

Über Pepsin-Fibrinpepton.

Von
Curt Borkel.

Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Universität Leipzig.
(Der Redaktion zugegangen am 18. April 1903.)

Das Endprodukt der künstlichen Verdauung von Eiweißkörpern mit Pepsin nannte Kühne Amphopepton. Wie Siegfried¹⁾ nachwies, enthielt diese nach Kühnes Vorschrift hergestellte Substanz Albumosen. Um das Pepton rein von Albumosen zu erhalten, arbeitete Mühle²⁾ nach der Siegfriedschen Eisenmethode³⁾ und stellte durch peptische Verdauung von Fibrin und Witte-Pepton zwei Säuren, $C_{21}H_{34}N_6O_9$ und $C_{21}H_{36}N_6O_{10}$, dar, die er in Anlehnung an die alte Kühnesche Bezeichnung Amphopepton A bzw. Amphopepton B nannte, die aber besser in Analogie zu den Antipeptonen die Namen Pepsinpepton α und Pepsinpepton β führen sollen.

Die Einheitlichkeit dieser Säuren bewies Mühle durch Analysen und Herstellung von Salzen von konstanter Zusammensetzung bei verschiedenen Darstellungen und Umfällungen.

Diese Einheitlichkeit der Pepsinpeptone auch durch die Konstanz des optischen Drehvermögens beim Umfällen der Präparate zu kontrollieren, war eine noch zu lösende Aufgabe.

1) M. Siegfried, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 33, S. 2852.

2) P. Mühle, Diss., Leipzig 1901, S. 39 ff.

3) M. Siegfried, loc. cit., S. 2853 ff., Diese Zeitschr., Bd. XXXV, S. 167.

Sämtliche bisher isolirten 6 Peptone (S. 259) sind linksdrehend.

Ferner mußte untersucht werden, ob die von Mühle isolierten Pepsinpeptone bei der tryptischen Verdauung die Antipeptone Siegfrieds lieferten.

Herr Prof. Siegfried veranlaßte mich, diese Aufgaben in Angriff zu nehmen. Dabei ergaben sich außerdem die schon früher vermuteten nahen Beziehungen¹⁾ zwischen den beiden Pepsinpeptonen.

I. Darstellung der Pepsinpeptone.

Charakterisierung derselben.

Bei der Darstellung der Pepsinpeptone hielt ich mich ganz an die Arbeitsweise Siegfrieds²⁾ und Mühles.³⁾

11 kg feuchten Fibrins entsprechend ca. 2,5 kg trockenem Fibrin wurden in ca. 20 Liter 0,5 %iger Salzsäure suspendiert, mit 20 g Pepsin der Firma Grübler-Dresden 3 Wochen bei 35—40 ° unter Zusatz von Chloroform und Thymol verdaut.

Aus der Verdauungsflüssigkeit entfernte ich die Hauptmenge der Albumosen (ca. 3 kg feucht) durch Sättigen mit Ammonsulfat und Zusatz konzentrierter ammoniumsulfatgesättigter Schwefelsäure. In der von Albumosen befreiten, ammoniumsulfatgesättigten, fast neutralisierten Lösung wurde durch gepulverten Eisenammoniakalaun das Pepsinpepton α als Eisenniederschlag A gefällt. Der Niederschlag wurde in Wasser gelöst, das Eisen mit Ammoniak entfernt und die vom Eisen befreite Lösung nach der Neutralisation mit Ammonsulfat gesättigt. Dadurch, sowie durch darauf folgenden Zusatz von ammoniumsulfatgesättigter Schwefelsäure wurden die letzten Reste der Albumosen beseitigt. In der so von Albumosen jetzt völlig befreiten Flüssigkeit fällte ich den Eisenniederschlag A aufs neue.

Im 1. Filtrat vom Eisenniederschlag wurde durch Neutralisation mit konzentriertem Ammoniak eine geringe Zwischen-

1) Mühle, loc. cit., S. 48.

2) loc. cit. Diese Zeitschr., Bd. XXXV, S. 164.

3) loc. cit.

fällung¹⁾ erzeugt, die aus den Eisensalzen der Pepsinpeptone α und β bestand und verworfen wurde.

Durch Eisenammoniakalaun wurde im stets schwach sauer gehaltenen, ammoniumsulfatgesättigten Filtrate der Zwischenfällung der Eisenniederschlag B, das Eisensalz des Pepsinpeptons β , gefällt. Durch Lösung in konzentrierter ammoniumsulfatgesättigter Schwefelsäure und Zusatz von konzentriertem Ammoniak fällte ich ihn um.

Die erhaltenen Eisenniederschläge löste man unter Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure in Wasser, fällte mittels Barythydrats Schwefelsäure und Eisen aus, im Filtrat davon mittels Ammoncarbonat das überschüssige Barythydrat und isolierte die Peptone durch Destillation der so erhaltenen Lösungen im Vacuum und Fällung des in wenig Wasser gelösten, mit Essigsäure versetzten Destillerrückstandes in absoluten Alkohol.

Die Ausbeute an Pepsinpeptonen war folgende: Aus 11 kg feuchten Fibrins wurden erhalten 157 g trockenen Pepsinpeptons α und 46 g trockenen Pepsinpeptons β , während Mühle bedeutend mehr Pepton β als α fand.²⁾ Die Verschiedenheit der Ausbeuten ergibt sich aus dem leichten Übergange des Peptons β in α .

Die Peptone erwiesen sich als frei von Salzsäure, Albumosen und Essigsäure.

Charakterisierung des Pepsinpeptons α .

Die Hälfte der wässrigen Peptonlösung wurde in die ca. 100fache Menge absoluten Alkohols eingerührt, das gefällte Pepton abfiltriert und in das Filtrat die zweite Hälfte der Lösung eingetragen, abgesaugt, mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen und über Schwefelsäure im Vacuum getrocknet. Die so erhaltenen Fällungen seien mit Fällung I bezw. II bezeichnet.

Die Substanzen wurden zur Analyse bei 60° im Trockenschranke bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und in mit Glashülsen versehenen Analysenschiffchen zur Wägung gebracht.

1) M. Siegfried, Diese Zeitschr., Bd. XXXV, S. 167.

2) loc. cit., S. 41.

Die Zinksalze wurden durch Aufkochen der wässrigen Peptonlösung mit Zinkoxyd, Filtration vom Zinkoxyd und Einengen der Zinksalzlösung im Porzellantiegel auf dem Wasserbade gewonnen.

Fällung I:

	gefunden	berechn. f. $C_{21}H_{34}N_6O_9$
0,2013 g Substanz gaben 0,1194 g H_2O ;	6,64 % H;	6,66 % H.
0,3604 g CO_2 ;	48,83 % C;	48,98 % C.
vollständig aschefrei.		

0,2185 g Substanz neutr.

25,05 ccm $\frac{1}{10}$ N-Säure; 16,06 % N; 16,37 % N.ber. f. $(C_{21}H_{33}N_6O_9)_2Zn$.0,3074 g Zinksalz gaben 0,0240 g ZnO ; 6,27 % Zn; 5,99 % Zn.

Fällung II:

	gefunden	berechn. f. $C_{21}H_{34}N_6O_9$
0,1918 g Substanz gaben 0,1226 g H_2O ;	7,15 % H;	6,66 % H.
0,3425 g CO_2 ;	48,70 % C;	48,98 % C.
vollständig aschefrei.		

0,1832 g Substanz neutr.

20,93 ccm $\frac{1}{10}$ N-Säure; 15,99 % N; 16,37 % N.ber. f. $(C_{21}H_{33}N_6O_9)_2Zn$.0,5270 g Zinksalz gaben 0,0400 g ZnO ; 6,09 % Zn; 5,99 % Zn.

Wie aus den Resultaten hervorgeht, sind die beiden Fällungen identisch. Das Pepsinpepton α ist aschefrei, stimmt vollkommen auf die von Mühle für das «Amphopepton A» aufgestellte Formel und erweist sich der Bestimmung des Zinkwertes seines Zinksalzes nach als einbasische Säure, auf die einfache Formel bezogen. Der Alkohol, der den Peptonen von ihrer Fällung her noch anhaftet, läßt sich durch Trocknen bei 60° völlig entfernen.

