

# Zur Kenntnis der allmählichen Hydrolyse des Pferdeoxyhämoglobins.

Von  
**Hugo Kirbach.**

---

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts Leipzig.)  
(Der Redaktion zugegangen am 6. November 1906.)

---

Zur Aufklärung der Konstitution des Eiweißes sind vorwiegend Spaltungsversuche ausgeführt worden, bei denen durch tief eingreifende Reaktionen, wie durch die Einwirkung von siedender starker Salzsäure, ein Zerfall des Eiweißmoleküles in die sogenannten letzten Spaltungsprodukte, Amidosäuren usw., bewirkt wird. Hingegen liefert eine allmähliche Hydrolyse nicht sofort diese letzten Spaltungsprodukte, sondern größere Komplexe derselben, deren nähere Untersuchung einen Einblick in die Verkettung der kleinen, bei der vollständigen Hydrolyse auftretenden Gruppen zu gewähren verspricht. Die in dieser Richtung von Siegfried unternommenen Versuche, der das Glutin und das Casein der allmählichen Hydrolyse unterwarf, haben ergeben, daß sowohl im Glutin<sup>1)</sup> als auch in Casein<sup>2)</sup> die bei der vollständigen Hydrolyse als Arginin, Lysin und Glutaminsäure auftretenden Spaltungsprodukte der betreffenden Proteinkörper wenigstens zu einem wesentlichen Teile in einem Komplex von ausgesprochenem basischen Charakter vereinigt sind. Beim Glutin enthält dieser Komplex auch noch Glykokoll.

Siegfried isolierte diesen basischen Komplex beim Glutin zuerst durch die Einwirkung von 12<sup>1</sup>/<sub>2</sub> iger Salzsäure auf das mit Hilfe seiner Eisenmethode rein dargestellte Glutintrypsinpepton, dessen weitere Zersetzung er mit Hilfe des Drehungsvermögens der Zersetzungslösung kontrollierte, wobei sich nach

---

<sup>1)</sup> M. Siegfried, Zur Kenntnis der Hydrolyse des Eiweißes, Bericht der math.-phys. Klasse der Kgl. Sächs. Ges. der Wissensch. zu Leipzig.

<sup>2)</sup> M. Siegfried, Über Caseinokyrin, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 46 ff.

einer gewissen Zeit eine Abänderung der Linksdrehung nicht mehr zeigte; dann direkt aus der Gelatine, indem er sie ebenso der Einwirkung von 12 $\frac{1}{2}$  % iger Salzsäure bei 38—40° aussetzte. Auf gleiche Weise zersetzte er direkt das Casein. In allen 3 Fällen wurden die entstehenden basischen Komplexe aus der Zersetzungslösung mit Phosphorwolframsäure ausgefällt und in Sulfate übergeführt, die nach mehreren Umfällungen Konstanz ihrer Zusammensetzung zeigten; die beiden aus der Gelatine gewonnenen Körper stimmten unter sich vollständig überein. Die Konstanz der Zusammensetzung und die weitere Untersuchung der isolierten basischen Komplexe berechtigten Siegfried zu dem Schlusse, daß in ihnen einheitliche Körper von ganz besonderem Typus vorliegen. Er bezeichnete sie als die basischen Kerne des Glutins und des Caseins und gab ihnen die Namen Glutokyrin und Caseinokyrin. Ihre Phosphorwolframate krystallisieren in gut ausgebildeten Krystallen.

Da aus der Existenz solcher basischen Komplexe oder Kyrine im Leim und Casein noch nicht ohne weiteres geschlossen werden konnte, daß solche auch in anderen Proteinstoffen vorhanden sind, mußten Versuche gemacht werden, auch aus anderen Eiweißkörpern und zwar verschiedener Gruppen solche basische Komplexe oder Kyrine zu isolieren.

Ich unterzog mich daher auf Veranlassung des Herrn Professor Dr. Siegfried der Aufgabe, festzustellen, ob auch die im Hämoglobin vorhandenen basischen Spaltungsprodukte in einem derartigen einheitlichen Komplex, einem Kyrin, zusammengeschlossen auftreten.

### I. Darstellung des Roh-Globinokyrinsulfates.

Als Ausgangsmaterial wurde seiner leichten Krystallisationsfähigkeit wegen Pferdeoxyhämoglobin genommen. Dasselbe wurde nach dem Verfahren von Hoppe-Seyler dargestellt. Die Krystalle wurden noch 2 mal umkrystallisiert, indem sie in Wasser von 35° gelöst und dann wie vorher aus der gekühlten Lösung durch kalten Alkohol wiederum ausgeschieden wurden. Das Nachwaschen geschah mit einer kalten Mischung von 1 Volumen Alkohol und 3 Volumen Wasser.

Die allmähliche Hydrolyse geschah mit der ca. 10fachen Menge 12<sup>1</sup>/<sub>2</sub>%iger Salzsäure während 10—12 Tagen bei 37—40°. Bei Darstellung A und B wurde der das Gemisch von Oxyhämoglobin und HCl enthaltende Kolben in Wasser von 37—40° gesetzt und des öfteren umgeschüttelt, bei Darstellung C dagegen der von M. Siegfried konstruierte Verdauungsapparat benutzt.

Der Apparat besteht aus einem großen Kessel, in welchem Wasser auf 37—40° erwärmt wird. Mit Hilfe eines Ostwaldschen Thermostaten wird die Temperatur konstant erhalten. Im Kessel stehen 4 große, innen glasierte Töpfe, die mit Glasdeckeln zugedeckt werden. Durch diese mit je 2 Tuben versehenen Glasdeckel reichen ein Thermometer und ein starker gläserner Rührer in das Innere der Töpfe und tauchen in die eventuell darin vorhandene Flüssigkeit. Die Rührer werden durch einen Elektromotor langsam gedreht, können höher und tiefer geschraubt und vermittelst einer besonderen Einrichtung ausgehängt und damit außer Funktion gesetzt werden, sodaß sich immer nur der jeweilige in Gebrauch befindliche Rührer bewegt.

Der Apparat wurde Tag und Nacht in Betrieb gelassen. Durch das beständige Rühren wurde selbstverständlich eine intensivere Mischung des zu zersetzenden Hämoglobins mit der Salzsäure ermöglicht, als beim zeitweiligen Schütteln und dadurch die Zersetzung beschleunigt.

Nach ca. 12tägiger Zersetzung wurden die Zersetzungs-lösungen von ungelöst gebliebenen Rückständen filtriert, diese gut ausgewaschen und das dunkel aussehende mit den Wasch-wässern vereinigte und dem gleichen Volumen Wasser verdünnte Filtrat unter kräftigem Rühren zuerst mit 10%iger, dann mit 50%iger Phosphorwolframsäurelösung versetzt; es fiel dadurch das rohe Kyrinphosphorwolframat als toniger Niederschlag aus. Die Phosphorwolframsäure war vor ihrer Verwendung nach Drechsel<sup>1)</sup> ausgeäthert, da auch die als rein bezogene Säure selten frei von Verunreinigungen ist.

Da sich das Roh-Kyrinphosphorwolframat im Überschusse der Säure wieder löst, wurde ein solcher vermieden. Das Phosphorwolframat setzte sich schnell und gut ab, so daß die Mutter-lauge leicht daraufhin geprüft werden konnte, ob alles ausgefällt war. Der Niederschlag wurde nun nach Abhebern der darüber-

---

<sup>1)</sup> Drechsel, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XX, S. 1452.

stehenden Flüssigkeit, die die vom Kyrin abgespaltenen und durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Bestandteile des Zeretzungsproduktes enthielt, und die nun hell geworden war, auf der Nutsche abgesaugt und gründlich bis zur Cl-Freiheit ausgewaschen. Er saugte sich gut ab. Das Auswaschen geschah mit 5%iger Schwefelsäure, da in derselben das Kyrinphosphorwolframat, wenn auch immerhin etwas, so doch bei weitem nicht so löslich war als in 5%iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 5%iger Phosphorwolframsäure oder Wasser. Es mußte ziemlich lange ausgewaschen werden, wodurch natürlich Verluste entstanden, aber die vollständige Beseitigung des Chlors war unerläßlich, da es sonst später auf keine Weise zu entfernen gewesen wäre.

Der Cl-freie Niederschlag wurde nun mit Wasser und Ammoniak unter Erwärmen bis zu  $40^\circ$  gelöst und mit Barythydrat unter möglichster Vermeidung eines größeren Überschusses zersetzt. Vom Niederschlage wurde abfiltriert, mit Wasser gut ausgewaschen, das Filtrat von der geringen Menge überschüssigen Baryts durch Zusatz von Ammoncarbonat befreit und vom entstandenen Niederschlage wiederum filtriert. Die Lösung, die jetzt eine gelbe Färbung hatte, wurde auf dem Wasserbade bis zum dicken Sirup eingedampft. Dieser Sirup reagierte stark alkalisch — er enthielt das Rohkyrin.

Er wurde nun durch Zugabe von zuerst konzentrierter und dann verdünnter Schwefelsäure bis zur schwachen Bläuung von Kongopapier gelöst und so das Kyrinsulfat gebildet. Um dieses in festem Zustande zu erhalten, wurde zu der abfiltrierten schwefelsauren Lösung das gleiche Volumen absoluten Alkohols gegeben und nun gefällt, indem ich diese Lösung aus einem Tropftrichter in dünnem Strahle in absoluten Alkohol, der durch einen mechanisch bewegten Rührer kräftig umgerührt wurde, einfließen ließ. Auf ca. 20 ccm der schwefelsauren Lösung nahm ich 1 kg absoluten Alkohol. Das Sulfat fiel dabei schon beim ersten Male in schönen weißen Flocken aus, so daß sich eine Entfärbung des Rohsirups durch wässrige Bleiacetatlösung wie beim Caseinokyrin als nicht notwendig erwies.<sup>1)</sup> Das Sulfat

---

<sup>1)</sup> M. Siegfried, Über Caseinokyrin, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 47.

setzte sich, wenn die zugeflossene Menge der Lösung der Quantität des Alkohols entsprach, auch sehr gut ab.

