

Ueber das Antipepton.¹⁾
(Mittheilung III.)

Von
Fr. Kutscher.

(Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 28. Juni 1899.)

In meiner zweiten Abhandlung über das « Antipepton » habe ich mich eingehender mit dem Antipepton beschäftigt, das sich nach der Methode Balke's²⁾ darstellen lässt, und nachgewiesen, dass es aus einem Gemenge bestehen muss, welches sich durch Phosphorwolframsäure in zwei Haupttheile zerlegen lässt, einen durch Phosphorwolframsäure fällbaren basenreichen und einen durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren, der die den Basen correspondirenden Säuren zu enthalten scheint.

Bei der Auflösung des basenreichen Theiles des Balke'schen Antipeptons musste ich nach Gewinnung von Histidin und Arginin Halt machen, da die damals bekannten Methoden für die Isolirung des Lysins versagten. Inzwischen war von Kossel³⁾ ein Verfahren ausgearbeitet, das gestattet, das Lysin in Form seines schwer löslichen Pikrates darzustellen. Nach dem Bekanntwerden dieser Methode nahm ich meine Versuche zur Isolirung des Lysins aus dem Antipepton Balke's wieder auf. Ich entfernte deshalb aus der silberhaltigen Flüssigkeit, die das Lysin enthalten musste, das Silber in der Kälte durch Salzsäure und die letzten Theile des Baryts durch Schwefelsäure, filtrirte vom entstandenen Nie-

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 110.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 248.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 586.

derschlag ab und fällte das Filtrat von Neuem mit Phosphorwolframsäure. Die voluminöse Fällung wurde abgesaugt, sorgfältig mit kaltem Wasser gewaschen und zweimal aus siedendem Wasser umkrystallisirt. Nach der zweiten Umkrystallisation fiel die Phosphorwolframverbindung in schön makroskopisch erkennbaren Nadeln aus. Diese letzte Fällung wurde von mir verarbeitet. Ich saugte sie ab, wusch sie noch etwas mit Wasser aus, schwemmte sie in Wasser auf, erwärmte auf 50°C. und zersetzte sie vorsichtig mit Baryt unter Vermeidung eines grösseren Ueberschusses. Von den entstandenen unlöslichen Barytverbindungen wurde abfiltrirt, aus dem Filtrat mit Kohlensäure der überschüssige Baryt entfernt und dasselbe zum dünnen Syrup concentrirt. Aus demselben liess sich nach der Methode Kossel's ohne Schwierigkeit ein Pikrat darstellen, das bei der Analyse nachstehende Zahlen lieferte:

Es gaben bei der Verbrennung 0,2065 g Substanz 0,290 g Kohlensäure und 0,0852 Wasser.

Für $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot C_6H_3N_3O_7$

Berechnet:	Gefunden:
C = 38,40%	C = 38,31%
H = 4,53%	H = 4,62%

Die Ausbeute an analysenreiner Substanz betrug 25,3 g entsprechend 9,85 g freiem Lysin.

Ferner versuchte ich den sauren Antheil des Balke'schen Antipeptons weiter aufzulösen. Aus demselben hatte ich ca. 8 g eines Säuregemisches isolirt, aus dem sich durch Krystallisation 2,33 g einer annähernd reinen Asparaginsäure gewinnen liess. Die Reste der in den Mutterlaugen enthaltenen Asparaginsäure schied ich dadurch aus, dass ich dieselben mit kohlensaurem Kupfer erhitzte, filtrirte und stark concentrirte. Es krystallisirte nun das charakteristische Kupfersalz der Asparaginsäure. Die stark kupferhaltige Mutterlauge des asparaginsauren Kupfers dagegen setzte freiwillig keine Krystallisation mehr ab, sondern dicker zum Syrup ein. Denselben nahm ich daher wieder mit Wasser auf und fällte ihn nach den Angaben von Hlasiwetz und Habermann¹⁾ mit Bleiessig unter Vermeidung eines Ueber-

1) Liebig's Annalen, Bd. 169, S. 150.

schusses. Die reichliche Bleifällung wurde abfiltrirt und das noch tiefblaue Filtrat vom Blei und Kupfer durch Schwefelwasserstoff befreit. Nach Entfernung der Metallsulfide schied die stark concentrirte Flüssigkeit eine geringe Menge harter glänzender Krystalle ab. Dieselben liessen sich ohne Schwierigkeit in die charakteristische salzsaure Verbindung der Glutaminsäure überführen. Die Ausbeute betrug ca. 0.130 g.

