

Über Caseinokyrin.

Von

M. Siegfried.

(Der Redaktion zugegangen am 19. August 1904.)

Nachdem der Nachweis erbracht war,¹⁾ daß aus dem Glutintrypsinpepton und aus Glutin durch geeignete Zersetzung mit Salzsäure ein basischer Kern, das Glutokyrin, abgespalten wird, ergab sich die Aufgabe, zu prüfen, ob auch eigentliche Eiweißkörper einen gleichen oder ähnlichen Kern enthalten. Bei der Sonderstellung, welche das Glutin in der Reihe der Proteinsubstanzen einnimmt, war es nicht angängig, einen basischen Eiweißkern anzunehmen, solange ein solcher nur für das Glutin nachgewiesen war.

Tatsächlich läßt sich ein solcher Kern sowohl aus dem Fibrin als auch aus dem Casein isolieren.

Diese Kyrine, die nunmehr den Namen Protokyrine beanspruchen können, sind sehr ähnlich, unterscheiden sich aber nicht unwesentlich von dem Glutokyrin. Die eingehende Untersuchung des Fibrinokyrins wird von Herrn H. Geide ausgeführt. Hier sei über das Caseinokyrin berichtet.

Darstellung des Caseinokyrins.

Die Zersetzung des Caseins geschah durch Digestion mit ca. dem zehnfachen Gewichte teils 12%iger, teils 16%iger Salzsäure während 3 Wochen bei 38—39°, wobei täglich umgeschüttelt wurde. Hierauf wird das dunkle, mit den Waschwassern vereinigte Filtrat zunächst unter kräftigem Rühren

¹⁾ M. Siegfried, Ber. d. Königl. Sächs. Gesellsch. d. Wissensch., 1903, S. 63.

mit 10%iger PWS-Lösung, dann mit ca. 50%iger gefällt. Der so entstehende Niederschlag saugt sich nicht so gut wie der bei der Zersetzung von Gelatine erhaltene ab, weil das Phosphorwolframat des Histidins beigemischt ist. Hingegen filtriert der kalt gefällte PWS-Niederschlag des reinen Caseinokyrins gleich gut wie der des Glutokyrins im Gegensatz zu dem kaltgefällten PWS-Niederschlag der Hexonbasen. Das Auswaschen geschieht mit 5%iger Schwefelsäure, in der das Phosphorwolframat des Kyrins viel weniger löslich ist, als in 5%iger Schwefelsäure + 5%iger PWS, bis zur Chlorfreiheit. Hierbei löst sich ein Teil von PWS-Verbindungen auf. Der Niederschlag wird in Wasser und Ammoniak bei 30–40° gelöst und mit Barythydrat unter Vermeidung eines wesentlichen Überschusses zersetzt. Das Filtrat vom Barytniederschlag liefert nach Zusatz von etwas Ammoniumkarbonat und Filtrieren beim Eindampfen einen dunklen Sirup. Zur Entfärbung wird am vorteilhaftesten zu der wässerigen Lösung des Rohsirups solange wässrige Bleiacetatlösung gegeben, als noch ein flockiger Niederschlag¹⁾ entsteht, das Filtrat nach Entbleiung mit Schwefelwasserstoff eingedampft. In einem Falle habe ich den Rohsirup in verdünnter schwefelsaurer Lösung nach Kossel und Patten²⁾ durch Mercurisulfat vom Histidin befreit und die durch Schwefelwasserstoff entquecksilberte Lösung wieder mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Auch ohne Behandlung mit Bleiacetat oder Mercurisulfat erhält man nach häufigem Umfällen des Sulfates ein fast farbloses Produkt. Die Überführung in das Platinsalz hat sich glücklicherweise als nicht nötig erwiesen, ist aber, wenn große Mengen Platin zur Verfügung stehen, vorteilhaft, da mit dem mehrfachen Umfällen des Sulfates, welches ohne Anwendung von Platin nötig ist, große Verluste an Substanz verbunden sind. Eine hartnäckige Verunreinigung ist namentlich das Tyrosin, welches in den ersten Sulfatfällungen stets vorhanden ist und sich durch die Millonsche Reaktion und das Heraufdrücken der Kohlenstoffwerte und Verminderung

¹⁾ Mit der Untersuchung dieses Niederschlages bin ich zur Zeit beschäftigt.

²⁾ A. Kossel u. A. J. Patten, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 40.

der Stickstoffwerte zu erkennen gibt. Die Umfällung geschieht am besten aus 5%iger Schwefelsäure in Alkohol, wobei etwa auf 15 cem der schwefelsauren Lösung 1 l Alkohol absolut zu nehmen ist. Vorteilhaft fällt man das Rohsulfat zunächst einige Male als Öl, durch allmählichen Zusatz von Alkohol zu der schwefelsauren Lösung des Kyrins. Selbstverständlich ist nur die Prüfung des Sulfates, namentlich die Elementaranalyse maßgebend dafür, ob das Sulfat rein oder noch weiter umzufällen ist. Das Sulfat, welches in absolutem Alkohol unlöslich ist, wird mit Alkohol bis zum Versagen der SO_4 -Reaktion gewaschen.

