

# Über das Verhalten des Caseins gegen Ozon.

Von

C. Harries und K. Langheld.

(Aus dem Chemischen Institut der Universität Kiel)

(Der Redaktion zugegangen am 19. März 1907.)

Die Resultate, auf denen sich unsere heutige Kenntnis der Eiweißchemie aufbaut, beruhen im wesentlichen auf den Ergebnissen der Säure- und -Alkalisplaltung, den Beobachtungen am lebenden Organismus und der Verfolgung der durch Fermente oder Bakterien eingeleiteten Spaltprozesse. In allen Fällen handelt es sich um die nähere Untersuchung eines weitgehenden hydrolytischen Teilungsvorganges des Eiweißmoleküls. Diese gemeinsame Grundlage im Verein mit der chemischen Gleichartigkeit der entstehenden Trennstücke bedingt die Schwierigkeiten, die der stufenweisen Verfolgung des Abbaus bei den bis jetzt verwandten Verfahren im Wege stehen. Bis vor wenigen Jahren war unser Wissen selbst über die äußersten Spaltstücke des Eiweißes, die Aminosäuren, noch recht lückenhaft. Emil Fischer<sup>1)</sup> war einer der ersten, der den großen experimentellen Hindernissen mit Erfolg zu begegnen wußte. Das von ihm ausgearbeitete Verfahren der Trennung der Aminosäuren durch fraktionierte Destillation ihrer Ester<sup>2)</sup> ermöglichte zunächst eine genauere Erforschung der Bausteine des Proteidmoleküls. Die so gewonnenen Resultate haben im Verein mit den Ergebnissen der Kosselschen Methode<sup>3)</sup> zur Bestimmung der Diaminosäuren unsere Kenntnis über den Aufbau der verschiedenen Eiweißarten ganz bedeutend gefördert. Um zu Trennungsver-

<sup>1)</sup> Vgl. Emil Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIX, S. 530 (1906).

<sup>2)</sup> loc. cit.

<sup>3)</sup> Vgl. A. Kossel, Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 165 (1900).

fahren für die höheren Spaltstücke der Proteide zu gelangen, hat Emil Fischer<sup>1)</sup> alsdann die synthetische Verkettung der bei der Spaltung aufgefundenen Aminosäuren in Angriff genommen. Diese Arbeiten haben zu Substanzen geführt, die den natürlichen Peptonen in ihrem Verhalten äußerst ähnlich sind und von ihrem Entdecker als Polypeptide bezeichnet werden. Schließlich ist es ihm und Abderhalden gelungen, auf Grund so gesammelter Erfahrung das Vorkommen von Dipeptiden unter den hydrolytischen Spaltstücken des Seidenfibroins<sup>2)</sup> und des Elastins<sup>3)</sup> zu entdecken und so den direkten Nachweis für das Vorhandensein von Polypeptidkomplexen im Proteidmolekül zu erbringen. Lassen diese für die Zukunft noch viel versprechenden Versuche auch erkennen, daß man unter Benutzung der bislang meist geübten Spaltungsmethoden schließlich zu Resultaten gelangen kann, so muß doch die Auffindung von neuen Wegen erwünscht sein, in denen das Eiweiß an anderen Stellen als bisher angegriffen wird und so vielleicht leichter von einander trennbare Spaltkörper erhalten werden könnten. Aus diesen Überlegungen heraus wurden die Versuche von Gorup-Besanez<sup>4)</sup> über die Einwirkung von Ozon auf Eiweiß wieder aufgenommen, nachdem dieses Oxydationsverfahren durch den einen von uns und seine Schüler<sup>5)</sup> jetzt allmählich zu einer brauchbaren Methode ausgearbeitet worden ist.

Vor nunmehr Jahresfrist ist kurz mitgeteilt worden, daß sich das Casein<sup>6)</sup> in alkalischer Lösung durch Ozon oxydieren läßt. Ein Oxydationsprodukt wurde durch essigsäures Phenyl-

<sup>1)</sup> loc. cit.

<sup>2)</sup> Vgl. Emil Fischer und Emil Abderhalden, Ber. der Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIX, S. 752 (1906).

<sup>3)</sup> Vgl. Emil Fischer und Emil Abderhalden, Ber. der Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXXIX, S. 2315 (1906). — Vgl. auch P. A. Levene und W. A. Beatty, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXXIX, S. 2060 (1906).

<sup>4)</sup> Vgl. v. Gorup-Besanez, Liebigs Ann. d. Chem., Bd. CX, S. 96.

<sup>5)</sup> Vgl. C. Harries, Liebigs Ann. d. Chem., Bd. CCCXLIII, S. 311 (1905).

<sup>6)</sup> Vgl. C. Harries, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVIII, S. 2990 (1905).

hydrazin als osazonartiges Produkt isoliert. Bei der weiteren Untersuchung stellte sich aber heraus, daß dieser Körper weder ein einheitliches Individuum ist, noch wahrscheinlich zu dem Casein in einfachen Beziehungen steht. Daher wurden die Methoden zur Isolierung der Spaltstücke unter folgenden Gesichtspunkten verändert.

Man hätte denken können, daß das Proteid an einigen Stellen seines Moleküls aliphatische Doppelbindungen enthielte, daß an diesen die Oxydation einsetze, und so verschiedenartige Trennstücke erzeuge. Allerdings war vorauszusehen, daß die Molekulargröße der letzteren noch sehr hoch und die Untersuchung wegen der Schwierigkeit der Reinigung solcher Produkte sehr erschwert, wenn nicht unmöglich gemacht werden würde. Trotzdem wurde durch kombinierte Fällung mit Phosphorwolframsäure und Bleiacetat der Versuch gemacht, solcher Spaltstücke habhaft zu werden. Die oxydierte Caseinlösung wurde zunächst mit Phosphorwolframsäure gefällt und sowohl der aus dem Niederschlag regenerierte Teil 1 wie die Mutterlauge 2 mit Bleiacetat versetzt. Es zeigte sich dabei, daß Teil 1 mit Bleiacetat teilweise, die durch Phosphorwolframsäure nicht mehr fällbaren Spaltprodukte 2 auch nicht mehr durch Bleiacetat niedergeschlagen werden. Die Menge der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Körper ist gering. Die aus den drei so erhaltenen Fraktionen wieder gewonnenen Substanzen — aus dem Bleiniederschlag 1, aus der Mutterlauge hiervon 2, aus der Mutterlauge von der Phosphorwolframsäurefällung 3 — waren nur im Vakuum fest, aber äußerst hygroskopisch und zum Teil (2 und 3) auch mit anorganischen Salzen durchsetzt. Sie luden nicht zu einer weiteren Untersuchung ein. Dagegen konnten wir aus dem bei direkter Fällung einer ozonisierten Caseinlösung mit Bleiacetat erhaltenen Niederschlage durch Zerlegung mit Schwefelwasserstoff ein weißes festes, aber amorphes peptonartiges Produkt gewinnen, dessen nähere Untersuchung zeigte, daß wir es auch hier wahrscheinlich noch nicht mit einem einheitlichen Körper zu tun hatten.

Diese Versuche waren in bezug auf den Endzweck, zu dem sie unternommen waren, ergebnislos, ließen aber mit einiger

Sicherheit erkennen, daß die Spaltung durch Ozon stets in demselben Sinne vor sich geht. Sie waren, wie schon oben angedeutet ist, von Anfang an nicht sehr aussichtsvoll und konnten es um so weniger sein, als in dem Casein ein äußerst kompliziertes Proteid vorliegt. Man wird uns fragen, warum wir gerade zuerst das Casein herangezogen haben, dessen Einheitlichkeit nicht einmal feststeht. Wir haben das Casein zunächst deshalb verwendet, weil es einmal in ständig gleichbleibender Beschaffenheit leicht zu erhalten ist und weil es uns in der Hauptsache nur darauf ankam, die Wirkungsweise des Ozons an sich auf die Proteide festzustellen.

Aus unseren Versuchsergebnissen scheint nun mit Sicherheit hervorzugehen, daß das Casein an mehreren, aber bestimmten Punkten durch das Ozon angegriffen wird. Eine Ozonidbildung findet nicht statt. Vielleicht erfolgt eine direkte Spaltung des Moleküls, wie es der eine von uns und Thieme<sup>1)</sup> in ähnlicher Weise bei der Ozonisation des ölsauren Natriums in wässriger Lösung beobachteten. Die Spaltung scheint jedenfalls an anderen Stellen wie bei den bisher angewandten Methoden vor sich zu gehen. Dieser Umstand, sowie derjenige, daß die Polypeptide gegen Ozon wahrscheinlich beständig sind, könnten zunächst den Schluß zulassen, daß im Proteidmolekül die einzelnen Atomkomplexe nicht nur nach Art der Polypeptide mit einander verkettet sind, sondern daß noch andere Bindungssysteme wie z. B. Kohlenstoff- oder Kohlenstoffstickstoffdoppelbindungen vorhanden sind, an denen die Wirkung des Ozons ansetzt. Nachweislich werden bei der Spaltung auch Substanzen mit Keto- und Aldehydgruppen gebildet. Diese können aber sowohl dadurch entstehen, daß die Doppelbindung in dem geschilderten Sinne gesprengt wird, als auch dadurch, daß die Phenylkerne der aromatischen Aminosäureradikale zerstört werden, ohne daß dabei die polypeptidartige Verkettung verändert wird. Auf letzteren Punkt kommen wir nachher zurück. Vielleicht läßt sich einmal auf diesem Vorhandensein von reaktionsfähigen Carbo-

<sup>1)</sup> Vgl. C. Harries und C. Thieme. Liebigs Ann. d. Chem., Bd. CCCXLIII, S. 354 (1905).

nylen eine Methode zur Isolierung größerer Trennstücke begründen. Die Aufspaltung des Eiweißes durch Ozon gibt auch eine einfache Erklärung für die von E. Buchner<sup>1)</sup> u. a. beobachtete Aufhebung der Gärfähigkeit von Hefe durch Ozon. Es findet dabei eine Zerstörung der dem Eiweiß ähnlich gebildeten Zymase statt.

