

152. Alfons Schöberl: Über die Isolierung von Lanthionin aus vorbehandelter Schafwolle*).

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Würzburg.
(Eingegangen am 19. Juli 1943.)

Bei der Untersuchung der Reaktionsfähigkeit der Disulfidbindungen in cystinhaltigen Naturstoffen, besonders in Keratinen, bei der Einwirkung alkalischer Lösungen hat sich auf Grund von systematischen Modellversuchen aus neuerer Zeit ein prinzipieller Wandel in der Problemstellung ergeben. Was Arbeitsziel und -technik anlangt, so standen zunächst analytische Gesichtspunkte und die Reaktionskinetik im Vordergrund. Indessen beginnen sich jetzt auch durch Versuche zugängliche, präparative Fragen auf diesem Arbeitsgebiet, das etwa bei der Schafwolle wissenschaftlich und technisch interessiert, abzuzeichnen. Die vorliegende Mitteilung soll einen präparativen Beitrag zu Problemen, die in unserem Arbeitskreis seit geraumer Zeit studiert werden¹⁾, liefern.

Wie seit langem bekannt ist, führt der Alkaliangriff auf das Keratin der Schafwolle²⁾ als Folge der Labilität der hier reichlich vorhandenen SS-Bindungen der eingebauten Cystinreste zu einer Abspaltung von Schwefel in Form von Schwefelwasserstoff. Beim Wollkeratin, wie auch bei anderen Proteinen, Cystin und Cystinderivaten maß man zunächst der Höhe dieser Schwefelabspaltung die Hauptbedeutung bei und erblickte hierin das Kennzeichnende dieser Vorgänge³⁾. So war in den vergangenen Jahrzehnten das Problem des labilen Schwefels in Eiweißstoffen entstanden.

In Modellversuchen an einer Reihe von Disulfiden verschiedener Struktur lernten wir in den letzten Jahren diese H_2S -Abspaltung aber als Folgereaktion charakteristischer Umsetzungen an SS-Bindungen kennen und verstehen, ja es wurden sogar Beispiele, wie etwa SS-Glutathion und Dialanyl-cystindianhydrid bekannt⁴⁾, in denen Natronlauge wohl starke Veränderungen an den SS-Gruppen, aber praktisch keine H_2S -Bildung auslöste. Damit wurde das Schwergewicht der Reaktionen auf das Studium der Umwandlung des disulfidisch gebundenen Schwefels in andere Bindungsformen des Schwefels beim Alkaliangriff verlagert. Die erste Feststellung betraf die Entstehung von Sulfhydrylgruppen aus den SS-Bindungen aller untersuchten Disulfide, die analytisch erfassbar waren, und deren Träger (Thiole) präparativ abgetrennt werden können. Es darf hier ferner auf die Isolierung einer Sulfinssäure, etwa von Benzolsulfinssäure bei der Alkalispaltung von Phenylsulfid, hingewiesen werden, worauf in früheren Arbeiten mehrfach aufmerksam gemacht worden war⁵⁾. Schließlich war noch von uns auf Grund eingehender Diskussionen der an SS-Bindungen ansetzenden Haupt- und Folgereaktionen, die sehr verwickelt sind, aber eine Fundgrube für bemerkenswerte Umsetzungen auch von allgemeiner Bedeutung darstellen, mehrfach (bereits im Jahre 1939) die Möglichkeit der Bildung von Thioätherbindungen erwähnt worden⁶⁾. Der präparative Nachweis solcher neuer Schwefelverbindungen kann dadurch gestört sein, daß diese selbst wiederum in den alkalischen Lösungen, beispielsweise unter Abspaltung von Schwefel, weiter-

*) VIII. Mitteil. in der Untersuchungsreihe „Reaktionsfähigkeit und Bau der Schafwollfasern“; VII. Mitteil.: Biochem. Ztschr. **313**, 214 [1942].

¹⁾ Vergl. Schöberl u. Rambacher, Biochem. Ztschr. **306**, 269 [1940] und frühere Mitteilungen.

²⁾ Wenn hier der Begriff Wollkeratin benutzt wird, so soll dies den Baustoff jener Fasern im allgemeinen bedeuten, ohne daß damit die durch das Vorhandensein verschiedener Zellarten gegebene Inhomogenität der Wollfasern übersehen wird. Jedoch ist festzuhalten, daß die Hauptmasse feiner Wollhaare durch das Keratin der Spindelzellen dargestellt wird.

³⁾ Vergl. Schöberl u. Hornung, A. **534**, 210 [1938]; ferner Hornung, Dissertat. Würzburg 1938.

⁴⁾ Schöberl u. Rambacher, A. **538**, 84 [1939].

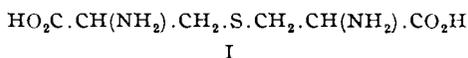
⁵⁾ Vergl. Schöberl u. Eck, A. **522**, 97 [1936].

⁶⁾ Rambacher, Dissertat. Würzburg 1939; Schöberl, Angew. Chem. **54**, 313 [1941].

reagieren oder abgebaut werden. Man erkennt aus diesen Überlegungen ohne weiteres die Notwendigkeit der Auswahl geeigneter Reaktionsbedingungen zur Erfassung bestimmter Zwischenstufen des Alkaliangriffes.

