

Eine quantitative Methode zur Trennung des Leucins und Tyrosins.

Von

J. Habermann und R. Ehrenfeld.

(Aus dem Laboratorium für allgemeine und analytische Chemie der k. k. deutschen technischen Hochschule in Brünn)

(Der Redaction zugegangen am 29. September 1902.)

Das Leucin und das Tyrosin treten bekanntlich, ihrem Vorkommen und ihrer Bildungsweise nach, zumeist gemeinsam auf. Trotz dieses Umstandes und der eminenten physiologischen Bedeutung beider Körper, sowie der Wichtigkeit ihrer Trennung und Isolirung aus der Masse jener Producte, welche die Hydrolyse der Proteinstoffe liefert, ist bislang keinerlei rationelle Methode zur Trennung der genannten Körper in der Litteratur aufzufinden. Namentlich fehlt eine Angabe zur quantitativen Trennung des Leucins und Tyrosins vollkommen. Zu nennen sind als bisher übliche Methode im Wesentlichen nur die Trennung durch fractionirte Krystallisation beider Körper aus wässriger Lösung, welche sich im Grunde auf die geringe Löslichkeit des Tyrosins im Wasser stützt, sowie im gewissen Sinne die Methode der Veresterung und fractionirten Destillation von Aminosäuren, welche Emil Fischer in neuester Zeit bekanntlich auf die Untersuchung der hydrolytischen Zersetzungsproducte von Eiweissstoffen angewandt hat.

Den Anlass zur Aufsuchung einer zweckmässigen Methode zur Trennung des Leucins und Tyrosins bot die Aufgabe, grössere Mengen von Rohfractionen dieser Körper weiter zu verarbeiten, welche durch die Hydrolyse von Casein mittelst Salzsäure und Zinnchlorür nach der Methode von Hlasiwetz und Habermann¹⁾ erhalten worden waren. Nach der Abscheidung der Glutaminsäure in Form ihrer schön krystalli-

sirenden salzsauren Verbindung wurde das Filtrat mittelst aufgeschlemmten Kupferoxyduls und Silberoxyds von der Salzsäure befreit und eingedampft. Die Rohfractionen, welche sich nun in mehr oder weniger braun bis braunschwarz gefärbten Massen ausschieden, waren Leucin und Tyrosin mit einander vermengt. Der langwierige und zeitraubende Weg einer neuerlichen Auflösung der erhaltenen Krystallfractionen, der Reinigung der tiefbraun bis schwarz gefärbten Lösungen derselben durch essigsäures Bleioxyd, respective durch Kochen mit Thierkohle und der nun folgenden weiteren fractionirten Krystallisation etc. konnte leicht durch die Anwendung einer Flüssigkeit vermieden werden, welche das Leucin schon in der Kälte in reichlichem Maasse löst, während im Gegensatze hierzu ihr Lösungsvermögen gegenüber dem Tyrosin ein nur geringes genannt werden muss. Es ist der Eisessig. Die Leucin-Tyrosinfractionen wurden mit Eisessig in einem Kolben am Rückflusskühler zum Sieden erhitzt, wodurch das Leucin äusserst leicht in Lösung ging und das Tyrosin am Boden des Gefässes in Form einer weissen bis braunen, pulverigen Masse zurückblieb, welche nunmehr abfiltrirt werden konnte. Im Falle die Leucin-Tyrosinmasse stark mit humösen Substanzen durchsetzt war und dadurch ihre Lösung beinahe schwarz gefärbt erschien, gestaltete sich das Abfiltriren des Tyrosins ziemlich schwierig und konnte nur mit Hülfe der Luftpumpe durchgeführt werden. Der Filterrückstand wurde sodann nach den für das Tyrosin angegebenen Reinigungsmethoden weiter verarbeitet, während aus dem Filtrate der Eisessig zum grössten Theile abdestillirt und der Rest schliesslich am Wasserbade verjagt werden konnte. Mit Rücksicht auf die weitere Reinigung des Leucins schien es geboten, das essigsäure Filtrat vor dem Abdestilliren, respective dem Abdampfen durch einige Minuten mit etwas Thierkohle zu kochen und nochmals zu filtriren. Der Abdampfrückstand wurde sodann mit siedend heissem Alkohol von 95% aufgenommen und wiederholt umkrystallisirt. Man erhält auf diesem Wege schliesslich ein Leucin, welches die bekannten Reactionen auf Tyrosin, namentlich die von Piria auch nicht mehr spurenweise zeigt.

