

# Über das Vorkommen von Isoleucin im Kasein

von

**R. Weitzenböck.**

Aus dem chemischen Institute der Universität Graz.

(Vorgelegt in der Sitzung am 12. Juli 1906.)

Die aus den Proteinen durch die Hydrolyse erhaltenen primären Bestandteile machen in der Regel in Summa viel weniger aus als hundert Prozent des hydrolysierten Proteins. Gewiß ist daran die Unvollkommenheit der gegenwärtigen Methoden die Hauptursache, möglicherweise aber auch der Umstand, daß primäre Spaltungsprodukte bisher übersehen worden sind.

Letztere Vermutung hat unter anderem Veranlassung gegeben, bei einer in größerem Maßstabe (3 Kilogramm) mit dem Kasein vorgenommenen Hydrolyse die Fällung mit Phosphorwolframsäure fraktionell vorzunehmen, damit die einzelnen Fällungen genauer untersucht werden können.

Ich habe die zu allererst entstehende Fällung untersucht. Es gelang nicht, aus ihr einen bisher nicht bekannten Stoff zu isolieren, es wurde in derselben hauptsächlich Leucin, möglicherweise Phenylalanin und neben diesen eine Verbindung erhalten, die ihren Eigenschaften nach das von F. Ehrlich<sup>1</sup> in der Melasse entdeckte Isoleucin ist. Ehrlich selber hat schon kurz bemerkt, daß das Isoleucin im Kasein vorhanden ist, nähere Angaben aber nicht gemacht.

Es sei aber bemerkt, daß trotz einer ziemlich umfänglichen Fraktionierung die vollkommene Reindarstellung nicht gelungen ist und aus den Analysen hervorgeht, daß eine hartnäckige Verunreinigung, möglicherweise eine Aminovaleriansäure

---

<sup>1</sup> Berl. Ber., 37, 1809 (1904).

anhaftet, deren Kupferalze ebenso in Methylalkohol löslich ist wie das des Isoleucins.

Histonbasen sind in der untersuchten ersten Phosphorwolframsäurefällung in sehr geringer Menge enthalten; sie dürften also hauptsächlich in den späteren Fällungen auftreten.

Das Isoleucin findet sich neben Leucin in flüchtigen alkalischen Anteilen, die erhalten werden, wenn das Phosphorwolframat mit zur Neutralisation unzureichenden Anteilen von Ätzkali sukzessive vermischt im Wasserdampfstrom destilliert wird. Wenn diese Basen mit Salzsäure übersättigt, eingedampft und nach Zusatz von Ätzbaryt neuerdings destilliert werden, so geht jetzt nur mehr wenig übrig und der Rückstand enthält nun die beiden Leucine.

Dieses erklärt sich dadurch, daß nach der Hydrolyse des Kaseins und der Esterifikation die Ester der Aminosäuren nicht nach dem Fischer'schen Verfahren in freiem Zustande mit Äther entfernt worden sind, sondern, wie es Skraup seinerzeit beim Kasein beschrieben hat, als Salzsäureverbindungen mit Ätheralkohol ausgeschüttelt wurden. Diese Ausschüttelung ist eine unvollkommene und die in wässriger Lösung verbleibenden Ester fallen mit Phosphorwolframsäure aus. Bei vorsichtigem Zusatz von Ätzkali werden sie in Freiheit gesetzt, zum Teil von Wasserdampf mitgeführt und erst beim längeren Erwärmen mit Salzsäure zu den freien Aminoverbindungen verseift.

Das Phosphorwolframat, aus 3 *kg* Kasein 4·5 *kg*, wurde in folgender Weise verarbeitet.

Je 300 *g* Phosphorwolframat wurden mit 60 *cm*<sup>3</sup> Alkohol erwärmt, einige Kubikzentimeter Wasser zugefügt, bis so gut wie alles in Lösung gegangen war, 50 *cm*<sup>3</sup> 36 prozentige alkoholische Kalilauge zugefügt und mit Wasserdampf destilliert, bis das Destillat nicht mehr alkalisch reagierte. Der Rückstand in dem Destillationsgefäß reagierte dann auch nicht alkalisch; in der Weise wurden nach und nach 4mal 50 *cm*<sup>3</sup> alkoholische Kalilauge zugesetzt; erst nach der letzten Destillation reagierte das nicht überdestillierte stark alkalisch.