Nach dem Abhebern der Mutterlauge wurde nun abgesaugt, mit absolutem Alkohol bis zum Versagen der  $\text{SO}_4$ -Reaktion, dann mit Äther I ausgewaschen und das Sulfat schließlich im evakuierten Exsikkator unter häufigem Erneuern der Schwefelsäure bis zur vollständigen Entfernung des Äthers getrocknet.

#### Ausbeute:

Darstellung A. Aus 6–7 l Pferdeblut wurde zweimal umkrystallisiertes Oxyhämoglobin dargestellt; dasselbe wurde ohne vorheriges Trocknen 11 Tage lang mit 6 l 12 $\frac{1}{2}$  iger Salzsäure im Kolben unter häufigem Schütteln zersetzt. Zur Ausfällung des Phosphorwolfrates aus der Zersetzungslösung wurde gebraucht  $\frac{1}{2}$  kg Phosphorwolframsäure, zur Ausfällung des festen Sulfates aus der schwefelsauren Lösung 5 l Alkohol. Ausbeute 30 g Rohkyrinsulfat.

Darstellung B. Aus 35 l Pferdeblut wurde zweimal umkrystallisiertes Oxyhämoglobin dargestellt und 12 Tage lang mit 30 l 12 $\frac{1}{2}$  iger HCl im Kolben unter häufigem Schütteln zersetzt. Verbrauch an Phosphorwolframsäure ca. 3 kg, an Alkohol 23 l. Ausbeute 200 g Rohkyrinsulfat.

Darstellung C. Aus 20 l Pferdeblut wurde zweimal umkrystallisiertes Oxyhämoglobin dargestellt und 10 Tage lang mit 18 l 12 $\frac{1}{2}$  iger HCl im Verdauungsapparat zersetzt. Verbrauch an Phosphorwolframsäure ca. 1 $\frac{3}{4}$  kg, an Alkohol 16 l. Ausbeute ca. 119 g Rohkyrinsulfat.

## II. Reinigung des Kyrins, Eigenschaften und Zusammensetzung desselben.

Zur Reinigung des Rohkyrinsulfates wurde dasselbe in folgender, doppelter Weise umgefällt:

a) Das feste Sulfat wurde in wenig gemessenem Wasser gelöst und nun absoluter Alkohol unter Umschütteln in dünnem Strahle so lange zugesetzt, bis das Kyrin als Öl abgeschieden wurde und als zähe Substanz am Boden des Gefäßes klebte,

was die 5—6fache Menge Alkohol erforderte. Es wurde über Nacht stehen gelassen, der Alkohol abgegossen, nochmals in Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt, am nächsten Tage abgegossen und nun erst wieder das Öl in 5%iger  $H_2SO_4$  gelöst, mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt und diese Lösung wie beim Fällen des Rohsulfates in Alkohol verrührt. Auf diese Weise wurde also in Staffeln zu je 3 Stationen gereinigt.

b) Das feste Sulfat wurde in 5%iger Schwefelsäure gelöst und sofort wieder in Alkohol als festes Sulfat gefällt.<sup>1)</sup>

Ich habe zuletzt dieser zweiten Reinigungsweise den Vorzug gegeben, weil meinen Beobachtungen nach die Fällung als Öl eine Reinigung in geringerem Maße bewirkt; denn während ich bei hintereinander erfolgter 8maliger Ölfällung und darauffolgender Fällung als festes Sulfat (also 9 Umfällungen) die C-Werte von 37,77% und 37,92% erhielt, bekam ich aus demselben Rohsulfate nach einmaliger Umfällung in das feste Sulfat die Werte 36,58% und 36,24%, die sich dem konstanten Werte schon um über 1% nähern. Außerdem gingen, wie die Analysentabelle auf S. 140 zeigt, die C-Werte bei der 2. Reinigungsmethode von Umfällung zu Umfällung um rund 1% herunter; eine größere Differenz wurde durch die Staffelfällung, die doch einer 3maligen Umfällung gleichkommen sollte, auch nicht erreicht. Dagegen sind hier die Verluste an Substanz, an Zeit und der Verbrauch an Alkohol größer gewesen.

Es mußte, wie die Analysentabelle auf S. 140 anzeigt, ziemlich oft umgefällt werden, ehe eine Konstanz der Werte eintrat, ehe also das Kyrin rein war. Die Verluste beim Umfällen waren ziemlich groß; sie betrug 20—25% des jedesmal angewandten festen Sulfates; aber es kann ja wohl gerade deshalb aus der Konstanz der Fraktionen beweisend auf die Einheitlichkeit des Kyrins geschlossen werden. Des weiteren ging aus den Analysen hervor, daß das Sulfat von Anfang an nahezu aschefrei war. Die die Inkonzanz der Zusammensetzung der ersten Fraktionen bedingenden Verunreinigungen

---

<sup>1)</sup> Siehe Seite 132 und M. Siegfried, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 48.

konnten also nicht anorganischer, sondern nur organischer Natur sein. Als besonders hartnäckige Verunreinigung erwies sich das Tyrosin. Bei Spaltung von 12 g des Sulfates der 15. Umfällung, bei welcher die Zusammensetzungswerte den konstanten Werten schon sehr nahe kommen, mit verdünnter Schwefelsäure wurde noch ziemlich 0,1 g Tyrosin abgeschieden; seine Identität wurde durch die Millonsche Reaktion und die Form seiner Krystalle nachgewiesen. Diese geringe Menge vermochte freilich die Analysenwerte nicht merkbar zu beeinflussen; seine reichliche Anwesenheit in den ersten Sulfatfällungen war aber jedenfalls neben der Anwesenheit anderer Verunreinigungen die Ursache dazu, daß die C-Werte so hoch und die N-Werte viel niedriger gefunden werden. Möglich ist auch, daß nicht Tyrosin selbst, sondern ein bei der Spaltung Tyrosin lieferndes Produkt die Verunreinigung bewirkte.

Auch die Konstanz der Verteilung des durch Phosphorwolframsäure fällbaren und nicht fällbaren N nach Spaltung des Kyrins mit Schwefelsäure wurde als Kriterium für die Reinheit des Sulfates genommen, wie die Tabelle auf S. 156 zeigt. Auch hier mag, neben anderen Verunreinigungen, hauptsächlich das Tyrosin die Ursache des bei unreinen Fraktionen geringer gefundenen Basenstickstoffes gewesen sein.

Im ganzen wurde bei dem aus Darstellung B gewonnenen Kyrinsulfat, mit dem die Hauptuntersuchungen ausgeführt wurden, 24mal umgefällt (also 8 Staffeln). Darstellung C ergab schon nach 3maligem direkten Umfällen in das feste Sulfat den konstanten C-Wert.

Eigenschaften: Das Sulfat des aus dem Hämoglobin dargestellten Kyrins konnte in Krystallform nicht erhalten werden, ebensowenig wie die Sulfate des Gluto- und Caseinokyrins. Aber auch beim Phosphorwolframat verliefen die Krystallisationsversuche resultatlos, während die Phosphorwolframate des Gluto- und Caseinokyrins charakteristische Krystalle zeigten. Es wurden folgende Versuche gemacht:

Eine Lösung von 0,2 g des reinen Kyrinsulfates in Wasser wurde mit Natronlauge eben alkalisch gemacht und aus ihr ohne Gegenwart von Mineralsäuren mit Phosphorwolframsäure

das Phosphorwolframat ausgefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, gut mit Wasser ausgewaschen und dann in heißem Wasser gelöst. Von einem etwa ungelöst gebliebenen Rückstande wurde heiß abfiltriert. Beim langsamen Erkalten schied sich das Phosphorwolframat wieder aus; eine Probe davon, unter das Mikroskop gebracht, zeigte aber keine Krystalle, sondern nur regelmäßige Körnchen. Auch ein Zusatz von verdünnter Schwefelsäure zu dem gut ausgewaschenen, in Wasser suspendierten und darauf heiß gelösten Phosphorwolframate bewirkte keine Krystallbildung; es waren auch hier selbst nach mehrtägigem Stehenlassen nur Körnchen zu sehen. — Es ist möglich, daß die Anwesenheit des Histidinkomplexes im Hämoglobinokyrin, der bei den bis jetzt dargestellten Kyrinen fehlt, hier aber, wie später gezeigt werden wird, vorhanden ist, die Krystallbildung verhindert oder zum mindesten sehr erschwert. Arginin- und Lysinphosphorwolframat sind leicht in Krystallen zu erhalten, besonders letzteres, das schon beim gewöhnlichen Fällen in ziemlich großen, auch ohne Mikroskop sichtbaren Nadeln auskrystallisiert. Anders verhält sich das Histidinphosphorwolframat. Eine kleine Quantität des später gewonnenen Histidinchlorids wurde in wenig Wasser gelöst, das Histidin mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, das Phosphorwolframat in heißem Wasser gelöst und durch Erkaltenlassen wieder abgeschieden. Eine Probe zeigte auch hier unter dem Mikroskope nur Körnchen; dagegen bewirkte der Zusatz von Schwefelsäure zu dem im Wasser suspendierten Phosphorwolframate, daß sich, wenn auch keine ausgesprochenen Krystalle, so doch immerhin zerfahrene Blättchen bildeten.

Das dargestellte Kyrinsulfat ist ebenso wie die freie Base leicht löslich in Wasser.

In Alkohol ist das Kyrin fast, in Äther vollständig unlöslich.

Es gibt deutlich die Biuretreaktion mit einem Stich ins Bordeauxrote, aber nicht die Millonsche Reaktion.

Das Sulfat gibt deutlich die Kongoreaktion.

