

Produkte der Hydrolyse von Casein

von

Zd. H. Skraup,

w. M. k. Akad.

Unter experimenteller Mitwirkung von H. Lampel und V. Neustetter.

Aus dem II. chemischen Universitätslaboratorium in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 9. Juli 1908.)

Nachstehende Untersuchung war schon vor einem Jahre beendet und wurden die wesentlichen Resultate in einer kurzen Notiz¹ mitgeteilt. Späterhin haben Abderhalden und Funk² Versuche veröffentlicht, die sich mit jenen zum Teile decken.

Das wesentliche unserer Beobachtung ist, daß unter den Produkten der Hydrolyse drei verschiedene Substanzen auftreten, die die Zusammensetzung des Leucylvalylanhydrids haben. Die eine ist ziemlich stark linksdrehend und wahrscheinlich identisch mit der von Abderhalden und Funk später beschriebenen Substanz. Die andere dreht schwächer nach links und die dritte ist so gut wie inaktiv und vielleicht identisch mit der inaktiven Verbindung, die inzwischen im hiesigen Institut E. Krause dargestellt hat. Ob diese drei Stoffe einheitlich sind oder Gemische, läßt sich ohneweiters nicht entscheiden, wenn sie auch bei eingehender Fraktionierung von konstantem Schmelzpunkt erhalten wurden. Am wahrscheinlichsten ist jenes für die stärker linksdrehende und für die nichtaktive Verbindung.

¹ Anzeiger der kaiserl. Akad. der Wissensch. in Wien, 1907, 323.

² Zeitschr. f. physik. Chemie, 53, 19 (1907).

Eine andere Frage ist, ob Verbindungen vom Charakter der Diketopiperazine als primäre Spaltungsprodukte der Eiweißstoffe angesehen werden können, beziehlich aus Dipeptiden entstehen, oder ob sie erst nach erfolgter Hydrolyse durch Anhydrisierung aus Aminosäuren entstehen.

Für ersteres ließe sich vor allem gerade die Zusammensetzung der in dieser Mitteilung beschriebenen Anhydride anführen. Denn wenn diese erst aus den Aminosäuren, beziehlich deren Estern entstanden, dann sollte Leucylimid und Valylimid ebenso auftreten können wie das gemischte Anhydrid, während nur dieses zu fassen war. Andererseits lassen sich dagegen gerade die zitierten Beobachtungen von Krause anführen, der beobachtet hat, daß Gemische von Leucin- und Valinester und ebenso der freien Säuren ganz überwiegend das gemischte Anhydrid geben. Und da bei der Destillation der Ester diese auf höhere Temperatur gehalten werden, ist die Möglichkeit der Anhydrisierung nicht ohneweiters auszuschließen.

Über diese Frage haben sich schon Abderhalden und Funke ausführlich geäußert und mir scheint, daß die Bedingungen, unter welchen sie das Anhydrid isoliert haben, am meisten gegen eine nachträgliche Überführung von Aminosäure in das Piperazinderivat spricht.

Die hier beschriebene Untersuchung wurde hauptsächlich begonnen, um festzustellen, ob in den auch im Vakuum nicht flüchtigen Anteilen der Ester, wie sie nach dem Fischer'schen Verfahren erhalten werden, bisher nicht beschriebene Verbindungen vorhanden sind. Es wurde nun bei einer ziemlich umständlichen Fraktionierung außer den erwähnten Piperazinen nur noch Leucin erhalten und schließlich noch Amine, die sich als ein Gemisch von »Butyl«- und »Amylamin« erwiesen. Es läßt sich nicht ohneweiters feststellen, welche Konstitution diese Amine haben, doch ist es sehr wahrscheinlich, daß sie durch Zersetzung von Leucin und Valin entstanden sind, denn da neben ihnen sehr große Mengen von Ammoniak auftreten, sind sekundäre Reaktionen sicherlich eingetreten und bei solchen ist das Auftreten der beiden Amine leicht zu verstehen.

Experimenteller Teil.

