

Ueber ein gechlortes Casein und dessen Spaltung durch rauchende Salzsäure.

Von

Dr. Theodor Panzer, Assistent.

Aus dem Universitäts-Laboratorium für medicinische Chemie in Wien.

(Der Redaction zugegangen am 28. Juni 1901.)

In den bisher erschienenen Publicationen über halogenhaltige Eiweisskörper werden vorwiegend die Darstellung und Reactionen dieser Verbindungen besprochen, während über Spaltungsversuche, welche Aufschluss über die Art der Bindung der Halogenatome im Eiweissmolekül geben können, nur vereinzelte Angaben existiren.

Darin stimmen alle Autoren überein, dass ein Theil des Halogens nur locker gebunden ist, während ein anderer Theil selbst der Einwirkung von Alkalien widersteht.

Eine einzige Abhandlung, und zwar aus dem Jahre 1875, beschreibt ausführlich eine tiefgreifende Spaltung eines halogenhaltigen Eiweissabkömmlings, welche zu halogenhaltigen Spaltungsprodukten führte. W. Knop¹⁾ erhielt nämlich durch Kochen von gebromtem Eiweiss mit wässriger Bromwasserstoffsäure die von ihm Bromdioxyleucin-Ammon-Bromtyrosinsäure benannte Substanz $C_{15}H_{27}Br_2N_3O_3$, nebst einer stickstofffreien Säure, deren Calciumsalz die Zusammensetzung $C_5H_{14}Br_2Ca_2O_2$ hatte.

Die im Folgenden beschriebene Untersuchung war bereits fertig gestellt, als eine Arbeit von Habermann und Ehrenfeld²⁾ erschien. In derselben wird die Darstellung eines

1) W. Knop, Untersuchungen über die Eiweisskörper, chemisches Centralblatt, 1875, S. 395.

2) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXXII Heft 5.

Chlorcaseins durch nasirendes Chlor beschrieben, sowie die Spaltung desselben durch Salzsäure bei Gegenwart von Zinnchlorür; von den Spaltungsprodukten haben die Verfasser nur die Glutaminsäure abgeschieden.

Zu meinen Versuchen diente auch ein gechlortes Casein, welches durch Einwirkung von Salzsäure und Kaliumchlorat dargestellt war: das Produkt wurde durch concentrirte Salzsäure in der Kochhitze gespalten, worauf die dabei entstehenden Produkte isolirt wurden.

Bevor über diese Zerlegung berichtet wird, müssen zunächst die Darstellung, sowie die Eigenschaften desjenigen gechlorten Caseins, von welchem ausgegangen wurde, näher beschrieben werden. Dies ist zur Charakteristik des betreffenden Präparates unbedingt nöthig, da schon kleine Abweichungen in der Darstellung eines gechlorten Eiweisskörpers beträchtliche Unterschiede in den Eigenschaften und in der Zusammensetzung zu bedingen scheinen.

1 kg Casein, welches nach Hammarsten's Methode aus Milch dargestellt und so lange mit Aether unter wiederholtem Zerreiben extrahirt worden war, bis der Aether nichts mehr aufnahm, wurde mit 4 kg 20%iger Salzsäure angerührt und in die breiige Masse unter Umrühren 450 g gepulvertes chloresaures Kalium in kleinen Portionen eingetragen, wobei das Gemisch sich stark erwärmte. Nach dem Abkühlen wurde mit viel Wasser verdünnt, das Ungelöste abfiltrirt und mit destillirtem Wasser so lange gewaschen, bis das Waschwasser mit Salpetersäure und salpetersaurem Silber keinen Niederschlag mehr gab. Nach dem Trocknen an der Luft zerfiel dieses Ungelöste zu einem schwach isabellfarbigen Pulver mit eigenthümlichem, entfernt an Chlor erinnerndem Geruche, im Gewichte von 770 g, von welchem eine Probe beim Erhitzen vollständig verbrannte, ohne Asche zu hinterlassen.

Dieses Präparat ist unlöslich in Wasser, Alkohol, Aether, Chloroform, Benzol und Eisessig. Dagegen löst es sich leicht in verdünnter Kali- oder Natronlauge und in verdünntem Ammoniak. Derartige Lösungen reagiren, wenn nur wenig von der Base verwendet wurde, sauer. Kohlensaure Alkalien be-

wirken ebenfalls eine Lösung, und zwar unter Entwicklung von Kohlendioxyd.

Eine mit Hülfe von etwas Lauge bereitete, sauer reagirende Lösung dieses Chlorcaseins coagulirt beim Kochen nicht. Sie wird dagegen gefällt durch Säuren, und zwar durch Essigsäure, Schwefelsäure und Salzsäure. Die so erhaltenen Niederschläge lösen sich im Ueberschusse der genannten Säuren, mit Ausnahme der Salzsäure, nicht auf. Auch Salpetersäure, in reichlicher Menge zugesetzt, bewirkt eine Lösung des zuerst entstandenen Niederschlages unter starker Gelbfärbung der Flüssigkeit.

Salze von Schwermetallen erzeugen in solchen Lösungen gleichfalls Niederschläge. So entsteht durch Zusatz von Silbernitrat eine weisse, von Kupfersulfat eine hellgrüne und von Bleizucker eine weisse Fällung. Aetzsublimat trübt die Lösung nicht.

Eine Lösung von diesem Chlorcasein kann ferner ausgesalzen werden durch Chlornatrium, Magnesiumsulfat, wenn diese Salze bis zur Sättigung der Flüssigkeit eingetragen werden, ferner durch Zusatz des gleichen Volumens einer gesättigten Ammonsulfatlösung.

Alkohol fällt zunächst nicht, erst wenn etwas Neutralsalz, z. B. essigsäures Natrium, zugesetzt wird.