Als wir festgestellt hatten, daß die aus den Blei- und Phosphorwolframsäureniederschlägen regenerierten Oxydationsprodukte des Caseins nach den zur Zeit bekannten Reinigungsmethoden nicht zu einheitlichen Produkten führten, untersuchten wir dieselben weiter nach folgenden Gesichtspunkten. Setzen wir den Fall, das Casein bestünde aus einem Komplex  $R_I - R_{II} = R_{III}$  und es würde durch die Oxydation in die drei Teile  $R_I O$ ;  $R_{II} O_2$ ;  $R_{III} O$  zerlegt, von denen sich  $R_{II} O_2$  durch Phosphorwolframsäure und Bleiacetat,  $R_I O$  durch Phosphorwolframsäure und nicht durch Bleiacetat und schließlich  $R_{III} O$  durch keines von beiden Fällungsmitteln niederschlagen ließen, so könnte man vermuten, daß diese Reste  $R_I O$ ,  $R_{II} O_2$  und  $R_{III} O$  unter sich Differenzen zeigen müßten. Verschiedene Aminosäuren könnten an ihrem Aufbau beteiligt sein. Diese Frage war nun experimentell nicht so schwer zu entscheiden und hätte sie zu positiven Resultaten geführt, so wäre damit vielleicht ein nicht unwesentlicher Schritt zur Aufhellung der Struktur des Proteins getan worden.

Man brauchte nur die aus den verschiedenen Niederschlägen regenerierten Spaltstücke mit Salzsäure zu hydrolysieren, die entstehenden Aminosäuren nach der Emil Fischerschen Methode<sup>2)</sup> zu esterifizieren und die Ester zu fraktionieren. Hierbei hat sich herausgestellt, daß sich nach dieser Methode beim Casein keine bestimmten Gruppierungen nachweisen lassen, außer daß die durch Phosphorwolframsäure und Bleiacetat nicht fällbaren Spaltprodukte  $R_{III} O$  kein oder jedenfalls nur wenig Leucin enthalten. Bei der Spaltung erhält man immer ähnliche Gemenge der verschiedenen Aminosäuren, die in bekannter

<sup>1)</sup> Privatmitteilung.

<sup>2)</sup> Vgl. loc. cit.

Weise getrennt und identifiziert wurden. Hierbei ist die Abwesenheit von Phenylalanin hervorzuheben. Auch Tyrosin konnte nach den gebräuchlichen Methoden nicht nachgewiesen werden. Die ozonisierte Lösung gibt weder die für das Tyrosin typische Millonsche noch die Tryptophanreaktion. Dies rührt davon her, daß der aromatische Kern in Verbindung mit einer basischen Gruppe durch Ozon zerstört wird,<sup>1)</sup> wobei reduzierende Verbindungen entstehen, die mit Phenylhydrazin reagieren. Die so entstehenden Keto- und Aldehydkörper dürften sich mit in dem Phenylhydrazon befinden, das der eine von uns in der ersten Mitteilung beschrieben. Wie wir schon hervorhoben, könnte sich die Aufspaltung des Eiweißmoleküls auch ohne die Annahme anderer als der Polypeptidbindungen allein durch die Zerstörung der aromatischen Ringe erklären lassen. Dieser Einwand dürfte nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen sein. Wenn nämlich die Aufspaltung der Benzolkerne an sich eine Teilung des polypeptidartig gebundenen Moleküls nicht bedingen, sondern nur eine Umwandlung der ursprünglich aromatischen Aminosäureradikale in aliphatische zur Folge haben sollte, so wäre damit doch die sehr wesentliche Veränderung der Eigenschaften des Casein nach der Oxydation hinreichend erklärt.

Bei der näheren Untersuchung der aus den Estern wieder in Freiheit gesetzten Aminosäuren sind an verschiedenen Stellen Substanzen beobachtet worden, die mit den sonst auf diese Weise erhaltenen Aminosäuren nicht identisch zu sein scheinen, aber vorläufig wegen der nur geringen vorhandenen Mengen nicht genauer untersucht werden konnten.

## Experimenteller Teil.

### Ozonisation von Casein.

Je 200 g Casein puriss. nach Hammarsten dargestellt wurden unter Zusatz von 475 ccm N-Natronlauge in 3 $\frac{1}{2}$  l Wasser gelöst. Die trübe Lösung färbte sich beim Einleiten des Ozons unter starker Nebelbildung zunächst dunkelbraun, um nach

<sup>1)</sup> Vgl. C. Harries und V. Weiss, Liebigs Ann. d. Chemie. Bd. CCCXLIII, S. 369 (1905), und siehe folgende Abhandlung.

30stündiger Einwirkung des ozonisierten Sauerstoffs bei gleichzeitigem Aufhören der Dämpfe wieder wasserklar zu werden. Nach ca. 10stündiger Oxydation war die alkalische Reaktion aufgehoben. Die Lösung rötete alsdann blaues Lackmuspapier. Gleichzeitig hiermit setzte ein starkes Schäumen der Flüssigkeit ein, das bis zum Schluß der Oxydation anhielt. Die Ozonisation wurde als beendet angesehen, wenn auf Zusatz von Salzsäure zu einer Probe der ozonisierten Lösung kein Niederschlag entstand. Die Einleitungsdauer betrug für 200 g ca. 110 Stunden und während dieser Zeit wurden ungefähr 5000 l Sauerstoff mit einem Ozongehalt von etwa 12% durchgeleitet. Bei der Verarbeitung kleinerer Mengen ist die Ausnutzung des Ozons eine weit schlechtere. 40 g Casein in entsprechender Weise gelöst beanspruchen fast die gleiche Oxydationszeit wie 200 g. Der Sauerstoffverbrauch beträgt dabei ca. 1500 l.

## I. Die ozonisierte Lösung.

### A. Allgemeines Verhalten.

Die ozonisierten Lösungen rochen zuckerartig, reduzierten ammoniakalische Silbernitrat-, aber nicht Fehlingsche Lösung. Das Reduktionsvermögen stieg, wenn man die oxydierten Lösungen mit Salzsäure versetzte und einige Zeit sich selbst überließ. Sie zeigten eine schwache Reaktion auf Salpetersäure. Die Probe auf Wasserstoffperoxyd fiel stets negativ aus. Die Flüssigkeiten reagierten stark sauer und röteten blaues Lackmuspapier. Freie Oxalsäure war in keinem Falle nachweisbar, ebensowenig freie Phosphorsäure. Von Eiweißfarbreaktionen war nur die Biuretprobe positiv. Die Xanthoprotein-, Millonsche und Adamkiewicz-Hopkinsche Reaktion versagten. Die diese Farbreaktionen verursachenden Atomkomplexe des Phenylalanins, Tyrosins und Tryptophans müssen demnach durch Ozon zerstört werden. Durch Sättigen mit Ammonsulfat konnten bis zu  $\frac{6}{10}$  des Gewichts des angewandten Caseins aus der ozonisierten Lösung ausgesalzen werden. Die üblichen Fällungsmittel für Eiweißstoffe gaben sämtlich unter geeigneten Bedingungen Niederschläge. Auch Barythydrat- und Magnesium-

sulfatlösung<sup>1)</sup> unter Beigabe von Ammoniak brachten verhältnismäßig geringe Mengen von schwer filtrierbaren Baryum- oder Magnesiumsalzen zur Abscheidung. Wurde eine 25 g Casein entsprechende Flüssigkeitsmenge im Vakuum eingedunstet, so blieb ein weißer, glasig spröder Körper im Gewicht von 29,5 g (nach Abzug des vorhandenen Natriums) zurück.

### B. Prüfung auf mit Wasserdampf flüchtige oder alkohollösliche Spaltstücke.

Zur Prüfung auf etwa gebildete flüchtige aliphatische Säuren wurde die ozonisierte Lösung von 25 g Casein unter Zusatz von Schwefelsäure bei starker Kühlung der Vorlage im Vakuum eingedunstet. Das absolut geruchlose Destillat zeigte gegen Lackmus schwachsaure Reaktion, die schon nach Zugabe einiger Tropfen n-Natronlauge in alkalisch umschlug. Der beim Eindampfen hinterbleibende Rückstand enthielt keine Spur von organischer Substanz. Er bestand nach den Reaktionen aus Natriumnitrat. Zur Untersuchung auf alkohollösliche Spaltprodukte wurden 25 g Casein entsprechende Flüssigkeitsmengen

1. nach genauer Neutralisation der zugesetzten Natronlauge durch Salzsäure,

2. nach Zusatz überschüssiger Salzsäure

unter vermindertem Druck zur Trockene gedampft und die zurückbleibenden glasigen, gelblich gefärbten Körper mit absolutem Alkohol ausgekocht. Beim Eindunsten des Alkohols blieben in beiden Fällen nur geringe Reste, die wieder in Alkohol unlöslich waren.

