

Über β -Glutokyrinsulfat.

III. Mitteilung.

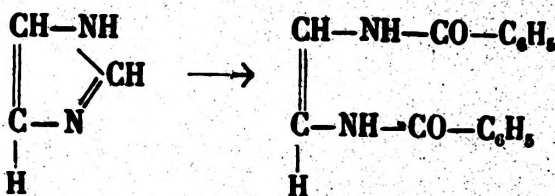
Von

M. Siegfried und W. Schunke.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Leipzig.)

(Der Redaktion zugegangen am 18. April 1916.)

Das β -Glutokyrin hat für die Eiweißchemie an Interesse gewonnen, seitdem es wahrscheinlich geworden ist,^{1) 2)} daß es durch Einwirkung von Silberbaryt nach Kossel nicht in vorher schon bestehende Komponenten getrennt, sondern daß es gespalten wird. Eine solche Spaltung würde bedeuten, daß durch Silberbaryt die Lösung einer Bindung erfolgt, welche der Hydrolyse einen relativ großen Widerstand entgegensetzt. Sie kann dadurch erklärt werden, daß man annimmt, daß ein Platz, an den das Silber zu treten bestrebt ist, durch die Reaktion frei gemacht wird, daß aber, wenn das Silber fehlt, Barythydrat allein die Spaltung nicht bewirkt, in ähnlicher Weise, wie Imidazol³⁾ und ein Teil seiner Derivate⁴⁻⁷⁾ durch Natronlauge und Säurechlorid aufgespalten werden, durch Natronlauge allein aber nicht.



Es kann auch das Silberoxyd katalytisch oder oxydierend wirken.

¹⁾ B. Todorowic, Inaug.-Diss., Leipzig, 1912.

²⁾ M. Siegfried, Diese Zeitschr., Bd. 84, S. 288 (1913).

³⁾ E. Bamberger und B. Berlé, Liebigs Ann., Bd. 273, S. 342 (1893).

⁴⁾ A. Windaus und F. Knoop, Berl. Ber., Bd. 38, S. 1166 (1906).

⁵⁾ A. Windaus, Berl. Ber., Bd. 42, S. 758 (1909).

⁶⁾ A. Windaus, Berl. Ber., Bd. 43, S. 499 (1910).

⁷⁾ A. Kossel u. S. Edlbacher, Diese Zeitschr., Bd. 93, S. 396 (1915).

Zur Beantwortung dieser, wie uns scheint, wichtigen Fragen sollte auch diese Untersuchung dienen.

Darstellung des Glutokyrin- β -sulfates.

Die Zersetzung der käuflichen ersten Qualität Leder-gelatine geschah mit der 10fachen Menge 16,5%iger Salz-säure während 28 Tagen bei 38—40° unter fortwährendem Rühren. An drei Darstellungen wurden 500, 750 und 500 g Gelatine verarbeitet. Das schon einmal in Alkohol gefällte Sulfat der ersten und dritten Darstellung wurde in früher be-schriebener Weise fünfmal, bei der zweiten Darstellung viermal umgefällt. Bei der ersten und zweiten Darstellung wurden je 25 g reines Sulfat gewonnen.

Elementare Zusammensetzung des Kyrinsulfates.

Ogleich die Elementaranalyse auch bei den Kyrinsulfaten wegen der ähnlichen Zusammensetzung derselben nicht aus-schlaggebende Resultate liefern kann, erschien es uns doch wünschenswert, an neuem Präparate die vor langer Zeit er-mittelte¹⁾ elementare Zusammensetzung zu kontrollieren. Hierbei wurden die früher gewonnenen C-, H- und S-Werte bestätigt, der Stickstoffgehalt etwas niedriger gefunden. Früher waren diese Bestimmungen nach Dumas ausgeführt, während wir die Kjeldahl-Methode benutzten.

Das Sulfat wurde im Alkohol-Siede-Trockenapparate unter Zuleitung mit Schwefelsäure getrockneter Luft bis zum kon-stanten Gewichte getrocknet. Die Konstanz trat in der Regel nach 10 mal 24 stündigem Trocknen ein.

1. 0,1683 g Substanz gaben 0,1998 g CO₂ und 0,0952 g H₂O
C = 32,37% H = 6,33%

2. 0,2010 g Substanz gaben 0,2391 g CO₂ und 0,1124 g H₂O
C = 32,44% H = 6,26%

3. 0,1168 g Substanz erhielten 13,3 ccm $\frac{n}{10}$ -S. N = 15,95%

4. 0,2042 g Substanz erhielten 23,2 ccm $\frac{n}{10}$ -S. N = 15,90%

5. 0,8012 g Substanz gaben 0,6076 g BaSO₄. S = 10,42%

Lediglich als Diskussionsformel sei für das Gluto- β -Kyrin-sulfat die folgende aufgestellt: C₁₇H₃₃N₇O₆ · 2 H₂SO₄.

¹⁾ M. Siegfried u. O. Pilz, Diese Zeitschr., Bd. 58, S. 222 (1908).

| Hierfür berechnet: | Gefunden: |
|--------------------|-----------|
| C 32,51 % | 32,4 % |
| H 5,94 % | 6,3 % |
| N 15,63 % | 15,9 % |
| S 10,22 % | 10,4 % |

Der Carbaminoquotient, der Formol-Stickstoff der v. Slyke-Stickstoff und der Acylquotient des Glutokyrin- β -sulfates.