Die allgemeinen Alkaloidreagentien, nämlich Ferrocyankalium, Pikrinsäure, Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Kaliumquecksilberjodid und Jodjodkalium trüben eine solche Lösung nicht, während Kaliumwismuthjodid einen reichlichen Niederschlag erzeugt. Hingegen entstehen in einer mit überschüssiger Salzsäure bereiteten Lösung mit allen genannten Reagentien Niederschläge.

Das Chlorcasein zeigt ferner auch den Eiweisssubstanzen zukommende Farbenreactionen, und zwar die Biuretreaction und die Xanthoproteinsäurereaction. Negativ fielen aus die Millon'sche und Liebermann'sche Reaction. Mit Rohrzucker und concentrirter Schwefelsäure, sowie mit α -Naphtol und concentrirter Schwefelsäure gibt eine Lösung dieses Körpers keine Färbung, wogegen bei längerem Kochen mit Fehling'scher

Im Mittel aus diesen Bestimmungen ergibt sich demnach die elementare Zusammensetzung des Chlorcaseins mit:

47,05 % C, 5,52 % H, 12,40 % N, 0,23 % S,
8,32 % Cl, 0,81 % P und 25,67 % O.

Der Umstand, dass das Chlorcasein mit verdünnten Alkalien sauer reagirende Lösungen gibt, sowie dass es aus Carbonaten Kohlendioxyd in Freiheit setzt, macht es wahrscheinlich, dass diese Substanz eine mehrbasische Säure ist, und zwar eine verhältnissmässig starke.

Es wurde nun versucht, das Aequivalentgewicht dieser Säure zu finden, und zu diesem Zwecke einige Bestimmungen ausgeführt, über welche hier ein kurzer Bericht eingeschaltet werden möge.

0,2479 g bei 110° C. getrocknetes Chlorcasein wurde in Wasser vertheilt und aus einer Bürette n/10 Lauge hinzufliessen gelassen, bis alles gelöst war, wozu 10,3 ccm. Lauge angewendet wurden. Nun wurde aus einer zweiten Bürette solange n/10 Säure zugesetzt, bis ein herausgenommener Tropfen die Farbe von empfindlichem Lackmuspapier nicht mehr veränderte. Hierzu waren 4,9 ccm. Säure verbraucht worden. Um also die genannte Menge von Chlorcasein in ein auf Lackmusfarbstoff neutral reagirendes Salz umzuwandeln, waren 5,4 ccm. n/10 Lauge erforderlich. Demnach würde ein Liter Normallauge, d. i. 1 Gramm Molekül Kaliumhydroxyd durch 459 g Chlorcasein neutralisirt werden.

Ferner wurde eine sauer reagirende Lösung von Chlorcasein einerseits mit einer Lösung von Kupferacetat, andererseits mit Silbernitrat ausgefällt, auf Saugfiltern abfiltrirt und so lange mit Wasser gewaschen, bis in dem abfliessenden Waschwasser keine Metallverbindung mehr nachzuweisen war.

0,2980 g des bei 110° getrockneten Silberniederschlags enthielten 0,0941 g Silber. Demnach entsprechen einem Atomgewicht Silber, in Grammen ausgedrückt, 234,2 g Chlorcasein.

Bei der Bestimmung des Kupfers aus dem bei 110° getrockneten Kupferniederschlage wurden aus 0,1897 g Substanz 0,0152 g Kupferoxyd, entsprechend 0,0121 g Kupfer, erhalten. Auf ein halbes Gramm-Atom Kupfer kommen demnach 463,4 g Chlorcasein.

Mit je einem Aequivalentgewichte der genannten Metalle verbinden sich demnach:

zur Kaliumverbindung	459,0	Gewichtstheile Chlorcasein
Silberverbindung	234,2	»
Kupferverbindung	463,4	»

Der erste und dritte Werth stimmen sehr gut miteinander überein, während die Silberverbindung genau die Hälfte von den beiden anderen Zahlen gibt. Vielleicht liegt hier ein ähnliches Verhalten vor, wie es der Harnstoff gegenüber Mercurinitrat zeigt.

Nach dem Vorausgegangenen zeigt demnach das Chlorcasein im Allgemeinen dieselben Eigenschaften, wie sie bis jetzt für halogenirte Eiweisskörper angegeben wurden. Namentlich fiel allen Autoren das Ausbleiben der Millon'schen Reaction auf. Zum Unterschiede von den meisten bisher dargestellten Präparaten zeichnet sich das vorliegende Chlorcasein dadurch aus, dass es einen relativ hohen Halogengehalt aufweist. Eine kleine Zusammenstellung soll dies darthun.

Es enthält:

das Jodcasein	von Blum und Vaubel	6—7% Jod, ¹⁾
„	„ Röhmann und Liebrecht	5,7% „ ²⁾
Perjodcasein	„ „ „ „ „	17,8% „
Caseojodin	„ „ „ „ „	8,7% „
Bromcasein	„ Knop	8—20% Brom, ³⁾
„	„ Hopkins und Pinkus	11,17% „ ⁴⁾
Chlorcasein	„ Habermann u. Ehrenfeld	13,28—14,04% Chlor.
das vorliegende Chlorcasein	„	8,3% „

Unter Berücksichtigung äquivalenter Halogenmengen wird das vorliegende Präparat unter den näher charakterisirten Präparaten nur von dem von Habermann und Ehrenfeld

1) Blum und Vaubel, Ueber Halogeneiweissderivate. Journ. f. prakt. Chemie. Bd. 57, S. 365.

2) A. Liebrecht, Ueber Jodderivate von Eiweisskörpern (Casein). Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 30, S. 1824.

3) W. Knop, Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper. Chem. Centralbl., Bd. X, S. 571 u. 587.

