

118. E. Schulze und A. Likiernik: Ueber die Constitution des Leucins.

(Eingegangen am 25. Februar.)

Während für die meisten der beim Eiweisszerfall entstehenden Amidosäuren, nämlich für die Asparaginsäure, die Glutaminsäure, das Tyrosin und die Phenylamidopropionsäure¹⁾ die Frage der Constitution endgiltig entschieden ist, gilt nicht das Gleiche für das Leucin. Wir wissen nur, dass wir dasselbe als eine Amidocaprönsäure anzusehen haben²⁾, aber es ist nicht bekannt, von welcher Caprönsäure es sich ableitet. Hüfner³⁾ suchte einen Beitrag zur Lösung dieser Frage zu liefern, indem er zwei synthetisch dargestellte Amidocaprönsäuren, von denen die eine aus normaler Monobromcaprönsäure⁴⁾ und Ammoniak, die zweite aus Isovaleraldehyd-Ammoniak und Blausäure erhalten war, mit Leucin verglich. Er fand jene beiden Amidosäuren im Aussehen dem Leucin sehr ähnlich, auch der Sublimationspunkt war fast der gleiche; beträchtliche Differenzen zeigten sich jedoch in der Löslichkeit; insbesondere war die aus Valeraldehyd dargestellte Amidosäure schwerer löslich als Leucin. (1 Theil der ersteren bedurfte bei 12° 117.5 Th. Wasser zur Lösung.)

Auf Grund unserer gegenwärtigen Kenntnisse muss es aber für wahrscheinlich erklärt werden, dass die von Hüfner ausgeführten Versuche eine Entscheidung der obigen Frage gar nicht bringen konnten. Denn das von Hüfner verwendete Leucin war vermuthlich optisch activ, während die synthetisch dargestellten Amidocaprönsäuren optisch inactiv sind⁵⁾. Inactive Körper können aber von

¹⁾ Dass die beim Eiweisszerfall entstehende Phenylamidopropionsäure eine optisch active Modification der von E. Erlenmeyer und A. Lipp (diese Berichte XV, 1006; Ann. Chem. Pharm. 219, 194) synthetisch dargestellten Phenyl- α -Amidopropionsäure ist, kann als zweifellos angesehen werden; der Beweis dafür liegt insbesondere in der von E. Schulze und E. Nägeli (Zeitschr. f. physiol. Chemie 11, 201) gemachten Beobachtung, dass man jene Amidosäure nach dem von Erlenmeyer und Lipp angegebenen Verfahren in Tyrosin umwandeln kann.

²⁾ Denn das Leucin liefert nach den Versuchen Hüfner's (Zeitschrift f. Chemie 1868, 391) beim Erhitzen mit Jodwasserstoffsäure im zugeschmolzenen Rohr Caprönsäure und Ammoniak.

³⁾ Journ. für prakt. Chem. N. F. 1, 6.

⁴⁾ Die von Hüfner verwendete Bromcaprönsäure war aus Gährungs-caprönsäure, also aus der normalen Säure, dargestellt.

⁵⁾ Dass dem durch Erhitzen von Eiweisstoffen mit Säuren dargestellten Leucin optische Activität zukommt, ist zuerst im Jahre 1883 von Mauthner (Zeitschr. f. physiol. Chemie 7, 223) nachgewiesen worden. Hüfner macht über die Beschaffenheit des von ihm verwendeten Leucins keine näheren An-

ihren activen Modificationen ausser im optischen Verhalten auch in anderen Punkten differiren. Will man also auf dem von Hüfner eingeschlagenen Wege zu einem Resultat gelangen, so muss man, wie man jetzt voraussagen kann, die synthetisch dargestellten Amidocaprinsäuren mit inactivem Leucin vergleichen, welches man durch Erhitzen von Eiweissstoffen mit Barytwasser auf 160° oder auch durch gleiche Behandlung von activem Leucin leicht darstellen kann, wie der Eine von uns in Verbindung mit J. Barbieri und E. Bosshard ¹⁾ gezeigt hat.

Es schien daher angezeigt, die Untersuchung über die Constitution des Leucins wieder aufzunehmen.

