

Über die Einwirkung von Bromlauge auf Kasein

von

Zd. H. Skraup und **R. Witt.**

Aus dem chemischen Institute der Universität Graz.

(Vorgelegt in der Sitzung am 21. März 1907.)

Schon Hüfner hat gefunden, daß im Gegensatz zum Harnstoff, der mit Knop'scher Bromlauge Stickstoff entwickelt, weder Leucin noch Glycocoll und Tyrosin von demselben Reagens angegriffen werden. Im Grazer chemischen Institut hat vor kurzem Herr H. Stuchez¹ die leichter zugänglichen Aminverbindungen, die bei der Hydrolyse aus Eiweißstoffen entstehen, eingehender untersucht und dabei konstatiert, daß das von Hüfner beim Leucin beobachtete negative Verhalten für sie mit einer einzigen Ausnahme gilt und nur das Arginin, welches ein Harnstoff(Guanidin)derivat ist, Stickstoff entwickelt. Bei dieser Gelegenheit sei nachgetragen, daß die für das Arginin angegebene Tatsache früher schon von Schulze² mitgeteilt worden ist. Demgegenüber ist es von Interesse, daß Kasein und mit diesem verschiedene andere Proteine mit Knop'scher Lauge zusammengebracht, einen sehr erheblichen Teil ihres Stickstoffes als elementares Gas abscheiden.

Die Versuche, welche von Dr. A. Zwinger mit dem Hüfner'schen Azotometer³ ausgeführt wurden, zeigten, daß,

¹ Monatshefte für Chemie, 27, 601 (1906).

² Zeitschrift für physiol. Chemie.

³ Das die Proteinlösung enthaltende untere Gefäß faßte $7 \cdot 4 \text{ cm}^3$, das obere 100 cm^3 .

wenn 5% Lösungen der Proteine in Wasser oder verdünnter Natronlauge angewendet werden, diese etwa 20% des Gesamtstickstoffes als Gas abgeben und daß nahezu dieselben Mengen auftreten, wenn die Proteine zuvor hydrolysiert werden und nach dem Übersättigen mit Natronlauge in das Azotometer kommen.

Im Verlauf der Untersuchung hat sich herausgestellt, daß diese Zahlen nur für Konzentrations- und Temperaturverhältnisse im Azotometer gelten. Denn bei erhöhter Temperatur kann beispielsweise aus dem Kasein fast der ganze Stickstoff austreten.

Andrerseits hat sich aber herausgestellt, daß, wenn durch Kühlung mit Wasser die Temperatur gemäßigt wird, auch beim Arbeiten mit größeren Mengen ein Maximum der Stickstoffentwicklung auftritt, welches durch größere Mengen von Bromlauge keine Änderung mehr erleidet.

So geben 20 cm^3 einer fünfprozentigen Lösung von Kasein in der eben nötigen Menge von $\frac{1}{10}$ normalem Ätznatron mit je 10, 20, 25 und 30 cm^3 der Knop'schen Lauge 22, 44, 60 und 63 cm^3 Gas und bei größeren Mengen der Lauge war eher eine Abnahme als Zunahme des N zu beobachten.

Die weitere Untersuchung dieser Verhältnisse wurde durch die Schwierigkeit, die massenhaft vorhandenen anorganischen Verbindungen ohne große Verluste von den organischen Oxydationsprodukten zu entfernen, sehr behindert.

Es wurden bisher nur die flüchtigen und ätherlöslichen Oxydationsprodukte und die Histonbasen genauer untersucht.

Was letztere betrifft, zeigte sich, daß, was von vornherein zu erwarten war, Arginin nicht mehr vorhanden ist und weiterhin, daß Histidin und Lysin in ganz derselben Menge auftraten, wie sie für die Hydrolyse des Kaseins selbst angegeben sind.

Die ätherlöslichen und flüchtigen Oxydationsprodukte sind bis auf eine kleine Menge Leucin, welches sich herübergeschlichen hat, stickstofffrei.

Ob Benzaldehyd vorhanden ist, war mit Sicherheit nicht festzustellen, doch ist die Anwesenheit von Aldehyden wahrscheinlich. Auch die gebromten Verbindungen, welche unter den Oxydationsprodukten aufgetreten waren, sind Gemische, die bei den disponiblen Mengen nicht zu entwirren waren.

Von nicht flüchtigen Säuren wurden Oxalsäure und Bernsteinsäure aufgefunden, deren Bildung aus Aminoverbindungen durch Oxydation in mannigfacher Weise erklärt werden kann, von flüchtigen Säuren verschiedene Fettsäuren, die ja schon von Guckelberger¹ vor nahezu fünfzig Jahren bei der Oxydation mit Chromsäure nachgewiesen worden sind. Von einigem Interesse ist es, daß unter den Fettsäuren am meisten Valeriansäure vorwaltet, die nach der Löslichkeit und Zusammensetzung des Kalksalzes sicherlich die normale ist.

Bei Bildung einer Valeriansäure aus Kasein durch einen Oxydationsprozeß ist selbstverständlich zunächst an das Leucin zu denken und dieses wird, wie speziell nachgewiesen wurde, durch die Einwirkung der Bromlauge tatsächlich auch größtenteils zerstört. Von dem aus Eiweißstoffen entstehenden Leucin ist es nun aber seit längerer Zeit bekannt, daß es nicht, wie anfangs vermutet wurde, die normale Aminocaprinsäure, sondern die Aminoisobutylelessigsäure ist, und aus dieser kann sich normale Valeriansäure nicht bilden.

