

Nachweis von Pyrrolkörpern in den Proteinstoffen.

Von

N. Troensegaard, Kopenhagen.

(Der Redaktion zugegangen am 20. November 1920.)

Im Jahre 1901 zeigte Nencki in Petersburg, daß im Hämin des Blutes und im Chlorophyll der Pflanzen Pyrrolverbindungen einen sehr wesentlichen Teil ausmachen¹⁾. Nencki hatte schon 1896 die Ansicht ausgesprochen, daß diese beiden Stoffe eine gleichartige Zusammensetzung hätten, und daß die Proteinstoffe ähnliche Verbindungen enthalten müßten²⁾. Nachdem er im Jahre 1901 Pyrrolkörper im Hämin und Chlorophyll nachgewiesen hatte, sah er seine nächste Aufgabe darin, dieselbe Spaltungsmethode an dem animalischen Melanin, dem Bilirubin und besonders an gewissen Substitutionsprodukten der Proteinstoffe zu versuchen³⁾. Nencki benutzte zu seinen Spaltungen eine Mischung von konzentrierter wäßriger Jodwasserstoffsäure, Eisessig-Jodwasserstoff und Phosphoniumjodid. Er erreichte sein Ziel nicht; ein früher Tod machte seinem Lebenswerk ein Ende. Erst im Jahre 1912 wiesen H. Fischer und Röse das Vorhandensein von Pyrrolen im Bilirubin nach⁴⁾. Nenckis Anschauung ist oft umstritten worden; so ist W. Küster 1913 mit Nencki der gleichen Ansicht⁵⁾, während Willstätter dieser Ansicht nicht beitreten kann, bevor mehr Anhaltspunkte vorliegen⁶⁾. Es ist

¹⁾ Nencki und Zaleski Bd. 34, S. 997 (1901); Nencki und Marchelewsky Bd. 34, S. 1687 (1901).

²⁾ Nencki Bd. 29, S. 2877 (1896).

³⁾ Nencki und Zaleski Bd. 34, S. 1010 (1901).

⁴⁾ H. Fischer, Röse Bd. 45, S. 3274 (1912).

⁵⁾ W. Küster H. 88, S. 384 (1913).

⁶⁾ Willstätter und Stoll, Untersuchungen über Chlorophyll S. 5.

bis jetzt nicht gelungen, durch chemische Spaltungsmethoden ungesättigte Pyrrole aus den Proteinstoffen herzustellen.

Nenckis Hypothese stimmt mit einer Anschauung überein, die ich mir von der Zusammensetzung der Proteinstoffe gebildet habe, nämlich daß diese größtenteils aus heterocyclischen Ringen aufgebaut sind, die durch Säuren, Alkalien und Enzyme leicht gespalten werden können, wie ich annehme, weil ein größerer Teil vom Sauerstoff der Proteinstoffe in den heterocyclischen Ringen als Hydroxyl vorhanden ist. Solches Hydroxyl veranlaßt nämlich erfahrungsgemäß eine äußerst leichte Aufspaltung der heterocyclischen Ringe; es ist anzunehmen, daß diese Ringspaltung auf gleiche Weise geschieht, sowohl bei Säure- wie bei Enzymwirkung, wobei sich Aminosäuren bilden.

Die heterocyclischen Verbindungen, auf die ich meine Aufmerksamkeit gerichtet habe, sind Glyoxalin, Pyridin und Pyrrolverbindungen. Pyrrolkörper nachzuweisen, ist der Hauptzweck dieser Arbeit gewesen.

Glyoxalinverbindungen sind schon unter den Spaltungsprodukten der Proteinstoffe als Histidin¹⁾ und als eine Nitrokarbonsäure von Glyoxalin²⁾ gefunden worden.

Gesättigte Pyrrolringe³⁾ befinden sich im Prolin und Oxyprolin⁴⁾.

Ich bin zu dieser Arbeit geführt worden, indem sich mir vor ungefähr 20 Jahren bei einer zufälligen Reduktion vom Proteinstoff des Weizens, dem Gliadin, große Mengen von Indigo und Skatol bildeten. Der Indigo entstand nach beendeter Reduktion dadurch, daß die Luft eine ausgeschiedene weiße Substanz oxydierte, ein Prozeß, den zu wiederholen mir jedoch nicht gelungen ist.

Meine Arbeitshypothese stütze ich auf verschiedene Überlegungen. 1) Es scheint nahezuliegen, ungesättigte Pyrrol-derivate im Proteinstoff des Weizens zu suchen, denn wenn

¹⁾ A. Kossel H. 22, S. 182 (1896).

²⁾ Carl Th. Mörner H. 101, S. 15.

³⁾ Emil Fischer H. 33, S. 151, 163 (1901).

⁴⁾ Emil Fischer Bd. 35, S. 2660 (1902); H. 39, S. 157 (1903).

das Weizenkorn keimt, ist es sogleich imstande, Chlorophyll aus seinem Proteinstoff zu bilden. Daß die Lebensfunktion im Weizenkorn während des Keimens die gesättigte aliphatische Aminosäure in ungesättigte labile Pyrrolverbindungen umbilden sollte, finde ich unwahrscheinlich. 2) Von den organischen Verbindungen der drei Hauptgruppen, aus denen sich der lebendige Organismus aufbaut, nämlich Kohlehydraten, Fetten und Proteinstoffen, zeigen die zwei ersten Gruppen eine große Übereinstimmung in der Zusammensetzung der Spaltungsprodukte, während die Spaltungsprodukte der Proteinstoffe höchst ungleich sind.