Diese Werte waren zum Teil bereits früher bestimmt und sind jetzt kontrolliert worden, teils wurden sie zum ersten Male ermittelt. Sie sind wertvolle Konstanten für intermediäre Eiweißspaltungsprodukte.

Es fragt sich, inwieweit lassen sich diese Größen auch zu Schlüssen auf die Konstitution anwenden? Für alle vier Werte gilt es, bei Schlüssen auf die Konstitution insofern Vorsicht walten zu lassen, als die Gesetzmäßigkeiten, die für die einzelnen Reaktionen bekannt geworden sind, an einfachen Körpern, Aminosäuren oder höchstens niederen Peptiden beobachtet worden sind. Ob dieselben Gesetze bei komplizierteren Körpern uneingeschränkt gelten, wissen wir nicht. Das verschiedene Verhalten von Imidazolderivaten gegen Acylierungen, auf das weiter unten eingegangen werden soll, zeigt deutlich die Unzuverlässigkeit von Schlüssen auf die Konstitution aus der Größe der Acylquotienten.

Der Carbaminoquotient $\frac{\text{CO}_2}{\text{N}}$ ist für Aminosäuren und Peptide bis zu Tripeptiden festgelegt.¹⁻⁴⁾

Die aliphatischen Aminogruppen reagieren quantitativ, auch die Methylaminogruppen wie im Sarkosin, ebenso die Aminogruppen der aliphatischen Seitenketten aromatischer Aminosäuren, wie der Phenylaminoessigsäure und des Phenylalanins,

¹⁾ M. Siegfried u. C. Neumann, Diese Zeitschr., Bd. 54, S. 423 (1908).

²⁾ M. Siegfried und H. Liebermann, Diese Zeitschr., Bd. 54, S. 437 (1908).

³⁾ H. Liebermann, Diese Zeitschr., Bd. 58, S. 84 (1908).

⁴⁾ W. Sulze, Pflügers Arch., Bd. 136, S. 712 (1909).

hingegen die am Benzolring befindlichen Aminogruppen unvollständig. Letztere dürften in der Eiweißchemie nicht in Betracht kommen. Während die Gruppe $\text{NH} \begin{array}{l} / \text{CH}_2 - \\ \backslash \text{CH}_2 - \end{array}$ in der Diglykolamidsäure quantitativ reagiert, ist die Gruppe $\text{NH}-\text{CO}-$ der Hippursäure indifferent, in den Peptiden teilweise reaktionsfähig gegen Kohlensäure. Nicht reagieren die Säureamide, Harnstoff und Guanidin und die Derivate derselben, Kreatin und Kreatinin, während von den vier Stickstoffatomen des Arginins eins, natürlich das der Aminosäurekette, reagiert. Ebenfalls die Stickstoffgruppe der Seitenkette reagiert im Histidin, das Prolin reagiert fast vollständig, während das Tryptophan, das Indolalanin mit der Stickstoffgruppe der Seitenkette quantitativ, mit der des Indolringes etwa zur Hälfte reagieren.

Ganz besonders wertvoll ist der Carbaminoquotient als Konstante deshalb, weil er in so vielen Fällen erkennen läßt, ob ein Gemisch vorliegt oder nicht. Bei Ermittlung des Quotienten wird ein basischer Kalkniederschlag erzeugt und im Filtrate desselben der Quotient bestimmt. Nun sind die Calciumsalze der Carbaminosäuren verschiedener Körper sehr verschieden löslich. Infolgedessen erhält man bei einem Gemenge verschiedener Peptone, Kyrine, abweichende Werte für den Quotienten, wenn man die Bestimmung bei verschiedenen Konzentrationen ausführt, da bald mehr bald weniger von der schwerlöslichen Verbindung im Niederschlage bleibt und so für den Quotienten weniger oder mehr zur Geltung kommt. Man erkennt also, daß ein Gemenge vorliegt, daran, daß bei wechselnder Konzentration von einander abweichende Zahlen erhalten werden. Diesen Vorteil besitzt die Methode von Sørensen nicht. Hingegen hat sie den Vorteil schnellerer Ausführbarkeit.

Es reagieren auch hier die Aminogruppen mit Ausnahme der Säureamidgruppen, ebenfalls nicht die Guanidin-Amidogruppen. Die NH -Gruppe des Sarkosins reagiert wie gegen Kohlensäure quantitativ.^{1, 2)} Auch die NH -Gruppe des Prolins

¹⁾ Clementi, Chem. Zentralblatt 1915, S. 1089.

²⁾ M. Siegfried und H. Reppin, Diese Zeitschr., Bd. 95, S. 19 (1915).

reagiert.¹⁾ Indifferent ist Formol gegen Peptidgruppen, also reagieren überhaupt nicht Diketopiperazine.^{1, 2)} Es ist dies deshalb bemerkenswert, weil der Fortgang der Hydrolyse durch Formoltitrierung bestimmt wird, aber bei langsamer Proteolyse solche Anhydride direkt entstehen sollen.³⁾ In dem Maße also, wie letzteres geschieht, gibt die Formoltitrierung ein fehlerhaftes Bild von dem Fortschreiten der Hydrolyse, indem sie die Abspaltung von solchen Anhydriden nicht anzeigt. In dieser Beziehung ist auch das verschiedene Verhalten von Histidin und seiner Derivate gegen Formol wichtig. Histidin liefert wesentlich mehr Formolstickstoff, als sich für die NH_2 -Gruppe berechnet,⁴⁾ nach Kossel und Edlbacher⁵⁾ 116—133% statt 100%, das Imidazol 84—85%, der Methylester des Histidins 174—200%. Wenn das intraprotein mit der Carboxylgruppe gebundene Histidin sich ebenso verhält, so erhält man bei der Proteolyse durch Aufspaltung der Carboxylgruppenbindung des Histidins weniger formoltitierbaren Stickstoff als vorher. Was hier für das Histidin gefunden wurde, kann für andere Komplexe ebenfalls gelten.