Es lag nun der Gedanke nahe, diese Methode der Trennung des Leucins und Tyrosins, welche beim präparativen Arbeiten¹⁾ ihrer expeditiven und präcisen Art halber ganz vortreffliche Dienste leistete, auch auf ihre Anwendbarkeit zur quantitativen Trennung beider Körper zu prüfen. Das hierzu verwendete Leucin, ebenso wie das Tyrosin, waren durch Hydrolyse des Caseins mittelst Salzsäure und Zinnchlorür nach der Methode von Hlasiwetz und Habermann²⁾ gewonnen worden; beide Körper wurden nach der vorhin beschriebenen Methode durch Eisessig aus ihren Rohfractionen getrennt und sodann gesondert der weiteren Reindarstellung unterzogen. Das Leucin konnte durch mehrfaches Umkrystallisiren aus der wässerigen Lösung und sodann aus siedendem Alkohol von 95° o in feinen, seidenglänzenden Blättchen gewonnen werden. Das Tyrosin wurde mindestens zehn Mal aus der wässerigen Lösung umkrystallisirt, bis es schliesslich in der bekannten Form von Nadeln resultirte, welche durch ihren fettigen Seidenglanz charakterisirt sind. Beide Körper zeigten jedoch merkwürdiger Weise ein bisher gänzlich unbekanntes Verhalten bei der Bestimmung ihrer Schmelzpunkte. Das Leucin schmolz im offenen Röhrchen bei 270° C. (uncorr.) unter totaler Zersetzung, ebenso im geschlossenen Röhrchen, ohne vorher zu sublimiren. Dieses Leucin erwies sich demnach als verschieden sowohl von den beiden optisch activen Modificationen, als auch der racemischen. Es ist vielmehr mit aller Wahrscheinlichkeit als ein Gemenge mehrerer isomerer Modificationen aufzufassen. Von einem näheren Studium der bezüglichen Verhältnisse wurde vorläufig Abstand genommen, da dieselben für den angestrebten Zweck der Trennung des Leucins und Tyrosins, so wie beide Körper unter den Producten der Hydrolyse von Proteinstoffen auftreten.

1) An dieser Stelle sei erwähnt, dass der Eisessig bei der Reindarstellung von Tyrosin an und für sich insofern mit gutem Erfolge anzuwenden ist, als Tyrosin, welches trotz wiederholten Umkrystallisirens aus Wasser einen Stich ins Gelbliche aufweist, mit möglichst wenig Eisessig übergossen und schwach erwärmt, blendend weiss wird.

2) loc. cit.

nicht von Wesenheit sind. Es sei jedoch immerhin auf den Unterschied dieses Leucinpräparates von jenem hingewiesen, welches (Gmelin¹⁾) durch Zersetzung von Casein mittelst Salzsäure und Zinnchlorür nach dem Verfahren von Hlasiwetz und Habermann²⁾ dargestellt hat. Nach seiner Angabe sublimiert das Leucin beim langsamen Erhitzen und bräunt sich beim raschen Erhitzen, wobei der Geruch nach Amylamin auftritt. Eine genauere Bezeichnung der Temperatur lassen seine Angaben vermissen.

Das Tyrosin schmolz im offenen Röhrchen bei 272° C. (uncorr.) unter völliger Zersetzung, im geschlossenen Röhrchen erhitzt, zeigte es einen Schmelzpunkt von 265° C. (uncorr.) bei gleichzeitiger intensiver Zersetzung, ohne dass es vorher sublimiert wäre. Nach den Angaben der Litteratur zeigt bekanntlich das Tyrosin einen Schmelzpunkt von 235° C. Da die folgende Analyse des Tyrosins, sowie die späterhin zu beschreibende Bestimmung seiner Löslichkeit in Eisessig keinen Zweifel an der Reinheit und der Homogenität des Präparates aufkommen lassen können, ist der Gedanke nicht von der Hand zu weisen, dass in diesem Tyrosin eine isomere Modification, respective ein Gemenge mehrerer solcher Modificationen vorliegt, umso mehr, als ja die Constitution des Tyrosins als eines substituirtten Benzolderivates diesem Gedanken einigen Spielraum gewährt. Die nähere Untersuchung dieser Frage blieb aus denselben Gründen wie beim Leucin vorläufig ausser Acht.

Sowohl das Leucin als auch das Tyrosin wurden einer Stickstoffbestimmung unterzogen, und zwar das erstere nach der Methode von Dumas, das letztere nach der von Kjeldahl.

Stickstoffbestimmung im Leucin nach Dumas.

0,2428 g Substanz lieferten bei 22° C. und 742,2 mm Druck
22,9 ccm Stickstoff, entsprechend 10,42 %.

Berechnet aus $C_6H_{11}NO_2$: 10,68 %.

