

# Ueber die Einwirkung von Natriumäthylat auf ein gechlortes Casein.

Von

Dr. Theodor Panzer, Assistent.

(Aus dem Universitätslaboratorium für medizinische Chemie in Wien.)

(Der Redaction zugegangen am 3. Oktober 1901.)

Von dem Gedanken ausgehend, ob es nicht vielleicht möglich sei, das Chlor gechlorter Eiweisskörper durch Behandlung derselben mit Alkalien oder verwandten Körpern gegen die Hydroxylgruppe auszutauschen, wurde unter anderen Versuchen ein gechlortes Casein mit einer Lösung von Natriumäthylat in absolutem Alkohol behandelt. Das erhoffte Ziel wurde zwar nicht erreicht, aber das gechlorte Casein zertiel dabei in eine Anzahl von Spaltungsprodukten, welche interessant genug erschienen, um darüber zu berichten.

Einen jodirten Eiweisskörper haben schon Blum und Vaubel<sup>1)</sup> durch Einwirkung von Aetzalkali gespalten. Sie stellten aus dem Reaktionsgemische vier Fractionen dar und zwar

1. durch Fällung mit Essigsäure eine jodreiche Substanz, welche keine Biuretreaction gab,

2. durch Fällung des Filtrates von 1 mit Alkohol eine jodärmere Substanz, welche die Biuretprobe zeigte,

3. aus der alkoholischen Lösung eine Substanz, welche noch weniger Jod enthielt und die Biuretreaction zeigte, endlich

4. einen schwefelhaltigen, in Aceton löslichen Körper, welcher ebenfalls die Biuretprobe gab.

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

Ferner fanden sie, dass man dieselben Produkte erhalte, wenn man einerseits das Eiweiss zuerst jodirt und dann mit Alkali spaltet, und wenn man andererseits das aus Eiweiss durch Spaltung mit Alkali erhaltene Produkt jodirt.

Zu den Versuchen, welche im Folgenden beschrieben werden sollen, wurde dasselbe gechlorte Casein verwendet, welches schon zu einer bereits publicirten Untersuchung<sup>1)</sup> gedient hat, dessen Eigenschaften also dort beschrieben sind.

300 g dieses Chlorecaseins wurden sehr fein gepulvert und mit einer Lösung von 48 g krystallisirtem Natriumäthylat in 180 cem. absolutem Alkohol übergossen. Die Menge des Natriumäthylats wurde so gewählt, dass je einem Atom Chlor des Chlorecaseins ein Molekül Natriumäthylat entspricht. Das Gemisch wurde unter wiederholtem, kräftigem Umschütteln 24 Stunden lang stehen gelassen, wobei der Alkohol sich lichtbraun färbte, dann mit ungefähr dem doppelten Volumen absoluten Alkohols verdünnt, filtrirt und das Ungelöste mit absolutem Alkohol so lange gewaschen, bis die Waschflüssigkeit farblos ablief. Filtrat und Waschflüssigkeiten wurden zur Trockne abgedampft und hinterliessen einen Rückstand, der mit I bezeichnet werden möge.

Das im Alkohol Unlösliche war eine amorphe Masse, in der kleine, aber schon mit freiem Auge sichtbare cubische Krystalle sich fanden. Eine Anzahl dieser Krystalle konnte ausgelesen und nach ihren Eigenschaften als Chlornatrium erkannt werden. Der ganze in Alkohol unlösliche Antheil wurde mit Wasser erschöpfend ausgezogen; der unlösliche Rückstand (II) wog getrocknet 127 g. Der wässrige Auszug, welcher stark sauer reagierte, schied auf Zusatz von Essigsäure einen reichlichen flockigen Niederschlag (III) ab, der abfiltrirt und mit Wasser erschöpfend gewaschen wurde. Filtrat und Waschwasser gaben auch nach dem Concentriren auf dem Wasserbade mit Essigsäure keinen Niederschlag mehr, wohl aber auf Zusatz von Salzsäure. Nachdem diese Fällung (IV) abfiltrirt und gewaschen worden war, wurde das Filtrat,

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. XXXIII, S. 199.

welches auch nach weiterem Einengen durch Salzsäure nicht mehr getrübt wurde, gelinde erwärmt und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Nach dem Erkalten schied sich der Niederschlag (V) als braune, an der Wand des Gefässes fest haftende Masse ab, welche leicht von der Flüssigkeit (VI) getrennt werden konnte.

Der im Wasser unlösliche Rückstand II, die an Menge weitaus bedeutendste Fraction, gleich, was später ausführlich dargethan werden soll, in seinen Eigenschaften dem Chlorcascin, nur enthielt er weniger Chlor. Der grösste Theil dieses Rückstandes wurde nun abermals der Spaltung mit Natriumäthylat unterworfen, jedoch wurde eine relativ grössere Menge Natriumäthylat, nämlich auf je ein Atomgewicht Chlor zwei Molekulargewichte desselben angewendet.