Wenn eine jener beiden synthetisch dargestellten Amidocaprinsäuren die Structur des Leucins besitzt, so muss sie erstens die gleiche Löslichkeit zeigen, wie das inactive Leucin, zweitens muss sie bei Einwirkung von *Penicillium glaucum* eine active Isomere liefern, welche mit dem in gleicher Weise von E. Schulze und E. Bosshard ²⁾ aus inactivem Leucin dargestellten Product in den Eigenschaften übereinstimmt. Drittens endlich muss sie bei Einwirkung von salpetriger Säure die gleiche Oxycaprinsäure liefern, wie das inactive Leucin.

In allen diesen Punkten stimmt nun in der That die α -Amidoisobutylessigsäure, welche wir uns aus Isovaleraldehydammoniak und Blausäure nach bekannter Methode dargestellt haben, mit dem inactiven Leucin (dargestellt durch Erhitzen eines pflanzlichen Eiweissstoffes mit Barytwasser auf 160°) überein.

Was zunächst die Löslichkeit betrifft, so ergab sich, dass 1 Theil α -Amidoisobutylessigsäure bei 13° 105 Theile Wasser zur Lösung bedurfte ³⁾. E. Schulze und E. Bosshard ⁴⁾ fanden für inactives Leucin eine Löslichkeit von 1:102.4 bei 21° ; für ein anderes Präparat wurde eine Löslichkeit von 1:106.5 bei Zimmertemperatur gefunden ⁵⁾.

gaben; er sagt nur, dass er für seine früheren Versuche Leucin benutzt habe, welches aus Hornspähen mittelst Schwefelsäure oder aus Fibrin mittelst Pankreas dargestellt worden war.

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie 9, 108, sowie 10, 135.

²⁾ Ebendaselbst, 10, 138.

³⁾ Auf die nicht beträchtliche Differenz dieses Resultats, von dem durch Hüfner (m. vgl. o.) erhaltenen ist kein Gewicht zu legen. Dass z. B. verschiedene Präparate des gleichen Leucins je nach dem grösseren oder geringeren Grad ihrer Reinheit ziemlich stark in der Löslichkeit differiren können, hat E. Schulze (Zeitschr. für physiol. Chem. 9, 254) gezeigt.

⁴⁾ Zeitschr. für physiol. Chem. 10, 136.

⁵⁾ Zeitschr. für physiol. Chem. 9, 111.

Die Behandlung der α -Amidoisobutyllessigsäure mit *Penicillium glaucum* führten wir im Wesentlichen nach den von E. Schulze und E. Bosshard in der früher erwähnten Untersuchung befolgten Vorschriften aus. Die wässerige Lösung der genannten Amidosäure wurde, nachdem ihr die für die Entwicklung des Pilzes erforderlichen anorganischen Nährstoffe¹⁾ und etwas freie Phosphorsäure zugefügt worden waren, in einen zuvor sterilisirten und mit einem Baumwollpfropfen versehenen Glaskolben gebracht und in demselben wiederholt (an mehreren aufeinander folgenden Tagen) zum Sieden erhitzt, um alle vorhandenen Keime zu tödten. Sodann wurde etwas reines *Penicillium glaucum*²⁾ eingesät. Nach ungefähr 14 Tagen hatte sich eine ziemlich dichte Pilzdecke gebildet. Nach ungefähr 10 Wochen wurde der Pilz durch Filtration entfernt, das Filtrat mit Barytwasser neutralisirt und nach nochmaliger Filtration im Wasserbade zur Trockne verdunstet. Den Verdampfungsrückstand extrahirten wir in der Wärme mit absolutem Alkohol, welchem etwas concentrirte Ammoniakflüssigkeit zugefügt war. Wir wendeten dieses Extractionsmittel zunächst nur in solcher Menge an, dass nicht alles Leucin in Lösung gehen konnte. Der Rest wurde sodann durch Behandlung mit einer neuen Quantität des Extractionsmittels in Lösung gebracht. Die Lösungen lieferten nach dem Erkalten bald Krystalle. So erhielten wir zwei, aus glänzenden Blättern bestehende Krystallisationen. Die Untersuchung derselben im Soleil-Ventzke'schen Polarisationsapparat lieferte folgende Resultate:

I. Fraction der Krystalle: Eine Lösung in 20procentiger Salzsäure, welche in 20 ccm 0.874 g wasserfreie Substanz enthielt, drehte im 200 mm-Rohr 4.4° nach links. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D = -17.4^{\circ}$.