4) F. G. Hopkins und St. N. Pinkus, Zur Kenntniss der Einwirkung von Halogenen auf Proteine. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 31, S. 1312.

übertroffen. In den Löslichkeitsverhältnissen unterscheidet es sich in einigen Punkten von diesem, trotzdem beide Präparate nach demselben Principe dargestellt wurden, ein Beweis dafür, dass kleine Unterschiede in der Darstellungsmethode verschiedene Körper liefern.

Bemerkenswerth ist noch der negative Ausfall der Molisch'schen Probe.

Von diesem eben beschriebenen Chlorcasein wurden nun 200 g mit 600 g reiner, rauchender Salzsäure ohne weiteren Zusatz durch 6 Stunden in einem Kolben gekocht, in dessen Hals mittelst Glasschliffes ein Rückflusskühler eingefügt war.

Im Kühlrohre setzte sich eine kleine Menge farbloser, nadelförmiger Krystalle ab, welche mit Wasser zur Hauptmenge der zerkochten Masse gespült wurden. Diese, eine dunkelbraune Flüssigkeit, welche nur wenig Ungelöstes enthielt, wurde mit dem gleichen Volumen destillirten Wassers verdünnt und im Wasserdampfströme destillirt, nachdem aus dem ganzen Destillirapparat die Luft vorher durch Kohlendioxyd vertrieben worden war. In der Vorlage, welche durch einen angefügten, mit Wasser beschickten Peligot'schen Absorptionsapparat vor Luftzutritt geschützt war, sammelt sich ein trübes Destillat an. Dasselbe reagirte sauer, enthielt nur wenig Chlorwasserstoff und klärte sich beim Schütteln mit Aether.

Es wurde deshalb das ganze Destillat mit Aether ausgeschüttelt und die ätherische Schichte von der wässerigen im Scheidetrichter getrennt. Der Aether hinterliess nach dem Verdunsten bei Zimmertemperatur ungefähr 1 g eines gelben Oeles, welches aber beim Stehen bald farblose, nadelförmige Krystalle abschied. Diese wurden durch Abpressen zwischen Filtrirpapier von dem noch übrigen Oele getrennt und wiederholt aus Aether umkrystallisirt. Sie sind unlöslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol, enthalten reichlich Chlor, sind jedoch frei von Stickstoff, Schwefel und Phosphor, sintern bei 88–90° C. und schmelzen unscharf bei 100–110° C. Werden diese Krystalle mit salpetersäurehaltigem Wasser geschüttelt, so gibt die filtrirte Flüssigkeit mit salpetersaurem Silber keinen Niederschlag. Erwärmt man die Krystalle mit verdünnter

Natronlauge, so lösen sie sich, ohne dass in der Lösung Chlorwasserstoff nachzuweisen wäre. Nach diesen Eigenschaften ist der vorliegende Körper (vielleicht ein Gemenge) also als eine gechlorte, stickstofffreie Säure anzusprechen, welche ihr Chlor ziemlich fest gebunden enthält, ähnlich den gechlorten Fettsäuren. Der Versuch einer Chlorbestimmung (nach Carius), welcher bei der geringen Menge der verfügbaren Substanz nur ein annäherndes Resultat versprach, lieferte folgende Werthe:

0,0229 g Substanz gaben 0,0438 g Ag, entsprechend 0,0144 g Cl
= 62,8% Cl.

Es sei mir gestattet, Vermuthungen über die Natur und Herkunft dieser gechlorten Säure erst später zu äussern.

Die von der ätherischen Schichte getrennte wässrige Flüssigkeit, also das mit Aether ausgeschüttelte Destillat, wurde zur Entfernung der geringen Mengen der darin enthaltenen Salzsäure nochmals im Wasserdampfströme destillirt. Das nunmehr übergegangene Destillat, welches klar war, sauer reagierte und keine Salzsäure mehr enthielt, wurde mit reiner Natronlauge schwach alkalisch gemacht und in einer Platinschale zur Trockene eingedampft, der weisse Rückstand zur Entfernung des kohlensauren Natriums mit Alkohol ausgezogen. Das in Alkohol Unlösliche enthielt nichts Organisches mehr, da es, mit Wasser zur Vertreibung des Alkohols wiederholt eingedampft, bei stärkerem Erhitzen keine Verkohlung zeigte.

Die alkoholische Lösung, zur Trockene eingedampft, hinterlässt nur wenig Rückstand. Derselbe enthält Chlornatrium, da seine wässrige Lösung mit Salpetersäure und salpetersaurem Silber einen weissen Niederschlag gibt. Dieser Chlorwasserstoff dürfte, da er früher nicht nachzuweisen war, dadurch entstanden sein, dass ihn die Lauge aus gechlorten Produkten abgespalten hat. Die wässrige Lösung dieses Rückstandes riecht nach dem Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure deutlich nach Buttersäure und höheren Fettsäuren.

Der Destillationsrückstand wurde filtrirt und der auf dem Filter bleibende braune Rückstand so lange mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser fast farblos ablief, sodann an der Luft getrocknet und mit Aether extrahirt. Der Aether

hinterliess nach dem Verdunsten wenige schwach gelbe, zu Rosetten gruppirte Krystalle, welche eine nicht eben beträchtliche Menge Chlor enthielten, jedoch frei von Schwefel, Stickstoff und Phosphor waren. Sie lösten sich nur theilweise in verdünnter Natronlauge, jedoch ohne Chlorwasserstoff abzuspalten. Diese Krystalle dürften also zum Theile ebenfalls eine gechlorte Säure sein.