Mit besonderem Nachdruck hatten wir bei unseren Untersuchungen über die Einwirkung von heißem Wasser und von Alkalien auf Schafwolle die Tatsache der weitgehenden Umwandlung der SS-Bindungen bei nur geringer Abnahme des Gesamtschwefelgehaltes herausgestellt und durch Ermittlung einer Schwefelbilanz auch zahlenmäßig erfaßt⁷⁾. Aus den Versuchen konnte mit Sicherheit auf die Anwesenheit beträchtlicher Mengen von neuen Schwefelverbindungen in vorbehandelter Schafwolle geschlossen werden. Aber auch in Rohwollpräparaten fanden wir Unterschiede im Gesamt- und Cystinschwefel, und wir schlugen die Bestimmung dieser beiden Größen in dem sog. „Schwefelbilanzverfahren“ zur Festlegung des Faserzustandes und zur Überprüfung von Veredelungsverfahren zwecks Nachweis von Faserschädigungen vor. Beispielsweise lagen in einer Versuchsreihe mit Wolle nach einer Heißwasserbehandlung nur noch rund 50% des Gesamtschwefels als Cystin, also in Form von SS-Bindungen vor, und in wasserlöslichen Anteilen aus dem Wollkeratin betrug dieser Cystinschwefel gar nur mehr um 30%. Auch bei einer eben abgeschlossenen Untersuchung über die Behandlung von menschlichen Haaren mit Natronlauge, über die in Kürze berichtet werden soll, fielen abgebaute Keratinpräparate mit über 4% Schwefel, aber mit sehr geringem Cystingehalt an. So wurde das Problem der präparativen Isolierung von Trägersubstanzen des nicht disulfidisch gebundenen Schwefels aus Keratinen, die an ihren SS-Bindungen eine hydrolytische Aufspaltung erlitten, immer vordringlicher.

Zu der erörterten Fragestellung lieferten Horn, Jones und Ringel⁷⁾ einen bemerkenswerten Beitrag. Die amerikanischen Autoren beschrieben im Jahre 1941 die Isolierung eines neuen, bisher unbekanntes Thioäthers aus Schafwolle, die in der Siedehitze mit verdünnter Sodaaflösung vorbehandelt worden war, und bestätigten damit die von uns ausgesprochene Vermutung der Bildung eines solchen Verbindungstyps bei der Alkalibehandlung von Keratin. Gleichzeitig bewiesen du Vigneaud und Brown⁸⁾ durch Synthese⁹⁾ die Struktur dieses Thioäthers, der als Lanthionin bezeichnet wurde¹⁰⁾, und studierten seine verschiedenen stereoisomeren Formen. Lanthionin leitet sich formal vom Cystin durch Abspaltung eines S-Atoms ab (I):



Horn, Jones und Ringel haben weiterhin gezeigt¹¹⁾, daß Lanthionin auch bei der Sodabehandlung anderer cystinhaltiger Keratine und Proteine, wie menschlicher Haare, Federn und Lactalbumin entsteht¹²⁾, und daß eine allgemeine Alkaliwirkung und keine spezifische Wirkungsweise der Soda vorliegt. Denn Lanthionin ließ sich aus Wolle bzw. Haaren auch nach Behandlung mit verdünnter Natronlauge oder Natriumsulfidflösung gewinnen. Beide inaktiven Formen des Lanthionins und zwar die Mesoform und die etwas leichter lösliche Racemform konnten aus den Proteinen abgetrennt werden¹³⁾.

Die Sodabehandlung von Schafwolle scheint für eine sich anschließende Isolierung neuer Schwefelverbindungen, die der Reaktionsfähigkeit der Cystin-SS-Bindungen ihre Entstehung verdanken, besonders günstig zu sein. Dies geht aus der von uns ermittelten Schwefelbilanz einer solchen Reaktion, die das Schicksal der SS-Bindungen festlegt,

⁷⁾ Journ. biol. Chem. **138**, 141 [1941].

⁸⁾ Journ. biol. Chem. **138**, 151 [1941]; **140**, 776 [1941].

⁹⁾ Vergl. auch Kuhn u. Quadbeck, B. **76**, 527 [1943].

¹⁰⁾ Die Bezeichnung geht auf einen Vorschlag von du Vigneaud zurück.

¹¹⁾ Journ. biol. Chem. **139**, 473 [1941]; **144**, 87 [1942].

¹²⁾ Kürzlich wiesen du Vigneaud, Brown u. Bounes (Journ. biol. Chem. **141**, 707 [1941]) die Bildung von Lanthionin auch bei der Einwirkung von Soda oder Natronlauge auf Insulin nach.

¹³⁾ Horn, Jones u. Ringel, Journ. biol. Chem. **144**, 93 [1942].

hervor¹⁴⁾. Die Bestimmungen hierbei erstreckten sich auf den als Schwefelwasserstoff oder in elementarer Form abgespaltenen Schwefel und auf Cystin- und Gesamtschwefelgehalt. Die starken Veränderungen am Wolleschwefel durch Sodalösungen ermittelt auch eine Untersuchung von Elöd, Nowotny und Zahn¹⁵⁾, in der die Geschwindigkeit des Angriffes auf jene funktionellen Gruppen eingehender untersucht wurde¹⁶⁾. Fragen präparativer Natur haben Elöd und Mitarbeiter nicht veröffentlicht. Hinsichtlich der S-Bilanz können wir aus unseren Zahlen die gleichen Folgerungen wie diese Autoren ziehen.

Bei 1-stdg. Kochen von Wolle mit 0.07-mol. Sodalösung, wobei zwar die Faserstruktur erhalten bleibt, aber eine starke mechanische Faserschädigung erfolgt¹⁷⁾, gingen 40 % des Wolle-S in die Flotten, und nach S-Bestimmungen an den behandelten Fasern lag der Schwefelumsatz bei 33 %. In der Hauptsache wird wohl in den Flotten Sulfid Schwefel und elementarer Schwefel vorgelegen haben¹⁸⁾. Auf Grund von Cystinbestimmungen betrug der Cystinumsatz¹⁹⁾ 71 %, woraus sich errechnete, daß vom Gesamtschwefel dieser behandelten Fasern nur mehr 32 % als Cystin und $\frac{2}{3}$ in anderen Bindungsformen vorlagen.

