

Beitrag zur Kenntnis der beim Kochen von Casein mit 25⁰/₀iger Schwefelsäure und mit starker Salzsäure entstehenden Spaltungsprodukte.

Von

Emil Abderhalden und Casimir Funk.

(Aus dem chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 22. Juli 1907.)

Es ist wiederholt betont worden, daß die Hydrolyse von Proteinen mit kochenden Säuren zu verschiedenen Resultaten führt, je nachdem man konzentrierte Salzsäure oder verdünnte (25—33⁰/₀ige) Schwefelsäure anwendet. So führen z. B. Fr. Kutscher und J. Seemann¹⁾ neuerdings namentlich unter Berufung auf Hlasiwetz und Habermann²⁾ an, daß die Spaltung der Eiweißstoffe durch siedende konzentrierte Salzsäure viel weiter gehe als durch 33⁰/₀ige Schwefelsäure, «denn während man z. B. bei Behandlung von Casein mit Schwefelsäure nur 2⁰/₀ Glutaminsäure erhält, kann man daraus nach Kochen mit Salzsäure bis zu 30⁰/₀ Glutaminsäure bekommen». Kutscher und Seemann schließen aus dieser Angabe, daß bei der Hydrolyse mit kochender 33⁰/₀iger Schwefelsäure ein Teil der Glutaminsäure in Form komplizierter Verbindungen vorhanden sein muß, die erst durch kochende konzentrierte Salzsäure zerlegbar sind. Diese Komplexe nennen die genannten Forscher vorläufig «Peptine». Wir hatten nun im Laufe der Zeit sehr oft Gelegenheit, die Spaltprodukte von Proteinen sowohl nach Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure als nach Abbau durch 25⁰/₀ige Schwefel-

¹⁾ Fr. Kutscher und J. Seemann, Beitrag zur Kenntnis der Verdauung im Dünndarm. Vorläufige Mitteilung. Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 298, 1906.

²⁾ Vgl. hierzu: Fr. Kutscher, Der Nachweis der Glutaminsäure unter den durch starke Schwefelsäure erzielten Spaltungsprodukten des tierischen Eiweißes, Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 122 (131), 1899.

säure zu untersuchen, und fanden im wesentlichen stets dieselben Resultate. Es gilt dies speziell für die Glutaminsäure. Die alte Angabe, daß aus Casein beim Kochen mit konzentrierter Salzsäure 30% Glutaminsäure entstehen, konnten wir allerdings nie bestätigen. Wir haben nie mehr als 10—11% gefunden. Dasselbe Resultat erhielten wir, wenn wir Casein während 16 Stunden mit der fünffachen Menge 25%iger Schwefelsäure kochten. Wir werden später die nach dieser Richtung angestellten Untersuchungen ausführlich mitteilen, hier sei nur betont, daß so große Unterschiede in den Mengen der Spaltprodukte und speziell der Glutaminsäure, wie Kutscher und Seemann sie angeben, bei der Hydrolyse von Proteinen durch verdünnte Schwefelsäure und durch konzentrierte Salzsäure nicht existieren, vorausgesetzt, daß die Hydrolyse nach den jetzigen Erfahrungen genügend lange durchgeführt wird. Wenn natürlich die Proteine mit verdünnter Schwefelsäure weniger als 10 Stunden gekocht werden, so wird man ohne Zweifel komplizierteren Abbauprodukten in größerer Menge begegnen, dasselbe wird auch der Fall sein, wenn bei der Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure weniger als 5—6 Stunden gekocht wird.

Addiert man die bei der Hydrolyse mit Säuren gefundenen Mengen an Aminosäuren zusammen, und subtrahiert man das bei der hydrolytischen Spaltung aufgenommene Wasser von der gefundenen Summe, so ergibt sich, daß ein bei den verschiedenen Proteinen mehr oder weniger erheblicher Teil an Spaltprodukten noch unbestimmt geblieben ist. Ein Teil dieses Restes fällt ohne Zweifel den noch unvollkommenen Methoden der Isolierung der Spaltprodukte zur Last. Einigermäßen genau lassen sich nur Tyrosin, die Glutaminsäure, Arginin, Lysin und Histidin bestimmen. Es ist schwer zu sagen, wie groß die durch die angewandten Methoden hervorgerufenen Verluste sind, und ein wie großer Anteil an Monoaminosäuren bei der Anwendung der Estermethode dem Nachweis entgeht. Immerhin scheinen unbekannte Spaltprodukte jedenfalls in größerer Anzahl nicht mehr vorhanden zu sein. Immerhin muß es unser Bestreben sein, unausgesetzt nach solchen zu suchen und zugleich die Fehlerquellen der angewandten Methoden möglichst genau zu ermitteln.