Man muß demnach die Entstehung der normalen Valeriansäure in anderen Atomkomplexen des Kaseins suchen und kommt unter anderen Möglichkeiten auch die in Betracht, daß im Kasein neben der 2-Methyl-4-Aminopentansäure-5, dem gewöhnlichen Leucin, auch noch normales Leucin vorhanden und letzteres die Muttersubstanz der normalen Valeriansäure ist.

Wenn man in Betracht zieht, daß in den Proteinen neben dem länger bekannten Leucin auch schon eine andere isomere Verbindung, das Isoleucin: 3-Methyl-4-Aminopentansäure-5 nachgewiesen worden ist, und überdies die großen Schwierigkeiten berücksichtigt, aus den Leucinfractionen der Fischer'schen Estermethode erheblichere Mengen des bekannteren Leucins rein darzustellen, gewinnt die geäußerte Vermutung an Wahrscheinlichkeit.

Es sind im Wiener Institut Versuche im Gange, diese Frage zu lösen.

Mit aller Bestimmtheit ließ sich nachweisen, daß durch die Einwirkung der Bromlauge ein großer Anteil der Aminosäuren,

¹ Liebig's Annalen, 64, 39 (1848).

wie sie nach der Hydrolyse des Kaseins sonst auftreten, zerstört worden ist. Die Estermethode nach Emil Fischer zeigte das ganz ausgesprochen. Es scheint diese Zerstörung besonders einige Aminosäuren betroffen zu haben. Denn während Leucin und aktives Prolin ohne Schwierigkeit nachzuweisen waren, gelang die Isolierung von Glutaminsäure von γ -Prolin, Asparaginsäure und von Phenylalanin nicht und es konnte auch auf die Abwesenheit von Glycocoll und Alanin geschlossen werden. Von einigem präparativen Interesse ist, daß das Leucin sich im ätherlöslichen Teil der Reaktionsprodukte eingeschlichen hatte und in den Esterfraktionen der Fischer'schen Methode auch Bernsteinsäureester vorhanden war.

Einwirkung von Knop'scher Bromlauge auf Proteine.

Untersucht wurden Kasein, Gelatine, käufliches Hühner-eiweiß und Globulin aus Pferdeserum. Es wurde von jedem Protein die Wasserbestimmung ausgeführt und die abgewogene lufttrockene Substanz auf Trockensubstanz umgerechnet.

Die Proteine wurden (zirka 5 g lufttrocken) entweder mit Wasser oder verdünnter Natronlauge auf 100 cm^3 Lösung gebracht und diese im Hüfner'schen Apparate geprüft.

Andere 5 g wurden mit konzentrierter Salzsäure hydrolysiert. Es zeigte sich, daß saure Flüssigkeiten im Hüfner'schen Apparate durch Bildung von Perbromiden störend wirken und außerdem abnorm hohe Werte liefern. Infolgedessen wurde die hydrolysierte Flüssigkeit mit Natronlauge neutralisiert und diese Lösung dann im Azotometer verwendet. Die Konzentration des Proteins war hier dieselbe wie früher, 5 zu 100.

In allen Fällen trat die Stickstoffentwicklung fast augenblicklich ein, nach 5 Minuten war die Entwicklung größtenteils beendet. Nach 30 Minuten war eine Zunahme kaum mehr zu bemerken und wurde nach dieser Zeit das Volumen abgelesen.

In den hydrolysierten Proteinen wurde durch Destillation mit Magnesia der als Ammoniak abgespaltene Stickstoff bestimmt. In den folgenden Tabellen ist diese Stickstoffmenge als »leicht abspaltbar« angeführt.

N durch Bromlauge
erhalten, Prozente
des Gesamtstickstoffs

Kasein mit Natronlauge gelöst:

Sofort nach erfolgter Lösung	16
Nach zweitägigem Stehen	18
Kasein, hydrolysiert	20
Stickstoff, leicht abspaltbar	9

Gelatine mit Natronlauge gelöst:

Sofort nach Lösung	13
Nach eintägigem Stehen	19
Nach fünftägigem Stehen	20
Gelatine, hydrolysiert durch 2 Stunden	16
» » » 6 » 	17
» » » 8 » 	17
» » » 15 » 	18
Stickstoff, leicht abspaltbar	1

Hühnereiweiß:

In Wasser gelöst	16
Eiweiß, hydrolysiert	18
Stickstoff, leicht abspaltbar	8

Globulin:

In Natronlauge gelöst	23
Globulin, hydrolysiert	14
Stickstoff, leicht abspaltbar	6

Die hier angegebenen Zahlen für leicht abspaltbaren Stickstoff stimmen mit den Zahlen des Cohnheim'schen Werkes bei Kasein und Eiweiß vollkommen, bei Gelatine annähernd, bei Globulin aber nicht überein (nach Cohnheim berechnet sich für Globulin 11%). Die außerordentlich auffallende Tatsache, daß Globulin nach der Hydrolyse weniger N entwickelt als vor derselben, wurde bei wiederholten Versuchen immer wieder konstatiert. Wir haben Versuchsfehler nicht gefunden und teilen den Befund ohne weitere Diskussion mit.

Die Zahlen, die bei ein und demselben Protein gefunden wurden, je nachdem es mit Salzsäure hydrolysiert oder in Natronlauge gelöst war, weichen sehr wenig ab. Auch die

verschiedenen Proteine zeigen wenig Abweichungen bei dem durch Bromlauge frei werdenden Stickstoff.