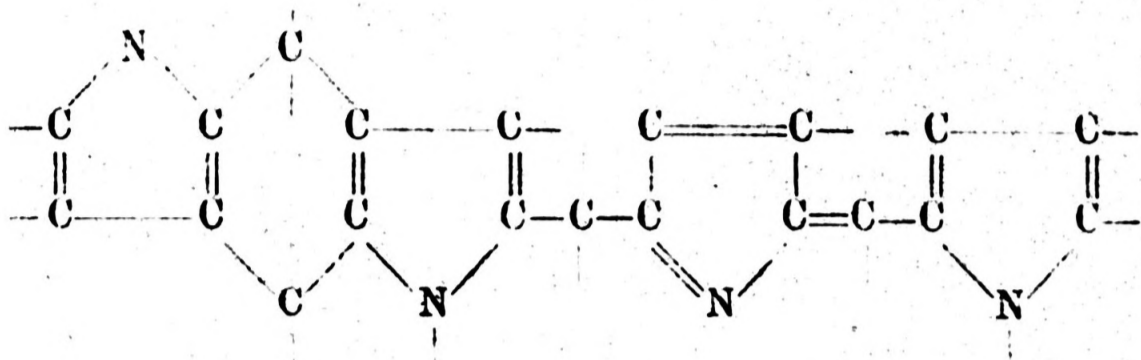
Die Mannigfaltigkeit und Ungleichheit der Spaltungsprodukte stimmt sehr schlecht mit der großen Gleichartigkeit überein, die man in der elementaren Zusammensetzung der Proteinstoffe findet; besonders habe ich es merkwürdig gefunden, wenn der Stickstoffgehalt der Aminosäuren von 8% im Tyrosin bis zu 32% im Arginin variiert, daß man dann keine genuinen Proteinstoffe gefunden hat, deren Stickstoffgehalt sich diesen Grenzzahlen nähert.

Auch muß auf die Schwierigkeiten hingewiesen werden, bei verschiedenen Spaltungen, gleichartige Analysenresultate der Spaltungsprodukte eines Proteinstoffes zu erhalten.

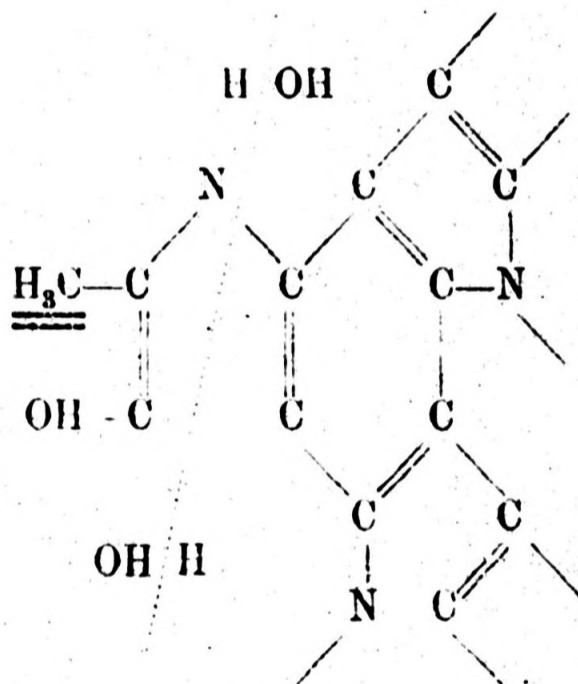
Es ist auffallend, daß die Aminogruppen in den aliphatischen Aminosäuren meistens in der α -Stellung stehen. Dieses Verhältnis kann eine wahrscheinliche Erklärung durch die Hypothese erhalten, daß die Aminosäuren durch Spaltung von labilen Oxypyrrolen entstehen.

In Übereinstimmung mit Pilotys Formeln für Hämin und Bilirubin (vgl. Formel I S. 89) kann man annehmen, daß das Proteinmolekül Ringsysteme enthält, die aus drei Oxypyrrolkernen zusammengesetzt sind, wie in Formel II angedeutet; ein Benzolring entsteht dann als innerer Kern. Aus einem solchen Körper können aliphatische Aminosäuren mittels Hydrolyse abgespalten werden, indem für jeden Oxypyrrolring, der gespalten wird, zwei Moleküle Wasser aufgenommen werden. Nach dem aus Formel II angedeuteten Zersetzungsschema bildet sich dann Alanin. Wenn die markierte Methyl-

gruppe durch Homologe des Methyls ersetzt ist, werden andere aliphatische α -Aminosäuren hieraus abgeleitet. Gleichzeitig erklärt die Formel II das Vorhandensein des Benzolringes in den Spaltungsprodukten der Proteinstoffe. Ebenso sieht man, daß Asparaginsäure und Glutaminsäure abgespalten werden können, falls man die Oxypyrrole durch Oxyphonopyrrolcarbon-säuren ersetzt.



Formel I:
Ringsystem im Hämin nach Piloty¹⁾.



Formel II:
Provisorisches Modell des Ringsystems der Proteine.