Das Präparat war schwefelhaltig, enthielt aber nur minimale Spuren von Sulfat. Das Gemisch der Fällungen wurde in Wasser gelöst, mit Barytwasser versetzt und Kohlensäure eingeleitet, bis sich eine geringe Menge Baryumcarbonat gebildet hatte. Dieses riß die geringen Mengen des in der Lösung suspendierten Baryumsulfates nieder. Vom Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat vom Baryum mit Ammoncarbonat befreit und das Pepton wie früher isoliert. Es erwies sich jetzt als völlig frei von Sulfat.

Zur Bestimmung des Schwefels wurden 0,4674 g trockener Substanz mit Natronhydrat und Salpeter in der Silberschale verschmolzen. Der Baryumsulfatniederschlag, der erst beim Kochen entstand, wog 0,0249 g. Daraus ergab sich ein Schwefelgehalt von 0,73 %/o. Der Schwefelgehalt ist etwas hoch, wenn man bedenkt, daß die meisten Peptone unter $1/2$ %/o Schwefel enthalten, ja vielfach schwefelfrei sind.

Alle verwandten Reagentien waren schwefelsäurefrei.

Molekulargewichtsbestimmungen.

Es wurde in der üblichen Weise nach Beckmann die Gefrierpunktserniedrigung der wässerigen Peptonlösung bestimmt. Die Substanzen waren bei 60° b. z. c. G. getrocknet.

Fällung I:

Nullpunkt: 2,668°.

Gelöst 1. 0,3422 g Substanz in 10 g Wasser,
Erstarrungspunkt: 2,569°,
Depression: 0,099°,
berechnetes Molekulargewicht = 653.

Gelöst 2. 0,6095 g Substanz in 10 g Wasser,
Erstarrungspunkt: 2,493°,
Depression: 0,175°,
daraus berechnetes Molekulargewicht = 658.

Fällung II:

Nullpunkt: 2,690°.

Gelöst 1. 0,3196 g Substanz in 10 g Wasser,
Erstarrungspunkt: 2,572°,
Depression: 0,118°,
gefundenes Molekulargewicht = 512.

Gelöst 2. 0,4927 g Substanz in 10 g Wasser,
Erstarrungspunkt: 2,504°,
Depression: 0,186°,
gefundenes Molekulargewicht = 500.

Gelöst 3. 0,7570 g Substanz in 10 g Wasser.
Erstarrungspunkt 2,431°,
Depression: 0,259°,
gefundenes Molekulargewicht = 552.

Das dem Pepsinpepton α entsprechende Molekulargewicht ist 515. Wie ersichtlich, kommen diesem Werte nur die Molekulargewichtsbestimmungen der Fällung II nahe. Die Fällung I gibt

ein wesentlich höheres Molekulargewicht, rund 655. Mühle¹⁾ fand 478, 528, 551, also Werte, die mit dem verlangten übereinstimmen.

Aus Gründen, die noch untersucht werden, ist es jetzt noch nicht möglich, aus den nach der Methode der Gefrierpunktserniedrigung in wässriger Lösung erhaltenen Resultaten Schlüsse auf die Molekulargröße der Peptone zu ziehen.

Bestimmung der optischen Drehung.

Fällung I.

1. Zu diesem Versuche wurde die bei einer der früheren Molekulargewichtsbestimmungen erhaltene Peptonlösung benutzt. Die Konzentration wurde bestimmt, indem 10 ccm im Wäagegläschen auf dem Wasserbade eingedampft, der Rückstand bei 70° bis zur Konstanz getrocknet und gewogen wurde. Die Bestimmung geschah mit einem Halbschattenapparate mit doppeltem Gesichtsfelde von Schmidt & Haensch bei Natriumlicht.

$$\alpha = -92^{\circ}, \quad t = 19^{\circ}, \quad l = 2, \quad c = 1,230 \text{ } \%.$$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{19} = -37,4^{\circ}.$$

2. In diesem und den folgenden Versuchen trocknete ich die Substanz bei 70° bis zur Gewichtskonstanz und löste sie im 20 ccm-Kölbchen in Wasser:

$$\alpha = -3,77^{\circ}, \quad t = 20^{\circ}, \quad l = 2, \quad c = 5,202 \text{ } \%.$$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -36,23^{\circ}.$$

Es wurden 10 g Pepton folgendermaßen umgefällt: 10 g (2 Teile) Pepton löste ich in 15 g (3 Teilen) Wasser und setzte dazu 5 g (1 Teil) absoluten Alkohols. Die Lösung wurde in 500 g absoluten Alkohols gegossen, das ausgeschiedene Pepton abgesaugt und mit absolutem Alkohol und absolutem Äther gewaschen. Die Ausbeute betrug 9 g, 1 g Pepton war im Alkohol gelöst geblieben. Dieses umgefällte Pepton gab folgende Drehung:

$$3. \quad \alpha = -3,27^{\circ}, \quad t = 20^{\circ}, \quad l = 2, \quad c = 4,5656 \text{ } \%.$$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -35,81^{\circ}.$$

1) l. c. S. 49.

$$4. \quad \alpha = -4,44^\circ, \quad t = 20^\circ, \quad l = 2, \quad c = 6,156 \text{ } \%. \\ [\alpha]_D^{20} = -36,06^\circ.$$

Das optische Drehvermögen blieb also innerhalb der Beobachtungsfehler auch nach dem Umfällen konstant, ein Zeichen dafür, daß die Substanz einheitlich war.

Fällung II.

$$5. \quad \alpha = -1,09^\circ, \quad t = 20^\circ, \quad l = 2, \quad c = 1,502 \text{ } \%. \\ [\alpha]_D^{20} = -36,28^\circ.$$

Die Fällungen I und II haben gleiches optisches Drehvermögen. Wieder ein Beweis für die Einheitlichkeit der Substanz. Die Temperatur wurde bei den Versuchen, um vergleichbare Werte zu haben, immer genau auf 20° gehalten. Trotz der verschiedenen Prozentgehalte (1—6%) stimmen die gefundenen Zahlen innerhalb der Beobachtungsfehler gut überein. Die für das optische Drehvermögen des Pepsinpeptons α gefundenen Werte sind:

$$-37,4^\circ; -36,23^\circ; -35,81^\circ; -36,06^\circ; -36,28^\circ; \\ \text{im Mittel } -36,36^\circ.$$

6. Das Pepton wurde in ammoniakalischer Lösung untersucht, um zu untersuchen, ob sich dabei die Drehung im selben Sinne, also nach links ändern oder ihre Richtung von links nach rechts umkehren würde.

Die 4,5656%ige Lösung des Versuches 3 verdünnte man zu einer 2,2828%igen. 10 ccm dieser Lösung wurden mit 10 ccm konzentrierten Ammoniaks vom spezifischen Gewicht 0,910 (25%) versetzt und die erhaltene Lösung polarisiert:

$$\alpha = -0,90^\circ, \quad t = 20^\circ, \quad l = 2, \quad c = 1,1414 \text{ } \%. \\ [\alpha]_D^{20} = -39,42^\circ.$$

Ammoniak erhöht also die Drehung nach links (von -36° auf $-39,4^\circ$), kehrt also die Richtung nicht um.

Reaktionen:

Biuretreaktion: sehr stark.

Millons Reaktion: sehr stark.

Essigsäure und Ferrocyankalium: keine Fällung, auch keine Spur von Trübung.

Gerbsäure: Fällung, die in viel Essigsäure löslich ist.

Pikrinsäure: Fällung, die sich in der Wärme löst, beim Erkalten wieder entsteht.

Sublimat: Fällung nur in konzentrierten Lösungen.

Bleiessig: keine Fällung in verdünnter Lösung.

Phosphorwolframsäure: starke Fällung.

Adamkiewicz' Reaktion: positiv.

Xanthoproteinreaktion: positiv.

Metaphosphorsäure: negativ.