117 g dieses Rückstandes wurden also mit einer Lösung von 15,6 g Natriumäthylat in 156 g absolutem Alkohol übergossen und diese wieder bei Zimmertemperatur 24 Stunden lang einwirken gelassen. Auch hier wurden in derselben Weise Fractionen isolirt, wie bereits beschrieben worden ist, nämlich ein im Alkohol löslicher Antheil (VII), eine in Wasser und Alkohol unlösliche Substanz (VIII) und eine wässrige Lösung. Aus dieser, welche gleichfalls stark sauer reagierte, wurde ebenso wie früher eine Fällung durch Essigsäure (IX), eine solche durch Salzsäure (X) und durch Phosphorwolframsäure (XI) erhalten. Die vom Phosphorwolframsäureniederschlage abfiltrirte Flüssigkeit sei mit XII bezeichnet.

Der in Wasser und Alkohol unlösliche Antheil (VIII), welcher gut zwei Drittheile der Spaltungsprodukte (71 g) ausmachte, wurde nun, nachdem eine Probe davon zur Prüfung seiner Eigenschaften reservirt worden war, einer energischen Behandlung mit Natriumäthylat unterworfen. Er wurde nämlich in einem Kochkolben mit Rückflusskühler mit einer 10%igen Lösung von Natriumäthylat in absolutem Alkohol übergossen und das Gemenge etwa eine Stunde lang gekocht, dann wurde in kleinen Antheilen 10% ige Natriumäthylatlösung unter beständigem Kochen so lange zugesetzt, bis eine klare Lösung erhalten wurde. Nach dem Erkalten wurde von der geringen

Menge von ausgeschiedenen Kochsalzkrystallen abfiltrirt. Eine kleine Probe des Filtrates, zur Trockne abgedampft und der Rückstand mit Wasser aufgenommen, gab eine alkalisch reagirende Lösung. Es wurde nun zum gesammten Filtrate so lange von einer frisch bereiteten Lösung von Chlorwasserstoff in absolutem Alkohol zugesetzt, bis auf die beschriebene Weise schwach saure Reaction erhalten wurde. Dabei schied sich ein reichlicher, flockiger Niederschlag ab. Als die saure Reaction erreicht war, bewirkte auch der weitere Zusatz eines Tropfens alkoholischer Salzsäure zu der durch Absetzen geklärten Flüssigkeit keinen Niederschlag mehr. Der Niederschlag wurde hierauf durch Filtration von der Flüssigkeit getrennt und mit absolutem Alkohol erschöpfend gewaschen. Filtrat und Waschflüssigkeit, zur Trockne eingedampft, hinterliess nur wenig Rückstand (XIII).

Der Niederschlag löste sich in Wasser bis auf einige unbedeutende braune Flocken vollständig. Nachdem die wässerige Lösung von diesen durch Filtration befreit worden war, wurden aus ihr in derselben Weise, wie bereits beschrieben, vier weitere Fractionen erhalten, nämlich ein durch Versetzen mit Essigsäure entstandener Niederschlag (XIV), eine Fällung durch Salzsäure (XV), eine durch Phosphorwolframsäure (XVI) und die von letzterer abfiltrirte Flüssigkeit (XVII).

So wurde eine allmähliche Spaltung des Chlorcaseins vorgenommen und das Gemenge der Spaltungsprodukte in einzelne Antheile zerlegt. Wenn es auch schon von vorneherein unwahrscheinlich war, dass jeder dieser Antheile ein chemisches Individuum repräsentirte, so hatten doch Vorversuche gezeigt, dass einzelne Fractionen sich von den anderen wesentlich unterschieden. Es schien daher vorläufig genügend, jede Fraction nur von Bestandtheilen anderer Fractionen zu reinigen und dann der weiteren Untersuchung zuzuführen. Eine Ausnahme wurde nur mit dem Abdampfrückstande der alkoholischen Lösung I gemacht, welcher nach oberflächlicher Prüfung wesentlich aus einem einheitlichen Körper zu bestehen schien und deshalb einem etwas complicirteren Reinigungsverfahren unterworfen wurde.

## Untersuchung der in Alkohol löslichen Fractionen I, VII und XIII.

Der Abdampfrückstand der alkoholischen Lösung I übertraf an Menge weitaus die beiden Rückstände VII und XIII, welche nur einige Centigramme wogen, weshalb dessen weitere Untersuchung eingehender vorgenommen werden konnte, als die der beiden anderen. Dieser Rückstand, eine braune, spröde Masse, wurde sehr fein zerrieben und im Extractionsapparate mit Aether erschöpfend extrahirt. Der Abdampfrückstand dieses ätherischen Auszuges, an Menge nur gering, bestand aus chlorhaltigen Substanzen saurer Natur.