Das Kyrinsulfat ist optisch inaktiv.

### Zusammensetzung des Kyrinsulfates.

Für die Analysen wurde das Kyrinsulfat bei ca. 95° bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Es geschah dies in dem von Siegfried konstruierten, mit Rückflußkühler versehenen Trockenapparate,<sup>1)</sup> in welchem nach dem bekannten Prinzip die Temperatur konstant bleibt und immer mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknete Luft über die Substanz geleitet wird. Das Sulfat wurde erst einen oder zwei Tage lang im Schiffchen über Schwefelsäure getrocknet, da es sonst im Trockenapparate leicht schmilzt. Die Substanz zeigte nach 3—4tägigem, täglich ungefähr 9stündigem Trocknen Konstanz. Die Gewichtsabnahme rührte nur zum allergeringsten Teile von einem Wasserverluste her; der größte Teil ist dem Verschwinden des Alkohols zuzuschreiben, den das über Schwefelsäure getrocknete Sulfat hartnäckig zurückhält.

Die Kohlen- und Wasserstoffbestimmungen wurden mit grobem CuO, reduziertem Cu und Bleichromat ausgeführt, die Stickstoffbestimmungen teils nach Kjeldahl, teils nach Dumas.

Es wurden meist Parallelbestimmungen ausgeführt.

Die Analysen ergaben folgende Werte:

Darstellung A: Die geringe Menge Substanz, die nach den Vorversuchen übrig blieb, gestattete keine Analysen.

Darstellung B: Das Rohkyrinsulfat wurde nicht analysiert. Ausbeute 200 g. Hiervon wurde ein

B 2. 180 g vom Rohsulfat. 8malige Ölfällung und darauffolgende Fällung als festes Sulfat, also

9. Umfällung (I., II. und III. Staffel). Ausbeute 145 g.

1. 0,1420 g Substanz ergaben 0,1962 g CO<sub>2</sub> und 0,0788 g H<sub>2</sub>O,  
also C = 37,77%, H = 6,13%, Asche = 0,41%.

2. 0,1416 g Substanz ergaben 0,1969 g CO<sub>2</sub> und 0,0766 g H<sub>2</sub>O,  
C = 37,92%, H = 6,00%, Asche = 0,46%.

3. 0,1889 g Substanz erforderten 18,15 ccm n/10-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N = 13,42%.

4. 0,1988 » » » 18,8 » » » = 13,24%.

5. 0,1935 » » ergaben 0,1423 g BaSO<sub>4</sub>, S = 10,1%.

6. 0,1634 » » » 0,1202 » » » = 10,3%.

12. Umfällung (nach 2maliger Ölfällung, also IV. Staffel); Ausbeute 103 g.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. LXIII, S. 50.

1. 0,1963 g Substanz ergaben 0,2592 g CO<sub>2</sub> und 0,1105 g H<sub>2</sub>O,  
C = 36,02%, H = 6,26%, Asche = 0,27%.
2. 0,2110 g Substanz ergaben 0,2797 g CO<sub>2</sub> und 0,1117 g H<sub>2</sub>O,  
C = 36,15%, H = 5,89, Aschefrei.
3. 0,2065 g Substanz erforderten 20,4 ccm n/10-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N = 13,8%.
4. 0,1931 » » » 19,45 » » » = 14,09%.
5. 0,2075 » » ergaben 0,1646 g BaSO<sub>4</sub>, S = 10,89%.

15. Umfällung (nach vorhergehender 2maliger Ölfällung, also V. Staffel). Ausbeute 76 g.

1. 0,1839 g Substanz ergaben 0,2382 g CO<sub>2</sub> und 0,0972 g H<sub>2</sub>O,  
C = 35,34%, H = 5,92%, Aschefrei.
- Das Schiffchen wog nach der Verbrennung 0,0002 g mehr, als es ohne Substanz gewogen hatte.
2. 0,1923 g Substanz ergaben 0,2465 g CO<sub>2</sub> und 0,1035 g H<sub>2</sub>O,  
C = 34,99%, H = 5,97%, Aschefrei.
3. 0,2004 g Substanz erforderten 20,8 ccm n/10-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N = 14,53%.
4. 0,2192 » » » 22,5 » » » = 14,37%.
5. 0,2421 » » gaben 0,1880 g BaSO<sub>4</sub>, S = 10,66%.

18. Umfällung (nach vorhergehender 2maliger Ölfällung, also VI. Staffel). Ausbeute 55 g.

1. 0,1018 g Substanz gaben 0,1278 g CO<sub>2</sub> und 0,0549 g H<sub>2</sub>O,  
C = 34,38%, H = 5,99%, Aschefrei.
2. 0,2054 g Substanz gaben 0,2563 g CO<sub>2</sub> und 0,1094 g H<sub>2</sub>O,  
C = 34,03%, H = 5,92%, Aschefrei.
3. 0,2014 g Substanz erforderten 21,5 ccm n/10-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N = 14,95%.
4. 0,1826 » » » 19,65 » » » = 15,06%.
5. 0,1651 » » gaben 0,1331 g BaSO<sub>4</sub>, S = 11,08%.

21. Umfällung (nach vorhergehender 2maliger Ölfällung, also VII. Staffel). Ausbeute 41 g.

1. 0,2079 g Substanz gaben 0,2611 g CO<sub>2</sub> und 0,1125 g H<sub>2</sub>O,  
C = 34,25%, H = 6,01%, Aschefrei.
2. 0,1954 g Substanz gaben 0,2464 g CO<sub>2</sub> und 0,1044 g H<sub>2</sub>O,  
C = 34,39%, H = 5,94%, Aschefrei.
3. 0,1964 g Substanz erforderten 21,3 ccm n/10-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N = 15,17%.
4. 0,1684 » » » 18,07 » » » = 15,02%.
5. 0,1417 » » gaben 0,1116 g BaSO<sub>4</sub>, S = 10,81%.

Der Genauigkeit wegen wurde nochmals umgefällt, also

24. Umfällung (nach vorhergegangener 2maliger Ölfällung, also VIII. Staffel). Ausbeute 32 g.

1. 0,1737 g Substanz gaben 0,2192 g CO<sub>2</sub> und 0,0924 g H<sub>2</sub>O,  
C = 34,42%, H = 5,91%, Aschefrei.

2. 0,1478 g Substanz erforderten 15,8 ccm  $n_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N = 14,96 %.
3. 0,1292 » » » 14,07 » » » = 15,25 %.
4. 0,1779 » » gaben 0,1401 g BaSO<sub>4</sub>, S = 10,92 %.

Die Konstanz für C wurde also bei der 18. Umfällung, die für N bei derselben, die für S schon bei der 12. erreicht. Der Wert für H entsprach von Anfang an schon dem Durchschnittswerte; seine Schwankungen waren verhältnismäßig gering — er konnte also als Kriterium für die Reinheit des Präparates nicht gelten.

Bei der direkten Umfällung des Sulfates wieder in das feste Sulfat (also ohne Ölfällung) wurde die Konstanz des C-Wertes schon eher erreicht.

Darstellung B 1 nach Seite 134 b) umgefällt.

#### I. Umfällung:

1. 0,1524 g Substanz gaben 0,2070 g CO<sub>2</sub> und 0,0876 g H<sub>2</sub>O,  
C = 36,61 %, H = 6,31 %, Asche = 0,39 %.
2. 0,1137 g Substanz gaben 0,1511 g CO<sub>2</sub> und 0,0633 g H<sub>2</sub>O,  
C = 36,24 %, H = 6,19 %, Asche = 0,58 %.

#### II. Umfällung:

1. 0,1421 g Substanz gaben 0,1825 g CO<sub>2</sub> und 0,0771 g H<sub>2</sub>O,  
C = 35,05 %, H = 6,04 %, Asche = 0,19 %.
2. 0,1544 g Substanz gaben 0,1990 g CO<sub>2</sub> und 0,0872 g H<sub>2</sub>O,  
C = 35,17 %, H = 6,28 %, Asche = 0,25 %.

#### III. Umfällung:

0,1334 g Substanz gaben 0,1674 g CO<sub>2</sub> und 0,0736 g H<sub>2</sub>O,  
C = 34,26 %, H = 6,15 %, Aschefrei.

Hier entspricht also schon der bei der 3. Umfällung festgestellte C-Wert dem vorhin erst bei der 18. gefundenen.

Darstellung C nach Seite 134 b) umgefällt.

1. 0,2006 g Substanz gaben 0,2519 g CO<sub>2</sub> und 0,1071 g H<sub>2</sub>O,  
C = 34,25 %, H = 5,95 %, Aschefrei.
2. 0,1940 g Substanz gaben 0,2426 g CO<sub>2</sub> und 0,1026 g H<sub>2</sub>O,  
C = 34,11 %, H = 5,89 %, Aschefrei.

0,2316 g Substanz gaben 29,95 ccm tr. N; t = 18°, Bar. = 757 mm;  
N = 15,17 %.

Bei Darstellung C war das Oxyhämoglobin im Verdauungsapparate zersetzt. Die C-, H- und N-Werte des Sulfates dieser Darstellung stimmen mit denen der Sulfate von Darstellung B überein. Es geht also daraus hervor, daß auch bei

der im Verdauungsapparate bewirkten gleichmäßigeren Zersetzung kein anderes Produkt entsteht, als bei Darstellung B.