Molischsche Zuckerprobe: in 1 0/00-Lösungen keine Reaktion, in konzentrierteren äußerst schwache Andeutungen einer Reaktion. Bei der großen Empfindlichkeit der Molischschen Probe machen jene die Anwesenheit der Kohlehydratgruppe nicht wahrscheinlich.

Die Reaktionen stimmen mit den von Mühle ausgeführten überein, nur gibt Mühle an, daß die Molischsche Zuckerprobe positiv ausfällt; es bezieht sich dies also auf konzentrierte Lösungen.

Charakterisierung des Pepsinpeptons β .

Es wurde wieder in zwei Portionen gefällt, die wieder als Fällungen I und II geführt werden sollen.

Fällung I.

Die ersten drei Analysensubstanzen wurden bei 65° bis zum konstanten Gewicht getrocknet.

		Analysen:		
		auf aschefr.	ber. für	
		Subst. ber.	C ₃₁ H ₃₆ N ₆ O ₁₀ ¹⁾	
		gef.		
0,2248 g S. gaben	0,1450 g H ₂ O;	7,21 0/0 H;	7,23 0/0 H;	6,81 0/0 H.
	0,3894 g CO ₂ ;	47,24 0/0 C;	47,33 0/0 C;	47,32 0/0 C.
	0,0004 g Asche;			
0,2255 g S. neutr.	26,96 ccm n ₁₀ -Säure:	16,71 0/0 N;	16,74 0/0 N;	15,82 0/0 N.
0,2112 g S. neutr.	24,80 ccm n ₁₀ -Säure:	16,43 0/0 N;	16,46 0/0 N;	15,82 0/0 N.

Der zu hohe Stickstoffgehalt legte die Vermutung nahe, daß das Präparat zum Teil das Ammoniumsalz des Peptons enthielt. Dies konnte verursacht sein durch nicht genügenden

1) loc. cit., S. 48.

Essigsäurezusatz vor der Fällung. Deshalb wurde das Präparat in der schon früher beschriebenen Weise unter Zusatz von Essigsäure umgefällt. Auch jetzt wurde wieder der zu hohe Stickstoffgehalt gefunden, wie folgende Analyse lehrt (Substanz bei 70° bis zur Konstanz getrocknet):

		auf aschefr.		
		gef.	Subst. ber.	ber.
0,1944 g S. gaben				
28,3 ccm tr. N. bei 19°	u. 747 mm Bar.:	16,73 % N;	16,78 % N;	15,82 % N.

Die Kohlenstoff-Wasserstoffanalyse der umgefällten Substanz zeigte folgende Werte:

		auf aschefr.		
		gef.	Subst. ber.	ber.
0,2236 g S. gaben	0,1395 g H ₂ O;	6,98 % H;	7,00 % H;	6,81 % H.
	0,3847 g CO ₂ ;	46,92 % C;	47,07 % C;	47,32 % C.
	0,0007 g Asche.			

Die Substanzen der nachstehenden Analysen wurden 2 Wochen lang über Phosphorpentoxyd im evakuierten Exsiccator bis zu konstantem Gewicht getrocknet:

		auf aschefr.		
		gef.	Subst. ber.	ber.
0,2295 g S. gaben	0,1536 g H ₂ O;	7,49 % H;	7,52 % H;	6,81 % H.
	0,4008 g CO ₂ ;	47,63 % C;	47,86 % C;	47,32 % C.
	0,0011 g Asche;			

		auf aschefr.		
		gef.	Subst. ber.	ber.
0,2339 g S. gaben	0,1543 g H ₂ O;	7,38 % H;	7,41 % H;	6,81 % H.
	0,4080 g CO ₂ ;	47,57 % C;	47,80 % C;	47,32 % C.

Da bei der letzten Analyse etwas Substanz über den Rand des Schiffchens getreten war, wurde zur Berechnung auf aschefreie Substanz der in der ersten der beiden Analysen angegebene Aschewert benutzt.

Bei diesen Analysen fällt hauptsächlich der zu hohe Wasserstoffgehalt auf.

Das Pepton fällte ich nochmals unter Zusatz von Essigsäure um und analysierte es. Die Substanzen wurden wieder über Phosphorsäureanhydrid bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

0,2292 g S. gaben	gef.	ber.
32,5 ccm tr. N bei 11,5° u. 750 mm Bar.:	16,79 % N;	15,82 % N.
0,2002 g S. gaben		
28,3 ccm tr. N bei 15° u. 765 mm Bar.:	16,86 % N;	15,82 % N.

Fällung II.

Die Substanzen wurden bei 65° bis zur Konstanz getrocknet:

		auf aschefr.		
	gef.	Subst. ber.	ber.	
0,2204 g S. gaben	0,1413 g H ₂ O;	7,17 % H;	7,21 % H;	6,81 % H.
	0,3792 g CO ₂ ;	46,93 % C;	47,18 % C;	47,32 % C.
	0,0012 g Asche;			

		auf aschefr.		
	gef.	Subst. ber.	ber.	
0,2159 g S. neutr.	25,67 ccm n/10-Säure:	16,63 % N;	16,72 % N;	15,82 % N;
0,2095 g S. gaben	29,3 ccu tr. N. bei 18°			
	u. 754 mm Bar.:	16,28 % N;	16,36 % N;	15,82 % N.

Das Pepton wurde umgefällt. 10% blieben in der Mutterlauge. Die Stickstoffwerte waren jetzt folgende:

		auf aschefr.		
	gef.	Subst. ber.	ber.	
0,1817 g S. gaben				
25,1 ccm tr. N bei 14° u. 7,48 mm Bar.:	16,17 % N;	16,26 % N;	15,82 % N.	
0,2030 g S. gaben				
28,3 ccm tr. N bei 14,5° u. 7,47 mm Bar.:	16,27 % N;	16,35 % N;	15,82 % N.	

Folgende Tabelle enthält die gefundenen und berechneten Zahlen:

%	gefunden	berechn.
C	47,33. 47,07. 47,86. 47,80. 47,18.	47,32
H	7,23. 7,00. 7,52. 7,41. 7,21.	6,81
N	16,74. 16,46. 16,78. 16,79. 16,86. 16,72. 16,36. 16,26. 16,35	15,82

Es ließen sich keine ganz konstanten Zahlen erhalten. Die Kohlenstoffwerte stimmen zum Teil sehr gut, zum Teil sind sie etwas zu hoch, die Wasserstoffwerte sind etwas zu hoch, ebenso diejenigen des Stickstoffs. Diese nähern sich dem Stickstoffgehalt des Pepsinpeptons α . Die genauesten Werte wurden erst nach Umfällen erhalten.

Der größere Teil der Analysen wurde ausgeführt, nachdem das Pepton β ca. 1 Jahr lang gestanden hatte. Wie später gezeigt wird, geht das Pepton β bei 100° in α über. Es ist anzunehmen, daß dieser Übergang schon teilweise bei gewöhnlicher Temperatur stattfindet. Denn ein Vorgang, der bei höherer Temperatur schnell verläuft, geht langsam auch bei niedriger Temperatur vor sich. Wir haben es also im Präparat β höchst wahrscheinlich mit einem bei verschiedenen Temperaturen verschieden zusammengesetzten Gemisch von β und α zu tun. Allerdings finden dadurch die etwas zu hohen Wasserstoff- und Stickstoffwerte noch keine erschöpfende Erklärung.

Die Analyse des Zinksalzes ergab:

	gef.	ber. f. $(C_{21}H_{35}N_6O_{10})_2Zn^1$
0,8590 g Subst. gaben 0,5772 g ZnO;	6,29 % Zn;	5,89 % Zn.

Nach Schmelzen mit Ätznatron und Salpeter, wiederholtem Eindampfen der Lösung der Schmelze mit Salzsäure wurde durch Baryumchlorid beim Stehen nur eine minimale Trübung erhalten, die keine wägbaren Mengen Baryumsulfates gab. Das Pepton war also schwefelfrei.

Molekulargewichtsbestimmungen.

Betreffs des Molekulargewichtes gilt dasselbe wie das bei Pepton α angeführte.

Fällung I.

Nullpunkt: $2,649^{\circ}$.