1) Diese Zeitschrift, Bd. XVIII.

2) loc. cit.

Stickstoffbestimmung im Tyrosin nach Kjeldhal.

0.2806 g Substanz lieferten 27.142 mg Ammoniak, entsprechend
22.353 mg Stickstoff = 7.96 %.

Berechnet aus $C_9H_{11}NO_3$: 7.74 %.

Bevor die Methode der quantitativen Trennung des Leucins und Tyrosins mittelst Eisessig auf ihre Verlässlichkeit hin zur Prüfung gelangte, wurde die Löslichkeit beider Körper im Eisessig von 16° C. sowie ihre Löslichkeit im siedenden Eisessig ermittelt. Die Bestimmung der Löslichkeit bei einer Temperatur von 16° C. geschah in der bekannten Weise durch Herstellung einer heiss gesättigten Lösung, welche sodann auf die Temperatur von 16° C. abgekühlt und so rasch als möglich durch ein trockenes Faltenfilterchen in ein gewogenes Wäggläschen filtrirt wurde. Die nun folgende Wägung ergab das Gewicht der Lösung, welche nunmehr im Luftbade bei einer Temperatur zwischen 100 und 110° C. zur Trockene verdampft wurde. Das Gewicht der Lösung minus dem Gewicht des so erhaltenen Abdampfrückstandes ergibt die Menge an Eisessig, welche zur Auflösung einer bestimmten Menge des Körpers, eben des Abdampfrückstandes, nothwendig ist, so dass sämtliche Zahlen zur Berechnung jener Quantität vorliegen, welche sich in 100 Theilen Eisessig löst.

Die Bestimmung der Löslichkeit im siedenden Eisessig wurde in analoger Weise vorgenommen, indem die heiss-gesättigte Lösung, welche noch immer eine deutliche Menge von ungelöster Substanz enthielt, so rasch als nur möglich durch ein trockenes Faltenfilterchen in ein gewogenes Wäggläschen filtrirt wurde. Ob zwar diese Art der Bestimmung nicht gänzlich einwandfrei ist, ergab sie doch, wie im Folgenden zu belegen sein wird, ganz ausserordentlich gut übereinstimmende Resultate, so dass von der Anwendung des bekannten Victor Meyer'schen Apparates zur Bestimmung der Löslichkeit von Körpern bei höheren Temperaturen, welcher die Herstellung der heiss gesättigten Lösung und das Filtriren derselben im gleichen Raume und ohne Temperaturerniedrigung gestattet, Umgang genommen werden konnte, und dies umso mehr, als seiner Benützung die angreifende Wirkung des

siedenden Eisessigs auf die nicht zu umgehenden Korkverschlüsse im Wege stand.

Löslichkeit des Leucins im Eisessig bei 16° C.

I.

Gewicht der gesättigten Lösung	0.408 g
des Abdampfrückstandes	0.040 g
Differenz	0.368 g

0.368 g Eisessig lösen 0.04 g Leucin. 100 Theile Eisessig demnach 10.87 Theile Leucin.

II.

Gewicht der gesättigten Lösung	1.4836 g
des Abdampfrückstandes	0.1462 g
Differenz	1.3374 g

1.3374 g Eisessig lösen 0.1462 g Leucin. 100 Theile Eisessig demnach 10.93 Theile Leucin.

100 Theile Eisessig lösen somit bei 16° C.:

I. 10.87 Theile Leucin	} Im Mittel: 10,90 Theile Leucin.
II. 10.93 „	

Löslichkeit des Leucins im siedenden Eisessig.

I.

Gewicht der gesättigten Lösung	10.8542 g
des Abdampfrückstandes	2.4544 g
Differenz	8.3998 g

8.3998 g Eisessig lösen 2.4544 g Leucin. 100 Theile Eisessig demnach 29.21 Theile Leucin.

II.

Gewicht der gesättigten Lösung	1.1642 g
des Abdampfrückstandes	0.2634 g
Differenz	0.9008 g

0.9008 g Eisessig lösen 0.2634 g Leucin. 100 Theile demnach 29.24 Theile Leucin.

100 Theile Eisessig lösen somit in der Siedhitze:

I. 29.21 Theile Leucin	} Im Mittel: 29.23 Theile Leucin.
II. 29.24 „	

Löslichkeit des Tyrosins im Eisessig bei 16° C.

I.

Gewicht der gesättigten Lösung	5,5482 g
des Abdampfückstandes	0,0088 "
Differenz	5,5394 g

5,5394 g Eisessig lösen 0,0088 g Tyrosin, 100 Theile demnach
0,15 Theile.

II.