Bei der Bildung des Kyrins aus Casein wird Pyrrolidinkarbonsäure abgespalten. Zur Isolierung derselben wurde das alkoholische Filtrat des Kyrinsulfates unter Fällung mit Kalilauge versetzt, bis Lackmus, nicht aber Kongo auf Säure reagierte, und eingedampft. Der Rückstand wurde mit absolutem Alkohol extrahiert, das Filtrat mit ca. $\frac{1}{2}$ Volumen Äther versetzt, das Filtrat eingedampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol aufgenommen, der Rückstand dieser Lösung in Wasser gelöst und mit frisch gefälltem anhydrischen Kupferoxydhydrat gekocht. Aus der alkoholischen Lösung wurde durch Äther das Kupfersalz abgeschieden: die aus diesem durch Zersetzung mit Schwefelwasserstoff erhaltene Säure war jedoch nicht zur Kristallisation zu bringen. Deshalb wurde nach dem Vorgange von Kossel und Dakin¹⁾ mit Sublimat, und zwar unter Zusatz alkoholischen Ammoniaks gefällt. Nach Zersetzung dieses Quecksilberniederschlags mit Schwefelwasserstoff wurde mit Silbersulfat entchlort, nach Entfernung des Silbers durch Schwefelwasserstoff und der Schwefelsäure durch Barythydrat kristallisierte nach Eindampfen die Säure. Dieselbe erwies sich nach dreimaliger Kristallisation aus Alkohol als α -Pyrrolidinkarbonsäure. Als Schmelzpunkt wurde ebenso wie von Kossel und Dakin 223° unkorrigiert gefunden: vorher war jedoch die Substanz weich geworden. Obgleich die Mengen alkohollöslicher Säure und alkohollöslichen Kupfersalzes sehr bedeutende waren, so war doch die Ausbeute an reiner kristallisierter Säure so gering, daß nach

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 410.

Zusammensetzung, zweitens durch die des durch Zersetzung mit Schwefelsäure erhaltenen Basenstickstoffs beim häufigen Umfällen erwiesen. Hierbei ergab sich regelmäßig für die Produkte der ersten Fällungen eine abweichende Zusammensetzung, ein höherer C- und niedrigerer N-Gehalt, sowie ein geringer Basengehalt der durch Schwefelsäure erhaltenen Zersetzungslösungen. Solche Produkte gaben die Reaktion von Millon, in den Spaltungslösungen ließ sich Tyrosin nachweisen. Entweder ist also in den Rohsulfaten Tyrosin selbst oder ein Tyrosin bei der vollständigen Spaltung lieferndes Spaltungsstück des Caseins vorhanden. Die Verluste beim Umfällen sind sehr bedeutend; aber gerade deshalb ist die Konstanz der Fraktionen beweisend für die Einheitlichkeit der Substanz.

Die Konstanz der optischen Aktivität der verschiedenen Fällungen, die von meinen Mitarbeitern und mir¹⁾ für die Pepsin- und Trypsinpeptone erwiesen wurde, kam hier nicht in Betracht, da das Caseinkyrinsulfat optisch inaktiv ist. Auf die Tatsache, daß das Kyrinsulfat inaktiv, während die isolierten Spaltungsprodukte sämtlich rechtsdrehend sind, werde ich in einer späteren Mitteilung eingehen.

Zusammensetzung des Caseinokyrinsulfates.

Das Sulfat wurde zur Analyse bei 65—70°, später bei 95° bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Am vorteilhaftesten geschah dies in bekannter Weise bei gleichzeitigem Überleiten von Luft, die mit Schwefelsäure getrocknet war. Zu dem Zwecke habe ich einen Apparat konstruiert, der in der Hauptsache aus einem Messingrohr von 1 cm Querschnitt besteht, das mit einem weiteren mit einem Tubus versehenen konzentrisch verlötet ist. Das innere Rohr wird durch das im äußeren siedende, durch einen aufgesetzten Kühler rücklaufende Wasser auf 95° erwärmt. In dem eingeschobenen Glasrohre haben bequem 4 Schiffchen Platz. Das über Schwefelsäure getrocknete Sulfat hält hartnäckig Alkohol zurück, der über Schwefelsäure überhaupt nicht entweicht. So wurde ein Sulfat, welches vorher

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 259 ff., und Bd. XLI, S. 68.

über Schwefelsäure im ganzen getrocknet war, auf Schiffchen vom 22. Dezember vor. J. bis 10. Februar d. J. im evakuierten, mit frischer Schwefelsäure beschickten Exsikkator belassen. Die Abnahme betrug während der 50 Tage nur 3^o/_o. Bei 70^o nahm dieses Sulfat noch 23^o/_o ab. Die Analyse des bei 70^o getrockneten Sulfats gab 31,72^o/_o C und 6,17^o/_o H, 14,56^o/_o N, das 50 Tage über Schwefelsäure getrocknete 35,80^o/_o C, 7,46^o/_o H und 10,40^o/_o N (Dumas)! Das über Schwefelsäure getrocknete Sulfat hatte außer etwas Wasser noch über 5 Mol. Alkohol zurückgehalten! Ja anfangs war mit der Möglichkeit zu rechnen, daß das bei 70^o bis zum konstanten Gewichte getrocknete Sulfat noch Alkohol im Molekül enthielte, denn durch Destillation einer größeren Menge bei 70^o konstant getrockneten Sulfates war im Destillate Alkohol mit der Jodoform- und Aldehydprobe nachzuweisen. Diese Proben fielen jedoch negativ aus, nachdem dieses Sulfat bei 95^o im oben beschriebenen Apparate getrocknet war; hierbei fand nur eine Dezimilligramme betragende Abnahme statt und die Zusammensetzung der Substanz hatte sich nicht geändert.

Analysen.¹⁾

A. Darstellung I. 500 g Casein Merck «nach Hammarsten purissimum». 5,5 Liter 16^o/_oige Salzsäure. Das direkt erhaltene Sulfat gab 14,5^o/_o N, aber 34,3^o/_o C und ca. 0,5^o/_o Asche.

I. Die Lösung von 22 g «büchsentrocknem» Sulfate in 50 ccm 10^o/_oiger H₂SO₄ wurde in 4,5 l Alkohol verrührt. Nach der Fällung wurde noch 1 Stunde weiter gerührt.

1. 0,1915 g Substanz gaben 0,2192 g CO₂, 0,0995 g H₂O und 0,0010 g Rückstand. Aschefrei: C = 31,38^o/_o, H = 5,84^o/_o.

2. 0,1912 g Substanz gaben 24,2 ccm tr. N, 22^o, 758 mm; N = 14,60^o/_o.

II. Präparat I aus Wasser ungefällt; das so erhaltene Sulfat aus 5^o/_oiger Schwefelsäure ungefällt, also 2 mal ungefalltes Sulfat. Asche: Spuren.