Das mit Aether extrahirte Pulver wurde nun in möglichst wenig Alkohol gelöst, die Lösung zum Kochen erhitzt und bei beständigem Sieden so lange kleine Mengen von Wasser zugesetzt, bis die Flüssigkeit anfang zu opalisiren, wozu ungefähr das doppelte Volumen Wasser erforderlich war. Nachdem die Lösung durch Zusatz einiger Tropfen Alkohol wieder geklärt worden war, wurde sie rasch siedend heiss filtrirt und dann im Wasserbade langsam erkalten gelassen. Dabei schied sich fast die gesammte Menge der aufgelösten Substanz als pulvriger Niederschlag wieder aus, während die Lösung ziemlich stark braun gefärbt blieb. Der Niederschlag wurde dem beschriebenen Reinigungsverfahren noch einmal unterworfen, dann auf ein Filter gebracht und anhaltend mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen stellte er ein hellchamoisfarbiges Pulver dar in der Menge von 11 g.

Aus den Filtraten konnten durch Abdampfen derselben noch 3 g eines unreinen Präparates gewonnen werden, welches nur durch Waschen mit Wasser gereinigt worden war. Zu den im Folgenden beschriebenen Versuchen wurde jedoch nur die gereinigte Substanz, deren Löslichkeitsverhältnisse den Anschein der Einheitlichkeit erweckten, verwendet.

Um ganz sicher zu sein, dass keine Amidosäuren beigemischt sind, wurde eine Probe der Substanz nach Zusatz von Kupfercarbonat mit Wasser längere Zeit gekocht. Die abfiltrirte Flüssigkeit war vollkommen farblos.

Dieses Präparat, welches im Folgenden Chlorocaseonsäure genannt werden soll, zeigt unter dem Mikroskope keinerlei Anzeichen einer krystallinischen Structur; es besteht aus kleinen, stark lichtbrechenden Kügelchen. Alle Versuche, die Substanz krystallisirt zu erhalten, misslangen. Beim Erhitzen auf dem Platinbleche verbrennt der Körper vollständig, ohne eine Asche zu hinterlassen. Er enthält neben Kohlenstoff und Wasserstoff Stickstoff und Chlor, ist jedoch frei von Phosphor und Schwefel.

Die Substanz ist unlöslich in Wasser, Aether, Benzol und Chloroform.

In Alkohol löst sie sich leicht auf und wird aus einer solchen Lösung durch Wasser wieder gefällt. Zusätze von Essigsäure, Natriumacetat oder Essigsäure und Ferrocyankalium bewirken in der alkoholischen Lösung keine Ausscheidung.

Ferner gibt die Chlorocaseonsäure mit Eisessig eine klare Lösung, welche beim Verdünnen mit Wasser sich trübt unter Ausscheidung eines Niederschlages.

In verdünnter Natronlauge, sowie in verdünntem Ammoniak löst sie sich leicht auf und liefert, wenn nur wenig von der Base verwendet wurde, sauer reagirende Lösungen. Aus Lösungen von kohlensauren Alkalien treibt die Chlorocaseonsäure Kohlendioxyd aus und geht dabei in Lösung.

Eine mit Hülfe von etwas Lauge bereitete Lösung coagulirt beim Kochen nicht, auch dann nicht, wenn etwas Neutralsalz zugesetzt wird.

Auf Zusatz von Essigsäure oder Schwefelsäure zur sauer reagirenden Lösung der Chlorocaseonsäure entstehen Fällungen, welche im Ueberschusse der genannten Säuren nicht löslich sind, dagegen lösen sich die durch Salzsäure oder Salpetersäure entstandenen Niederschläge im Ueberschusse dieser Säuren auf.

Auch Metallsalze, wie Kupfersulfat, Silbernitrat, Bleiacetat, Wismutnitrat und Eisenchlorid, nicht aber Sublimat, rufen Niederschläge hervor.

Durch Zusatz des gleichen Volumens einer gesättigten Ammonsulfatlösung oder gesättigter Bittersalzlösung wird die Chlorocaseonsäurelösung ausgesalzen.

Ein bemerkenswerthes Verhalten zeigt diese Lösung gegen

Chlornatrium. Wird sie nämlich mit dem gleichen Volumen gesättigter Kochsalzlösung versetzt, so bleibt die Flüssigkeit vollkommen klar. Erhitzt man nun zum Sieden, so entsteht ein reichlicher Niederschlag, der beim Abkühlen der Flüssigkeit nicht wieder in Lösung geht, wohl aber beim Verdünnen derselben mit Wasser.

Wird in die Lösung der Chlorocaseonsäure Kochsalz bis zur Sättigung eingetragen, so entsteht gleichfalls eine Fällung.

Eine schwach saure Lösung der Chlorocaseonsäure wird durch die allgemeinen Alkaloidreagentien: Kaliumquecksilberjodid, Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure und Jodjodkalium, nicht gefällt, wohl aber eine mit Hilfe von überschüssiger Salzsäure bereitete Lösung.