Der nicht mehr disulfidisch gebundene Schwefel in mit Sodalösung behandelter Wolle ist zumindest zu einem großen Teil in Form von Lanthionin anwesend. Nach der von Horn, Jones und Ringel angegebenen Methode gelingt die Isolierung dieses Thioäthers aus Eiweiß nach unseren bisherigen Erfahrungen recht gut. Das Verfahren ist dadurch charakterisiert, daß Lanthionin zusammen mit anderen schwer löslichen Aminosäuren (beispielsweise Cystin) aus der alkoholischen Lösung der Hydrochloride mit Pyridin gefällt wird. Übrigens läßt sich nach dieser „Pyridinmethode“ auch das Cystin aus salzsauren Hydrolysaten ziemlich quantitativ abtrennen. Mesolanthionin ist wegen seiner charakteristischen dreieckigen Krystalle auch in Aminosäuregemischen gut erkennbar.

Wie schon erwähnt, glückte die Isolierung von Lanthionin bisher aus Wolle oder Haaren nach einer Vorbehandlung mit Sodalösung, Natriumsulfidlösung oder Natronlauge. In einer früheren Arbeit war nun vor Jahresfrist über die Einwirkung von Ammoniak auf Wolle berichtet worden²⁰⁾. Im Verlaufe dieser Untersuchung hatten sich auch hierbei starke Veränderungen an den SS-Bindungen ergeben, und es fielen Wollpräparate an, in denen ein großer Teil des Gesamtschwefels nicht mehr disulfidisch gebunden vorlag, und die ein geeignetes Versuchsmaterial für eine präparative Weiterarbeit darstellten. Wir vermuteten auch in solchen Wollkeratinen die Anwesenheit von Lanthionin. Diese Vermutung erwies sich, wie bereits kurz berichtet²⁰⁾, als zutreffend.

¹⁴⁾ Vergl. auch Hoffmann, Journ. biol. Chem. **65**, 251 [1925].

¹⁵⁾ Melliand Textilber. **23**, 58 [1942].

¹⁶⁾ Am 4. November 1941 unterrichtete ich Hrn. Elöd unter Hinweis auf die starken Veränderungen am Wolle-S brieflich von unseren Untersuchungen über die Soda einwirkung auf Wolle. Hr. Elöd teilte mir dann am 8. November 1941 mit, daß er sich im Anschluß an die Mitteilung von Horn, Jones u. Ringel gleichfalls mit diesem Problem beschäftigt habe. Der Beginn unserer Untersuchungen liegt vor dem Bekanntwerden jener amerikanischen Arbeiten. Jedoch konnte seinerzeit aus äußeren Gründen die notwendige systematische Bearbeitung nach den in unseren Modellversuchen festgelegten Gesichtspunkten nicht geleistet werden. Über Teilergebnisse wurde vor dem Bezirksverein des VDCh in Frankfurt am 19. Februar 1942 und auf der Arbeitstagung des Arbeitskreises für Färbereitechnik in Brünn am 11. April 1942 berichtet.

¹⁷⁾ Elöd, Nowotny u. Zahn (Kleppigs Text.-Ztschr. **45**, 663 [1942]) haben solche Faserschädigungen durch Sodabehandlung auch zahlenmäßig festgelegt.

¹⁸⁾ Sehr wahrscheinlich erscheint auch die Anwesenheit geringer Mengen von organisch gebundenem Schwefel. Elöd und Mitarbeiter stellten die Höhe der löslichen Wollanteile, die selbstverständlich S-haltig sein können, fest.

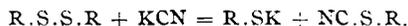
¹⁹⁾ Bezogen auf den tatsächlichen Cystingehalt der Rohfaser, nicht auf den aus dem Gesamt-S-Gehalt errechneten.

²⁰⁾ Schöberl, Biochem. Ztschr. **313**, 214 [1942].

Die als Ausgangsmaterial benutzte NH_3 -Wolle²¹⁾ besaß bei einem Gesamtschwefelgehalt von 1.65% nur mehr rund die Hälfte dieses Schwefels in disulfidischer Bindung. In der Tat lieferte die Aufarbeitung des Hydrolysatens dieser NH_3 -Wolle nach der „Pyridinmethode“ in guter Ausbeute eine nicht einheitliche Krystallisation, die auf Grund der ermittelten S-Bilanz nur zu 43.4% aus Cystin bestand, während der Rest eine andere schwefelhaltige Verbindung darstellen mußte. Die S-Verteilung in diesem Substanzgemisch entsprach also völlig jener im Ausgangsmaterial. Die Trennung der schwefelhaltigen Stoffe durch fraktionierte Krystallisation erwies sich als nicht möglich. Es war uns aber bereits bekannt, daß Cystin und Lanthionin in ihren Löslichkeitseigenschaften einander sehr ähnlich sind.

Wir geben hier zwei präparativ anwendbare Methoden zur bequemen Trennung von Cystin und Lanthionin bekannt. Die eine beruht darauf, daß nur *N,N'*-Dibenzoyl-cystin ein vor allem bei Gegenwart überschüssiger Natronlauge schwer lösliches Natriumsalz bildet²²⁾. Die Abtrennung von Cystin gelingt so in einem Arbeitsgang, und es erscheint möglich, daß dieses Natrium-Salz auch in anderen Fällen zur Abscheidung von Cystin geeignet ist.

