

238. O. Gerngross, O. Graf Triangi und P. Koeppe: Über die thermische Desaggregation von Gelatine (Röntgeno- graphisches Bild ihres Abbaues).

[Aus d. Techn.-chem. Institut d. Techn. Hochschule Berlin.]

(Eingegangen am 29. April 1930.)

Bekanntlich erleiden Gelatine und Leim beim Erhitzen ihrer wäßrigen Lösungen einen irreversiblen Viscositäts-Abfall, bei dem gleichzeitig Gelatinierfähigkeit, Klebkraft, Dehnbarkeit der Gallerten, mit einem Wort die technisch wertvollen Eigenschaften, abnehmen. Dieser Vorgang wurde früher wohl allgemein als ein hydrolytischer Eiweiß-Abbau angesehen¹⁾.

In Gemeinschaft mit H. A. Brecht²⁾ war der eine von uns bemüht, den erwarteten Anstieg des formol-titrierbaren Stickstoffes bei stufenweisem Hitze-Abbau von Gelatine-Lösungen zu messen, um auf diese Weise ein technisches Prüfverfahren auf solider chemischer Grundlage statt der üblichen physikalischen Prüfmethode für Gelatine und Leim auszuarbeiten.

Überraschenderweise zeigte sich jedoch, daß bei schwach saurer Reaktion, bei p_H 4,7, d. i. in der Nähe des iso-elektrischen Punktes der Gelatine, im Vergleich zur verheerenden Minderung der physikalischen Eigenschaften des Glutins fast gar keine Lösung von Peptid-Bindungen zu bemerken war²⁾. Es wurde gefolgert, daß „man in diesem Falle auf eine vorwiegend dispersoid chemische und weniger konstitutiv chemische Wandlung des Stoffes“ zu schließen habe³⁾.

Der damals aus technischen Gründen unternommene Versuch hat mit der seitherigen Entwicklung der Chemie der Proteine und der hochmolekularen Stoffe im allgemeinen an Interesse gewonnen. Er steht im Zusammenhang mit der Frage, ob die irreversiblen physikalischen Veränderungen beim Erhitzen von Lösungen hochmolekularer Stoffe, die ohne Frage unter Teilchen-Zerkleinerung einhergehen, notwendig mit einer chemischen Molekül-Veränderung, insbesondere einer Lösung von Hauptvalenzen⁴⁾, zusammenhängen oder ob Aufhebung von höheren Kohäsionskräften, „Micellarkräften“, lockeren Bindungen, welche die großen Bausteine zusammenhalten, eine „Desaggregation“, erfolge⁵⁾. Auch die Pepsin-Wirkung auf Proteine, bei welcher ein starker Einfluß auf die physikalischen Eigenschaften bei geringer Lösung von Peptid-Bindungen — ganz ähnlich wie bei der Thermolyse der Gelatine — bemerkbar ist, hat man lange Zeit als reine Desaggregation erklärt⁶⁾, und erst neueste genaue Nachprüfungen haben eine normale Pep-

¹⁾ Vereinzelt wurde allerdings schon damals die Anschauung vorgetragen, daß in den nativen Proteinen eine Zusammenfassung, „Aggregation“ von Großbausteinen (Polypeptid-Ketten) durch lockere Bindungen zu größeren Gebilden vorliegen könne: O. Cohnheim, *Chemie d. Eiweißkörper*, Braunschweig 1911, S. 771, und insbesondere E. Stiasny, *Collegium* 1920, 255; *Sciences* 57, 483 [1923], der diesen Gedanken speziell für das Kollagen diskutierte.

²⁾ O. Gerngroß u. H. A. Brecht, *Mitt. Materialprüf.-Amt*, 1922, 253; *Collegium* 1922, 262.

³⁾ O. Gerngroß, *Kolloid-Ztschr.* 83, 254 [1923].

⁴⁾ H. Staudinger, *Naturwiss.* 17, 141 [1929]; H. Staudinger u. W. Heuer, *B.* 63, 222 [1930].

⁵⁾ K. H. Meyer, *Ztschr. angew. Chem.* 41, 943 [1928].

⁶⁾ C. Oppenheimer, „Die Fermente und ihre Wirkungen“, 5. Aufl., II. Bd., S. 812 [1925].

tolyse ergeben. Desaggregation soll bei dieser Ferment-Wirkung überhaupt nicht auftreten⁷⁾.

Es ist auch mit Recht darauf hingewiesen worden, daß bei den außerordentlich großen Molekülen der Proteine sich eine Teilchen-Verkleinerung durch Spaltung des Moleküls in 2 oder 3 Teile wohl in einer starken Änderung der physikalischen Eigenschaften, aber kaum merklich in chemischer Hinsicht äußern könnte⁸⁾.

All dies veranlaßt uns, den thermolytischen Versuch an Gelatine, bei dem immerhin ein geringer, aber doch deutlicher Peptid-Abbau von Gerngroß und Brecht⁹⁾, festgestellt worden war, mit allen Kautelen zu wiederholen. Es war damals bei der Wahl der Gelatine auch nicht auf Elektrolyt-Freiheit und genaue Einstellung auf iso-elektrische Reaktion geachtet worden.

Wir wählten jetzt eine elektro-osmotisch gereinigte Gelatine mit nur 0.13% Asche, ermittelten nephelometrisch den iso-elektrischen Punkt¹⁰⁾ ($p_H = 5.05$) und führten die Thermolyse bei genau iso-elektrischer Reaktion in ausgekochten Jenaer Glasgefäßen in 25-proz. Lösungen durch 24-, 72-, 75- und 336-stdg. Erhitzen bei 100° und 48-stdg. Erhitzen bei 121° im Einschlußrohre durch. Einen etwaigen Peptid-Abbau kontrollierten wir, außer durch die Formol-Zahl, durch die Ermittlung des Zuwachses von freien Aminogruppen nach van Slyke und durch alkalimetrische Bestimmung freier Carboxylgruppen nach Willstätter und Waldschmidt Leitz¹¹⁾. Die physikalischen Veränderungen wurden durch Viscositäts-Messungen, Beobachtung der Gelatinierfähigkeit der erhitzten Sole und der „Mutarotation“, d. i. der reversiblen Drehungsänderung im Polarimeter bei 15 und 35°, festgestellt, von der bekannt ist, daß sie in ähnlicher Weise wie die Viscosität beim Erhitzen der Lösungen der Glutin-Präparate abnimmt¹²⁾.

In Tabelle 1 sind die betreffenden Untersuchungen zusammengestellt.