Das Material stammte von älteren Versuchen, bei welchen das mit Salzsäure hydrolysierte Casein so oft mit Ätheralkohol geschüttelt wurde, so lange dieser noch erheblich aufnahm. Diese Ausschüttelungen, die über 2 Jahre gestanden hatten, wurden abdestilliert, der Rückstand nach E. Fischer verestert und die Ester im Vakuum (20 *mm*) destilliert.

Die Fraktion 40 bis	60°	betrug	127 g.
»	»	60 » 80	» 20
»	»	80 » 115	» 102

Trotz Steigerung der Badtemperatur auf 200° ging nichts mehr über. Der Destillationsrückstand war 270 g.

Beim Lösen im gleichen Gewicht absoluten Alkohols schieden sich aus ihm schimmernde Krystalle ab, die nach dem Verdünnen mit Äther auf das doppelte Volum sich vermehrten. Nach längerem Stehen abgesaugt, wogen sie 22 g.

Sie wurden durch Chloroform im Extraktionsapparat in leichter und schwerer lösliche Anteile zerlegt und diese sodann durch Umkrystallisieren aus Amylacetat, schließlich Eisessig weiter gereinigt. Die anfänglich grünen Krystalle hinterließen beim Extrahieren mit Chloroform eine geringe Menge eines lebhaft grüngefärbten Pulvers, das sich als eine Kupferverbindung erwies.¹

Kleine Mengen der grünen Substanz gingen auch in die Lösungen über, wurden aber beim Kochen mit Tierkohle entfernt.

Die oftmals umkrystallisierte Substanz ist in Äther so gut wie unlöslich, in der Hitze nicht zu schwer löslich in Alkohol, Essigäther, Amylacetat, am reichlichsten in Eisessig löslich. Von kochendem Amylacetat sind ungefähr 70 Teile zur Lösung notwendig.

Der Schmelzpunkt liegt bei 289° (unkorr.); Sintern tritt schon bei 283° ein.

Zur Analyse wurde bei 110° im Vakuum getrocknet.

¹ Das Kupfer rührt von Gefäßen her, die bei den früheren Stadien verwendet wurden.

- I. 0·1457 *g* gaben 0·3316 *g* CO₂ und 0·1192 *g* H₂O.
 II. 0·1241 *g* gaben 0·2822 *g* CO₂ (H₂O ging verloren).
 III. 0·1583 *g* gaben 18·5 *cm*³ N bei 24·5° und 743·4 *mm* Barometerstand.

In 100 Teilen:

	Gefunden			Berechnet für C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₂
	I.	II.	III.	
C	62·06	62·02	—	62·21
H	9·15	—	—	9·49
N	—	—	13·12	13·23

0·4060 *g* mit Eisessig zu 10·0392 *g* gelöst ($D = 1·044$), zeigten in 1 *dm*-Rohr eine Drehung von $-2·10$; demnach $(\alpha)_D = -53·0^\circ$. Abderhalden¹ und Funk fanden bei ihrem Präparat $(\alpha)_D = -44·27$.

Die Verbindung ist ihrer Zusammensetzung nach das Leucylvalylimid. Es wurde versucht, dieses unter den von E. Fischer beim Leucinimid eingehaltenen Verhältnissen zu den Dipeptid aufzuspalten. Die Analysen zeigten aber, daß dem Peplid Aminosäuren beigemischt sind und keine besseren Resultate wurden erhalten, als die Hydrolyse mit Bromwasserstoffsäure noch vorsichtiger unternommen wurde. Aus den Mutterlaugen des unreinen Pepsides wurden Kupfersalze dargestellt, welche sicher nicht ausschließlich Leucinkupfer, sondern auch viel leichter lösliche Salze (Vallinkupfer) enthielten.

In den Mutterlaugen des Leucyl-Valylimides ist eine niedriger und auch leichter lösliche Substanz von ähnlichem Aussehen (nadlige Krystalle) enthalten. Nach fortgesetztem Umkrystallisieren blieb der Schmelzpunkt bei 250° stehen. In dieser Reinheit braucht die Substanz in der Kochhitze die 40fache Menge Amylacetat zur Lösung.