### Zusammenstellung der Analysenwerte:

Prozent	Darstellung B 1			Darstellung B 2						Darst. C
	Umfällung									
	1.	2.	3.	9.	12.	15.	18.	21.	24.	3.
C	36,61	35,05	34,26	37,77	36,02	35,34	34,38	34,25	34,42	34,25
	36,24	35,17	—	37,92	36,15	34,99	34,03	34,39	—	34,11
H	6,31	6,04	6,15	6,13	6,26	5,92	5,99	6,01	5,91	5,95
	6,19	6,28		6,00	5,89	5,97	5,92	5,94	—	5,85
N	—	—	—	13,42	13,80	14,53	14,95	15,17	14,96	15,17
	—	—	—	13,23	14,09	14,37	15,06	15,02	15,25	—
S	—	—	—	10,01	10,89	10,66	11,08	10,81	10,97	—
	—	—	—	10,3	—	—	—	—	—	—

### Zusammenstellung der konstanten Werte.

Prozent	Darst. B 1	Darstellung B 2				Darst. C	Durchschnitt
	Umfällung						
	3.	18.	21.	24.	3.		
C	34,26	34,38	34,25	34,42	34,25	34,25	34,26
		34,03	34,39		34,11		
H	6,15	5,99	6,01	5,91	5,95	5,95	5,98
		5,92	5,91		5,85		
N	—	14,95	15,17	14,96	15,17	15,17	15,08
		15,06	15,02				
S	—	11,08	10,81	10,97	—	—	10,95
		—	—		—		

Also enthält das dargestellte Kyrinsulfat:

34,26 % C
5,98 % H
15,08 % N
10,95 % S
33,73 % O
<hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/>
100,00 %.

Der Versuch, den Stickstoff, wenn auch nicht ganz, so doch in einem bestimmten Verhältnisse nach der Methode von Knop-Hüfner durch Vermischen der in Wasser gelösten Substanz mit unterbromigsaurem Natron in Freiheit zu setzen und zu bestimmen, und dadurch vielleicht einen tieferen Einblick in die Natur des Kyrins zu erhalten, ergab keine sicheren Resultate. Wenn auch nicht erwartet wurde, daß der Stickstoff wie beim Harnstoff quantitativ abgespalten werden sollte, so konnte man immerhin vermuten, daß die Menge des in Freiheit gesetzten N bei allen Bestimmungen, wenigstens was die reinen oder ziemlich reinen Präparate anbetrifft, in einem bestimmten Verhältnisse zum Gesamtstickstoff stünde, umsomehr als Fränkel angibt, daß er derartige Versuche mit dem Histidin angestellt hat. Nach seinen Angaben <sup>1)</sup> wird durch unterbromigsaures Natron  $\frac{1}{3}$  des Histidin-N, also eins von den 3 N-Atomen, als elementarer Stickstoff abgespalten. Da das aus dem Hämoglobin dargestellte Kyrin nun ebenfalls Histidin enthält, konnte ähnliches hier erwartet werden; außerdem war es nicht ausgeschlossen, daß auch die Komplexe der übrigen Spaltungsprodukte auf diese Weise N in proportionaler Menge in Freiheit setzten.

Zur Herstellung des unterbromigsauren Natrons oder der Bromlauge wurden 68 g Natriumhydrat in 1 l Wasser gelöst und dazu 50 g Brom = 16 ccm gesetzt. Sie wurde für jede Bestimmung frisch bereitet, wenn nicht eine Reihe von Bestimmungen nebeneinander ausgeführt wurde. Zur Verwendung kam der bekannte Hüfnerapparat. Um eine recht schnelle und intensive Vermischung der im untersten kalibrierten Kölbchen befindlichen, in Wasser gelösten Substanz mit der Bromlauge zu ermöglichen, wurde vor dem Öffnen des das Kölbchen verschließenden Hahns Quecksilber in den bauchig erweiterten Teil der Röhre gefüllt. Beim Beginn der Bestimmung nun trat nach Öffnen des Hahns das Quecksilber schnell in das Kölbchen ein und drängte die Substanz nach oben. Die Stickstoffentwicklung begann sofort, setzte sich einige Zeit energisch fort und ließ dann allmählich nach. In bestimmten Zeitabschnitten wurden die Volumina abgelesen. Ein bestimmter Zeit-

<sup>1)</sup> Fränkel, Darstellung und Konstitution des Histidins. Aus den Sitzungsberichten der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien. Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse Bd. CXII, Abt. II b. März 1903.

punkt, wann die Entwicklung zu Ende war, konnte nicht festgestellt werden; bei einer Erschütterung des Apparates oder bei einer Erhöhung der Temperatur wurde nach scheinbarem Aufhören immer noch N in Freiheit gesetzt.

In 10 ccm derselben Lösung war vorher nach Kjeldahl der Gesamtstickstoff ermittelt worden. Das den freien N enthaltende Eudiometer wurde nach 22 Stunden in ausgekochtes Wasser gebracht und aus dem nun abgelesenen Volumen mit Rücksicht auf Temperatur und Barometerstand das Gewicht des freigewordenen Stickstoffes ermittelt und auf den Gesamt-N bezogen.

Zahlreiche von mir und anderen ausgeführte Bestimmungen ergaben aber trotz intensiver Vermengung der Lösungen und trotz des Umstandes, daß die Bromlauge immer in derselben Temperatur zur Verwendung kam, keine übereinstimmenden und sicheren Resultate bei Verwendung ein und desselben Präparates.

### III. Spaltung des Kyrins.

Sowohl für die qualitativen als auch für die quantitativen Spaltungen wurde das reine Kyrinsulfat 12 Stunden lang am Rückflußkühler mit der 10—15fachen Menge Schwefelsäure ( $\frac{2}{3}$  Gewichtsmenge Wasser,  $\frac{1}{3}$  Gewichtsmenge konzentrierte Säure) gekocht und dadurch das Kyrinmolekül vollständig hydrolytisch gespalten.

#### A. Qualitative Spaltung.

12 g Sulfat der 24. Umfällung (Darstellung B) wurden in oben angegebener Weise gekocht. Die filtrierte und mit Wasser verdünnte Lösung wurde zur Ausfällung der Basen vorsichtig und unter Vermeidung eines Überschusses mit 10%iger Phosphorwolframsäure versetzt, filtriert und gut mit Wasser ausgewaschen. Das Filtrat (Filtrat I) wurde später auf Amidosäuren geprüft.

##### a) Basen.

1. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde in Wasser suspendiert, in Ammoniak in der Wärme gelöst, die Lösung zur Ausfällung der Phosphorwolframsäure und der Schwefelsäure mit Barythydrat versetzt, filtriert, mit Ammoncarbonat versetzt, filtriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und mit Schwefelsäure neutralisiert. Eine Probe dieser Lösung gab sowohl auf Zusatz von ammonia-

kalischer Silberlösung<sup>1)</sup> als auch von Merkurisulfat<sup>2)</sup> (75 g HgO werden in 500 ccm 15 volumprozentiger erhitzter Schwefelsäure gelöst) einen dicken Niederschlag. Es war also anzunehmen, daß bei der Spaltung des Kyrins Histidin entsteht. Zur vollständigen Ausfällung desselben setzte ich der Basenlösung soviel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zu, daß sie 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> 0/0 ig wurde<sup>3)</sup> und fällte mit HgSO<sub>4</sub> unter Vermeidung eines Überschusses, da sich das Histidin darin ebenso wie im Überschuß der ammoniakalischen Silberlösung löst. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser ausgewaschen und das Filtrat zur weiteren Untersuchung aufgehoben (Filtrat II). Das Histidin-Quecksilber wurde nun in Wasser verührt und durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zersetzt. Vom ausgefällten Quecksilbersulfid wurde abfiltriert und der Schwefelwasserstoff durch Durchleiten von Luft verjagt. Um das im Filtrat befindliche Histidin als solches zu charakterisieren, versuchte ich, es in eins der beiden Chlorhydrate überzuführen. Zu diesem Zwecke wurde das Filtrat mit Salzsäure bis zur sauren Reaktion versetzt. Beim vollständigen Eindampfen der Lösung schieden sich Krystalle aus, die aber noch ziemlich dunkelgelb gefärbt waren. Sie wurden deshalb nochmals in Wasser gelöst, die Lösung mit Tierkohle gekocht, wiederum Salzsäure zugefügt und auf dem Wasserbade ziemlich eingeeengt. Beim vollständigen Verdunsten des Wassers über Schwefelsäure im evakuierten Exsikkator schieden sich schöne, große, glashelle Krystalle aus. Sie wurden auf kleinem Saugfilter abgesaugt und mit absolutem Alkohol und Äther I ausgewaschen. Die Untersuchung ergab, daß ich es mit dem von Kutscher<sup>4)</sup> zuerst dargestellten Histidindichlorid von der Formel C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> · 2 HCl zu tun hatte.

I. 0,2178 g Substanz gaben 0,2732 g AgCl.

II. 0,2787 » » erforderten 36,1 ccm n/10-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Gefunden: Berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> · 2 HCl:

Cl = 31,03 0/0 31,14 0/0

N = 18,15 0/0 18,42 0/0

<sup>1)</sup> Hedin, Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 194, 195.

<sup>2)</sup> Hopkins und Cole, Journ. of Physiology, Bd. XXVII, S. 418.  
Kossel und Patten, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 40.

<sup>3)</sup> Kossel und Patten, a. a. O., S. 40 und 41.

<sup>4)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 199 ff.; Bd. XXVIII, S. 383.

Schmelzpunkt  $233^{\circ}$ ; angegeben  $231\text{—}233^{\circ}$ .<sup>1)</sup> Krystallwasser wurde nicht abgegeben; auch bei  $140^{\circ}$  gab das von Kutscher dargestellte Histidindichlorid kein Wasser ab;<sup>2)</sup> eine Lösung meines Histidinsalzes gab beim Erhitzen intensive Biuretreaktion, in der Kälte zeigte sich blaue Farbe; Histidin gibt beim Erhitzen intensive Biuretreaktion.<sup>3)</sup> Ausbeute ca.  $1\frac{3}{4}$  g.