Die Horizontalreihen 1 bis 4 weisen nach, daß nach 24-, 72-, ja 75-stdg. Thermolyse bei 100° ein hauptvalenz-chemischer Abbau durch Lösung von Peptid-Bindungen überhaupt nicht zu bemerken ist, während die Gelatinierfähigkeit selbst 25-proz. Lösungen ganz vernichtet, die Viscosität auf 18.8% und die Mutarotation auf 28.4%, also auf Bruchteile des ursprünglichen Wertes der intakten Gelatine, gesunken sind. Die lang andauernde Erhitzung auf 121° und die Ausdehnung des Versuches in kochendem Wasserbade bis 336 Stdn. bringt allerdings eine deutliche echte Hydrolyse. So zeigt sich in letzterem Falle (Reihe 6) eine 24-proz. Zunahme der ursprünglichen Sørensen'schen Formol- und der Willstätter-Waldschmidt-Leitz-Zahlen, ferner eine 26-proz. Zunahme der van-Slyke-Zahlen. Die Viscosität ist dagegen auf 9.4%

⁷⁾ E. Waldschmidt-Leitz u. E. Simons, Ztschr. physiol. Chem. **156**, 114 [1926]; derselbe u. G. Künstner, ebenda **171**, 70 [1927]; S. P. L. Sørensen u. L. Katschioni, ebenda **174**, 251 [1928]; vergl. auch M. Frankel, Biochem. Ztschr. **207**, 53 [1929].

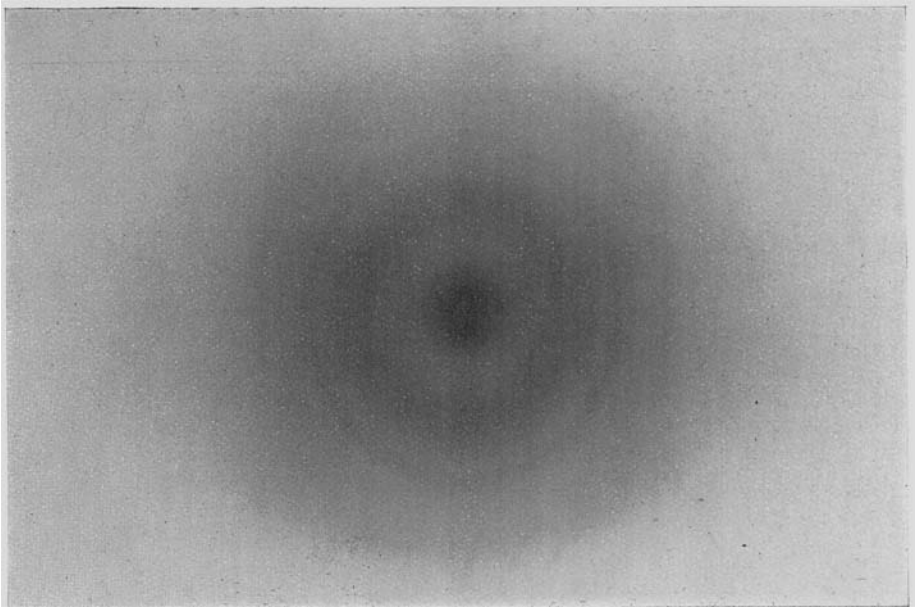
⁸⁾ I. H. Northrop, Journ. gen. Physiol. **12**, 529 [1929]; vergl. auch ähnliche Überlegungen bei Balata: H. Staudinger u. E. O. Leupold. B. **63**, 731 [1930].

⁹⁾ O. Gerngroß u. H. A. Brecht, l. c.

¹⁰⁾ O. Gerngroß u. St. Bach, Biochem. Ztschr. **143**, 542 [1923]; O. Gerngroß, Kolloid-Ztschr. **40**, 283 [1926].

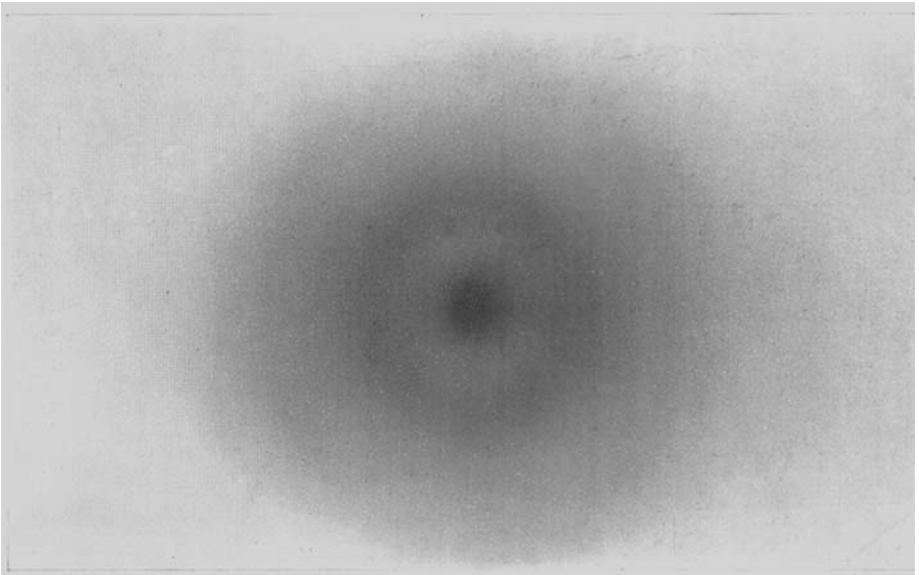
¹¹⁾ R. Willstätter u. E. Waldschmidt-Leitz, B. **54**, 2988 [1921].

¹²⁾ C. R. Smith, Journ. Amer. chem. Soc. **41**, 135 [1919]; vergl. auch Trunkel, Biochem. Ztschr. **26**, 493 [1910].



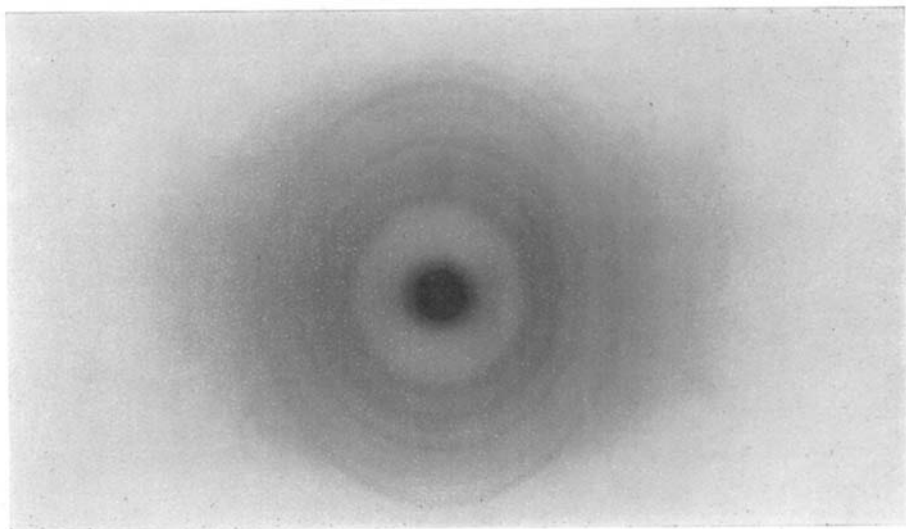
Abbild. 1.

Luft-trockene, iso-elektrische, elektro-osmotisch gereinigte Gelatine.
(Wasser-Gehalt 15.3%, Asche-Gehalt 0.13%). 2 Stdn. mit K_{α} -Strahlung belichtet.