Der van Slyke-Stickstoff wird ebenfalls von Amino-
gruppen und nicht von Säureamidgruppen geliefert, auch nicht von Guanidin-Amidogruppen. Während aber Prolin und Sarkosin gegen Kohlensäure und Formol reagieren, geben diese Aminosäuren keinen Stickstoff nach van Slyke. Betreffs der Peptidbindungen besteht eine gewisse Unsicherheit. Salpetrige Säure wirkt auch auf Peptidbindungen ein,⁶⁾ unter den nach van Slyke eingehaltenen Bedingungen, soweit bisher bekannt, nur auf Peptide, welche Glycin als Komponente enthalten.^{7, 8)}

¹⁾ S. P. L. Sörensen, Biochem. Zeitschr., Bd. 7, S. 45 (1908).

²⁾ P. Glagelow, Biochem. Zeitschr., Bd. 70, S. 118 (1915).

³⁾ E. Abderhalden u. C. Funk, Diese Zeitschr., Bd. 53, S. 19 (1907).

⁴⁾ V. Henriques und J. K. Gjoldbaek, Diese Zeitschr., Bd. 75 S. 363 (1911).

⁵⁾ A. Kossel und S. Edlbacher, Diese Zeitschr., Bd. 93, S. 396 (1915).

⁶⁾ E. Fischer u. W. Koelker, Liebigs Ann., Bd. 340, S. 172 (1905).

⁷⁾ D. D. v. Slyke, Journ. of Biol. Chem., Bd. 9, S. 185 (1911).

⁸⁾ E. Abderhalden und D. D. v. Slyke, Diese Zeitschr., Bd. 74, S. 505 (1911).

Der Acylquotient.

Die zuerst von J. Baum¹⁾ angewandte Acylierung von Aminosäuren nach Baumann und Schotten mit Benzoylchlorid wurde von Hedin²⁾ durch Ersatz des Benzoylchlorides durch ein schwefelhaltiges Säurechlorid, das Benzolsulfochlorid, weitergeführt, namentlich aber durch die Methode von E. Fischer und P. Bergell³⁾ unter Einführung des β -Naphthalinsulfochlorides fruchtbar gemacht. Die Anwendung eines schwefelhaltigen Säurechlorides ermöglicht eine genaue Kontrolle der Anzahl der in kompliziertere Moleküle eingetretenen Acylgruppen, durch Bestimmung des Stickstoffes einerseits und der des Schwefels anderseits. Deshalb hat auch das Naphthalinsulfochlorid vor dem besonders schön krystallisierende Derivate gebenden o-Nitrotoluolsulfochlorid⁴⁾ den Vorzug, weil wegen der Nitrogruppe die Bestimmung des Stickstoffs nach Kjeldahl besondere Modifikationen erfordert.

Es entspricht also jeder eingetretenen Acylgruppe 1. Atom Schwefel. Wenn auch die Säurechloride nicht nur auf Stickstoffgruppen, sondern auch auf Hydroxylgruppen einwirken, so ist doch bei komplizierteren intermediären Eiweißspaltungsprodukten, deren Formel unbekannt ist, der Stickstoffgehalt das beste und am leichtesten zu ermittelnde Maß der Verbindungen. Deshalb setzen wir den Schwefelgehalt der Naphthalinsulfoprodukte in Beziehung zum Stickstoffgehalt.

Als Acylquotient sei das Verhältnis $\frac{S}{N}$ bezeichnet, in dem S die atomistischen Mengen Schwefel, N die atomistischen Mengen Stickstoff bedeutet.

Man erhält also die Werte S und N des Quotienten, indem man die durch die Analysen gefundenen absoluten Werte für S und N durch die betreffenden Atomgewichte dividiert.

Bisher ist beobachtet worden, daß Peptone und Kyrine in höherem Grade mit Säurechloriden reagieren als gegen

¹⁾ J. Baum, Diese Zeitschr., Bd. 9, S. 465 (1885).

²⁾ S. G. Hedin, Berl. Ber., Bd. 23, S. 3196 (1890).

³⁾ E. Fischer und P. Bergell, Berl. Ber., Bd. 35, S. 3779 (1902).

⁴⁾ M. Siegfried, Diese Zeitschr., Bd. 43, S. 68 (1904).

Kohlensäure und Formol. Wiederholt wurde hier der Acylquotient ungefähr doppelt so groß gefunden als der Carbaminoquotient, und zwar bei solchen Körpern, die keine Tyrosin-gruppe enthalten. Wie unten bewiesen werden wird, reagiert das Arginin mit 2 Molekülen β -Naphthalinsulfochlorid, hingegen nur mit 1 Mol. Kohlensäure und Formol. Da, nachdem durch Kossel^{1, 2, 3)} gezeigt worden ist, daß in Protaminen und Protonen die Guanidinamidogruppe des Arginins frei ist, besteht auch hier die Möglichkeit, daß der höhere Acylquotient zum Teil durch Acylierung solcher Argininguanidinamidogruppen zu erklären ist.