Die zweite Methode benutzt die spezifische Umsetzung der SS-Bindung des Cystins mit Kaliumcyanid nach folgender Gleichung²³⁾:



Die in ammoniakalischer Lösung hinreichend rasch verlaufende Reaktion führt zur Bildung von Thiol und Rhodanid, die beide im Gegensatz zu Cystin selbst leicht löslich sind²⁴⁾. Säuert man daher solche Systeme mit Essigsäure an, so fällt nur das schwer lösliche Lanthionin, dessen Thioätherbindung natürlich nicht mit dem Cyanid reagiert, aus. Diese einfache Reinigung für Lanthionin ist deswegen von Interesse, weil bei der Alkalibehandlung etwa von Keratinen nicht eine völlige Umsetzung sämtlicher Cystinreste angestrebt zu werden braucht und dann zunächst Gemische von Cystin und Lanthionin anfallen.

Die gemachten Erfahrungen führten bei dem oben erwähnten Mischkrystallinat aus der NH_3 -Wolle ebenfalls zum Erfolg. Auch hier gelang nach Abtrennung des Cystins als Natrium-Salz seiner Dibenzoylverbindung glatt die Isolierung von Lanthionin als Dibenzoylderivat. Damit ist nunmehr auch bei der Einwirkung von Ammoniak auf Schafwolle die Bildung von Lanthionin durch den Versuch erwiesen.

Im Zusammenhang mit den von uns untersuchten Fragen wäre eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Lanthionin erwünscht. Bei dem Versuch, die von Baernstein am Methionin entwickelte und auf einer Aufspaltung mittels Jodwasserstoffsäure beruhenden Methode auf Lanthionin zu übertragen, zeigte es sich, daß die Thioätherbindung des Lanthionins nur sehr schwer von konz. Jodwasserstoffsäure angegriffen wird²⁵⁾. Unter den Bedingungen der Methioninbestimmung fanden wir nur 5% Cystin nach

²¹⁾ So wird die mit konz. Ammoniak-Lösung behandelte Wolle kurz bezeichnet.

²²⁾ Siehe vorangehende Mittel., B. 76, 96+ [1943].

²³⁾ Vergl. Schöberl u. Ludwig, B. 70, 1422 [1937].

²⁴⁾ Vergl. auch Brown u. du Vigneaud, Journ. biol. Chem. 140, 767 [1941] und Biochem. Ztschr. 313, 220, Anm. 5 [1942].

²⁵⁾ Vergl. Biochem. Ztschr. 313, 228, Anm. 2 [1942].

6-stdg. Reaktion. Auch mit der von Kögl und de Man²⁶⁾ angegebenen und beispielsweise an Thiophan- α -carbonsäure studierten Methode der Oxydation mittels Kaliumpermanganats in sodaalkalischer Lösung zur Bestimmung von thioätherartig gebundenem Schwefel machten wir bis jetzt beim Lanthionin keine günstigen Erfahrungen.

Man kann schon aus den bisher vorliegenden Ergebnissen die Folgerung ziehen, daß zur Erzielung einer maximalen Lanthioninausbeute bei der Behandlung von Proteinen mit alkalischen Lösungen die Einhaltung gewisser Reaktionsbedingungen notwendig ist. Die wesentlichen Faktoren scheinen Alkalikonzentration, Temperatur und Reaktionsdauer zu sein, jedoch können hier erst weitere Versuche eine endgültige Klärung bringen. Auch der an anderer Stelle erörterte Mechanismus der Lanthioninbildung, über den es noch keine durch Versuche gesicherten Vorstellungen gibt, regt zu neuen Untersuchungen an. Nach beiden Richtungen werden unsere Arbeiten fortgesetzt.

Die Auffindung von Lanthionin als einer neuen schwefelhaltigen Aminosäure in wenn auch vorbehandelten Proteinen kann als direkte Folge der Bemühungen, die Umwandelbarkeit der SS-Bindungen verstehen zu lernen, angesehen werden und erweckte erneut das Interesse am Studium schwefelhaltiger Naturstoffe. Die hier neu auftauchende Möglichkeit der Bildung einer Thioätherbindung wird nicht zuletzt für gewisse Fragen des Faserbaues bei der Wolle und für Stoffwechselfvorgänge zu diskutieren sein.

Für die Untersuchungen standen Mittel aus dem Textilförderungs-
werk der Wirtschaftsgruppe Textilindustrie zur Verfügung. Ich
möchte auch hier für diese Unterstützung unserer Arbeiten vielmals danken.

Beschreibung der Versuche.

1) Darstellung von *l*-Cystin aus Schafwolle nach der „Pyridinmethode“: 100 g lufttrockne Schafwolle (Kammzug A/AA, australische Merinowolle) mit einem photometrisch ermittelten Cystingehalt von 9.1% wurden mit 300 ccm konz. Salzsäure 15 Stdn. im Ölbad (130°) unter Rückfluß gekocht. Das tiefbraune, filtrierte Hydrolysat ließ sich nach Verdünnung mit Wasser durch mehrfaches, längeres Schütteln mit jeweils etwa 5 g Aktivkohle (Carboraffin C) entfärben. Das nur mehr blaßgelbe Hydrolysat wurde im Vak. zu einem dicken Sirup eingeengt, den man wiederum in 200 ccm Äthanol aufnahm. Nach erneuter Abdestillation wurde schließlich der Rückstand in der Hitze mit insges. 1 l absol. Äthanol aufgenommen. Nimmehr setzte man tropfenweise Pyridin zu, bis keine Fällung mehr erfolgte, wozu etwa 25 ccm nötig waren. Die dichten, weißen Flocken setzten sich im Verlaufe von 1 Stde. gut ab, so daß abgehebert werden konnte. Die Fällung wurde mehrmals mit absol. Äthanol durchgerührt, schließlich abgenutscht, nochmals mit Alkohol gewaschen und im Exsiccator getrocknet: 23 g staubtrocknes Pulver. Zur Reinigung kochte man das Pulver mit 100 ccm Wasser aus, wobei das Cystin ungelöst blieb und aus der eiskalten Lösung abzentrifugiert wurde. Das Rohprodukt wurde aus salzsaurer Lösung durch Zugabe von gesättigter Natriumacetatlösung umgefällt, wobei die Fällung durch Zusatz von Aceton (100 ccm auf 200 ccm Lösung) vervollständigt wurde. Schließlich saugte man das Cystin ab, wusch gründlich mit heißem Wasser, zum Schluß mit Methanol und Äther. Ausb. 5.5 g.

