

Ueber das Antipepton (Mittheilung I).

Von
Fr. Kutscher.

(Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 10. April 1898.)

Nach den Arbeiten Kühne's und seiner Schüler soll sich bekanntlich die Spaltung der meisten Eiweisskörper durch das Trypsin nach folgendem Schema vollziehen: ¹⁾

Natives Eiweiss

Deuteroalbumose

Amphopepton

Antipepton Leucin, Tyrosin, Asparaginsäure, Tryptophan etc.

Die Isolirung der Endprodukte der Trypsinverdauung, also des Antipeptons einerseits, des Leucins und Tyrosins andererseits, geschieht nach Kühne der Hauptsache nach in folgender Weise: Eine durch intensive Trypsinverdauung von Eiweiss gewonnene Lösung wird durch Filtration von den ungelösten, durch Aufkochen bei essigsaurer Reaction und Filtration von den coagulablen Theilen getrennt. Das Filtrat wird stark eingeeengt zur Krystallisation aufgestellt. Dabei scheiden sich die Hauptmassen des Leucins und Tyrosins aus. Weitere Abscheidungen der beiden Körper werden dann noch durch passende Alkoholbehandlung erzielt. Die vom Tyrosin und Leucin abgeschiedene Masse wird darauf mit Ammonsulfat ausgesalzen und von den ausgesalzenen

¹⁾ Neumeister, Lehrbuch der physiol. Chemie. Aufl. II. Theil I. S. 247.

Albumosen durch Filtration getrennt. Der durch Ammonsulfat nicht aussalzbare Rest wird vom Ammonsulfat befreit, durch Alkohol gefällt und dieser Niederschlag als *Antipepton* bezeichnet. Eine Reinigung des *Antipeptons* suchte Kühne durch Auskochen mit Alkohol und schliesslich durch Fällung desselben mit Phosphorwolframsäure zu erreichen. Eine scharfe Definition dessen, was er unter *Antipepton* versteht, gibt Kühne nicht. Mit Wahrscheinlichkeit geht aus einzelnen Andeutungen Kühne's¹⁾ hervor, dass er selbst das *Antipepton* als ein Gemenge auffasst, aus dem er mit Hilfe von Trichloressigsäure einen besonderen Körper gewinnen konnte. Trotzdem wird das *Antipepton* in der Litteratur gewöhnlich als ein chemisches Individuum aufgeführt und man findet sogar viele Analysen dieses Körpers vor.

Die Isolirung anderer Spaltungsprodukte als *Antipepton*, Leucin und Tyrosin ist in der Methode Kühne's nicht vorgesehen.

Von den bisher bekannten Produkten der Trypsinverdauung, welche Kühne nicht erwähnt, kommen Asparaginsäure, Ammoniak und Tryptophan wohl kaum als Bestandtheile des *«Antipeptons»* in Betracht, da die Erstere mit den Krystallisationen des Leucins und Tyrosins, die Letzteren auf andere Weise fortgeschafft werden. Wohl aber muss das bei der Trypsinverdauung der Eiweisskörper entstehende Lysin, welches von Hedin²⁾ zuerst aus den Produkten der Pankreasverdauung isolirt worden ist, in den Alkoholniederschlag eingehen. Denn das Lysin ist ein in Wasser leicht löslicher Körper, der durch Ammonsulfat nicht aussalzbar, durch Alkohol aber und Phosphorwolframsäure fällbar ist. Alle von Kühne für das *Antipepton* angewandten Reinigungsmethoden werden demnach am Lysin versagen. Man muss also das Lysin in der *Antipeptonportion* erwarten. Ferner lassen sich mit höchster Wahrscheinlichkeit in der *Antipeptonportion* auch das Arginin und Histidin vermuthen, die wir

¹⁾ Siehe Zeitschr. f. Biologie. Bd. 28. J. 1891, S. 571 und Bd. 29. J. 1892, S. 320.