Solche treten aber hervor, wenn man von dessen Menge die Stickstoffmenge in Abzug bringt, welche schon bei der Hydrolyse als Ammoniak austritt.

Die Differenzen sind dann für

Kasein	11
Gelatine	18
Eiweiß	10
Globulin.....	17

Versuche mit Kasein.

Die Knop'sche Bromlauge (100 g NaOH, 250 g H₂O und 75 g Br) enthält überschüssiges Ätznatron. Es wurde versucht, diesen Überschuß zu vermeiden und weiterhin, ob auch verdünntere Bromlauge angewendet werden kann. Hiedurch hätte die massenhafte Bildung anorganischer Salze vermindert werden können. Es zeigte sich, daß Bromlauge, die im Liter 30 g NaOH und 50 g Br enthält, überhaupt nicht mehr einwirkt, daß aber die Stickstoffentwicklung unverändert vor sich geht, wenn bei der Knop'schen Bromlauge der Überschuß von Natronlauge vermieden wird.

Derartige vergleichende Versuche ergaben weiter, daß zur Abspaltung von Stickstoff eine viel größere Menge von Bromlauge notwendig ist, als sich theoretisch berechnen würde und deshalb noch weitere Oxydationen anzunehmen sind.

Jodometrisch wurde festgestellt, daß bei Zimmertemperatur etwa dreimal soviel Hypobromid verschwindet als zur Oxydation des elementar abgeschiedenen Stickstoffs notwendig ist. Endlich ergab sich, daß bei sonst gleichen Verhältnissen mit steigender Temperatur viel mehr Stickstoff entwickelt wird als bei niedriger.

Aus präparativen Gründen wurde auch versucht, zur Knop'schen Bromlauge anstatt Ätznatron Ätzkali zu verwenden. Auch bei sehr guter Kühlung fielen (aus 53 g KOH, 250 g H₂O und 72 g Br) sofort sehr beträchtliche Mengen (15 g) Kaliumbromat aus. Bei Anwendung von Kaliumhydroxyd ist die Lauge, vermutlich infolge der geringen Löslichkeit von

Kaliumbromat, viel unbeständiger als bei Anwendung von Ätznatron. Diese kalihaltige Lauge gab auch unter sonst gleichen Umständen weniger Stickstoff.

Endlich zeigte sich übereinstimmend, daß beim Arbeiten in etwas größerem Maßstabe die Stickstoffentwicklung, die augenblicklich beginnt, nach einiger Zeit sich abschwächt und dann wieder stärker einsetzt, um ungefähr nach derselben Zeit ganz aufzuhören.

Bei kleineren Kaseinmengen tritt das erste Stadium nach etwa 5 Minuten, das Ende der Gasentwicklung nach etwa 15 Minuten ein, bei größeren verdoppeln sich die Zeiten. Die Flüssigkeiten bräunen sich im Verlauf der Oxydation, zum Schlusse werden sie wieder viel heller und haben einen an Benzaldehyd erinnernden Geruch.

Bei den Versuchen in größerem Maßstab wurde unter anfänglicher Kühlung mit Eis langsam gemischt und dann eine halbe Stunde stehen gelassen. Die Temperatur war dann auf höchstens 40° gestiegen. Die Bromlauge wurde stets unter Kühlung mit Eis-Kochsalz bereitet.

80 g entfettetes Kasein (I) wurde in vier Portionen zu 20 g in je 200 cm^3 $\frac{n}{10}$ NaOH und 200 cm^3 H_2O gelöst.

600 g Brom in vier Portionen zu je 150 g unter Kühlung mit Kältegemisch zu je 90 g NaOH, in 500 cm^3 H_2O gelöst (II).

Unter guter Kühlung wurden je ein Anteil von II in einen Anteil I langsam eingetragen; nach einer halben Stunde war die Stickstoffentwicklung beendet.

Darauf wurde schwefelige Säure eingeleitet, bis alles Hypobromid reduziert war; dabei entwich etwas CO_2 und es schieden sich grobe Flocken im Gewicht von 9 g aus (unverändertes Kasein?).

Die filtrierten Flüssigkeiten wurden 14 mal mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösungen, abdestilliert, gaben 32 g braunen öligen Rückstand, der nicht kristallisierte und einen scharfen Geruch nach Fettsäuren hatte.

Der Rückstand der Ätherauszüge wurde mit H_2O -Dampf destilliert, bis 2 cm^3 Destillat durch einen Tropfen Kalkwasser alkalisch wurden. Dabei ging anfangs ein nach Benzaldehyd riechendes Öl über. Die ganze Flüssigkeit samt dem Öl wurde

mit Kalkmilch genau neutralisiert und das Öl nochmal mit H_2O -Dampf übergetrieben.

Der Rückstand im Kolben wurde von einer Trübung abfiltriert und konzentriert. Er enthielt reichliche Mengen von Bromkalzium, welches den beim weiteren Einengen auskristallisierenden Kalksalzen hartnäckig anhaftet. Er wurde durch Zusatz der vorher ermittelten Mengen von Silbercarbonat beseitigt.

Das auf 60 cm^3 konzentrierte Filtrat wurde durch stufenweisen Zusatz von Silbernitratlösung (dreimal je 1 g) in der Kälte ausgefällt. Ein viertes Silbersalz schied sich beim Konzentrieren im Vakuum und ein fünftes bei nochmaligem Zusatz von Silbernitrat aus. Die erhaltenen Silbersalze waren frisch gefällt weiß, kaum kristallinisch und schwärzten sich am Lichte bald. Die Waschwässer kamen selbstverständlich nicht zum Filtrat.