2) Einwirkung von Sodalösung auf Schafwolle: Benutzt wurde eine fabrikgewaschene Schafwolle, und zwar ein Kammzug des Sortimentes A/AA (australische Merinowolle) mit einem Gesamt-S-Gehalt von 3.64%

²⁶⁾ Ztschr. physiol. Chem. 269, 93 [1941].

(Mittelwert aus 3 Verbrennungen) und einem Cystingehalt von 10.1%²⁷⁾ (6-stdige. Hydrolyse von 400.7 bzw. 443.1 mg Wolle mit 6-n. H₂SO₄, wobei 10.2 und 10.05% Cystin gefunden wurden). In einem 2-l-Schliffkolben kochte man in 2 Ansätzen je 90.2 g (Trockengewicht) des zerzupften Kammzuges mit 1500 ccm 0.07-mol. Sodalösung 60 bzw. 90 Min. unter Rückfluß. Die heiße Sodalösung färbte sich schon sehr bald und war nach Beendigung des Kochens recht intensiv gelb gefärbt²⁸⁾. Die orangefarbenen Flotten, die beträchtliche Mengen von Sulfid-S enthielten, wurden soweit als möglich abgegossen und in verschlossenen Flaschen aufbewahrt. Die behandelten Wollen wurden tüchtig mit Wasser gewaschen, etwas abgepreßt und an der Luft getrocknet. Sie waren der Ausgangswolle gegenüber stärker gelb, waren stark verfilzt und hatten im Griff erheblich gelitten. An manchen Stellen zeigten sich verklebte und besonders brüchige Fasern²⁹⁾. Der Gewichtsverlust der Fasern wurde nicht bestimmt. Die Haare färbten sich beim Erwärmen mit alkalischer Plumbitlösung tiefschwarz.

Bestimmung von Gesamt-S in den Flotten: Je 100 ccm der Flotten wurden zunächst nach Zugabe von genügend 2-n. NaOH mit Brom in der Wärme oxydiert. Dann setzte man konz. Salpetersäure zu, verdampfte zur Trockne, filtrierte und fällte die salzsauer gemachte Lösung in üblicher Weise mit BaCl₂. Folgende Werte wurden erhalten:

Versuchsdauer Min.	BaSO ₄ mg	S mg	S in Gesamtflotte g	S in % des Wolle-S ³⁰⁾
60	640.6	88	1.32	40.2
90	720.0	99	1.48	45.1

S-Bestimmung in der 60 Min. mit Soda behandelten Wolle³¹⁾:

Analysen- Nr.	Einwaage mg	Asche mg	Barium- acetat- lösung ³²⁾ ccm	S mg	S %	Nicht- Cystin-S %
200	253.8	0.9	3.60	6.23	2.46	1.68
201	267.7	1.7	3.70	6.40	2.40	1.62

Für die photometrischen Cystinbestimmungen mit Phosphorwolframsäure bei Anwesenheit von Sulfit wurde in Doppelansätzen mit 10 ccm 6-n. H₂SO₄ hydrolysiert, auf 50 ccm aufgefüllt und filtriert. Von den Hydrolysaten

²⁷⁾ Sämtliche Angaben dieser Versuchsreihe beziehen sich auf Trockengewichte. Die Trockengewichte sind auch bei den Einwaagen angegeben. Durchführung der S- und Cystinbestimmungen an den Wollpräparaten wie in früheren Mitteilungen beschrieben (Biochem. Ztschr. **306**, 269 [1940]; Klepzig's Text.-Ztschr. **42**, 369 [1939]; B. **74**, 1225 [1941]). Die Analysen stammen z. Tl. von Frl. G. Schneider.

²⁸⁾ In späteren Versuchen soll bei der Sodaeinwirkung O₂ peinlichst ausgeschlossen werden.

²⁹⁾ Wir besitzen hier keine Möglichkeit, Faserschädigungen durch mechanische oder mikroskopische Prüfmethode festzulegen.

³⁰⁾ In der eingesetzten Wolle waren auf Grund der S-Bestimmung 3.28 g S vorhanden.

³¹⁾ Ihr Feuchtigkeitsgehalt betrug 8.56%.

³²⁾ 1 ccm Bariumacetatlösung = 1.73 mg S.

diente jeweils 1 ccm für die Messungen mit dem Pulfrichschen Stufenphotometer ($s = 1$ cm). Die folgende Zusammenstellung enthält die Ergebnisse:

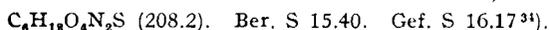
Versuchs- dauer Min.	Einwaage mg	Ek	Cystin mg	Cystin %	Cystin-S %	Cystin-S in % des Gesamt-S der Soda- Wolle
60	571.4	0.413	16.4	2.87	0.780	32.1
	506.5	0.374	15.0	2.96		
90	613.7	0.404	15.9	2.59	0.702	
	536.5	0.355	14.3	2.66		