Gelöst 1. 0,3392 g Substanz in 10 g Wasser,

Gefrierpunkt: $2,485^{\circ}$,

Depression $0,164^{\circ}$,

daraus berechnetes Molekulargewicht = 391.

Gelöst 2. 0,9062 g Substanz in 10 g Wasser,

Erstarrungspunkt: $2,257^{\circ}$,

Depression: $0,392^{\circ}$,

gefundenes Molekulargewicht = 437.

Fällung II.

Nullpunkt: $3,397^{\circ}$.

Gelöst 1. 0,2054 g Substanz in 10 g Wasser,

Erstarrungspunkt: $3,277^{\circ}$,

1) Mühle, l. c. S. 52.

Depression: $0,120^{\circ}$,

daraus berechnetes Molekulargewicht = 324.

Gelöst 2. $0,8532$ g Substanz in 10 g Wasser,

Erstarrungspunkt: $2,982^{\circ}$,

Depression: $0,415^{\circ}$,

gefundenes Molekulargewicht = 389.

Die gefundenen Werte stimmen mit dem für das Mühlesche Pepsinpepton B, $C_{21}H_{36}N_6O_{10}$, berechneten Molekulargewichte, 532, nicht überein.

Bestimmung des optischen Drehvermögens.

Die Versuche wurden in derselben Weise ausgeführt wie mit dem Pepsinpepton α . Die Substanzen wurden bei 70° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Fällung I.

$$1. \quad \alpha = -0,88^{\circ}, \quad t = 20^{\circ}, \quad l = 2, \quad c = 1,772^{\circ}.$$

$$[\alpha]_D^{20} = -24,83^{\circ}.$$

Nach der Umfällung des Peptons ergab sich folgender Wert:

$$2. \quad \alpha = -2,44^{\circ}, \quad t = 20^{\circ}, \quad l = 2, \quad c = 4,654^{\circ}/_{\circ}.$$

$$[\alpha]_D^{20} = -26,21^{\circ}.$$

Diese Substanz lieferte nach nochmaligem Umfällen den gleichen Wert:

$$3. \quad \alpha = -1,49^{\circ}, \quad t = 20^{\circ}, \quad l = 2, \quad c = 2,7805.$$

$$[\alpha]_D^{20} = -26,79^{\circ}.$$

Nach längerem Stehenlassen der mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnten Lösung stieg $[\alpha]_D^{20}$ auf $-37,04$, gab aber nach Berühren mit einem mit Essigsäure benetzten Glasstabe wieder den alten Wert $-26,85$.

Die $0,5214^{\circ}/_{\circ}$ ige mit Essigsäure berührte Lösung wurde mit einem in konzentrierten Ammoniak getauchten Glasstabe eben berührt und wieder polarisiert:

$$\alpha = -0,81^{\circ}, \quad l = 4.$$

$$[\alpha]_D^{20} = -38,84^{\circ}.$$

Fällung II.

$$1. \quad \alpha = -0,76^{\circ}, \quad t = 21, \quad l = 2, \quad c = 1,703^{\circ}/_{\circ}.$$

$$[\alpha]_D^{21} = -22,31^{\circ}.$$

2. Dasselbe Pepton umgefällt:

$$\alpha = -23,07, \quad t = 20^{\circ}, \quad l = 2, \quad c = 3,2728 \text{ ‰}.$$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -23,07^{\circ}.$$

3. 10 ccm dieser Lösung verdünnte ich mit 10 ccm Wasser und polarisierte die so erhaltene 1,6364 ‰ige Lösung:

$$\alpha = -0,71, \quad t = 20^{\circ}.$$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -21,69^{\circ}.$$

4. 10 ccm dieser 1,6364 ‰igen Lösung wurden mit 10 ccm Wasser verdünnt und die 0,8182 ‰ige Lösung polarisiert:

$$\alpha = -0,33^{\circ}.$$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -20,17^{\circ}.$$

Es konnten also für die verschiedenen Fällungen des Peptons β keine genügend übereinstimmenden Werte erhalten werden, wie folgende Zusammenstellung deutlich zeigt:

$$\begin{aligned} & -24,83^{\circ}; -26,21^{\circ}; -26,79^{\circ}; -26,85^{\circ}; -22,31^{\circ}; \\ & -23,07^{\circ}; -21,69^{\circ}; -20,17^{\circ}. \end{aligned}$$

Im Einklange mit den bei den Analysen dieses Peptons gefundenen Resultaten¹⁾ ist also hieraus zu schließen, daß das Präparat nicht völlig einheitlich ist.

Zum Schlusse sei auf die Polarisationswerte Mühles aufmerksam gemacht. Er fand

$$-25,55^{\circ}; -26,31^{\circ}; -27,24^{\circ}.$$

Dies sind Zahlen, welche sich den von mir erhaltenen nähern.

Reaktionen:

Biuretreaktion: sehr stark.

Millons Reagenz: intensive Reaktion.

Essigsäure + Ferrocyankalium: keine Trübung.

Gerbsäure: Fällung, in viel Essigsäure löslich.

Pikrinsäure: Fällung in der Kälte. Der Niederschlag löst sich in der Wärme, tritt aber in der Kälte wieder auf.

Sublimat: Fällung nur in konzentrierter Lösung.

Bleiessig: keine Fällung.

1) cf. S. 298.

Phosphorwolframsäure: starke Fällung.

Adamkiewicz' Reaktion: positiv.

Xanthoproteinreaktion: positiv (Braunfärbung).

Metaphosphorsäure: negativ.

Molischsche Zuckerprobe: in konzentrierten, wie in 1^o/_{co} Lösungen negativ.

Die Reaktionen des Pepsinpeptons β stimmen mit denen von α überein.

II. Überführung des Pepsinpeptons α in das Pepsinpepton β .

Als beim Trocknen mehrerer Analysenschiffchen mit Pepsinpepton B die Temperatur des Trockenschrankes unvorhergesehen bis auf 95^o gestiegen war, ergaben sich bei der Kohlenstoff-Wasserstoffbestimmung folgende Werte:

	gef.	Subst. ber.	ber. f. Pepton β
0,2123 g S. gaben	0,1341 g H ₂ O; 7,07 % H;	7,10 % H;	6,81 % H.
	0,3778 g CO ₂ ; 48,53 % C;	48,69 % C;	47,32 % C.
	0,0007 g Asche;		
0,2250 g S. gaben	0,1416 g H ₂ O; 7,04 % H;	7,06 % H;	6,81 % H.
	0,4016 g CO ₂ ; 48,68 % C;	48,83 % C;	47,32 % C.
	Asche nicht bestimmt.		

Die Zahlen stimmen nicht auf das Pepton β , wohl aber auf das Pepsinpepton α : H = 6,66₁^o/_o; C = 48,98^o/_o ber.

Es wurden weiter mehrere Schiffchen mit Pepsinpepton β bis zur Gewichtskonstanz bei 100^o getrocknet.

Analysen:

	gef.	auf aschefr. Subst. ber.	ber. f. α
0,2024 g S. gaben	0,1287 g H ₂ O; 7,11 % H;	7,13 % H;	6,66 % H.
	0,3609 g CO ₂ ; 48,63 % C;	48,73 % C;	48,98 % C.
	0,0004 g Asche;		
0,2487 g S. gaben		gef.	ber. f. α
34,7 ccm tr. N bei 15 ^o u. 768 mm Bar.:		16,71 % N;	16,37 % N.
0,1992 g S. gaben			
27,6 ccm tr. N bei 14 ^o u. 768 mm Bar.;		16,65 % N;	16,37 % N.

Der Übergang des Peptons β in das Pepton α ist dadurch wahrscheinlich gemacht.