Besondere Berücksichtigung verdient die eingangs erwähnte Spaltbarkeit des Imidazolringes bei der Acylierung, die bei manchen Imidazolkörpern erfolgt, bei anderen nicht. Bei Bestimmung des Acylquotienten wird das Acylierungsprodukt gefällt und umgefällt. Die N- und S-Bestimmungen werden mit diesem Produkte ausgeführt, ohne daß man weiß, ob ein Gemenge oder eine einheitliche Substanz vorliegt. So wie der Imidazolring in manchen Imidazolderivaten bei der Acylierung gesprengt wird, können auch andere Bindungen durch Acylierung gelöst werden. Scharfe Schlüsse aus der Größe der Acylquotienten auf die Konstitution zu ziehen, wäre also bedenklich.

$\frac{\text{CO}_2}{\text{N}}$ des Kyrins.

Für die erste Bestimmung wurde Präparat der zweiten, für die zweite und dritte Bestimmung Präparat der dritten Darstellung verwendet. Die Schwefelsäure war wie früher durch Baryt entfernt.

| | | | | | |
|----|--------------------|-------------------|----------|---------|---|
| 1. | Gefunden: 0,1344 g | CaCO ₃ | 40,6 ccm | n/10-S. | $\frac{\text{CO}_2}{\text{N}} = \frac{1}{3,02}$ |
| 2. | 0,1221 | CaCO ₃ | 36,4 | n/10-S. | $\frac{\text{CO}_2}{\text{N}} = \frac{1}{2,98}$ |
| 3. | 0,1299 | CaCO ₃ | 38,2 | n/10-S. | $\frac{\text{CO}_2}{\text{N}} = \frac{1}{2,94}$ |

¹⁾ A. Kossel und E. L. Kennaway, Diese Zeitschr., Bd. 72, S. 486 (1911).

²⁾ A. Kossel u. A. T. Cameron, Diese Zeitschr., Bd. 76, S. 457 (1912).

³⁾ A. Kossel und F. Weiß, Diese Zeitschr., Bd. 78, S. 402 (1912).

Die Übereinstimmung der Größe des Quotienten mit den früher von Pilz, Siegfried, Todorowic an verschiedenen Präparaten erhaltenen spricht von neuem für die Einheitlichkeit des Kyrins.

Formol-N des Kyrins.

Indikator Thymolphthalein.

A. 1,0442 g büchsentrockenes Sulfat der zweiten Darstellung in Wasser gelöst, mit Natronlauge neutralisiert (Lackmus), auf 50 ccm aufgefüllt.

1. 10 ccm erf. nach Zusatz von 15 ccm Formolmischung 3,9 ccm $\frac{n}{s}$ -L und nach Kjeldahl 19,4 ccm $\frac{n}{s}$ -S. Formol-N = 40,4% vom Gesamt-N.

2. 10 ccm erf. nach Zusatz von 15 ccm Formolmischung 3,8 ccm $\frac{n}{s}$ -L und nach Kjeldahl 19,3 ccm $\frac{n}{s}$ -S. Formol-N = 39,4%.

B. 0,5580 g büchsentrockenes Sulfat der dritten Darstellung ebenso wie in A.

3. 10 ccm erf. 2,3 ccm $\frac{n}{s}$ und 12,0 ccm $\frac{n}{s}$. Formol-N = 38,3% vom Gesamt-N.

4. 10 ccm erf. 2,5 ccm $\frac{n}{s}$ und 12,2 ccm $\frac{n}{s}$. Formol-N = 41,7% vom Gesamt-N.

Innerhalb der Fehlergrenzen der Methode stimmen die Werte untereinander und mit den früher gefundenen überein.

van Slyke-N des Kyrins.

Die Werte nahmen bei längerer als fünf Minuten langer Einwirkung bedeutend zu; auch nach 10 Minuten hatten sie noch nicht das Maximum erreicht.

| Dauer der Einwirkung der salpetrigen Säure in Minuten | v. Slyke-N v. Ges.-N in % |
|---|------------------------------|
| 5 | 26,1 |
| 10 | 34,9 |
| 30 | 37,5 |
| 60 | 39,0. |

Diese langsame Zersetzung ist zu erklären, wenn eine Lysin-Aminogruppe frei ist, da in Lysin ebenfalls die Aminogruppen langsam reagieren. Der Endwert stimmt mit den Formolwerten überein.

Acylquotient des Kyrins.

Die β -Naphthalinsulfoverbindung wurde aus dem Präparate erster und dem dritter Darstellung gewonnen. Im ersten Falle wurden 2,5 g Kyrinsulfat 4 Stunden mit der ätherischen Lösung von 15 g β -Naphthalinsulfochlorid und im ganzen 120 ccm Normalnatronlauge nach E. Fischers Vorschrift, im zweiten Falle 1,6 g Sulfat mit 9,6 g Chlorid und im ganzen 77 ccm Normalnatronlauge auf der Maschine acyliert. Die durch Salzsäure ausgeschiedene Verbindung wurde abgesaugt, in verdünnter Natronlauge gelöst und wieder durch Salzsäure gefällt, abgesaugt, mit Wasser gewaschen über Schwefelsäure getrocknet.