3. 0,1806 g Substanz gaben 0,2094 g CO₂ und 0,0928 g H₂O:

$$C = 31,62\text{ }^{\circ}/\text{o}, H = 6,08\text{ }^{\circ}/\text{o}.$$

4. 0,1891 g Substanz gaben 23,9 ccm tr. N, 18^o, 757 mm; N = 14,79^o/_o.

5. 0,1873 g Substanz gaben 0,1581 g BaSO₄; S = 11,59^o/_o.

¹⁾ Von den im folgenden mitgeteilten Analysen sind die bereits in der vorläufigen Mitteilung (Ber. d. Königl. Sächs. Ges. d. Wiss., 1904, S. 117) angeführten von Herrn E. Singewald ausgeführt worden.

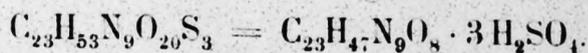
Der jetzt erhaltene Niederschlag saugte sich wie stets das kalt gefällte Phosphorwolframat der Kyrine sehr gut ab. Nach sorgfältigem Auswaschen mit 5%iger Schwefelsäure wurde aus dem PWS-Niederschlage der Basensirup hergestellt, aus ihm das Sulfat. Dieses wurde nochmals aus 5%iger Schwefelsäure umgefällt.

19. 0,1893 g Substanz gaben 24,2 ccm tr. N, 757 mm, 22°; N = 14,73%.

20. 0,2186 » » 0,2561 g CO₂ und 0,1243 g H₂O;

C = 31,95% , H = 6,36%.

Wie die Tabelle auf folgender Seite zeigt, läßt sich für das Caseinokyrinsulfat als eine der möglichen Formeln ableiten



Daß die für S gefundenen Werte etwas zu hoch sind, befremdet nicht. Denn obgleich die aus schwefelsaurer Lösung gefällten Sulfate mit Alkohol bis zum Ausbleiben der SO₄-Reaktion gewaschen wurden, so können doch Spuren von Schwefelsäure zurückgehalten werden.

Diese Analysen zeigen, daß das gewonnene Sulfat einheitlich ist. Bei zwei Darstellungen aus verschiedenem Materiale wurde dasselbe Sulfat erhalten. Bei wiederholtem Umfällen unter verschiedenen Bedingungen besaß das gewonnene Sulfat die gleiche Zusammensetzung. Bei jeder Umfällung blieben 30—50% des Sulfates in den Mutterlaugen, es kommt also jeder Umfällung einer fraktionierten Fällung gleich.

Aus dem Versuche IV geht ferner hervor, daß das Caseinokyrin, wie zu erwarten war, durch andauernde Einwirkung von 10%iger Schwefelsäure bei Körpertemperatur nicht merklich zersetzt wird.

Spaltungen des Caseinokyrins.

A. Qualitative Ergebnisse.

Zur qualitativen Untersuchung wurden sowohl die bei den unten zu beschreibenden quantitativen Bestimmungen gebliebenen Reste der Lösungen der Zersetzungsprodukte, als die aus 10 g Caseinokyrinsulfat, 2mal umgefällt (Analysen siehe S. 44 Nr. III), erhaltenen Spaltungsprodukte benutzt. Zur Isolierung wurde wie früher verfahren.

Prozent	I Präparat A		Präparat I			Präparat II				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C	31.38	—	31.62	—	—	32.27	31.92	—	—	—
H	5.84	—	6.08	—	—	5.68	6.21	—	—	—
N	—	14.60	—	14.79	—	—	—	15.05	15.07	—
S	—	—	—	—	11.59	—	—	—	—	11.27

I. Basen.

In keiner der Zersetzungslösungen war ein Niederschlag durch ammoniakalisches Silbernitrat oder Mercurisulfat in 5%iger schwefelsaurer Lösung zu erhalten. Histidin entsteht also nicht bei der Spaltung von Caseinokyrin.

a) Arginin als saures Argininsilbernitrat isoliert:

Fp. korr. 184°.

I. 0.2021 g Substanz gaben 0.0539 g Ag.

II. 0.2008 g Substanz gaben 0.1300 g CO₂, 0.0688 g H₂O u. 0.0534 g Ag.

III. 0.2021 g Substanz gaben 35.2 ccm tr. N, 18°, 755 mm.

Gefunden:	Berechnet für C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ · NO ₃ H · AgNO ₃ :
C 17.66%	17.68%
H 3.83%	3.71%
N 20.30%	20.68%
Ag 26.67%; 26.60%	26.55%

Das aus Caseinokyrin durch Spaltung mit Schwefelsäure entstehende Arginin dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts (S. 53).

b) Lysin. Die Lösung des Chlorhydrates drehte die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts und lieferte glatt das charakteristische Platindoppelsalz.

Präparat III					Präparat IV			Präparat V		Be- rechnet
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
31.72	31.69	—	—	—	—	32.18	—	—	31.95	31.65
6.17	6.45	—	—	—	—	5.70	—	—	6.36	6.12
—	—	14.69	14.54	—	14.68	—	—	14.73	—	14.49
—	—	—	—	11.81	—	—	11.60	—	—	11.03

I. 0.2695 g Substanz gaben 0.0888 g Pt.

II. 0.3217 g Substanz erforderten 10.4 ccm n₁₀ S.

Gefunden:	Berechnet für (C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂) ₂ PtCl ₆ H ₂ + C ₂ H ₅ OH:
Pt 32.21%	32.37%
N 4.58%	4.67%

In einem zweiten Falle wurde das Lysin als Pikrat isoliert. Es kristallisierte in den charakteristischen langen Prismen.

0.2081 g Substanz gaben 33.6 ccm tr. N, 21°, 758 mm.