Die braunen, mit Aether extrahirten Massen, welche in getrocknetem Zustande 1,2 g wogen, hatten dem äusseren Ansehen nach Aehnlichkeit mit den Huminsubstanzen, wie man sie beim Zerkochen von Eiweisskörpern mit Mineralsäuren immer erhält (Schmiedeberg's Melanoidinsäure). Sie lösten sich auch in verdünnter Lauge und fielen aus einer solchen Lösung auf Zusatz einer Säure wieder in braunen Flocken aus. Nachdem sie durch wiederholtes Lösen in verdünnter Lauge und Fällen mit verdünnter Schwefelsäure, sowie durch sorgfältiges Auswaschen mit Wasser von mechanisch anhaftendem und chemisch gebundenem Chlorwasserstoff befreit worden waren, liessen sich in denselben nebst viel Stickstoff auch reichliche Mengen von Chlor nachweisen. Es dürften hier also gechlorte Huminsäuren vorliegen.

Der filtrirte Distillationsrückstand wurde nun mehrmals mit Aether ausgeschüttelt und die ätherischen Auszüge vereinigt. Nachdem diese an der Luft abgedunstet waren, hinterblieb ein brauner, schmieriger Rückstand, aus welchem bei längerem Stehen nadelförmige Krystalle sich abschieden. Als dieser Rückstand mit Wasser übergossen wurde, gingen die Krystallnadeln in Lösung, während die braune schmierige Masse ungelöst blieb. Aus dem wässerigen Auszuge konnten beim Einengen diese Nadeln wieder erhalten und durch Umkrystallisiren aus Wasser gereinigt werden. Sie stellten dann farblose, ziemlich lange Nadeln dar, welche Chlor enthielten, jedoch frei von Stickstoff, Schwefel und Phosphor waren. Ihre wässerige Lösung reagierte intensiv sauer und schied, wenn sie genügend concentrirt war, auf Zusatz von Silbernitratlösung einen weissen, krystallinischen Niederschlag ab, der sich beim Verdünnen mit Wasser wieder löste. Wurde dieses Gemisch

zum Kochen erhitzt, so trat Reduction des salpetersauren Silbers unter Abscheidung von metallischem Silber auf. Es ist demnach auch dieser Körper als eine gechlorte, stickstofffreie Säure zu bezeichnen.

Der braune, schmierige, in Wasser unlösliche Rückstand wurde wiederholt in Aether gelöst, wobei immer eine geringe Menge von braunen Flocken sich abschied, die Lösung filtrirt und verdunsten gelassen. Schliesslich wurde der Rückstand nochmals in Aether gelöst und diese Lösung mit einer verdünnten Sodalösung ausgeschüttelt, welche letztere sich hierbei stark braun färbte. Die nahezu entfärbte ätherische Schichte hinterliess nach dem Verdunsten wenig von einem gelben Syrup, der Stickstoff und Chlor enthielt und in verdünnter Natronlauge löslich war. Die wässrige Schichte wurde mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit Aether ausgeschüttelt. Der Aether hinterliess beim Verdunsten eine braune, amorphe Masse, welche reichlich Chlor enthielt und stickstofffrei war. Die Löslichkeitsverhältnisse lassen darauf schliessen, dass auch dieser Rückstand saurer Natur ist und somit eine oder ein Gemenge von gechlorten, stickstofffreien Säuren darstellt; nur gelang es nicht, dasselbe frei von dem braunen Farbstoffe zu erhalten.

Der filtrirte und mit Aether ausgeschüttelte Destillationsrückstand wurde nunmehr bis zur Syrupdicke eingeengt und einen Monat lang im Eiskasten stehen gelassen. Die Masse war dann zu einem Krystallbrei erstarrt, welcher auf poröse Thonteller gestrichen wurde. Die derart von der Mutterlauge getrennten Krystalle wurden zunächst nochmals in Wasser gelöst und durch Sättigen der Lösung mit Chlorwasserstoffgas unter Abkühlen wieder ausgefällt, wodurch sie bereits fast farblos erhalten wurden. Durch öfteres Umkrystallisiren aus heissem Wasser konnten endlich 8 g ganz reiner Krystalle erhalten werden, während die beim Umkrystallisiren abgetrennten Mutterlaugen noch 15 g unreinerer Krystalle lieferten. Diese Krystalle glichen dem Aussehen nach dem Glutaminsäurechlorhydrat und enthielten auch die der salzsäuren Glutaminsäure entsprechende Menge Chlorwasserstoff.

0,2651 g der reinen Krystalle gaben 0,2003 g AgCl und 0,0032 g Ag.

Berechnet für $C_5H_{10}NO_4Cl$: 19,31% Cl

Gefunden: 19,08% Cl.

Die von der salzsauren Glutaminsäure abgetrennte Mutterlauge, welche in den Thontellern eingesogen war, wurde durch Auskochen dieser Thonteller mit Wasser wieder gewonnen, die so erhaltene filtrirte Flüssigkeit zur Entfernung der Hauptmenge der Salzsäure wiederholt eingedampft und der Rückstand endlich in Wasser gelöst. Da in dieser Lösung noch gechlorte Spaltungsprodukte vermuthet werden mussten, so durfte die Entfernung der noch vorhandenen Salzsäure aus der Flüssigkeit nicht durch Silberoxyd bewerkstelligt werden, da zu befürchten stand, dass dieses aus den aufzusuchenden gechlorten Substanzen Chlor abspalten würde. Es wurde daher unter peinlicher Vermeidung von alkalischer Reaction folgendes Verfahren eingeschlagen.