Man kann sich das Entstehen des Histidins denken, falls ein Wasserstoffatom in der Methylgruppe des Pyrrols durch einen Glyoxalinring ersetzt wird. Das Entstehen von Phenylalanin und Tyrosin ist denkbar bei der Spaltung von dreikernigen Oxypyrrolsystemen durch Abspaltung zweier Pyrrolreste. Die Anwesenheit des Tryptophans in den Spaltungs-

¹⁾ Piloty, Stock und Dørmann A. 406, S. 353 und 356.

produkten der Proteinstoffe läßt sich auch durch dieselbe Theorie erklären, und auch meine Beobachtung der Bildung größerer Mengen von Indigo und Skatol bei Reduktion des Gliadins und ihre Bildung durch Alkalischmelze stützt die Anschauung, daß die Aminosäuren Spaltstücke von Oxypyrrolen sind. Die Aufstellung der bestimmten Trioxypyrrolformel II ist natürlich nur geschehen, um meinen Gedankengang klarzulegen, und nicht in der Meinung, daß die Zusammensetzung der Eiweißkörper gerade durch sie genau ausgedrückt werden sollte. Ich bin durchaus damit vertraut, daß nicht bei den β -Oxyindolen sondern bei den α -Oxyindolen sich der Pyrrolring durch Alkalien öffnen läßt; wie die Spaltung geschieht, wenn drei Oxypyrrolkerne vorhanden sind, ist jedoch unbekannt. Mein Hinweis auf Pilotys Pyranthracensysteme im Hämin berechtigt mich einigermaßen dazu, meine Theorie aufzustellen, insofern sich ungesättigte Pyrrolkörper in den Proteinstoffen nachweisen lassen. Dies ist mir auch gelungen.

Wenn man Proteinstoffe spalten will, um ungesättigte Pyrrole nachzuweisen, muß die Spaltung so unternommen werden, daß man die Aussicht hat, eventuell entstandene Pyrrolkörper isolieren zu können; deshalb sind die bis jetzt angewandten Spaltungsmethoden für Proteinstoffe unanwendbar.

Ich habe mich besonders mit dem für den Weizen typischen Proteinstoff Gliadin und mit Gelatine beschäftigt, die beide als die am einfachsten zusammengesetzten Proteinstoffe betrachtet werden müssen. Teils durch Kjeldahls¹⁾ und Osbornes²⁾, teils durch Gröh und Friedls³⁾ Untersuchungen ist erwiesen worden, daß Gliadin aus einem einzigen Proteinstoff besteht.

Um die Zersetzung eventuell gebildeter Pyrrolverbindungen zu umgehen, habe ich mich bemüht, wasserhaltige

¹⁾ Kjeldahl, Bied. Central. Bd. 25, S. 197—199 (1896); Meddeleser fra Carlsberglaboratoriet Bind V, XII (1903).

²⁾ Osborne and Vorhees, Amer. Chem. Journ. Bd. 15, S. 392 (1893).

³⁾ Gröh und Gustav Friedl, Biochem. Zeitschr. Bd. 66, S. 154 bis 164 (1914).

Lösungsmittel zu vermeiden, und habe versucht, Radikale einzuführen, welche die Pyrrolgruppen während der Spaltung stabilisieren können. Da saure Radikale die Pyrrolkörper stabilisieren, während basische Radikale in entgegengesetzter Weise wirken, dürfte eine Acetylierung zweckmäßig sein. Die Proteinstoffe, die ich untersucht habe, lassen sich jedoch nicht direkt acetylieren; nachdem sie aber in wasserfreiem methylalkoholischen Kali gelöst worden sind, gelingt es leicht.

Gliadin löst sich recht schnell im wasserfreien methylalkoholischen Kali, besonders wenn es bei 130° getrocknet worden ist und das Kalihydrat durch Schmelzen annähernd entwässert ist. Bei der Lösung im wasserfreien methylalkoholischen Kali entwickelt sich im Gegensatz zu dem Verhalten bei der Lösung in wasserhaltigem Kali kein Ammoniak; erst bei längerem Kochen werden geringe Mengen entwickelt.

Die methylalkoholische Gliadinlösung wird von Äthyl- und Amylalkohol nicht gefällt und der Methylalkohol kann nach dem Zusatz von Äthyl- oder Amylalkohol abdestilliert werden, ohne daß der Proteinstoff gefällt wird. Das Kalihydrat in der methylalkoholischen Lösung läßt sich mittels Essigester und einigem Kochen neutralisieren; man entgeht dadurch der Wasserbildung. Eine Neutralisierung mit Kohlensäure oder anderen Säuren ist nicht anwendbar, da der Proteinstoff mit denselben reagiert und gänzlich oder teilweise gefällt wird.

Die neutralisierte methylalkoholische Lösung wird im Vakuum eingedampft und auf gewöhnliche Weise mit wasserfreiem, essigsauerm Natron und Essigsäureanhydrid acetyliert. Das acetylierte Gliadin wird in Chloroform gelöst, indem die Feuchtigkeit der Luft ferngehalten wird; man läßt es 24 Stunden in einem Eisschrank stehen, wobei eine Verbindung CH_3COOK , $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ ¹⁾ gefällt wird. Das acetylierte Gliadin wird mit wasserfreiem Äther gefällt und gut ausgewaschen.

Das acetylierte Gliadin läßt sich in Eisessig, Pyridin, Chloroform und Methylalkohol lösen, dagegen nicht in Wasser.

¹⁾ H. Franzen, Bd. 41, S. 3641.

Durch Behandlung mit Wasser wird es zersetzt und in Chloroform unlöslich. Ca. 3% des gesamten Stickstoffes lassen sich nach van Slykes Methoden als Aminostickstoff bestimmen.