Bei der Destillation gingen zunächst Öltropfen über, die sich jedoch in der nachfolgenden Wassermenge bald lösten und stark alkalisch reagierten. Die Destillation wurde jedesmal fort-

gesetzt, bis die alkalische Reaktion des Destillats verschwand und eine Probe, mit Salzsäure eingedampft, nur mehr einen ganz geringen Rückstand ergab.

Das gesamte Destillat wurde nach dem Übersättigen mit Salzsäure zur Trockene verdampft, mit Alkohol von etwas Chlorammonium befreit und unter portionenweisem Ätzbarytzusatz nochmals mit Wasserdampf destilliert.

Hiebei zeigte sich nun, daß weitaus der größte Teil nun nicht mehr mit Wasserdampf flüchtig war. Es wurde demnach, als nichts mehr überdestillierte, der Baryt mit Schwefelsäure genau ausgefällt und das Filtrat vom Bariumsulfat zur Kristallisation verdampft. Nach mehrfachem Umkristallisieren aus wenig Wasser unter Salzsäurezusatz ergab sich eine Kristallisation vom Schmelzpunkte 203 bis 206°, deren Analysenzahlen für Leucinchlorhydrat stimmen.

Zur Analyse kamen Präparate zweier gesonderter Darstellungen:

0·1533 g Substanz gaben 0·1311 g Ag Cl.

0·1488 g Substanz gaben 0·1282 g Ag Cl.

In 100 Teilen:

	Berechnet für Leucin- chlorhydrat $C_6H_{14}NO_2Cl$	Gefunden
Cl. ....	21·15	21·15 21·30

In der beschriebenen Art wurde das ganze übrige Phosphorwolframat (4 kg) verbreitet.

Das salzsaure Leucin wurde in der Wärme mit der berechneten Menge Silberoxyd entchlort und durch Kochen mit gefälltem Kupferoxyd in das Kupfersalz verwandelt. Ein großer Teil dieses fiel sofort nach dem Filtrieren aus. Durch fraktionelles Eindampfen wurden weitere Anteile erhalten, deren Löslichkeit im Wasser immer mehr zunahm. Das zuerst auskristallisierte Kupfersalz von lichtvioletter Farbe gab nach Zersetzung mit Salzsäure und Schwefelwasserstoff reines gewöhnliches Leucinchlorhydrat:

0·1614 g Substanz gaben 0·1386 g Ag Cl.



	Berechnet für		
	Isoleucinkupfer $C_{12}H_{24}N_2O_4Cu$	Mittel	Aminovalerians. Cu $C_{10}H_{20}N_2O_4Cu$
Cu .....	19·64	19·62	21·51
C .....	44·46	42·49	40·60
H .....	7·47	7·86	6·60
N .....	8·67	9·14	9·47

0·1576 g freie Säure gaben 0·3138 g  $CO_2$  und 0·1442 g  $H_2O$ .

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für	
		Leucin $C_6H_{13}NO_2$	Aminovalerians. $C_5H_{11}NO_2$
C .....	54·30	54·96	51·29
H .....	10·24	10·69	9·40

Hingegen ergab die Bestimmung des Drehungsvermögens in Salzsäure von 22 % einen Wert, der mit dem von Ehrlich für Isoleucin gefundenen nahe übereinstimmt: 0·1861 g Substanz in 10·8944 g 22prozentiger HCl zu 10  $cm^3$  gelöst gaben im Dezimeterrohr

$$\alpha = + 0·713^\circ$$

$$(\alpha)_D = + 38·3^\circ$$

$$(\alpha)_D = + 36·3^\circ \text{ Ehrlich für Isoleucin in 20\% HCl.}$$

Bei der früher erwähnten Destillation mit Wasserdampf blieb in der Blase eine dunkle Flüssigkeit mit einem weißgrauen Bodensatz, der zum allergrößten Teil aus Kaliumphosphorwolframat besteht.