Wir haben im folgenden bei einer derartigen Untersuchung die Beobachtung gemacht, daß bei der Hydrolyse von Casein mit kochender 25%iger Schwefelsäure Anhydride von Dipeptiden entstehen und ebenso bei der Hydrolyse mit siedender konzentrierter Salzsäure. Ihre Menge war allerdings gering, besonders im letzteren Falle. Die Ausbeute an Anhydriden betrug bei 20stündigem Kochen mit 25%iger Schwefelsäure bei Anwendung von rohem Casein ca. 2% an Rohprodukt. An reinen Substanzen wurden weniger als 1% erhalten. Bei Anwendung von nach Hammarsten bereitetem Casein und 16stündigem Erhitzen mit 25%iger Schwefelsäure erhielten wir nur 0,75% an reinen Anhydriden. Nach 6stündigem Kochen von rohem Casein mit rauchender Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 isolierten wir 0,76% an Anhydriden und zwar erwies sich das isolierte Produkt als einheitlich und zwar als optisch aktives Leucinimid. Die in analoger Weise isolierten Anhydride bei der Schwefelsäurehydrolyse stellten ein Gemisch dar. Es ist uns nicht gelungen, dieses vollständig aufzuklären. Wir haben vorläufig optisch aktives Leucinimid und l-Phenylalanyl-d-alanin-anhydrid nachgewiesen und mit den entsprechenden synthetischen Diketopiperazinen identifiziert. Ein drittes Produkt gab Analysenzahlen, die recht gut auf l-Leucyl-d-valin-anhydrid stimmen, und bei der Hydrolyse dieses Produktes durch Kochen mit rauchender Salzsäure erhielten wir auch Valin und Leucin; wir müssen es jedoch vorläufig unentschieden lassen, ob das genannte Diketopiperazin wirklich vorlag oder aber ein Gemisch von Leucinimid und Valin-anhydrid, da das entsprechende synthetische Produkt noch nicht dargestellt ist.

Es fragt sich nun, wie man sich die Entstehung dieser Produkte zu denken hat. Am naheliegendsten ist die Annahme, daß ihre Bildung eine sekundäre ist und zwar aus den entsprechenden Dipeptiden. Wir hätten in diesem Falle Produkte einer nicht ganz vollständigen Hydrolyse vor uns. Für diese Auffassung spricht, daß die Ausbeute an Anhydriden steigt, je kürzere Zeit das Casein mit den genannten Säuren gekocht wird. Es läßt sich dies besonders deutlich bei der Anwendung von verdünnter Schwefelsäure verfolgen. Für ihre Entstehung

aus Dipeptiden spricht ferner die Beobachtung, daß z. B. beim Kochen von Leucyl-leucin mit der 5fachen Menge 25%iger Schwefelsäure während 16 Stunden die Bildung von Leucinimid sich nachweisen läßt. Allerdings war bei Verwendung von 1 g Dipeptid die Menge des entstandenen Anhydrids sehr gering. Es ist jedoch wohl denkbar, daß beim hydrolytischen Zerfall komplizierter gebauter Polypeptide die Bildung derartiger Produkte erleichtert ist. Wir müssen jedoch auch mit der Möglichkeit rechnen, daß im Eiweiß derartige Anhydride vorgebildet vorhanden sind. Diese Vermutung würde eine gewisse Grundlage erhalten, wenn sich die Angabe von Salaskin und Kowalewsky¹⁾ bestätigen würde, daß bei der Verdauung von Globin aus Hämoglobin mit Magensaft Leucinimid gebildet würde. Leider haben diese Autoren den Nachweis des Leucinimids nicht exakt genug geführt und uns ist es vorläufig nicht gelungen, bei Wiederholung dieser Versuche mit verschiedenen Proteinen Anhydride von Dipeptiden zu gewinnen. Ein abschließendes Urteil ist noch nicht zu geben, weil es sehr auf die Versuchsbedingungen und vor allem auf die Dauer der Verdauung ankommen wird. Hervorheben wollen wir noch die Beobachtung von Emil Fischer,²⁾ daß Leucyl-leucin beim Trocknen sehr leicht in Anhydrid übergeht. Ein Präparat von l-Leucyl-l-leucin enthielt nach fünfstündigem Trocknen im Vakuum bei 100° über Phosphorpentoxyd schon 4% Leucinimid. Man wird auf Grund dieser Feststellung stets an eine sekundäre Bildung von Anhydriden aus Dipeptiden denken müssen, falls die angewandte Methode eine solche nicht ausschließt.