### C. Verhalten gegen Phenylhydrazin.

Setzte man zu der ozonisierten Lösung essigsaures Phenylhydrazin, so trübte sie sich und nach eintägigem Stehen hatte sich ein brauner amorpher Körper ausgeschieden, der in allen bekannten Lösungsmitteln außer Eisessig, der ihn aber zersetzte, unlöslich war. Derselbe wurde von Alkalien aufgenommen und war durch Säuren wieder fällbar. Mit Ausnahme seiner langsamen Bildung zeigte er ähnliche Eigenschaften wie die in

<sup>1)</sup> Vgl. folgende Abhandlung.

der folgenden Arbeit beschriebenen, aus dem Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan erhaltenen Phenylhydrazinderivate. Zu seiner Darstellung wurde schließlich folgender Weg eingeschlagen. Die ozonisierte Lösung wurde nach Zusatz des gleichen Volumen Wassers mit  $\frac{1}{10}$  n-Natronlauge unter Benutzung von Phenophtalein als Indikator genau neutralisiert. Es wurden dann  $\frac{3}{4}$  der Gewichtsmenge des angewandten Caseins an salzsaurem Phenylhydrazin und die fünffache Menge Natriumacetat hinzugefügt. Nach anderthalbstündigem Erwärmen der Mischung auf dem Wasserbade wurde die rotbraun gefärbte Lösung abgekühlt, von geringen Ausscheidungen durch Filtration getrennt und das Phenylhydrazinderivat durch Zugabe überschüssiger n-Salzsäure abgeschieden. Die so gewonnene Substanz war ein hellgelber amorpher Körper, der zwischen 180 und 200° schmolz. Er reduzierte Fehlingsche Lösung in der Wärme und zeigte die schon erwähnten Löslichkeitsverhältnisse. Ob der Körper noch die Biuretreaktion gab, konnte wegen der braunen Farbe der Lösung nicht einwandfrei festgestellt werden. Die Ausbeute betrug 33% des angewandten Caseins. Die Verbrennungen gaben vor allen in den Stickstoffwerten große Differenzen. Es wurden folgende Resultate erhalten:

C	H	N
54,03%	6,70%	15,82%
54,47%	6,55%	12,10%
53,58%	6,62%	13,48%
53,07%	6,73%	8,34%
53,10%	7,27%	14,38%

Phosphor war in den auf die oben bezeichnete Weise dargestellten Produkten entgegen der früheren Mitteilung nur in Spuren vorhanden, ebenso Schwefel.

## II. Allgemeine Untersuchung der aus der ozonisierten Caseinlösung durch Fällung erhaltenen Fraktionen.

### A. Fraktionierung durch direkte Fällung mit Bleiacetat.

Wurde zu der ozonisierten Caseinlösung eine konzentrierte Bleiacetatsolution gegeben, so entstand ein reichlicher Niederschlag. Dieser Bleikörper wurde durch Schwefelwasserstoff zer-

legt. Da bei der Zersetzung durch einfaches Einleiten des Schwefelwasserstoffs auch bei mehrfacher Wiederholung der Operation stets größere Mengen der Eiweißsubstanz im Niederschlage zurückblieben, wurde schließlich die Zerstörung der Substanz unter Rühren und Einleiten des  $H_2S$  unter Druck vorgenommen. Hierbei fand ein in geeigneter Weise modifizierter Apparat, wie ihn Emil Fischer in seiner Anleitung zur Ausführung organischer Präparate (Präparat 22) beschreibt, Anwendung. Als Sperrflüssigkeit wurde Quecksilber benutzt. Wurde die Bleifällung von 200 g angewandtem Casein in dieser Weise 6 Stunden lang der Einwirkung des Schwefelwasserstoffs ausgesetzt, der Niederschlag mehrfach mit heißem Wasser ausgezogen und abgepreßt, so enthielt er nur noch Spuren von organischer Substanz. Das Filtrat vom Bleisulfid hinterließ beim Eindampfen unter vermindertem Druck einen schönen weißen, glasig spröden Körper, der in allen bekannten Lösungsmitteln, außer Wasser, unlöslich war. Er zeigte undeutlich die Biuretreaktion, reduzierte ammoniakalische Silbernitratlösung in der Wärme, aber nicht Fehlingsche Lösung. Phosphorwolframsäure in schwefelsaurer Lösung und die anderen Eiweißfällungsmittel ergaben Niederschläge. Die Substanz schäumte beim Erwärmen im Schmelzpunktröhrchen zwischen  $116$  und  $120^\circ$  auf, ohne sich zu färben. Die Ausbeute betrug  $39-40\%$  des angewandten Caseins. Das Produkt resp. das Gemenge der dasselbe ausmachenden Körper zeigte, auch wenn es in verschiedenen Operationen und aus verschiedenen Caseinen dargestellt war, große Konstanz der Eigenschaften. Es brauchte beispielsweise je 1 g zur Neutralisation  $51,29$  ccm,  $49,11$  ccm,  $50,86$  ccm,  $52,11$  ccm,  $52,18$  ccm  $1/10$  n-Natronlauge. Auch die Drehung des polarisierten Lichtes durch verschiedene Proben gab annähernd übereinstimmende Werte.

1,8236 g Substanz in 30 ccm  $H_2O$  gelöst drehten im 2 dm-Rohr  $6,70^\circ$  nach links

$$(\alpha)_{18} = 58,4^\circ.$$

1,8214 g Substanz gelöst in 30 ccm  $H_2O$  drehten im 2 dm-Rohr  $6,53^\circ$  nach links

$$(\alpha)_{20} = 56,97^\circ.$$

Zwei Verbrennungen von Körpern verschiedener Darstellung gaben folgende Resultate:

- |               |           |
|---------------|-----------|
| 1. C = 39,69% | H = 5,99% |
| 2. C = 38,82% | H = 5,63% |

Zur Prüfung der Einheitlichkeit wurde der Körper in der 15fachen Menge Wasser gelöst und die fünffache Quantität Alkohol hinzugefügt. Es fiel alsdann eine Substanz aus, die in ihrem Verhalten wesentlich von dem Ausgangskörper abwich. Je 1 g derselben erforderte zur Neutralisation 18,84 cem, resp. 20,70 cem  $\frac{1}{10}$  n-Natronlauge.

1,7350 g Substanz in 30 cem  $H_2O$  gelöst drehten im  $\frac{1}{2}$  dm-Rohr  $1,53^\circ$  nach links

$$(\alpha)_{21} = 55,97^\circ.$$

0,8601 g Substanz in 15 cem  $H_2O$  gelöst drehten im  $\frac{1}{2}$  dm-Rohr  $1,43^\circ$  nach links

$$(\alpha)_{21} = 52,76^\circ.$$

Von Körpern verschiedener Darstellung wurden folgende Verbrennungsergebnisse erhalten:

	C	H	N
1.	44,01%	7,02%	12,81%
2.	44,44%	6,33%	12,29%
3.	44,97%	6,69%	—
4.	—	—	12,65%
5.	44,98%	7,64%	12,37%

Diese so erhaltene neue Substanz zeigte bis  $300^\circ$  erhitzt keine Veränderung. Wiederholte Fällungen aus Wasser durch Alkohol oder Aceton ließen erkennen, daß auch hier wie häufig in der Eiweißchemie, trotz der ziemlich übereinstimmenden Analysen, noch kein einheitliches Produkt vorlag. Die angeführten Beobachtungen vermitteln zwar keine wichtigen chemischen Aufschlüsse, sind aber insofern von Interesse, als sie den ständig gleichen Verlauf der Spaltung dartun.

Das Filtrat vom Bleiniederschlag wurde vom überschüssigen Bleiacetat durch Einleiten von Schwefelwasserstoff befreit. Der Niederschlag wurde zweimal mit Wasser ausgekocht und abgepreßt. Beim Eindunsten des zunächst wasserklaren, später braun gefärbten Filtrats im Vakuum hinterblieb ein dunkler

amorpher hygroskopischer Körper, der Fehlingsche Lösung nicht, wohl aber ammoniakalisches Silbernitrat in der Wärme reduzierte. Er gab alle Reaktionen der ozonisierten Caseinlösung. Sein Gewicht betrug 40—50% des angewandten Caseins, wenn das vorhandene Natrium als Natriumacetat in Rechnung gestellt wurde.

Das unter I C beschriebene Phenylhydrazinderivat konnte nur aus dem durch Blei fällbaren Teil erhalten werden. Beide Fraktionen gaben aber nach Ansäuern mit Schwefelsäure Fällungen mit Phosphorwolframsäure. Stark eingeeengte Lösungen der zwei Teile wurden zur Krystallisation drei Wochen in den Eisschrank gestellt, ohne daß sich Spuren von krystallinischen Substanzen abgeschieden hätten. Tyrosin oder Leucin scheinen demnach im freien Zustande nicht vorhanden zu sein.