Silbersalz I (am schwersten löslich) 0.9 g .

0.2220 g im Vakuum getrocknete Substanz gab 0.2330 g CO_2 , $0.0580\text{ g H}_2\text{O}$ und 0.1159 g Ag .

In 100 Teilen:	Berechnet für $C_5H_9O_2Ag$	Gefunden
C	28.71	28.62
H	4.30	2.90
Ag	51.68	52.21

Silbersalz II 0.95 g .

0.0990 g im Vakuum getrocknete Substanz gab 0.0514 g Ag .

In 100 Teilen:	Gefunden
Ag.....	51.91

Silbersalz III 1.05 g .

0.0890 g im Vakuum getrocknete Substanz gab 0.0474 g Ag .

In 100 Teilen:

	Berechnet für $C_5H_9O_2Ag$	Berechnet für $C_4H_7O_2Ag$	Gefunden
Ag.....	51.68	55.40	53.23

Es liegt demnach der Hauptmenge nach das Silbersalz der Valeriansäure vor.

Silbersalz V (in Wasser merklich leichter löslich) 1·2 g.

0·3973 g im Vakuum getrocknete Substanz gab 0·2368 g Ag, 0·2910 g CO₂ und 0·0871 g H₂O.

In 100 Teilen:

	Berechnet für C ₉ H ₅ O ₂ Ag	Gefunden
C.....	19·89	19·97
H.....	2·76	2·43
Ag.....	59·98	59·60

Die Zahlen stimmen für propionsaures Silber.

Der mit Wasserdampf nicht flüchtige Anteil der ätherlöslichen Säuren hatte nach der Destillation eine schwarze harzige Masse abgeschieden und reagierte stark sauer.

Er wurde mit Äther oftmals ausgeschüttelt, wobei sich auch die harzige Masse löste.

Nach dem Abdestillieren des Äthers hinterblieben 8·6 g eines braunen Öles. Dieses enthielt eine ziemlich große Menge eines in Wasser schwer, in Alkohol leicht löslichen öligen Körpers. Durch systematisches Fällern aus alkoholischer Lösung mit Wasser wurde er entfernt. Die wässrigen Lösungen eingedampft, kristallisierten dann vollständig. Die Kristalle wurden auf Ton von der Mutterlauge befreit, dann einige Male aus Wasser umkristallisiert, bis der Fp. bei 187° blieb. Sie bildeten schöne, weiße, prismatische Nadeln; die Analysen zeigten, daß Bernsteinsäure vorlag. Die erste Rohkristallisation betrug 2·9 g, die ganz reine Substanz 1·05 g.

0·1258 g bei 105° getrocknete Substanz gab 0·1877 g CO₂ und 0·0575 g H₂O.

In 100 Teilen:

	Berechnet für C ₄ H ₆ O ₄	Gefunden
C.....	40·68	40·82
H.....	5·09	5·09

Der ölige, in Wasser schwerlösliche Körper reagierte sauer. Er wurde in verdünnt alkoholischer Lösung mit Kalk

neutralisiert. Dabei fiel etwas schwerlösliches Salz aus (1·3 g), das von noch vorhandener Bernsteinsäure herrühren dürfte; das Filtrat davon gab aber selbst bei starkem Eindampfen keine Kristallisation. Nach Beseitigung von Brom mit Silbercarbonat wurde in sehr konzentrierter Lösung zweimal mit je 0·5 g Silbernitrat das Silbersalz gefällt. Die beiden so erhaltenen Fällungen bilden weiße, käsige, amorphe Massen, die lichtempfindlich sind und mit viel kaltem Wasser gut gewaschen wurden. Die Analysen stimmen merkwürdigerweise für Leucinsilber, welches wir nicht beschrieben fanden.

Silbersalz I 0·9 g. Silbersalz II 0·35 g.

I. 0·2107 g im Vakuum getrocknete Substanz gab 0·0970 g Ag, 0·2304 g CO₂ und 0·0576 g H₂O.

0·2362 g Substanz gab 13·0 cm³ N bei 20° und 735 mm.

II. 0·2501 g Substanz gab 0·1148 g Ag.

In 100 Teilen:

	Berechnet für <u>C₆H₁₂NO₂Ag</u>	Gefunden	
		I	II
C	30·25	29·82	—
H	5·04	3·04	—
N	5·88	6·10	—
Ag	45·38	46·03	45·90

Die wässrige Lösung der mit Wasserdampf nicht flüchtigen Säuren, aus der mit Äther bereits Bernsteinsäure und der in Wasser unlösliche ölige Körper entfernt war, schied, mit Kalkmilch heiß neutralisiert, eine geringe Menge eines unlöslichen Kalksalzes ab, nach dem Erkalten fielen schöne lange, prismatische Kristalle ab, die in heißem Wasser sehr schwierig löslich sind (trocken 2·4 g) und beim Umkristallisieren immer schwerer löslich wurden. Die Ca- und C-Werte liegen zwischen den für oxalsauren und bernsteinsauren Kalk berechneten. Zur Trennung wurde 1·5 g des Gemenges mit zehnpromzentiger Essigsäure erwärmt, das Ungelöste in der gerade nötigen Menge verdünnter Salzsäure gelöst, von einer geringen Trübung filtriert und vorsichtig mit Ammoniak neutralisiert; der sodann erhaltene kristallinische Niederschlag wog 0·6 g.