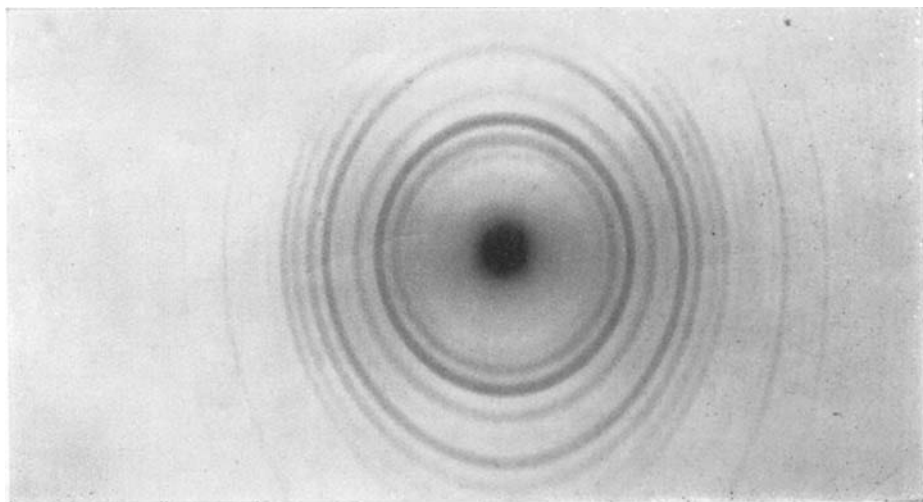
Abbild. 2.

Die gleiche Gelatine wie in Abbild. 1 nach Thermolyse (53 Stdn., 100°, 25 proz. Lösg.)
Wasser-Gehalt 15.28%. 2 Stdn. mit K_{α} -Strahlung belichtet.



Abbild. 3.

Die gleiche Gelatine nach 48-stdg. Hydrolyse mit 25-proz. H_2SO_4 , Entfernung der Säure und Eindampfen auf dem Wasserbade. (Wasser-Gehalt 23%). 12 Stdn. mit K_α -Strahlung belichtet.



Abbild. 4.

Glykokoll-Pulver. 2 Stdn. mit K_α -Strahlung belichtet.

des ursprünglichen Wertes gefallen, und die Mutarotation so gut wie ganz verschwunden, nämlich auf 2.7% des ursprünglichen Wertes gesunken.

Tabelle 1.

Verfolgung der Lösung von Peptid-Bindungen und der Abnahme von Viskosität und Mutarotation durch Thermolyse und Hydrolyse von Gelatine-Lösungen.

Nr.	Vorbehandlung der Gelatine-Lösung	Formol-Titration. 20 cem 3-proz. Lösg. verbr. cem $\frac{n}{15}$ Barytauge	van Slyke 1 cem 3-proz. Lösg. (0° ; 760 mm) cem N_2	Alkohol-Alkalltitration. 20 cem 3-proz. Lösg. verbr. cem $\frac{n}{15}$ KOH	Viskosität bei 40° . 25 cem 3-proz. Lösg. Ostwald Viskosimeter W.-W. 27	Mutarotation 8-proz. Lösg. 1 dm-Kohr in 25° C. in 120 Min.	pH-Werte
1	unvorbehandelt. isoelektr. Lösg.	1.13	0.74	1.20	1.85	12.40	konst. 5.05
2	24 ^h bei 100° erhitzte 25-proz. Lösg.	1.14	—	—	—	—	—
3	72 ^h bei 100° erhitzte 25-proz. Lösg.	1.15	0.65	—	1.22	—	konst. 5.05
4	75 ^h bei 100° erhitzte 25-proz. Lösg.	1.20	0.74	—	1.16	3.52	konst. 5.12
5	48 ^h bei 121° erhitzte 25-proz. Lösg.	1.30—1.40	1.09	—	1.07	0.70	—
6	336 ^h bei 100° erhitzte 25-proz. Lösg.	1.40	0.93	1.40	1.08	0.34	ca. 4.89
7	8 ^h bei 100° pH 1.8 erhitzte 25-proz. Lösg.	2.60	1.30	—	—	0.45	—
8	336 ^h bei 35° pH 2 200 cem 3-proz. Lösg. + 1 g Pepsin .	—	—	1.60	1.10	—	—
9	wie 8, ohne Pepsin ..	—	—	1.20	1.12	—	—

Eine Kontrollbestimmung, bei der die gleiche Gelatine einer nur 8-stdg. Hydrolyse bei ganz schwach saurer Reaktion ($p_H = 1.8$) und 100° unterworfen wurde (Reihe 7), gab allerdings viel deutlicher den bekannten Peptid-Abbau.

In Reihe 8 ist endlich auch ein 336-stdg. Abbau mit Pepsin bei $p_H = 1.8$ und Brutschrank-Temperatur im Vergleich zur Thermolyse gesetzt und in Reihe 9 der Versuch ohne Pepsin, ebenfalls bei 35°, unter sonst gleichen Bedingungen wiedergegeben. Man sieht den deutlichen Anstieg der Willstätter-Waldschmidt-Leitz-Zahl bei dem peptischen Abbau, während in der Kontrolle ein solcher nicht zu bemerken ist. Hingegen ist aus der Viskositätszahl ersichtlich, daß auch bei 336-stdg. Einwirkung von Brutschrank-Wärme (35°) eine starke irreversible Teilchen-Zerkleinerung (Viskositäts-Minderung) stattgefunden hat, was mit ähnlichen Beobachtungen von M. Frankel¹³⁾ im Einklang steht.

Es bietet nun im Zusammenhang mit dem besprochenen Problem ein besonderes Interesse, ein Bild von der durchschnittlichen Größe und der

¹³⁾ M. Frankel, Ztschr. physiol. Chem. **167**, 26 [1927].

Zerteilung der intakten Gelatine-Großteilchen bei der Thermolyse zu gewinnen, um beurteilen zu können, in wie weit überhaupt bei stattfindendem Peptid-Abbau sich dieser in Form eines Zuwachses von COOH- und NH_2 -Gruppen äußern würde, ja ob er überhaupt unter den bestehenden Verhältnissen wesentlich in Erscheinung treten könnte⁸⁾.

Die Angaben über das „Molekularaggregatgewicht“ der intakten Gelatine in ihren verdünnten wäßrigen Lösungen bei Zimmer-Temperatur, die sich meistens auf Bestimmungen des osmotischen Druckes gründen, schwanken von 15000 bis 96000¹⁴⁾. Wo. Ostwald¹⁵⁾ hat unter Berücksichtigung des „Solvatations-Druckes“ unter der Annahme, daß auch in verdünnten Solen eine Hydratation der kinetischen Teilchen stattfindet, aus neuen, sorgfältigen Messungen des osmotischen Druckes von Gelatine-Lösungen¹⁶⁾ für das „Micellargewicht“ der Gelatine den „Limes-Wert“ von 73200 errechnet.

Es liegt auch ein Versuch vor, ebullioskopisch in siedendem Wasser das Molekulargewicht des Glutins zu bestimmen. Bei der hohen Temperatur ist zu erwarten, daß sich die kleinen, „desaggregierten“ Teilchen manifestieren. Es ergab sich bei diesem älteren Versuch¹⁷⁾ ein Molekulargewicht von rund 900, ein Wert, der in fast allen einschlägigen Lehrbüchern ohne weiteres übernommen wurde. Da auch das Salzsäure-Bindungsvermögen auf ein Äquivalentgewicht von rund 850 hinweist¹⁸⁾, wurden von verschiedenen Seiten Berechnungen angestellt, daß 33—50 kleine Elementarmolekeln zu der intakten „Gelatine-Micelle“, wie sie in verdünnten Lösungen bei Zimmer-Temperatur vorhanden ist, zusammengeschlossen seien¹⁹⁾.