Davon gaben 0.122 g. 0.0965 g AgCl.

Für $C_5H_9NO_4 \cdot HCl$

Berechnet:

Cl = 19.34%

Gefunden:

Cl = 19.56%

Der Schmelzpunkt der Substanz lag bei 195°C (uncorrig.). Für salzsaure Glutaminsäure wird der Schmelzpunkt zu 193°C angegeben.

Die durch Schwefelwasserstoff zersetzte Bleifällung gab einen Syrup, der nach Zusatz von Salzsäure gleichfalls Krystalle abschied. Leider ging mir durch einen Unfall dieser Theil verloren.

Als einen weiteren krystallinischen Körper, den ich aus dem Antipepton Balke's darzustellen vermochte, habe ich in meiner zweiten Mittheilung¹⁾ über das Antipepton das neutrale Nitrat einer bisher unbekanntem Base angeführt. Ueber diese Verbindung kann ich zur Zeit nähere Aufklärungen geben. Sie stellt die neutrale Salpetersäureverbindung eines bisher unbekanntem, nämlich eines optisch inactiven Arginins dar.

Das Salz krystallisirt im Gegensatz zum rechtsdrehenden wasserfrei in kleinen, glänzenden, klaren, vierseitigen Säulen oder Tafeln, die häufig zu kleinen Drusen vereinigt sind. Seine wässrige Lösung reagirt vollkommen neutral.

Von der analysenreinen Verbindung lösen sich bei 20°C. 0.116 g in 2 cem. Wasser, also in 100 Theilen Wasser nur 5,8 Theile, während von dem bisher bekannten rechtsdrehenden Argininnitrat 100 Theile²⁾ Wasser 50 Theile bei einer Temperatur von 16°C. zu lösen vermögen.

Wie die Löslichkeit, so weicht auch der Schmelzpunkt

1) S. Hedin, Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 114.

2) S. G. Hedin, Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 156.

des inactiven Argininnitrates von dem des rechtsdrehenden wesentlich ab. Das inactive Argininnitrat sintert erst bei 206°C., ist vollkommen geschmolzen bei 211°C. und zersetzt sich gleichzeitig bei dieser Temperatur unter Blasenbildung, während das rechtsdrehende Argininnitrat nach Gulewitsch¹⁾ schon bei 175°C. unter Zersetzung zusammensintert.

Die eigenartige Isolirung und die eben geschilderten stark abweichenden physikalischen Verhältnisse des inactiven Argininnitrates hatten mich veranlasst, in demselben das salpetersaure Salz einer gänzlich unbekanntem Base zu vermuthen, bis die erst später von mir ausgeführten Analysen die unerwartete Aufklärung gaben.

Analytische Belege.

0,177 g der lufttrockenen Substanz verloren bei 120°C. nur 0,4 mg an Gewicht. Die vorher über Schwefelsäure getrockneten, zur Verbrennung bestimmten Substanzmengen dagegen verloren bei 120°C. nichts an Gewicht. Das inactive Argininnitrat krystallisirt also ohne Krystallwasser.

Eine Lösung von 1,781% beeinflusste im 6 d-Rohr das polarisirte Licht nicht. (S. die entsprechenden Versuche von Gulewitsch mit rechtsdrehendem Argininnitrat in dieser Zeitschrift, Bd. 27, S. 190.)

Bei der Verbrennung gaben 0,1985 g Substanz 0,2226 g Kohlensäure und 0,1168 g Wasser.

Bei der volumetrischen Stickstoffbestimmung lieferten 0,1582 g Substanz 40,6 ccm. Stickstoff bei 15°C. und 750,5 mm. Barometerstand.

0,152 g gaben bei der volumetrischen Stickstoffbestimmung 39,2 ccm. Stickstoff bei 16°C. und 752 mm. Barometerstand.