0·2659 *g* lufttrockene Substanz verloren bei 190° 0·0316 *g* H₂O, die wasserfreie Substanz gab dann 0·2431 *g* CaSO₄.

In 100 Teilen:

	Berechnet für <u>C₂O₄Ca+H₂O</u>	Gefunden
Ca	22·22	21·49
H ₂ O	12·32	11·83

Der in Essigsäure gelöste bernsteinsäure Kalk wurde zur Entfernung dieser zur Trockne verdampft, der Rückstand (0·9 *g*) aus viel Wasser einmal umkristallisiert und gab dann Zahlen, welche für bernsteinsäuren Kalk mit 3 Mol Wasser stimmen.

I. 0·1462 *g* Substanz, bei 190° getrocknet, gab 0·1265 *g* CaSO₄.

II. 0·2017 *g* lufttrockene Substanz verlor bei 190° 0·0512 *g* H₂O, die wasserfreie Substanz gab dann, mit einem Gemisch von Bleichromat und Kaliumbichromat verbrannt, 0·1688 *g* CO₂ und 0·0400 *g* H₂O.

In 100 Teilen:

	Berechnet für <u>C₄H₄O₄Ca+3H₂O</u>	Gefunden	
		I	II
C	30·77	—	30·58
H	2·56	—	2·95
Ca	25·64	25·45	—
H ₂ O	25·75	—	25·38

Die mit Äther behufs Entfernung der Fettsäuren ausgeschüttelte Reaktionsflüssigkeit wurde eingedampft, bis ein dicker Kristallbrei ausfiel, dann so viel Schwefelsäure zugefügt, als sich zur Verwandlung des gesamten Natriums in Sulfat berechnet, wobei Bromwasserstoff in Strömen entwich, das Natriumsulfat in üblicher Weise, schließlich durch Alkohol möglichst vollständig abgeschieden und die nach dem Abdestillieren des Alkohols erhaltenen organischen Substanzen durch zwölfstündiges Kochen mit konzentrierter Salzsäure am Rückflußkühler hydrolysiert. Nach 6 Stunden war die Biuretreaktion verschwunden.

Es wurde die Salzsäure durch Eindampfen entfernt, der Sirup in Wasser gelöst (100 *cm*³), dann mit 50prozentiger Phosphorwolframsäure in der Kälte vollständig ausgefällt. Der

mit Schwefelsäure chlorfrei gewaschene Niederschlag (trocken 65 g) wurde dann nach Kossel-Kutscher auf Histonbasen geprüft. Weder nach dem gewöhnlichen Gang, noch nach einigen Modifikationen konnte Arginin isoliert werden.

An Histidindichlorid (kristallisiert) wurde 0·21 g, an reinem Lysinpicrat 0·39 g erhalten. Letzteres wurde analysiert.

I. 0·2790 g bei 105° getrocknete Substanz gab 0·3940 g CO₂ und 0·1173 g H₂O.

II. 0·1718 g bei 105° getrocknete Substanz gab 29·8 cm³ N bei 25° und 734 mm.

In 100 Teilen:

	Berechnet für	Gefunden	
	<u>C₁₂H₁₇N₅O₉</u>	I	II
C	38·40	38·51	—
H	4·53	4·67	—
N	18·66	—	18·80

Im konzentrierten Filtrat des Phosphorwolframate wurde noch eine Fällung mit Phosphorwolframsäure erhalten. Dieses (trocken 31 g) lieferte zersetzt einen Sirup, aus welchem Leucin in Form des charakteristischen schwerlöslichen Kupfersalzes isoliert werden konnte.

Endlich wurde im Filtrate dieses zweiten Phosphorwolframate, nachdem die Phosphorwolframsäure entfernt war, neben wenig Chlornatrium noch 0·4 g Bernsteinsäure vom Schmelzpunkt 187° nachgewiesen.

Die Valeriansäure.

Um die durch Bromlauge abgespaltenen flüchtigen Säuren, insbesondere die Valeriansäure, näher zu untersuchen, wurde eine größere Menge (160 g) entfettetes Kasein in der schon beschriebenen Art verarbeitet.

Die Kalksalze aus den Wasserdampfdestillaten wurden mit frisch gefälltem Silbercarbonat entbromt und dann eingedampft. Hierbei schied sich immer an der Oberfläche eine zähe Haut ab, die, wenn dann erkalten gelassen wurde, sich wieder löste, während dann allmählich reichliche Kristallisation eintrat. Die erste etwas gelblich gefärbte Rohkristallisation

(7·4 g) zeigte schön ausgebildete, lange, abgeschrägte Prismen und wurde so lange aus Wasser umkristallisiert, bis der Kalkgehalt konstant war; die Kristallform blieb dieselbe, doch bildete sich bei den reineren Präparaten beim Einengen der Lösungen nicht mehr die zähe Haut an der Oberfläche.

Das erhaltene reine Kalksalz (3·8 g) gab Ca-Werte für valeriansauren Kalk, eine Löslichkeitsbestimmung zeigte, daß *n*-Valeriansäure vorliegt.