Das acetylierte Gliadin enthält von 0,3 bis 1,02 äquivalente Acetyl für je einen Stickstoff; die eingeführte Menge hängt davon ab, wie lange man mit Methylalkohol und mit Essigsäureanhydrid kocht. Kocht man $\frac{1}{2}$ Stunde mit Methylalkohol und 8 Minuten mit Essigsäureanhydrid, so erhält man ein Produkt, welches 36,8% Acetyl und 11,7% Stickstoff enthält, oder annähernd ein Acetyl für jedes Stickstoffatom. Das im Vakuum getrocknete acetylierte Gliadin verliert bei Erhitzen bis 110° im Hochvakuum 6—10% im Gewicht, teils Äther, teils ein Teil des gebundenen Acetyls; man muß deshalb sowohl Erwärmung als Feuchtigkeit vermeiden.

Das mit höchst verschiedenen Prozentzahlen Acetyl acetylierte Gliadin enthält annähernd dieselbe Menge Stickstoff, nämlich ca. 11,7%; es müssen also bei der Acetylierung kohlenstoffhaltige oder sauerstoffhaltige Teile aus dem methylierten Gliadin verschwinden, die dem Gewicht nach das hinzukommende Acetyl äquivalieren müssen.

Löst man das acetylierte Gliadin in wasserfreier Essigsäure ohne Erwärmung und fällt es mit Jodwasserstoff, der in Essigsäure gelöst ist, so wird ein Jodid kristallinischen Charakters unter teilweiser Abspaltung von Acetyl oder Acetat gefällt. Dieses Jodid läßt sich in Pyridin und Alkohol lösen, dagegen nicht in Wasser, welches es nach einiger Zeit zersetzt. Solche Jodide werden sich sicher zu einem genaueren Studium der Proteinstoffe eignen.

Sucht man das Jodid des Gliadins durch teilweise Lösung in Methylalkohol zu fraktionieren, so gibt es keinen größeren Unterschied zwischen dem Jod- und Stickstoffgehalt der beiden Fraktionen.

Das Jodid ertrug Erhitzen bis zu 100° im Hochvakuum und verlor dadurch 3% an Gewicht. Obengenanntes acetyliertes Gliadin mit 36,8% Acetyl ergab ein Jodid, das 10,0% Acetyl und 9,53% Stickstoff enthielt.

Alle die Proteinstoffe, die ich untersucht habe, lassen sich

in obengenannter Weise in Methylalkohol lösen, acetylieren und mit Jodwasserstoff fällen; bei einigen ist das Jodid in Essigsäure-Jodwasserstoff löslich, kann dann aber mit wasserfreiem Äther gefällt werden.

Um die gewünschten Pyrrole zu erhalten, löst man das acetylierte Gliadin in wasserfreier Essigsäure; am besten benutzt man Präparate mit 17–27% Acetyl, also nicht völlig acetylierte. Danach wird mit 40% Eisessig-Jodwasserstoff gefällt. Beim Erwärmen in einem Wasserbad löst sich das zuerst ausgeschiedene Jodid, bei weiterer Erwärmung während 5 Minuten beginnt aber ein anderes Jodid sich abzuscheiden; in diesem Augenblick setzt man tropfenweise eine geringe Menge konzentrierte wäßrige Jodwasserstoffsäure hinzu; so viel, daß die zweite Abscheidung verhindert wird; danach erwärmt man es im kochenden Wasserbad 10 Minuten lang, entfernt darauf das abgeschiedene Jod mit Phosphoniumjodid und möglichst wenig Wasser. Die Lösung ist klar und es finden keine Melaninbildungen statt, selbst bei stärkerem Erhitzen mit dem Jodwasserstoff. Die Melaninbildung bei gewöhnlicher Säurespaltung stammt wahrscheinlich von den jetzt nachgewiesenen Pyrrolen. Man kühlt die Lösung mit Eis, verdünnt mit dem gleichen Volumen Wasser und neutralisiert unter Eiskühlung mit Kjeldahl-Natron zu schwach alkalischer Reaktion. Die gesuchten Pyrrolkörper lassen sich dann mittels überhitztem Wasserdampf abdestillieren.

Sie haben die charakteristischen Eigenschaften der Pyrrole, indem sie schwache Basen sind, die sich nicht mit Lackmus titrieren lassen, in Wasser schwer löslich sind und mit Äther daraus ausgeschüttelt werden können. Läßt man sie in verdünnter Schwefelsäure stehen, entsteht ein orangegelber Niederschlag, sie verleihen einem mit Salzsäure befeuchteten Fichtenspan eine stark rote Farbe und geben die charakteristische Pyrrolreaktion mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd.

Die entstandenen Pyrrolbasen sind Mischungen verschiedener Pyrrolkörper, denn wenn einem eine gute Pyrrolausscheidung gelingt und man bei der Dampfdestillation in zwei Fraktionen fraktioniert, so zeigen diese deutlich verschiedene

Farben bei der Aldehydreaktion und geben auch verschiedene Absorptionsspektren im Spektroskop. Ein ganz kleiner Teil der Pyrrolkörper geht nicht mit den Wasserdämpfen über, kann aber mit Äther ausgeschüttelt werden; diese 3. Fraktion gibt eine stark weinrote Aldehydreaktion und wieder ein verändertes Absorptionsspektrum.