Gefunden:	Berechnet für C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₉ :
N 18.70%	18.71%

II. Amidosäure.

Durch Silbernitrat und ammoniakalische Silbernitratlösung wurde in allen Fällen ein Niederschlag erhalten, der sich als glutaminsaures Silber erwies. Die Analyse des mit Salpetersäure gelöst und durch Ammoniak wieder ausgeschiedenen Salzes gab folgende Werte:

I. 0.2121 g Substanz gaben (bei 70° getrocknet) 0.1258 g Ag.

II. 0.1769 g Substanz gaben 0.1058 g CO₂ und 0.0356 g H₂O.

Gefunden:	Berechnet für C ₅ H ₇ NO ₄ Ag ₂ :
C 16.31%	16.63%
H 2.25%	1.95%
Ag 59.32%	59.81%

Das aus dem Silbersalz dargestellte Chlorhydrat kristallisierte in den Formen des Glutaminsäurechlorhydrates und war in starker Salzsäure sehr schwer löslich, leicht löslich in Wasser.

0.0839 g Substanz gaben 0.0670 g ClAg.

Gefunden:	Berechnet für $C_5H_9NO_4 \cdot HCl$
Cl 19.74%	19.31%

Für $[\alpha]^{20}_D$ wurde bei einem anderen durch Zersetzung mit Schwefelsäure nur 12.5° gefunden ($K = 3,215$). Zum Teil lag also die Glutaminsäure in der racemischen Form vor.

Das Filtrat von der Silberfällung wurde durch Schwefelammonium entsilbert und zur vollständigen Trockne eingedampft. Das gepulverte Salz wurde mit absolutem Alkohol gekocht, in dem es sich bis auf einen geringen Rückstand löste. Dieser erwies sich als rein anorganisch. Die alkoholische Lösung des Ammonitrates schied beim Erkalten nichts aus. Durch alkoholisches Silbernitrat und einige Tropfen alkoholischen Ammoniakes wurde nur eine sehr geringe gelbliche Fällung erhalten. Soviel ist gewiß, daß bei der Spaltung des Caseinokyrins nicht, wie bei der Spaltung des Glutokyrins, Glykokoll oder eine andere in absolutem Alkohol, bezw. in einer Lösung von Ammonitrat in absolutem Alkohol lösliche Amidosäure entsteht.

Als Spaltungsprodukte ließen sich also lediglich nachweisen: Arginin, Lysin und Glutaminsäure.

Daß kein Ammoniak bei der Spaltung mit Schwefelsäure gebildet wird, zeigen die quantitativen Ergebnisse.

B. Quantitative Ergebnisse.

Die quantitativen Spaltungen wurden nicht nur ausgeführt, um die Verteilung des Stickstoffs im Caseinokyrinmolekül zu ermitteln, sondern auch um die Einheitlichkeit der Präparate zu kontrollieren. Deshalb wurden nicht nur die Sulfate verschiedener Darstellungen, sondern auch der verschiedenen Umfällungen ein und derselben Darstellung zersetzt. Die Ausführung der Methode, wie sie im folgenden gegeben wird, erscheint mir zur Charakteristik und Analyse von Proteinsubstanzen und ihrer größeren Spaltungsstücke durchaus geeignet zu sein.

Methodisches.

Die Zersetzung des Kyrins geschah nach Kossel und Kutscher mit einer Mischung von 1 Gewichtsteil Schwefelsäure und 2 Teilen Wasser, während 12 Stunden. Zur Bestimmung des Basenstickstoffes genügt es, gegen 2 g büchsen-trocknes Sulfat mit der Mischung von 50 ccm Wasser und 25 g Schwefelsäure zu zersetzen. Die Reaktionslösung wird auf 100 ccm aufgefüllt. In je 20 ccm wird der Gesamt-N der Lösung ermittelt, in je 30 ccm der durch Phosphorwolframsäure fällbare und der nicht fällbare N. Wird wesentlich mehr Sulfat als 2 g zersetzt, so wird die Zersetzungslösung auf 250 ccm aufgefüllt.

Es ist unbedingt erforderlich, die als purissimum käuflich bezogene Phosphorwolframsäure nach Drechsel mit Äther zu reinigen. Auch die Gegenwart von Salpetersäure, mit welcher die käufliche Phosphorwolframsäure oft verunreinigt ist, ist schädlich. Denn die Bestimmung von N nach Kjeldahl bei Gegenwart von Nitraten ist nach meinen Erfahrungen unzuverlässig. Je schneller die Verbrennung geschieht, umsomehr bildet sich aus Salpetersäure Ammoniak; bei ganz langsamem Eindunsten mit Schwefelsäure gelingt es wohl, die Salpetersäure vor wesentlicher Verkohlung der organischen Substanz zu verjagen und so die Bildung von Ammoniak aus Salpetersäure praktisch zu vermeiden. Bei raschem Verbrennen von Salpetersäure mit organischer Substanz wurden jedoch in diesbezüglichen Versuchen beträchtliche Mengen Ammoniak, mehreren Kubikzentimetern $n/10$ S entsprechend, erhalten. Deshalb wurde auch davon Abstand genommen, bei der Bestimmung des Arginin- und Lysin-N den letzteren aus dem Filtrate der Silberfällung direkt zu bestimmen.

Die Verbrennung mit Schwefelsäure bei Gegenwart von Phosphorwolframsäure ist, wie jedem, welcher solche Analysen ausgeführt hat, bekannt ist, mit großen Schwierigkeiten verbunden: namentlich ist es das schwer vermeidliche Stoßen, welches oft den Verlust der Bestimmung verursacht. Es trocknet aber auch leicht ein Teil an der Wandlung des Aufschlußkolbens ein und gibt so zu N-Verlusten Anlaß. Ganz glatt

verläuft jedoch der Aufschluß mit dem vor kurzem¹⁾ beschriebenen Apparate: der Aufschluß bei Gegenwart von Phosphorwolframsäure fordert nicht mehr Zeit als ein gewöhnlicher. Selbst bei Gegenwart von 25 g Phosphorwolframsäure im Kölbchen findet kein Stoßen und Anlegen statt. Sobald die Mischung grünlich wird, oxydiert man mit Permanganat bei ausgelöschter Flamme, aber während die Kolben in Bewegung sind. Nach dem Gelbbrennen des Inhalts oxydiert man in gleicher Weise noch zweimal in Zwischenräumen von etwa 10 Minuten. Um das Anlegen während des Erkaltes zu vermeiden, läßt man den Apparat bis zum Erkalten der Kolben in Bewegung.