3) Isolierung von Lanthionin aus mit Sodalösung behandelter Schafwolle: Je 90 g der lufttrocknen Wollpräparate, die nach Abschnitt 2 60 bzw. 90 Min. mit heißer Sodalösung behandelt worden waren, hydrolysierte man durch 16-stdg. Kochen mit insges. 500 ccm konz. Salzsäure unter Rückfluß im Ölbad bei 120—125°. Das dunkelbraune Hydrolysat enthielt viel Huminsubstanzen, von denen nach Verdünnung abfiltriert wurde. Die Entfärbung des auf 1 l verdünnten Hydrolysates erfolgte durch mehrmaliges, längeres Schütteln mit 5—10 g Aktivkohle (Carboraffin C). Das blaßgelbe Hydrolysat wurde im Vak. bei 50—60° völlig eingedampft und der anfallende gelbe Sirup heiß in 200 ccm Äthanol gelöst. Nach erneutem Eindampfen wurde der Rückstand in 1000 ccm absol. Äthanol auf dem Wasserbad unter Rückfluß gelöst, was längere Zeit beanspruchte. Beim Stehenlassen der Lösung über Nacht in der Kälte krystallisierte ein weißer Stoff aus, der abgesaugt, mit 200 ccm Äthanol gewaschen und an der Luft getrocknet wurde. 1.6 g einer feinen, weißen, in kaltem Wasser schwerlöslichen Substanz (Fraktion I). Plumbitreaktion und Nitroprussidnatrium-Test (mit KCN) waren positiv, ebenso war Cl⁻ vorhanden. Hingegen blieben Diazoreaktion und Millonsche Probe entweder schwach oder überhaupt negativ. Die Verbindung enthielt etwas Asche.

Cystinbestimmung in Fraktion I (Durchführung wie oben): 251 mg Substanz wog man in ein Meßkölbchen ein, schlämmte in Wasser auf, löste durch Zusatz von 1.2 ccm 2-n. H₂SO₄ und füllte auf 25 ccm mit Wasser auf. Von dieser Lösung diente 1 ccm zum Farbanatz. Gefunden wurde Ek = 0.624, was 0.47 mg Cystin entspricht. In der Einwaage waren also insgesamt 11.7 mg = 4.7% Cystin vorhanden.

S-Bestimmung an Fraktion I: 133.4 mg Substanz (Aschegehalt = 5.6 mg) verbrauchten 7.72 ccm Bariumacetatlösung = 13.4 mg S = 10.5% S = einem Cystingehalt von 39.4%. Mithin liegt nur ein kleiner Teil des S disulfidisch gebunden vor (ber. für Cystin 26.70% S, für Lanthionin 15.40% S).

Zur Reinigung löste man Fraktion I in 2-n. NH₃ auf und ließ bei Zimmertemperatur das NH₃ langsam abdunsten, wobei reichliche Krystallisation erfolgte. In der Fällung waren die charakteristischen dreieckigen Krystalle des *meso*-Lanthionins reichlich vorhanden³³⁾.



³³⁾ *meso*-Lanthionin krystallisiert in dreieckigen Blättchen mit abgerundeten Ecken, die sehr typisch sind, *d,l*-Lanthionin in hexagonalen Tafeln.

³⁴⁾ Der etwas zu hohe S-Gehalt ist auf eine geringe Beimengung von Cystin zurückzuführen. Cystin kann durch das Umlösen aus NH₃-Lösung nur schlecht abgetrennt werden.

Die Mutterlauge von der 1. Krystallisation fällt man nach dem Verdünnen mit weiteren 500 ccm absol. Äthanol durch tropfenweise Zugabe von insgesamt 50 ccm Pyridin. Diese Pyridinmenge reichte für die Ausflockung der Hauptmasse an fällbaren Aminosäuren. Nach mehrstündigem Stehenlassen konnte abgehert werden. Die Fällung verrührte man noch einige Male mit Äthanol und saugte dann ab. Es wurden 31.2 g einer blaßgelben, körnigen Masse erhalten (getrocknet). Sie wurde mit 200 ccm Wasser durchgekocht, wobei ein feines, weißes Pulver ungelöst blieb. Nach mehrstündigem Stehenlassen im Eisschrank saugte man vom Ungelösten ab und wusch mit wenig Wasser und Methanol nach. Erhalten 2.4 g einer weißen Substanz (= Fraktion II)³⁵). — Zur Reinigung von Fraktion II löste man in der Wärme in 150 ccm Wasser + 6 ccm konz. NH_3 -Lösung, filtrierte nach 1-stdg. Stehenlassen und engte im Vak. auf $\frac{1}{3}$ des Volumens ein. Hierbei erfolgte Fällung einer weißen Substanz. Ihre Menge betrug nach Abtrennung 1.8 g. In der Mutterlauge befand sich eine wesentlich leichter lösliche Verbindung³⁶). Zur weiteren Reinigung löste man nochmals warm in 2-n. NH_3 und ließ das NH_3 durch Stehenlassen bei Zimmertemperatur abdunsten. Die dabei anfallenden Krystalle (650 mg aus 800 mg eingesetztem Material) enthielten reichlich die dreieckigen Krystalle des *meso*-Lanthionins. Lanthionin läßt sich auch durch Lösen in Salzsäure und Abstumpfen mit gesättigter Natriumacetatlösung umfällen.

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}$ (208.2). Ber. S 15.40. Gef. S 14.66, 14.62.

Darstellung von *N, N'*-Dibenzoyl-lanthionin: 100 mg der aus NH_3 -Lösung ungelösten Fraktion II wurden in schwach alkalischer Lösung, genau wie bei der Benzoylierung von Cystin beschrieben²²), benzoyliert. Überschüssige Natronlauge erzeugte hier keine Fällung eines schwer löslichen Na-Salzes. Die Rohausbeute betrug 150 mg. Mischschmelzpunkt mit *N, N'*-Dibenzoyl-cystin völlig unscharf.