²⁾ du Bois-Reymond's Archiv für Physiologie. 1891, S. 273.

durch Hedin's ¹⁾ und Kossel's ²⁾ Arbeiten als fast ständige Begleiter des Lysins kennen gelernt haben. Die Lösungs- und Fällungsverhältnisse des Arginins und Histidins sind, so weit sie hier in Betracht kommen, vollkommen identisch mit denen des Lysins resp. Antipeptons.

Die nachstehenden Untersuchungen haben meine Schlussfolgerungen vollkommen bestätigt.

Zur Gewinnung des Ausgangsmaterials des Antipeptons verfuhr ich in der Weise, dass ich am 22. Februar 1898 500 gr. frisches, gut gewaschenes und abgepresstes Fibrin in einem Kolben mit 2 Liter Sodalösung von 0,25% aufschwemmte, einen Liter Pankreasinfus (nach Kühne und Chittenden ³⁾ aus 100 gr. Trockenpankreas dargestellt) zufügte und reichlich Chloroform und Thymol beigab. Den so beschickten, wohl verschlossenen Kolben hielt ich bis zum 6. März 1898 im Brutschrank bei 40° C. Am genannten Tage brach ich die Verdauung ab. Bei der Darstellung des Antipeptons aus obigem Verdauungsgemisch hielt ich mich auf das Genaueste an die von Kühne ⁴⁾ für die Gewinnung des Antipeptons gegebenen Vorschriften. Nur das Trocknen nahm ich anders vor als Kühne. Um eine Zersetzung des freien Antipeptons zu vermeiden, ⁵⁾ dampfte ich dasselbe auf dem Wasserbade bloss zum dünnen Syrup ein und fügte darauf so viel 96%igen Alkohol hinzu, bis sich das Antipepton als Oel abzuscheiden begann. Die ganze Masse goss ich unter stetem Umrühren langsam in viel absoluten Alkohol. In dieser Weise behandelt, fiel das Antipepton in leicht gelbgefärbten Flocken aus. Das gefällte Antipepton saugte ich ab und wusch es mit absolutem Alkohol, darnach mit Aether. Von der Nutsche brachte ich es schnell in den Exsiccator. Hier zerfiel es in ein staubfeines, gelbliches,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 155 und Bd. XXII, S. 191.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 176 und Sitzungsber. der Ges. z. Bef. der ges. Naturw. zu Marburg, Juli 1897.

³⁾ Zeitschr. f. Biologie, 1886, Bd. 22, S. 435.

⁴⁾ Kühne, Zeitschr. f. Biologie, 1886, Bd. 22, S. 434 ff. und Bd. 29, S. 2 ff.

⁵⁾ Kühne, Zeitschr. f. Biologie, 1886, Bd. 22, S. 437.

äusserst hygroskopisches Pulver.¹⁾ Die Ausbeute betrug circa 60 gr.

Das so dargestellte Präparat wurde zu folgenden Versuchen benutzt. Ich löste circa 50 gr. in einem Liter Wasser, säuerte dasselbe mit 40 ccm. concentrirter Schwefelsäure an und fällte in der Kälte mit Phosphorwolframsäure, so lange ein Niederschlag entstand. Den voluminösen körnigen Niederschlag saugte ich ab, wusch ihn zuerst mit 4^o iger Schwefelsäure, darnach mit Wasser aus. Darauf nahm ich ihn vom Filter, schwemmte ihn im Kochtopf mit 4 Liter Wasser auf und erhitze zum Sieden. Hierbei löste sich der Niederschlag schon nach kurzer Zeit bis auf einen geringen, dunkel gefärbten Rest. Ich filtrirte jetzt die siedend heisse Flüssigkeit in einen grossen Kolben, wo bis zum nächsten Tage der in Lösung gegangene Theil der Phosphorwolframsäurefällung sich in gut ausgebildeten mikroskopischen Nadeln niederschlug. Die unkrystallisirte Phosphorwolframverbindung saugte ich wiederum ab, schwemmte sie in einer Porzellanschale mit 2 Liter Wasser auf, erhitze sie auf 50^o C. und zersetzte sie durch Baryt unter Vermeidung eines grösseren Ueberschusses. Ich filtrirte nun, schlug im Filtrat durch Kohlensäure den freien Baryt nieder, kochte auf, filtrirte nochmals. Das alkalisch reagirende Filtrat, welches sehr schöne Biuretreaction gab, musste das Antipepton an Baryt gebunden rein enthalten.