Bei Berechnung der Korrektur für die Löslichkeit des PWS-Niederschlags bei Proteinsubstanzen im allgemeinen ist folgendes zu beachten: Bei den bisher bekannten Untersuchungen ist im allgemeinen nur die Löslichkeit des Argininphosphorwolframate berücksichtigt, da das Lysinphosphorwolframat nur wenig löslich ist. Außer acht ist aber die Pyrrolidinkarbonsäure gelassen, von deren Phosphorwolframat die Löslichkeit unbekannt ist. Aber auch die Berücksichtigung der Löslichkeit der Phosphorwolframate des Histidins, des Arginins, Lysins und der Pyrrolidinkarbonsäure würde nicht genügen, weil die Gemenge der Phosphorwolframate andere Löslichkeit besitzen müssen, als die Summe der Löslichkeit der einzelnen Bestandteile. Als einziger Weg ergibt sich das einfache Verfahren, in jedem einzelnen Falle, also bei jeder Proteinsubstanz, die Löslichkeit des gesamten PWS-Niederschlags zu bestimmen und hiernach die Korrektur zu berechnen.

Bei dem Caseinokyrin liegen die Verhältnisse einfacher, da nur Arginin und Lysin als Spaltungsprodukte entstehen; wie ich weiter unten zeigen werde, deckt sich die Löslichkeit des genannten Niederschlags in diesem Falle ungefähr mit der des Argininphosphorwolframate.

Zweitens ist die Temperatur sehr zu beachten. Die unten mitgeteilten Zahlen zeigen den wesentlichen Einfluß der Temperaturen auf die Löslichkeit der Phosphorwolframate.

¹⁾ M. Siegfried, Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 1.

Drittens ist die in der Waschflüssigkeit gelöste Menge der Phosphorwolframate viel geringer, als einer Sättigung entspricht (s. unten). Hier wird man nur annähernde Werte angeben können, da die Menge des gelösten Phosphorwolframmates von der Beschaffenheit und Quantität des PWS-Niederschlages abhängt. Jedenfalls ist es tunlich, Waschflüssigkeit und Filtrat getrennt zu messen. Unter Berücksichtigung dieser Verhältnisse gelangt man bei gleichmäßigem Arbeiten zu gut übereinstimmenden Resultaten.

Die Ausführung der Fällung gestaltet sich bei den Kyrinen folgendermaßen: Der abgemessene Teil der Zersetzungslösung wird mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, dazu eine zu messende Menge 10%iger Lösung von Phosphorwolframsäure gesetzt, bis kein Niederschlag mehr erfolgt. Man prüft dies, indem man, nachdem der Niederschlag sich etwas abgesetzt hat, mit einer Kapillarpipette eine kleine Menge der klaren Flüssigkeit herausnimmt und im Reagensglas mit einem Tropfen PWS-Lösung versetzt. Die Proben werden mit PWS-Lösung, wenn die Fällung noch nicht beendet war, oder sonst mit etwas Wasser zurückgespült. Nach beendigter Fällung wird mit Wasser nachgefüllt, bis der Gesamtgehalt der Flüssigkeit an Schwefelsäure etwa 5% beträgt: der Kolben wird auf dem Wasserbade erwärmt, bis der größte Teil des Niederschlages sich gelöst hat. Andern Tags saugt man bei 20° Temperatur des Kolbeninhaltes ab und wäscht mit einem gemessenen Volumen 5%iger PWS- und 5%iger H_2SO_4 -Lösung (50 ccm) aus. Das Filtrat wird vor der Verbrennung mit Schwefelsäure (das Eindampfen geschieht direkt im Aufschlußkölbchen) gemessen: das gefundene Volumen ergibt nach Abzug der Menge der Waschflüssigkeit die Menge des Filtrates. Der PWS-Niederschlag läßt sich ohne Verlust mit der Filterscheibe (das verwendete Papier ist vorher auf N-Freiheit zu prüfen) in einen Aufschlußkolben bringen; etwa am Trichter anhaftende Partikeln des Niederschlages spült man mit Wasser über.

Die Berechnung der Korrekturen und Prozentzahlen für N geschieht direkt nach den Kubikzentimetern $n/10$ S ohne Umrechnung in Stickstoff.

Bestimmung der Korrektionswerte.

Für die Löslichkeit des umkristallisierten Argininphosphorwolframate bei 20° wurden den von Gulewitsch¹⁾ ermittelten Werten entsprechende Zahlen erhalten: 15—16 ccm n_{10} pro Liter 5%iger PWS-, 5%iger H_2SO_4 -Lösung.

Wurde die bei 20° gesättigte und filtrierte Lösung mehrere Tage unter öfterem Umschütteln bei 10° im Kühlschranke belassen, so schied sich ein beträchtlicher Teil in schwer filtrierbarer Form aus. In je 500 ccm solchen bei 10° hergestellten Filtrates wurde N gefunden, entsprechend 1. 3,0 ccm, 2. 3,2 ccm. Bei 10° werden also pro Liter nur 6,1 ccm gelöst. Die Differenz zwischen der Löslichkeit bei 20° und 10° beträgt also 10 ccm.