Die überstehende Flüssigkeit wurde mit Schwefelsäure angesäuert, wobei die Farbe in hellgrün<sup>1</sup> umschlug und ein gelblichbraunes Phosphorwolframat ausfiel. Dieses wurde sorgfältig ausgewaschen, in der gewöhnlichen Weise mit Baryt zersetzt und mit  $CO_2$  vom Baryt befreit. Nach dem Eindampfen hinterblieb ein brauner Sirup im Gewicht von 100 g. Mit einem Teile wurde die Bestimmung der Histonbasen nach Kossel-Kutscher vorgenommen. Nach den erhaltenen Zahlen enthält

<sup>1</sup> Die Flüssigkeit enthielt Kupfer, welches von den bei der Esterifikation verwendeten Kupfergefäßen herrührt.

der Sirup je 0·6 g Arginin und Histidin. Das Lysinpikrat 5·8 g bestand zum größten Teil aus Kaliumpikrat. Nach diesen Daten geht hervor, daß die Histonbasen in die erste Fraktion der Phosphorwolframsäurefällung nur zum geringsten Teil übergehen.

Das vom Phosphorwolframat getrennte schwach schwefelsaure Filtrat ergab nach Entfernung des Kupfers (von der Verarbeitung des Kaseins herrührend) und Neutralisieren mit Kalilauge beim Eindampfen mehrere Kristallisationen, die anfänglich nur Kaliumsulfat waren, die späteren enthielten aber sehr reiche organische Anteile. Durch wiederholtes Ausziehen mit alkoholischem Ammoniak ließen sich diese gewinnen. Sie wurden aus Wasser umkristallisiert und sodann wieder in das Chlorhydrat verwandelt. Nur ein relativ geringer Teil kristallisierte, der alle Ähnlichkeit mit Leucinchlorhydrat hatte. Die sirupösen Mutterlaugen wurden wieder mit Silberoxyd zerlegt und die Kupfersalze dargestellt. Diese wurden wieder durch systematisches Eindampfen in verschiedene Fraktionen zerlegt. Die schwerstlöslichen zeigten wohl in der Löslichkeit, nicht aber im Aussehen Ähnlichkeit mit Leucin.

Das schwerstlösliche wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das kolloidal suspendierte Schwefelkupfer wurde nach kurzem Kochen mit Aluminiumhydroxyd<sup>1</sup> leicht filtrierbar. Die umkristallisierte Aminosäure hatte Ähnlichkeit mit Leucin. Sie scheint ein Gemenge dieses mit Aminovaleriansäure zu sein.

0·1552 g Substanz gaben 0·2975 g CO<sub>2</sub> und 0·1347 g H<sub>2</sub>O.

In 100 Teilen:

Berechnet für			Gefunden
Leucin	Aminovaleriansäure		
C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>		
54·96	51·29		52·28
10·69	9·40		9·71

In den leichter löslichen Fraktionen der Kupfersalze tritt ein schön rotviolett gefärbtes Salz auf, das in heißem Wasser

<sup>1</sup> Dieser Zusatz ist vor kurzer Zeit von Ehrlich empfohlen worden.

relativ leicht, in kaltem ziemlich schwer löslich ist und deshalb sowohl vom Leucinkupfer sowie von sirupösen leicht löslichen Salzen befreit werden konnte. Es tritt in verfilzten Nadeln auf. Es dürfte ein Gemenge von Leucinkupfer mit dem Kupfersalz von Phenylalanin sein. Dafür spricht auch der Umstand, daß es ungefähr denselben Kristallwassergehalt enthält, der für das Kupfersalz des Phenylalanin angegeben ist.

0·1805 g lufttrockenes Salz verloren bei 120° 0·0169 g H<sub>2</sub>O.

0·1636 g bei 120° getrocknetes Salz gaben 0·2862 g CO<sub>2</sub>, 0·0812 g H<sub>2</sub>O und 0·0383 g CuO.

In 100 Teilen:

	Berechnet für			
	Leucinkupfer	Aminovaleriansäure	Phenylalaninkupfer	Gefunden
C . . . . .	44·46	40·60	55·16	47·51
H . . . . .	7·47	8·60	5·11	5·55
Cu . . . . .	19·64	21·51	16·11	18·71
	Berechnet für Phenylalaninkupfer + 2H <sub>2</sub> O			Gefunden
2H <sub>2</sub> O . . . . .	9·06			9·36

---