Ausbeute 2,2 g bzw. 1,2 g. Die Naphthalinsulfoverbindung sintert bei 100° und schmilzt unscharf bei ungefähr 137° ; ist in Wasser, Benzol und Schwefelkohlenstoff unlöslich, in Alkohol und Chloroform löslich.

Die Schwefelbestimmungen geschahen unter Schmelzen mit Ätznatron und Salpeter.

Präparat I.

1. 0,2143 g Substanz gaben 0,1618 g BaSO_4 . S = 10,8%
2. 0,1422 „ „ erf. 8,1 ccm $\frac{2}{10}$ -S. N = 8,0%.

Präparat II.

1. 0,2536 g Substanz gaben 0,1953 g BaSO_4 . S = 10,58%
2. 0,1230 „ „ erf. 7,0 ccm $\frac{2}{10}$ -S. N = 8,0%.

$$\text{Acylquotient } \frac{\text{S}}{\text{N}} = \frac{1}{1,7}$$

Zum Zwecke der Diskussion der Acylquotienten war es erwünscht, zu wissen, ob das Arginin mit 1 oder 2 Mol. Naphthalinsulfochlorid reagiert. O. Riesser¹⁾ hatte erwartet, daß 2 Moleküle des Chlorides einwirken, hatte aber sowohl bei der inaktiven als den beiden aktiven Modifikationen Mononaphthalinsulfoderivate erhalten. Wir erhielten aus dem d-Arginin ein

¹⁾ O. Riesser, Diese Zeitschr., Bd. 49, S. 210 (1906).

Binaphthalinsulfoarginin, ebenso Herr Dr. Zimmermann in einem dritten und vierten Versuche.

Versuch I. 0,7 g d-Argininnitrat. 2,1 g β -Naphthalinsulfochlorid, im ganzen 19 ccm Normalnatronlauge. Die durch Salzsäure teils ölig ausgeschiedene Verbindung wurde in verdünnter Natronlauge gelöst, die Lösung mit Tierkohle geschüttelt. Das Binaphthalinsulfoarginin wurde durch Eingießen der alkalischen Lösung in verdünnte Salzsäure farblos ausgeschieden. Über Schwefelsäure getrocknet 0,6 g.

| | |
|--|-------------|
| I. 0,0988 g Substanz erf. nach Kjeldahl 7,1 ccm $\frac{n}{10}$ -S. | N = 10,07% |
| II. 0,2067 g gaben 0,1868 g BaSO ₄ . | S = 12,42%. |

Versuch II. 2,046 g Argininnitrat. 7,8 g β -Naphthalinsulfochlorid, im ganzen 70 ccm Normalnatronlauge. Ausbeute 1,5 g.

| | |
|---|-------------|
| III. 0,1013 g Substanz erf. nach Kjeldahl 7,44 ccm $\frac{n}{10}$ -S. | N = 10,29% |
| IV. 0,2270 g gaben 0,1979 g BaSO ₄ . | S = 11,98%. |

| | |
|---|---|
| Berechnet für C ₆ H ₁₃ N ₄ O ₂ · SO ₂ H ₇ C ₁₀ : | Für C ₆ H ₁₂ N ₄ O ₂ (SO ₂ H ₇ JO) ₂ : |
| S = 8,8% | 11,6% |
| N = 15,4% | 10,1%. |

Versuch III (Zimmermann). 1,2 g Argininmononitrat. 4,6 g β -Naphthalinsulfochlorid. 40 ccm Äther. Im ganzen 25 ccm Normalnatronlauge. Umgefällte Substanz Fp. ca. 140° nach vorherigem Sintern. Zu den Analysen war die Substanz über Schwefelsäure bis zum konstanten Gewichte getrocknet.

| | |
|---|-------------|
| I. 0,1141 g Substanz erf. 8,75 ccm $\frac{n}{10}$ -S. | N = 10,77% |
| II. 0,1979 g gaben 0,1614 g BaSO ₄ . | S = 11,20%. |

Versuch IV. 2,4 g Argininmononitrat. 9,2 g Naphthalinsulfochlorid, im ganzen 75 ccm Normalnatronlauge. Alkalische Lösung mit 500 ccm Wasser verdünnt, in verdünnte Salzsäure gefällt. Von gelblicher Ausscheidung abfiltriert. Aus dem Filtrate schied sich das schneeweiße Produkt ab. Fp. ca. 150° nach vorherigem Sintern.

| | |
|---|-------------|
| I. 0,1527 g erf. 10,95 ccm $\frac{n}{10}$ -S. | N = 10,07% |
| II. 0,2098 g gaben 0,1758 g BaSO ₄ . | S = 11,51%. |