$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{N}_2\text{S}$ (416.4). Ber. S 7.70. Gef. S 7.43.

4) Einwirkung von Jodwasserstoffsäure auf Lanthionin: 44.34 mg Lanthionin (aus Fraktion II von Versuch 3) wurden 6 Stdn. mit 10 ccm frisch destillierter Jodwasserstoffsäure (d 1.70) in der von Baernstein angegebenen Apparatur²⁰) unter Rückfluß gekocht. H_2S -Bildung wurde nicht beobachtet. Die Jodwasserstoffsäure destillierte man dann weitgehend ab und füllte das Hydrolysat mit Wasser auf 10 ccm auf. 2 ccm davon verbrauchten zur Neutralisation 0.5 ccm 2-n. NaOH . SH- bzw. SS-Nachweis mit Nitroprussidnatrium (Zusatz von KCN) stark positiv. Die photometrische Cystinbestimmung mit Phosphorwolframsäure ohne Sulfitzusatz, die mit 2 ccm Hydrolysat diesmal in Bicarbonatlösung³⁷) durchgeführt wurde (Vol. des Farbsatzes = 25 ccm), ergab einen $\text{Ek} = 0.312$. Hieraus errechnet sich ein Cystingehalt von 1.19 mg im Gesamthydrolysat, was 4.6% der theoretisch möglichen Menge entspricht. Mit Sulfit wurde unter genau gleichen Bedingungen nur ein Ek von 0.248 gefunden, obwohl theoretisch eine Verdoppelung des Farbwertes hätte erwartet werden müssen³⁸). Die Ursache

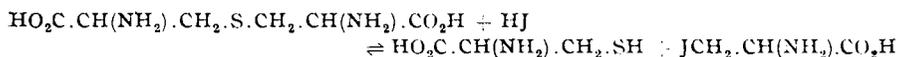
³⁵) Will man Lanthionin aus alkalisch vorbehandelten Proteinen, besonders aus Keratinen, präparativ isolieren, so ist die hier beschriebene Abtrennung der 1. Krystallisation nicht notwendig. Es ist vielmehr zweckmäßig, sie mit der durch Pyridin erhaltenen Fällung gemeinsam zu verarbeiten. Der Thioäther wurde aus Wolle auch in unserem organ. Praktikum durch Hrn. cand. chem. R. Hamu in guter Ausbeute abgetrennt.

³⁶) Auf Anwesenheit von *d, l*-Lanthionin wurde nicht geprüft.

³⁷) Schöberl u. Krumej, B. **71**, 236 [1938].

³⁸) Vergl. Biochem. Ztschr. **295**, 377 [1938].

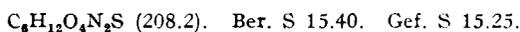
für diese Beobachtung kann vielleicht darin erblickt werden, daß die nach der folgenden Gleichung bei der HJ-Einwirkung auf Lanthionin entstehenden Verbindungen, nämlich Cystein und α -Amino- β -jod-propionsäure,



in der Bicarbonatlösung (pH 7.3) während des Stehenlassens der Ansätze nach Sulfitzusatz wiederum rückwärts unter Bildung des Thioäthers reagieren. Entsprechende Umsetzungen zwischen Thiolen und Jodverbindungen in neutraler Lösung sind in der Literatur beschrieben worden. Da anzunehmen war, daß diese Rückreaktion in schwach saurer Lösung nicht so rasch erfolgt, wurde nochmals eine Messung bei Anwesenheit von Sulfit in Acetattpufferlösung bei pH 5.2 vorgenommen. Hierbei wurde ein E_k von 0.611 für 2 ccm Substrat gefunden, was nunmehr etwa einer Verdoppelung des Wertes ohne Sulfitzusatz entspricht. In einem Blindversuch mußte bei diesem Ansatz die Reduktion von Phosphorwolframsäure durch HJ in der schwach sauren Lösung berücksichtigt werden.

5) Trennung von Lanthionin und Cystin über die Dibenzoylverbindungen: Eine Mischung aus 100 mg *l*-Cystin und 100 mg Lanthionin (aus Versuch 3) wurde in schwach alkalischer Lösung wie in der vorhergehenden Mitteilung beschrieben²²⁾ mit 2 ccm Benzoylchlorid benzoiliert. Dem mit Salzsäure gefällten Rohprodukt entzog man die Benzoessäure mit heißem Benzol, schlämmte den Rückstand in 5 ccm Wasser auf und löste bei schwachem Erwärmen durch Zugabe von einigen Tropfen 2-*n*. Natronlauge. Die kalte Lösung der Natrium-Salze (ihr pH lag bei 6) wurde mit überschüssiger 2-*n*. Natronlauge versetzt (etwa 6 ccm), wobei eine dichte Fällung des Natrium-Salzes von *N,N'*-Dibenzoyl-*l*-cystin in den charakteristischen Blättchen entstand. Die Rohausbeute an Natrium-Salz betrug 160 mg. — Aus der Mutterlauge fällt man mit Salzsäure das *N,N'*-Dibenzoyl-lanthionin, das noch aus 50-proz. Äthanol umkrystallisiert wurde. Ausb. 60 mg.