Gefunden:		Berechnet für:
I.	II.	$C_6H_{14}N_4O_9, HNO_3$
C = 30,59%	—	C = 30,38%
H = 6,58%	—	H = 6,33%
N = 29,83%	29,90%	N = 29,54%

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 190.

Gegen meine Arbeit sind, soweit sie gegen das Antipepton Balke's gerichtet ist, von Siegfried¹⁾ Einwände erhoben worden. Namentlich ist von ihm mein Ausgangsmaterial, das Antipepton, das ich genau nach der Vorschrift Balke's gewonnen hatte, bemängelt worden, indem er meine Ausbeute als unverhältnissmässig hoch hingestellt hat.

Ich werde in der folgenden Darlegung zeigen, dass sie nicht höher ist, als man sie nach der Angabe Kühne's erwarten sollte.

Um bezüglich der quantitativen Ausbeuten an Antipepton die näheren Aufklärungen zu geben, muss ich kurz die Theorie Kühne's über die Spaltung des Eiweisses durch Trypsin berühren. Danach besteht das Eiweissmolekül aus zwei dem Gewicht nach gleichen Hälften, der Anti- und der Hemigruppe. Gemäss dieser Theorie soll bei der Spaltung des Eiweisses durch Trypsin die Antigruppe als einziges Endprodukt lediglich Antipepton liefern, dieses aber seinem Gewicht nach die Hälfte des zur Verdauung gelangten Eiweisses ausmachen. Die Theorie Kühne's findet einen Abschluss in den Angaben Siegfried's²⁾ und Balke's,³⁾ dass das Antipepton identisch mit der Fleischsäure und mithin eine einbasische Säure von der Formel $C_{10}H_{15}N_3O_5$ und dem Molekulargewicht 257 ist.

Nach der oben geschilderten Theorie berechnet Kühne⁴⁾ die Ausbeute an Antipepton, welche er in einem quantitativen Versuch erhalten hat, der mit Ausnahme meiner eigenen der einzige ist, welcher zahlenmässig die factisch an «Antipepton» zu erhaltende Ausbeute angibt. In diesem Versuch, welcher sich gerade auf ein Antipepton bezieht, das sowohl von Siegfried⁵⁾ wie von Balke⁶⁾ als besonders reines Präparat citirt und zur Identificirung mit den eigenen Produkten benutzt wird, nämlich auf Antipepton

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 335.

2) Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abth., 1894, S. 416.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 255.

4) Zeitschrift f. Biologie, Bd. XXII, S. 435, 36, 37, Antipepton [C].

5) Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abth., 1894, S. 415.

6) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 251.

C. waren nach Kühne und Chittenden 388 g Albumine zur Verdauung gekommen. Die Ausbeute sollte theoretisch 194 g Antipepton betragen. In Wirklichkeit wurden 120 g, also 62% der berechneten Ausbeute gewonnen.

In meiner ersten Untersuchung über Antipepton,¹⁾ in der ich von einem genau nach Kühne und Chittenden dargestellten Präparat ausging, erhielt ich eine Ausbeute, die den obigen Zahlen sehr nahe kommt, ich gewann dort aus 213 g verdauten Albuminen statt der berechneten 106 g Antipepton 60 g, also 57% der nach Kühne's Theorie berechneten Menge. Auch bei meinem zweiten, unter Benutzung des Verfahrens von Balke angestellten Versuch blieb die Ausbeute wesentlich hinter der theoretischen zurück und nähert sich der von Kühne. Ich erhielt nämlich aus 526 g verdauten Albuminen statt der theoretischen 263 g ca. 200 g, also 76% der berechneten Ausbeute an Antipepton. Die Steigerung der Ausbeute in dem letzten Versuch gegenüber dem ersten erklärt sich sehr einfach aus Angaben Balke's²⁾ selbst. Denn nach denselben schränkt die Methode Balke's die Zahl der Operationen der Kühne'schen Methode, die Verluste bei der Darstellung unvermeidlich machen, wesentlich ein. Da ich also in Wirklichkeit mit Antipeptonpräparaten gearbeitet habe, welche in ihrer Ausbeute einem nach Siegfried und Balke besonders gelungenen Kühne'schen Präparate entsprachen, kann ich wohl die Einwände Siegfried's gegen mein Ausgangsmaterial als hinfällig ansehen.