2. Zur weiteren Untersuchung wurde in das Filtrat vom Histidin-Quecksilber-Niederschlag (Filtrat II) Schwefelwasserstoff eingeleitet, vom Quecksilbersulfid abfiltriert und der Schwefelwasserstoff durch Durchleiten von Luft verjagt. Die Flüssigkeit wurde dann nochmals filtriert, die Schwefelsäure mit Barythydrat ausgefällt, der überschüssige Baryt mit Ammoncarbonat ausgeschieden und das Filtrat wieder bis zum Sirup eingedampft.

Aus der Lösung des Rückstandes wurde nach Kossel und Kutscher das Arginin unter Anwendung von Silbernitrat abgeschieden.

Der Silber-Baryt-Niederschlag wurde in Wasser verrührt und zur Ausfällung des Silbers und des Baryts mit Salz- und Schwefelsäure geschüttelt. Das Arginin ging dabei in Lösung. Von  $\text{AgCl}$  und  $\text{BaSO}_4$  wurde abfiltriert und aus dem Filtrate das Arginin mit Phosphorwolframsäure gefällt. Das Phosphorwolframat wurde wie früher in wässrigem Ammoniak gelöst, die Lösung mit Baryt und Ammoncarbonat behandelt und schließlich das Filtrat im tarierten Schälchen zum Sirup eingedampft. Der Sirup wog 0,8 g. Er wurde in möglichst wenig Wasser gelöst, die Lösung mit Salpetersäure schwach angesäuert, mit ca. 1 g festen Silbernitrat versetzt, nochmals filtriert und zum Filtrate zwecks Ausfällung des Argininsalzes zuerst Alkohol und dann von Zeit zu Zeit Äther zugegeben. Nach mehrtägigem Stehen hatte sich das Salz ausgeschieden, allerdings nicht in schönen Krystallen. Daher wurde abfiltriert, das Salz in wenig Wasser gelöst und dieses im evakuierten Exsikkator verdunstet, wobei das saure Argininsilbernitrat in kleinen weißen Krystallen

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 385.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 385.

<sup>3)</sup> Herzog, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 248.

auskrystallisierte. Die Ausbeute betrug 0,9 g. Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

I. 0,1546 g Substanz gaben 0,0412 g Ag.

II. 0,1578 » » » 27,2 ccm tr. N bei 15° und 758,5 mm.

Gefunden:	Berechnet für $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HNO_3AgNO_3$ :
Ag = 26,62%	26,55%
N = 20,35%	20,68%

Für eine C- und H-Bestimmung reichte die Substanz nicht mehr aus, da ich durch Unvorsichtigkeit einen Teil derselben verlor. Die Schmelzpunktbestimmung ergab 179° unkor. in Übereinstimmung mit den von Gulewitsch<sup>1)</sup> gefundenen Werten.

3. Das Filtrat vom Argininniederschlage (Filtrat III) wurde auf Lysin untersucht. Nach Ausfällen des Silbers und Baryums durch Salzsäure und Schwefelsäure wurde durch PWS ein reichlicher, zum Teil in mikroskopischen Nadeln krystallisierter Niederschlag gewonnen. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit 5%iger Schwefelsäure Cl-frei gewaschen, in bekannter Weise mit Ammoniak, Barythydrat und kohlensaurem Ammonium behandelt und wieder in gewogenem Schälchen bis zum Sirup eingedampft. Er wog ca. 1 1/2 g. Die wässrige Lösung desselben wurde auf 30 ccm aufgefüllt und in 2 Portionen geteilt.

a) Die eine Portion wurde zur Darstellung des Lysinchloroplatinates benutzt. Zu diesem Zwecke wurde sie wieder vollständig eingedampft, in wenig Wasser gelöst und 2 g festes Platinchlorid zugegeben. Das Ganze wurde darauf mit Alkohol bis zur Trübung, schließlich auch mit ein wenig Äther versetzt und im Eisschranke aufbewahrt. Nach abermaligem Zusatze von Alkohol am nächsten Tage schieden sich lange, rötlichgelbe, glänzende Nadeln ab. Die Krystalle wurden abgesaugt, mit Alkohol und Äther ausgewaschen und im Exsikkator aufbewahrt. An der Luft zerfließen sie leicht. In vollständig trockenem Zustande verlieren sie ihren Glanz. Ausbeute 1,4 g. Das über Schwefelsäure getrocknete Salz gab folgende Werte und erwies sich dadurch als krystallalkoholhaltiges Lysinplatinchlorid.

I. 0,2132 g Substanz gaben 0,0694 g Pt.

II. 0,3007 » » » erforderten 9,65 ccm  $n_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 200.

Gefunden:	Berechnet für $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot PtCl_6H_2 + C_2H_5OH$ :
Pt = 32,54%	32,37%
N = 4,49%	4,67%

Zur Vertreibung des Krystallalkohols wurde eine Probe des Salzes im Trockenschranke bei 90° getrocknet.

0,2308 g Substanz wogen nach 2 Tagen konstant 0,2135 g.

Alkohol = 0,0173 g.

0,2135 g gaben 0,0747 g Pt. Pt = 35,01%.

Berechnet für  $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot PtCl_6H_2$ : Pt = 35,07%.

β) Die andere Portion des Sirups wurde zur Darstellung des Pikrates benutzt. Nachdem sie nochmals eingedampft und wieder in wenig Wasser gelöst war, wurde die Lösung mit (der doppelten berechneten Menge vom Gewichte des verwendeten Sirups) Pikrinsäure im festen Zustande versetzt, das sofort ausgeschiedene Pikrat abfiltriert und aus heißem Wasser umkrySTALLISIERT. Es entstanden beim Erkalten lange Prismen, die für das Pikrat charakteristisch sind und sich auch als solches erwiesen. Ausbeute 1,1 g.

0,2367 g Substanz gaben 37,5 ccm tr. N bei 16° und 756 mm.

Gefunden: Berechnet für  $C_{12}H_{17}N_5O_9$ :

N = 18,65% 18,71%

Im Hämoglobinmoleküle sind also Histidin, Arginin und Lysin in einem basischen Komplexe vereint.

#### b) Amidosäure.

Das Filtrat vom Phosphorwolframatniederschlage (Filtrat I) war nun noch auf andere in Lösung befindliche Körper, auf Monoamidosäuren zu untersuchen; denn sowohl bei der Gelatine als auch beim Casein waren am Aufbau des Kyrins Amidosäuren beteiligt, sodaß ein gleiches hier vermutet werden konnte. Außerdem zeigten die (später zusammengestellten) Stickstoffverteilungsbestimmungen, daß ein bestimmter Prozentsatz des Stickstoffs nicht den Basen zugesprochen werden konnte, also anderen Körpern, vermutlich Amidosäuren, zukam, die zu isolieren die nächste Aufgabe war.

Zu diesem Zwecke wurde das Filtrat mit Barythydrat versetzt, vom Niederschlage abfiltriert, der überschüssige Baryt mit Ammoncarbonat gefällt und zum Sirup eingedampft. Dieser wurde in wenig Wasser gelöst und nun zuerst auf Glutamin-

säure in folgender Weise geprüft: Nach Zusatz von ammoniakalischer Silberlösung (zu  $\text{AgNO}_3$  wird  $\text{NH}_3$  gefügt, bis sich der entstandene Niederschlag gerade wieder gelöst hat) wurde Silbernitrat so lange zugefügt, bis sich nichts mehr ausschied. Der Niederschlag wurde abgesaugt und das Filtrat aufgehoben (Filtrat IV), der Niederschlag dann in zwei Portionen geteilt. Die eine wurde in Salpetersäure gelöst, wobei ein unlöslicher Rückstand zurückblieb; von diesem wurde abfiltriert und zum Filtrate vorsichtig nach Zusatz von wenig Silbernitrat verdünnter Ammoniak gefügt. Es entstand wiederum ein Niederschlag, der sich als glutaminsaures Silber erwies. Im Überschusse des Ammoniaks war das Salz löslich.

Die Analysen der bei  $70\text{--}80^\circ$  getrockneten Substanz ergaben folgende Werte:

- I. 0,1408 g Substanz gaben 0,0834 g Ag.  
 II. 0,1544 » » » 0,0928 »  $\text{CO}_2$ , 0,0306 g  $\text{H}_2\text{O}$  und 0,0916 g Ag.

Gefunden:	Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_4\text{Ag}_2$ :
Ag = 59,26 %; 59,33 %	59,81 %
C = 16,39 %	16,63 %
H = 2,19 %	1,95 %

Aus der anderen Portion wurde das Glutaminsäurechlorhydrat darzustellen versucht. Der Niederschlag wurde in Wasser verrührt und zur Ausfällung des Silbers mit Salzsäure versetzt, in das eingeeengte Filtrat Chlorwasserstoff bis zur Sättigung eingeleitet und die Lösung über Schwefelsäure im evakuierten Exsikkator gelassen. Es schieden sich weiße Krystalle aus, die in konzentrierter Salzsäure schwer, in Wasser dagegen leicht löslich waren und ohne Zweifel das Chlorhydrat der Glutaminsäure darstellten — eine Analyse desselben war leider bei der zu geringen Ausbeute nicht möglich.

Zur Prüfung auf noch andere Amidosäuren wurde das Filtrat von der Glutaminsäuresilberfällung (Filtrat IV) durch Schwefelammonium entsilbert und dann zur vollständigen Trockene eingedampft. Der gepulverte Rückstand, der eine Menge Ammoniumnitrat enthalten mußte, wurde längere Zeit am Rückflußkühler mit absolutem Alkohol gekocht und löste sich bis auf einen ganz minimalen Rest anorganischer Natur vollständig in dem-

selben. Glykokoll, dessen Abwesenheit ja von vornherein wahrscheinlich war, da es bis jetzt im Hämoglobin überhaupt noch nicht gefunden worden ist, war also nicht vorhanden. Aber auch sonst erwies sich die Prüfung auf weitere Amidosäuren als negativ:

Die alkoholische Lösung des Ammonnitrates schied beim Erkalten nichts aus; ein Zusatz von alkoholischem Silbernitrate und einigen Tropfen alkoholischen Ammoniaks ergab keine Fällung.