Schließlich haben wir uns auch die Frage vorgelegt, ob nicht beim Kochen von Aminosäuren mit rauchender Salzsäure und verdünnter Schwefelsäure unter gleichen Bedingungen, wie sie bei der Hydrolyse des Caseins angewandt wurden, Diketopiperazine entstehen. Das Resultat dieser Versuche war stets völlig negativ. Wir erhielten immer das Ausgangsmaterial quan-

¹⁾ S. Salaskin und Katharina Kowalewsky, Über die Wirkung des reinen Hundemagensaftes auf das Hämoglobin, resp. Globin. Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 567, 1903.

²⁾ Emil Fischer, Synthese von Polypeptiden. XV. Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXIX, S. 2919, 1906.

titativ wieder und niemals auch nur Spuren von Anhydriden. Endlich haben wir noch festgestellt, ob bei der partiellen Hydrolyse von Casein mit starken Säuren in der Kälte Anhydride sich bilden. Wir ließen Casein mit der 5fachen Menge 70%iger Schwefelsäure 5 Tage unter öfterem Umschütteln im Brutraume stehen, entfernten dann die Schwefelsäure quantitativ mit Baryt und engten das Filtrat vom Baryumsulfat unter vermindertem Druck bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur des Wasserbades völlig zur Trockne ein und extrahierten den Rückstand mit trockenem Essigäther. Beim Verdunsten des Essigäthers hinterblieb ein geringer Rückstand, der sich fast ganz in verdünnter Salzsäure löste. Anhydride waren somit höchstens in Spuren entstanden.

Wir werden unsere Versuche auf andere Proteine ausdehnen und die Bedingungen, unter denen diese Anhydride von Dipeptiden aus Proteinen entstehen, noch genauer feststellen. Um Mißverständnissen vorzubeugen, heben wir ausdrücklich hervor, daß natürlich diese Methode zur Auffindung von höheren Spaltprodukten aus Eiweiß nicht die gleiche Bedeutung hat, wie diejenige durch partiellen Abbau der Proteine durch konzentrierte Säuren bei niederer Temperatur.¹⁾ Wir haben diese Versuche nur ausgeführt, um zu entscheiden, wie groß die Menge der Produkte ist, die bei der Bestimmung der Aminosäuren mit Hilfe der Estermethode dem Nachweis entgehen. Die vorliegenden Resultate sind nur ein erster Beitrag zu dieser Frage und zeigen, daß in der Tat ein kleiner Teil der Spaltungsprodukte der Proteine sich dem Nachweis entzieht, namentlich wenn die Hydrolyse des Caseins durch Kochen mit 25%iger Schwefelsäure herbeigeführt wird. Diese Feststellung ist insofern von Wichtigkeit, als z. B. geringe Mengen von Phenylalanin durch die Bildung von Anhydriden ganz dem

¹⁾ Vgl. Emil Fischer und Emil Abderhalden, Bildung eines Dipeptids bei der Hydrolyse des Seidenfibroins. Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXIX, S. 752, 1906. — Bildung von Dipeptiden bei der Hydrolyse der Proteine. Ebenda, Bd. XXXIX, S. 2315, 1906. — Bildung von Polypeptiden bei der Hydrolyse der Proteine. Sitzungsberichte der Kgl. preußischen Akad. d. Wissenschaften, Bd. XXX, 20. Juni 1907.

Nachweis nach den gewöhnlichen Methoden entgehen könnten. Es wird auf alle Fälle von Nutzen sein, bei Anwendung von 25%iger Schwefelsäure zur Hydrolyse von Proteinen nach Anhydriden zu fahnden. Ihr Nachweis läßt sich, wie die unten mitgeteilte Methode zeigt, leicht durchführen und in den Gang der Verarbeitung der hydrolytischen Spaltprodukte der Proteine einschalten.