Gerbsäure fällt die mit etwas Lauge bereitete Lösung der Chlorocaseonsäure erst, wenn etwas Neutralsalz zugesetzt wird.

Die Chlorocaseonsäure zeigt die meisten Farbenreactionen der Eiweisskörper nicht, wie die Millon'sche Xanthoprotein-säure- und Liebermann'sche Reaction, ebenso gibt sie mit  $\alpha$ -Naphthol und concentrirter Schwefelsäure keine Färbung und reducirt beim Kochen Fehling'sche Lösung nicht. Die Biuretreaction tritt nicht sofort, sondern erst nach einiger Zeit ein.

Die elementare Zusammensetzung der Chlorocaseonsäure ergibt sich aus den folgenden Resultaten der Elementaranalyse:

#### Kohlenstoff und Wasserstoff:

- I. 0.1809 g Substanz: 0.0935 g  $H_2O$  und 0.3367 g  $CO_2$ .
- II. 0.1802 g Substanz: 0.0925 g  $H_2O$  und 0.3353 g  $CO_2$ .

#### Stickstoff (nach Dumas-Ludwig):

- III. 0.2794 g Substanz: 26.8 ccm. N bei 8.9° C. und 749.0 mm.
- IV. 0.2347 g Substanz: 22.6 ccm. N bei 10.8° C. und 741.5 mm.

#### Chlor (nach Carius):

- V. 0.2127 g Substanz: 0.0660 g AgCl und 0.0084 g Ag.
- VI. 0.1917 g Substanz: 0.0423 g AgCl und 0.0210 g Ag.

	In Procenten:					
	I	II	III	IV	V	VI
C	50,81	50,80	—	—	—	—
H	5,75	5,73	—	—	—	—
N	—	—	11,50	11,35	—	—
Cl	—	—	—	—	8,98	9,06

Das Mittel aus diesen gut übereinstimmenden Analysenresultaten ergibt folgende procentische Zusammensetzung der Chlorocaseonsäure:

50,81% C, 5,74% H, 11,43% N, 9,02% Cl, 23,00% O.

Zur Feststellung des Aequivalentgewichtes dieser Säure wurden die Kupfer- und die Silberverbindung derselben durch Fällung einer sauer reagirenden Lösung der Chlorocaseonsäure mit Kupferacetat einerseits und mit Silbernitrat andererseits dargestellt, durch Waschen mit Wasser gereinigt und auf ihren Metallgehalt untersucht.

0,2508 g der Silberverbindung enthielten 0,0449 g Silber, entsprechend 17,90% Silber.

0,3023 g der Kupferverbindung lieferten 0,0228 g Kupferoxyd, entsprechend 6,02% Kupfer.

Demnach verbinden sich mit

einem Atomgewicht Silber 494,5 Gewichtstheile der Säure,  
einem halben Atomgewicht Kupfer 495,0 Gewichtstheile der Säure.

Die Chlorocaseonsäure zeigt zwar noch die Eigenschaften colloider Körper überhaupt, wie z. B. die Aussalzbarkeit aus ihren Lösungen, aber sie liegt doch schon ziemlich weit ab von dem Casein. Sie gibt eigentlich keine charakteristische Eiweissreaction mehr, und sie enthält weder Schwefel noch Phosphor. Es liegt daher nahe, zu vermuthen, dass ihre Constitution im Vergleiche zu der des Caseins verhältnissmässig einfach sei, weshalb es nicht ganz unpassend zu sein scheint, aus den eben angeführten Zahlen eine Formel zu rechnen.

Da die Chlorocaseonsäure mit Aetzalkalien sauer reagirende Lösungen liefern kann, so muss sie mindestens eine zweibasische Säure sein, weshalb das Molekulargewicht derselben wenigstens das Doppelte des Aequivalentgewichtes betragen muss. Legt man nun der Berechnung den doppelten Werth der für das

Aequivalentgewicht gefundenen Zahlen zugrunde, so ist damit der Chlorgehalt nur schwer in Einklang zu bringen. Am besten stimmt noch die Formel  $C_{42}H_{57}N_8Cl_3O_{14}$ . Nimmt man dagegen den vierfachen Werth des Aequivalentgewichtes als Molekulargewicht an, so ergibt sich die mit den gefundenen Zahlen gut übereinstimmende Formel  $C_{84}H_{113}N_{16}Cl_5O_{29}$ , wie die folgende Zusammenstellung zeigt.