- I. 0·1405 *g* gaben 0·3200 *g* CO₂ und 0·1141 *g* H₂O.
 II. 0·1285 *g* gaben 0·2927 *g* CO₂ und 0·1045 *g* H₂O.
 III. 0·1699 *g* gaben 19·35 *cm*³ N bei 23·5° und 748·5 *mm* Barometerstand.

In 100 Teilen:

	Gefunden		
	I.	II.	III.
C	62·12	62·12	—
H	9·09	9·10	—
N	—	—	12·91

¹ Zeitschr. f. physik. Chemie, 53, 25 (1907).

Die Substanz ist gleichfalls linksdrehend, doch viel schwächer als die höher schmelzende.

0.4311 *g* mit 10.0077 *g* Eisessig gelöst ($D = 1.04$), zeigten im 1 *dm*-Rohr $\alpha = -0.75$. Daraus berechnet sich $(\alpha)_D = -17.6^\circ$.

Die alkoholisch-ätherische Mutterlauge des 22 *g* wiegenden Gemisches, welches bisher besprochen worden ist, schied, mit Petroleumäther vermischt, ein Harz ab. Die obenstehende Flüssigkeit krystallisierte aber wieder beim freiwilligen Verdunsten und gab, neuerdings abdestilliert, nach längerem Stehen Krystalle, die, aus Amylacetat und Eisessig umkrystallisiert, in allen Fraktionen den konstanten Schmelzpunkt 275° besaßen, dem früher erwähnten Imid vom Schmelzpunkt 289° sehr ähnlich, nur in Lösungsmitteln leichter löslich waren. In Eisessiglösung dreht sie kaum wahrnehmbar nach rechts.

I. 0.1287 *g* gaben 0.2919 *g* CO_2 und 0.1009 *g* H_2O .

II. 0.2105 *g* gaben 24.1 *cm*³ N bei 25° und 747 *mm* Barometerstand.

In 100 Teilen:

	Gefunden
C	61.86
H	8.77
N	12.89

Es liegen demnach drei verschiedene Verbindungen vor, welche alle die Zusammensetzung eines aus Leucin und Vallin gebildeten Diketopiperazins haben. Die höchstschmelzende Verbindung ist aller Wahrscheinlichkeit dieselbe, welche nach meiner ersten Notiz von Abderhalden und Funk beschrieben worden ist. Inzwischen hat E. Krause,¹ allerdings nur für die razemischen Verbindungen, gezeigt, daß ein Gemisch von Leucinimid und Vallylimid vom Leucylvallylimid unterschieden werden kann. Es kann deshalb vorläufig angenommen werden, daß drei individuelle Substanzen vorliegen. Die letzterwähnte ist möglicherweise identisch mit der von E. Krause aus razemischem Material synthetisch dargestellten Verbindung.

¹ Monatshefte für Chemie, Augustheft 1908.

Die Mutterlaugen der nichtaktiven Substanz wurden nach dem Verdünnen mit Äther mit verdünnter Schwefelsäure ausgeschüttelt. Im Äther blieb die Hauptmenge zurück, eine harzige Substanz, die auch in starken Säuren nicht löslich ist, ebenso in Alkalien, mit diesen länger gekocht sich aber auflöst, und dann beim Ansäuern wieder ausfällt.

Die saure wässrige Lösung wurde mit Ätzkali neutralisiert, eingedampft, durch Alkohol von Kaliumsulfat befreit, das Filtrat mit Baryt ausgefällt und dann eingedampft. Es schieden sich grünliche Krystalle aus, die nach der Analyse und dem Schmelzpunkt Leucin waren. Für die Beständigkeit der komplexen Kupferverbindungen von Aminosäuren ist charakteristisch, daß selbst diese Leucinfraction stark mit Kupfer verunreinigt war, welches in Eisessiglösung durch Schwefelwasserstoff abgeschieden werden konnte.

Im Filtrat der rohen Leucinkrystallisation konnten Amine von der Zusammensetzung des Butyl- und Amylamins nachgewiesen werden.