Experimenteller Teil.

I. Hydrolyse mit 25%iger Schwefelsäure.

2 kg Casein wurden mit 6 l 25%iger Schwefelsäure 20 Stunden am Rückflußkühler gekocht, dann die Hydrolysenflüssigkeit mit Wasser verdünnt, die Schwefelsäure quantitativ mit festem, später mit gelöstem Baryt gefällt und das Baryumsulfat abfiltriert. Der Niederschlag wurde mit viel Wasser ausgekocht und die gesamten Filtrate und Waschwasser schließlich bei etwa 15 mm Druck und einer Außentemperatur von 40° zum Sirup eingedampft. Diesen gossen wir in eine Schale und vermengten das erhaltene Produkt, nachdem wir es noch etwa 8 Stunden auf dem Wasserbade weiter eingeengt hatten, mit Kieselgur, um eine feste Masse zu erhalten. Diese brachten wir nun portionenweise in den Soxhlet und extrahierten mit Essigäther, bis jeweilen eine Probe des abfließenden Lösungsmittels beim Verdunsten keinen Rückstand mehr hinterließ. Nach dem Abdestillieren des Essigäthers hinterblieb ein rotbraun gefärbtes Öl, das intensiv nach Fleischextrakt roch. Es wurde in Alkohol aufgenommen und mit Tierkohle gekocht. Aus dem klaren Filtrat ließen sich durch Einengen drei Krystallfraktionen gewinnen. Die erste wog roh 6 g, die zweite 14 g und die dritte durch Fällung mit Wasser erhaltene 20 g. Diese Produkte waren offenbar noch sehr unrein. Sie wurden einzeln durch Umkrystallisieren aus Wasser gereinigt.

Fraktion I: Eine Probe wurde in wässriger Lösung mit Kupferoxyd gekocht. Die Lösung blieb farblos. In verdünnter Salzsäure löste sich das Produkt nicht. Es schmeckte bitter. Je 2 g des Rohproduktes wurden in 1 l Wasser gelöst und die Lösung durch Kochen mit Tierkohle entfärbt. Beim Abkühlen

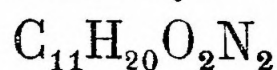
schieden sich feine Nadelchen ab. Die Gesamtausbeute an diesem Produkt betrug 1 g. Aus den Mutterlaugen erhielten wir noch 3 g eines weniger reinen Produktes. Das erstere krystallisierten wir aus Essigäther um. Wir erhielten eine erste Krystallisation von 0,65 g. Die Ausscheidung war sehr voluminös. Die genannten aus der Mutterlauge erhaltenen 3 g Substanz krystallisierten wir gleichfalls aus Essigäther um und erhielten 1 g eines Produktes, das die gleichen Eigenschaften zeigte, wie das eben erwähnte. Die bei 105° im Toluolbad bis zum konstanten Gewicht (4 Stunden) getrocknete Substanz bräunte sich beim Erhitzen im Kapillarrohr gegen 280° und war bei 285° (unkorr.) völlig zersetzt.

0,1685 g Substanz gaben 0,3873 g CO₂ und 0,1445 g H₂O.

0,1131 » » » 12,8 ccm N (19°, 758 mm).

Berechnet für Leucyl-valinanhydrid:

Gefunden:



62,21 % C, 9,43 % H u. 13,20 % N. 62,68 % C, 9,40 % H u. 13,01 % N.

0,1900 g Substanz in Eisessig gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 4,4134 g. Spezifisches Gewicht 1,04. $\alpha = 1,98^\circ$ nach links im 1 dm-Rohr bei Natriumlicht. $[\alpha]_{20}^D = -44,27^\circ$.

