sich, ins Kupfersalz verwandelt, durch ihre Schwerlöslichkeit als Leucin erwies.

¹ Nach E. Fischer, Zeitschrift für physiol. Chemie, 35, 230.

Aus den Mutterlaugen des Leucins gelang es, nach Verwandeln in Kupfersalze durch fraktionelles Eindampfen ein in Alkohol nicht lösliches Kupfersalz zu erhalten, dessen Analyse sich dem für Pyrrolidincarbonsäure berechneten Werte nähert.

0·1265 g gaben 0·0371 g CuO.

In 100 Teilen:		Gerechnet für
	Gefunden	$C_{10}H_{16}N_2O_4Cu$
Cu	23·43	22·5

Dem Alaninkupfer ähnliche Fraktionen wurden nicht aufgefunden.

Esterfraktion III.

Nach Verseifen mit 125 cm^3 Wasser wurden durch fraktioniertes Eindampfen fünf Kristallisationen erhalten, deren Schmelzpunkte und Mengenverhältnisse folgende waren:

I	II	III	IV	V
270°	275°	257°	256°	248°
0·5 g	2·7 g	4·6 g		0·8 g

Die Fraktionen II, III mit IV und endlich V wurden durch Kochen mit gefällttem CuO in Kupfersalze verwandelt.

Aus II ergab sich durch fraktionelles Eindampfen der Lösung Leucinkupfer als schwerstlöslicher Bestandteil.

0·3166 g gaben 0·5750 g CuO.

In 100 Teilen:		Gerechnet für
	Gefunden	$C_{12}H_{24}O_2N_4Cu$
Cu	18·93	19·65

In den vereinigten Fraktionen III und IV fand sich als schwerstlöslicher Körper Leucinkupfer, das durch fraktionelles Eindampfen entfernt wurde. Als die Mutterlauge davon zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit Alkohol ausgekocht, die alkoholische Lösung eingedampft wurde, ergab sich ein dunkelblaues Kupfersalz von den Eigenschaften und der Zusammensetzung des Isoleucinkupfers.

0·3098 g gaben 0·0760 g CuO.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Gerechnet für $C_{12}H_{24}N_2O_4Cu$
Cu	19·60	19·65

Aus den Mutterlaugen des Leucins wurden nach Entfernen der alkohollöslichen Anteile in Wasser leichter lösliche Kupfersalze erhalten, von denen zwei nahestehende Fraktionen in ihrer Zusammensetzung sich dem aminovaleriansauren Kupfer nähern.

I. 0·1064 g gaben 0·0279 g CuO.

II. 0·1870 g gaben 0·0512 g CuO.

In 100 Teilen:

	Gefunden		Gerechnet für $C_{10}H_{20}N_2O_4Cu$
	I	II	
Cu	20·95	21·87	21·51

Das 21·8% enthaltende Kupfersalz gab nach Zersetzen mit Schwefelwasserstoff und Eindampfen eine Kristallisation, deren Analysenzahlen sich denen der Aminovaleriansäure nähern. Weitere Reinigung war hier bei den geringen Substanzmengen unmöglich.

0·1497 g. getrocknet, gaben 0·2770 g CO₂ und 0·1240 g H₂O.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Gerechnet für $C_5H_{11}NO_2$
C	50·70	51·28
H	9·31	9·40

Aus Fraktion V wurde ein dem pyrrolidincarbon-sauren Kupfer ähnelndes, in Alkohol lösliches Kupfersalz erhalten.

0·2602 g gaben 0·0751 g CuO.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Gerechnet für $C_{10}H_{16}N_2O_4Cu$
Cu	23·06	22·5

Esterfraktion IV.

Sie wurde mit 110 g Ba(OH)₂, gelöst in 1000 cm³ H₂O, verseift, das Baryum mit Schwefelsäure genau entfernt und sodann fraktionell eingedampft.