## In Procenten

	berechnet für	berechnet für	gefunden	
	$C_{42}H_{57}N_8Cl_3O_{14}$	$C_{84}H_{113}N_{16}Cl_5O_{29}$		
C	50,20	50,74	50,81	50,80
H	5,69	5,70	5,75	5,73
N	11,19	11,30	11,50	11,35
Cl	10,60	8,92	8,98	9,06
O	22,32	23,34	—	—
Molekulargewicht	1001,37	1983,17	$\left\{ \begin{array}{l} 2 \times 494,5 = 989, \quad 2 \times 495 = 990 \\ 4 \times 494,5 = 1978, \quad 4 \times 495 = 1980 \end{array} \right.$	

Zur Bestätigung einer dieser Formeln könnte am besten eine Molekulargewichtsbestimmung dienen: es wurde auch eine solche nach der kryoskopischen Methode versucht. Hierzu konnte von den bisher aufgefundenen Lösungsmitteln nur der Eisessig dienen, doch zeigte eine solche Lösung keinen scharfen Gefrierpunkt, die Quecksilbersäule stieg vielmehr beständig. Wurde die gefrorene Lösung durch Aufthauen verflüssigt und wieder zum Gefrieren gebracht, so erstarrte sie schon bei einer höheren Temperatur als das erste Mal. Diese Verhältnisse lassen darauf schliessen, dass durch die Einwirkung des Eisessigs die Chlorocaseonsäure zerfällt. Zur Bestätigung dieser Vermuthung wurde die Lösung in Eisessig bei gelinder Wärme zur Trockene verdampft: der Rückstand unterschied sich wesentlich von der ursprünglichen Chlorocaseonsäure, namentlich löste er sich in kaltem Alkohol nur zum Theile auf. Dagegen gab er mit heissem Alkohol eine klare Lösung, welche sich beim Abkühlen unter Abscheidung eines Niederschlages wieder trübte.

Ich musste daher vorläufig darauf verzichten, einen strikten Beweis für die Richtigkeit einer dieser Formeln zu erbringen und kann mich nur darauf beschränken, noch einen

Spaltungsversuch kurz anzuführen, dessen Resultate nicht im Widerspruche mit den berechneten Formeln stehen.

Nach den beiden Formeln beträgt nämlich die Anzahl der Kohlenstoffatome 42, bzw. 84, beides Multipla von 6. Da nun die Glutaminsäure 5 und das Tyrosin 9 Kohlenstoffatome im Moleküle enthält, so kann, wenn eine der beiden Formeln richtig ist, das Molekül der Chlorocaseonsäure das Kohlenstoffskelett dieser beiden Amidosäuren entweder gar nicht enthalten, oder es muss 6 solche Gruppen enthalten: d. h. wenn man die Chlorocaseonsäure mit concentrirter Salzsäure spaltet, darf unter den Spaltungsprodukten Glutaminsäure und Tyrosin gar nicht zu finden sein oder eine der beiden Amidosäuren müsste den weitaus grössten Theil der durch Spaltung erhaltenen Substanzen bilden.

Es wurde nun ein solcher Spaltungsversuch angestellt, doch konnten hierzu nicht mehr als 5 g Chlorocaseonsäure verwendet werden, weshalb die Resultate dieses Versuches mit einiger Reserve hingestellt werden mögen.

Durch Spaltung der Chlorocaseonsäure wurden nämlich erhalten: gechlorte, stickstofffreie Säuren, Leucin und durch Phosphorwolframsäure fällbare Basen; dagegen wurden Tyrosin und Glutaminsäure vermisst. Dass ersteres nicht unter den Spaltungsprodukten zu finden sein wird, war zu erwarten, da ja das Chloreasein auch kein Tyrosin als Spaltungsprodukt liefert, dagegen könnte man das beim Aufsuchen der Glutaminsäure erhaltene negative Resultat allenfalls der geringen Menge des Ausgangsmateriales zuschreiben; dem widerspricht aber die Thatsache, dass eine nicht viel grössere Menge von einer anderen Fraction (XIV), ebenfalls der Spaltung mit concentrirter Salzsäure unterworfen, leicht und in reichlichen Mengen Glutaminsäure lieferte.

Alle diese Verhältnisse sollen noch näher untersucht werden, wenn grössere Mengen der Chlorocaseonsäure dargestellt sein werden; es scheint jedoch aus den beschriebenen Versuchen wenigstens dies hervorzugehen, dass die Chlorocaseonsäure ein ziemlich einfaches, recht gut charakterisiertes Spaltungsprodukt ist, welches seiner Molekulargrösse

nach zwischen Peptonen, bezw. Albumosen einerseits und Amidosäuren andererseits stehen dürfte.

Die Substanz VII wog, nachdem sie fein gepulvert, hierauf mit Aether und dann mit Wasser ausgezogen worden war, nur 0,05 g. Soweit Versuche mit dieser kleinen Menge angestellt werden konnten, zeigte sie ganz dieselben Eigenschaften wie die Chlorocaseonsäure.