1 g des reinen Produktes wurde zunächst mit der 5 fachen Menge 25 % iger Schwefelsäure am Rückflußkühler gekocht. Es gelang nicht, auf diese Weise innerhalb 18 Stunden vollständige Hydrolyse herbeizuführen. Der Hauptteil war noch ganz unangegriffen. Wir gewannen deshalb das Anhydrid wieder und kochten es 8 Stunden mit 25 ccm rauchender Salzsäure (vom spezifischen Gewicht 1,19). Es schieden sich während der Hydrolyse in kleinen Mengen bräunliche Flocken aus. Von ihnen wurde abfiltriert und das Filtrat auf dem Wasserbade zur Trockene verdampft. Den Rückstand lösten wir in Wasser und gaben etwas überschüssiges Ammoniak zu. Es trat sofort Ausscheidung weißer Massen ein. Diese wurden abfiltriert und der Rückstand mit wenig Wasser ausgewaschen. Das Filtrat wurde eingeeengt, die sich ausscheidenden Krystalle abfiltriert, mit Wasser gewaschen und mit Alkohol ausgekocht, bis das beigemengte Chlorammon vollständig entfernt war. Die erste Abscheidung war gleich frei von Chlorammon gewesen. Die

Mutterlauge der zweiten Krystallisation versetzten wir zur Entfernung des Ammoniaks mit überschüssigem Baryt und dampften unter vermindertem Druck bei 40° Außentemperatur völlig zur Trockene ein. Den Rückstand lösten wir in Wasser und entfernten den Baryt quantitativ mit Schwefelsäure und dann im Filtrat vom Baryumsulfat die Salzsäure durch Schütteln mit Silbersulfat. Das gelöste Silber fällten wir dann mit $\frac{1}{10}$ -n-Salzsäure und die Schwefelsäure mit Baryt. Von den erhaltenen Substanzmengen bestimmten wir das optische Verhalten in 20%iger Salzsäure. Wir erhielten für salzsaures Leucin berechnet $[\alpha]_{20}^D = +19,3^\circ$ und $+17,3^\circ$. Diese Zahlen deuten auf ein Gemisch von Leucin und Valin. Um diese beiden Aminosäuren zu trennen, stellten wir deren Kupfersalze dar und fraktionierten diese. Die Analyse der ersten Krystallfraktion ergab:

0,0988 g Substanz gaben 0,0237 g CuO.	
Berechnet für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$:	Gefunden:
19,60% Cu.	19,13% Cu.

Die dritte Krystallfraktion ergab:

0,1012 g Substanz gaben 0,0271 g CuO.	
Berechnet für $(C_5H_{10}NO_2)_2Cu$:	Gefunden:
21,49% Cu.	21,35% Cu.

Es unterliegt somit keinem Zweifel, daß das untersuchte Produkt Leucin und Valin enthalten hat. Fraglich bleibt vorläufig, ob Leucyl-valinanhydrid vorhanden war oder ein Gemisch von Leucinimid und Valinanhydrid. Da die Krystalle ein recht einheitliches Aussehen zeigten, neigen wir der Ansicht zu, daß erstere Verbindung vorgelegen hat. Eine Entscheidung wird erst zu treffen sein, wenn das synthetische Produkt bekannt ist.

II. Fraktion. Das Rohprodukt hatte gallertige Konsistenz und löste sich in diesem Zustand viel leichter in Wasser als die I. Fraktion. Für 6 g Substanz brauchten wir einen Liter kochendes Wasser zur Lösung. Sie wurde mit Tierkohle versetzt, filtriert und abgekühlt. Hierbei schieden sich 2 g einer krystallinischen Substanz direkt aus. Aus der Mutterlauge erhielten wir durch Einengen noch 9,0 g an Krystallen.

Die ersteren 2 g krystallisierten wir aus Essigäther um. Wir erhielten 0,5 g einer nach dem Trocknen im Toluolbad gegen 270° sich allmählich unter Sublimation verflüchtigenden Substanz.

0,1663 g Substanz gaben 0,3900 g CO_2 und 0,1452 g H_2O .

0,1119 » » » 12,2 ccm N (19° , 758 mm).

Berechnet für Leucinimid $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{N}_2$:

Gefunden:

63,71% C, 9,73% H u. 12,39% N. 63,95% C, 9,70% H u. 12,53% N.

0,1242 g Substanz in Eisessig gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 4,3438 g. Spezifisches Gewicht 1,04. $\alpha = 1,00^{\circ}$ nach links im 1 dm-Rohr bei Natriumlicht. $[\alpha]_{20}^{\text{D}} = -33,74^{\circ}$. Das synthetische Leucinimid aus l-Leucyl-l-leucin hat $[\alpha]_{20}^{\text{D}} = -42,5^{\circ}$. Unser Produkt war somit zum Teil racemisch.