I. 0·1682 g lufttrockene Substanz verlor bei 105° 0·1120 g H₂O.

II. 0·1571 g wasserfreie Substanz gab 0·0887 g CaSO₄.

In 100 Teilen:

	Berechnet für <u>C₁₀H₁₈O₄Ca + H₂O</u>	Berechnet für <u>C₁₀H₁₈O₄Ca</u>	Gefunden	
			I	II
H ₂ O	6·92	—	7·13	—
Ca	—	16·53	—	16·54

Zur Löslichkeitsbestimmung wurden 2·2 g Substanz mit zur Lösung unzureichender Menge Wasser im Thermostaten bei 30° eine Stunde lang geschüttelt, rasch in ein gewogenes Wägglas filtriert, die Lösung gewogen, eingedampft und dann bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

4·3362 g Lösung gab Rückstand 0·3953 g.

In 100 Teilen Wasser lösen sich bei 30°:

Nach Ad. Lieben ¹ <u>normal valeriansaurer Kalk</u>	Gefunden
8·3	10·03

Die Löslichkeit der Kalksalze der zwei isomeren Säuren beträgt ebenfalls nach Ad. Lieben 35·0, beziehungsweise 20·6 Teile in 100 Teilen Wasser bei 30°. Sie enthalten auch mehr als 1 Mol Kristallwasser.

Die Mutterlauge des valeriansauren Kalkes lieferten zunächst zwei aufeinander folgende Kristallisationen a) 4·5 g, b) 4·8 g, die dieselbe Kristallform wie die früheren zeigten, also

¹ Monatshefte für Chemie, 15, 404 ff. (1894).

bereits in Wasser viel leichter löslich waren. Zur Analyse wurden beide aus Wasser nochmals umkristallisiert und gaben Werte, welche zwischen den für propion- und buttersaurem Kalk berechneten liegen. Kristallwasser konnte nicht bestimmt werden, da die Salze sehr rasch verwitterten.

a) 0·1914 g bei 105° getrocknete Substanz gab 0·1239 g CaSO₄.

b) 0·1460 g bei 105° getrocknete Substanz gab 0·1020 g CaSO₄.

In 100 Teilen:

	Berechnet für	Berechnet für	Gefunden	
	<u>C₈H₁₄O₄Ca</u>	<u>C₆H₁₀O₄Ca</u>	a	b
Ca	18·69	21·51	19·04	20·55

Die letzten Mutterlaugen, die schwer kristallisierten, wurden mit Silbernitrat gefällt. Fällung weiß, lichtempfindlich (1·1 g).

0·1507 g trockene Substanz gab 0·0872 g Silber.

In 100 Teilen:

	Berechnet für	Berechnet für	Gefunden
	<u>C₄H₇O₂Ag</u>	<u>C₃H₅O₂Ag</u>	
Ag	55·40	59·98	57·86

Die Mutterlauge dieses Silbersalzes, im Vakuum stark konzentriert, schied neben Salz metallisches Silber ab. Es wurde deshalb zweimal mit viel Wasser ausgekocht, heiß filtriert und die Filtrate im Vakuum eingedunstet. Schließlich fielen in beiden Anteilen undeutlich kristallinische, grau-gefärbte Silbersalze aus (I 0·4 g, II 0·15 g).

I. 0·0994 g im Vakuum getrocknete Substanz gab 0·0627 g Ag.

II. 0·1491 g im Vakuum getrocknete Substanz gab 0·0935 g Ag.

In 100 Teilen:

	Berechnet für	Berechnet für	Gefunden	
	<u>C₃H₅O₂Ag</u>	<u>C₂H₃O₂Ag</u>	I	II
Ag	59·98	64·68	63·08	62·71

Die Zahlen nähern sich bereits dem essigsauren Silber.

Aminosäuren.

Hauptsächlich um mit Hilfe der Estermethode festzustellen, inwieweit Bromlauge die Aminosäuren verändert, wurden nochmals 500 g, und zwar nicht entfettetes Kasein verarbeitet.

Nach der Extraktion mit Äther wurde, wie schon beschrieben, das Natrium als Sulfat abgeschieden, und das in absolutem Alkohol Lösliche zusammen mit dem entsprechenden Anteil aus den 160 g entfetteten Kaseins mit Salzsäure hydrolysiert, die Lösung auf ein Drittel Volum eingedampft, mit Salzsäuregas unter Kühlung gesättigt, mit einem Kriställchen salzsaurer Glutaminsäure geimpft und 4 Tage im Eisschrank stehen gelassen. Nach dieser Zeit hatte sich nicht eine Spur von Glutaminsäure abgeschieden.

Die salzsaure Lösung wurde nach E. Fischer auf Ester verarbeitet.

Die fraktionierte Destillation der Ester zeigte, daß um ungefähr die Hälfte weniger Aminosäuren vorhanden sind, als sie E. Fischer¹ aus Kasein erhalten hat.

Die Zahlen von Fischer sind des Vergleiches halber auf 660 g Kasein umgerechnet.

		E. Fischer ¹ aus Kasein	
Fraktion	I 40 bis 55° bei 20 bis 15 mm	16 g	9·2 g
»	II 55 » 65° » 15 » 12 »	5 »	9·2 »
»	III 65 » 80° » 12 »	6 »	16·0 »
»	IV 80 » 85° » 12 »	36 »	115·6 »
»	V 85 » 110° » 12 »	3 »	12·0 »
»	VI 110 » 120° » 12 »	2 »	26·0 »
»	VII 120 » 130° » 13 »	4 »	18·5 »
		Zusammen	72 g 206·0 g

Besonders auffallend ist die geringere Menge der höher siedenden Fraktionen.