Die größte Menge Pyrrolkörper, die ich erlangt habe, macht 6% des gesamten Stickstoffes aus; da aber verschiedene Umstände beim Spaltungsprozeß darauf deuten, daß die Pyrrolkörper als Spaltungsprodukte größerer, sehr labiler Komplexe entstehen, so erwarte ich, daß später bedeutend mehr Pyrrolkerne nachgewiesen werden können. Die Bildung der Pyrrole ist nämlich dadurch bedingt, daß man bei der Neutralisation der wäßrigen, essigsäuren Jodwasserstofflösung mit Natron eine ölhaltige Ausscheidung erhält, lange bevor die Lösung alkalisch wird; hat man erst die Neutralisierung erreicht und die Lösung schwach alkalisch gemacht, klärt sich die Flüssigkeit ab, und die Pyrrolkörper entstehen, indem die Flüssigkeit deutlich nach Dippels Öl riecht.

Die labile ölarartige Ausscheidung in saurer Flüssigkeit ist wie die Phonopyrrolkarbonsäure in Äther löslich, läßt sich aber sehr schwer festhalten.

Die Empfindlichkeit bei der Reaktion des Pyrrolnachweises gegenüber Anwesenheit von Wasser ist dadurch charakterisiert, daß das Entstehen der Pyrrolkörper ausbleibt, falls die Essigsäure, die man zur Lösung und zum Jodwasserstoff gebraucht, 3% Wasser enthält.

Das Hämoglobin enthält 90% Globin und 10% Hämin, und es wäre ein ansprechender Gedanke, wenn das Gliadin eine ähnliche Menge Pyrrolverbindungen enthielte; allein wenn die Spaltung näher geprüft wird, werden sicher größere Mengen Pyrrolverbindungen konstatiert werden. Größere Pyrrolkomplexe zu spalten bereitet immer große Schwierigkeiten, die gesteigert werden, wenn Jod und Sauerstoff fortgeschafft werden sollen; es spielen gleichzeitig so viele variierende Faktoren mit, namentlich kann man nicht erwarten, alles Jod bei der kurzen Erwärmung abspalten zu können.

Ehe ich an diese Arbeit ging, habe ich andere Wege versucht, um Pyrrole im Proteinstoff nachzuweisen, und es ist mir auch gelungen, Pyrrole nachzuweisen, indem ich eine amyalkoholische Lösung von Gelatine mit Natrium hydrierte.

Die gereinigte Gelatine wird im Vakuum über Schwefelsäure, danach in schwachem Wasserstoffstrom und Vakuum bei langsam steigender Temperatur bis zu 160° getrocknet. Die Gelatine darf in dem darin vorhandenen Wasser nicht schmelzen. Einige Gramm der auf diese Weise getrockneten Gelatine und eine gleiche Menge nicht getrockneter Gelatine — unter Rücksichtnahme auf den Wassergehalt — wurde im gleichen Wasserbad mit gleichem Quantum Natriumhydroxydlösung hydrolysiert. Es zeigte sich, daß die Lösungen gleichviel Aminostickstoff, durch van Slykes Methode bestimmt, enthielten, so daß ich annehme, daß die stattgefundene Trocknung keine durchgreifenden Veränderungen in der Zusammensetzung der Gelatine veranlaßt hat.

30 g der getrockneten Gelatine werden in wasserfreiem, methylalkoholischem Kali gelöst, das Kalihydrat mit Essigester neutralisiert. Man setzt ein wenig Amyalkohol hinzu und destilliert den Methylalkohol ab. Die breiartige Masse löst man in wasserfreiem Amyalkohol und hydriert mit Natrium. Von sämtlichem Stickstoff in der methylalkoholischen Lösung waren 3% als Aminostickstoff — nach der van Slykeschen Methode bestimmt — vorhanden. Wurde nicht getrocknete Gelatine benutzt, fand sich bedeutend mehr Aminostickstoff vor. Man neutralisiert die hydrierte Lösung mit Kohlensäure, spaltet sie mit Wasser und schüttelt sie mit Äther aus. Die ätherische amyalkoholische Schicht wird mit Wasser ausgeschüttelt, unter anderem, um das letzte Alkali und die Basen fortzuschaffen, die auch in Wasser löslich sind. Der Äther und der Amyalkohol mit Pyrrolen wurden abdestilliert, letzterer im Vakuum und schwachem Wasserstoffstrom; die nicht flüchtigen Pyrrolbasen lassen sich dann in Äther lösen. Sie zeigen die gewöhnlichen Pyrrolreaktionen. Es entsteht ein Gemisch von Pyrrolkörpern, sowohl von flüssigen als festen,

die meisten flüssigen gehen mit dem Amylalkohol über und werden mit Säure aufgenommen.

Unterläßt man es, die amyalkoholische Schicht mit Wasser auszuschütteln, so erhält man auch stärkere Basen, die in Äther unlöslich, dagegen in absolutem Alkohol löslich sind; ich vermute, daß es Pyrroline sind.

Ich habe auch 10% Äthylalkohol in Amylalkohol angewandt.

3¹/₂% des gesamten Stickstoffes gewann ich als Pyrrol. Man kann bei dieser Spaltungsmethode keinen großen Ertrag erwarten.

Bei der Hydrierung entwickelte sich Ammoniak, 4–6% der gesamten Stickstoffmenge entsprechend.