Aus den erwähnten 9,0 g der zweiten Krystallisation erhielten wir durch Umkrystallisieren aus Essigäther noch 2 g desselben Produktes, dessen Eigenschaften oben angegeben wurden. Erwähnt sei noch, daß das reine Produkt in Wasser sehr schwer löslich ist und beim Abkühlen der heißen Lösung in feinen Nadelchen herauskommt. Sie sind oft büschelförmig verwachsen. In Methylalkohol lösen sie sich viel leichter als in Wasser. Sehr leicht löslich sind sie in Eisessig.

Zur totalen Hydrolyse kochten wir 1 g der reinen Substanz mit 25 ccm rauchender Salzsäure 6 Stunden am Rückflußkühler. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie bei Fraktion I. Vom isolierten Produkt bestimmten wir zunächst das optische Verhalten.

0,0934 g Substanz in 20% iger Salzsäure gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 4,6768 g. $\alpha = 0,37^{\circ}$ nach rechts im 1 dm-Rohr und bei Natriumlicht. $[\alpha]_{20}^{\text{D}} = +14,50^{\circ}$.

Das Kupfersalz der isolierten Verbindung zeigte folgenden Kupfergehalt:

0,1494 g Substanz gaben 0,0364 g CuO .

Berechnet für $(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_2)_2$:

Gefunden:

19,60% Cu.

19,41% Cu.

Alle Daten stimmen somit mit der Annahme, daß Leucinimid vorgelegen hat, überein.

Fraktion III. Das Rohprodukt zeigte deutlich ausgebildete Blättchen. Es wurde mehrmals aus Wasser unter Anwendung von Tierkohle umkrystallisiert. Das gereinigte Produkt wog 12,0 g. Es löste sich in verdünnter Salzsäure nicht und gab beim Kochen mit frisch gefälltem Kupferoxyd keine Blaufärbung. Das erhaltene Produkt wurde aus Essigäther umkrystallisiert. Die erste Krystallfraktion wog 7,0 g. Sie wurde nochmals aus Wasser umkrystallisiert. Erhalten wurden 2 g sehr schwer lösliches Produkt. Das im Vakuum bei 105° getrocknete Produkt sinterte bei raschem Erhitzen gegen 258° und war bei 265° (unkorr.) völlig zersetzt.

0,1205 g Substanz gaben 0,2910 g CO_2 und 0,0700 g H_2O .

0,1740 » » » 19,2 ccm N (16° , 758 mm).

Berechnet für Phenylalanyl-alanin-
anhydrid $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$:

Gefunden:

66,05% C, 6,47% H u. 12,84% N. 65,86% C, 6,45% H u. 12,83% N.

0,1119 g Substanz in Eisessig gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 3,4680 g. Spezifisches Gewicht 1,04. $\alpha = 2,00^{\circ}$ nach links im 1 dm-Rohr und bei Natriumlicht. $[\alpha]_{20}^{\text{D}} = -59,73^{\circ}$.

Für das synthetische l-Phenylalanyl-d-alaninanhydrid gibt Schoeller¹⁾ $[\alpha]_{20}^{\text{D}} = +66,32^{\circ}$ an.

Die totale Hydrolyse dieses Anhydrids durch 6stündiges Kochen mit 25 ccm rauchender Salzsäure ergab l-Phenylalanin und d-Alanin. Zur Trennung dieser beiden Aminosäuren benützten wir die schwere Löslichkeit des salzsauren Phenylalanins in Salzsäure. Wir erhielten 0,45 g salzsaures Phenylalanin. Die Ausbeute wurde etwas vermindert durch Verluste, die wir beim Versuche, Phenylalanin und Alanin als solche durch Krystallisation zu trennen, gehabt hatten.

0,1226 g Substanz gaben 7,2 mm N (22° , 761 mm).

Berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$:

Gefunden:

6,94% N.

6,70% N.

¹⁾ Walter Schoeller, Über die Spaltung des Phenylalanins in seine optisch aktiven Komponenten mittels der Formylverbindung. Über die d-Bromhydrozimmtsäure und zwei aktive Dipeptide, Derivate des l-Phenylalanins. Inaug.-Diss., Berlin 1906.