II. Fraction der Krystalle: Eine ebenso bereitete Lösung, welche in 20 ccm 0.8613 g wasserfreie Substanz enthielt, drehte unter den gleichen Bedingungen 3.6° nach links. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D = -14.4^{\circ}$.

Die erste Fraction der Krystalle zeigte also das gleiche Drehungsvermögen, wie die von E. Schulze und E. Bosshard bei Einwirkung von *Penicillium glaucum* auf inactives Leucin erhaltene active Modification³⁾; sie dreht ferner gleich dem zuletzt erwähnten Pro-

¹⁾ Wir setzten die auch von E. Schulze und E. Bosshard (loc. cit.) verwendeten Nährsalze zu, jedoch mit Weglassung des Chlorammoniums.

²⁾ Wir verdanken dasselbe der Gefälligkeit des Hrn. Dr. von Tavel, Assistent am botanischen Institute des Polytechnikums.

³⁾ Für ein Präparat dieses Products wurde ein Drehungsvermögen von -17.3° , für ein zweites ein solches von -17.5° gefunden. Zwei andere Präparate drehten etwas schwächer, ohne Zweifel deshalb, weil denselben noch etwas inactives Leucin beigemischt war. Letzteres wurde für dasselbe dieser Präparate

duct in salzsaurer Lösung ebenso viel nach links, wie das gewöhnliche aktive Leucin nach rechts dreht. Die zweite Fraction der Krystalle besass ein etwas schwächeres Drehungsvermögen. Vermuthlich war derselben noch etwas vom inactiven Product beigemischt. Der gleiche Fall trat in den Versuchen von E. Schulze und E. Bosshard ein; es wurden in zwei Versuchen Präparate erhalten, deren Drehungsvermögen darauf hinwies, dass ihnen noch inactives Leucin beigemischt war¹⁾.

Die in der beschriebenen Weise enthaltene Modification der α -Amidoisobutylelessigsäure zeigte nun auch eine Löslichkeit, welche derjenigen des aus dem inactiven Leucin durch Einwirkung von Penicillium entstandenen activen Products sehr nahe lag und bedeutend grösser war, als die Löslichkeit der inactiven Modification; 1 Theil derselben (und zwar von der ersten Fraction der Krystalle) bedurfte nämlich bei 13° 41 Theile Wasser zur Lösung, während E. Schulze und E. Bosshard für jene aus dem inactiven Leucin erhaltene active Modification eine Löslichkeit von 1 : 43 bei 18° fanden²⁾.

Zur Ueberführung in die Oxysäure brachten wir die α -Amidoisobutylelessigsäure in wässriger Lösung mit der berechneten Menge von Schwefelsäure und Natriumnitrit zusammen. Nachdem die Reaction sich vollendet hatte, wurde die Flüssigkeit eingedunstet, der Verdampfungsrückstand mit Aether behandelt. Die ätherische Lösung wurde verdunstet, der Rückstand in Wasser aufgenommen, die Lösung mit Kupferacetat versetzt. Es entstand ein hellblauer krystallinischer Niederschlag, welcher abfiltrirt, mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen und sodann durch Schwefelwasserstoff zerlegt wurde. Aus der vom Schwefelkupfer abfiltrirten Lösung der freien Oxysäure gewannen wir die letztere durch Ausschütteln mit Aether, führten sie zur Reinigung noch einmal in das Kupfersalz über, schüttelten sie aus der bei Zerlegung des letzteren erhaltenen Flüssigkeit wieder mit Aether aus und brachten sie sodann zur Krystallisation. Das so gewonnene Product schmolz bei 50°.

direct bewiesen, indem man es noch einmal mit Penicillium zusammenbrachte; sein Drehungsvermögen vergrösserte sich in Folge dessen bis auf obigen Betrag.