Es ist also unwahrscheinlich, daß bei der Spaltung des dargestellten Kyrins irgend eine in absolutem Alkohol bzw. in einer Lösung von Ammoniumnitrat in absolutem Alkohole lösliche Amidosäure entsteht.

Auch auf freies Ammoniak war zu prüfen; es entsteht nicht bei der Spaltung des Kyrins mit verdünnter Schwefelsäure. Je 50 ccm der Spaltungslösung des mit Schwefelsäure gespaltenen Sulfates der 21. und 24. Umfällung wurden mit Magnesia usta destilliert, das Destillat zur Entfernung der Kohlensäure gekocht <sup>1)</sup> und nachdem es abgekühlt war, zurücktitriert. Es wurden gebraucht für den in 50 ccm enthaltenen

	Gesamtstickstoff:	Ammoniak-(Amid-)stickstoff:
bei Um-		
fällung: { 21: 81,7 ccm $n/10$ -H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0,4 ccm $n/10$ -H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
{ 24: 77,0 ccm $n/10$ -H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0,25 ccm $n/10$ -H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .

Das ergibt für freien Amidstickstoff

bei Umfällung 21: 0,49%,

»            »        24: 0,33%.

Es entstanden also bei der Spaltung des Kyrins nur Spuren von Ammoniak; dieses kann also nicht als Spaltungsprodukt gelten.

Als Spaltungsprodukte des aus dem Hämoglobin isolierten Kyrins ließen sich also nachweisen: Histidin, Arginin, Lysin und Glutaminsäure.

### B. Quantitative Spaltungen.

Die Spaltung des Kyrins mit verdünnter Schwefelsäure bezweckte erstens die Feststellung und Isolierung der am Aufbau des Kyrins beteiligten Spaltungsprodukte. Zweitens ließen sich die Bestimmungen des durch PWS fällbaren und nicht fällbaren noch in anderer Beziehung verwerten. War das ge-

<sup>1)</sup> Fr. Müller, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 286.

spaltene Präparat rein, so mußte das Verhältnis der beiden N-Werte bei den Präparaten der verschiedenen Umfällungen konstant sein, und umgekehrt, zeigte das Verhältnis von Basen- und Säure-N immer dieselben Zahlen, so konnte diese Übereinstimmung sehr wohl zusammen mit der Konstanz des Kohlenstoffwertes ein Kriterium für die Unveränderlichkeit und damit Reinheit der Substanz sein.

Die Verteilung des PWS-Niederschlags- und PWS-Filtratstickstoffes bei den Präparaten der einzelnen Umfällungen.

Die Zersetzung des Kyrins wurde ausgeführt nach der Vorschrift von Kossel und Kutscher ebenso wie die qualitative Spaltung durch 12 stündiges Kochen mit einer Mischung von 1 Gewichtsteil konzentrierter  $H_2SO_4$  und 2 Gewichtsteilen Wasser am Rückflußkühler; es genügten zur jedesmaligen Spaltung 2 g festes Sulfat. Die Zersetzungslösung wurde dann abfiltriert und auf 100 ccm aufgefüllt. In je 10 oder 20 ccm wurde der Gesamtstickstoff ermittelt, in je 20 der Stickstoff der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Basen und im Filtrate von diesem Niederschlage der durch die Säure nicht ausgefällte Amidosäurestickstoff. Für die Genauigkeit der Bestimmungen war es unerläßlich, nur ausgeätherte Phosphorwolframsäure zu verwenden.

Die Bestimmungen selbst wurden nach Kjeldahl ausgeführt; die Verbrennung geschah mit dem nach den Angaben Siegfrieds konstruierten und von ihm beschriebenen Schüttelapparate,<sup>1)</sup> dessen Vorzüge bei allen Bestimmungen, besonders beim Aufschluß der die Phosphorwolframsäure enthaltenden Lösungen oder Niederschläge klar zutage treten. Ein Stoßen des Kolbeninhaltes und Springen der Kolben ist so gut wie ausgeschlossen; außerdem geht die Verbrennung, da mit größerer Flamme gearbeitet werden kann, viel schneller vor sich. Es wurde nie länger als höchstens zwei Stunden verbrannt. Zugemischt wurde Kaliumsulfat und Kaliumpermanganat.

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 1.

Die Bestimmungen des Basen- und Säure-N wurden nun in folgender Weise ausgeführt: Je 20 ccm der Zersetzungslösung wurden mit derselben Menge Wasser verdünnt und dazu eine zu messende Quantität 10%iger Phosphorwolframsäure gesetzt, bis kein Niederschlag mehr erfolgte. Um dies festzustellen, wurde nach Absitzen des Niederschlages eine kleine Menge der klaren Flüssigkeit mit einer Kapillarpipette herausgenommen und im Reagenzglase mit einem Tropfen Phosphorwolframsäure versetzt. Die Probe wurde wieder in die Lösung zurückgespült und dieses Verfahren so oft wiederholt, bis die Fällung beendet war, worauf Wasser nachgefüllt wurde, bis der Gesamtgehalt der Flüssigkeit an Schwefelsäure 5% betrug. Das Ganze wurde nun auf dem Wasserbade erwärmt, wobei sich der größte Teil des Niederschlages löste. Dann ließ ich über Nacht stehen. Beim Erkalten schied sich der Niederschlag wieder aus. Anderen Tages wurde bei 20° abgesaugt, was glatt vonstatten ging, und mit einem gemessenen Volumen (50 ccm)<sup>1)</sup> einer 5%igen Schwefelsäure-5%igen Phosphorwolframsäure ausgewaschen. Der Niederschlag wurde nun ohne Verlust samt der (natürlich N-freien) Filterscheibe in einen Aufschlußkolben gebracht; ebenso das Filtrat, nachdem es vorher gemessen war: das gefundene Volumen ergab nach Abzug der Waschflüssigkeit die Menge des Filtrates. Das Eindampfen desselben samt der Waschflüssigkeit geschah gleich im Kolben. Nach beendigter Verbrennung wurde destilliert und titriert. Das bei der Verbrennung abgeschiedene Wolframtrioxyd war gelb gefärbt; ließen sich Reste dieses gelben Niederschlages, die sich an der Kolbenwand angesetzt hatten, beim Überführen aus dem Kjeldahl- in den Destillierkolben nicht mit Wasser herausspülen, so benutzte ich einige Kubikzentimeter kalter konzentrierter Natronlauge zur Lösung. Stickstoffverluste waren hierbei kaum zu befürchten.

Zur Bestimmung des Korrektionswertes<sup>2)</sup> wurden aus einer der Zersetzungslösungen die Basen ausgefällt, gut abgesaugt und

---

<sup>1)</sup> 1 l 10%iger  $H_2SO_4$  und 1 l 10%iger Phosphorwolframsäure werden zusammengegossen.

<sup>2)</sup> M. Siegfried, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 57.

nun in 500 ccm der 5%igen Schwefelsäure-Phosphorwolframsäurelösung suspendiert. Das Ganze wurde auf dem Wasserbade erwärmt und anderen Tages bei genau 20° abgesaugt. Das Filtrat enthielt die gelösten Basenphosphorwolframate, deren Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt wurde. Das Eindampfen geschah im Aufschlußkolben selbst, um Verluste zu vermeiden. Selbst die in der Mischung reichlich vorhandene Menge Phosphorwolframsäure (25 g) erschwerte den Verbrennungsprozeß nicht. Die Resultate der Bestimmungen waren folgende:

500 ccm der Säurelösung verbrauchten

a) 6,23 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$

b) 6,1 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$

c) 6,45 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ ,

also im Mittel: 6,26 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

1 l der 5%igen Schwefelsäure-Phosphorwolframsäurelösung erforderte demnach zur Bestimmung des in ihm enthaltenen N rund 12,50 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Die Löslichkeit der Basenphosphorwolframate im angewandten Waschwasser (dieselbe Säurelösung) wurde derart bestimmt, daß 500 ccm dieses Waschwassers bei gewöhnlicher Temperatur durch die auf der Saugplatte befindlichen Basenphosphorwolframate durchgesaugt wurden. Die gelöste Menge ist natürlich abhängig von einem rascheren oder langsameren Durchlaufen der Flüssigkeit; ein leichtes und gleichmäßiges Filtrieren wurde ja eben bewerkstelligt dadurch, daß die Niederschläge erst in der Wärme gelöst und dann durch Erkaltenlassen wieder ausgeschieden wurden. 500 ccm Waschwasser verbrauchten

a) 2,72 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$

b) 2,53 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ ,

also im Mittel: 2,63 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

1 l erforderte demnach 5,26 ccm  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , das ist nicht ganz die Hälfte des vorhin gefundenen Wertes. Man wird also dem wirklichen Werte sehr nahe kommen, wenn man mit Siegfried annimmt, daß die Hälfte des für die Füllungslösung gefundenen Korrektionswertes auf das Waschwasser angewendet werden kann. Außerdem war bei den kleinen Quantitäten Waschflüssigkeit, die zur Verwendung kamen (50 ccm), eine Abweichung vom

richtigen Werte von nur geringem Einflusse. Es wurde also als Korrektionswert angenommen für 1 l Waschflüssigkeit 6,25 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ . — Die gefundenen Korrektionszahlen können selbstverständlich nur bei diesem zur Untersuchung vorliegenden Kyrin verwendet werden.

Sie waren nun bei den einzelnen Basen-N- und Säure-N-Bestimmungen so anzuwenden, daß die der Filtrat- und der Waschflüssigkeitsmenge entsprechenden Kubikzentimeter  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$  den bei der Bestimmung des Basen-N verbrauchten Kubikzentimeter  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$  zugezählt, bei den Amidosäuren dagegen in Abrechnung gebracht wurden.