#### **B. Kombinierte Fällung mit Phosphorwolframsäure und Bleiacetat.**

Wurde die ozonisierte Caseinlösung mit soviel Schwefelsäure versetzt, daß der Säuregehalt 5% betrug und eine konzentrierte Auflösung von Phosphorwolframsäure hinzugefügt, so fiel ein weißer Körper aus, der im exsikkatortrockenen Zustande das gleiche Gewicht wie das angewandte Casein aufwies. Ein Überschuß an Phosphorwolframsäure war peinlichst zu vermeiden, da er lösend wirkte. Die Zerlegung der Fällung wurde zunächst in der bekannten Weise durch Schütteln mit überschüssigem Baryt versucht. Hierbei schied sich das Baryumphosphorwolframat in einer solchen Form aus, daß auch nach längerem Stehen eine Filtration selbst mittels einer Pukalschen Zelle unmöglich war. Diese unangenehme Eigenschaft des Niederschlages dürfte von den schon unter I A erwähnten, sich bei Zusatz einer Barythydratlösung zu der ozonisierten Caseinlösung bildenden Baryumsalzen, die gleichfalls außerordentlich schwer filtrierbar sind, herrühren. Am besten gelang noch die Trennung, wenn man den Niederschlag in möglichst wenig Ammoniak löste, mit einer warm gesättigten Barythydratlösung versetzte und nach einigem Stehen so lange Essigsäure hinzufügte, bis der Niederschlag anfang sich zusammenzuballen. Das Filtrat vom Baryumphosphorwolframat, das nach Entfernung

des überschüssigen Baryts durch Schwefelsäure alle Reaktionen der ozonisierten Caseinlösung einschließlich des Phenylhydrazinderivates gab, war frei von anorganischer Substanz. Der abfiltrierte Niederschlag enthielt aber auch nach mehrfachem Auskochen mit Wasser noch große Mengen von Spaltprodukten. Diese Lösung wie das von Schwefel- und Phosphorwolframsäure durch Baryt befreite Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung wurden mit Bleiacetat behandelt. Die Substanzen der ersten Flüssigkeit wurden fast gänzlich niedergeschlagen, während in der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Fraktion auch Bleiacetat keine Ausscheidung bewirkte. Diese letztere gab nach dem Entbleien noch die Biuretprobe, reduzierte aber nicht mehr und bildete auch kein Phenylhydrazinderivat. Ein 20 g Casein entsprechender Teil dieser Lösung wurde zur Prüfung auf etwa vorhandene freie Aminosäuren auf 50 ccm eingeeengt und nach den Angaben von Emil Fischer und Peter Bergell<sup>1)</sup> unter Zusatz von Natronlauge mit einer ätherischen Lösung von 10 g  $\beta$ -Naphthalinsulfosäurechlorid 6 Stunden lang geschüttelt. Beim Ansäuern trat nur eine geringe Trübung auf, eine Abscheidung von schwer löslichen Derivaten der Aminosäuren oder niedrigeren Peptiden fand aber nicht statt. Solche Körper scheinen also bei der Ozonisation nicht gebildet zu werden.

Die beim Eindampfen der drei Fraktionslösungen verbleibenden Körper waren im Vakuum fest, aber äußerst hygroskopisch. Sie wurden ihrer unangenehmen Eigenschaften wegen nicht weiter untersucht.

### III. Untersuchung der einzelnen Fraktionen nach dem Esterverfahren.

#### A. Direkte Fällung mit Bleiacetat.

a) Regenerierung des Spaltungsproduktes aus dem Bleiniederschlage und seine Zerlegung durch Salzsäure.

Der durch Fällen einer 200 g Casein enthaltenden ozonisierten Lösung gewonnene Bleikörper im Gewicht von 80 g

<sup>1)</sup> Vgl. Emil Fischer und Peter Bergell, Ber. d. Deutschen chem. Ges., Bd. XXXV, S. 3779 (1902).

wurde durch 8 stündiges Kochen mit einem Liter konzentrierter Salzsäure aufgespalten. Die Flüssigkeit färbte sich während des Kochens braun, ohne aber feste Stoffe abzuscheiden. Sie enthielt geringe Mengen von Oxalsäure. Die Reaktionsmasse wurde unter vermindertem Druck unter starker Kühlung der Vorlage eingedunstet. Zur Untersuchung auf etwa entstandene mit Wasserdampf flüchtige Körper wurde ein Teil des Destillats durch Schütteln mit Silberoxyd von der Salzsäure befreit. Nach der Filtration zeigte die so behandelte Flüssigkeit kein Reduktionsvermögen und gab unter Zusatz von Natronlauge im Vakuum eingedampft einen Rückstand, der keine organischen Substanzen enthielt. Auch das abfiltrierte Gemisch von Silberchlorid und Silberoxyd enthielt keine organischen Körper. Demnach entstanden auch bei der Spaltung des Bleikörpers keine flüchtigen Stoffe. Das Gemisch der salzsauren Spaltprodukte wurde mit wenig Wasser aufgenommen, mit Salzsäure gesättigt und mit einem Krystall von salzsaurer Glutaminsäure geimpft. Nach zweitägigem Stehen im Eisschrank hatten sich 2 g von salzsaurer Glutaminsäure ausgeschieden. Der Trockenrückstand der Lösung wurde nach den Angaben von Emil Fischer<sup>1)</sup> durch Übergießen mit 800 ccm absolutem Alkohol und Sättigen mit Salzsäure verestert. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde der Prozeß nach jedesmaligem vorhergehenden Eindampfen im Vakuum dreimal wiederholt. Der abdestillierte Alkohol, der nicht esterartig roch, wurde trotzdem zur Untersuchung auf etwa vorhandene nicht basische leicht flüchtige Ester bei 20° unter stark vermindertem Druck eingedunstet. Es hinterließ kein Rückstand. Das Gemenge der salzsauren Ester wurde in 500 ccm absolutem Alkohol gelöst, wobei nur das gebildete Ammoniumchlorid zurückblieb. Es war frei von organischen Beimischungen und wog 5 g. Die Ester wurden nach dem Verfahren von Curtius durch Eintragen von Silberoxyd in die alkoholische Lösung unter starker Kühlung in Freiheit gesetzt. Die die freien Ester enthaltende Flüssigkeit wurde von dem Silberchlorid filtriert, der Niederschlag zweimal mit warmem

<sup>1)</sup> Vgl. Emil Fischer, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 151 (1905).

absolutem Alkohol ausgezogen und die vereinigten Lösungen im Vakuum unter starker Kühlung der Vorlage eingedampft. Das Destillat wurde unter Zusatz von Salzsäure zur Gewinnung der mitgerissenen Ester abermals eingedunstet. Der geringe Rückstand (0,8 g) gab in wenig Alkohol gelöst nach Sättigung mit Salzsäure und Impfung mit einem Krystall von salzsaurem Glykokollester keine Ausscheidung des genannten Körpers. Nach Entfernung der Salzsäure durch Silberoxyd wurde der freie Ester zu den übrigen gegeben. Das Gemisch der Ester wurde alsdann mit viel Äther aufgenommen. Der beim Verdampfen des Äthers verbleibende Rest im Gewicht von 45,3 g wurde nach den Angaben von Emil Fischer<sup>1)</sup> weiter verarbeitet. Bei der fraktionierten Destillation wurden folgende Teile erhalten:

1. Bei 15 mm Druck bis	60° <sup>2)</sup>	=	2,2 g
2. „ 15 „ „ „	100°	=	2,2
3. „ 0,2 „ „ „	105°	=	11,5
4. „ 0,1 „ „ „	185°	=	10,3
5. Rückstand		=	19,1
			45,3 g

Die erste Fraktion wurde auf Glykokoll nach der schon oben erwähnten Methode erfolglos untersucht. 2 und 3 wurden alsbald nach der Destillation durch fünfstündiges Kochen mit Wasser verseift. Es wurden durch allmähliches Eindunsten der so gewonnenen Aminosäurelösung auf dem Wasserbade folgende Krystallfraktionen erhalten:

1. 0,5 g	Fast nur Leucin.	Gef. Fraktion 1: C = 54,81%; H = 10,65%
2. 0,6 „		Subst.: 0,1223 g; CO <sub>2</sub> : 0,2458 g; H <sub>2</sub> O: 0,1173 g
3. 0,4 „	Berechnet für C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub> N:	Gef. Fraktion 3: C = 54,23%; H = 10,26%
4. 0,5 „		Subst.: 0,1202 g; CO <sub>2</sub> : 0,2390 g; H <sub>2</sub> O: 0,1110 g
5. 0,4 „	C = 54,96%; H = 9,92%	Gef. Fraktion 5: C = 53,16%; H = 10,02%
		Subst.: 0,1216 g; CO <sub>2</sub> : 0,2370 g; H <sub>2</sub> O: 0,1097 g
6. 0,4 g	F. n. Amino- valeriansäure. Berechnet	
7. 0,3 g	für C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> N: C = 51,28%; H = 9,40%	Gef. Fraktion 7: C = 48,33%; H = 9,39%
		Subst.: 0,1220 g; CO <sub>2</sub> : 0,2162 g; H <sub>2</sub> O: 0,1032 g

<sup>1)</sup> Vgl. Emil Fischer, loc. cit.

<sup>2)</sup> Hier wie in allen folgenden Fällen beziehen sich die Temperaturangaben auf die Temperatur des Bades und nicht der Dämpfe.