Die recht erheblichen Kristallisationen erwiesen sich durch Aussehen, Schmelzpunkt und Löslichkeit als Leucin. Die Mengen betragen 22 g vom Fp. 276°, der nach Umkristallisieren aus Wasser auf 280° stieg, 11 g vom Fp. 269° und verschiedene Fraktionen in der Gesamtmenge von 5 g aus den Mutterlaugen von etwas niedrigeren Schmelzpunkten 269 bis 252°.

Die Hauptfraktion des Leucins wurde ins Chlorhydrat verwandelt und dieses dreimal aus verdünnter Salzsäure umkristallisiert. Es hatte exsikkatortrocken den Schmelzpunkt 218°.

0·2774 g gaben 0·2373 g AgCl.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Gerechnet für C ₆ H ₁₄ NO ₂ Cl
Cl.....	21·15	21·15

In Salzsäure von 23·66% wurden bei einer Konzentration von 6·488 g in 100 cm³ Lösung und einer Dichte von 1·103 im Dezimeterrohr bei Natriumlicht eine Drehung von +1·067° gefunden:

$$[\alpha]_D = +14·57°.$$

Schulze und Boßhard¹ geben $[\alpha]_D = +17·3°$ an. Das geringere Drehungsvermögen dürfte durch die Anwesenheit von Racemkörper in der untersuchten Substanz herrühren.

Auch die Esterfraktion V enthielt größere Mengen von Leucin.

Bei Fraktion VI und VII wurde von einer weiteren Untersuchung wegen zu geringer Substanzmengen abgesehen.

Die Untersuchung der in Äther löslichen Ester des Desamidokaseins ergab im wesentlichen also dieselben Resultate, die E. Fischer beim Kasein selbst gefunden hat.

¹ Schulze und Boßhard, Zeitschrift für physiol. Chemie, 10, 140.

Das Gemisch von Kaliumcarbonat, Natronlauge und ätherunlöslichen Estern, das nach dem Entfernen der ätherlöslichen Ester zurückblieb, wurde mit konzentrierter Salzsäure angesäuert und stark eingedampft, das auskristallisierte Chlorkalium und Chlornatrium auf Leinwand scharf abgesaugt, mehrmals mit Alkohol angerieben, wieder abgesaugt und dieses Verfahren so lange fortgesetzt, bis fast keine organische Substanz in den Salzmassen nachweisbar war. Die vereinigten Filtrate gaben nach weiterem Konzentrieren erneute Kristallisationen anorganischer Natur, die ebenso entfernt wurden.

Schließlich wurde im Vakuum stark eingedampft, mit Wasser aufgenommen und nach längerem Erwärmen mit der durch einen Vorversuch ermittelten Menge von Phosphorwolframsäurelösung in der Hitze vollständig ausgefällt. Es waren 4400 cm^3 50 prozentiger Phosphorwolframsäure notwendig. Der Niederschlag wog feucht 2280 g.

Nach dem Erkalten wurde vom ölig ausgeschiedenen Phosphorwolframat abgossen, die Lösung stark eingedampft und nochmals mit 1500 cm^3 50 prozentiger Phosphorwolframsäure gefällt. Die Fällung betrug feucht 755 g.

Aus dem Filtrat der letzten Fällung wurde die Phosphorwolframsäure mit Baryumhydroxyd, dieses mit Kohlendioxyd entfernt.

Das abfiltrierte Baryumphosphorwolframat und Baryumcarbonat wurde zweimal mit je $1\frac{1}{2}\text{ l}$ 10prozentigem Ammoniak ausgekocht, wobei nach Eindampfen nicht kristallisierende Sirupe erhalten wurden, welche mit Millon'schem Reagens keine Färbung gaben; Tyrosin ist also nicht vorhanden.