Die Flüssigkeit wurde mit reinem alkalifreien Barytwasser genau neutralisirt, wodurch ein ziemlich reichlicher, bräunlich gefärbter Niederschlag entstand. Dieser wurde abfiltrirt und gut mit kaltem Wasser gewaschen. Er enthielt dann ausser einer geringen Menge von Huminstoffen nichts Nennenswerthes an organischen Stoffen, namentlich war derselbe frei von gechlorten Produkten, wie eine auf das Vorhandensein von Chlor angestellte Probe lehrte. Die Hauptmenge dieses Niederschlages wurde zunächst mit Wasser wiederholt ausgekocht und die so gewonnenen wässerigen Auszüge eingedampft; sie hinterliessen nur eine minimale Menge von Rückstand, dessen wässerige Lösung keine Millon'sche Reaction gab, demnach auch kein Tyrosin enthielt.

Der ausgekochte Niederschlag wurde behufs Entfernung von Huminstoffen wiederholt in verdünnter Salzsäure gelöst und aus dieser Lösung durch einen Ueberschuss von Ammoniak wieder ausgefällt, schliesslich nochmals in verdünnter Salpetersäure gelöst und mit einer Auflösung von Molybdänsäure in Salpetersäure versetzt. Es entstand der für die Orthophosphorsäure charakteristische gelbe Niederschlag. Eine Lösung des abfiltrirten und ausgewaschenen phosphormolybdänsauren

Ammoniums in überschüssigem Ammoniak wurde auch durch Magnesiamixtur gefällt.

Die von dem durch Barytwasser entstandenen Niederschlage abfiltrirte, nunmehr nur noch hellgelbe Lösung wurde zur Krystallisation eingedampft, die ausgeschiedenen Krystalle abgesaugt, die Mutterlauge weiter eingedampft und dies so lange fortgesetzt, bis sich Chlorbaryum auszuscheiden begann. Eine Lösung der so erhaltenen krystallinischen Massen in heissem Wasser gab auch nicht die Andeutung einer Millon'schen Reaction. Obwohl schon dadurch die Abwesenheit von Tyrosin nachgewiesen worden war, wurde doch noch die Krystallmasse dem Trennungsverfahren nach Hlasiwetz und Habermann unterworfen, wobei ebenfalls kein Tyrosin erhalten wurde.

Dagegen konnte eine reichliche Menge von Leucin dargestellt werden, welches nach mehrmaligem Umkrystallisiren aus ammoniakhaltigem Alkohol farblose Blättchen darstellte. Diese zeigten das für das Leucin charakteristische Verhalten. Sie sublimirten beim Erhitzen unter Entwicklung des eigenthümlich riechenden Dampfes, sie gaben die Scherer'sche Reaction und lieferten beim Kochen mit einer concentrirten Lösung von Kaliumpermanganat und nachherigem Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure eine stark nach Valeriansäure riechende Flüssigkeit. Trotzdem die Krystalle sorgfältig gereinigt worden waren und den Eindruck einer einheitlichen Substanz hervorriefen, erwiesen sie sich doch nicht als rein. Zunächst fiel beim Erwärmen der Krystalle mit einer Lösung von Kaliumpermanganat ein deutlicher Geruch nach Bittermandelöl auf, eine Reaction, welche der Zimmtsäure, einer dem Tyrosin nahe verwandten Substanz, zukommt. Durch Extraction der Leucinkrystalle mit Aether konnte jedoch keine Zimmtsäure dargestellt werden. Wurde sodann das durch Kochen mit Kaliumpermanganat erhaltene Reactionsgemisch mit Schwefelsäure angesäuert, so war der Geruch nach Valeriansäure zwar weitaus vorherrschend, jedoch nicht rein. Eine Stickstoffbestimmung (nach Dumas-Ludwig) aus den Krystallen, sowie eine Kupferbestimmung aus deren Kupferverbindung gaben endlich beide zu hohe Werthe für Stickstoff bezw. Kupfer.

0,1727 g Substanz: 16,1 ccm. N bei 12,0° C. und 749,8 mm.

Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$: 10,71% N

Gefunden: 11,06% N.

0,1406 g der Kupferverbindung gaben 0,0405 g CuO,
entsprechend 0,0323 g Cu.

Berechnet für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$: 19,60% Cu

Gefunden: 23,00% Cu.

Diese Werthe sprechen dafür, dass dem Leucin eine niedrigere Amidosäure beigemischt war.

Die von dem Rohleucin abgesaugte Flüssigkeit wurde nun zur Entfernung des darin enthaltenen Chlorbaryums unter Erwärmen mit einem Ueberschusse von Silbersulfat behandelt, die wieder erkaltete Flüssigkeit filtrirt und dann zur Abscheidung der geringen in Lösung gebliebenen Silbermengen mit Schwefelwasserstoff gesättigt, filtrirt und durch Kochen von dem überschüssigen Schwefelwasserstoff befreit. Sowohl der Chlorsilberbaryumsulfatniederschlag, als auch das Schwefelsilber wurde zur Vorsicht wiederholt mit Wasser ausgekocht und mit den eingeeengten wässerigen Auszügen die Millon'sche Reaction angestellt, jedoch mit dem gleichen negativen Erfolge wie beim Barytniederschlage.