Eine Nachprüfung des „Molekularaggregatgewichtes“ unserer reinen Gelatine durch Bestimmung des osmotischen Druckes in 0,5-proz. Lösung bei 20°, wobei wir die Hydratation nicht weiter berücksichtigten und das wasser-freie Gelatine-Molekularaggregat als osmotisch wirksames Teilchen annahmen, ergab Werte von rund 90000, was der von Smith¹⁴⁾ gefundenen hohen Zahl nahekommt. Es liegt dies ohne Frage an der Güte, an der Elektrolyt-Freiheit unserer Gelatine und an der iso-elektrischen Reaktion der verwendeten Lösungen. Schon ein geringer Zusatz von Elektrolyten oder die Abweichung von iso-elektrischer Reaktion drückt, wie ja auch schon von anderer Seite²⁰⁾ gezeigt wurde, wesentlich die gefundenen Werte. Auch ein ganz kurzes Aufkochen veranlaßte bereits, wie wir feststellten, ein an der Steigerung des osmotischen Druckes erkennbares Absinken des Molekularaggregatgewichtes, und es gelang, durch zeitlich abgestuftes Kochen das durchschnittliche Micellargewicht auf etwa den halben Wert herabzusetzen, ehe Durchlässigkeit durch die Membran des Osmometers auftrat.

Das niedere Molekulargewicht der Gelatine, das ebullioskopisch in siedendem Wasser gefunden wurde, konnten wir nicht bestätigen. Beim

¹⁴⁾ W. Biltz, Ztschr. physikal. Chem. **91**, 719 [1916]; R. Wintgen u. H. Löwen-thal, Kolloid-Ztschr. **84**, 292 [1924]; J. Eggert u. J. Reitstötter, Ztschr. physikal. Chem. **123**, 363 [1926]; C. R. Smith, Journ. Amer. chem. Soc. **43**, 1350 [1921].

¹⁵⁾ Wo. Ostwald, Kolloid-Ztschr. **49**, 66 [1929].

¹⁶⁾ M. Kunitz, Journ. gen. Physiol. **10**, 815 [1927].

¹⁷⁾ C. Paal, B. **25**, 1202 [1892].

¹⁸⁾ vergl. z. B. R. Wintgen u. H. Vogel, Kolloid-Ztschr. **30**, 47 [1922]. Neuere Arbeiten lassen auf ein Äquivalentgewicht von rund 1000 schließen; vergl. z. B. Hitchcock, Journ. gen. Physiol. **12**, 495 [1929].

¹⁹⁾ O. Gerngroß, Ztschr. angew. Chem. **38**, 88 [1925]; J. Eggert u. J. Reitstötter, l. c.

²⁰⁾ J. Loeb, Journ. gen. Physiol. **1**, 483, 559 [1918/19]; ebenda **3**, 691 [1920/21].

Arbeiten in 1-proz. Lösungen fanden wir eher Depressionen als Alterationen, und 2-proz. Lösungen lieferten Werte, die bestimmt über 2000 lagen, aber als außerordentlich unsicher bezeichnet werden müssen. Der bisherige ebullioskopische Befund wäre auf jeden Fall endgültig zu streichen²¹⁾. Interessant war, daß die 336 Stdn. bei 100° desaggregierte Gelatine sich ganz ähnlich bei der Prüfung im Beckmann-Apparat verhielt wie die intakte Gelatine — ein Zeichen, daß selbst die irreversibel zerkleinerten Teilchen noch von beträchtlicher, den Wert von 900 auf jeden Fall weit übersteigender Größe sind. Durch kryoskopische Bestimmungen gelang es einwandfrei, das Durchschnitts-Molekulargewicht des 336 Stdn. thermolysierten Präparates mit rund 4500 zu ermitteln. Dieser Wert dürfte eher zu niedrig als zu hoch sein, da wir an dem gleichen Präparat bereits einen unverkennbaren Peptid-Abbau bemerkt hatten (Tab. I, Reihe 6).

Machen wir nun die Annahme, daß ein durchschnittliches Molekularaggregatgewicht von rund 90000 in den Gelatine-Großteilchen vorliege und unterwerfen wir 20 ccm einer 3-proz. Gelatine-Lösung, wie wir es in unseren Versuchen taten, einer Formol- oder Alkohol-Titration mit 0.2-n. Lauge, so würde eine freie neuauftretende COOH-Gruppe nur einen Zuwachs von 0.033 ccm 0.2-n. Lauge bedeuten, eine Menge, die wir mit Rücksicht auf die nicht ganz scharfen Farbumschläge unbedenklich als nicht meßbar bezeichnen müßten. Nehmen wir jedoch rein schematisch an, daß bei der lang andauernden Thermolyse die Aufspaltung des Großmoleküls in 20 Teile ($20 \times 4500 = 90000$) erfolge, so gibt dies den Wert von $19 \times 0.033 = 0.63$ ccm 0.2-n. Lauge, eine Zahl, die keineswegs übersehen werden könnte. Ja, wenn nur 50% der Total-Aufspaltung in kleinere Teilchen unter Lösung von Peptid-Bindungen erfolgen würde, müßte dies mit unseren Methoden mit aller Schärfe erfaßt werden können. Da nun nach 75-stdg. Thermolyse bei 100° eine Zerkleinerung mindestens im genannten Ausmaße stattgefunden haben muß, dabei aber ein Zuwachs von COOH- bzw. NH₂-Gruppen überhaupt nicht zu bemerken ist, können wir unsere Feststellung, daß die Thermolyse keine Peptid-Bindungen in wesentlichem Maße löst, als sicher begründet bezeichnen. Daß sich bei sehr lang andauernder Erwärmung und bei Druck-Erhitzung auf hohe Temperaturen auch Peptid-Bindungen lösen werden, ändert nichts an diesem Hauptresultat.

Wir wollen hier bemerken, daß wir nicht etwa der Ansicht sind, die Gelatine bestehe nun tatsächlich aus einer einheitlichen Substanz, für welche die genannten Größenangaben zuträfen. Im Gegenteil: wir sind der Auffassung, daß besonders die von dem einen von uns in Gemeinschaft mit J. R. Katz²²⁾ aufgenommene Röntgen-Spektrographie der Gelatine beweise, daß in den Gelen ein Gemisch vorliege, und zwar einer Substanz, die scharfe „Krystall-Interferenzen“ und einer Substanz, die einen Flüssigkeits-

²¹⁾ Eine ganz kurze, ablehnende Notiz über die Anwendung der Siedepunkts-Methode für die Molekulargewichts-Bestimmung von Gelatine findet sich bei F. Krafft u. H. Wiglow, B. 28, 2582 [1895], in einer wohl kaum in diesem Zusammenhang betrachteten Arbeit: „Über das Verhalten der fettsauren Alkalien und der Seifen in Gegenwart von Wasser, IV.: Die Seifen als Kolloide“.