Die weitere Untersuchung führte zu dem Resultate, dass das reine «Baryt-Antipepton» bedeutende Mengen von Hexonbasen enthielt. Der Nachweis wurde im Wesentlichen nach der in der vorgehenden Abhandlung Kossel's beschriebenen Methode geführt.

Ich dampfte zu diesem Zweck die Lösung meines «Baryt-Antipeptons» auf ein Volumen von 500 ccm. ein und fällte es durch concentrirte überschüssige Quecksilberchloridlösung.

A. Quecksilberchloridniederschlag. Die reichliche Fällung filtrirte ich ab, wusch aus und zersetzte die in Wasser aufgeschwemmte Quecksilberverbindung in der Kälte

1) Siehe Balke, Diese Zeitschrift. Bd. XXII. S. 250.

mit Schwefelwasserstoff. Das gebildete Schwefelquecksilber entfernte ich durch Filtration, den Schwefelwasserstoff durch mässiges Erwärmen auf dem Wasserbade. Die so erhaltene Flüssigkeit gab nur spurenhafte Biuretreaction. Zur weiteren Reinigung entfernte ich aus der Flüssigkeit das Chlor durch Silbernitrat, filtrirte das gebildete Chlorsilber ab und fällte durch abwechselnden vorsichtigen Zusatz von Silbernitrat und Ammoniak, so lange ein Niederschlag entstand.¹⁾ Den voluminösen Niederschlag filtrirte ich ab, wusch ihn sorgfältig aus und zersetzte ihn durch Salzsäure. Das Filtrat vom gebildeten Chlorsilber bräunte sich beim Concentriren auf ein kleines Volumen stark. Ich entfärbte es daher mit Thierkohle und dampfte zum dünnen Syrup ein. Derselbe erstarrte nach einigen Tagen zu einer Krystallmasse. Ich saugte die Krystalle von der Mutterlauge ab und krystallisirte mehrmals aus salzsäurehaltigem Wasser um. Die scheinbar tadellos ausgebildeten Krystalle zeigten jedoch schwankenden Chlorgehalt, ein Zeichen, dass ich noch nicht eine reine Substanz in Händen hatte. Bei meiner letzten Analyse erhielt ich 30,31% Cl. Dieser gefundene Chlorwerth näherte sich dem für ein Histidindichlorid²⁾ der Formel $C_6H_9N_3O_2 \cdot 2 HCl$ berechneten von 31,19% Chlor. Um den endgültigen Nachweis zu führen, dass das isolirte Chlorsalz eine Histidinverbindung sei, führte ich den Rest desselben wieder in das amorphe Silbersalz über und analysirte dasselbe.

Es gaben 0,1264 gr. Substanz 0,0940 gr. $AgCl = 55,98\%$ Ag. 0,1225 gr. lieferten verbrannt 0,0819 $CO_2 = 18,24\%$ C und 0,0234 $H_2O = 2,14\%$ H.

Für $Ag_2C_6H_9N_3O_2 + H_2O$

berechnet	gefunden
Ag = 55,81%	Ag = 55,98%
C = 18,60%	C = 18,24%
H = 2,33%	H = 2,14%

1) Hedin, Diese Zeitschrift. Bd. XXII, S. 191.

2) Es ist mir übrigens gelungen, aus den Zersetzungsprodukten der Gelatine ein Histidindichlorid obiger Formel darzustellen. Dabei zeigte sich, dass sich in das Histidindichlorid ähnlich wie in das Lysin-dichlorid nur schwierig die nöthige Menge Salzsäure einführen liess.

Demnach hat sich das Histidin mit Sicherheit im Anti-pepton nachweisen lassen.