Die Löslichkeit des aus den Spaltungsprodukten des Kyrins durch Schwefelsäure erhaltenen Phosphorwolframsäureniederschlages wurde ermittelt, indem teils von der untersättigten, teils von der übersättigten zur gesättigten Lösung gegangen wurde, indem erstens die kristallisierten Phosphorwolframate mit der PWS- H_2SO_4 -Lösung in der Schüttelmaschine bis 1 Stunde geschüttelt, zweitens auf dem Wasserbade in jener Lösung gelöst und auf 20—21° abgekühlt, andern Tags nach kräftigem Schütteln abgesaugt wurden. Durch Bestimmung des N für je 500 ccm wurden so gefunden:

1. beim Ausgange von der untersättigten Lösung:
 - a) 8,35 ccm, b) 8,8 ccm;
2. beim Ausgange von der übersättigten Lösung:
 - a) 8,3 ccm, b) 8,5 ccm.

Hieraus ergibt sich für die Löslichkeit des aus Kyrin nach Zersetzung mit Schwefelsäure erhaltenen PWS-Niederschlages: 16,98 ccm, oder rund:

17 ccm n_{10} für 1 Liter Filtrat.

Für die Löslichkeit dieses Niederschlages bei 10° wurde ein ähnlicher Wert wie für die des Argininphosphorwolframate bei dieser Temperatur erhalten: 500 ccm erforderten 3,55 ccm n_{10} = pro Liter 7,1 ccm.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 196.

Um eine Vorstellung der Mengen N, welche beim Auswaschen auf der Saugplatte durch 5% PWS — 5% H₂SO₄ gelöst werden, zu erhalten, wurde

1. das mehrfach ausgeschüttelte Phosphorwolframat mit 5%iger H₂SO₄-, 5%iger PWS-Lösung verrührt und abgesaugt, das Filtrat weggeworfen und der Niederschlag mit 500 cem 5%iger PWS-, 5%iger H₂SO₄-Lösung von 22° durchgesaugt. Die Waschflüssigkeit neutralisierte nach Kjeldahl 4,09 cem ⁿ/₁₀ S;

2. ein anderer Teil des Phosphorwolframates, auch diesmal an Quantität ungefähr der bei den Bestimmungen in Betracht kommenden entsprechend, wurde in 5% H₂SO₄ — 5% PWS gelöst, nach Erkalten abgesaugt und nach Weggießen des Filtrates mit 500 cem Waschflüssigkeit durchgesaugt. Der darin enthaltene N entsprach 4,8 cem.

Aus den oben angeführten Gründen müssen die Werte für die Waschflüssigkeit schwanken. Man wird sich aber dem richtigen Werte sehr nähern, wenn man ansetzt als

Korrektion für die Waschflüssigkeit 8,5 cem pro Liter:

Quantitative Versuche.

Von den hier anzuführenden Versuchen sind die ersten drei ausgeführt worden, ehe mir der große Einfluß der Temperatur auf die Löslichkeit des Phosphorwolframates bekannt war. Da sie im November und Dezember angestellt wurden und die Fällungen über Nacht im Kühlzuge aufbewahrt wurden, sind die erhaltenen Werte für Basen-N etwas zu hoch, für Amidosäure-N etwas zu niedrig berechnet. Da die Differenz jedoch nur einige Prozente betragen kann, und da sie zeigen, daß die verschiedenen Präparate unter gleichen Bedingungen nahe übereinstimmende Werte geben, teile ich sie doch mit, weil trotz der ungenauen Korrektur aus ihnen, wie aus den späteren, die Einheitlichkeit der Sulfate hervorgeht.

Von mehreren Spaltungslösungen wurden entsprechende Mengen mit Magnesia destilliert, das Destillat zur Entfernung der Kohlensäure¹⁾ gekocht und nach dem Abkühlen zurück-

¹⁾ Fr. Müller, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 286.

titriert. Es wurden nur 0,1—0,2 ccm $n/10$ L. verbraucht. Bei der Spaltung des Kyrins entstehen also höchstens Spuren von Ammoniak.

Versuch I. 7 g büchsentrockenes, zweimal umgefälltes Sulfat erster Darstellung mit 68 ccm Wasser und 34 g Schwefelsäure zersetzt.

Gefunden für Basen-N: a) 89,4%, b) 88,4%; Mittel: 88,9%
 » » Amidosäure-N: a) 10,6%, b) 10,5%; » 10,55%

Versuch II. 6 g Sulfat erster Darstellung 4mal umgefällt, mit 50 g Wasser und 25 g Schwefelsäure zersetzt.

Gefunden für Basen-N: a) 88,4%, b) 89,8%; Mittel: 89,1%
 » » Amidosäure-N: a) 12,3%, b) 11,9%; » 12,1%

Versuch III. 2 g des Sulfates zweiter Darstellung mit 50 g Wasser und 25 g Schwefelsäure zersetzt.

Gefunden für Basen-N: a) 86,6%, b) 85,6%; Mittel: 86,1%
 » » Amidosäure-N: a) 15,9%, b) 15,5%; » 15,7%

Versuch IV. 2,8 g Sulfat 2 mal umgefällt, dasselbe Präparat, welches zu Versuch I verwendet wurde, 12 Stunden mit 80 g 25%iger Salzsäure gekocht.

Die Basenfällung wurde zur Bestimmung des Arginins (S. 54) verarbeitet. Als Amidosäure-N wurde gefunden: 12,2%, wobei zu berücksichtigen ist, daß möglicherweise die Gegenwart der Salzsäure die Löslichkeit der Phosphorwolframate beeinflußt.

Versuch V. ca. 4 g Sulfat der dritten Darstellung mit 50 g Wasser und 25 g Schwefelsäure 15 Stunden gekocht, auf 250 ccm aufgefüllt.

Basen-N: a) 84,3%, b) 83,3%; Mittel: 83,8%
 Amidosäure-N: a) 15,8%, b) 16,6%; » 16,2%

Versuch VI. Das Sulfat nochmals umgefällt. Zersetzt ca. 1 g.

Basen-N: 83,0%
 Amidosäure-N: 17,5%

Versuch VII. Das im vorigen Versuche verwendete Sulfat noch 2 mal umgefällt.; ca. 1 g zersetzt.