Die Lösung wurde nach Zusatz von Ätzbaryt mit Wasserdampf destilliert. Der Ätzbaryt wurde in Anteilen nur jedesmal dann erst wieder zugefügt, wenn Destillat und Kolbeninhalt nicht mehr alkalisch reagierten. Im ganzen wurden 175 g Ätzbaryt verbraucht.

Die vereinigten Destillate wurden mit Salzsäure neutralisiert, zur Trockene eingedampft und durch wiederholtes Ausziehen mit Alkohol und abermaliges Eindampfen von Chlorammonium, welches weitaus überwog, befreit. Der in absolutem Alkohol völlige Anteil wog 4 g. Im Vakuum schied er einzelne Prismen ab, die aber an freier Luft sehr bald wieder verschwanden.

Er wurde mit 10prozentiger Goldchloridlösung ausgefällt. Das ziemlich reichlich ausfallende Aurat wurde in möglichst wenig heißem Alkohol gelöst, mit Wasser versetzt, bis eben deutliche Trübung eintrat und die rasch filtrierte Lösung dann über Schwefelsäure gestellt. Die Mutterlauge der ausgeschiedenen Krystalle (1 g) gab bei weiterem Verdunsten das Doppelte (2·3 g) einer Krystallisation von gleichem Ansehen und Schmelzpunkt 195°. Die Verflüssigung erfolgt unter starker Zersetzung.

Beide Fraktionen wurden vakuumtrocken analysiert.

I. 0·1871 g gaben 0·0903 g Au.

II. 0·2399 g gaben 0·1161 g Au, 0·1050 g CO₂ und 0·0553 g H₂O.

In 100 Teilen:

	Gefunden		Berechnet für
	I.	II.	C ₄ H ₁₁ N Au Cl ₃ H
C	—	11·94	12·78
H	—	2·57	3·18
Au	48·21	48·39	51·94

Nach den Resultaten der Analyse liegt das Aurat einer Base C₄H₁₁N vor, die vermutlich durch Zersetzung des Vallins entstanden ist.

Ein Teil des Goldsalzes wurde mit SH₂ zerlegt und die Lösung des Chlorhydrates stark eingedampft. Im Vakuum trat nach einiger Zeit Krystallisation ein, die aber an freier Luft rasch wieder zerfloß. Das Salz gibt schwach, aber deutlich die Isonitrilreaktion.

Das Filtrat von der Fällung durch Goldchlorid wurde durch Schwefelwasserstoff vom Golde befreit. Das Filtrat krystallisierte nach dem Verdampfen über festem Ätzkali viel reichlicher als der früher erwähnte Sirup.

Die sehr konzentrierte Lösung wurde, um beigemischte Ammonsalze zu beseitigen, zunächst partiell mit Platinchlorid ausgefällt, dann vollständig und die zweite Fällung aus heißem Wasser umkrystallisiert, wobei große, gelbe Blätter anschossen. Der Schmelzpunkt liegt unscharf bei 210° (unkorr.) unter sehr starker Zersetzung und Ausstoßung von Nebeln.

Zur Analyse wurde im Vakuum bei 100° getrocknet.

0·2548 g gaben 0·2001 g CO₂, 0·1039 g H₂O und 0·0843 g Pt.

In 100 Teilen:

	Gefunden		Berechnet für
			(C ₅ H ₁₃ N) ₂ Pt Cl ₆ H ₂
C	21·42		20·59
H	4·56		4·78
Pt	33·08		33·13

Aus den verschiedenen Mutterlaugen des Platinsalzes krystallisierten neben den recht charakteristischen Tafeln auch noch heller gelbe, drusenartige Aggregate aus.

Das aus dem analysierten Platinsalz erhaltene Chlorhydrat krystallisiert viel besser wie das aus dem Goldsalz, und zwar schon während dem Konzentrieren der Lösung.

Das Chlorhydrat gibt die Isonitrilreaktion sehr stark.

Der Inhalt des Kolbens, aus welchem mit Ätzbaryt das Gemisch von Ammoniak und den analysierten Aminen abdestilliert wurde, lieferte nach einem recht umständlichen Verfahren nur relativ geringe Mengen einer Krystallisation, die im wesentlichen wieder Leucin war.
