

Über Leucin aus Kasein

von

Dr. Fritz Heckel.

Aus dem II. chemischen Universitätslaboratorium in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 31. Oktober 1907.)

Zd. H. Skraup und R. Witt haben bei der Einwirkung von Bromlauge auf Kasein *n*-Valeriansäure erhalten. Wenn durch einen Oxydationsprozeß Valeriansäure aus Kasein entsteht, ist jedenfalls zunächst an das Leucin zu denken. Das gewöhnliche Leucin ist aber eine Isobutylaminoessigsäure, welche die Muttersubstanz der Valeriansäure nicht sein kann. Es liegt daher der Gedanke nahe, besonders da neben dem länger bekannten Leucin in den Proteinen auch schon ein Isoleucin, die 3-Methyl-4-Aminopentansäure nachgewiesen worden ist, daß auch ein normales Leucin vorhanden sein müsse. Aus diesem könnte durch Oxydation *n*-Valeriansäure entstehen. Diese Frage zu lösen, war die Aufgabe der folgenden Arbeit.

Als Material dienten Hydrolysierungsfractionen des Kaseins, welche durch Ausschütteln mit Ätheralkohol schon vor längerer Zeit gewonnen worden waren.

Sie lieferten im Vakuum eingedampft 2200 g, welche in bekannter Weise nach E. Fischer verestert und auf die freien Ester verarbeitet wurden.

Es wurden 858 g ätherlöslicher Ester erhalten, welche dann im Vakuum (10 bis 12 mm) destilliert und in drei Fractionen aufgefangen wurden.

1. Fraktion 40 bis 60° wog 127 g.
2. Fraktion 60 bis 80° wog 20 g.
3. Fraktion 80 bis 115° wog 122 g.

Da in der Fraktion 80 bis 115° die Hauptmenge des Leucin enthalten ist, wurde nur diese verarbeitet und durch zehnstündiges Kochen mit Wasser verseift und fraktionell eingedampft.

Die erste Kristallisation wog feucht 36 g, die zweite 50 g und die dritte ebenfalls 50 g. Die ersten zwei Fraktionen wurden mit gefälltem Kupferoxyd in die Kupfersalze verwandelt. Aus der schwerstlöslichen Fraktion schied sich nach dem Filtrieren etwa 5 g Leucinkupfer ab, welches mit wenig heißem Wasser ausgekocht wurde.

Bei weiterem Eindampfen schieden sich aus den beiden Fraktionen tiefblaue Blättchen aus, die sich nach ihrem Kupfergehalte als ein Gemisch von Leucin- und aminovaleriansaurem Kupfer erwiesen und auch die von E. Fischer beschriebenen Eigenschaften zeigten.

Eine Trennung der beiden Säuren durch fraktionierte Kristallisation der Kupfersalze gelang mir nicht.

Daher wurden die freien Säuren durch Schwefelwasserstoff aus den vereinigten Kupfersalzen regeneriert und in die Chlorhydrate verwandelt. Diese wurden aus 50prozentiger Salzsäure umkristallisiert und dadurch fünf Fraktionen gewonnen.

Das schwerstlösliche Chlorhydrat (5 g) gab folgenden Chlorgehalt:

0·3246 g bei 100° getrocknete Substanz gab 0·2836 g AgCl.

In 100 Teilen:

	Berechnet für		Gefunden
	$C_6H_{14}NO_2Cl$	$C_5H_{12}NO_2Cl$	
Cl.....	21·15	23·08	21·60

Bei weiterem Umkristallisieren änderte sich der Chlorgehalt nicht.

0·3246 g Substanz, bei 105° getrocknet, gab 0·2838 g AgCl.

In 100 Teilen:

	Berechnet für		Gefunden
	$C_6H_{14}NO_2Cl$	$C_5H_{12}NO_2Cl$	
Cl.....	21·15	23·08	21·55

Das leichtestlösliche Chlorhydrat gab folgenden Chlorgehalt.

0·3158 g bei 105° getrocknete Substanz gab 0·2748 g AgCl.

In 100 Teilen:

	Berechnet für		Gefunden
	$C_6H_{14}NO_2Cl$	$C_5H_{12}NO_2Cl$	
Cl.....	21·15	23·08	21·65

Sämtliche Chlorhydrate wurden hierauf jeder für sich mit gefällttem Silberoxyd entchlort und wieder in die Kupfersalze verwandelt.

Aus dem schwerst- und leichtestlöslichen Chlorhydrat wurden durch fraktionierte Kristallisation nahezu nur Kristalle vom Ansehen des gewöhnlichen Leucinkupfers gewonnen, während die mittleren Fraktionen ein Gemisch von Leucin und Aminovaleriansäure waren.