8. 0,6 g } Alanin und Gef. Fraktion 8: C = 41,13<sup>o</sup>/<sub>o</sub>; H = 8,49<sup>o</sup>/<sub>o</sub>  
 } unbek.Säuren. Subst.: 0,1256 g; CO<sub>2</sub>: 0,1894 g; H<sub>2</sub>O: 0,0942 g
9. 1,0 g } Ber. f. C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N:  
 } C = 40,45<sup>o</sup>/<sub>o</sub>; H = 7,87<sup>o</sup>/<sub>o</sub>
10. 2,8 g in Alkohol löslich.  
 7,5 g

Die Fraktionen von 6 ab wurden stets erst nach dem Auskochen mit Alkohol zur Wägung gebracht. 9 wurde durch Versetzen der restierenden Masse mit dem gleichen Volumen Alkohol erhalten. Die oben angeführten Verbrennungsergebnisse sind durch direkte Analysierung der einzelnen Fraktionen gewonnen. Sie zeigen, daß bis 5 einschließlich fast reines Leucin vorlag. Durch gemeinsames Umkrystallisieren der fünf ersten Teile wurde 1 g Leucin erhalten, das bei der Verbrennung folgende Resultate lieferte:

Substanz: 0,1215 g; CO<sub>2</sub>: 0,2461 g; H<sub>2</sub>O: 0,1120 g  
 Berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N: C = 54,96<sup>o</sup>/<sub>o</sub>; H = 9,92<sup>o</sup>/<sub>o</sub>  
 Gefunden: C = 55,24<sup>o</sup>/<sub>o</sub>; H = 10,24<sup>o</sup>/<sub>o</sub>

Aus der Mutterlauge und den Fraktionen 6 und 7 wurde 0,4 g Aminoisovaleriansäure gewonnen:

Substanz: 0,1230 g; CO<sub>2</sub>: 0,2297 g; H<sub>2</sub>O: 0,1076 g  
 » : 0,1334 g; N: 14,1 ccm bei 773 mm und 20<sup>o</sup>  
 Berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub>N: C = 51,28<sup>o</sup>/<sub>o</sub>; H = 9,40<sup>o</sup>/<sub>o</sub>; N = 11,95<sup>o</sup>/<sub>o</sub>  
 Gefunden: C = 50,93<sup>o</sup>/<sub>o</sub>; H = 9,71<sup>o</sup>/<sub>o</sub>; N = 12,26<sup>o</sup>/<sub>o</sub>

Aus den beiden letzten Fraktionen konnte kein einheitlicher Körper isoliert werden. Sie bestanden aus mindestens zwei, wenn nicht drei verschiedenen Substanzen, von denen eine wahrscheinlich Alanin ist. Löste man das Produkt in möglichst wenig heißem Wasser, so schied sich beim Abkühlen zunächst ein in Wasser schwerer löslicher Körper ab, der Aminoisovaleriansäure sein dürfte. Auf Zusatz des halben Volumens Alkohol krystallisierte bei längerem Stehen im Eisschrank eine Substanz in kleinen harten kugelförmigen Krystallgefügen aus, die sich bei 216<sup>o</sup> unter starkem Aufblähen, aber ohne die Farbe zu ändern, zersetzte. Wurde jetzt der Alkoholgehalt der Lösung weiter erhöht, so fiel ein leichter weißer Körper aus, der in der Hauptsache Alanin sein dürfte, aber noch beträchtliche Mengen des vorerwähnten Produkts enthielt, wie die Unter-

suchung im Schmelzpunktröhrchen zeigte. Auch nach nochmaligem Umkrystallisieren ließ der Stickstoffgehalt erkennen, daß noch nicht reines Alanin vorlag.

Substanz: 0,1509 g; N: 14,6 ccm bei 748 mm und 16°

Berechnet für  $C_3H_7O_2N$ : 15,73%

Gefunden: 11,10%

Die geringe Menge des vorhandenen Produktes gestattete keine genauere Untersuchung.

Die in Alkohol lösliche zehnte Fraktion von sirupöser Konsistenz war auch nach verschiedentlichem Umlösen aus Alkohol nicht zum Krystallisieren zu bringen. Sie wurde deshalb zur Isolierung des etwa vorhandenen Prolins durch Kochen mit überschüssigem Kupferoxyd in das Kupfersalz verwandelt und dieses darauf durch Auskochen mit Alkohol in einen löslichen und einen unlöslichen Teil getrennt. Beim Eindampfen der wässerigen Kupfersalzlösungen konnte ein Geruch nach Pyrolidin nicht beobachtet werden. Aus dem unlöslichen Kupfersalz wurden 0,65 g Aminosäuren wieder erhalten, von denen 0,1 g in absolutem Alkohol löslich waren. Beim Verdunsten der alkoholischen Lösung hinterblieb ein wasserklarer Sirup, der nach längerem Stehen zu einem weißen Krystallmagma erstarrte, das wieder in Alkohol unlöslich war. Inaktives Prolin kann demnach nur in Spuren vorhanden sein. Das in Alkohol lösliche Kupfersalz ergab 0,95 g Aminosäuren, von denen 0,1 g von Alkohol nicht aufgenommen wurde. Der beim Verdampfen des Alkohols zurückbleibende Sirup konnte weder durch Füllen mit Äther aus seiner alkoholischen Lösung, noch durch langsames Eindunsten derselben im Vakuum zum Krystallisieren gebracht werden. Er wurde daher nochmals in das Kupfersalz verwandelt. Die regenerierten Säuren waren wieder völlig in Alkohol löslich, gaben aber auch jetzt keine krystallinischen Ausscheidungen. Nach abermaliger Reinigung über das Kupfersalz wurde der durch langsames Eindampfen der alkoholischen Lösung im Vakuumexsikkator erhaltene Sirup bei vermindertem Druck und niedriger Temperatur drei Wochen sich selbst überlassen. Nach dieser Zeit hatten sich kleine Krystallmengen abgeschieden, die auf Ton von dem anhaftenden Sirup befreit, in Alkohol unlös-

lich waren. Es wurde alsdann versucht, aus dem Sirup nach den Angaben von Emil Fischer<sup>1)</sup> das für das Prolin typische Phenylhydantoin zu gewinnen. Der Erfolg war negativ. Auch aktives Prolin konnte demnach nicht isoliert werden. Wir möchten indessen ausdrücklich hervorheben, daß es uns nicht zugänglich erscheint, aus diesem negativen Befunde, der sich später bei allen untersuchten Fraktionen wiederholt, auf die völlige Abwesenheit des Prolins unter den bei der kombinierten Aufspaltung von Eiweiß durch Ozon und Säuren auftretenden Spaltprodukten schließen zu wollen, denn bei den kleinen Mengen des bis jetzt gleichzeitig verarbeiteten Caseins und der dadurch bedingten geringen Quantitäten von Estern könnte das Prolin übersehen worden sein. Wir wollen deshalb aus der Abwesenheit des Prolins keine vorzeitigen Schlüsse ziehen.

Die vierte Esterfraktion schied beim Stehen einen in feinen Nadeln krystallisierenden Körper ab. Sein Gewicht betrug nur 0.25 g. so daß eine genauere Untersuchung ausgeschlossen war. Die Substanz enthielt Stickstoff, schmolz unscharf bei 110° und war in Alkohol, Äther und Wasser sehr leicht löslich, in Petroläther unlöslich. Die abfiltrierte Estermenge wurde mit der fünffachen Menge Wasser versetzt, von dem sie klar aufgenommen wurde, und die Lösung mit dem gleichen Volumen Äther zur Isolierung etwa vorhandenen Phenylalaninesters durchgeschüttelt. Nach mehrmaligem Waschen des Äthers mit Wasser wurde er im Vakuum verdunstet. Es hinterblieb 1 g Ester. Dieser wurde zur Verseifung mit Salzsäure behandelt und die Lösung auf dem Wasserbade eingedunstet. Es hinterblieb ein brauner Sirup, der nicht krystallisierte. Er wurde mit Wasser aufgenommen und die Salzsäure durch Silberoxyd entfernt. Eine Probe der so erhaltenen stark eingeeengten Lösung gab mit Schwefelsäure und überschüssigem Kaliumbichromat erhitzt nicht den charakteristischen Geruch nach Phenylacetaldehyd. Das Phenylalanin wird also in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der folgenden Abhandlung, da es auch in der durch Blei nicht fällbaren Fraktion unauffindbar ist, durch Ozon zerstört.

Der Rest der Ester der vierten Fraktion wurde durch

<sup>1)</sup> Vgl. Emil Fischer. Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 168 (1901).

anderthalbstündiges Erhitzen mit warm gesättigter Barythydratlösung verseift. Nach zweitägigem Stehen hatte sich eine kleine Menge von asparaginsaurem Baryum abgeschieden, das durch die äquivalente Menge Schwefelsäure zerlegt wurde. An freier Säure konnten nur 0,06 g erhalten werden. Aus der abfiltrierten Lösung wurde der Baryt durch Schwefelsäure entfernt und dieselbe auf ein kleines Volumen eingedampft. Nach Sättigung mit Salzsäure schied sich daraus 2,2 g salzsaure Glutaminsäure ab. Aus einem Teil des Salzes wurde durch Schütteln der wässrigen Lösung mit Silberoxyd die Säure frei gemacht. Die Verbrennung derselben gab folgende Resultate:

Substanz: 0,1210 g; CO<sub>2</sub>: 0,1807 g; H<sub>2</sub>O: 0,0638 g  
 Berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub>N: C = 40,81%; H = 6,12%  
 Gefunden: C = 40,73%; H = 5,85%

Die salzsaure Mutterlauge wurde durch Silberoxyd von Salzsäure befreit und zum Sirup eingedampft. Dieser krystallisierte beim Stehen im Eisschrank. Sein Gewicht betrug 1,2 g. Er war in Alkohol völlig unlöslich und wurde von konzentrierter Salzsäure leicht aufgenommen. Um etwa darin noch enthaltene Asparaginsäure zu gewinnen, wurde er in das Kupfersalz verwandelt. Aus der eingeengten Kupfersalzlösung krystallisierte kein schwer lösliches Salz aus. Der regenerierte Körper zersetzte sich beim Erhitzen bei 162°. Er wurde zur Reinigung aus seiner wässrigen Lösung durch Alkohol gefällt. Er schied sich daraus in amorpher Form aus und gab bei der Verbrennung folgende Resultate:

Substanz: 0,1222 g; CO<sub>2</sub>: 0,1761 g; H<sub>2</sub>O: 0,0743 g  
 N: 0,1260 g; N: 11,5 ccm bei 768 mm und 22°  
 C = 39,30%; H = 6,75%; N = 10,45%

Die Analyse gibt über die Natur der Substanz keine Aufschlüsse.

b) Regenerierung der nicht durch Bleiacetat fällbaren Spaltprodukte und ihre Zerlegung durch Kochen mit Salzsäure.