Die Mutterlauge des salzsauren Alanins verdampften wir im Vakuumexsikkator über Kalk und Schwefelsäure zur Trockene.

0,1248 g Substanz in Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 4,9024 g. $\alpha = 0,20^\circ$ nach rechts. $[\alpha]_{20}^D = + 7,87^\circ$.

Schließlich setzten wir aus dem salzsauren Alanin das Alanin noch durch Kochen von dessen Lösung mit gelbem Bleioxyd in Freiheit und stellten das Kupfersalz der freien Aminosäure dar.

0,1060 g Substanz gaben 0,0356 g CuO.

Berechnet für $(C_3H_6NO_2)_2$:	Gefunden:
26,54 % Cu.	26,79 % Cu.

Einen ganz analogen Versuch haben wir mit demselben Präparat von Casein und 16stündigem Erhitzen mit der 5fachen Menge 25%iger Schwefelsäure durchgeführt. Wir erhielten aus 500 g Casein 12 g Rohprodukt an Anhydriden und konnten Leucinimid und Phenylalanyl-alanin isolieren. Die reinen Produkte wogen zusammen 4,5 g. Endlich haben wir 100 g nach Hammarsten dargestelltes Casein 16 Stunden mit der 5fachen Menge 25%iger Schwefelsäure gekocht. Wir erhielten nur 1 g an Rohprodukt und daraus 0,75 g an reinen Substanzen. Bei diesen beiden Versuchen, denen sich noch ein dritter mit 500 g gewöhnlichem Casein anschließt, haben wir das Einengen der von der Schwefelsäure befreiten Flüssigkeitsmengen ausschließlich unter vermindertem Druck bei 35° Außentemperatur vorgenommen. Bei dem dritten Versuch erhielten wir 0,75 % an reinen Anhydriden.

II. Hydrolyse mit rauchender Salzsäure.

500 g gewöhnliches Casein wurden 6 Stunden mit 1500 ccm rauchender Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 am Rückflußkühler gekocht. Es entstanden dabei größere Mengen von Huminsubstanzen. Sie wurden abfiltriert, der Rückstand mit Wasser ausgekocht und die vereinigten Filtrate unter vermindertem Druck bei 40° des Wasserbades stark eingeengt. Den Rückstand lösten wir in Wasser und engten wieder zur Trockene ein. Diesen Prozeß wiederholten wir, um möglichst viel Salzsäure zu entfernen. Schließlich lösten wir den Rückstand in 1900 ccm Wasser und bestimmten in 10 ccm genau den Chlor-

gehalt. Wir setzten dann zu der Gesamtlösung die berechnete Menge Natronlauge und dampften nun die ganze Flüssigkeit auf dem Wasserbade möglichst stark ein. Die verbleibende sirupöse Masse vermengten wir mit Kieselgur und extrahierten die nun feste Masse mit Essigäther im Soxhlet. Beim Verdampfen des Essigäthers hinterblieb zunächst ein Öl, das bald krystallinisch erstarrte. Die Krystallmasse wurde in Alkohol heiß gelöst. Beim Abkühlen schieden sich feine Nadelchen ab. Ihre Menge betrug 3,8 g. Sie wurden noch aus Wasser umkrystallisiert. 1 g der Substanz brauchte etwa 1 l Wasser zur Lösung. Das bei 105° getrocknete Produkt zersetzte sich unter Sublimation gegen 270° (unkorr.).

0,1061 g Substanz in Eisessig gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 4,2394 g. $\alpha = 1,10^\circ$ nach links im 1 dm-Rohr und bei Natriumlicht. $[\alpha]_{20^\circ}^D = -42,3^\circ$.

0,1894 g Substanz gaben 0,4413 g CO₂ und 0,1617 g H₂O.

0,1736 » » , 15,0 ccm ¹/₁₀-Normal-Schwefelsäure (Kjeldahl).

Berechnet für Leucinimid (C₁₂H₂₂O₂N₂):

Gefunden:

63,71% C, 9,73% H u. 12,38% N. 63,54% C, 9,48% H u. 12,13% N.

Außer diesem einen Anhydrid ließ sich kein weiteres nachweisen. Vor allem fehlte das Phenylalanyl-alaninanhydrid offenbar ganz.