Auch die durch die Bestimmung des optischen Drehvermögens erhaltenen Werte stimmen mit den für Pepton gefundenen überein. Durch einen Vorversuch wurde festgestellt, daß beim Trocknen bei 91° das optische Drehvermögen des Peptons α noch nicht erreicht werden konnte. Dies geschah erst durch Trocknen bei 100° bis zur Gewichtskonstanz. Hierbei verfärbte sich das Pepton schwach.

$$1. \quad \alpha = -1,59^{\circ}, \quad t = 20^{\circ}, \quad l = 1, \quad c = 4,394 \text{ } \%/o.$$

$$[\alpha]_{D}^{20} = -36,19^{\circ}.$$

$$2. \quad \alpha = -0,51^{\circ}, \quad t = 20^{\circ}, \quad l = 1, \quad c = 1,3428 \text{ } \%/o.$$

$$[\alpha]_{D}^{20} = -37,97^{\circ}.$$

Diese 1,3428 $\%$ ige Lösung erhielt ich durch Verdünnung von 10 ccm einer 2,6856 $\%$ igen Lösung mit 10 ccm Wasser. Die 26856 $\%$ ige Lösung gab im 1-Dezimeterrohre bei 20° folgenden Wert:

$$3. \quad \alpha = -1,01^{\circ}, \quad l = 1, \quad t = 20.$$

$$[\alpha]_{D}^{20} = -37,60^{\circ}.$$

Durch die Verdünnung änderte sich das optische Drehvermögen nicht.

Während früher die Beobachtung gemacht worden war, daß das Pepsinpepton β in wässriger Lösung bei längerem Stehenlassen das optische Drehvermögen des Peptons α erreichte, zeigte sich diese Drehung sofort nach dem Auflösen des bei 100° getrockneten Pepsinpeptons β in Wasser. Das Pepsinpepton β geht also durch Trocknen bei 100° bis zur Gewichtskonstanz in das Pepsinpepton α über, soweit sich dies durch die Analysen und durch Bestimmung des optischen Drehvermögens nachweisen ließ. — Bei der Behandlung des Pepsinpeptons β mit Essigsäureanhydrid ließ sich weder Pepton α noch ein Acetylierungsprodukt erhalten.

III. Tryptische Verdauung des Pepsinpeptons A.

Es waren die Fragen zu beantworten: Entstehen bei der tryptischen Verdauung von Pepsinpepton beide Antipeptone Siegfrieds? oder nur eins und welches? oder bildet sich kein Antipepton? Da Pepsinpepton die Millonsche Reaktion,

Antipepton dieselbe nicht gibt, so war zu erwarten, daß, wenn Antipepton entstand, Tyrosin als solches oder in einem Komplex abgespalten würde.

Im folgenden sind Versuche einer tryptischen Verdauung des Pepsinpeptons unternommen worden und zwar nur von α , da sich β hatte in α überführen lassen. Dabei wurde auch, soweit möglich, nach den eventuell entstandenen Basen, Arginin, Histidin, Lysin, und Amidosäuren, wie Glutaminsäure, gesucht.

1. Verdauungsversuch.

Es wurde, um möglichst wenig fremde Substanzen zu der Peptonlösung zu bringen, ein äußerst wirksames Trypsinpräparat verwendet; als solches erwies sich ein von der Fabrik Rhenania freundlichst zur Verfügung gestelltes Präparat. 7 g trockenen Pepsinpeptons α wurden in 30 ccm einer 0,2%igen Natriumcarbonatlösung gelöst, die zur Neutralisation des Peptons 1 g Natriumcarbonat enthielt, und dazu 0,03 g Pankreatin-Rhenania «100», gelöst in 25 ccm einer 0,2%igen Natriumcarbonatlösung, gegeben. Die Lösung wurde bei 37° unter Zusatz von wenig Chloroform verdaut. Nach Verlauf eines Tages fiel die Tryptophanreaktion positiv aus, dagegen hatte sich Tyrosin nicht abgeschieden.

a) Isolierung des Tyrosins.

Auch nach schwachem Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure ließ ein Tropfen der Flüssigkeit auf dem Uhrglase an der Luft verdunsten unter dem Mikroskope kein Tyrosin erkennen. Die Verdauungsflüssigkeit wurde mit Natriumcarbonat wieder auf 0,2% gebracht und unter Zusatz von 0,1 g Pankreatin-Rhenania «100» mehrere Tage bei 37—40° weiter verdaut. Die Verdauung wurde schließlich unterbrochen, als sich ein geringer, flockiger Bodensatz gebildet hatte, der sich aber nicht als Tyrosin auswies. Die vom Bodensatz abfiltrierte, schwach angesäuerte Flüssigkeit schied beim Eindampfen bei 50° einen geringen, weißen Krystallbrei ab, der sich in der Kälte noch vermehrte und dessen Kryställchen unter dem

Mikroskope die dem Tyrosin eigene Form zeigten. Die Tyrosin-
ausbeute betrug 0,1 g. Die Krystalle zersetzten sich im
Kapillarrohre bei 235° und gaben die Millonsche Reaktion.

b) I. Eisenniederschlag.

Das Filtrat vom Tyrosin wurde mit Ammoniak neutralisiert,
bei 45° mit Ammonsulfat gesättigt und mit gesättigter Ammon-
sulfatlösung auf ca. 300 ccm aufgefüllt. Durch Zusatz von
ammonsulfatgesättigter Eisenammoniakalaunlösung wurde der
I. Eisenniederschlag gefällt. Den mit gesättigter Ammonsulfat-
lösung gut ausgewaschenen Niederschlag suspendierte ich in
Wasser und löste ihn mit wenig konzentrierter Schwefelsäure.
Nach Entfernung des Eisens und der Schwefelsäure mit einem
geringen Überschuß von Baryumhydrat wurde im Filtrat das
überschüssige Baryum mit Ammoncarbonat ausgefällt und das
Filtrat vom Baryumcarbonat im Vacuum eingedampft. Dabei
blieb ein geringer Sirup als Rückstand, der mit wenig Wasser
aufgenommen, filtriert und mit einigen Tropfen konzentrierter
Essigsäure und 5 ccm absoluten Alkohols versetzt in $\frac{1}{2}$ Liter
absoluten Alkohols eingerührt wurde. Das dabei ausgeschiedene
Pepton betrug 0,5 g. Es gab ganz schwache Millonsche
Reaktion und folgende Werte für das optische Drehvermögen
und den Zinkgehalt des Zinksalzes:

$$\alpha = -0,83^{\circ}, \quad t = 20, \quad l = 2, \quad c = 1,305 \text{ } \%.$$

Art der Drehung: nach links.

$$[\alpha]_D^{20} = -31,80^{\circ}.$$

$$0,2348 \text{ g Zinksalz gaben } 0,0300 \text{ g ZnO} = 10,27 \text{ } \% \text{ Zn.}$$

Das Zinksalz wurde durch kurzes Aufkochen der Pepton-
lösung mit Zinkoxyd und Eindampfen der vom überschüssigen
Zinkoxyd abfiltrierten Flüssigkeit dargestellt. Der gefundene
Zinkwert stimmt genügend auf das Zinksalz des Siegfriedschen
Antipeptons β ($C_{11}N_3H_{18}O_5$)₂Zn, für welches 10,73% Zn¹⁾ be-
rechnet ist.

Das Fibrinantipepton β besitzt, wie Herr Müller im hie-
sigen Laboratorium nachgewiesen hat, ein optisches Drehver-
mögen von $-32,4^{\circ}$, womit obiger Wert ($-31,8^{\circ}$) übereinstimmt.

1) M. Siegfried, B. Ber. 33, 2857. — Diese Zeitschr., Bd. XXXV, S. 173.

Es ist somit schon durch diesen I. Versuch wahrscheinlich gemacht, auch durch den ganz schwachen Ausfall der Millonschen Reaktion, daß bei der tryptischen Verdauung des Pepsinpeptons Antipepton β entsteht. Es sei noch erwähnt, daß die Zersetzung des Pepsinpeptons ganz oder fast vollständig war, da das Antipepton β nicht wesentlich mit Pepsinpepton verunreinigt auftrat. Wäre das letztere der Fall, dann müßte der gefundene Zinkwert bedeutend mehr nach 5,99%, dem Zinkgehalte des Pepsinpeptonzinksalzes, zu liegen.

c) II. Eisenniederschlag.