Zu der wäßrigen Schicht, die vom Amylalkohol getrennt ist, wurden 60 ccm n. NaOH gesetzt. Die Lösung wurde im Vakuum bis zur Trockenheit eingedampft, gegen Ende in schwachem Wasserstoffstrom, um das Wasser zu entfernen. 3 ccm-normal Base, die weder Ammoniak noch primäres Amin enthielt, wurden abdestilliert, und die Salzmasse wurde mit absolutem Alkohol ausgezogen. Aus der alkoholischen Lösung wurden Kali und Natrium mit einem Überschuß von 50% Schwefelsäure gefällt. Das Filtrat wurde, um die Essigsäure zu entfernen, im Vakuum eingedampft. Die Masse wurde in Wasser gelöst, und die Schwefelsäure wurde mit berechnetem Barytwasser gefällt. Das Filtrat wurde eingedampft und war fast vollständig löslich in absolutem Alkohol. 60% des Stickstoffes der ursprünglichen wäßrigen Lösung waren darnach in Alkohollösung. Von diesem Stickstoff waren 52,5% formoltitrierbar nach Sörensens Formoltitriermethode für Aminostickstoff, während nach van Slykes Methode nur 36,1% zu bestimmen waren. Der in Alkohol ungelöste Stickstoff ergab 66,4% formoltitrierbaren und 53,0% van Slykeschen Stickstoff.

Dieser Unterschied, der bedeutend größer ist als bei gewöhnlichen Säurespaltungen, muß mehreren hydrierten, heterocyclischen Ringen, Pyrrolin- oder Pyrrolidin-Derivaten zugeschrieben werden; diese lassen sich nämlich nicht durch

van Slykes Methode bestimmen, sind aber im wesentlichen formoltitrierbar. Dies gibt auch für meine Theorie einen vorläufigen Stützpunkt ab.

Unter den Basen, die gebildet werden, finden sich keine primären Amine; die Carbylaminreaktion war negativ.

Aus dem Angeführten geht hervor, daß die Spaltungsprodukte sich nicht wie die Säurespaltungsprodukte verhalten.

Experimenteller Teil.

Herstellung von Gliadin. Man knete nordamerikanischen Frühjahrsweizen zu einem Teig und wasche das Gluten in einer großen Zentrifuge oder beim Kneten unter rinnendem Wasser aus. Wenn die meiste Stärke ausgewaschen ist, knete man das Gluten einige Male reichlich in eiskaltem, destilliertem Wasser. Dann reiße man das Gluten in kleinere Stücke und bringe es in Äthylalkohol von einer solchen Stärke, daß es 60% Alkohol enthält, wenn das Wasser im Gluten mitgerechnet wird. Darauf lasse man es einige Tage bei 25 bis 35° stehen und schüttele es häufig.

Die Lösung wird abgegossen und die Behandlung des Glutens mit neuem Alkohol etliche Male wiederholt. Die Lösungen werden bei ca. 8° einige Tage hingestellt, wodurch sich ein Bodensatz sammelt, und nach Dekantierung davon werden sie filtriert. Aus den Lösungen wird dann das Gliadin in Kältemischungen ausgefroren. Die alkoholische Mutterlauge, welche noch einen kleinen Teil Gliadin enthielt, kann danach zu neuem Auszug benutzt werden.

Das ausgefrorene Gliadin behandle man danach mit Äther, bis alles Öl gelöst ist.

Das Gliadin wird dann nochmals in 60%igem Alkohol gelöst, filtriert und ausgefroren. Dies wiederholt man noch einmal, nachdem das Gliadin mit reichlich eiskaltem, destilliertem Wasser durchgeknetet worden ist. Das zuletzt ausgefrorene Gliadin knete man zu wiederholten Malen mit absolutem Alkohol, damit es trockne, lasse es schließlich ein paar Tage mit absolutem Alkohol stehen, trockne es danach

teilweise im Vakuum über Schwefelsäure. Um die Zeit, wo das Gliadin eine Pasta, etwas trockener als Bäckereihefe, bildet, läßt es sich leicht pulverisieren, und man siebt es dann durch Müllergaze Nr. 11 oder 12; wird es zu alkoholfrei oder nimmt es etwas Feuchtigkeit auf, ist es sehr schwer zu pulverisieren.

Das Verfahren ist zum Teil nach Kjeldahl.

Die angewandte Gelatine wurde aus französischer Handelsware mit der Marke „Gold“ dargestellt. Die Gelatine wurde an Metallfäden in einem Glasgefäß aufgehängt, wo sie mit kaltem, toluolhaltigem Wasser ausgewaschen wurde, welches dreimal vorsichtig erneuert wurde. Nach 2 Tagen wurde sie auf einem Netz und darauf über Schwefelsäure schnell getrocknet. Der Aschengehalt in der Gelatine sank von 1,2% bis 0,3%. Die ausgewaschene Gelatine löst sich in methylalkoholischem Kali schneller als die nicht ausgewaschene, und zwar fast vollständig klar.

Der Methylalkohol wurde durch Destillation mit Kalihydrat, nachher mit Calcium gereinigt.

Das Kalihydrat wurde durch Schmelzen in einem Silberiegel teilweise entwässert.

Was die Essigsäure betrifft, ist Kahlbaums Essigsäure — frei von höheren Homologen — benutzt worden; diese enthält 0,3—0,4% Wasser und wurde in einem Kolben mit daraufgeschliffenem Kühler 4 Stunden mit 5%igem Essigsäureanhydrid gekocht. In der Essigsäure befand sich danach ein kleiner Überschuß an Essigsäureanhydrid. Der Jodwasserstoff ist nach Travers (Experimentelle Untersuchung von Gasen) hergestellt worden.

Es wurde dafür gesorgt, daß die Feuchtigkeit und der Sauerstoff der Luft während der Absorption vom Jodwasserstoff in der Essigsäure ferngehalten wurde. Die Essigsäure enthielt 45% HJ; sie wurde so aufbewahrt, daß sich die Feuchtigkeit der Luft fernhalten ließ; eine Überbindung mit Gummihaube ist notwendig.