Fraktion I, 40 bis 55°. Sie bestand noch zum größten Teile aus Alkohol und Äther. Nach dem Verseifen und Eindampfen kristallisierte wenig einer Säure vom Fp. 289° in

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

schönen glänzenden Plättchen. Sie wurden aus H_2O noch einmal umkristallisiert, der Schmelzpunkt blieb derselbe. Die Analyse zeigte, daß unreines Leucin vorliegt. Ausbeute 0·14 g.

0·0470 g bei 105° getrocknete Substanz gab 0·0930 g CO_2 und 0·0430 g H_2O .

In 100 Teilen:

	Berechnet für $C_6H_{13}O_2N$	Gefunden
C	54·96	53·96
H	9·92	10·16

Die Mutterlauge wurde zur Trennung des noch vorhandenen Leucins vom Alanin in Kupfersalze verwandelt; leicht lösliche Kupfersalze waren nur in Spuren vorhanden.

Es ist deshalb sehr fraglich, ob Glycocoll und Alanin vorhanden sind.

Fraktion II, 55 bis 65°. Fraktion III, 65 bis 80°. Nach dem Verseifen lieferten beide beim Einengen Leucinkristallisationen, die für sich aus Wasser mehrmals umkristallisiert, schließlich den konstanten Schmelzpunkt 289° zeigten. Aus Fraktion II erhielt ich 1·65 g, aus Fraktion III 1·82 g. Beide gaben das charakteristische schwerlösliche Cu-Salz.

Fraktion IV, 80 bis 85°. Sie enthielt der Hauptmenge nach Leucin, vom Präparate mit dem Schmelzpunkt 289°, 3·65 g.

0·1888 g bei 105° getrocknete Substanz gab 0·3818 g CO_2 und 0·1700 g H_2O .

In 100 Teilen:

	Berechnet für $C_6H_{13}O_2N$	Gefunden
C	54·96	55·15
H	9·92	10·00

Die Mutterlaugen der Fraktionen II, III und IV wurden vereinigt, im Vakuum zur Trockene verdampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgezogen. Ungelöst blieben 8·9 g. Ob diese Aminovaleriansäure enthalten, wurde nicht untersucht.

Der in Alkohol lösliche Anteil wurde dann in Kupfersalze verwandelt, die tiefblaue Lösung im Vakuum zur Trockene gebracht und endlich der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgekocht.

Das ungelöst gebliebene Kupfersalz (1.3 g) hatte grüne Farbe, war auch in Wasser fast unlöslich. Die Analysen zeigten, daß bernsteinsaures Kupfer vorliegt, ein Teil wurde auch mit Schwefelwasserstoff zerlegt und die Säure zeigte sofort den richtigen Schmelzpunkt 187°. *r*-Prolinkupfer wurde keines gefunden.

I. 0.2174 g lufttrockene Substanz verlor bei 105° 0.0371 g H₂O; 0.1803 g trockene Substanz gab 0.0801 g CuO.

II. 0.2576 g lufttrockene Substanz verlor bei 105° 0.0426 g H₂O; 0.2150 g trockene Substanz gab 0.0960 g CuO, 0.2077 g CO₂ und 0.0482 g H₂O.

In 100 Teilen:

	Berechnet für <u>C₄H₄O₄Cu</u>	Gefunden	
		I.	II.
2 Mol H ₂ O...	15.65	17.07	16.53
C	26.21	—	26.35
H	2.23	—	2.38
Cu	35.20	35.43	35.60

Die tiefblaue alkoholische Kupfersalzlösung wurde nach der Vorschrift E. Fischer's auf das Phenylcyanatderivat des Prolins verarbeitet. Als Nebenprodukt entstand dabei viel Diphenylharnstoff, beziehungsweise dessen Anhydrid. Das Phenylcyanatderivat selbst war merkwürdigerweise nur schwierig zur Kristallisation zu bringen; es fiel immer ölig oder harzig aus, erst nach sehr starkem Eindampfen und langem Stehen im Eisschrank trat Kristallisation ein. Der Schmelzpunkt blieb konstant viel zu niedrig, d. i. 60 bis 61°, statt 143°. Ausbeute 1.1 g.

Die Analyse gab aber die für die Prolinverbindung berechneten Werte.

I. 0.1485 g im Vakuum getrocknete Substanz gab 0.3618 g CO₂ und 0.0826 g H₂O.

II. 0.1956 g im Vakuum getrocknete Substanz gab 22.6 cm³ N bei 25° und 735 mm.

In 100 Teilen:

	Berechnet	Gefunden	
		I.	II.
C	66.67	66.45	—
H	5.57	6.18	—
N	12.96	—	12.60

Fraktion V, 85 bis 110°. Fraktion VI, 110 bis 120°. Fraktion VII, 120 bis 130°. Alle drei Fraktionen wurden vereinigt untersucht, dabei konnte aber, trotzdem das Gesamtgewicht 9 g an Ester betrug, nicht die geringste Menge, weder von Phenylalanin, noch von salzsaurer Glutaminsäure und Asparaginsäure gefunden werden.¹ Auch konnte nicht festgestellt werden, welche Bestandteile sonst in diesen 9 g Ester enthalten waren.

Die bei der Abscheidung der Ester im Kaliumcarbonatbrei zurückbleibende organische Substanz wurde nochmals, wie schon beschrieben, auf Histonbasen untersucht und hiezu der fünfte Teil, entsprechend 132 g Kasein, verwendet.

Von Arginin wurde wiederum nicht die Spur gefunden, an reinem Lysinpikrat 14·1 g, an Histidindichlorid 3·5 g.