Für die einzelnen Basen- und Säurestickstoffbestimmungen ergaben sich folgende Zahlen:

Darstellung B. I. (direkte Umfällungen in das feste Sulfat).

1. Umfällung. 2 g festes Sulfat mit 50 ccm Wasser und 25 g konzentrierter Schwefelsäure 12 Stunden am Rückflußkühler zersetzt und die Zersetzungslösung ebenso wie bei den folgenden Bestimmungen auf 100 ccm aufgefüllt; für jede Bestimmung wurden 20 ccm genommen. Je 20 ccm der Lösung erforderten für den Gesamt-N

$$\left. \begin{array}{l} \text{a) } 29,6 \text{ ccm } n/10\text{-H}_2\text{SO}_4 \\ \text{b) } 29,7 \text{ ccm } n/10\text{-H}_2\text{SO}_4 \end{array} \right\} \text{Mittel: } 29,65 \text{ ccm.}$$

Filtrat: 100 ccm, Korrektion also 1,25 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Waschflüssigkeit: 60 ccm, Korrektion also 0,38 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Basen-N. 20 ccm der Lösung erforderten für den Basen-N 17,8 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , d. i. korrigiert 19,43 ccm = 65,53% vom Gesamt-N.

Amidosäure-N. Das Filtrat erforderte 12,2 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , d. i. korrigiert 10,57 ccm = 35,65% vom Gesamt-N.

2. Umfällung. 2 g Sulfat wie oben zersetzt.

Gesamt-N. 20 ccm der Spaltungslösung erforderten

$$\left. \begin{array}{l} \text{a) } 32,75 \text{ ccm } n/10\text{-H}_2\text{SO}_4 \\ \text{b) } 32,70 \text{ ccm } n/10\text{-H}_2\text{SO}_4 \end{array} \right\} \text{Mittel: } 32,73 \text{ ccm.}$$

Filtrat: 100 ccm, Korrektion also 1,25 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Waschflüssigkeit: 50 ccm, Korrektion also 0,31 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

20 ccm der Lösung erforderten für Basen-N: 21,15 ccm  $n/_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, d. i. korrigiert 22,71 ccm = 69,39% vom Gesamt-N.

Für Amidosäure-N: 11,85 ccm  $n/_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, d. i. korrigiert 10,29 ccm = 31,44% vom Gesamt-N.

## II. Mit Ölfällungen.

9. Umfällung: (III. Staffel) 2 g festes Sulfat wie oben zersetzt. Gesamt-N. Je 20 ccm der Spaltungslösung erforderten:

a) 28,8 ccm  $n/_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

b) 28,8 ccm  $n/_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Filtrat 100 ccm, Korrektion also 1,25 ccm  $n/_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Waschflüssigkeit 70 ccm, Korrektion also 0,44 ccm  $n/_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Für Basen-N: 16,9 ccm  $n/_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, d. i. korrigiert 18,59 ccm, d. i. vom Gesamt-N 64,55% (!)

Für Amidosäure-N: 11,85 ccm  $n/_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, d. i. korrigiert 10,16 ccm, d. i. vom Gesamt-N 35,28%.

Der Wert für den Basen-N ist hier sehr niedrig und weicht von dem vorhin bei der 2. Umfällung gefundenen sehr ab. Diese Abweichung ist analog dem hohen C-Werte bei diesem Präparate (vergl. S. 140). Die 8 malige Ölfällung ist auf die Reinigung des Kyrins ohne großen Einfluß geblieben. Der niedrige Basen-N-Wert beweist also die Verwendbarkeit dieser Bestimmungen zur Kontrolle der Reinheit der Substanz.

12. Umfällung (IV. Staffel). 2 g festes Sulfat wie oben zersetzt.

Gesamt-N. Je 20 ccm der Zersetzungslösung erforderten

a) 31,6 ccm  $n/_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

b) 31,6 ccm  $n/_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Filtrat 100 ccm, Korrektion also 1,25 ccm  $n/_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Waschflüssigkeit 50 ccm, Korrektion also 0,31 ccm  $n/_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Je 20 ccm der Lösung erforderten:

Für Basen-N: 20,15 ccm  $n/_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, d. i. korrigiert 21,71 ccm, d. i. vom Gesamt-N 68,70%.

Für Amidosäure-N: 11,67 ccm  $n/_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, d. i. korrigiert 10,11 ccm, d. i. vom Gesamt-N 32%.

15. Umfällung (V. Staffel) 2 g festes Sulfat wie oben zersetzt.

Gesamt-N. Je 20 ccm der Zersetzungslösung erforderten

$$\left. \begin{array}{l} \text{a) } 25,6 \text{ ccm } n/10\text{-H}_2\text{SO}_4 \\ \text{b) } 25,7 \text{ ccm } n/10\text{-H}_2\text{SO}_4 \end{array} \right\} \text{Mittel: } 25,65 \text{ ccm.}$$

Filtrat a) 100 ccm, b) 100 ccm, Korrektion also 1,25 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Waschflüssigkeit a) 50 ccm, b) 50 ccm, Korrektion also 0,31 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Je 20 ccm der Lösung erforderten für Basen-N

a) 16,9 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 18,46 ccm,  
 b) 17,0 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 18,58 ccm, d. i. vom  
 Gesamt-N a) 71,97<sup>0</sup>/<sub>0</sub>; b) 72,43<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

Für Amidosäure-N:

a) 8,85 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 7,29 ccm,  
 b) 8,73 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 7,17 ccm, d. i. vom  
 Gesamt-N a) 28,42<sup>0</sup>/<sub>0</sub>; b) 27,96<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

18. Umfällung (VI. Staffel). 2 g festes Sulfat wie oben zersetzt.

Gesamt-N. Je 20 ccm der Zersetzungslösung erforderten

$$\left. \begin{array}{l} \text{a) } 30,5 \text{ ccm } n/10\text{-H}_2\text{SO}_4 \\ \text{b) } 30,4 \text{ ccm } n/10\text{-H}_2\text{SO}_4 \end{array} \right\} \text{Mittel: } 30,45 \text{ ccm.}$$

Filtrat a) 100 ccm b) 100 ccm; Korrektion also 1,25 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Waschflüssigkeit: a) 50 ccm, b) 50 ccm, Korrektion also 0,31 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Je 20 ccm der Lösung erforderten für Basen-N

a) 20,93 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 22,49 ccm,  
 b) 21,0 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 22,56 ccm, d. i.  
 vom Gesamt-N a) 73,85<sup>0</sup>/<sub>0</sub> b) 74,09<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

Für Amidosäure-N:

a) 9,6 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 8,04 ccm,  
 b) 9,4 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert, 7,84 ccm, d. i. vom  
 Gesamt-N a) 26,41<sup>0</sup>/<sub>0</sub> b) 25,74<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

21. Umfällung (VII. Staffel). 2 g festes Sulfat wie oben zersetzt.

Gesamt-N. Je 20 ccm der Zersetzungslösung erforderten

a) 27,8 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ ,

b) 27,8 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Filtrat a) 100 ccm, b) 100 ccm, Korrektion also 1,25 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Waschflüssigkeit a) 50 ccm, b) 50 ccm, Korrektion also 0,31 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Je 20 ccm der Lösung erforderten für Basen-N

a) 19,52 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 21,08 ccm,

b) 19,47 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 21,03 ccm, d. i. vom Gesamt-N a) 75,85<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, b) 75,65<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

Für Amidosäure-N:

a) 8,3 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 6,75 ccm,

b) 8,4 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 6,84 ccm, d. i. vom Gesamt-N a) 24,29<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, b) 24,64<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

24. Umfällung (VIII. Staffel). 2 g festes Sulfat wie oben zersetzt.

Gesamt-N. Je 20 ccm der Zersetzungslösung erforderten

a) 28,8 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$  } Mittel: 28,85 ccm.  
b) 28,9 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$  }

Filtrat a) 100 ccm, b) 100 ccm, Korrektion also 1,25 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Waschflüssigkeit a) 50 ccm, b) 50 ccm, Korrektion also 0,31 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Je 20 ccm der Lösung erforderten für Basen-N

a) 20,62 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 22,18 ccm,

b) 20,5 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 22,06 ccm, d. i. vom Gesamt-N a) 76,89<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, b) 76,46<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

Für Amidosäure-N

a) 8,22 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 6,66 ccm,

b) 8,4 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 6,84 ccm, d. i. vom Gesamt-N a) 23,09<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, b) 23,71<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

Darstellung C. 2 g dreimal umgefälltes Sulfat von konstantem C-Wert wie oben zersetzt.

Gesamt-N. Je 20 ccm der Zersetzungslösung erforderten

a) 26,5 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ ,

b) 26,5 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Filtrat a) 100 ccm, b) 100 ccm, Korrektion also 1,25 ccm  $n_{/10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Waschflüssigkeit a) 50 ccm, b) 50 ccm, Korrektion also 0,31 ccm  $n_{/10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Je 20 g der Lösung erforderten für Basen-N

a) 18,6 ccm  $n_{/10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 20,16 ccm,

b) 18,8 ccm  $n_{/10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 20,36 ccm, d. i. vom Gesamt-N a) 76,07%, b) 76,83%.

Für Amidosäure-N

a) 8,05 ccm  $n_{/10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 6,49 ccm,

b) 7,90 ccm  $n_{/10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ , korrigiert 6,34 ccm, d. i. vom Gesamt-N a) 24,49%, b) 23,93%.

	Darstellung B 2			Darstellung C
	18. Umfällung %	21. Umfällung %	24. Umfällung %	3. Umfällung %
Basen-N	73,85	75,85	76,89	76,07
	74,14	75,65	76,46	76,83
Amidosäure-N	26,41	24,29	23,09	24,49
	25,74	24,64	23,71	23,93

Diese Bestimmungen zeigen, daß in den letzten Präparaten Übereinstimmung in der Stickstoffverteilung eingetreten ist, während die noch unreinen Sulfate wesentlich weniger Basen-N lieferten.