²²⁾ J. R. Katz u. O. Gerngroß, Naturwiss. 13, 901 [1925]; O. Gerngroß u. J. R. Katz, Kolloid-Ztschr. 39, 181, [1926]; Ztschr. angew. Chem. 1927, 1443; vergl. auch J. Trillat, Compt. rend. Acad. Sciences 190, 265 [1930].

Ring bzw. einen „amorphen Ring“ liefere²³⁾. Es könnte somit sein, daß z. B. die eine Substanz ein Micellargewicht von 180000, die andere ein solches von 45000 hätte. Dies würde aber an unseren Befunden und Schlüssen prinzipiell nichts ändern.

Es verdient hier im Zusammenhang mit der Frage, wie das Glutin aus dem Kollagen gebildet werde, erwähnt zu werden, daß der „amorphe Ring“ bereits im intakten Kollagen vorgebildet ist und nicht etwa durch Abbau bei der Verwandlung von Kollagen in Gelatine gebildet wird.

Wir haben endlich untersucht, wie sich die Thermolyse im Röntgenogramm der Gelatine auswirke. Das Röntgen-Diagramm der ungedehnten Gelatine ist durch mehrere „Krystall-Interferenzen“, besonders aber durch eine scharfe periphere der Identitätsperiode 2.8 Å.-E. ausgezeichnet, die im folgenden allein Berücksichtigung findet (Abbild. 1). Durch langdauernde Thermolyse verschwindet dieser Ring fast vollständig²⁴⁾ (Abbild. 2).

Diese Erkenntnis, daß bei der Thermolyse die „K-Interferenzen“ verschwinden, scheint nicht nur für die technische Prüfung von Leim und Gelatine²⁵⁾ bedeutungsvoll, sondern auch für unsere Vorstellung vom Feinbau der Gelatine-Gele.

Daß das Verschwinden dieser „Krystallinität“ nicht etwa mit einem hydrolytischen Abbau einhergeht, eine Frage, die uns entsprechend der Hauptrichtung der vorliegenden Untersuchungen besonders interessierte, sondern offenbar nur mit der thermischen Desaggregation zusammenhängt, sieht man aus Abbild. 3. Es ist die Aufnahme einer durch 48 Stdn. mit 25-proz. Schwefelsäure weitgehend hydrolysierten und dann mit Barythydrat genau von Elektrolyten befreiten und eingedampften, fein gepulverten Gelatine. Sie zeigt ein schönes Debye-Scherrer-Diagramm, das weitgehende Übereinstimmung mit dem Diagramm von Glykokoll (Abbild. 4) bekundet.

In Tabelle 2 sind die Identitätsperioden der 7 Hauptlinien im Diagramm des Gelatine-Hydrolysates, ferner von Glykokoll nach einer Arbeit von M. H. Simmers²⁶⁾ und eines Glykokoll-Präparates, das wir durch rasches Fällern einer wäßrigen Lösung mit absol. Alkohol in fein verteilter Form für die Aufnahme laut Abbild. 4 bereiteten, nebeneinander gestellt.

Tabelle 2.

Vergleich der Netzebenen-Abstände in Å.-E. der 7 Haupt-Interferenzen von Gelatine-Hydrolysat und Glykokoll-Pulver.

Hydrolysierte Gelatine	4.74	3.74	3.01	2.67	2.45	1.91	1.58
Glykokoll (Simmers)	4.8	3.75	3.00	2.68	2.45	1.90	1.60
„ (Koeppe).....	—	—	3.01	2.73	2.50	1.89	1.62

Bekanntlich enthält das Hydrolysat der Gelatine als einheitlichen Hauptbestandteil 25% Glykokoll neben 16 anderen identifizierten Aminosäuren, unter denen Prolin mit rund 9%, Oxy-prolin mit rund 14% an erster Stelle stehen: Es ist

²³⁾ Das Vorliegen einer krystallinischen Hauptschubstanz und amorphen Kittschubstanz ist für Seide und Kollagen schon früher auf Grund der Röntgen-Spektrographie angenommen worden: R. O. Herzog u. W. Jancke, B. 59, 2489 [1926]; R. O. Herzog u. H. W. Gonell, B. 58, 2229 [1925].

²⁴⁾ Durch weitere Untersuchungen wird sich vielleicht feststellen lassen, ob die nicht-krystalline Phase, der „amorphe Ring“, auf Kosten der K-Interferenz an Intensität zunimmt. Solche Versuche sind in Gemeinschaft mit K. Herrmann und W. Abitz im Gange.

²⁵⁾ O. Gerngroß, Ztschr. angew. Chem. 42, 968 [1929].

²⁶⁾ M. H. Simmers, Proceed. Roy. Soc. experimen. Biology Medicine 26, 527 [1929].

beachtenswert, wie das Vorherrschen des Glykokolls in dem komplizierten Gemisch durch das Röntgen-Bild manifest wird, und es ist durchaus möglich, daß diese Methode in ein oder dem anderen Falle bei der Erforschung der komplexen Gemenge von Abbauprodukten anderer Stoffe mit Vorteil verwendet werden kann.

Auf Grund aller dieser Befunde können wir uns folgendes Bild vom Bau und der Thermolyse der Gelatine machen: Die intakten Gelatine-Gele bestehen aus langgestreckten Gebilden. Dies ist unter anderem mit Sicherheit bewiesen durch die Dehnungsversuche und röntgenographischen Befunde an Gelatine von Katz und Gerngroß²⁷⁾, denen zufolge bei der Dehnung von Gelatine eine weitgehende Parallelisierung der Teilchen, eine Spaltbarkeit in der Dehnungsrichtung²⁸⁾ und ein Faserdiagramm wie im Kollagen tierischer Sehnen auftritt, was nur möglich ist, wenn die Einzelgebilde von ungleicher Größenordnung nach verschiedener Richtung sind. Diese langgestreckten Gebilde kommen durch übermolekularen Zusammenschluß der Gelatine-Teilchen zustande. In wäßriger Lösung geringerer Konzentration als 0.5% bei 20° haben diese Einzelteilchen je nach der Vorgeschichte der Präparate bei iso-elektrischer Reaktion ein durchschnittliches Molekularaggregatgewicht von rund 50000—90000. Diese Teilchen erleiden beim kurzen Erhitzen der Lösung auf 100° eine fast völlig reversible Aufteilung in Moleküle eines durchschnittlichen Molekulargewichtes von wenigen 1000. Aber selbst dieses bewirkt bereits unverkennbar eine irreversible Veränderung, welche das durchschnittliche Molekularaggregatgewicht der intakten Substanz vermindert. Langanhaltendes Kochen ruft eine Aufteilung in Einzelmoleküle von einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 4500 hervor, die sich beim Abkühlen nicht mehr zu den Aggregaten zusammenschließen können, wobei auch die Fähigkeit zur Gelbildung, Bildung viscoser, Klebkraft äußernder Lösungen verloren geht. Diese Aufteilung erfolgt nicht oder nicht wesentlich durch Lösung von Peptid-Bindungen.