Dagegen löste sich Substanz XIII grösstentheils in Wasser auf. Der sehr geringe, in Wasser ungelöst gebliebene Rückstand glich in den wenigen Reactionen, welche damit angestellt werden konnten, der Chlorocaseonsäure. Auch der in Wasser lösliche Antheil wies in seinen Eigenschaften nur geringe Abweichungen auf, doch war seine Menge zu unbedeutend, um darauf weiter einzugehen.

Diese schon in Vorversuchen zu Tage getretenen Complicationen waren übrigens dafür massgebend, dass die Spaltung des Chlorocaseins nicht auf einmal durch Kochen mit überschüssiger Natriumäthylatlösung, sondern schrittweise vorgenommen wurde.

#### **Untersuchung der in Wasser und Alkohol unlöslichen Antheile II und VIII.**

Präparat II wog nach dem Trocknen 127 g, Präparat VIII 76. Diese Substanzen wurden denselben Reactionen unterworfen, welche bei der Untersuchung des Chlorocaseins bereits beschrieben sind. Mit diesem zeigen nämlich die vorliegenden Präparate grosse Aehnlichkeit. Untereinander stimmen beide, was ihre Reactionen betrifft, fast vollständig überein. Da dieselben zweifellos Gemenge sind, so sollen die Reactionen derselben nicht alle wieder aufgeführt werden, nur einige mögen kurz besprochen werden, in denen sie sich entweder vom Chlorocasein oder von der Chlorocaseonsäure wesentlich unterscheiden.

So sind beide Präparate in Eisessig unlöslich; mit Hilfe von verdünnter Natronlauge bereitete, sauer reagirende Lösungen geben mit Essigsäure Niederschläge, welche sich im Ueberschusse dieser Säure lösen.

Gegen Kochsalz zeigen diese Substanzen nicht dasselbe Verhalten, wie die Chlorocaseonsäure. Eine Lösung derselben in verdünnter Natronlauge, nach Zusatz von dem gleichen Volumen gesättigter Chlornatriumlösung zum Sieden erhitzt, trübt sich entweder gar nicht oder nur ganz schwach.

Endlich geben die beiden Präparate die Biuretreaction sofort und intensiv.

Was die elementare Zusammensetzung der beiden Substanzen betrifft, so verzichte ich, sowie auch bei den folgenden Präparaten, auf die detaillirte Mittheilung der Analysenbelege, da es sich ja augenscheinlich um Gemenge handelt, und will nur die Mittelzahlen aus je zwei gut stimmenden Analysen anführen.

Die Präparate II und VIII sind demnach folgendermassen zusammengesetzt:

	In Procenten:	
	II	VIII
C	49,00	47,27
H	6,68	7,50
N	12,87	13,38
Cl	5,56	5,50
P	1,08	1,46

Eine Silberverbindung von II enthielt 7,91% Silber, eine Kupferverbindung 8,05% Kupfer. Demnach hatten sich mit einem Atomgewicht Silber 1254 Gewichtstheile, einem halben Atomgewicht Kupfer 361,9 Gewichtstheile organischer Substanz verbunden, Zahlen, welche untereinander nicht in einem einfachen Verhältnisse stehen.

#### Untersuchung der durch Fällung mit Essigsäure entstandenen Niederschläge III, IX und XIV.

Diese Niederschläge wurden behufs Reinigung in ungefähr 1 Liter Wasser unter Zusatz von möglichst wenig reiner Natronlauge zu einer sauer reagirenden Flüssigkeit gelöst, diese Lösungen filtrirt und durch Essigsäure wieder ausgefällt, zu welchem Zwecke ziemlich beträchtliche Mengen dieser Säure hinzugefügt werden mussten. Dieses Reinigungsverfahren wurde noch zweimal wiederholt, dann die Niederschläge auf Filter gebracht, andauernd mit Wasser gewaschen und endlich

im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet. Merkwürdiger Weise war der Niederschlag III durch dieses Vorgehen nicht frei von organischen Substanzen zu bekommen, er hinterliess beim Verbrennen eine nennenswerthe Menge von Natriumcarbonat.

Das Gewicht der so gereinigten und getrockneten Fällungen betrug bei III 5,5 g, bei IX 6,6 g und bei XIV 22 g. Alle drei waren chamoisfarbige Pulver. In ihren Eigenschaften stimmten sie untereinander nicht ganz überein. Obwohl mit jedem der drei Präparate dieselben Reactionen wie mit der Chlorocaseonsäure angestellt wurden, so will ich im Folgenden nur jene beschreiben, welche diese Präparate mit der Chlorocaseonsäure nicht gemein haben.

In reinem Wasser sind alle drei unlöslich, dagegen lösen sie sich in verdünnter Lösung von essigsaurem Natrium zu sauer reagirenden Flüssigkeiten, III und IX auch in verdünnter Kochsalzlösung. In Eisessig löste sich nur XIV.