Durch ammoniumsulfatgesättigte Eisenammoniakalaunlösung wurde in dem durch Zufügen von konzentriertem Ammoniak ständig ganz schwach sauer gehaltenen Filtrate vom I. Eisenniederschlag der II. Eisenniederschlag gefällt. Er wurde ebenso wie der I. zersetzt und die erhaltene Peptonlösung im Vacuum eingedampft. Die Ausbeute des durch absoluten Alkohol gefällten Peptons betrug 0,9 g.

Das Zinksalz hatte folgenden Zinkgehalt:

0,2536 g Zinksalz gaben 0,0418 g ZnO = 13,24% Zn.

Für eventuell entstandenes Antipepton α mußte 11,25% Zn gefunden werden.

Für die optische Drehung wurde

$$[\alpha]_D^{20} = -8,96^\circ$$

bestimmt, wobei die Ablenkung $0,25^\circ$ nach links, die Temperatur 20° , die Rohrlänge 2 dm und der Gehalt der Lösung 1,395% betragen.

Nach der Umfällung der Substanz mit absolutem Alkohol ergab sich

$$\alpha = -0,35^\circ, t = 20^\circ, l = 2, c = 1,323$$

$$[\alpha]_D^{20} = -13,23^\circ.$$

Die Drehung stieg von -9° auf -13° . Das optische Drehvermögen des Antipeptons α aus Fibrin beträgt $-24,5^\circ$. Von einer weiteren Reinigung durch Umfällen wurde abgesehen, da die zur Verfügung stehende Substanzmenge zu gering war. Jedenfalls stellte das erhaltene Pepton kein reines Präparat dar.

Das Filtrat vom II. Eisenniederschlag befreite ich durch überschüssiges Baryumhydroxyd vom Eisen und von der Schwefelsäure, im Filtrat davon vom überschüssigen Barythydrat mit Ammoncarbonat und engte das erhaltene Filtrat bis zum Verschwinden des Ammoniakgeruches ein. Die Lösung wurde mit Schwefelsäure neutralisiert und dann durch weiteren Zusatz der Säure bis auf 5% gebracht. Durch Zufügen einer 50%igen wässerigen Phosphorwolframsäurelösung wurde ein Niederschlag gefällt, der abgesaugt und mit 5%iger Schwefelsäure gewaschen wurde.

Die Trennung der Basen geschah nach den Vorschriften von Kossel und Kutscher¹⁾ und Siegfried.²⁾

d) Der Phosphorwolframsäureniederschlag

wurde auf dem Wasserbade unter Zusatz von Ammoniak in Wasser gelöst und mit Barythydrat zersetzt. Die vom Überschusse des letzteren durch Ammoncarbonat befreite Lösung wurde fast bis zur Trockne eingedampft und nach der Aufnahme des Rückstandes mit wenig Wasser so lange mit Silbernitratlösung versetzt, bis eine Probe mit Barytwasser eben eine bräunliche Färbung zeigte. Darauf sättigte ich das Ganze in der Kälte mit Barythydrat, saugte den entstandenen geringen Silberniederschlag ab und zersetzte ihn nach dem Auswaschen mit Barytwasser durch konzentrierte Salzsäure und verdünnte Schwefelsäure. Vom Chlorsilber und Baryumsulfat wurde abfiltriert, das Filtrat mit Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag wie oben zersetzt und die erhaltene Lösung schließlich zur Trockne verdampft. Der Rückstand betrug 0,17 g. Zur Isolierung des Arginins und Histidins wurde zu dem in wenig Wasser gelösten Rückstande die berechnete Menge Silbernitrats, ferner warmer Alkohol und Äther gegeben. Es ließ sich durch Variieren der Alkohol- und Ätherzusätze keine der beiden Basen erhalten.

Das Filtrat vom Silberniederschlag wurde mit konzentrierter Salzsäure und verdünnter Schwefelsäure vom Silber und

1) Diese Zeitschr., Bd. XXXI, S. 171 ff.

2) M. Siegfried, Diese Zeitschr., Bd. XXXV, S. 184 ff.

Baryum befreit und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Durch Zersetzung dieses Niederschlages mit Barythydrat, Entfernung des letzteren mit Ammoncarbonat erhielt man eine Lösung, die zur Trockne verdampft 0,13 g Rückstand gab. Durch Zusatz der für Lysin berechneten Menge Platinchlorids, durch Zufügen von Alkohol und Äther ließ sich das charakteristische Lysinplatinchlorid nicht erhalten.

e) Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag.

Die Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure wurden mit überschüssigem Barythydrat, dieses im Filtrat der Baryumsalze durch Ammoncarbonat ausgefällt und das Filtrat vom Baryumcarbonat auf dem Wasserbade eingedampft. Durch abwechselndes Zufügen einer ammoniakalischen Silbernitratlösung und wässriger Silbernitratlösung¹⁾ zu dem mit Wasser aufgenommenen Rückstande wurde ein bräunlich-weißer Niederschlag gefällt, der sich beim Stehen dunkler färbte. Den Silberniederschlag zersetzte ich mit Salzsäure und leitete in das ziemlich weit eingeeengte Filtrat vom Chlorsilber unter guter Kühlung gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung ein. Auch nach längerem Stehenlassen, abermaligem Einleiten von Salzsäuregas und schließlichem Eindampfen der Lösung zur Trockne konnten keine Krystalle von Glutaminsäurechlorhydrat erhalten werden.

Das Filtrat vom Silberniederschlag wurde mit Schwefelammon entsilbert und zur Trockne eingedampft. Die Hauptmenge des Rückstandes erwies sich als Schwefel und Ammonnitrat. Ersterer blieb beim Behandeln des Rückstandes mit Wasser ungelöst zurück, letzteres wurde nach dem Eindampfen der Lösung mit absolutem Alkohol ausgezogen. Den Rückstand löste ich in wenig Wasser, versetzte die Flüssigkeit mit absolutem Alkohol bis zur schwachen Trübung und trug das Ganze in siedenden absoluten Alkohol ein. Am nächsten Tag hatte sich eine geringe flockige Substanz abgeschieden, deren Reinigung versucht wurde, aber erfolglos blieb. In das Filtrat von der

¹⁾ M. Siegfried, Diese Zeitschr., Bd. XXXV, S. 189.

flockigen Substanz wurde eine alkoholische Kupferacetatlösung eingetragen: es entstand ein flockiger, blauer Niederschlag, der sich als zu wenig für die Untersuchung erwies. Die alkoholische Lösung des Ammonitrats versetzte ich mit einer alkoholischen Silbernitratlösung, wobei sich ein gelbes Silber-salz ausschied. Es verschmierte unter Rot- bis Schwarzfärbung. Mit Schwefelwasserstoff wurde es entsilbert und das Filtrat vom Schwefelsilber zur Trockne eingedampft. Auch nach längerem Stehen schieden sich aus dem Sirup keine Krystalle ab.

Bei diesem ersten Verdauungsversuche wurden Tyrosin an der Hand seiner Krystallform und Antipepton β durch die optische Drehung und den Metallwert des Zinksalzes nachgewiesen. An «Pankreatin» wurden im ganzen 0,13 g auf 7 g Pepton zugesetzt, also 1,8 g auf 100 g Pepton. Die bei der Selbstverdauung des Enzyms entstandenen Produkte kamen demnach ihrer Menge nach nicht in Betracht.

2. Verdauungsversuch.

35 g trockenen Pepsinpeptons α aus Fibrin, die zur Neutralisation des Peptons nötige Menge Natriumcarbonat (ca. 5 g), 250 ccm einer 0,2%igen Natriumcarbonatlösung und 0,5 g Pankreatin-Rhenania «100» wurden unter Zusatz von Chloroform 3 Tage bei 37—40° verdaut. Wie schon beim ersten Verdauungsversuche ist auch hier die Enzymmenge zu gering, als daß ihre Spaltungsprodukte in Betracht kommen können.

a) Isolierung des Tyrosins.