Das vom Schwefelwasserstoff befreite Filtrat nach dem Silbersulfidniederschlage, welches ebenfalls keine Millon'sche Reaction zeigte, enthielt nun keine Salzsäure mehr, nichtsdestoweniger konnte darin eine zwar nicht beträchtliche, aber immerhin nennenswerthe Menge von Chlor in anderer Bindung nachgewiesen werden. Es konnte ferner festgestellt werden, dass diese chlorhaltige Substanz durch Phosphorwolframsäure, ferner durch Bleizucker oder Chlorblei, nicht aber durch überschüssigen Aetzbaryt aus der Lösung ausgefällt werde. Ein Versuch jedoch, diese Substanz dadurch darzustellen, dass man die ganze Flüssigkeit mit einer heissgesättigten Chlorbleilösung versetzte, den abfiltrirten und gut gewaschenen Niederschlag in Wasser aufschwemmte und mit Schwefelwasserstoff zerlegte, misslang. Nachdem nämlich das Filtrat vom Schwefelblei durch Erwärmen vom Schwefelwasserstoff befreit, weiters zur Entfernung der Schwefelsäure mit reinem Barytwasser genau neutralisirt und filtrirt worden war, wurde dasselbe zur Kry-

stallisation eingedampft und dabei nur wenig von einem gelben, gummiartigen Rückstand erhalten, der Stickstoff und nur eine geringe Menge Chlor enthielt. Derselbe ist in Wasser ziemlich gut löslich und reagiert stark sauer. Da die Substanzmenge zu klein war, um sie auf den chlorhaltigen Körper weiter zu verarbeiten, und der Chlorgehalt auch nur gering war, so wurde wenigstens versucht, Asparaginsäure darin nachzuweisen. Die wässrige Lösung des Rückstandes wurde daher mit Kupfercarbonat gekocht und die filtrirte dunkelblaue Flüssigkeit zur Krystallisation eingedampft. Es schieden sich radiär gestellte blaue Nadeln aus, welche dem äusseren Ansehen nach dem asparaginsäuren Kupfer glichen, zur weiteren Identificirung jedoch zu wenig waren.

Aus dem Filtrat von dem durch Chlorblei entstandenen Niederschlage wurde nun das Blei durch Schwefelwasserstoff abgeschieden, die filtrirte Flüssigkeit bis zum Austreiben des Schwefelwasserstoffs erhitzt, dann mit Silbersulfat gesättigt, vom abgeschiedenen Chlorsilber abfiltrirt und das nunmehrige Filtrat genau nach der von Kossel und Kutscher¹⁾ angegebenen Methode auf Hexonbasen verarbeitet. Hierbei wurden folgende Substanzen erhalten:

Die Argininfraction repräsentirte wenig von einer krystallinischen Masse, welche beim Erhitzen vollständig verbrannte, sich als stickstoffhaltig erwies und in wässriger Lösung alkalisch reagirte. Das daraus dargestellte saure Nitrat krystallisirte in schönen Nadeln, deren wässrige Lösung optisch activ und zwar rechtsdrehend war und mit Phosphorwolframsäure einen reichlichen Niederschlag gab. Alle diese Reactionen zeigt auch das Arginin.

Die als Histidin erhaltene Substanz bildet einen krystallisirten, aschefreien, stickstoffhaltigen Abdampfrückstand, dessen wässrige Lösung mit Silbernitrat versetzt bei genauem Neutralisiren mit Ammoniak einen weissen, flockigen Niederschlag gibt, der im Ueberschusse von Ammoniak leicht löslich ist.

¹⁾ A. Kossel und F. Kutscher. Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper. Zeitschr. für physiol. Chemie Band XXXI. 1. und 2. Heft.

Die angesäuerte Lösung der Krystalle gibt ferner mit Phosphorwolframsäure eine reichliche Fällung, alles Reactionen, welche auch dem Histidin zukommen.

Die endlich als Lysin anzusprechende Substanz stellte gut ausgebildete, farblose Nadeln dar, welche beim Erhitzen vollständig verbrannten, stickstoffhaltig waren und in mit Salzsäure angesäuerter Lösung mit Platinchlorid einen krystallinischen Niederschlag gaben.

Allerdings waren die Mengen der drei zuletzt beschriebenen Substanzen zu gering, um deren Identität mit den Hexonbasen durch Elementaranalysen beweisend festzustellen, doch dürften die angeführten Eigenschaften, sowie die Art und Weise, auf welche diese Substanzen gewonnen wurden, es höchst wahrscheinlich machen, dass hier diese Basen vorliegen.

Nachdem aus dem Reactionsgemisch nach der genannten Methode die Hexonbasen abgeschieden waren, konnte aus dem Reste, bei geeigneter Behandlung noch eine reichliche Menge von Leucin erhalten werden.

Bei der beschriebenen Untersuchung wurden also durch Spaltung des Chlorcaseins mit rauchender Salzsäure folgende Substanzen erhalten: eine Anzahl von gechlorten, stickstofffreien Säuren, gechlorte stickstoffhaltige Huminsäuren, Glutaminsäure, Leucin und Orthophosphorsäure; mit grosser Wahrscheinlichkeit wurden nachgewiesen Asparaginsäure, Arginin, Histidin und Lysin. Tyrosin fehlt vollständig, was auch dem Umstande entspricht, dass das Chlorcasein keine Millon'sche Reaction gibt.

Nach meinen Erfahrungen erscheinen Glutaminsäure, Leucin, Asparaginsäure und Hexonbasen nicht in auffallend geringerer Menge, als man sie bei der Spaltung des Caseins durch rauchende Salzsäure erhält. Abgesehen von den gechlorten stickstofffreien Säuren wurden keine anderen Spaltungsprodukte in berücksichtigungswürdigen Mengen erhalten, als sie das Casein selbst gibt. Die Spaltung des Chlorcaseins durch rauchende Salzsäure scheint also insofern in demselben

Sinne zu erfolgen, wie beim Casein, als im Allgemeinen dieselben Kohlenstoffskette beisammen bleiben.