Wir nehmen also an, daß es keine Hauptvalenzkräfte sind, welche die Moleküle der intakten Gelatine zu den Gebilden von 90000 zusammenschließen. Sicher bewiesen ist dies aber nicht. Es könnten ja andere chemische Bindungen als Peptid-Bindungen vorhanden sein, die allerdings durch die Thermolyse ganz außerordentlich leicht gelöst werden müßten, da die irreversible Teilchen-Zerkleinerung selbst bei Brutschrank-Temperatur mit der Zeit eintritt. Nach unserer Meinung muß aber diese Thermolyse eine konstitutive Änderung der Grundmoleküle hervorrufen. Wie ließe sich sonst das Verschwinden der Fähigkeit nach langandauerndem Erhitzen der wäßrigen Lösungen erklären, beim Abkühlen der Lösung wieder die großen Teilchen zu bilden, die sich ihrerseits zu fadenförmigen micellaren Aggregaten zusammenschließen²⁹⁾?

²⁷⁾ Katz u. Gerngroß, l. c.

²⁸⁾ J. R. Katz u. O. Gerngroß, Kolloid-Ztschr. 89, 180 [1926]; O. Gerngroß u. J. R. Katz, ebenda 181; vergl. auch M. Bergmann u. B. Jacobi, Kolloid-Ztschr. 49, 46 [1929].

²⁹⁾ Man könnte vielleicht die vermittelnde Ansicht zur Diskussion stellen, daß durch das Erhitzen in wäßriger Lösung ein geringer Peptid-Abbau, etwa eine Aufteilung der sehr langen Hauptvalenzketten in 2 oder 3 Teile erfolge, die sich noch unserer analytischen Feststellung entziehen könnte. Durch diese Verringerung der Länge der Polypeptid-Ketten würden infolge der von M. Dunkel näher untersuchten Additivität der Mol.-Kohäsion (K. H. Meyer, Ztschr. angew. Chem. 41, 943 [1928]) auch die Kohäsionskräfte (Micellarkräfte), welche die Einzelteilchen zusammenhielten, vermindert, so daß die experimentell von uns festgestellte weitgehende Teilchen-Zerkleinerung in Erscheinung tritt.

Das stufenweise Schwächerwerden der scharfen „Krystall-Interferenzen“ im Röntgen Bild bei der Thermolyse ist durch fortschreitende Vernichtung des Gitters bei der Aufteilung der großen Teilchen, die eine häufige periodische Wiederholung der Einzelmoleküle enthalten, zu erklären.

Am Schluß seien noch einige Versuche erwähnt, in denen wir prüften, ob nicht eine Reaggregation der thermolysierten Teilchen nach dem Eindampfen der Gelatine-Lösungen und Trocknen bemerkbar wäre. In der Technik³⁰⁾ findet man nämlich die allerdings auch bestrittene Behauptung³¹⁾, daß die Viscosität frischer Leimsude geringer sei als nach dem Trocknen und Wiederauflösen der Leime, was auf Reaggregation schließen ließe. Wir haben nun tatsächlich bei verschiedenen erhitzten Präparaten nach dem Trocknen und Wiederauflösen eine etwas höhere Viscosität und Mutarotation gefunden als in den frischen, erhitzten und einige Zeit abgekühlt aufbewahrten Lösungen. Der Anstieg war eindeutig, aber im Vergleich zu dem in der technischen Publikation behaupteten außerordentlich gering.

Hrn. Prof. K. Herrmann von der Technischen Hochschule Charlottenburg sind wir für Überlassung der Röntgen-Apparatur und freundliche Unterstützung bei den Aufnahmen zu Dank verpflichtet. Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft sprechen wir für wesentliche Beihilfe bei dieser Arbeit unseren ehrerbietigsten Dank aus.

Beschreibung der Versuche.

Das Ausgangsmaterial: Zur Verwendung kam eine elektro-osmotisch gereinigte Gelatine mit folgenden Kennzahlen:

Tabelle 3.

Kennzahlen der elektro-osmotisch gereinigten Gelatine.

Wasser	Asche	pH in 0.5-proz. Lösg. 25°	iso-elekt. Punkt	Relative Vis- cosität, 3- proz. Lösung, pH 5.05, 40°	Gallertfestigkeit, 10-proz. Gel, 22 Stdn. bei 17°, 200 g Belastung	Mutarotation in Ventzke-Graden. 3-proz. Lösng. pH 5.05, 1-dm-Rohr, Na-Licht
15.3 %	0.13 %	5.00	5.05	1.85	180 Greiner-°	12.40°

Es wurden bestimmt der Wasser-Gehalt nach der Soltrocknungsmethode, die Gallertfestigkeit im Greinerschen Glutimeter³²⁾, die pH-Werte potentiometrisch mit strömendem Wasserstoff, der iso-elektrische Punkt im Kleinmannschen Nephelometer durch Ermittlung des Trübungs-Maximums in 1-proz. Lösung, eine Methode, die nach unserer Erfahrung die zuverlässigsten Werte liefert³³⁾. Die Viscositäts-Messung wurde in einem Ostwaldschen Viscosimeter vom Wasser-Wert 27 mit 25 ccm Lösung durch-

³⁰⁾ E. Sauer, Chem.-Ztg. 48, 501 [1924]; vergl. auch H. Maier-Bode, Kunstdünger und Leim 26, 339 [1929]. ³¹⁾ E. Goebel, Farben-Ztg. 35, No. 25 [1930].

³²⁾ O. Gerngroß, Ztschr. angew. Chem. 42, 969 [1929].

³³⁾ O. Gerngroß, Kolloid-Ztschr. 60, 283 [1926]; wir suchten bei dieser Gelegenheit besonders sorgfältig das Gebiet zwischen pH 7 und 8.5 nach einem 2. Trübungs-Maximum als Zeichen für einen 2. iso-elektrischen Punkt (I. A. Wilson u. Daub, Journ. industr. engneer. Chem. 18, 1137 [1921]; C. E. Davis u. E. T. Oaks, Journ. Amer. chem. Soc. 44, 464 [1922]) ab, ohne auch nur andeutungsweise ein solches feststellen zu können.

geführt. Die Mutarotation wurde in Anlehnung an die Versuche von Smith¹²⁾ in folgender Weise ermittelt: Eine 3-proz. Gelatine-Lösung wurde 7 Stdn. bei 35° gehalten und die Drehung in einem mit Mantel versehenen 1-dm-Rohr bei 35° festgestellt. Ein anderer Teil der Lösung wurde rasch auf 0° gekühlt und, ehe noch Erstarrung eintrat, blasenfrei in ein 1-dm-Rohr gefüllt und 16 Stdn. bei 15° belassen; dann wurde in Bogengraden abgelesen. Die Differenz der Drehwerte, mit 2.94 multipliziert, lieferte die Mutarotation in Ventzke-Graden.

Die Thermolyse.

Die Gelatine-Lösungen wurden mit so viel $\frac{1}{10}$ -n. Lauge und Wasser versetzt, daß sie nach dem Verdünnen auf 0.5% bei 25° $p_1 = 5.05$ zeigten und 10 bzw. 25% asche- und wasser-freie Gelatine enthielten. Sie wurden in ausgekochten Jenaer Rundkolben mit Steigrohren aus Jenaer Glas in siedende Wasserbäder versenkt und während den in Tabelle 1 (S. 1605) angegebenen Zeiten erhitzt, bzw. in Jenaer Glasröhren eingeschlossen, mit siedendem Perchlor-äthylen als Heizflüssigkeit behandelt. Nach dem Abkühlen erfolgte sofort die Verdünnung auf 3% für Vornahme der Viscositäts-, Mutarotations- und quantitativen Peptidabbau-Bestimmungen bzw. auf 1-proz. Lösungen für Trübungs- und auf 0.5-proz. Lösungen für p_H -Messungen.