Kupfersalz aus schwerstlöslichem Chlorhydrat:

0·6835 g bei 100° getrocknetes Salz gaben 0·1680 g CuO.

In 100 Teilen:

	Berechnet für	Gefunden
	$C_{12}H_{28}N_2O_4Cu$	
Cu	19·64	19·63

Kupfersalz II, zweite Chlorhydratkristallisation:

0·1595 g bei 100° getrocknetes Salz gab 0·0410 g CuO.

In 100 Teilen:

	Berechnet für		Gefunden
	$C_{12}H_{28}N_2O_4Cu$	$C_{10}H_{24}N_2O_4Cu$	
Cu	19·64	22·00	20·54

Das Kupfersalz aus Chlorhydrat 3 wurde nicht analysiert, weil es schon der Kristallform und Löslichkeit nach einem Gemisch der beiden Aminosäuren ähnelte.

Kupfersalz IV aus Chlorhydrat 4.

0·3885 g Kupfersalz bei 110° getrocknet gab 0·1038 g CuO.

In 100 Teilen:

	Berechnet für		Gefunden
	$C_{12}H_{28}N_2O_4Cu$	$C_{10}H_{24}N_2O_4Cu$	
Cu	19·64	22·00	21·35

Kupfersalz V (aus dem leichtestlöslichen Chlorhydrat):

0·3417 g Kupfersalz bei 110° getrocknet gab 0·0833 g CuO.

In 100 Teilen:

	Berechnet für	Gefunden
	$C_{12}H_{28}N_2O_4Cu$	
Cu	19·64	19·47

Aus dem Angeführten geht hervor, daß das Umkristallisieren des Gemisches von Leucin und Valin in Form der Salzsäureverbindung eine annähernde Trennung ermöglicht, wobei das Leucin in der schwerst- und in der leichtestlöslichen Fraktion wesentlich vorwaltet.

Aus den Kupfersalzen I und V wurde durch Schwefelwasserstoff das Leucin regeneriert und hiebei aus I 6·5 g, aus V 3 g Leucin erhalten. Mit dem ursprünglichen als schwerstlösliches Kupfersalz abgeschiedenen Leucin konnten also im ganzen 13 g Leucin von annähernder Reinheit isoliert werden.

Es wurde zunächst versucht, analog den Versuchen von Skraup und Witt,¹ Leucin mit Bromlauge zu oxydieren.

3 g Leucin (von der schwerstlöslichen Fraktion) wurden in 30 cm³ n/10 NaOH gelöst und 10 cm³ Bromlauge zufließen gelassen. Dabei trat in der Kälte gar keine Reaktion ein. Als dann auf dem kochenden Wasserbade erwärmt wurde, wurden 7 cm³ N abgespalten. Nachdem im ganzen 28 cm³ Bromlauge zugefügt worden waren, war ungefähr die Hälfte des N (17·4 cm³) abgespalten.

Bei weiterem Zufügen von Bromlauge trat überhaupt keine Gasentwicklung mehr auf. In das Reaktionsgemisch wurde schwefelige Säure eingeleitet, bis alles Hypobromit reduziert war. Dann wurde mit Schwefelsäure angesäuert, mit

¹ Monatshefte für Chemie, 28, 605 ff. (1907).

Wasserdampf destilliert. Das Destillat wurde durch Silberoxyd vom Bromwasserstoff befreit, mit Kalkmilch neutralisiert und eingedampft. Es konnte jedoch nur 0.1 g Kalksalz erhalten werden, welches nicht weiter untersucht wurde.

Infolge dieses Mißerfolges wurde mit Permanganat oxydiert.

Das Leucin wurde in Portionen zu je 2 g gelöst in 100 cm³ Wasser mit je 4 g Kaliumpermanganat gelöst in 200 cm³ H₂O versetzt und über Nacht stehen gelassen. Es war vollständige Entfärbung eingetreten, der Geruch nach Aldehyd aber noch deutlich wahrnehmbar, weshalb erwärmte und verdünnte Kaliumpermanganatlösung zugesetzt wurde, um die Oxydation vollständig zu machen. Es genügte der Zusatz von wenigen Tropfen einer einprozentigen Permanganatlösung und kurzes Erwärmen am Wasserbade.

Der ausgeschiedene Braunstein wurde abgenutscht und ausgekocht (dreimal). Das Filtrat wurde mit Schwefelsäure angesäuert und mit Wasserdampf destilliert, und zwar solange, bis 2 cm³ des Destillats, mit einem Tropfen Kalkwasser versetzt, deutlich alkalisch reagierten.