Mit Hülfe von etwas verdünnter Natronlauge bereitete sauer reagirende wässrige Lösungen von IX und XIV zeigen das bei der Chlorocaseonsäure beschriebene Verhalten beim Kochen nach Zusatz von concentrirter Kochsalzlösung, Präparat III lässt diese Reaction vermissen.

Solche Lösungen werden zunächst durch Alkohol nicht gefällt, erst auf Zusatz eines Neutralsalzes wie essigsaures Natrium.

Alle drei Präparate geben die Biuretreaction sofort und deutlich.

Ihre elementare Zusammensetzung erhellt aus nachstehender Tabelle, wobei hervorgehoben sein mag, dass Präparat XIV zum Unterschiede von den beiden anderen frei von Phosphor ist.

In Procenten:

	III	IX	XIV
C	45,91	48,00	51,15
H	6,84	6,73	7,28
N	12,24	12,12	13,64
Cl	3,75	3,54	2,35
P	1,69	1,57	—
Na	2,35	—	—

Von Präparat XIV wurde auch eine Kupferverbindung mit einem Kupfergehalte von 6,66% und eine Silberverbindung mit einem Silbergehalte von 18,37% Silber dargestellt. Es hatten sich also mit

einem Atomgewicht Silber 479,5 Gewichtstheile,

einem halben Atomgewicht Kupfer 452,1 Gewichtstheile organischer Substanz verbunden.

Aus der nur annähernden Uebereinstimmung der beiden zuletzt angeführten Zahlen, sowie aus verschiedenen anderen Beobachtungen habe ich die Ansicht gewonnen, dass auch diese Präparate Gemenge sind. Bei den im vorigen Abschnitte beschriebenen Substanzen dürften auch Bestandtheile dieser Fraction geblieben sein. Doch schien mir eine schärfere Trennung vorläufig nicht der Mühe werth, es genügte mir, nachzuweisen, dass im Spaltungsgemische noch andere, der Chlorocaseonsäure ähnliche, aber doch von ihr verschiedene Körper vorhanden sind. Die Verschiedenheit geht auch aus einem Spaltungsversuche hervor, welcher mit dem bei der beschriebenen Untersuchung nicht verbrauchten Reste von XIV angestellt wurde.

10 g dieses Präparates wurden nämlich mit rauchender Salzsäure gekocht und dabei als Spaltungsprodukte erhalten: chlorhaltige, stickstofffreie Säuren, reichlich Glutaminsäure (0,6 g) und Leucin, Orthophosphorsäure und durch Phosphorwolframsäure fällbare Basen. Auch hier wurde das Tyrosin vermisst.

#### **Untersuchung der durch Fällung mit Salzsäure entstandenen Niederschläge IV, X und XV.**

Die Reinigung dieser Niederschläge wurde in ganz analoger Weise besorgt, wie es bei den im vorhergehenden Abschnitte vorgeführten Substanzen beschrieben ist. Das Gewicht der gereinigten und getrockneten Präparate betrug bei IV 5,4 g, bei X 1,9 g, bei XV 2,1 g. Die Farbe dieser Substanzen war dunkler als bei den bisherigen Präparaten. Ihre Eigenschaften stimmen mit denen der durch Essigsäurefällung erhaltenen Niederschläge im Allgemeinen überein. Erwähnt mag werden, dass nur Präparat IV die bereits geschilderte merkwürdige Reaction gegen concentrirte Kochsalzlösung zeigte.

Auffallend war jedoch, dass die Lösungen aller drei Präparate in verdünnter Natronlauge durch Zusatz von Essigsäure gefällt wurden. Dieses mit dem Darstellungsverfahren im Widerspruche stehende Verhalten klärte sich aber auf, als sich ergab, dass die durch Essigsäure entstandenen Niederschläge sich wieder lösten, wenn essigsäures Natrium in die Flüssigkeit eingetragen wurde, was bei den im vorigen Abschnitte beschriebenen Präparaten nicht der Fall war.

Die Elementaranalysen führten zu folgenden Mittelzahlen.

In Procenten:

	IV	X	XI
C	50.28	47.91	51.48
H	8.81	6.50	6.84
N	11.91	11.68	14.17
Cl	4.01	4.40	3.40
P	0.51	1.20	—

Die Kupferverbindung von XV enthielt 6,84% Kupfer, sodass einem halben Atomgewichte Kupfer 432 g organischer Substanz entsprechen.