Die nach dem schon beschriebenen Verfahren aus 200 g Casein erhaltene, nicht durch Bleiacetat fällbare Fraktion im Gewicht von 77 g (Gewicht des Gesamtrückstandes 116 g, ab 39 g Natriumacetat, entsprechend 11 g Natrium) wurde in einem

Liter konzentrierter Salzsäure gelöst und von dem sich ausscheidenden Kochsalz abfiltriert. Die salzsaure Lösung roch etwas nach Chlor. Die weitere Verarbeitung erfolgte analog der des Bleikörpers. Das Gewicht des gewonnenen Salmiaks, der nur durch wenig Kochsalz verunreinigt war, betrug 12,7 g. Es wurden 1,6 g salzsaure Glutaminsäure erhalten. Flüchtige, nicht basische Substanzen und Glykokoll konnten nicht nachgewiesen werden. Es konnte aber die Anwesenheit von wenig Oxalsäure festgestellt werden. Die fraktionierte Destillation ergab bei einer Gesamtmenge von in Äther löslichen Estern von 40,9 g folgende Teile:

1. Bei 15 mm Druck bis 60°	= 1,9 g
2. „ 15 „ „ 100°	= 3,8 „
3. „ 0,2 „ „ 105°	= 12,9 „
4. „ 0,08 „ „ 175°	= 9,5 „
5. Rückstand	= 12,8 „
	40,9 g

Die erste Fraktion enthielt kein Glykokoll. Die Fraktionen 2 und 3 wurden durch vierstündiges Kochen mit Wasser verseift. Aus der Aminosäurelösung wurden Krystallfraktionen in folgenden Gewichten erhalten:

1. 0,4 g	Fast reines Leucin. Berechnet für $C_6H_{13}O_2N$ : C = 54,96% H = 9,92%	Gef. Fraktion 1: C = 54,56%; H = 10,63%
2. 0,6 g		Subst.: 0,1134 g; CO <sub>2</sub> : 0,2268 g; H <sub>2</sub> O: 0,1085 g
3. 0,6 g		Gef. Fraktion 3: C = 53,78%; H = 9,85%
		Subst.: 0,1202 g; CO <sub>2</sub> : 0,2371 g; H <sub>2</sub> O: 0,1066 g
4. 0,5 g	F. r. Amino- valeriansäure. Berechnet für $C_5H_{11}O_2N$ : C = 51,28% H = 9,40% N = 11,95%	Gef. Fraktion 4: C = 52,53%; H = 10,09%
5. 0,3 g		Subst.: 0,1219 g; CO <sub>2</sub> : 0,2348 g; H <sub>2</sub> O: 0,1100 g
6. 0,4 g		Gef. Fr. 5: C = 50,79%; H = 9,94%; N = 12,19%
		Subst.: 0,1228 g; CO <sub>2</sub> : 0,2287 g; H <sub>2</sub> O: 0,1099 g
		Subst.: 0,1168 g; N: 12,3 ccm bei 754 mm u. 16°
7. 0,7 g	Alanin und unbekannte Säuren.	Gef. Fr. 8: C = 38,88%; H = 7,00%; N = 11,39%
8. 1,0 g		Subst.: 0,1209 g; CO <sub>2</sub> : 0,1719 g; H <sub>2</sub> O: 0,0763 g
		Subst.: 0,1316 g; N: 13,4 ccm bei 762 mm u. 25°
9. 4,1 g	in Alkohol löslich.	
	8,6 g	

Die ersten drei Fraktionen waren nach den Verbrennungen fast reines Leucin, während 4 und 5 in der Hauptsache Aminovaleriansäure enthielten. 6, 7 und 8 wurden gemeinschaftlich analog den schon in A a gemachten Angaben in äußerst wenig Wasser gelöst und nach Abscheidung des in Wasser schwerer löslichen Teils durch Fällung mit Alkohol fraktioniert. Es wurden dabei dieselben Beobachtungen wie in A a gemacht. Die erste Fraktion enthielt noch viel Aminovaleriansäure, wie die Verbrennung anzeigte.

Substanz: 0,1199 g; CO<sub>2</sub>: 0,2007 g; H<sub>2</sub>O: 0,0933 g  
: 0,1389 g; N: 15,2 ccm bei 745 mm und 23°

Berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub>N: C = 51,28%; H = 9,40%; N = 11,95%  
Gefunden: C = 45,65%; H = 8,64%; N = 12,09%

Die Untersuchung der 10. in Alkohol löslichen Fraktion auf Prolin über die Kupfersalze ergab noch 1 g in Alkohol unlöslicher Aminosäuren. Der aus dem in Alkohol unlöslichen Kupfersalze gewonnene in Alkohol lösliche Teil der Säuren im Gewicht von 0,08 g wurde, da er den für Prolin angegebenen Zersetzungspunkt von 207° zeigte verbrannt. Die Resultate waren

Substanz: 0,0778 g; CO<sub>2</sub>: 0,1327%; H<sub>2</sub>O: 0,0560 g

Berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>N: C = 52,18%; H = 7,83%

Gefunden: C = 46,52%; H = 7,99%

Ein Phenylhydantoin konnte aus dem Sirup, der das aktive Prolin hätte enthalten müssen, nicht gewonnen werden.

Die vierte Esterfraktion, die keinen krystallisierten Körper ausschied, wurde ohne Ergebnis auf Phenylalanin geprüft. Der in Äther lösliche Teil zeigte gegen Salzsäure das gleiche Verhalten wie die entsprechende Gruppe in A a. Es konnten 0,08 g Asparaginsäure aus dem Baryumsalz isoliert werden. Ferner wurden 3,1 g salzsaure Glutaminsäure erhalten.

Substanz: 0,2031 g; AgCl: 0,1598 g

Berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>NCl: Cl = 19,12%

Gefunden: Cl = 19,23%

Der schließlich verbleibende kristallinische Rückstand von 1,2 g gab kein schwer lösliches Kupfersalz, war in Alkohol absolut unlöslich und wurde von konzentrierter Salzsäure leicht aufgenommen. Nach der Fällung aus Wasser durch Alkohol ergab die Verbrennung

Substanz: 0,1215 g; CO<sub>2</sub>: 0,1710 g; H<sub>2</sub>O: 0,0748 g  
 „ : 0,1342 g; N: 10 ccm bei 762 mm und 23°  
 C = 38,38%; H = 6,84%; N = 8,42%.

## B. Untersuchung der durch kombinierte Fällung mit Phosphorwolframsäure und Bleiacetat erhaltenen Fraktionen.

### a) Spaltung der durch Phosphorwolframsäure und durch Bleiacetat fällbaren Fraktion durch Salzsäure.

Die aus 300 g Casein gewonnene durch Phosphorwolframsäure und Bleiacetat fällbare Fraktion von 70 g wurde nach ihrer Regenerierung wie in A a durch Kochen mit Salzsäure zerlegt und dann verestert. Flüchtige nicht basische Stoffe wurden nicht gefunden. Oxalsäure war in Spuren vorhanden. Die Isolierung der Ester wurde nach dem Verfahren von Emil Fischer<sup>1)</sup> durch Zugabe von Natronlauge und Kaliumcarbonatlösung zu der mit Äther überschichteten wässrigen Solution der salzsauren Ester bewirkt. Bei der Destillation unter vermindertem Druck wurden folgende Fraktionen erhalten:

1. Bei 14 mm Druck bis 60°	= 4,4 g
2. „ 14 „ „ 100°	= 1,5
3. „ 0,18 „ „ 105°	= 11,3
4. „ 0,18 „ „ 190°	= 8,0
5. Rückstand	= 8,5
	33,7 g

Die erste Fraktion enthielt keinen Glykokollester. Sie wurde mit zwei verseift und krystallisiert und hierbei ergaben sich folgende Teile:

1. 0,12 g	Fast reine Amino- valeriansäure. Ber. für C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> N: C = 51,28% H = 9,40%	Gef. Fraktion 1: C = 48,76%
		H = 9,74%
		Substanz: 0,1221 g
		CO <sub>2</sub> : 0,2183
		H <sub>2</sub> O: 0,1035
2. 0,3 g	Fast reines Alanin. Berechnet für C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> N: C = 40,45% H = 7,87%	Gef. Fraktion 2: C = 40,48%
		H = 8,09%
		Substanz: 0,1210 g
		CO <sub>2</sub> : 0,1796
		H <sub>2</sub> O: 0,0891
3. 0,08 g	nicht krystallinisch.	

<sup>1)</sup> Vergl. Emil Fischer, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 151 (1901).

Das Produkt 2 verändert sich beim Erhitzen im Schmelzpunktröhrchen bis  $255^{\circ}$  nicht. Es dürfte daher hier reines Alanin vorliegen.