Das Filtrat von den Barytniederschlägen ergab, eingedampft, eine Kristallisation, welche die Tyrosinreaktion mit Millon'schem Reagens wieder nicht gab. Die Kristallisation wurde mit Wasser angerieben, abgesaugt, in heißem Wasser gelöst und mit Tierkohle entfärbt. Sie hatte die Eigenschaften von Leucin. Der Schmelzpunkt lag bei 279° .

Das Filtrat dieser letzten Kristallisation wurde nun ganz in derselben Weise weiter behandelt, wie es der eine von uns für die Gewinnung von Kasein und Kaseinsäure angegeben hat.

Die chlorhaltigen Kupfersalze ließen sich unschwer in einen durch Alkohol relativ leicht fällbaren Anteil von blaugrüner Farbe und in einen in verdünntem Weingeist ziemlich leicht, nicht aber in absolutem Alkohol löslichen von laubgruner Farbe zerlegen, die durch fraktioniertes Umfällen weiter gereinigt wurden, wobei nicht unerhebliche Mengen von in Wasser sehr schwer löslichen Kupfersalzen abgetrennt wurden.

Aus dem blaugrünen Kupfersalz wurden nach Ausfällen des Kupfers mit Schwefelwasserstoff und der Salzsäure mit Silberoxyd und Konzentrieren zum dünnen Sirup 3 g einer Kristallisation erhalten, die in den Eigenschaften mit der Kaseinsäure übereinstimmt und aus dem laubgrunen Kupfersalz nach derselben Behandlung 3·5 g einer Kristallisation von den Eigenschaften der rohen Kaseinsäure.

Die Mutterlaugen lieferten bei freiwilliger Verdunstung weitere Mengen.

Untersuchung auf die Histonbasen.

Diese wurde nach dem von Kossel und Kutscher angegebenen Verfahren¹ einmal bei Salzsäure- und einmal bei Schwefelsaurehydrolyse durchgeführt. In beiden Fällen wurde äußerst wenig Arginin und gar kein Lysin erhalten. Im Gange der Untersuchung zeigten sich sonst keine weiteren Unterschiede mit dem gewöhnlichen Kasein, das zum Vergleich derselben Untersuchung unterzogen wurde.

20 g Desamidokasein wurden mit Salzsäure wie gewöhnlich hydrolysiert, die Lösung mit Wasser verdünnt und mit 50 prozentiger Phosphorwolframsäure in der Kälte vollständig ausgefällt. Der erhaltene Niederschlag bildete eine zähe, amorphe Masse von dunkelbrauner Farbe, die mit fünfprozentiger Schwefelsäure ofers angerieben und bis zum Verschwinden der Chlorreaktion gewaschen wurde. Das Phosphorwolframat wurde in üblicher Weise mit Barythydrat zersetzt, der überschüssige Baryt mittels Kohlendioxyds entfernt. Das erhaltene Filtrat wurde nun auf Histonbasen verarbeitet.

¹ A. Kossel und F. Kutscher, Zeitschrift für physiol. Chemie, 31, 165 (1900) und 38, 39 (1903).

Die Arginin enthaltende Lösung wurde mit Salpetersäure neutralisiert, eingedampft, der Rückstand im Vakuum über Kalk und Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, als Arginnitrat gewogen und in Rechnung gezogen.

Das Histidin war schließlich im Wege der Fällung durch Merkurisulfat gereinigt worden.

Die Basen, welche aus dem »Lysinphosphorwolframat« abgeschieden wurden gaben mit alkoholischer Pikrinsäure keine Kristallisation.

Es resultierten Arginnitrat 0·09249 g, rohes Histidinchlorid 0·3200 g als Abdampfrückstand und Lysinpikrat 0 g.

In 100 Teilen:

	Gefunden	In Cohnheim, Chemie der Eiweißkörper, p. 43, für Kasein angegebene Werte
Arginin	0·33	4·8
Histidin	1·09	2·6
Lysin	—	5·8

Ganz dasselbe negative Resultat trat ein, als die Hydrolyse mit Schwefelsäure vorgenommen wurde.