Die beschriebenen gechlorten stickstofffreien Säuren können demnach nur als Abkömmlinge der als Spaltungsprodukte der Eiweisskörper auftretenden Amidosäuren aufgefasst werden. Der Umstand, dass diese gechlorten Säuren keinen Stickstoff mehr enthalten, ist dahin zu deuten, dass die Amidogruppe dieser Säuren durch Chlor ersetzt wurde.¹⁾

In einer dieser gechlorten Säuren wurde der Chlorgehalt (allerdings nur auf ganze Procente verlässlich) mit 62,8% bestimmt. Um einen Begriff davon zu geben, welchen von den hier in Betracht kommenden Körpern diese Chlormenge entspricht, ist in einer kleinen Tabelle der Chlorgehalt einiger gechlorter Säuren, von denen jedoch bisher noch keiner dargestellt wurde, angeführt. Es würde enthalten:

dem Leucin entsprechend		
eine Pentachlorcapronsäure	$C_6H_7Cl_5O_2$	61,42% Chlor
eine Hexachlorcapronsäure	$C_6H_6Cl_6O_2$	65,91% Chlor
der Asparaginsäure entsprechend		
eine Tetrachlorvaleriansäure	$C_5H_6Cl_4O_2$	59,14% Chlor
eine Pentachlorvaleriansäure	$C_5H_5Cl_5O_2$	64,64% Chlor
dem Tyrosin entsprechend		
eine Hexachlorphenylpropionsäure	$C_9H_4Cl_6O_2$	59,63% Chlor
eine Heptachlorphenylpropionsäure	$C_9H_3Cl_7O_2$	63,42% Chlor.

In Erwägung zu ziehen wäre vielleicht noch, ob die als gechlorte Säuren angesprochenen Substanzen nicht theilweise Säurechloride gechlorter Säuren sind, zumal bei dem Umstande, als der Werth von 62,8% Chlor am besten mit demjenigen übereinstimmt, den ein Pentachlorphenylpropionylchlorid $C_9H_4Cl_6O$ mit 62,43% Chlor verlangt. Die energische Behandlung in verdünnten wässerigen Lösungen jedoch, welche alle diese Körper bei ihrer Darstellung erlitten haben, macht dies sehr unwahrscheinlich, und ich möchte eher die mangel-

¹⁾ Diese Säuren von dem dem Casein immer beigemengten Milchlipid herzuleiten, geht schon deshalb nicht an, weil ihre Menge beträchtlich grösser ist, als dem minimalen Fettgehalte eines sorgfältig gereinigten Caseins entspricht.

hafte Uebereinstimmung des Werthes 62,8% Chlor mit einem der oben angeführten auf die schon begründete Unzuverlässigkeit der Chlorbestimmung beziehen oder unter der analysirten Substanz noch ein Gemenge vermuthen, zumal da dieselbe keinen scharfen Schmelzpunkt zeigt.

Bei diesen Betrachtungen wurde allerdings nicht berücksichtigt, dass ausser der Chlorirung auch Oxydation stattgefunden und dass die Kohlenstoffkette gesprengt sein kann. Wie dem auch sei, so geht doch aus dem Angeführten hervor, dass diese Substanz eine sehr hochgechlorte Säure ist und dass ausser der Amidogruppe auch Wasserstoffatome gegen Chlor ausgetauscht sein müssen.

Von den anderen dargestellten gechlorten Säuren enthalten auch einzelne weniger Chlor, wie schon die qualitative Probe lehrte, so dass die Verschiedenheit der Löslichkeitsverhältnisse und der Eigenschaften, welche diese gechlorten Säuren zeigen, nur zum Theile dem Umstande zuzuschreiben ist, dass ihr Kohlenstoffskelett verschieden ist, zum andern aber auf der Verschiedenheit der Anzahl der in das Molekül eingeführten Chloratome beruht. Ein grosser Theil dieser gechlorten Säuren sind zweifellos Abkömmlinge des Tyrosins, also vielleicht gechlorte Phenylpropionsäuren, und zwar aus dem Grunde, weil unter den Spaltungsprodukten das Tyrosin vollständig vermisst wurde. Ob auch gechlorte Glutarsäuren, gechlorte Capronsäuren oder Valeriansäuren vorhanden sind, ist nach diesen Untersuchungen nicht zu entscheiden.

Zur Stütze der soeben dargelegten Anschauung ist noch der experimentelle Beweis zu erbringen, ob das Tyrosin, bezw. die Phenylpropionsäure überhaupt einer so hohen Chlorirung fähig ist, wie dies angenommen wurde.

Zu diesem Behufe wurden 5 g reines Tyrosin ebenso behandelt, wie dies bei der Chlorirung des Caseins geschehen ist. Das Tyrosin wurde nämlich in 100 cem. 20%iger Salzsäure gelöst und in diese 11 g chlorsaures Kalium unter Umrühren eingetragen. Es entstand zunächst eine schöne kirschrothe Lösung, allein nach kurzer Zeit entfärbte sich die Flüssigkeit unter Erwärmen und entwickelte reichlich Chlor,

wobei sich eine geschmolzene, röthliche Masse abschied. Diese erstarrte beim Erkalten und wurde, nachdem sie mechanisch von der Flüssigkeit getrennt worden war, in verdünnter Salzsäure vertheilt und ebenso behandelt, wie es mit dem verkochten Chlorcasein geschehen ist. Es wurden auch ganz ähnliche gechlorte Produkte erhalten, wie durch Spaltung des Chlorcaseins, namentlich durch Destillation im Dampfstrome und Ausschütteln des Destillates mit Aether eine sehr chlorreiche, in Nadeln krystallisirende Säure.

Für einige der früher geäußerten Ansichten steht noch ein weiteres Beweismaterial zur Verfügung, nämlich die elementare Zusammensetzung des Chlorcaseins.