Es ergab sich also, daß in dem aus dem Hämoglobin isolierten Kyrin 76—77% Stickstoff den Basen, 23—24% den Amidosäuren zuzurechnen ist.

Die Verteilung des Basenstickstoffs auf die einzelnen gefundenen Spaltungsprodukte.

Bei der qualitativen Untersuchung waren im Kyrin gefunden worden Histidin, Arginin, Lysin und Glutaminsäure. Das quantitative Verhältnis zwischen diesen drei Basen insgesamt und der Amidosäure ist bereits festgestellt worden; es

blieb nun noch die Aufgabe, zu ermitteln, in welchem Verhältnis die drei Basen untereinander im Kyrinmolekül vorhanden sind.

4 g der reinen Substanz, Darstellung B 2, 21. Fällung (Staffel VII) wurden wie früher mit 50 ccm Wasser und 25 g konzentrierter Schwefelsäure 12 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht; aus der Lösung wurden mit Phosphorwolframsäure die Basen ausgefällt, vom Niederschlage abfiltriert und dieser wie früher behandelt: Lösen in wässrigem Ammoniak, Ausfällen der Schwefel- und Phosphorwolframsäure mit Baryt, Abfiltrieren, Ausfällen des überschüssigen Baryts mit Ammoncarbonat, Abfiltrieren und Eindampfen zum Sirup. Dieser Sirup enthielt nur die Basen. Der Sicherheit halber, um alles Ammoniak zu vertreiben, wurde nochmals Wasser zugegeben und wieder eingedampft.

Der Sirup wurde in Wasser gelöst, filtriert und die Lösung auf 250 ccm aufgefüllt. Je 20 ccm dieser Lösung erforderten zur Bestimmung des Gesamtstickstoffes:

a) 15,8 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$

b) 15,7 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

50 ccm erforderten also:

a) 39,5 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$

b) 39,25 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Im Mittel: 39,4 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Histidin und Arginin können zusammen annähernd quantitativ durch Silbernitrat und überschüssigen Baryt gefällt werden,<sup>1)</sup> Histidin für sich allein durch Quecksilbersulfat. Ich bestimmte darum den Stickstoff der 3 Basen in folgender Weise:

- I. für Histidin und Arginin zusammen,
- II. im Filtrate vom Niederschlage dieser 2 Basen für Lysin allein,
- III. für Histidin allein. Aus der Subtraktion des dabei gefundenen Wertes von Wert I ergab sich der N-Wert für Arginin.

I. 50 ccm der auf 250 ccm gefüllten Basenlösung wurden zur Fällung von Histidin und Arginin mit 10% iger Silbernitratlösung solange versetzt, bis ein Tropfen der Lösung auf einem

<sup>1)</sup> Kossel und Kutscher, Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 70.

Uhrglase mit einem Tropfen kalt gesättigter Barytlösung zusammengebracht, eben anfang, gelben Niederschlag zu zeigen. Die Reaktionsproben wurden selbstverständlich wieder in das Becherglas zurückgespült, dann pulverisierter Baryt hinzugetan, bis sich solcher nicht mehr löste, abgesaugt, der Niederschlag gut mit kaltem Barytwasser ausgewaschen und dann samt Filter quantitativ in den Kjeldahlkolben gespült.

Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für Arginin- + Histidin-N zusammen

1. 27,55 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$
2. 27,90 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Das sind vom Gesamtbasenstickstoff

1. 69,91 %, 2. 70,84 %.

II. Das Filtrat des Arginin- und Histidinniederschlages wurde zur Entfernung des Baryts und des Silbers mit Salzsäure und Schwefelsäure geschüttelt; vom Niederschlage wurde abfiltriert und aus dem Filtrate das Lysin mit Phosphorwolframsäure als Phosphorwolframat ausgefällt, abgesaugt und, um alle Salpetersäure zu entfernen, gut mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschen. Der Niederschlag wurde mit dem Filter in den Kjeldahlkolben gebracht und unter Zugabe von etwas festem Kaliumsulfat kjeldahlisiert.

Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für Lysinphosphorwolframat

1. 11,2 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$
2. 11,15 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Das ist für Lysin-N vom Gesamtbasen-N

1. 28,47 %, 2. 28,29 %.

III. Zur Bestimmung des Histidinstickstoffes säuerte ich 50 ccm der Basenlösung in einem Becherglase mit wenig Schwefelsäure an, sodaß die Lösung wie bei der qualitativen Isolierung des Histidins ungefähr  $2\frac{1}{2}\%$ ig schwefelsauer war. Aus einer Bürette ließ ich dann langsam und unter Umrühren tropfenweise Merkurisulfatlösung zufließen, bis nichts mehr ausfiel. Der Niederschlag wurde mit Wasser gut ausgewaschen, samt Filter in den Kjeldahlkolben gebracht und kjeldahlisiert.

Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für den Stickstoff des Histidinquicksilbers

1. 15,88 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$

2. 16,57 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Das ist für den Histidin-N vom Gesamtbasen-N

1. 40,3 %, 2. 42,07 %.

Auch das Filtrat des Niederschlages wurde zur Kontrolle kjeldahlisiert. Es erforderte

1. 23,3 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$

2. 22,63 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Das ist für Arginin- + Lysin-N vom Gesamtbasen-N

1. 59,14 %, 2. 57,45 %.

Dieselben Bestimmungen wurden mit ca. 4 g des Sulfates der 24. Umfällung der Darstellung B und mit 4 g des Sulfates der 3. Umfällung der Darstellung C ausgeführt. Dabei ergaben sich folgende Werte:

#### Darstellung B 2, 24. Umfällung.

Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für den Gesamtbasen-N

1. 35,8 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$  } Mittel: 35,73 ccm.  
2. 35,65 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$  }

I. Histidin- + Arginin-N. Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für Histidin-N + Arginin-N

1. 25,7 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$

2. 25,12 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Das ist für Histidin- + Arginin-N vom Gesamtbasen-N

1. 71,93 %, 2. 70,3 %.

II. Lysin-N. Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für Lysin-N.

1. 8,9 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$

2. 10,15 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Das ist für Lysin-N vom Gesamtbasen-N

1. 24,91 %, 2. 28,11 %.

III. Histidin-N. Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für den Histidin-N des ausgefällten Histidinquicksilbers:

1. 15,0 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$
2. 15,2 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Das ist für Histidin-N vom Gesamtbasen-N

1. 41,98 ‰, 2. 42,56 ‰.

Das Filtrat erforderte

1. 20,65 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$
2. 20,4 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Das ist vom Gesamtbasen-N

1. 57,86 ‰, 2. 57,11 ‰.

Darstellung C, 3. Umfällung.

Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für den Gesamtbasen-N

1. 38,3 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$
  2. 38,35 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$
- } Mittel: 38,33 ccm.

I. Histidin- + Arginin-N. Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für Histidin- + Arginin-N

1. 25,96 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$
2. 26,53 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Das ist für Histidin- + Arginin-N vom Gesamtbasen-N

1. 67,72 ‰, 2. 69,23 ‰.

II. Lysin-N. Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für Lysin-N

1. 11,51 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$
2. 11,1 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ .

Das ist für Lysin-N vom Gesamtbasen-N

1. 30,04 ‰, 2. 28,95 ‰.

III. Histidin-N. Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für den Histidin-N des ausgefällten Histidinquecksilbers:

1. 16,15 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$
2. war erfolglos.

Das ist für Histidin-N vom Gesamtbasen-N 42,09 ‰.

Das Filtrat erforderte 21,9 ccm  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ , das ist vom Gesamtbasen-N 57,13 ‰.

In folgender Tabelle sind die N-Werte zusammengestellt.

Von dem durch Phosphorwolframsäure fällbaren Gesamtbasen-N betragen

Präparat	Histidin- + Arginin-N %	Lysin-N %	Histidin-N %	Arginin-N %
Darstellung B 2	69,91	28,47	40,3	—
21. Umfällung	70,84	28,25	42,07	—
Darstellung B 2	71,93	24,91	41,98	—
24. Umfällung	68,70	28,11	42,56	—
Darstellung C	67,72	30,04	42,09	—
3. Umfällung	69,23	28,95		
Durchschnitts- wert	69,66	28,12	41,80	27,87

Diese Durchschnittsstickstoffwerte der einzelnen Basen im Verhältnis zum Gesamtbasenstickstoffe bezogen auf die rund 77% des Basenstickstoffes im Kyrinmoleküle ergaben für:

Basen	Gesamtmolekül- stickstoff %
Histidin- + Arginin-N . . . . .	51,63
Lysin-N . . . . .	21,66
Histidin-N . . . . .	32,17
Also Arginin-N . . . . .	21,46
Glutaminsäure-N . . . . .	23,00
	<hr/> 98,29

Der Stickstoff im Kyrin aus Pferdehämoglobin würde sich also in folgender Weise auf die einzelnen Komplexe verteilen:

Histidin      Arginin      Lysin      Glutaminsäure  
           2                   1                   2                   4 Moleküle.

Diese Annahme setzt voraus, daß bei der Spaltung des Kyrins mit Schwefelsäure lediglich die genannten Spaltungsprodukte entstehen, was bis jetzt jedoch noch nicht bewiesen ist.

Durch den Nachweis der Existenz des (Hämo-)Globinkyrins wird also die Anschauung Siegfrieds unterstützt, daß in den Kyrinen Körper von einem ganz besonderen Typus vorliegen, die «als harte Kerne gleichsam aus dem Proteinmolekül durch die Salzsäure herausgeschält werden». <sup>1)</sup>

Es sei mir vergönnt, auch an dieser Stelle meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor M. Siegfried, für die Anregung zu der Arbeit, sowie für die mir stets gewährte Belehrung und Unterstützung bei derselben meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

---

<sup>1)</sup> M. Siegfried, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 67.

---