Um Pyrrolbasen vom Gliadin abzuspalten, wendet man Gliadin an, das im Vakuum bei 70° und schwachem Wasser-

stoffstrom vorsichtig getrocknet worden ist. Wenn man Gliadin anwendet, welches vorsichtig bei 130° getrocknet ist, löst dieses sich schneller. Ob das stark getrocknete Gliadin vorzuziehen ist, müssen spätere Versuche zeigen.

Man rührt 20 g pulverisiertes Gliadin in 60 ccm wasserfreiem Methylalkohol auf, setzt 140 ccm wasserfreien 0,8%igen normalen methylalkoholischen Kali hinzu und kocht 15 Minuten auf dem Wasserbad. Die Dauer des Kochens richtet sich einigermaßen nach der größeren oder geringeren Feinheit des Gliadins.

Man neutralisiert das Kalihydrat mit 20 g wasserfreiem Essigester und kocht es leise in 10 Minuten. Bei der Kühlung wird eine geringe Menge Stoff gefällt, welcher durch Filtrierung entfernt wird. Setzt man mehr Methylalkohol hinzu, veranlaßt er eine verhältnismäßig geringe Ausscheidung.

Die Lösung wird im Vakuum bei 60° bis zur Trockenheit eingedampft. Vor Schluß entfernt man den letzten Methylalkohol bei schwachem Wasserstoffstrom.

20 g frisch entwässertes, pulverisiertes, essigsaures Natron wird zugesetzt und danach 10 Minuten lang in einem Glycerinbad bei 130° mit 80 ccm Essigsäureanhydrid (vorher bis zum Kochpunkt erwärmt) acetyliert. Es entsteht reichlich essigsaures Methyl. Man destilliert das Essigsäureanhydrid im Vakuum annähernd ab und löst das acetylierte Gliadin bei schwacher Wärme in trockenem Chloroform. Diese Lösung wird über Nacht in einen Eisschrank gestellt, ohne filtriert zu werden; eine Verbindung von essigsaurem Kali und Essigsäureanhydrid wird ausgeschieden. Nach der Filtrierung wird mit wasserfreiem Äther gefällt, den Äther entfernt man im Vakuum. Man muß schnell arbeiten, um Wasseraufsaugung zu verhindern, da diese Essigsäure abspaltet; ist der Stoff erst ätherfrei, ist er nicht so geneigt, Wasser aufzunehmen.

Um das völlig acetylierte Gliadin mit einem Acetyl für je einen Stickstoff zu erhalten, kocht man ein wenig länger mit methylalkoholischem Kali und acetyliert etwas länger; es gelingt jedoch nicht immer, den völlig acetylierten Stoff herzustellen.

Die Acetylbestimmung wurde nach Wenzels Methode¹⁾ vorgenommen. 0,4 g Stoff wurden 1 1/2 Stunden in kochendem Wasser mit 3 ccm Schwefelsäure (2 + 1) und weiteren 3 ccm Wasser hydrolysiert. Bei Acetylbestimmungen im Jodid wurde Ag₂SO₄ hinzugesetzt. Bei den Acetylbestimmungen entstand eine sehr geringe Menge schwefelige Säure allein, ohne auf das Resultat zu influieren. Oben angeführte Analyse gab 0,005 ccm normal schwefelige Säure. Lackmus wurde als Indikator benutzt.

Das acetylierte Gliadin enthielt eine recht große Menge Äther, welches bei Erwärmung im Vakuum mit einiger Essigsäure oder Anhydrid verschwindet.

Aus der beigefügten Tabelle sieht man einige Versuchsergebnisse; trotz des sehr variierenden Acetylgehaltes ist der Stickstoffgehalt recht konstant.

Bei den drei letzten Versuchen wurde Gliadin benutzt, welches bei langsam gesteigerter Temperatur, bis 130°, im Vakuum getrocknet wurde.

Präparat	Dauer des Kochens mit KOH	Dauer der Acetylierung	ccm Essigsäure für g Stoff	% CH ₃ CO	Millimol N pro g	% N	$\frac{\text{CH}_3\text{CO}}{\text{N}}$	Nr.
1 a	1 1/4 Std.	5 Min.	4,35	18,66	8,0	11,2	0,545	1
1 a	1 1/4 "	5 "	3,86	16,6	7,2	11,5	0,47	2
1 a	1/2 "	15 "	8,54	36,8	8,38	11,7	1,02	3
1 a	1/2 "	1 "	5,22	22,4	8,48	11,9	0,617	4
1 a	1/2 "	5 "	6,26	27,0	8,7	12,2	0,72	5
1 a	3/4 "	2 "	5,74	24,6	—	—	—	6
1 b	1 1/4 "	5 "	6,34	27,3	8,35	11,7	0,76	7
1 d	5 Min.	5 "	3,68	15,9	8,23	11,5	0,448	8
1 c	3 "	3 "	4,80	21,6	8,04	11,25	0,598	9
1 c	10 "	5 "	4,07	17,5	8,35	11,7	0,487	10
Das Jodid von Nr. 3 enthielt			2,24	10,0	6,6	9,53	0,34	

Die Jodwasserstoffspaltung wurde in einem kleinen Fraktionskolben in trockenem Kohlensäurestrom unternommen.

Man muß aufpassen, daß die Dämpfe des Wasserbads

¹⁾ M. 18, S. 659 und Hans Meyer, Analyse und Konstitutionsermittlung S. 540.

von dem starken Essigsäure-Jodwasserstoff nicht aufgezogen werden.