Als nach 3 Tagen sich ein geringer brauner Bodensatz gebildet hatte und die überstehende Flüssigkeit eine intensive Tryptophanreaktion gab, wurde die Verdauung unterbrochen. Nach Filtration vom Bodensatz wurde mit Schwefelsäure schwach angesäuert und bei 45—50° auf dem Wasserbade bis zum Sirup eingeengt. Das ausgeschiedene Tyrosin betrug 0,43 g. Es gab bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl folgenden Wert:

	gefunden:	ber. f. Tyrosin
0,2368 g S. neutr. 14,59 ccm $\frac{1}{10}$ N-Säure;	8,61 % N	= C ₉ H ₁₁ NO ₃ : 7,75 % N.

Das unter Zusatz von Ammoniak aus Wasser umkrystallisierte Tyrosin besaß folgenden Stickstoffgehalt:

0,1760 g S. gaben 11,3 ccm tr. N bei 20° und 751,3 mm Bar.;	
gefunden:	berechnet:
7,39% N;	7,75% N.

Die Substanz war also bei der ersten Analyse noch unreinigt gewesen und erwies sich bei der zweiten als reines Tyrosin.

b) I. Eisenniederschlag.

Im Filtrate von Tyrosin wurde nach Neutralisation mit Ammoniak in der früher beschriebenen Weise der I. Eisenniederschlag gefällt, den man, wie bekannt, zersetzte. Dabei wurden 9 g Pepton erhalten, das schwache Millonsche Reaktion zeigte. Die frühere Untersuchung ließ erwarten, daß das gewonnene Präparat aus Antipepton β bestand. Folgende Analysen bestätigten dies (die Substanzen wurden über Phosphor-pentoxyd im evakuierten Exsiccator getrocknet):

		auf aschefr. S.	ber. für
	gefunden:	ber.:	Antipept β :
0,2054 g S. gaben 0,1229 g H ₂ O;	6,69% H;	6,72% H;	6,97% H.
0,3619 g C ₂ O;	48,05% C;	48,24% C;	48,35% C.
0,0008 g Asche.			

0,2274 g S. gaben 29,5 ccm tr. N bei 15,5° und 757 mm Bar.;	
gefunden:	auf aschefr. S. berechnet:
15,29% N;	15,35% N;
	berechnet:
	15,38% N.

Das Zinksalz, erhalten durch Kochen der Peptonlösung mit Zinkoxyd und Eindampfen der vom Zinkoxyd abfiltrierten Flüssigkeit, ergab folgenden Wert:

0,3444 g Zinksalz gaben 0,0446 g ZnO;	
gefunden:	berechnet f. (C ₁₁ H ₁₈ N ₃ O ₅) ₂ Zn:
10,41% Zn;	10,73% Zn.

Bestimmung der optischen Drehung.

Die Substanzen wurden über Phosphor-pentoxyd bis zum konstanten Gewichte getrocknet.

$$1. \quad \alpha = -2,24^\circ, t = 20^\circ, l = 2, c = 3,772\% ,$$

$$[\alpha]_D^{20} = -29,69^\circ .$$

$$\begin{array}{l}
 4. \quad \left. \begin{array}{l} \text{Nullpunkt: } 0,75^\circ \\ \text{nach Einschalt: } 1,97^\circ \end{array} \right\} \text{Ablenkung} = 1,22^\circ, \\
 \alpha = 1,22^\circ, t = 20^\circ, l = 2, c = 2,1665\%, \\
 [\alpha]_D^{20} = -28,16^\circ.
 \end{array}$$

Diese Werte sind niedriger als der bei dem 1. Verdauungsversuch für das optische Drehvermögen des Antipeptons β gefundene. Damals wurde $-31,8^\circ$ erhalten.

Die Peptonlösung gab, im Rohre über Nacht liegen gelassen, unter denselben Bedingungen wie oben, folgenden Polarisationswert:

$$\begin{array}{l}
 3. \quad \alpha = -1,68^\circ, \\
 [\alpha]_D^{20} = -38,74^\circ,
 \end{array}$$

nach Verlauf eines weiteren Tages:

$$\begin{array}{l}
 4. \quad \alpha = -1,70^\circ, \\
 [\alpha]_D^{20} = -39,2^\circ.
 \end{array}$$

Die Drehung war innerhalb eines Tages konstant geblieben. Um die durch das Steigen der optischen Aktivität sich kundgebende intramolekulare Umlagerung aufzuheben, wurde wie schon früher (S. 300), die Lösung mit einem in Eisessig getauchten Glasstabe eben berührt und polarisiert.

$$\begin{array}{l}
 5. \quad \alpha = -1,36^\circ, \\
 [\alpha]_D^{20} = -31,38^\circ.
 \end{array}$$

Nach Verlauf eines weiteren Tages wurde wieder polarisiert:

$$\begin{array}{l}
 6. \quad \alpha = -1,40^\circ, \\
 [\alpha]_D^{20} = -32,31^\circ.
 \end{array}$$

Durch die erwähnte Behandlung mit der Spur Essigsäure erlangte die Peptonlösung den ursprünglichen, mit dem optischen Drehvermögen des Antipeptons β ($-32,4^\circ$) übereinstimmenden Wert wieder, der auch konstant blieb.

Die Reaktionen des erhaltenen Peptons sind ebenfalls dieselben wie die des Antipeptons:

Millons Reagens: eine vorübergehende, ganz schwache Reaktion.

Essigsäure Ferrocyankalium: negativ.

Gerbsäure: Fällung, die in viel Essigsäure löslich ist.

Pikrinsäure: Fällung, die sich in der Wärme löst, beim Erkalten wieder entsteht.

Sublimat: Fällung nur in konzentrierten Lösungen.

Bleissig: keine Fällung in verdünnten Lösungen.

Phosphorwolframsäure: in verdünnter Lösung keine Fällung.

Adamkiewicz' Reaktion: positiv.

Xanthoproteinreaktion: positiv.

Metaphosphorsäure: negativ.

Molischsche Reaktion negativ.

Auch bei diesem Verdauungsversuche trat das isolierte Antipepton β , wie aus den gefundenen Zahlen und Reaktionen ersichtlich, frei von Pepsinpepton auf.

c) II. Eisenniederschlag.

Im Filtrat vom I. Eisenniederschlage wurde in bekannter Weise der II. Eisenniederschlag gefällt, aus dem 5,5 g Pepton isoliert werden konnten. Die Analyse gab folgende Werte, nachdem die Substanz bei 70° bis zur Konstanz getrocknet war:

	gefunden:	auf aschefr. S. ber.:	ber. f. Antipepton α (C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₅):
0,1936 g S. gaben	0,1200 g H ₂ O;	6,93 % H;	6,95 % H;
	0,3334 g CO ₂ ;	46,97 % C;	47,10 % C;
	0,0005 g Asche.		46,33 % C.

Für die optische Drehung erhielt ich:

$$\alpha = -0,67^\circ, t = 20^\circ, l = 1, c = 4,739\%$$

$$[\alpha]_D^{20} = -14,14^\circ.$$

Das Pepton wurde umgefällt unter Zusatz von Essigsäure und nach dem Trocknen im evakuierten Exsiccator über Phosphorpentoxyd bis zur Konstanz analysiert:

	gef.	auf aschefr. Subst. ber.	ber. für Antipept. α
0,2430 g S. gaben	0,4145 g CO ₂ ;	46,52 % C;	46,69 % C;
	0,1517 g H ₂ O;	6,98 % H;	7,00 % H;
	0,0009 g Asche;		6,56 % H.

	gef.	auf aschefr. Subst. ber.	ber. f. A. α
0,2066 g S. gaben			
29,1 ccm tr. N bei 13° u. 743 mm Bar.:	16,44 % N;	16,50 % N;	16,21 % N.

Das Baryumsalz, hergestellt durch Kochen der Peptonlösung mit frisch gefälltem Baryumcarbonat, Eindampfen des gelösten Baryumsalzes und Fällern des in wenig Wasser gelösten Rückstandes mit absolutem Alkohol, besaß nach dem Trocknen bei 70° bis zur Gewichtskonstanz folgenden Baryumgehalt:

	gef.	ber.
0,2068 g Ba-Salz gaben	0,0704 g Ba SO ₄ ;	(C ₁₀ H ₁₆ N ₃ O ₅) ₂ Ba
	20,04 % Ba;	21,03 % Ba.