Bei oberflächlicher Betrachtung der weiteren Mittheilungen Siegfried's könnte man den Eindruck gewinnen, als ob Siegfried meine Behauptungen, dass das nach Balke's Vorschrift dargestellte Antipepton ein Gemenge sei, widerlegen wolle. In der That kann dies nur dadurch geschehen, dass Siegfried einen einheitlichen Körper von der Formel $C_{10}H_{15}N_3O_5$ mit peptonartigem Charakter nach der Methode Balke's darstellt, und dass er meine Angaben über die Zerlegung des Anti-

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 195.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 252.

peptons Balke» in Histidin, Arginin, Lysin etc. als irrthümlich erweist.

Doch nichts davon geschieht, sondern Siegfried stellt Versuche zur Reindarstellung des «Antipeptons» an, was doch überflüssig sein würde, wenn man in Wirklichkeit durch die Methode Balke's und die alte Eisenmethode Siegfried's zu analysenreinen Präparaten der Formel $C_{10}H_{15}N_3O_5$ kommen könnte.

Was haben nun die neuen Versuche Siegfried's zur Reindarstellung eines Antipeptons geleistet?

Ueber seine Versuche zur Reindarstellung eines Antipeptons von constanter Zusammensetzung durch Reinigung des Rohantipeptons mit Alkohol, die sich zum Theil noch eng an das Verfahren Kühne's und Balke's anlehnen, kann ich hinweggehen, da Siegfried darüber selbst den Stab mit den Worten bricht: «Ich habe die Versuche, durch Alkoholreinigung zu reinen Produkten zu gelangen, aufgegeben».

Ich wende mich nunmehr den Versuchen Siegfried's zur Reindarstellung des Antipeptons durch Fällen seiner Eisenverbindung in ammoniumsulfatgesättigten Lösungen zu.

Hier kommt nur ein Präparat in Betracht, für dessen Reinheit Siegfried keine Garantie übernehmen will und kann. Mit demselben stellt er qualitative Reactionen an und publicirt dieselben auch noch, doch wahrscheinlich, um damit die Reactionen für das reine hypothetische «Antipepton» festzulegen. Unter diesen qualitativen Reactionen ist mir namentlich Nr. 8 aufgefallen, wegen der wesentlichen Einschränkung, die die Angaben von Kühne¹⁾ und Chittenden,¹⁾ Balke²⁾ und Siegfried³⁾ selbst dadurch erfahren. Denn nach derselben soll das Antipepton nur in concentrirten Lösungen durch Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure fällbar sein, während bisher alle Autoren — trotzdem es bekannt ist, dass die Phosphorwolframsäure das Antipepton nicht vollständig niederschlägt — doch die

1) Zeitschrift f. Biologie, Bd. XXII, S. 450.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 255.

3) Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abth., 1894, S. 414.

Phosphorwolframsäure als ein wesentliches Fällungsmittel betrachten, auf das Kühne und Chittenden sogar ihre Reinigungsmethode des Antipeptons gründeten. Ich möchte auf diese von Siegfried erst jetzt, nachdem sich die Phosphorwolframsäure als ein brauchbares Reagens zur Auftheilung des Antipeptons erwiesen hat, so stark beschränkte Fällbarkeit des Antipeptons durch Phosphorwolframsäure aufmerksam machen.

Durch seine weiteren Versuche bestätigt dann Siegfried meine Einwände gegen die Brauchbarkeit seiner alten Methode zur Isolirung des Antipeptons durch die Eisenfällung, da er feststellen muss, dass seine Methode nicht specifisch ist, sondern dass auch andere Körper durch das Eisen niedergeschlagen werden. Das Resultat Siegfried's, durch die Eisenfällung zu einem einheitlichen Antipepton der Formel $C_{10}H_{13}N_3O_5$ zu gelangen, gipfelt schliesslich in folgenden zwei Sätzen: «Die Analysen der Silbersalze (des Antipeptons¹⁾, der aus diesen dargestellten Säuren und Zinksalze lieferten zwar in einigen Fällen Werthe, welche mit denen für Fleischsäure und ihre Salze berechneten nahe übereinstimmten. Dieselben besitzen aber vorläufig keine Beweiskraft,²⁾ da bei Parallelversuchen mit anderen Rohantipeptonpräparaten andere Resultate erhalten wurden.»