Man löst 1 g acetyliertes Gliadin im Fraktionskolben in 5 ccm wasserfreier Essigsäure ohne Erwärmung und setzt 25 ccm 40%igen Essigsäure-Jodwasserstoff hinzu. Der Kolben darf nicht geschüttelt werden, ehe das Jodid abgeschieden ist. Dann erwärmt man vorsichtig in einem vorher bis 60° erwärmten Wasserbad und schüttelt leise, bis die Lösung vollendet ist. Jetzt erwärmt man den Kolben weiter im Wasserbad; wenn die Temperatur bis auf ca. 80° gestiegen ist, beginnt ein zweites Jodid sich abzuscheiden; dies verhindert man dadurch, daß man tropfenweise einen stark wäßrigen Jodwasserstoff (Vol.-Gew. 2,0), 0,8—1 ccm hinzusetzt. Das Wasserbad muß danach 10 Minuten lang kochen; das abgeschiedene Jod entfernt man bis zu heller Braunfärbung mit kleinen Stücken Phosphoniumjodid, ca. 0,5 g, im Laufe weniger Minuten; kurz vor dem Schluß setzt man ein paar Tropfen Wasser hinzu. Danach wird mit Eis gekühlt, mit gleichem Volumen kaltem Wasser verdünnt und unter Eiskühlung mit Kjeldahl-Natron aus einer Bürette neutralisiert. Die Pyrrolkörper lassen sich dann mit überhitzten Wasserdämpfen abdestillieren.

Die Reaktion ist nur richtig verlaufen, sofern bei der Kühlung der Essigsäurelösung eine reichliche kristallinische Abscheidung entsteht, und auch eine milchartige Abscheidung bei der Neutralisierung mit dem Kjeldahl-Natron.

Die Menge der Pyrrolkörper habe ich ein paarmal durch Stickstoffbestimmung nach Dumas' Methode bestimmt. Die Pyrrolkörper wurden mit Äther ausgeschüttelt und wieder in verdünnte Schwefelsäure übergeführt und in dieser Lösung auf das zur Verbrennung nötige Kupferoxyd gegossen.

Einen Maßstab für das Gelingen der Reaktion gibt einem die Benzaldehydprobe.

Die Gelatinespaltung.

Man löst 30 g getrocknete, pulverisierte Gelatine mittels Kochens in 300 ccm 0,8 n. wasserfreien, methylalko-

holischem Kali und neutralisiert annähernd mit 25 ccm Essigester, indem man 10 Minuten lang kocht. Danach setzt man 50 ccm wasserfreien Amylalkohol hinzu und destilliert den Methylalkohol, zuletzt im Vakuum. Die Masse wird in 250 ccm wasserfreiem Amylalkohol gelöst und die Lösung mit 25 g Natrium hydriert. Die Hydrierung wurde in einem dreihalsigen Kolben unternommen, der in einem Ölbad erhitzt wurde. Die Reaktionstemperatur war 110° , bis zu 150° steigend. Die Natriumzufuhr geschah durch eine Schlüsse, genügend feingeschnitten. Hierdurch wurde es möglich, die entwickelte Wasserstoffmenge und Ammoniak zu bestimmen.

Durch meinen Beitrag zur Klärung der Zusammensetzung der Proteinstoffe habe ich ihre Verwandtschaft mit dem Hämin des Blutes und dem Chlorophyll der Pflanzen nachgewiesen, die Nencki und andere Gelehrte vergebens nachgeforscht haben. Zugleich habe ich den ersten Beweis für die Berechtigung meiner Theorie von der Zusammensetzung der Proteinstoffe gegeben. Daß die nachgewiesenen Pyrrole als Oxypyrrole vorhanden sein müssen, scheint mir zweifellos, auch weil man die Pyrrole durch Nenckis Spaltungsmethode mit wäßrigem Jodwasserstoff nicht nachweisen kann. Ich werde meine Untersuchungen fortsetzen, doch hoffe ich, daß andere Gelehrte meine Methoden zu weiterer Entwicklung aufnehmen werden; die Aufgaben sind so vielfältig, daß sie die Kräfte eines einzelnen Mannes bei weitem übersteigen. Wohlgeeignete Methoden zur Deoxydierung der Proteinstoffe zu finden, um danach einen größeren Ertrag von Pyrrolen zu erhalten, ist eine Aufgabe für künftige Forschung. Die bis jetzt benutzten Spaltungsmethoden für Proteinstoffe bedürfen einer Ergänzung; namentlich hat man die reduktiven Spaltungsmethoden nicht untersucht, für die ich hier Beispiele gegeben habe. — Dem endlichen Ziel, der synthetischen Herstellung der Proteinstoffe, ist man nicht näher gerückt, falls die Proteinstoffe Oxypyrrole enthalten, was man nach der vorliegenden Arbeit annehmen muß.

Während meiner Arbeit haben mir meine beiden Assistenten, die Ingenieure Valdemar Olsen und Poul Tutein, beigestanden, so wie auch meine Freunde Prof. S. P. L. Sörensen und Prof. N. Bjerrum meine Arbeit mit Interesse verfolgt und mir manchen guten Rat und manche Anweisung erteilt haben. Ich bringe ihnen allen meinen Dank.

Eine vorläufige Mitteilung über diese Untersuchungen wurde während der ersten nordischen Chemikersitzung bei der Gedächtnisfeier für H. C. Ørsted am 1. September d. J. abgegeben.