Durch Umrechnung auf 100 Teile findet man für freies Histidin und Lysin ganz dieselben Werte, die für Kasein E. Hart² angibt:

In 100 Teilen:

	E. Hart	Gefunden
Lysin	5·8	5·5
Histidin	2·6	2·4

Es wurde schon einige Male erwähnt, daß den in Äther löslichen Säuren ein in Wasser nicht lösliches, nach Benzaldehyd riechendes Öl beigemischt ist. Um dieses zu isolieren, wurden die Ätherextrakte aus den 500 g Kasein zunächst so lange mit Wasserdampf destilliert, bis es sich nicht mehr vermehrte, und nach Wechseln der Vorlage dann weiter, so lange das Destillat noch sauer reagierte. Das erste Destillat wurde sofort mit Kalkmilch neutralisiert und das Öl neuerdings mit Wasserdampf übergetrieben.

¹ Dabei wurde die von E. Fischer in »Anleitung zum präparativen Arbeiten«, 7. Auflage, bei der Hydrolyse des Leims beschriebene Trennungsmethode dieser drei Säuren angewendet.

² E. Hart, Zeitschrift für physiol. Chemie, 33, 347 (1901).

Das Öl.

Es wurde in Äther aufgenommen, mit entwässertem Natriumsulfat getrocknet, dann im CO_2 -Strom der Äther bei möglichst niedriger Temperatur abdestilliert und darauf der Rückstand über freier Flamme destilliert. Die Destillate wurden in mit CO_2 gefüllten Vorlagen aufgefangen.

Zunächst geht noch viel Äther über, dann steigt die Temperatur rasch bis auf 130° , bleibt dann ziemlich konstant und der Hauptteil geht bis 140° über; über 140° steigt die Temperatur sehr rasch, es tritt deutliche Zersetzung ein, das Destillat ist stark dunkel gefärbt und besitzt einen stechenden Geruch nach Bromwasserstoff, im Fraktionierkölbchen bleibt eine schwarze kohlige Masse zurück.

Fraktion I, 30 bis 130° , 5·6 g. Fraktion II, 130 bis 140° , 13·0 g. Fraktion III über 140° , 3·1 g. Die ersten beiden Fraktionen wurden noch einmal einer fraktionierten Destillation unterworfen. Zunächst destilliert noch viel Äther, darauf steigt die Temperatur wieder plötzlich bis 120° , nimmt dann langsam bis 147° zu, dann tritt wieder deutliche Zersetzung unter starker Bromwasserstoffabgabe ein.

Das zwischen 120 und 147° Übergehende wurde in vier getrennten Anteilen aufgefangen.

Auf diese Art ergaben sich folgende Fraktionen:

Bis 65° , 1·2 g, enthält noch Äther,
65 bis 120° , 0·4 g,
120 bis 131° , 2·7 g,
131 bis 136° , 3·0 g,
136 bis 140° , 2·7 g,
endlich 140 bis 147° , 3·4 g.

Die höchstsiedende Fraktion gibt mit Silbernitrat allein schon gelbes Bromsilber und ist schwach braun gefärbt, die übrigen Fraktionen sind farblos und geben erst nach Zusatz von starker Salpetersäure einen gelblichen Niederschlag mit Silberlösung.

Alle besitzen einen deutlichen Geruch nach bitteren Mandeln und reduzieren ammoniakalische Silberlösung beim

Erwärmen. Mit Phenylhydrazin tritt keine Reaktion ein. Eine geringe Menge Stickstoff ist in allen Fraktionen enthalten. Von Fraktionen, 120 bis 131° und 136 bis 140°, wurden Brombestimmungen nach Carius im Bombenrohr ausgeführt. Die gefundenen Bromwerte sind untereinander sehr verschieden und auffallend hoch.

0·1525 g von Fraktion 120—131 gaben 0·1724 g AgBr.

0·1657 g von Fraktion 136—140 gaben 0·2643 g AgBr.

In 100 Teilen:

	Fraktion 120—131	Fraktion 136—140
Br.....	48·11	67·87

Eine weitere Untersuchung wurde nicht ausgeführt.

Die Kalksalze der mit Wasserdampf flüchtigen Fettsäuren und 500 g Kasein gaben als erste Kristallisation 31·2 g. Der schwerstlösliche Anteil wurde daraus durch wiederholtes Umkristallisieren aus Wasser gewonnen, das so lange fortgesetzt wurde, bis der Ca-Gehalt konstant blieb (4·6 g).

0·0929 g lufttrockenes Salz verloren bei 105° 0·0065 g H₂O und gaben dann 0·0487 g CaSO₄.

In 100 Teilen:

	Berechnet für C ₁₀ H ₁₈ O ₄ Ca + H ₂ O	Berechnet für C ₁₀ H ₁₈ O ₄ Ca	Gefunden
H ₂ O	6·92	—	6·99
Ca	—	16·53	16·58

10·2275 g bei 30° im Thermostaten dargestellte Lösung lieferten bei 105° 0·8445 g Trockenrückstand.

In 100 Teilen lösen sich an wasserfreiem Salz:

Nach Ad. Lieben ¹	Gefunden
8·2	9·00

In dem mit Wasserdampf nicht flüchtigen Anteil wurde auch dieses Mal neben Bernsteinsäure nichts Charakteristisches isoliert. Eine ausgedehnte Fraktionierung der Silber- und Bleisalze führte stets zu amorphen Substanzen.

¹ L. c.