Die dritte Esterfraktion wurde wie folgt zerlegt:

1. 0,42 g	} Fast nur Leucin. Berechnet für $C_6H_{13}O_2N$ : C = 54,96% H = 9,92%	Gef. Fraktion 1: C = 53,99%
2. 0,30 "		H = 10,33%
3. 0,30 "		Substanz: 0,1248 g CO <sub>2</sub> : 0,2471 H <sub>2</sub> O: 0,1125
4. 0,30 g	} Fast nur Amino- valeriansäure. Ber. für $C_5H_{11}O_2N$ : C = 51,28% H = 9,40%	Gef. Fraktion 4: C = 51,95%
5. 0,20 g		H = 9,74%
		Substanz: 0,1242 g CO <sub>2</sub> : 0,2366 H <sub>2</sub> O: 0,1089
6. 0,80 g	} Alanin und andere Säuren. Ber. für $C_3H_7O_2N$ : C = 40,45% H = 7,67%	Gef. Fraktion 6: C = 42,76%
		H = 8,20%
		Substanz: 0,1246 g CO <sub>2</sub> : 0,1954 H <sub>2</sub> O: 0,0920
7. 2,90 g	in Alkohol löslich.	
5,22 g		

Die ersten Krystallfraktionen bestanden wieder aus Leucin, die folgenden aus Aminovaleriansäure. Die Fraktion 6 verhielt sich wie die entsprechenden Gruppen in A a und A b. Bei der Prüfung auf Prolin wurde aus der 7. Fraktion noch zusammen 0,6 g Alkohol unlösliche krystallinische Aminosäuren erhalten, die aus Wasser mit Alkohol gefällt folgende Analysenwerte ergaben:

Substanz: 0,1262 g; CO <sub>2</sub> : 0,1961 g; H <sub>2</sub> O: 0,0969 g
Berechnet für Valeriansäure, $C_5H_{11}O_2N$ : C = 51,28%; H = 9,40%
"    " Alanin, $C_3H_7O_2N$ : C = 40,45%; H = 7,87%
Gefunden: C = 42,38%; H = 8,53%

Nach zweimaliger Reinigung über das Kupfersalz wurde der Teil, welcher das aktive Prolin hätte enthalten müssen, nach langem Trocknen im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure verbrannt.

Substanz: 0,1396 g; CO <sub>2</sub> : 0,2334 g; H <sub>2</sub> O: 0,1014 g
Berechnet für $C_3H_9O_2N$ : C = 52,10%; H = 7,82%
Gefunden: = 45,59%; H = 8,07%

Das Phenylhydantoin konnte aus ihm nicht erhalten werden. Das unlösliche Kupfersalz hatte nur 0,05 g alkohollösliche Substanz ergeben.

Die vierte Esterfraktion, die keinen krystallisierenden Körper enthielt, wurde ergebnislos auf Phenylalanin durch Ausschütteln mit Äther untersucht. Aus dem schwer löslichen Baryumsalz wurden 0,7 g Asparaginsäure erhalten. An Glutaminsäure wurden 1,7 g isoliert.

Substanz: 0,1204 g;  $\text{CO}_2$ : 0,1789 g;  $\text{H}_2\text{O}$ : 0,0704 g  
 Berechnet für  $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_4\text{N}$ : C = 40,81%; H = 6,28%  
 Gefunden: C = 40,52%; H = 6,49%

Der Rest wurde mit einer ätherischen Lösung von  $\beta$ -Naphthalinsulfosäure unter Zugabe von Natronlauge 6 Stunden geschüttelt. Beim Ansäuern fiel ein Öl aus, das nicht zum Krystallisieren gebracht werden konnte.

b) Zerlegung der durch Phosphorwolframsäure, nicht aber durch Bleiacetat fällbaren Fraktion durch Salzsäure.

Die aus 300 g erhaltene Fraktion wurde analog den anderen gespalten und verestert. Die Ester wurden nach dem Verfahren von Emil Fischer in Freiheit gesetzt. Bei der Destillation wurden erhalten:

1.	Bei 14 mm Druck bis	60°	=	0,6 g
2.	„ 14 „ „	100°	=	1,1 „
3.	„ 0,1 „ „	105°	=	2,9 „
4.	„ 0,1 „ „	180°	=	1,1 „
5.	Rückstand		=	2,2 „

7,9 g

Die Probe auf Glykokoll fiel negativ aus. Die Fraktionen 1 bis 3 wurden gemeinschaftlich verarbeitet:

1.	0,3 g	} Fast nur Leucin.	Gef. Fraktion 1: C = 54,13%; H = 9,75%
2.	0,2 g	} C = 54,96% H = 9,92%	CO <sub>2</sub> : 0,2434 g; H <sub>2</sub> O: 0,1078 g

3.	0.3 g	Fast nur Amino- valeriansäure. Ber. f. $C_5H_{11}O_2N$ :	Gef. Fraktion 3: C = 51.74%; H = 9.62%; N = 11.10 Substanz: 0.1208 g CO <sub>2</sub> : 0.2292 g; H <sub>2</sub> O: 0.1046 g Substanz: 0.1481 g N = 14.5 ccm bei 753 mm und 20°
4.	0.3 g		
5.	0.4 g	Alanin u. andere Säuren. Ber. f. $C_3H_7O_2N$ :	C = 44.27%; H = 6.08% Substanz: 0.1242 g CO <sub>2</sub> : 0.2016 g; H <sub>2</sub> O: 0.0680 g
6.	1.3 g 2.8 g	in Alkohol löslich.	

Die ersten Fraktionen enthielten wieder Leucin und Aminovaleriansäure. Die letzte krystallinische Fraktion konnte wegen der nur vorhandenen geringen Menge nicht genauer untersucht werden. Die sechste Fraktion ergab noch 0,3 g in Alkohol unlösliche Substanz. Die das eventuell inaktive Prolin enthaltende Menge war nicht wägbare. Ein Phenylhydantoin konnte nicht erhalten werden.

Die vierte Esterfraktion gab 0,3 g einer krystallinischen Substanz. Sie wurde in Wasser aufgenommen und die Lösung mit Salzsäure gesättigt. Es schied sich alsdann 0,1 g salzsaure Glutaminsäure ab.

c) Zerlegung der durch Phosphorwolframsäure und Bleiacetat nicht fällbaren Fraktion durch Salzsäure.

Eine 475 g Casein entsprechende Menge wurde, wie früher angegeben, verestert. Die Ester wurden nach dem Verfahren von Fischer in Freiheit gesetzt. Bei der Destillation wurden folgende Fraktionen erhalten:

1.	Bei 14 mm Druck bis 60°	= 2.0 g
2.	14 " " " 100°	= 3.2 "
3.	0,1 " " " 105°	= 5,5 "
4.	0,1 " " " 190°	= 6,6 "
5.	Rückstand	= 8,0 "
		<hr/> 25.3 g

Die erste Fraktion, die keinen Glykokollester enthielt, wurde gemeinschaftlich mit der zweiten verarbeitet.

1. 0.15 g	Wenig Leucin, sonst Amino- valeriansäure.	Ber. f. $C_6H_{13}O_2N$ :	Gef. Fraktion 1:
			C = 53.65%; H = 9.92%
2. 0.23 g	C = 54.96%	H = 9.92%	Substanz: 0.1223 g
			CO <sub>2</sub> : 0.2406 g; H <sub>2</sub> O: 0.1092 g
3. 0.40 g	Ber. f. $C_5H_{11}O_2N$ :	C = 51.28%	Gef. Fraktion 2:
			C = 53.24%; H = 9.86%
	H = 9.40%	Substanz: 0.1212 g	CO <sub>2</sub> : 0.2366 g; H <sub>2</sub> O: 0.1076 g
4. 0.70 g			Alanin u. andere Säuren.
	C = 41.45%; H = 8.00%		
	C = 40.45%	H = 7.87%	Substanz: 0.1219 g
			CO <sub>2</sub> : 0.1853 g; H <sub>2</sub> O: 0.0878 g
5. 0.06 g	Rückstand.		

1.54 g

Es lag hier nach den Analysen wenig Leucin neben Aminovaleriansäure vor. Die vierte Krystallfraktion enthielt nach ihrem Verhalten im Schmelzpunktröhrchen nicht nur Aminovaleriansäure und Alanin, sondern auch die in A a beschriebene, sich bei 216° zersetzende Substanz.

Die dritte Esterfraktion gab folgende Teile:

1. 0.2 g	Fast reine Amino- valeriansäure.	Ber. f. $C_5H_{11}O_2N$ :	Gef. Fraktion 1:
			C = 51.93%; H = 9.79%
2. 0.12 g	C = 51.28%	H = 9.40%	Substanz: 0.1231 g
			CO <sub>2</sub> : 0.2344 g; H <sub>2</sub> O: 0.1084 g
	Alanin u. andere Säuren.	Ber. f. $C_3H_7O_2N$ :	Gef. Fraktion 2:
			C = 50.78%; H = 8.82%
3. 0.62 g	C = 40.45%	H = 7.87%	Substanz: 0.1224 g
			CO <sub>2</sub> : 0.2279 g; H <sub>2</sub> O: 0.0971 g
	C = 39.89%; H = 6.89%	Substanz: 0.1225 g	Gef. Fraktion 3:
			CO <sub>2</sub> : 0.1792 g; H <sub>2</sub> O: 0.0760 g
4. 2.2 g	in Alkohol löslich.		

3.14 g

Auffällig war, daß Leucin fast nicht vorhanden war. Der nicht durch Phosphorwolframsäure und Bleiacetat fällbare Teil der aus dem Casein durch Behandlung mit Ozon erhaltenen Spaltstücke scheint demnach nicht oder nur wenig Leucin zu be-

sitzen. Aus der vierten Fraktion wurden noch 0,8 g in Alkohol unlösliche Aminosäuren gewonnen. Prolin war wieder nicht nachweisbar.

Der in Äther lösliche Teil von 0,6 g der vierten Esterfraktion enthielt kein Phenylalanin. Es wurden über das Baryumsalz 0,07 g Asparaginsäure erhalten. Weiter wurden 1,6 g Glutaminsäure gewonnen.

Substanz: 0,1234 g; CO<sub>2</sub>: 0,1838 g; H<sub>2</sub>O: 0,0723 g

Berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub>N: C = 40,81%; H = 6,2%

Gefunden: C = 40,62%; H = 6,51%

Der Rest wurde wie in B a mit  $\beta$ -Naphthalinsulfosäurechlorid behandelt. Ein krystallinisches Derivat konnte nicht erhalten werden.