Basen-N: 83,9%
 Amidosäure-N: 17,5%

Versuch VIII. Das zu diesem Versuche verwendete Sulfat war auf folgende Weise umgefällt: Die wässerige Lösung umgefällten Caseinokyrinsulfates wurde mit PWS ausgefällt, aus diesem Niederschlage wieder Base und Sulfat dargestellt, dieses nochmals umgefällt. 2 g zersetzt.

Basen-N: 85,3%

Amidosäure-N: 13,8%

Diese Versuche zeigen, daß nach verschiedenen Umfällungen das Caseinokyrinsulfat gleichen Prozentgehalt an Basen- und Amidosäuren-N bei der Zersetzung liefert. Unter Berücksichtigung der oben begründeten Erwägung, daß der in den drei ersten der ausgeführten Versuche gefundene Basen-N etwas zu hoch ist, ergibt sich, daß aus Caseinokyrin ca. 84—85% als Basen-N und 15—16% als Amidosäure-N durch Kochen mit Schwefelsäure erhalten werden.

Arginin-N und Lysin-N.

I. Von der Zersetzungslösung Versuch V wurden 150 ccm nach Kossel und Kutscher mit Silbersulfat und Barythydrat behandelt. Die Silberbarytfällung wurde mit Schwefelsäure und Schwefelwasserstoff zersetzt, die erhaltene schwefelsaure Lösung des Arginins auf 500 ccm aufgefüllt. 350 ccm wurden eingeeengt und auf 20 ccm aufgefüllt. α wurde im 20 cm-Rohr $0,70^\circ$ gefunden. Hieraus ergibt sich $K = 1,56\%$ unter Zugrundelegung des von Gulewitsch¹⁾ für Arginin bei Gegenwart überschüssiger Schwefelsäure ermittelten Wertes $[\alpha]_D = +22,35^\circ$. Danach waren in den 350 ccm vorhanden: 0,312 g Arginin, also in der ganzen Argininlösung: 0,4446 g.

Die Bestimmung des N in 150 ccm hatte ergeben: 30,2 ccm n_{10} S = für die ganze Lösung berechnet: 100,7 ccm = 0,141 g N = 0,4380 g Arginin, also ungefähr der gleiche Wert, der aus der Bestimmung der Polarisation ermittelt wurde.

Da die verwendeten 150 ccm Zersetzungslösung 225 ccm n_{10} S entsprechenden N enthielten, so berechnen sich nach der N-Bestimmung für Arginin aus Caseinokyrin durch Spaltung mit Schwefelsäure entstanden: 44,8%. Da dieses Kyrin 83,8%

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 192.

Basen-N lieferte, besteht dieser Basen-N zu 53,4%, also rund der Hälfte, aus Arginin-N.

Das Filtrat der Silberbarytfällung wurde zum Zwecke der Lysinbestimmung nach Entfernung des Silbers und Baryums durch PWS ausgefällt, dieser Niederschlag mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschen und wie gewöhnlich zersetzt. Die völlig eingedampfte Base wurde in Wasser gelöst und mit der aus der Differenz von Basen-N und Arginin-N berechneten Menge Pikrinsäure auf dem Wasserbade versetzt und eingeeengt. Nach dem Erkalten war das Pikrat in langen Spießen auskristallisiert, das, wie die N-Bestimmung ergab (s. S. 45), unmitttelbar rein war. Zu der nach Trocknen über Schwefelsäure gefundenen Menge von 1,1983 g ist als Korrektion der von Lawrow¹⁾ ermittelten Löslichkeit des Pikrates im Filtrate 0,248 zu addieren, sodaß die Menge des Pikrates in Summa 1,4463 g beträgt.

Hieraus berechnet sich für Lysin-N 0,105 g = 34,4% vom Gesamt-N und 40,9% vom Basen-N. Die Differenz des Basen-N und Arginin-N würde 46,6% erfordern. Wenn man bedenkt, daß das Lysinphosphorwolframat nicht ganz unlöslich ist und alle Teile der Bestimmung den Wert nach unten beeinflussen, so ist der gefundene Wert nur als Mindestwert zu betrachten und würde der Annahme nicht widersprechen, daß in Wahrheit bei der Spaltung des Kyrins mit Schwefelsäure rund die Hälfte des Basen-N dem Lysin zukommt, daß also auf 1 Mol. Arginin 2 Mol. Lysin entstehen.

II. Aus dem PWS-Niederschlage des Versuches IV (S. 52), bei dem das Sulfat mit Salzsäure zersetzt war, wurden die Basen hergestellt, ihre Lösung auf 250 ccm aufgefüllt. Gesamt-N entsprach in 50 ccm 36,5 ccm $\frac{n}{10}$ S. In je 50 ccm wurde der Arginin-niederschlag mit Silbernitrat und Barythydrat erzeugt und nach Auswaschen mit Barytwasser kjeldahlisiert. Es wurden neutralisiert 1. 19,9 ccm, 2. 20,4 ccm, 3. 21,0 ccm $\frac{n}{10}$ S, im Mittel 20,43 ccm. Hieraus berechnet sich ein Arginin-N vom Gesamtbasen-N: 55,7%. Dabei ist zu berücksichtigen, daß auf diese Weise erstens etwas zu wenig Arginin gefunden

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 398.

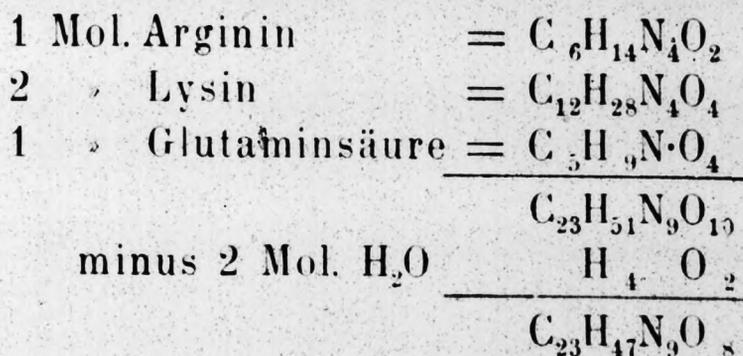
wird, weil durch die größere Löslichkeit des Argininphosphorwolframate gegenüber der des Lysinphosphorwolframate die Basenlösung verhältnismäßig etwas argininärmer wird; zweitens wird etwas zuviel Arginin gefunden, da der Silberbarytniederschlag nicht vollständig auswaschbar ist.