50 g Desamidokasein, aus fettfreiem Kasein dargestellt und mit Alkohol ausgekocht, wurden mit 150 g H₂SO₄ und 300 g H₂O durch 14 Stunden am Rückflußkühler gekocht, aus der mit Wasser verdünnten Lösung die Hauptmenge der Schwefelsäure mit reinem Ätzbaryt gefällt und das Filtrat auf die Histonbasen verarbeitet. Die Arginin enthaltende Lösung wurde mit $\frac{1}{5}$ normaler Salpetersäure genau neutralisiert. Aus der verwendeten Menge HNO₃ wurde das vorhandene Arginin berechnet.

Es ergaben sich 0·301 g Arginin, 0·9299 g rohes Histidinchlorid als Abdampfrückstand und 0 g Lysinpikrat.

In 100 Teilen:

Arginin.....	0·602
Histidin	1·27
Lysin	—

Das auf Lysin zu untersuchende Phosphorwolframat betrug feucht 102 g. Der aus dem zersetzten Phosphorwolframat erhaltene Sirup wog 8·5 g. Dieser wurde durch Verdünnen mit

Wasser auf 50 cm^3 gebracht. Die Hälfte, d. i. 25 cm^3 , wurden mit 5 g Pikrinsäure in zirka fünfprozentiger alkoholischer Lösung versetzt, wobei eine Fällung nicht eintrat. Die Lösung wurde nun am Wasserbad verdampft und der zurückbleibende Sirup mit zirka 300 cm^3 Äther gefällt. Von dem ausgeschiedenen Öl wurde der Äther abgegossen und das Öl mit Alkohol behandelt, wobei es fast völlig in Lösung ging, wodurch die Abwesenheit von Lysinpikrat sichergestellt erscheint.

Der abgegossene Äther wurde abdestilliert. Als Rückstand hinterblieb nun Pikrinsäure, die sich durch Löslichkeit und Aussehen unter dem Mikroskope als solche erwies.

Bei einem dritten Versuche mit 38 g Desamidokasein erfolgte der Zusatz von alkoholischer Pikrinsäure zu der »Lysinfraktion« sukzessive.

Die alkoholische Lösung wurde jedesmal abdestilliert und der Sirup dann mit Benzol behandelt. Solange dieses amorph verdunstete, also keine freie Pikrinsäure enthielt, wurde dem in Benzol unlöslichen Sirup neue Mengen von alkoholischer Pikrinsäure zugefügt. Auch unter diesen Umständen war nicht die geringste Menge von Lysinpikrat aufzufinden. Bei einer partiellen Ausfällung mit Äther wurde dasselbe beobachtet. In die ätherleichterlöslichen Anteile ging in geringer Menge ein gut kristallisiertes Pikrat über, das anders kristallisiert wie das des Lysins, in Wasser und Alkohol auch viel leichter löslich ist und welches Ähnlichkeit hat mit einem Pikrat, das in analoger Weise aus desamidiertem Glutin entsteht.

Es wurde versucht, den Stoff, der bei der Einwirkung von Salpetersäure auf den Lysinrest im Kasein entsteht, zu fassen. Unter der allerdings unsicheren Annahme, daß er statt des Lysins in der Lysinfraktion des Kossel-Kutscher'schen Verfahrens vorkommt, wurde in dieser nachgesucht.

Aus 50 g desamidiertem Kasein wurden Histidin und Arginin nach Kossel-Kutscher entfernt, aus dem Filtrat in bekannter Weise das Phosphorwolframat ausgefällt (feucht 155 g), dieses in bekannter Weise zersetzt und die vom Baryt befreite Lösung stark eingedampft. Nach einiger Zeit begann eine Kristallisation. Es wurde mit verdünntem Alkohol angerieben, abgesaugt und auf Ton abgepreßt. Die Kristallisation betrug 5 g .