Das gesamte Destillat wurde nun mit Kalkmilch bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt und eingedampft. Hierbei bildete sich an der Oberfläche eine zähe Haut, welche das Abdunsten des Wassers erschwerte. Wenn man das Wasser jedoch im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure abdunsten ließ, so kristallisierte das Kalksalz in schönen Prismen aus.

Aus 6 g Leucin (schwerstlösliche Fraktion) wurden 2 g Kalksalz gewonnen. Dieses wurde umkristallisiert und mit dem zuerst umkristallisierenden Salz eine Löslichkeitsbestimmung gemacht.

0.5 g Substanz wurden in einer kleinen Epruvette mit einer zur Lösung unzureichenden Menge Wassers versetzt und ein rascher Luftstrom zwei Stunden lang durchgesaugt. Dann wurde die Lösung von dem ungelöst Gebliebenen in ein gewogenes Wägegglas abgesaugt, eingedampft und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

2.9440 g Lösung gab Rückstand 0.3564 g, in 100 Teilen Wasser lösen sich somit bei der Versuchstemperatur von 23° also 14.32 Teile Kalksalz. Die Löslichkeit der Kalksalze der Valeriansäuren beträgt nach Adolf Lieben¹ für normal valeriansauren Kalk 8.3, für 2-methyl-pentansauren Kalk 20.6 und für isobutylelessigsauren Kalk 35.0.

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

Die Ca-Bestimmung gab Werte für valeriansauren Kalk.

0·3048 g bei 110° getrocknete Substanz gab 0·1707 g CaSO₄.

In 100 Teilen:

	Berechnet für <u>C₁₀H₁₈O₄Ca</u>	<u>Gefunden</u>
Ca	16·56	16·04

Da durch die Kalkbestimmung die Abwesenheit homologer Verbindungen ausgeschlossen ist, muß ein Gemisch vorliegen, von welchem *n*-Valeriansäure eben die Hälfte beträgt, demnach das oxydierte Leucin auch *n*-Aminocaprinsäure enthalten muß.

Durch Eindampfen der Mutterlauge dieses Kalksalzes wurde eine zweite Kristallisation erhalten (1 g), mit der ebenfalls eine Löslichkeitsbestimmung, wie oben beschrieben, vorgenommen wurde.

2·5011 g Lösung gab 0·6032 g Rückstand.

In 100 Teilen Wasser lösen sich bei 23°: 32·82 Teile Kalksalz.

Die Ca-Bestimmung gab folgende Werte:

0·2676 g bei 110° getrocknete Substanz gab 0·0635 g Ca O.

In 100 Teilen:

	Berechnet für <u>C₁₀H₁₈O₄Ca</u>	<u>Gefunden</u>
Ca	16·56	16·76

Diese Fraktion besteht demnach fast nur aus isovaleriansaurem Salz.

Auch die 3 g Leucin, erhalten aus der leichtestlöslichen Fraktion der Chlorhydrate, wurden wie oben oxydiert und das Calciumsalz hergestellt. Hierbei wurde 1 g Kalksalz erhalten, welches ebenfalls in Prismen kristallisierte.

0·5295 g Lösung gab 0·1382 g Rückstand.

In 100 Teilen Wasser lösen sich bei 23°: 35·32 Teile Kalksalz.

Die Ca-Bestimmung ergab dagegen einen zu hohen Wert:
 0·1224 g bei 110° getrocknete Substanz gab 0·0312 g CaO.

In 100 Teilen:

	Berechnet für $C_{10}H_{18}O_4Ca$	Gefunden
Ca	16·56	17·99

Der ungelöste Rückstand wurde abermals mit einer zur Lösung unzureichenden Menge Wassers versetzt und wieder eine Löslichkeitsbestimmung durchgeführt.

1·8966 g Lösung gab 0·4937 g Rückstand.

In 100 Teilen Wasser lösen sich bei 23°: 35·19 Teile Kalksalz.

Die Ca-Bestimmung ergab folgende Werte:

0·2996 g bei 110° getrocknete Substanz gab 0·0753 g CaO.

In 100 Teilen:

	Berechnet für $C_{10}H_{18}O_4Ca$	Gefunden
Ca	16·56	17·97

Dieses Kochsalz dürfte stark durch buttersauren Kalk verunreinigt sein, der 18·23% Ca enthält.

Das von mir untersuchte Leucin aus Kasein enthält nach meinen Versuchen eine sehr kleine Menge α -Amino-*n*-Capronsäure. Es muß wohl berücksichtigt werden, daß nur ein kleiner Teil des Leucins in kristallisierte Form zu bringen war. Immerhin muß es fraglich erscheinen, ob die Angabe von Kwizda, der aus Kasein-Leucin durch Jodwasserstoffsäure *p*-Capronsäure erhalten zu haben erklärt, richtig ist.