6) Trennung von Lanthionin und Cystin mittels Kaliumcyanids: Eine Mischung von 100 mg *l*-Cystin und 100 mg Lanthionin (aus Versuch 3) schlämmte man in 5 ccm Wasser auf und löste durch Zugabe von ein paar Tropfen konz. NH_3 -Lösung. Dann ließ man mit 150 mg Kaliumcyanid 45 Min. stehen. Nach dem Ansäuern mit 2-*n*. Essigsäure bis pH 6 erfolgte nach einiger Zeit Krystallisation. Die Mutterlauge zeigte intensive SH-Reaktion mit Nitroprussidnatrium. Die Substanz wurde nach mehrstündigem Stehenlassen abgesaugt und getrocknet. Ausb. 70 mg. Die Hauptmasse der Fällung bestand aus den typischen dreieckigen Krystallen des *meso*-Lanthionins. Zur Analyse wurde nochmals aus ammoniakal. Lösung mit Essigsäure umgefällt.



7) Isolierung von Lanthionin aus einer mit Ammoniak behandelten Schafwolle: Als Ausgangsmaterial diente hier eine deutsche Mischwolle, die 29 Monate bei Zimmertemp. mit konz. Ammoniaklösung reagiert hatte und in einer früheren Arbeit (hier als „ NH_3 -Wolle D“ bezeichnet) eingehend analytisch untersucht worden war²⁰⁾. Diese behandelte Wolle enthielt 1.65% Gesamt-S und 3.02% Cystin, woraus sich 0.806% Cystin-S errechnen (bezogen auf Trockengewicht). Der Gesamt-Schwefel lag also nur noch zu 48.8% als Cystin vor. — 80 g „ NH_3 -Wolle D“ (entspr. einem Trockengewicht von 68 g mit 2.05 g Cystin) wurden mit 300 ccm konz. Salzsäure durchhydrolysiert. Bei der Hydrolyse und der Aufarbeitung

des Hydrolysates wurde nach Versuch 3 vorgegangen. Jedoch wurde hier von der in ziemlicher Menge anfallenden krystallisierten Substanz, die aus der alkohol. Lösung beim Stehen im Eisschrank über Nacht ausfiel, nicht abgetrennt, sondern sogleich die Pyridinfällung angeschlossen. Man benötigte etwa 25 ccm Pyridin und erhielt eine weiße Verbindung in einer Menge von 18 g (trocken). Aus dieser Fällung trennte man durch Durchkochen mit 50 ccm Wasser und Stehenlassen in der Kälte 1.4 g eines feinen weißen Stoffs ab, der schließlich in 70 ccm Wasser durch Zugabe von konz. Ammoniak gelöst wurde. Nach Filtration wurde diese Lösung im Vak. auf $\frac{1}{3}$ des Volumens eingengt, wobei sich wiederum ein körniger, weißer Stoff abschied. In ihm ließ sich Cystin mit Nitroprussidnatrium nachweisen. Er wurde nochmals durch Lösen in 25 ccm 2-n. NH_3 und Verdunstenlassen des NH_3 bei Zimmer-temp. gereinigt. Ausb. dann 850 mg (Krystallisation I).

Krystallisation I enthielt 19.32% S (Mittelwert aus 19.51 und 19.12%). Zur Cystinbestimmung benutzte man eine Lösung von 15.5 mg in 10 ccm verd. H_2SO_4 . Mit 1 ccm dieser Lösung wurde ein Extinktionskoeffizient von 0.924 gefunden = 0.672 mg Cystin = 43.4% der Einwaage. Danach würde Krystallisation I zu 43.4% aus Cystin und zu 56.6% aus Lanthionin bestehen. Danach müßte sich der Gesamt-S der Substanz aus 11.58% Cystin-S und 8.70% Lanthionin-S zusammensetzen, während sich aus der Gesamt-S-Bestimmung ein Lanthionin-S-Gehalt von 7.74% errechnet (nach Abzug des photometrisch ermittelten Cystin-S). Die 850 mg von Krystallisation I enthielten rund 480 mg Lanthionin.

Isolierung von Lanthionin aus Krystallisation I: 200 mg Krystallisation I wurden, wie in Abschnitt 5 beschrieben, benzoyliert, die Dibenzoylverbindungen mit Säure gefällt und das Rohprodukt zur Entfernung der Benzoesäure mit Benzol extrahiert. Dann schlämmte man in 5 ccm Wasser auf, löste durch Zusatz der gerade nötigen Menge 2-n. NaOH (etwa 0.9 ccm), filtrierte und fällte nunmehr mit rd. 12 ccm 2-n. NaOH das Natriumsalz von *N,N'*-Dibenzoyl-cystin aus. Dieses wurde nach 1-stdg. Stehen in der Kälte abgesaugt. Aus dem Filtrat wurde das *N,N'*-Dibenzoyl-lanthionin mit 2-n. HCl ausgefällt. Rohausb. 200 mg. Es wurde nochmals 2-mal aus 50-proz. Äthanol umgelöst. Reinausb. 160 mg.

$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{N}_2\text{S}$ (416.4). Ber. S 7.70. Gef. S 7.65.

153. Paul Rabe: Das Wesen der Isomerie: 1.5-Diketone — cyclische Ketonalkohole (Zur Kenntnis der 1.5-Diketone, IV. Mittel. *).

[Aus d. Chem. Staatsinstitut Hamburg, Hansische Universität.]
(Eingegangen am 26. Juli 1943.)

Mit dieser und der sich anschließenden Mitteilung werden die Arbeiten über 1.5-Diketone unter Verwertung eines Versuches abgeschlossen, der sich über Jahrzehnte erstreckt hat. Die Arbeiten hatten bald nach ihrem Beginn zu Erscheinungen der Tautomerie geführt; sie enden mit der Behandlung einer Frage der Ring-Ketten-Tautomerie¹⁾ (Oxy-Oxo-Desmotropie).

*) III. Mittel.: A. 360, 265 [1908].

¹⁾ W. Hüchel, Theoret. Grundlagen d. organ. Chemie, 3. Aufl., 1. Band [1940], S. 185 u. besonders S. 202; 4. Aufl., 1. Band [1943], S. 205.