Gewicht der gesättigten Lösung	6,413 g
Gewicht des Abdampfückstandes	0,0092 "
Differenz	6,4038 g

6,4038 g Eisessig lösen 0,0092 g Tyrosin, 100 Theile Eisessig demnach
0,14 Theile Tyrosin.

100 Theile Eisessig lösen somit bei 16° C.:

I. 0,15 Theile Tyrosin	} Im Mittel: 0,14 (5) Theile Tyrosin.
H. 0,14 "	

Löslichkeit des Tyrosins im siedenden Eisessig.

I.

Gewicht der gesättigten Lösung	9,3808 g
des Abdampfückstandes	0,0164 "
Differenz	9,3644 g

9,3644 g Eisessig lösen 0,0164 g Tyrosin, 100 Theile Eisessig demnach
0,17 g Tyrosin.

II.

Gewicht der gesättigten Lösung	2,7642 g
des Abdampfückstandes	0,0054 "
Differenz	2,7588 g

2,7588 g Eisessig lösen 0,0054 g Tyrosin, 100 Theile Eisessig demnach
0,19 Theile Tyrosin.

100 Theile Eisessig lösen somit in der Siedehitze:

I. 0,17 Theile Tyrosin	} Im Mittel: 0,18 Theile Tyrosin.
II. 0,19 "	

Für den Zweck der auszuarbeitenden Trennungsmethode war es von Wesenheit, dass die Löslichkeit des Tyrosins im Eisessig mit der Steigerung der Temperatur auf Siedehitze fast keinerlei Zunahme aufweist. Wir konnten demnach der Trennungsmethode den Eisessig von vornherein im siedenden Zustande zu Grunde legen, und dies mit um so grösserem Vortheile, als ja die Löslichkeit des Leucins im siedenden Eisessig nahezu das Dreifache der Löslichkeit bei Zimmertemperatur beträgt. Zur Prüfung der Methode wurden genau bekannte Mengen von Leucin und Tyrosin, die zwischen 0,3 bis 0,6 g schwankten, in einem Erlenmeyer-Kölbchen eingewogen, mit ca. 10 ccm Eisessig übergossen und zum Sieden erhitzt. Mit dem Beginne des Siedens wurde das Kölbchen vom Feuer weggerückt und nach dem Erkalten durch ein trockenes Faltenfilterchen in eine vorher gewogene Platinschale filtrirt; Kölbchen und Filterrückstand wurden mit möglichst geringen Mengen Eisessig nachgespült, das Filtrat bei einer Temperatur von 100—110° C. im Luftbade abgedunstet und der Rückstand gewogen. Das Verdunsten nimmt etwa die Zeit von 6 bis 8 Stunden in Anspruch: ein weiteres Erhitzen des Rückstandes, als es zur Vertreibung der letzten Spuren des Essigsäuregeruches nöthig war, wurde in sämtlichen Fällen vermieden, da sich nach den Erfahrungen, welche die Löslichkeitsbestimmungen ergeben hatten, trotz der relativ niedrigen Temperatur immerhin eine leichte Bräunung des Abdampfrückstandes mit der Zeit bemerkbar machte. Sowohl das Leucin als auch das Tyrosin waren naturgemäss vor ihrer Anwendung bei einer Temperatur von 105° C. zur Gewichtsconstanz getrocknet worden.

Trennung des Leucins und Tyrosins mittelst siedenden Eisessigs.

I.

Verwendet: { 0,3062 g Leucin,
 { 0,3934 Tyrosin.

Platinschale leer	26,9054 g
+ Abdampfrückstand	27,2266 "
Differenz	0,3212 g

II.

Verwendet: $\left\{ \begin{array}{l} 0,5138 \text{ g Leucin.} \\ 0,2996 \text{ g Tyrosin.} \end{array} \right.$

Platinschale leer	27,8402 g
+ Abdampfrückstand	28,3596
Differenz	0,5194 g.

Wie ein Blick auf Differenz I und Differenz II lehrt, bringt der siedende Eisessig somit neben dem Leucin noch eine geringe Menge von Tyrosin mit in Lösung.

Zur Vermeidung dieses Uebelstandes wurde die Anwendung eines Zusatzes von 95^o/_oigem Alkohol zum Eisessig versucht. Das Gemenge von genau bekanntem Gewichte an Leucin und Tyrosin wurde wie früher mit ca. 10 cem Eisessig übergossen, das gleiche Volumen an Alkohol hinzugefügt, das Kölbchen wurde über offenem Feuer bis zum Sieden erhitzt und im Momente des Aufwallens vom Feuer weggezogen. Nach dem Erkalten wurden neuerlich 10 cem Alkohol von 95^o/_o hinzugegossen und durch ein trockenes Faltenfilterchen in die vorher gewogene Platinschale filtrirt. Kölbchen und Filtrerrückstand wurden mit einem Gemische von gleichen Volumentheilen Eisessig und Alkohol in möglichst geringer Menge nachgespült.