Nach öfterem Umkristallisieren aus Wasser erwies sie sich als Leucin, das infolge geringer Verunreinigungen, die sich nicht entfernen ließen, bei den Analysen nur Näherungswerte ergab.

0·1348 g gaben 0·2670 g CO₂ und 0·1178 g H₂O.

0·1170 g gaben 13·5 cm³ N über 33 prozentiger KOH, $t=20^{\circ}$, $B=740$ mm.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Gerechnet für C ₆ H ₁₃ NO ₂
C	54·02	54·95
H	9·78	9·92
N	12·89	10·68

Die Mutterlauge vom Leucin wurde nun durch Kochen mit CuO in Kupfersalze verwandelt. Es entstand eine tief dunkelgrüne Lösung, die mit Alkohol eine Fällung grün gefärbten Kupfersalzes gab. Durch wiederholtes Lösen in Wasser, Abfiltrieren von braunen unlöslichen Kupfersalzen und Fällen mit Alkohol wurde schließlich ein grünes Kupfersalz erhalten, das in kaltem Wasser sich langsam, aber recht leicht löste und in rundlichen Platten kristallisierte. Nach den Analysen dürfte ein Gemisch vorliegen.

0·1992 g gaben 0·3132 g CO₂, 0·0966 g H₂O und 0·0456 g CuO.

0·1433 g gaben 14·6 cm³ N bei $t=17·5^{\circ}$, $B=732$ mm.

In 100 Teilen:

	Gefunden
C	42·88
H	5·42
Cu	18·29
N	10·13

Als ganz dasselbe Verfahren mit unverändertem Kasein wiederholt wurde, entstand nach Abscheiden des Lysins nur eine geringe, lichtblau gefärbte, an Leucinkupfer erinnernde Fällung.

Der Rest des erwähnten grünen Kupfersalzes, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, gab beim Eindunsten eine Kristallisation, die, mit konzentrierter Salzsäure verrührt, sich noch vermehrte.

In der Erwartung, in dieser Art zu definierten Verbindungen zu kommen, wurde das bei der Hydrolyse von 700 g Desamidokasein erhaltene Phosphorwolframat, ohne erst Histidin und Arginin zu entfernen, auf das erwähnte Kupfersalz verarbeitet.

Es wurde in Alkohol gelöst und in vier Portionen mit im ganzen 3420 g Ätzbaryt in sehr verdünnter Lösung zerlegt, der überschüssige Baryt mit Kohlensäure entfernt, das Filtrat eingedampft.

Die erhaltene Lösung wurde nun 3 Stunden lang mit einem Überschuß von CuCO_3 und $\text{Cu}(\text{OH})_2$ gekocht; nach Abfiltrieren resultierte ein tief dunkelgrünes Filtrat, das stark eingedampft wurde. Nun wurde mit 96prozentigem Alkohol gefällt, das ausgefällte Kupfersalz in Wasser gelöst und von nicht unbedeutenden Mengen eines dunkelbraunen amorphen Kupfersalzes abfiltriert und wiederholt mit Alkohol gefällt.

Die alkoholischen Filtrate gaben nach sehr starkem Eindampfen mit absolutem Alkohol neuerliche Fällungen, die weiter umgefällt wurden.

Die nahestehenden Fällungen wurden mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Schwefelkupfer stark eingedampft und mit konzentrierter Salzsäure angerührt.

Nach längerem Stehen war reichliche Abscheidung von Kristallen eingetreten. Diese wurden abgesaugt und zweimal aus konzentrierter Salzsäure umkristallisiert, bis der Schmelzpunkt sich nicht mehr änderte. Die Substanz erwies sich als salzsaure Glutaminsäure vom Schmelzpunkt 205 bis 210° (bei 208° starke Gasentwicklung). Zu den Analysen wurde im Vakuum über Kalk und Schwefelsäure getrocknet.

0·1541 g gaben 0·1836 g CO_2 und 0·0789 g H_2O .