¹⁾ vergl. die vorstehende Anmerkung. Es sei noch darauf aufmerksam gemacht, dass die schwächer drehende zweite Fraction der Krystalle nach der Art ihrer Gewinnung einen etwa vorhandenen schwerer löslichen Theil des Products einschliessen musste.

²⁾ Die gleiche Löslichkeit zeigt das gewöhnliche, in salzsaurer Lösung nach rechts drehende Leucin. Für einige durch wiederholtes Umkrystallisiren aus verdünntem Weingeist gereinigte Präparate desselben (dargestellt aus den Eiweisssubstanzen der Kürbis- und Lupinen-Samen) fand E. Schulze (Zeitschrift f. physiol. Chemie, 9, 254—256) eine Löslichkeit von 1 : 45 bis 1 : 46 bei 17—19°, für weniger sorgfältig gereinigte Präparate (denen vermuthlich noch ganz geringe Mengen anderer Amidosäuren anhafteten) eine Löslichkeit von durchschnittlich 1 : 40 bei Zimmertemperatur.

Genau in der gleichen Weise wurde aus dem inactiven Leucin eine Oxysäure dargestellt. Eine Probe der letzteren schmolz bei 50° , eine andere noch besser gereinigte bei 52° ¹⁾.

Man darf also sagen, dass die aus der α -Amidoisobutylelessigsäure und aus dem inactiven Leucin dargestellten Oxysäuren den gleichen Schmelzpunkt besaßen. Dieselben zeigten auch das gleiche Aussehen. Dies gilt auch für die schwer löslichen Kupfer- und Zinksalze der beiden Säuren. Auch zeigten die Zinksalze die gleiche Löslichkeit. Die beiden Säuren sind also für identisch zu erklären.

Die im Vorigen mitgetheilten Versuchsergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die α -Amidoisobutylelessigsäure identisch mit Leucin ist. Allerdings können wir diese Schlussfolgerung zunächst nur für das von uns verwendete Leucin, welches aus einem pflanzlichen Eiweissstoff (Conglutin) dargestellt war, und für die in den Eigenschaften mit demselben übereinstimmenden Leucinpräparate anderer Herkunft aussprechen, denn es ist denkbar, dass nicht alle aus thierischen und pflanzlichen Objecten dargestellten Leucine identisch sind.

Während wir für die α -Amidoisobutylelessigsäure Uebereinstimmung mit Leucin fanden, gilt nicht das Gleiche für die normale α -Amidocapronsäure. Dieselbe erwies sich als leichter löslich in Wasser und gab bei der Einwirkung von salpetriger Säure eine bei 60° schmelzende Oxysäure.

Es sei noch darauf hingewiesen, dass die aus dem inactiven Leucin und aus der α -Amidoisobutylelessigsäure von uns erhaltene Oxysäure verschieden von der Leucinsäure ist, welche man bei Einwirkung von salpetriger Säure auf das gewöhnliche active Leucin erhält. Wir haben uns diese Säure selbst dargestellt und fanden sie optisch wirksam. Der Schmelzpunkt lag bei 73° , was mit der in den chemischen Handbüchern sich findenden Angabe übereinstimmt. Will man alle aus den Leucinen entstehenden Oxysäuren als Leucinsäuren bezeichnen, so wird man sagen müssen, dass mehrere solche Säuren existiren, welche sich ausser im optischen Verhalten auch in anderen Eigenschaften, z. B. im Schmelzpunkt, unterscheiden.

Eine ausführliche Mittheilung über die im Vorigen in aller Kürze dargelegten Versuchsergebnisse soll in der Zeitschrift für physiologische Chemie gemacht werden.

Zürich, agriculturchemisches Laboratorium des Polytechnikums.

¹⁾ Trotz einer kleinen Differenz im Schmelzpunkt ist diese Säure doch wohl für identisch mit der von Erlenmeyer und Sigel (diese Berichte VII, 1109), von Ley (ebendaselbst X, 231) und von Guthzeit (Ann. Chem. Pharm. 209, 240) untersuchten Oxycaprinsäure zu erklären. Der Schmelzpunkt der letzteren lag bei $54-56^{\circ}$. Das Zinksalz besass die gleiche Löslichkeit in Wasser, wie das Zinksalz unserer Säure.