### Untersuchung der in Äther nicht löslichen Ester des Bleikörpers und des Destillationsrückstandes auf Diaminosäuren.

Die Menge der nicht in Äther löslichen Ester des Bleikörpers wurden gemeinsam mit dem Destillationsrückstand in Wasser gelöst, von geringen Quantitäten Silberchlorid abfiltriert, mit Schwefelsäure angesäuert und durch vierstündiges Kochen verseift. Zur Isolation der drei Diaminosäuren wurde die Lösung nach den Angaben von Kossel<sup>1)</sup> verarbeitet. Es wurden an den betreffenden Stellen gefunden:

I. 0,6 g Argininnitrat. Die Silberbestimmung seines Silber-salzes ergab bei 0,1860 g Substanz 0,0489 g Silber.

Berechnet: 26,53% Ag

Gefunden: 26,29% "

II. 0,4 g Histidinchlorid.

III. 0,6 g Lysinpikrat.

Die beiden letzten Körper konnten bei der nur geringen vorhandenen Menge nicht weiter wie durch ihre Fällungsreaktionen identifiziert werden.

<sup>1)</sup> Vergl. A. Kossel. loc. cit.

### Tabellarische Übersicht über die nach dem Esterverfahren erhaltenen Resultate.

#### 1. Fraktionierung durch direkte Fällung mit Bleiacetat.

Angewendete Menge: 200 g Casein.

##### Bleifällung.

Regenerierte Substanz: 80 g  
Gewicht der Ester: 45,3 g

##### Fraktionen.

1.	15 mm bis 60°	=	2,2 g
2.	15 " " 100°	=	2,2 "
3.	0,2 " " 105°	=	11,5 "
4.	0,1 " " 185°	=	10,3 "
5.	Rückstand	=	19,1 "
			<hr/>
			45,3 g

Krystallfraktionen der Aminosäuren aus den Esterfraktionen 2 und 3:

1.	0,5 g	}	Fast reines Leucin.
2.	0,6 "		
3.	0,4 "		
4.	0,5 "		
5.	0,4 "	}	Fast reine Amino- valeriansäure.
6.	0,4 "		
7.	0,3 "		
8.	0,6 "	}	Alanin und nicht charakterist. Säuren.
9.	1,0 "		
10.	2,8 " in Alkohol löslich		
	7,5 g (später unlösl. 0,6 g).		

##### Esterfraktion 4.

Kryst. Ester: 0,25 g  
Ätherlösliche Ester: 1,0 g  
Aus den ätherunlöslichen Estern  
gewonnene Aminosäuren:  
Asparaginsäure: 0,06 g  
Glutaminsäure: 1,8 g  
Nicht identif. Säuren: 1,2 g  

---

Direkt gew. Glutaminsäure: 1,6 g  
Ammoniak gew. als NH<sub>4</sub>Cl: 1,6 g

##### Filtrat der Bleifällung.

Regenerierte Substanz: 77 g  
Gewicht der Ester: 40,9 g

##### Fraktionen.

1.	15 mm bis 60°	=	1,9 g
2.	15 " " 100°	=	3,8 "
3.	0,2 " " 105°	=	12,9 "
4.	0,08 " " 175°	=	9,5 "
5.	Rückstand	=	12,8 "
			<hr/>
			40,9 g

Krystallfraktionen der Aminosäuren aus den Esterfraktionen 2 und 3:

1.	0,4 g	}	Fast reines Leucin.
2.	0,6 "		
3.	0,6 "		
4.	0,5 "	}	Fast reine Amino- valeriansäure.
5.	0,3 "		
6.	0,4 "	}	Alanin und nicht charakterist. Säuren.
7.	0,7 "		
8.	1,0 "		
9.	4,1 " in Alkohol löslich		
	8,6 g (später unlösl. 1,0 g).		

##### Esterfraktion 4.

Kryst. Ester: — g  
Ätherlösliche Ester: 0,8 g  
Aus den ätherunlöslichen Estern  
gewonnene Aminosäuren:  
Asparaginsäure: 0,08 g  
Glutaminsäure: 2,5 g  
Nicht identif. Säuren: 1,2 g  

---

Direkt gew. Glutaminsäure: 1,6 g  
Ammoniak gew. als NH<sub>4</sub>Cl: 4,0 g

## 2. Kombinierte Fällung mit Phosphorwolframsäure und Bleiacetat.

Angewendete Menge: 475 g Casein.

Phosphorwolframsäureniederschlag.  
(Von dem Niederschlage wurde nur ein 300 g Casein entsprechender Teil bis zu den Aminosäuren weiter verarbeitet.)

Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag.

Fällung der regenerierten Substanz mit Bleiacetat.

(Keine Fällung mit Bleiacetat.)

	Bleinieder- schlag	Filtrat vom Blei- niederschlag	Filtrat vom Phosphorwolfram- säureniederschlag
Regenerierte Substanz:	70 g	unbest.	unbest.
Estermenge:	33.7 g	7.9 g	25.3 g
	Fractionen	Fractionen	Fractionen
1. 14 mm bis 60°	4.4 g	0.6 g	2.0 g
2. 14 " " 100°	1.5 "	1.1 "	3.2 "
3. 0.1 " " 105°	11.3 "	2.9 "	5.5 "
4. 0.1 " " 195°	8.0 "	1.1 "	6.6 "
5. Rückstand	8.5 "	2.2 "	8.0
	33.7 g	7.9 g	25.3 g
	Bleinieder- schlag	Filtrat vom Blei- niederschlag	Filtrat vom Phosphorwolfram- säureniederschlag 1 und 2
Esterfraktion: 1 u. 2			
1. 0.12 g ( F. n. Amino- valeriansäure			1. 0.15 g } wenig Leucin
2. 0.3 " Alanin			2. 0.23 " } sonst
3. 0.08 n. kryst.			3. 0.40 " } F. r. Amino- valeriansäure
0.5 g			4. 0.70 " } Alanin u. and. Säuren
			5. 0.06 " nicht kryst.
			1.54 g
Esterfraktion: 3		1 bis 3	3
1. 0.4 g } Fast reines	1. 0.3 g } Fast reines	1. 0.2 g } Fast reine	
2. 0.3 " } Leucin	2. 0.2 " } Leucin	2. 0.1 " } Amino- valeriansäure	
3. 0.3 " }	3. 0.3 " }	3. 0.6 " } Alanin u. and. nicht charakt. Säuren	
4. 0.3 { F. r. Amino- valeriansäure	4. 0.3 { F. r. Amino- valeriansäure	4. 2.2 " { In Alkohol löslich (später unlös. 0.8 g	
5. 0.2 { Alanin u. and. nicht charakt.	5. 0.4 " { Alanin u. and. nicht charakt. Säuren		
6. 0.8 { Säuren			
7. 2.9 { In Alkohol löslich (später unlös. 0.65 g)	6. 1.3 { In Alkohol löslich (später unlös. 0.3 g)		
5.2 g	2.8 g	3.1 g	

Esterfraktion:	4	4	4
Davon ätherlöslich:	0.8 g	—	0.6 g
Aus dem Äther schwer lösl. Aminosäuren:			
Asparaginsäure:	0,07	—	0,07
Glutaminsäure:	1.7	0.1 g	1.6

### Zusammenfassung der Resultate.

1. In der Arbeit wurde angestrebt, aus dem Gemenge der durch die Ozonisation des Caseins in alkalischer Lösung erhaltenen Spaltstücke

a) durch Abscheidung der Keto- oder Aldehydgruppen enthaltenden Körper als Phenylhydrazinderivate,

b) durch Fällung mit Bleiacetat und fraktionierte Fällung der aus dem Bleiniederschlag regenerierten Substanz mit Alkohol,

c) durch kombinierte Behandlung mit Phosphorwolframsäure und Bleiacetat,

zu chemisch einheitlichen größeren Abbauprodukten des Caseins zu gelangen. Die Versuche zeigten zwar, daß die Oxydation des Proteids wahrscheinlich stets in dem gleichen Sinne vor sich geht, allein chemisch einheitliche Körper konnten nicht isoliert werden.

2. Das Gemisch der durch die Ozonisation erhaltenen Spaltkörper wurde

a) durch direkte Fällung mit Bleiacetat,

b) durch successive Behandlung mit Phosphorwolframsäure und Bleiacetat

in 2 bezüglich 3 Fraktionen geschieden und diese zur Untersuchung auf die in ihnen enthaltenen Aminosäuren durch Kochen mit konzentrierter Salzsäure gespalten. Aus den Reaktionsmassen wurden die Aminosäuren nach dem von Emil Fischer<sup>1)</sup> ausgearbeiteten Esterverfahren isoliert.

Die auf diese Weise gewonnenen Resultate sind in den Tabellen am Schluß des experimentellen Teils zusammengestellt. Sie zeigen, daß die einzelnen Fraktionen in bezug auf

<sup>1)</sup> Vgl. loc. cit.

ihren Gehalt an Aminosäuren wenig von einander abweichen, außer daß der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Teil wenig oder kein Leucin enthält.

Es dürfte aussichtsreich sein, die am Casein gemachten Erfahrungen bei der Ozonisation anderer einfacherer Proteide wie die des Seidenfibroins anzuwenden. Auch die direkte Säurespaltung der durch die Oxydation mit Ozon erhaltenen Spaltprodukte würde Erfolg versprechen. Die genauere Untersuchung der Ester und der daraus regenerierten Aminosäuren dürfte vielleicht zu noch unbekanntem Spaltstücken führen, die über die Angriffspunkte des Ozons und damit über neue Atomkomplexverknüpfungen im Eiweiß Aufschluß geben könnten.