0·2508 g gaben 17·5 cm^3 N über 33prozentiger Lauge, $t=16^\circ$, $B=725 \text{ mm}$.

0·1328 g gaben 0·1004 g AgCl.

In 100 Teilen:

	Gefunden			Gerechnet für $\text{C}_3\text{H}_{10}\text{NClO}_4$
C	32·49	—	—	32·69
H	5·73	—	—	5·45
N	—	7·78	—	7·63
Cl.....	—	—	19·36	19·35

0·5 g wurden genau mit Ag_2O entchlort und ins Kupfersalz verwandelt, das ziemlich schwer löslich war. Die freie Säure schmolz bei 200° .

Aus den alkoholischen Filtraten der Kupfersalze gelang es, durch neuerliches Fällen mit stärkerem Alkohol neuerliche Mengen von Kupfersalz zu erhalten, die, zersetzt, Kristallisationen von unreinem Leucin vom Schmelzpunkt 269° ergaben.

Bestimmung der Glutaminsäure.

Um die Menge der entstehenden Glutaminsäure festzustellen, wurden je 30 g desamidiertes und unverändertes Kasein mit Salzsäure hydrolysiert, klar filtriert, die Filtrate auf je 50 cm^3 gebracht und unter Eiskühlung mit Salzsäuregas gesättigt. Die bei längerem Stehen im Eis ausgeschiedenen Kristallisationen wurden mit eiskaltem Alkohol angerührt, abgesaugt und dann durch Entfärben mit Tierkohle und Umkristallisieren aus Salzsäure gereinigt. Beide hatten den Schmelzpunkt 204° .

Die aus dem Desamidokasein erhaltene Verbindung gab bei der Chlorbestimmung folgenden Wert.

0·1439 g gaben 0·1126 g AgCl.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Gerechnet für $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NClO}_4$
Cl.	19·35	19·35

Aus 30 g käuflichen Kasein (Hammarsten) wurden von salzsaurer Glutaminsäure als Rohkristallisation 4·55, aus derselben Menge desamidierten Kaseins 2·9 g erhalten. Auf Glutaminsäure berechnet, ist die Ausbeute in Prozenten beim Kasein 12%, beim desamidierten 7·7%, also nur wenig geringer.

In wässriger Lösung drehte das Chlorhydrat aus desamidiertem Kasein bei einer Konzentration von 9·727 g in 100 cm^3 Lösung und einer Dichte von 1·0334 um $2\cdot416^\circ$:

$$[\alpha]_D = +24\cdot03^\circ.$$

Scheibler¹ gibt für salzsaure Glutaminsäure in wässriger Lösung $[\alpha]_D = +20 \cdot 4^\circ$ an.

Bestimmung des abspaltbaren Ammoniaks.

50 g desamidiertes Kasein (fettfrei) wurden mit 150 g konzentrierter Schwefelsäure und 300 g Wasser durch 14 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die erhaltene Lösung wurde von Schwefelsäure größtenteils befreit und genau auf einen Liter gebracht. 50 cm^3 dieser Flüssigkeit wurden zur Bestimmung des Ammoniaks mit ausgeglühtem Magnesiumoxyd destilliert. Vorgelegt waren 10 cm^3 $\frac{1}{10}$ normaler Schwefelsäure. Durch Zurücktitrieren mit $\frac{1}{10}$ normaler Natronlauge (verbraucht wurden 73·95 cm^3) ergaben sich 0·04429 g NH_3 .

In 100 Teilen:

NH_3 1·77.

Bei einem mit unverändertem Kasein in gleicher Weise ausgeführten Versuch, bei welchem 79·78 cm^3 $\frac{1}{10}$ normale NaOH zum Zurücktitrieren nötig waren, ergaben sich 0·03437 g NH_3 .

In 100 Teilen:

NH_3 1·38.

¹ Berl. Ber., 17, 1728.