Greifen wir auf die oben aufgestellte Diskussionsformel des β -Glukokyrins zurück, welche besagt, daß das Kyrin aus Glutaminsäure, Arginin und Lysin im Verhältnis ihrer Mole-

kulargewichte aufgebaut ist, und nehmen wir für diese Überlegungen als einfachsten Fall den an, daß das Molekül des Kyrins aus 1 Molekül Arginin, Lysin und Glutaminsäure zusammengesetzt ist. Die Spaltungsprodukte Arginin + Lysin + Glutaminsäure haben, wie bekannt ist, 1 + 2 + 1 Amino-
gruppen, die sowohl gegen Kohlensäure, als gegen Formol, als van Slyke-Salpetrige Säure reagieren, also von 7 N-Atomen 4. Wenn die Reaktionsverhältnisse der gebundenen Komplexe dieselben sind wie die der freien, so sind zwei Möglichkeiten in Betracht zu ziehen: Entweder sind im Kyrin zwei reaktionsfähige Stickstoffgruppen weniger vorhanden als in der Summe der freien Aminosäuren oder eine. Im ersteren Falle würden also von 7 Stickstoffgruppen im Kyrin zwei reaktionsfähig sein, im zweiten Falle drei. Unter der Voraussetzung, daß nur diese Gruppen gegen Kohlensäure, Formol und salpetrige Säure nach van Slyke reagieren, würde sich ergeben für

| | $\frac{\text{CO}_2}{\text{N}}$ | Formol-N und v. Slyke-N |
|---|--------------------------------|----------------------------|
| Fall I: 2 reaktionsfähige N-Gruppen von 7 | $\frac{1}{3,5}$ | 28,6% |
| II: 3 „ „ „ 7 | $\frac{1}{2,33}$ | 42,8% |

Die gefundenen Werte für den Carbaminoquotienten 1 : 2,95 liegen also gerade in der Mitte beider Fälle, während die für Formol- und van Slyke-N gefundenen sehr nahe den für Fall II berechneten kommen und von den für Fall I berechneten stark abweichen.

Berechnet man die gefundenen Werte für Carbamino-, Formol- und van Slyke-Stickstoff auf Atome Stickstoff und bezieht das Verhältnis auf 7 Atome Stickstoff des Kyrins, so findet man, daß 2,37 gegen Kohlensäure und 2,8 gegen Formol und salpetrige Säure reaktionsfähige Gruppen auf diese 7 Atome Gesamtstickstoff kommen. Da die Peptidgruppen bis zu einem gewissen Grade Kohlensäure binden, würde, wenn zwei Peptidbindungen vorhanden sind, der Carbaminoquotient besagen, daß 2 gegen Kohlensäure reaktionsfähige NH_2 -Gruppen vorhanden sind, die Formol- und van Slyke-Werte, daß die An-

zahl der reaktionsfähigen Gruppen beinahe 3 beträgt. Es besteht hier zweifelsohne ein Widerspruch zwischen dem Verhalten gegen Kohlensäure einerseits und gegen Formol und salpetrige Säure andererseits, wenn wir die an den Aminosäuren, die bei der Totalhydrolyse des Kyrins entstehen, gemachten Erfahrungen zugrunde legen. Man sieht also, daß Schlüsse auf die Konstitution aus den angeführten Konstanten nur in sehr beschränktem Maße zu ziehen sind. Aber als Konstanten sind diese Werte ebenso wie der Acylquotient von großer Bedeutung.

Der Acylquotient ist, wie oben erörtert, nicht mit den Carbamino-, Formol- und van Slyke-Werten zu vergleichen. Die gefundene Zahl 1 : 1,7 besagt, daß von 7 Stickstoffatomen 4,1 gegen Säurechlorid reagieren. Also ungefähr eine Gruppe mehr als gegen Formol.

Die spätere Forschung wird zeigen müssen, ob die Annahme, daß diese weitere Gruppe eine freie Guanidin-Amidogruppe des Arginins ist, berechtigt ist.

Ausgehend von der oben aufgestellten Diskussionsformel des Kyrins würde die Summe der Spaltungsprodukte des Kyrins, 1 Mol. Arginin, 1 Mol. Lysin, 1 Mol. Glutaminsäure, 7 Stickstoffatome enthalten und von diesen würden 4 gegen Kohlensäure, Formol und salpetrige Säure reagieren. Der Carbaminoquotient würde also $\frac{4}{7} = \frac{1}{1,75}$ sein, der Formol- und van Slyke-Stickstoff 55,5%, der Acylquotient $\frac{5}{7} = \frac{1}{1,4}$ betragen.

Tatsächlich wurden, wie die folgenden Versuche zeigen, die entsprechenden Werte für die Summe der Spaltungsprodukte gefunden; hier bei den Spaltungsprodukten gehen die Werte für Formol- und van Slyke-Stickstoff den für Carbaminostickstoff parallel, im Gegensatz zu den für die Aminosäuren im verketteten Zustande gefundenen. Die Übereinstimmung der Werte der Konstanten der Summe der Spaltungsprodukte mit den nach der Diskussionsformel berechneten ist eine erhebliche Stütze der letzteren.

In den folgenden Versuchen wurde das Glutokyrin- β -sulfat der dritten Darstellung 12 Stunden mit 30%iger Schwefelsäure gekocht, die Schwefelsäure durch Barythydrat entfernt.

Formolstickstoff.

Von einer mit Schwefelsäure neutralisierten (Lackmus) Lösung der Spaltungsprodukte verbrauchten je 10 ccm nach Zusatz der Formolmischung 9,1 und 9,3 ccm $n/5$ -Natronlauge (Thymolphthalein) und nach Kjeldahl 31,9 und 32,2 ccm $n/10$ -Säure. Formol-N = 57,0 bzw. 57,8% vom Gesamt-N.

Carbaminquotient.

Die Reaktion wurde in genügender Verdünnung ausgeführt, sodaß das Calciumsalz der Lysindicarbonsäure vollständig im Filtrate blieb.