Verwendet: $\left\{ \begin{array}{l} 0,356 \text{ g Leucin.} \\ 0,3138 \text{ g Tyrosin.} \end{array} \right.$

Platinschale leer	26,899 g
+ Abdampfrückstand	27,2348 g
Differenz	0,3358 g.

Der Abdampfrückstand sinkt somit beträchtlich unter das Gewicht der eingewogenen Menge Leucin. Hierdurch wurde der Gedanke nahegerückt, dass der doppelte Zusatz an Alkohol eine nachtheilige Verminderung der Löslichkeit des Leucins nach sich gezogen hatte. Es wurde daher die Trennung so durchgeführt, dass die eingewogenen Mengen an Leucin und Tyrosin mit 10 cem Eisessig versetzt und nach dem Hinzufügen des gleichen Volumens an 95^o/_oigem Alkohol das Ganze zum beginnenden Sieden erhitzt wurde. Ein neuerlicher Zusatz von Alkohol nach dem Erkalten wurde unterlassen. Diese

Art der Ausführung lieferte bei Weitem die günstigsten Resultate, wie aus den folgenden Belegén hervorgeht.

I.

Verwendet: $\left\{ \begin{array}{l} 0,4006 \text{ g Leucin,} \\ 0,3598 \text{ » Tyrosin.} \end{array} \right.$

Platinschale leer	32,2484 g
+ Abdampfrückstand	32,646 »
Differenz	0,3976 g

II.

Verwendet: $\left\{ \begin{array}{l} 0,3264 \text{ g Leucin,} \\ 0,3074 \text{ » Tyrosin.} \end{array} \right.$

Platinschale leer	32,2478 g
+ Abdampfrückstand	32,5768 »
Differenz	0,329 g

Der einmalige Zusatz von Alkohol zum Eisessig ist somit der alleinigen Verwendung des Eisessigs entschieden vorzuziehen. Da hierdurch die Bildung von Essigäther im Verlaufe des Processes nicht ausgeschlossen ist, wurde ein Versuch nicht unberücksichtigt gelassen, welchem von vornherein neben der Menge von 10 cem Eisessig die gleiche Menge an absolutem Essigäther zu Grunde gelegt wurde. Das Leucintyrosingemenge wurde demnach mit 10 cem Eisessig versetzt und 10 cem absoluter Essigäther hinzugefügt. In seinem weiteren Verlaufe blieb das Verfahren das gleiche wie früher, nur wurde das Nachspülen des Kölbchens und das Waschen des Filtrerrückstandes mit einem Gemenge von gleichen Volumtheilen Eisessig und Essigäther vorgenommen. Der erwartete Erfolg blieb jedoch aus, indem die Löslichkeit des Tyrosins dadurch keine Verminderung erlitt und der Abdampfrückstand in der Platinschale nach wie vor die eingewogene Menge Leucin überstieg.

Verwendet: $\left\{ \begin{array}{l} 0,5078 \text{ g Leucin,} \\ 0,3014 \text{ » Tyrosin.} \end{array} \right.$

Platinschale leer	32,2484 g
+ Abdampfrückstand	32,769 »
Differenz	0,5206 g

Die Anwendung des siedenden Eisessigalkoholgemisches zur Trennung des Leucins und Tyrosins liefert somit eine Methode, deren quantitative Verlässlichkeit einerseits ausser Frage steht und die andererseits ihrer exacten und exepeditiven Art halber beim präparativen Arbeiten mit günstigem Erfolge zu verwenden ist. Es steht zu erwarten, dass diese Trennungsmethode wichtige Dienste leisten wird bei der quantitativen Bestimmung der Mengen an Leucin und Tyrosin, welche durch die Hydrolyse von Proteinstoffen entstehen. Ueber die diesbezüglichen Versuche soll nächsthin berichtet werden, desgleichen über die Versuche, das abnormale Verhalten des Leucins wie des Tyrosins mit Bezug auf ihren Schmelzpunkt einem näheren Studium zu unterziehen. Auch soll die Löslichkeit der optisch-activen und der racemischen Modification des Leucins, wie jene des Tyrosins mit normalem Schmelzpunkte im Eisessig bestimmt werden, um die Anwendbarkeit der vorgeschlagenen Trennungsmethode im einzelnen Falle feststellen zu können.