Das Filtrat von der Quecksilberfällung befreite ich durch Schwefelwasserstoff vom überschüssigen Quecksilber, filtrirte es vom Schwefelquecksilber, entfernte den Schwefelwasserstoff durch mässiges Erwärmen, das Chlor durch Silbernitrat.

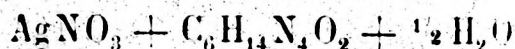
B. Silberniederschlag. Der vom Chlorsilber abfiltrirten Flüssigkeit setzte ich darauf so lange Silbernitrat in Substanz zu, bis eine Probe in gesättigtem Barytwasser nicht mehr eine rein weisse, sondern leicht bräunliche Fällung hervorrief. Jetzt sättigte ich die ganze Flüssigkeit in der Kälte mit Baryt, filtrirte den entstehenden bräunlichen Niederschlag ab und wusch denselben sehr gut aus. Die in Wasser vertheilte Silberverbindung zersetzte ich mit Schwefelwasserstoff. Vom abgetrennten Schwefelsilber filtrirte ich ab, verjagte den Schwefelwasserstoff aus dem Filtrat, fällte geringe Mengen beigemischten Baryts durch einige Tropfen verdünnter Schwefelsäure, neutralisirte die stark alkalisch reagirende Flüssigkeit durch Salpetersäure und dampfte zum Syrup ein. Bereits nach 24 Stunden war derselbe bis auf den letzten Tropfen krystallisirt. Da hier eine Mutterlauge nicht zu erhalten war, eine Probe jedoch noch schwache Biuretreaction gab, so führte ich das salpetersaure Salz nach dem Verfahren von Hedin¹⁾ in das basische Silbersalz über. Die Analyse des Silbersalzes ergab:

Es wurden verbrannt 0,2303 gr. Substanz. Dieselben lieferten 0,1729 gr. $\text{CO}_2 = 20,48\%$ C und 0,0916 gr. $\text{H}_2\text{O} = 4,45\%$ H.

Weiter gaben 0,188 gr. Silbersalz 0,0765 gr. $\text{AgCl} = 30,63\%$ Ag

Demnach gefunden

Berechnet für



C = 20,48%

C = 20,40%

H = 4,45%

H = 4,25%

Ag = 30,63%

Ag = 30,59%

C. Das Filtrat von der Silberfällung befreite ich durch Kohlensäure vom überschüssigen Baryt und dampfte zum Syrup ein. An Volumen übertraf dieser von mir noch nicht aufgelöste Rest, welcher die Hauptmasse des Biuret gebenden

¹⁾ Hedin, Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 155.

Körpers enthielt, nicht die durch die Quecksilber- und Silberfällung gewonnenen Mengen des Histidins, der noch nicht krystallisirten Mutterlauge des Histidins und des Arginins. Es hatte sich demnach das gereinigte Antipepton in Histidin, Arginin, eine bisher nicht krystallisirte Mutterlauge und einen von mir nicht untersuchten Rest zerlegen lassen. Dieser Rest muss jedoch — es lässt sich dies mit Bestimmtheit voraussagen — das von Hedin bei der Pankreasverdauung gefundene Lysin enthalten, das durch die zur Isolirung des Histidins und Arginins angewandten Reagentien gewöhnlich nicht gefällt wird.

Die Ergebnisse meiner Arbeit, kurz zusammengefasst, sind demnach:

1. Bei der Trypsinverdauung des Fibrins entsteht an organischen Basen neben dem Lysin auch etwas Histidin und Arginin in reichlicher Menge.
2. Die Basen müssen ihren Lösungs- und Fällungsverhältnissen nach in die Antipeptonportion übergehen.
3. Das Verfahren Kühne's zur Gewinnung des Rohmaterials von «Fibrinantipepton» liefert ein Gemenge heterogener Körper, unter denen die Hexonbasen in bedeutender Menge vorhanden sind. Eine noch grössere Anreicherung an diesen Basen wird erzielt, wenn man das rohe «Antipepton» nach Kühne's Vorschrift mit Hilfe der Phosphorwolframsäure zu reinigen versucht.