#### **Untersuchung der durch Phosphorwolframsäure entstandenen Niederschläge V, XI und XVI.**

Diese Niederschläge wurden in Wasser aufgeschwemmt, erwärmt und mit heissgesättigtem Barytwasser bis zur deutlich alkalischen Reaction versetzt. Nach dem Absitzen der Niederschläge wurde filtrirt und die Niederschläge mit Wasser gewaschen. Filtrate und Waschwässer wurden zur Entfernung der Hauptmenge des Baryums mit Kohlendioxyd gesättigt und nach dem Aufkochen filtrirt. Beim Einengen auf dem Wasserbade schieden die so erhaltenen Flüssigkeiten noch etwas Baryumcarbonat aus, von welchem abfiltrirt wurde. Die Filtrate enthielten nun noch nennenswerthe Mengen von Baryum; sie wurden zunächst mit Salzsäure angesäuert, wodurch Niederschläge entstanden, welche bei weiterer Prüfung sich als identisch mit dem im vorigen Abschnitte vorgeführten Substanzen erwiesen. Die Filtrate nach diesen Niederschlägen wurden nun durch verdünnte Schwefelsäure von dem gelösten Baryum befreit und, nachdem die Flüssigkeiten durch Filtration

geklärt worden waren, nach Zusatz von essigsaurem Natrium mit Alkohol gefällt. Dieser Zusatz war deshalb nothwendig, weil Alkohol allein keinen Niederschlag hervorrief. Die Fällungen setzten sich besser ab, wenn noch etwas Aether hinzugefügt wurde. Die Niederschläge wurden sodann auf Filtern gesammelt und mit Alkohol ausgewaschen.

An Menge kam nur der aus V gewonnene Niederschlag in Betracht, welcher nach dem Trocknen 1,5 g wog, während die beiden anderen nur gering waren. Der aus XI erhaltene bestand vollständig aus anorganischer Substanz (Natriumsulfat), der aus XVI dargestellte zum Theile. Die wässrige Lösung desselben zeigte, soweit eine Prüfung möglich war, dieselben Reactionen wie V.

Präparat V selbst war im Gegensatze zu den beiden anderen vollkommen frei von Asche, auch frei von Chlor, Schwefel und Phosphor. Es löste sich leicht in Wasser, verdünnten Säuren, verdünnten Laugen und verdünnten Salzlösungen, dagegen nicht in Alkohol. Die wässrige Lösung reagirt neutral und trübt sich auf Zusatz von Säuren nicht. Sie gibt dagegen Niederschläge mit Metallsalzen, wie Kupfersulfat und Silbernitrat, sie wird auch gefällt durch ein gleiches Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung oder, wenn Kochsalz bis zur Sättigung eingetragen wird. Durch Essigsäure und Ferrocyankalium entsteht kein Niederschlag. Die Biuretreaction ist sehr deutlich, die anderen Farbenreactionen fielen negativ aus.

Diese Substanz unterscheidet sich demnach insofern wesentlich von den bisher vorgeführten, als sie kein Chlor mehr enthält und nicht wie diese die hervorstechenden Eigenschaften einer Säure besitzt. Sie zeigt vielmehr grosse Aehnlichkeit mit den Verdauungsalbumosen.

Die Elementaranalyse führte zu folgenden Zahlen.

#### Kohlenstoff und Wasserstoff:

Substanz 0.1671 g: 0.0935 g H<sub>2</sub>O und 0.2578 g CO<sub>2</sub>.

#### Stickstoff:

Substanz 0.1692 g: 17.2 ccm. N bei 19.6° C. und 748.0 mm., entsprechend 42.12% C, 6.23% H und 11.72% N.

Die von den eben beschriebenen Niederschlägen abfiltrirten alkoholischen Flüssigkeiten enthielten ausser essigsauerm Natrium nur geringe Mengen von organischen Substanzen, welche die Biuretreaction zeigten.

#### **Untersuchung der Filtrate VI, XII und XVII.**

Die Filtrate von den durch Phosphorwolframsäure entstandenen Niederschlägen wurden durch Aetzbaryt von der Phosphorwolframsäure und durch Schwefelsäure vom Baryum befreit. Sie gaben keine Biuretreaction mehr und enthielten überhaupt nur geringfügige Mengen organischer Substanz. In VI konnten nach Entfernung der freien Salzsäure mit einiger Wahrscheinlichkeit Amidosäuren nachgewiesen werden, doch schien eine Reindarstellung derselben bei der grossen Menge anorganischer Salze kaum durchführbar zu sein.

Durch Spaltung mit Natriumäthylat in alkoholischer Lösung zerfällt demnach das Chlorecasein, indem ein Theil des Chlors herausgenommen wird, in eine Anzahl einfacherer Körper. Ein Theil derselben, der bei weitem kleinere, ist chlorfrei und besteht aus Substanzen, welche den Verdauungsalbumosen an die Seite zu stellen sind, vielleicht auch aus geringen Mengen von Amidosäuren. Der andere Theil wird von chlorhaltigen Substanzen mit den ausgesprochenen Eigenschaften von Säuren gebildet. Diese Säuren unterscheiden sich wesentlich von den Eiweisskörpern und von den durch Fermentwirkung aus diesen entstandenen Spaltungsprodukten. Sie scheinen in ihrer Constitution schon ziemlich einfach zu sein, liefern aber bei weiterer Spaltung noch Amidosäuren.