- | | |
|---|---|
| 1. Gef. 0,2066 g CaCO_3 , verbr. 37,4 ccm $n/10$ -Säure. | $\frac{\text{CO}_2}{\text{N}} = \frac{1}{1,81}$ |
| 2. „ 0,2732 „ CaCO_3 „ 50,0 „ $n/10$ „ | $\frac{\text{CO}_2}{\text{N}} = \frac{1}{1,83}$ |

van Slyke-Stickstoff.

| | | | |
|-------------|----------|---------|-------------------------------------|
| Nach 5 Min. | 10 Min. | 30 Min. | 60 Min. |
| 36,0; 36,6 | 48,5; 49 | 56; 57 | 56,9; 58,4% v. Slyke-N v. Gesamt-N. |

Acylquotient.

2,5 g des Sulfates wurden mit 25 ccm 30%iger Salzsäure 10 Stunden gekocht. Das Gemenge der Spaltungsprodukte wurde mit 12 g β -Naphthalinsulfochlorid und insgesamt 96 ccm Normalnatronlauge acyliert. Der Schmelzpunkt des über Schwefelsäure getrockneten Produktes lag bei ca. 92°.

- | | | | |
|--|----------------------|--|--|
| 1. 0,3690 g Subst. gaben 0,3360 BaSO_4 . | $\text{S} = 12,51\%$ | | $\frac{\text{S}}{\text{N}} = \frac{1}{1,42}$ |
| 2. 0,2418 „ „ erf. n. Kjeldahl 13,4 ccm $n/10$ -S. | $\text{N} = 7,76\%$ | | |

Einwirkung von Silberbaryt auf Glutokyrin- β -sulfat.

Für die Tatsache, daß durch Behandeln mit Silberbaryt nach Kossel das Kyrin in 2 Fraktionen, eine in der Silberbarytfällung und eine im Filtrate desselben enthalten, geschieden

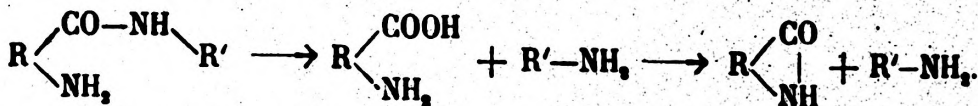
wird, gibt es 2 Erklärungen: Entweder ist das Kyrin kein einheitlicher Körper, sondern ein Gemenge und wird durch Silberbaryt nur in 2 Fraktionen getrennt, oder das Kyrin wird durch Silberbaryt gespalten. Nach den verschiedenen Gründen, die bisher für die Einheitlichkeit des Glutokyrin- β -sulfates sprechen, ist die erstere Erklärung sehr unwahrscheinlich. Es war zu erwarten, daß sich die Frage, ob eine Spaltung oder nur eine Trennung eintritt, durch Bestimmung der Konstanten in dem mit Silberbaryt behandelten Gemische, wenn die Fraktionen nicht durch Filtration getrennt werden, entscheiden läßt. Denn es ist anzunehmen, daß, wenn eine Spaltung eintritt, die Summe der Spaltungsprodukte nicht dieselben Werte für die Konstanten liefert, wie das Kyrin.

Versuch I. 2 g Glutokyrin- β -sulfat wurden nach der Vorschrift Kossels mit Silbersulfat und Barythydrat behandelt, die Mischung, ohne zu filtrieren, 3 Stunden stehen gelassen, mit Schwefelsäure angesäuert, mit Schwefelwasserstoff gesättigt, Luft durchgeleitet bis zur Entfernung des Schwefelwasserstoffes, abgesaugt, Filtrat mit Barythydrat von der Schwefelsäure befreit, der geringe Überschuß des letzteren durch Ammoncarbonat, das Filtrat der Baryumcarbonatfällung bis zur völligen Freiheit von Ammoniak wiederholt mit Wasser eingedampft.

Die Lösung des Rückstandes gab bei zwei Formoltitrierungen 41,3% und 39,2% Formolstickstoff vom Gesamtstickstoff. Die ungefähr gleichen Werte waren früher sowohl von Todorowic als von Siegfried bei den entsprechenden Versuchen mit anderen Präparaten erhalten worden. Dieser Wert stimmt aber mit dem Wert für Formolstickstoff des ungespaltenen Kyrins überein. Wenn also eine Spaltung durch Silberbaryt erfolgt ist, ist sie so verlaufen, daß die Menge des mit Formol titrierbaren Stickstoffes sich nicht geändert hat. Dies schließt keineswegs die Möglichkeit, daß hierbei eine Peptidbindung gelöst worden ist, aus, wie früher von dem einen von uns geschlossen worden ist.¹⁾ Denn es kann nach der Lösung der Peptidbindung eine Anhydrisierung eines Spaltungsproduktes erfolgt sein, eine Möglichkeit, mit der

¹⁾ M. Siegfried, Diese Zeitschr., Bd. 84, S. 288 (1913).

um so mehr zu rechnen ist, als nach E. Fischer und E. Abderhalden bei der allmählichen Hydrolyse Peptidanhidride, Diketopiperazine, direkt entstehen.



Im van Slyke-Stickstoff zeigt sich schon ein Unterschied zwischen dem Kyrin und dem mit Silberbaryt behandelten Kyrin.