Nach etwa 7 $\frac{1}{2}$ -stdg. Erhitzen machte sich eine leichte Farbvertiefung der ursprünglich stark gelb gefärbten 10- bzw. 25-proz. Lösungen bemerkbar, nach 72 Stdn. war die Farbe hellbraun geworden, und es hatte sich ein schwacher Fleischextrakt-Geruch, wohl ein Zeichen chemischer Veränderung, eingestellt. Beim Erhitzen auf 121° und nach 336-stdg. Erwärmung auf 100° traten außerdem voluminöse braune Flocken auf, die sich nach dem Filtrieren größtenteils als Eisenhydroxyd auswiesen, das offenbar nach dem völligen Verschwinden der Schutzkolloid-Wirkung der Gelatine ausflockte. Die starke iso-elektrische Trübung, die sich beim Verdünnen der abgekühlten Lösungen auf 1–3% bemerkbar machte, nahm nach mehrstündigem Erhitzen stark ab und war nach 24-stdg. Behandeln ganz verschwunden, ein Zeichen der fortschreitenden Molekül-Verkleinerung. Hingegen nahmen die konz. Lösungen eine starke, ohne Hilfsmittel sichtbare Fluoreszenz an³⁴⁾. Die Fähigkeit, zu einer Gallerte zu erstarren, war schon nach wenigen Stunden verschwunden, so daß von Gallertfestigkeits-Messungen abgesehen wurde. Die lange Zeit, z. B. 336 Stdn., erhitze Lösung lieferte nach dem Eindampfen in Platinschalen einen leicht pulverisierbaren Rückstand, der, ohne wesentliche Quellung zu zeigen, beim Verrühren mit kaltem Wasser sich glatt löste.

Nach 72- und 75-stdg. Erhitzen auf 100° ließ sich die $[H']$ noch anstandslos elektrometrisch im Luft-Thermostaten bei 25° messen. Es war eine Steigerung der p_H -Werte von 5.05 auf 5.12, wohl infolge des Entweichens von Kohlensäure bei langdauerndem Erhitzen, eingetreten. Die länger oder höher erhitzten Präparate gaben jedoch keine befriedigend konstanten Potentiale³⁵⁾, doch schien sich ein Absinken auf p_H -Werte zwischen 4.8 und 4.9 zu ergeben. Die Genauigkeit colorimetrischer Messungen reichte nicht aus, um dies sicherzustellen.

³⁴⁾ H. Pringsheim u. O. Gerngroß, B. 61, 2009 [1928].

³⁵⁾ Diese Erscheinung hängt möglicherweise mit der Tatsache zusammen, daß auch technische Leime sich nicht potentiometrisch messen lassen, vergl. O. Gerngroß, Ztschr. angew. Chem. 42, 970 [1929].

Die Verfolgung des Abbaues.

Die Bestimmung der Formol-Zahlen und der Alkohol-Titrationszahlen wurde in üblicher Weise mit je 20 ccm der 3-proz. Lösungen durchgeführt. Die alkalimetrische Ermittlung der Carboxylgruppen im hochprozentigen Alkohol machte durch Ausflockung der Gelatine, die durch starkes Schütteln nach Möglichkeit verteilt wurde, einige Schwierigkeiten, ließ sich aber doch zuverlässig durchführen. Die objektivsten Befunde lassen sich an Gelatine wohl mit der van-Slyke-Methode gewinnen.

Molekulargewichts-Bestimmungen durch Messung des osmotischen Druckes.

Die Apparatur bestand aus einem Steigrohr von 7 mm lichter Weite, das am unteren Ende eine glockenförmige Erweiterung von 29 mm äußerer Weite und 40 mm Höhe trug. Über diese Erweiterung wurde ein Kollodiumsack gezogen, der folgendermaßen bereitet war: Eine 6-proz. Kollodium-Lösung, Schering-Kahlbaum, wurde in einem Reagensglas von 20 cm Länge und 3 cm lichter Weite blasenfrei eingefüllt, nach 1 Min. ausgegossen, das Reagensglas, genau horizontal auf Glasschienen gelagert, 5 Min. gleichmäßig gedreht. Sofort nach dem Trocknen des Kollodium-Filmes wurde das Reagensglas mit Wasser gefüllt und unter vorsichtigem zeitweisem Lüften seines oberen Randes die Hülse eine $\frac{1}{4}$ Stde. sich selbst überlassen. Alsdann ließ sich der Kollodiumsack fehlerlos aus der Glasröhre ziehen³⁶⁾. Zur dichten Verbindung mit der Glocke bedienten wir uns des folgenden Kunstgriffes: Das nur bis zum Beginn der Glasglocke mit Wasser gefüllte Kollodium-Säckchen wurde in ein mit Wasser gefülltes Becherglas nur so weit eingetaucht, daß 3 cm des Sackes über der Wasserfläche standen. Beim alsbald einsetzenden Austrocknen der luft-umspülten Kollodium-Hülse kontrahiert sie sich, schmiegt sich an das Glas an und wird außerdem so fest, daß man ein 2 cm weites, 3 cm langes Schlauchstück als weitere Dichtung über die abzudichtende Stelle rollen kann, die durch Umlegen eines Gumminbandes und Befestigung mit Bindfaden weiter gesichert wird.

Für den Versuch wurde das Osmometer mit einer thymol-gesättigten, genau isoelektrischen Gelatine-Lösung gefüllt und in ein etwa 4 l fassendes Gefäß mit thymol-gesättigtem Wasser auf Niveau-Gleichheit der Innen- und Außenflüssigkeit gebracht. Vorher wurde auf Dichtigkeit des Osmometers geprüft, indem der gefüllte Apparat in nicht mit Thymol gesättigtes Wasser eingehängt und nach einigen Stunden mit der Hellerschen Probe die Außenflüssigkeit auf Eiweiß untersucht wurde. Diese Reaktion gestattet noch den Eiweiß-Nachweis in 0.0033-proz.³⁷⁾ Lösung. Bei Gegenwart von Thymol ist die Reaktion nicht anwendbar, und wir prüften in solchen Fällen mit Tannin bei schwach saurer Reaktion.