Auf je 100 Kohlenstoffatome einerseits im Casein, andererseits im Chlorcasein kommen von den übrigen Elementen in Atomen:

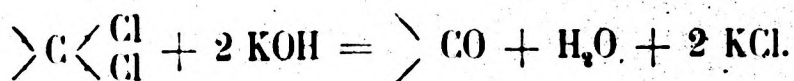
	Casein. ¹⁾	Chlorcasein.
C	100	100
H	158.2	140.5
N	25.3	22.5
S	0.6	0.2
P	0.6	0.7
O	32.1	40.9
Cl	—	6.0

Ohne auf die Differenz im Schwefelgehalte einzugehen, sei nur auf die Zahlen für Wasserstoff und Stickstoff hingewiesen, welche beide kleiner sind als beim Casein, da ja sowohl Wasserstoffatome, als auch Amidogruppen durch Chlor vertreten sind. Ferner scheint auch eine Oxydation stattgefunden zu haben, da der Sauerstoffwerth beim Chlorcasein grösser ist als beim Casein.

Ein scheinbarer Widerspruch wäre noch etwas näher zu beleuchten. Das Chlorcasein gibt nämlich nicht die Molisch'sche Reaction, reducirt aber andererseits Fehling'sche Lösung, jedoch, wie hier ausdrücklich bemerkt werden muss, nicht sofort, sondern erst nach längerem Stehen. Der positive Ausfall der Molisch'schen Probe gilt allgemein als Hinweis darauf, dass in dem betreffenden Körper eine Kohlehydratgruppe vorhanden

¹⁾ Nach den Analysen Hammarstens.

ist. Nun ist es aber auch gar nicht einzusehen, dass ein so leicht oxydirbarer Complex, wie jener der Kohlehydrate, einem so kräftigen Oxydationsmittel wie Chlor in wässriger Lösung, standhalten sollte, insbesondere ist einem solchen Oxydationsmittel gegenüber das Bestehenbleiben einer Aldehyd- oder Ketongruppe undenkbar. Wie hätte man sich nun aber die reducirende Wirkung des Chlorcaseins gegenüber Fehling'scher Lösung vorzustellen? Eine Erklärung dafür wäre folgende. Trifft es sich, dass im Chlorcasein an ein Kohlenstoffatom zwei Chloratome gebunden sind, was sehr wahrscheinlich ist, da ja sehr hoch gechlorte Substanzen daraus abgespalten werden konnten, so kann durch die Wirkung der concentrirten Lauge der Fehling'schen Lösung folgende Reaction zustande kommen:



Derart entsteht eine Aldehyd- bzw. Ketongruppe, welche dann reducirend wirkt.

Kurz zusammengefasst lassen sich also aus der beschriebenen Untersuchung folgende Schlüsse ziehen:

Die Chlorirung des Caseins¹⁾ geschieht in der Weise, dass einzelne Amidogruppen und Wasserstoffatome (vielleicht auch Hydroxylgruppen, wie z. B. im Tyrosin) gegen Chlor ausgetauscht werden. Diesem Umstande ist es zuzuschreiben, dass das Chlor, wie von den meisten Autoren auch hervorgehoben wurde, ziemlich fest gebunden ist und durch verdünnte Alkalien nicht abgespalten wird. Zum Vergleiche sei nur an die Resistenz der gechlorten Essigsäuren erinnert. Namentlich findet die Chlorirung in denjenigen Atomcomplexen statt, welche bei der hydrolytischen Spaltung des Caseins das Tyrosin liefern. Bei entsprechend ausgiebiger Chlorirung werden alle tyrosingebenden Atomcomplexe gechlort. Auffallend ist, dass nur verhältnissmässig wenige Atomgruppen der Chlorirung anheimfallen, während andere vollständig unberührt

1) Es besteht zwar kein Grund, dass die Verhältnisse bei anderen Eiweisskörpern anders liegen, doch soll hier nicht, ohne dass ein Experiment beigebracht wird, generalisirt werden.

bleiben; denn es wurden z. B. reichliche Mengen von Leucin und Glutaminsäure durch Spaltung aus dem Chlorcasein erhalten. Es scheint daher, als ob es der Stellung der einzelnen Atomgruppen in dem complexen Molekül des Eiweisskörpers zuzuschreiben wäre, dass einzelne Gruppen der Chlorirung zugänglich sind, während andere überhaupt nicht angegriffen werden.

Zum Schlusse sei noch auf einige Einwendungen, welche gegen die beschriebene Untersuchung vorgebracht werden könnten, gleich im Vorhinein erwidert.

Es ist nämlich nicht unmöglich, dass das angewendete Chlorcasein keine einheitliche Substanz, sondern ein Gemenge ist. Dafür würde der Umstand sprechen, dass die Chlorirung in einer stark sauren Flüssigkeit erfolgte, welche schon an und für sich spaltend auf Eiweisskörper wirkt. Für den hier verfolgten Zweck erscheint dies aber ziemlich gleichgültig, da es mir zunächst um die Spaltungsprodukte zu thun war. Weiters stand ja die Wahl des zur Untersuchung zu verwendenden Eiweisskörpers frei. Es durften also ebensogut gechlorte Caseosen, wie ein gechlortes Casein gewählt werden. Der Grund, warum gerade diese Methode der Chlorirung gewählt wurde, ist der, dass auf diesem Wege viel Chlor in das Casein eingeführt werden konnte. Immerhin spricht der Umstand, dass übereinstimmende Zahlen für das Aequivalentgewicht des Chlorcaseins erhalten wurden, dafür, dass, wenn schon ein Gemenge vorliegt, dieses aus einander sehr ähnlichen Körpern besteht.

Ein weiterer Einwand wäre der, dass die Untersuchung nicht als abgeschlossen betrachtet werden kann, da keine der als Spaltungsprodukte erhaltenen gechlorten Säuren identificirt wurde. Um jedoch dieses Ziel zu erreichen, müssen erst umfassende Studien über hochgechlorte Fettsäuren und verwandte Körper angestellt werden. Immerhin scheinen für die gezogenen Schlüsse die erhaltenen Resultate zu genügen.