Mittelwerte für v. Slyke-Stickstoff von je 2 Bestimmungen.

| | Nach 5 Min. | 10 Min. | 30 Min. | 60 Min. |
|---|-------------|---------|---------|---------|
| Für Kyrin, ungespalten | 26,1 | 34,9 | 37,5 | 39,0 |
| Für Kyrin nach Behandlung mit Silberbaryt | 36,0 | 40,0 | 50,1 | 55,9. |

Unzweideutig zeigt der Carbaminoquotient, daß das Kyrin durch Silberbaryt eine Spaltung erfährt. Schon früher ist mitgeteilt worden, daß der Carbaminoquotient des mit Silberbaryt behandelten Kyrins ein ganz anderer ist als des nicht mit Silber behandelten Kyrins. Für letzteres ist er an vielen Präparaten von vier Untersuchern übereinstimmend 1 : 2,9 bis 1 : 3 gefunden worden.

Hingegen hatte Todorowic für das mit Silberbaryt behandelte Kyrin die Werte ermittelt: 1 : 5,6; 1 : 5,68; 1 : 5,51; 1 : 5,58; 1 : 5,78; 1 : 5,32; 1 : 5,14; 1 : 5,43.

Wir fanden bei dem Präparate unserer ersten Darstellung 1 : 5,42; 1 : 5,50; 1 : 5,73; 1 : 5,41.

Man hätte erwarten sollen, daß der Quotient $\text{CO}_2 : \text{N}$ größer würde bei einer Spaltung des Kyrins, wenigstens wenn Peptidbindungen gelöst werden. Nun ist er aber beinahe halb so groß geworden.

Hierfür ist schon früher die Erklärung gegeben worden. Bei der Spaltung des Kyrins durch Silberbaryt entstehen mehrere Körper, von denen einer oder eine Fraktion einen sehr kleinen Quotienten, noch kleineren als das Arginin besitzt, und ein anderer oder eine andere Fraktion, die einen relativ großen Carbaminoquotienten hat. Diese letztere Fraktion bildet schwer lösliche Calciumsalze der Carbaminoverbindung, infolgedessen bleibt sie bei der Bestimmung des Quotienten im basischen Niederschlag und kommt für die Größe des Quotienten, da dieser lediglich aus dem Filtrate des Calciumniederschlags er-

halten wird, nicht zur Geltung. Es wird also durch die Einwirkung auf das Kyrin dessen eine Konstante, der Carbaminoquotient, enorm verändert. Ganz regelmäßig erhält man nach der Behandlung mit Silberbaryt einen beinahe doppelt so hohen Wert für diese Konstante. Dies ist ein untrüglicher, schlagender Beweis für die Tatsache, daß durch Silberbaryteinwirkung das Kyrin unter Sprengung irgendwelcher Bindungen gespalten wird und nicht in Komponenten, aus deren Mischung es bestanden hatte, getrennt wird.

Es sollte festgestellt werden, ob diese Spaltung nur durch Silbersalz und Barythydrat vereint, oder etwa auch schon durch Barythydrat allein bewirkt werde. Deshalb wurde in zwei Parallelversuchen die wässrige Lösung von Kyrinsulfat mit Barythydrat bei gewöhnlicher Temperatur durch Schütteln gesättigt, nach dreistündigem Stehen das Baryum durch Kohlensäure und Ammoncarbonat entfernt. Der ammoniakfreie Rückstand, der nun nach Eindampfen der Lösung gewonnen war, wurde carbaminisiert.

$$1. \text{ Gef. } 0,1756 \text{ g CaCO}_3 \text{ verbr. } 50,7 \text{ ccm } n_{10}\text{-S. } \frac{\text{CO}_2}{\text{N}} = \frac{1}{2,89}$$

$$2. \text{ „ } 0,1470 \text{ „ CaCO}_3 \text{ „ } 41,6 \text{ „ } n_{10}\text{-S. } \frac{\text{CO}_2}{\text{N}} = \frac{1}{2,83}$$

Man sieht, der Quotient hat sich nicht geändert; durch Barythydrat bei gewöhnlicher Temperatur wird das Kyrin also nicht gespalten.

Niederschlagssulfat und Filtratsulfat.

Das Kyrin wird durch Silberbaryt in zwei Fraktionen gespalten, von denen die eine aus dem Niederschlage, die andere aus dem Filtrate der Silberbarytfällung gewonnen wird. Durch quantitative Bestimmungen des im Niederschlage und im Filtrate enthaltenen Stickstoffes wurde gefunden, daß zwei Drittel des Gesamtstickstoffes im Niederschlage sich befinden. Die Ausbeuten an Filtratsulfat sind gering, weil dieses in Alkohol verhältnismäßig leicht löslich ist. Die Totalhydrolyse lieferte die Hauptmenge des Arginins aus dem Niederschlagssulfat, die

Hauptmenge des Lysins und der Glutaminsäure aus dem Filtratsulfate. Die Werte der Konstanten zeigten, daß, wenn überhaupt, freie Aminosäuren sich höchstens in ganz geringen Mengen sowohl im Niederschlagssulfate als im Filtratsulfate vorfinden. Insbesondere ließ sich einwurfsfrei nachweisen, daß die Glutaminsäure in gebundenem Zustande und nicht frei vorkommt, daß diese Aminosäure also durch Silberbaryt nicht abgespalten wird.

Bei der weiteren Untersuchung des Filtratsulfates ist es gelungen, durch die Carbaminoreaktion aus diesem einen krystallinen Körper abzuscheiden, über den später berichtet werden soll.