Diskussion der Formel des Caseinokyrins.

Aus den Analysenwerten (S. 44) läßt sich unter anderen folgende Formel für das Sulfat ableiten: $C_{23}H_{53}NO_{20}S_3$
 $= C_{23}H_{47}N_9O_8 \cdot 3 H_2SO_4$.

Für die Base selbst also die Formel: $C_{23}H_{47}N_9O_8$.

Bei der hydrolytischen Spaltung wurden erhalten: Arginin, Lysin, Glutaminsäure und kein Histidin und Ammoniak. Versucht man aus diesen Spaltungsprodukten das Kyrin aufzubauen, gelangt man auf folgende Weise zu der Formel desselben:



Denkt man sich das Molekül des Kyrins aus diesen 4 Molekülen der Spaltungsprodukte nach Art der synthetischen Peptide E. Fischers aufgebaut, so müßte dies unter Austritt von wenigstens 3 Mol. Wasser geschehen. Andersartige als die besagten Verkettungen können natürlich auch so geschehen, daß aus 4 Mol. 2 Mol. Wasser austreten. Doch dieses minus und plus 1 Mol. Wasser ist belanglos. Erstens beeinflußt es die Analysenwerte nicht sehr stark, zweitens kann das Sulfat 1 Mol. Molekularwasser enthalten, das bei 95° nicht entweicht.

Ein solcher Aufbau des Moleküls würde unter der Voraussetzung, daß bei der Spaltung mit Schwefelsäure glatt die Komponenten entstehen, voraussetzen, daß der Basen-N $\frac{8}{9}$ des Gesamt-N beträgt = 88,8%. Diesem Werte äußerst nahe-stehende haben die ersten Spaltungsversuche ergeben. Ich habe aber oben ausgeführt, daß diese infolge ungenauer

Korrektion als etwas zu hoch angesehen werden müssen. Aber auch die sonst gefundenen Werte für Basen-N würden dieser Forderung entsprechen. Die Differenz von 88,8% berechnet und 84,5% gefunden beträgt vom Ganzen nur 4,8%. Diese Genauigkeit ist bei Bestimmung organischer Substanzen eine große. Sie entspricht etwa der Genauigkeit bei Molekulargewichtsbestimmungen mit Hilfe der Erniedrigung des Gefrierpunktes bei nicht dissocierten Substanzen. Enthält eine Substanz 10,0% C und findet man bei der Elementaranalyse 10,2%, so wird man die Substanz für rein ansprechen, und doch beträgt die Abweichung der Bestimmung 2%. In der Literatur¹⁾ findet man Werte 3,37 und 3,71 für Basen-N bei ein und derselben Proteinsubstanz für gleich bezeichnet, und doch ist der größere um über 10% größer als der kleinere.

Auch die für Arginin bzw. Lysin gefundenen Werte würden der Annahme, daß das Kyrinmolekül aus 2 Mol. Lysin, 1 Mol. Arginin und 1 Mol. Glutaminsäure aufgebaut ist, und daß die Spaltung glatt unter Bildung der Komponenten erfolgt, nicht widersprechen.

Hingegen habe ich in mehreren Versuchen weniger als die Hälfte der berechneten Glutaminsäure erhalten. Es liegt dies nach meinen Erfahrungen nicht an der Methode, Abscheidung als Silbersalz durch Silbernitrat und ammoniakalische Silberlösung, sondern es wird wirklich viel weniger als berechnet Glutaminsäure gebildet. Nach diesen Versuchen ist es aber nicht wahrscheinlich, daß etwa Glykokoll oder ein Homologes desselben gebildet wird. Für die Tatsache, daß weit weniger, als berechnet, Glutaminsäure bei der Hydrolyse des Kyrins gebildet wird, gibt es mehrere Erklärungen, deren Berechtigung von mir geprüft werden soll, sodaß vorläufig kein Grund vorliegt, aus ihr den Schluß zu ziehen, daß das Caseinokyrin nicht in der angegebenen Weise konstituiert ist (vgl. dieses Heft, S. 35).

Die Bedeutung der Glutaminsäure für das Eiweißmolekül muß immer wieder betont werden,²⁾ wenn man sieht, daß auch

¹⁾ Zeitschrift f. analyt. Chemie, Bd. XLIII, S. 298.

²⁾ M. Siegfried, Ber. d. Königl. Sächs. Gesellsch. d. Wissensch., 1903, S. 86.

in dem Molekül des Caseinokyrins der Glutaminsäurekomplex nicht fehlt und wahrscheinlich als einziger Amidosäurekomplex vorhanden ist. Alle von mir und meinen Mitarbeitern untersuchten Peptone lieferten reichlich Glutaminsäure bei der Spaltung. Das weitere Abbauprodukt, das Glukokyrin, gab sie ebenfalls, und wenn den Caseinmolekül fast alle sauren oder, richtiger gesagt, amphoteren Komplexe gewonnen werden, so bleibt in fester Vereinigung mit Arginin und Lysin die Glutaminsäure zurück.

Schon nach Auffindung des ersten Kyrins, des Glutokyrins, habe ich darauf hingewiesen, daß die Anschauungen Kossels über den basischen Kern des Eiweißmoleküls durch die Bildung des widerstandsfähigen Kyrins, das wie ein harter Kern gleichsam aus dem Proteinmolekül durch die Salzsäure herausgeschält wird, eine wesentliche Stütze findet. Mehr noch als durch das Glutokyrin geschieht dies durch das Caseinokyrin; der hohe Basen-N entspricht dem der Protamine.