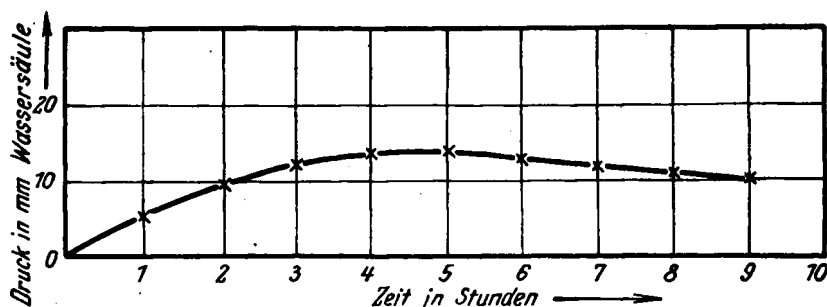
Da die Ergebnisse in Übereinstimmung mit den Befunden von Eggert und Reitstötter³⁸⁾ bei Anwendung 0.25-proz. und 0.5-proz. Lösungen praktisch die gleichen waren, arbeiteten wir nur in 0.5-proz. Lösung, um möglichst starke Ausschläge zu erhalten, und zwar bei 20°. Das Diagramm (Abbild. 5) zeigt den osmotischen Druck-Zeit-Verlauf. Nach 5 Stdn., bei Anwendung dickerer Kollodium-Hülsen langsamer, war ein stets repro-

³⁶⁾ vergl. auch J. Eggert u. J. Reitstötter, l. c.; R. Zsigmondy, „Kolloid-chemie“ [1920], S. 48.

³⁷⁾ Ullmann, Enzyklopädie d. technischen Chemie, Band IV, S. 338 [1929].

³⁸⁾ l. c.

duzierbares Maximum des Druckes von 14 mm Wasser-Säule erreicht. Daraus errechnet sich ein Molekularaggregatgewicht von 88700.



Abbild. 5.

Osmotischer Druck 0.5-proz. iso-elekt. Gelatine-Lösung bei 20°.

Die Molekül-Verkleinerung, die sich beim stufenweisen Erhitzen einstellt, ist in Tabelle 4 ersichtlich.

Tabelle 4.

Molekularaggregatgewichts-Bestimmung von verschieden lange erhitzten wäßrigen Gelatine-Lösungen durch Messung der osmotischen Drucke ($t = 20^\circ$, Konzentration = 0.5 %).

Nr.	Vorbehandlung der Gelatine-Lösg.	p in mm Wasser-Säule	Mol.-Gew.	Bemerkung
1	Nicht vorbehandelte Gelatine.	140 mm	88.700	Kollodium-Hülse undurchlässig
2	1-proz. Sol, 5' bei 100° gekocht	149 "	82.600	"
3	10-proz. Sol, 5h bei 100° erhitzt	210 "	58.500	"
4	25-proz. Sol, 10h bei 100° erhitzt	220 "	55.800	"
5	25-proz. Sol, 15h bei 100° erhitzt	270 "	45.500	Schwache Tannin-Reaktion in d. Außenflüssigk.; Hülse etwas durchlässig

Man sieht, daß nach 10-stdg. Erhitzen der 25-proz. Lösungen die Teilchen in 0.5-proz. Lösungen noch so groß sind, daß sie die Kollodium-Hülsen nicht passieren, und daß ein „Molekulargewicht“ von rund 55000 durch Druck-Bestimmung beobachtet werden kann. Von 15-stdg. Erhitzen an ist die Verkleinerung so weit vorgeschritten, daß alle Hülsen durchlässig sind, auch diejenigen, die durch längeres Trocknen, ferner durch Über-einanderschichten von 3–4 Kollodium-Lagen und endlich auch durch Eintauchen in Gelatine-Lösungen, Trocknen und Härten mit Formaldehyd hergestellt sind.

Ebullioskopische und kryoskopische Molekulargewichts-Bestimmung.

Die bekannte Molekulargewichts-Bestimmung³⁹⁾ geht von 5-proz. Lösungen aus, einer Konzentration, bei der die Gasgesetze kaum Gültigkeit

³⁹⁾ C. Paal, l. c.

haben dürften. Wir verwendeten genau 25-proz. Gallerten, aus denen mit Glasröhren kleine (7 mm breite) Zylinderchen gestanzt wurden. Zur Einwage gelangten zunächst 1 g dieser Gallert-Zylinderchen in etwa 25 ccm Wasser. Dabei erzielten wir etwa 1-proz. Gelatine-Lösungen, die jedoch statt Alteration eher Depression des Siedepunktes des Wassers anzeigten. Bei Verwendung 2-proz. Lösungen, bei denen bereits van-der-Waalssche Kräfte zu berücksichtigen wären, ließ sich andeutungsweise eine Siedepunkts-Erhöhung nachweisen. Aber obwohl wir, um die Schwankungen des Siedepunktes durch Luftdruck-Änderungen auszugleichen, nebeneinander 2 Beckmann-Apparate mit und ohne Gelatine im Gang hielten, und den durchschnittlichen Wasser-Siedepunkt in die Rechnung einbezogen, möchten wir ganz im allgemeinen auf Grund unserer Beobachtungen die ebullioskopische Bestimmung in wäßriger Lösung für Gelatine ablehnen. Zwei auf diese Weise ermittelte Werte, die um rund 100% differieren, seien mitgeteilt:

- 1) 0.4666 g Gelatine in 26.4001 g Wasser: $\Delta = 0.003^{\circ}$. Mol.-Gew. gef. 3004. —
- 2) 0.6756 g Gelatine in 27.0261 g Wasser: $\Delta = 0.008^{\circ}$. Mol.-Gew. gef. 1600.

Die 336 Stdn. auf 100° in 25-proz. wäßriger Lösung erhitzte Gelatine, die kaum mehr kolloide Eigenschaften äußerte, ergab keine besseren Werte, ein Zeichen, daß auch in ihr noch durchschnittlich sehr hohe Molekulargewichte vorliegen.

Die kryoskopische Bestimmung des gleichen Präparates ließ sich jedoch anstandslos in wäßriger Lösung durchführen.

0.1912 g Gelatine in 25.000 g Wasser: $\Delta = 0.03^{\circ}$. — Mol.-Gew. gef. 4736.

Reaggregation der Gelatine.

Eine 25-proz., 336 Stdn. bei 100° erhitzte Gelatine-Lösung wurde auf 3% verdünnt und zeigte bei 40° eine relative Viscosität von 1.08 und eine Mutarotation von 0.34 Ventzke-Graden. Nach dem Eindampfen zur Trockne und Wiederauflösen auf genau 3-proz. Lösung ergab sich eine Erhöhung der Viscosität auf 1.1 und der Mutarotation auf 0.9 Ventzke-Grade.

239. Werner Keil: Entstehung von Pyrrolidin aus Halogenbutyl-phthalimiden.

[Aus d. Physiolog. Institut d. Universität Greifswald.]

(Eingegangen am 15. Mai 1930.)

Bei Untersuchungen über Basen des tierischen Stoffwechsels benötigte ich eine größere Menge 1.4-Amino-butanol. Das von Henry¹⁾ angegebene Verfahren (Reduktion von γ -Cyan-propylalkohol mit Natrium in Alkohol) gab in mehreren Ansätzen eine sehr schlechte Ausbeute. Deshalb wurde versucht, für das 1.4-Amino-butanol den von Putochin²⁾ vorgezeichneten Weg zu benutzen. Putochin stellte Aminoverbindungen in der Weise dar, daß er die entsprechenden Phthalylverbindungen mit starker Kalilauge spaltete. Die entstehenden Basen ließen sich durch Destillation leicht in guter Ausbeute herstellen. Das Verfahren gab die Möglichkeit, manche Diamine und Amino-alkohole zu gewinnen, deren Darstellung früher schwierig war.

¹⁾ C. 1907, I 1314.

²⁾ B. 59, 625 [1926].