Danach ist es also Siegfried nicht gelungen, mittelst seiner neuen Methoden sicher zu einem einheitlichen Antipepton zu kommen, und von ihm auch nicht ein stichhaltiger Beweis gegen meine Behauptung, dass sowohl nach der Methode Balke's, wie nach seiner alten Methode dargestelltes Antipepton ein Gemenge heterogener Körper sein muss, erbracht worden.

Auch den Schlusssatz der Siegfried'schen Arbeit, dass bei der tryptischen Verdauung aus dem Eiweiss ein Antipepton entsteht, welches durch Ammonsulfat nicht aussalzbar

1) Die beiden eingeklammerten Worte sind von mir des Verständnisses halber eingefügt.

2) Im Original nicht gesperrt gedruckt.

ist, eine starke Biuretreaction, nicht die Millon'sche gibt und schwefelfrei ist. muss ich nach Versuchen, die ich anderweitig¹⁾ veröffentlicht habe, durchaus bestreiten.

Ein wesentliches Kennzeichen des Antipeptons ist bekanntlich, nach Kühne, seine absolute Widerstandsfähigkeit gegen jede weitere Einwirkung des Trypsins. Ich habe aber in der citirten Arbeit zeigen können, dass, wenn man dem Trypsin nicht eine übermässige Arbeitsleistung zumuthet, die biuretgebende Substanz bis auf Spuren vernichtet wird, die Theorie Kühne's von einem Antipepton, das seinem Gewicht nach die Hälfte des in Verdauung gegebenen Eiweisses ausmachen, und das nach Siegfried eine einbasische Säure der Formel $C_{10}H_{15}N_3O_5$ sein soll, also nicht mehr aufrecht erhalten werden kann.

Auf Grund der citirten Versuche und der im Laufe derselben ausgeführten quantitativen Bestimmungen kam ich zu folgenden, mit den Angaben Siegfried's unverträglichen Schlussätzen:

Durch eine energische langdauernde Trypsinverdauung lässt sich eine Reihe Eiweisskörper sicher bis auf Spuren spalten.

Die Spaltung verläuft wahrscheinlich durchaus ähnlich der durch starke Schwefelsäure bewirkten.

Als Endprodukte treten schliesslich dieselben Körper auf, die wir auch bei der Spaltung des Eiweisses durch starke Schwefelsäure erscheinen sehen, während die Peptone nur Zwischenstufen bilden.²⁾

Aus dem letzten Satz ergibt sich, glaube ich, zur Genüge, dass ich das Auftreten von Durchgangsprodukten peptonartigen

1) Die Endprodukte der Trypsinverdauung. Habilitationsschrift, erschienen im Verlag von Karl J. Trübner, Strassburg.

2) In meiner Habilitationsschrift habe ich an einzelnen Stellen den Ausdruck concentrirte Schwefelsäure gebraucht. Trotzdem aus dem Zusammenhang klar ist, dass ich eine Schwefelsäure der Concentration, wie sie von Ritthausen bei der Spaltung der Eiweisskörper angewandt worden ist, im Sinne hatte, erkläre ich dies noch ausdrücklich, um Irrthümer auszuschliessen.

Charakters bei der tryptischen Verdauung nicht bestreite, dagegen muss ich die Versuche, solche Durchgangsprodukte jetzt als Antipepton in die chemisch-physiologische Litteratur einzuführen, als durchaus unzulässig zurückweisen, weil dieselben der Theorie Kühne's, nach der das « Antipepton » das einzige Endprodukt der tryptischen Verdauung der « Antigruppe » ist, direkt entgegenlaufen und nur dazu dienen, den wahren Thatbestand zu verdunkeln.

Auf meine letzte Arbeit hat Siegfried keine Rücksicht genommen und das Gegentheil der von mir darin erarbeiteten Resultate nicht erwiesen.