Die Bestimmung der optischen Drehung ergab:

$$\alpha = -0,44^{\circ}, t = 20^{\circ}, l = 1, c = 2,4365 \text{ \%}$$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -18,07^{\circ}$$

Aus den Analysenwerten des umgefällten Peptons ist ersichtlich, daß bei der tryptischen Verdauung des Pepsinpeptons das Antipepton α Siegfrieds entstanden ist. Der Baryumgehalt stimmt zwar nicht gut, doch ist dies durch eine geringe Verunreinigung des Peptons mit Kupfer zu erklären. Das optische Drehvermögen für Antipepton α aus Fibrin hat Herr Müller im hiesigen Laboratorium zu $-24,5^{\circ}$ gefunden. Obiger Wert ist etwas zu niedrig. Doch hat Herr Müller für ein einmalig umgefälltes Antipepton auch einen niedrigeren Wert für das optische Drehvermögen, nämlich $-19,77^{\circ}$, erhalten. Dieser stieg und erreichte schließlich nach weiteren Umfällungen unter Zusatz von Essigsäure die Zahl $-24,5^{\circ}$, die dann konstant blieb.

Weitere Umfällungen, daran anschließende Analysen und optische Bestimmungen konnte ich wegen Substanzmangels nicht ausführen. Die folgenden

Reaktionen

zeigen Übereinstimmung mit denen des von Siegfried gefundenen Antipeptons:

Millons Reagens: negativ.

Essigsäure Ferrocyankalium: negativ.

Gerbsäure: Fällung, die in viel Essigsäure löslich ist.

Pikrinsäure: Fällung, die sich in der Wärme löst, beim Erkalten wieder entsteht.

Sublimat: Fällung nur in konzentrierten Lösungen.

Bleiessig: keine Fällung in verdünnten Lösungen.

Phosphorwolframsäure: in konzentrierter Lösung Fällung.

Adamkiewicz' Reaktion: positiv.

Xanthoproteinreaktion: positiv.

Metaphosphorsäure: negativ.

Molische Probe: negativ.

Der negative Ausfall der Millonschen Reaktion bestätigt weiterhin die Bildung des Antipeptons.

Das Filtrat vom II. Eisenniederschlag wurde vom Eisen und der Schwefelsäure mit Barythydrat, im Filtrat davon vom überschüssigen Baryum mit Ammoncarbonat befreit und die erhaltene Lösung bis zum Sirup eingedampft, um das Ammoncarbonat zu vertreiben. Der Sirup wurde in Wasser gelöst und mit absolutem Alkohol versetzt. Nach längerem Stehen hatte sich ein farbloser Bodensatz gebildet, der nicht aus Tyrosin bestand, auch zu gering war, um untersucht werden zu können. Im Filtrat vom Bodensatz verjagte ich den Alkohol, säuerte mit Schwefelsäure stark an und fällte mit einer 50%igen wässrigen Phosphorwolframsäurelösung die Basen aus. Ihre Trennung geschah nach den beim 1. Verdauungsversuche angegebenen Vorschriften.

d) Phosphorwolframsäureniederschlag der Basen.

Der Niederschlag wurde mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschen und wie bei der 1. Verdauung mit Barythydrat zersetzt. Das überschüssige Baryum wurde als Baryumcarbonat entfernt und die erhaltene Basenlösung nach dem Eindampfen zur Trockene und Lösen des übrigbleibenden Rückstandes in Wasser so lange mit Silbernitrat gefällt, bis ein Tropfen der Lösung mit Barytwasser eben eine gelbliche Färbung zu erkennen gab, worauf mit festem Baryumhydroxyd in der Kälte gesättigt wurde.

Silberbarytniederschlag.

Der sich allmählich schwarz färbende Niederschlag wurde nach dem Absaugen und Waschen mit gesättigtem Barytwasser mit konzentrierter Salzsäure und verdünnter Schwefelsäure unter starkem Schütteln zersetzt und die vom Silber und Baryum befreite Lösung mit Phosphorwolframsäure gefällt. Aus dem

entstandenen Niederschlage entfernte ich die Phosphorwolframsäure in bekannter Weise und dampfte die Lösung auf dem Wasserbade ein. Der Rückstand betrug 2 g.

Da der Rückstand aus Arginin und Histidin bestehen konnte, wurde nach der Methode von Kossel¹⁾ die Trennung des Histidins vom Arginin versucht.

Der Rückstand wurde in Wasser gelöst, mit konzentrierter Salpetersäure neutralisiert und die Lösung mit Silbernitrat so lange versetzt, bis sich ein Tropfen mit gesättigter Barytlösung sofort braun färbte. Dann fällte man mit verdünnter Barytlösung so lange, bis eine Probe mit ammoniakalischer Silberlösung keine Fällung mehr gab. Dieser ev. «Histidinsilberniederschlag» wurde nach dem Auswaschen mit Wasser in einer Schale mit Salzsäure verrieben. Nach der Entfernung des Chlorsilbers wurde die Lösung, fast zur Trockene eingedampft in den Exsikkator gestellt. Es erfolgte auch nach längerem Stehen keine Krystallisation. Der Rückstand wurde durch Kochen mit Wasser und wenig Tierkohle von den braunfärbenden Substanzen befreit, ließ sich aber auch dann beim Zusatz von wenig rauchender Salzsäure, Alkohol und Äther in wechselnden Mengen zu keiner Krystallisation bringen. Er gab intensive Biuretreaktion.²⁾ Seine Fällung mit Phosphorwolframsäure zeigte keine Krystallstruktur. Es war also wahrscheinlich kein Histidin gefällt worden, sondern zum größten Teil Pepton. Wegen der zu geringen Menge konnte dieses nicht weiter untersucht werden.

Das Filtrat vom «Histidinsilberniederschlag» wurde mit Barythydrat gesättigt. Den entstandenen Silberniederschlag befreite ich nach gutem Auswaschen mit Barytwasser durch Schwefelwasserstoff vom Silber, im Filtrat davon vom Baryum durch Ammoncarbonat. Nach dem Eindampfen der erhaltenen Flüssigkeit zur Trockene wurde mit Salpetersäure schwach angesäuert und ca. 1 g festen Silbernitrats und Alkohol bis zur Trübung der Lösung hinzugefügt. Es entstand ein rötlich-

¹⁾ A. Kossel, Diese Zeitschr., Bd. XXXI, S. 171 ff.

²⁾ Nach neuerdings von R. O. Herzog gemachten Angaben (Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 248) gibt auch das Histidin eine Biuretreaktion.

brauner, sehr geringer Niederschlag, der verworfen wurde. Das Filtrat von diesem Niederschlage wurde mit ca. $\frac{1}{2}$ kg Äther versetzt und stehen gelassen. Eine krystallinische Substanz schied sich ab, die sich zu verschmieren begann. Sie wurde in wenig Wasser gelöst und die Lösung mit absolutem Alkohol und Äther versetzt. Es bildete sich ein grauer, aus feinen Nadelchen bestehender Bodensatz, der sich als anorganische Substanz auswies. Das Filtrat von dem grauen Bodensatz löste ich nach dem Eindampfen zur Trockene in wenig Wasser und versetzte die Lösung mit Alkohol und Äther in wechselnden Mengen: Warzenförmige, dem Argininsilbernitrat eigene Krystalle schieden sich ab, die im Vacuum getrocknet 0,3 g Substanz ergaben. Die Silber- und Stickstoffbestimmung lieferten folgende Werte:

0,1990 g Substanz gaben 0,0686 g AgCl = 25,95 % Ag.

Berechnet für Argininsilbernitrat ($C_6H_{14}N_4O_2 \cdot NO_3H \cdot NO_3Ag$) 26,55 Ag.

0,0940 g Substanz gaben 16,1 ccm tr. N. bei 15⁰ u. 766 mm Bar. = 20,46 % N.

Berechnet für $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot NO_3H \cdot NO_3Ag$ 20,68 % N.

Die Substanz zersetzte sich bei 184⁰ (korr.). Gulewitsch¹⁾ gibt als Zersetzungspunkt 180—183⁰ an.

Die erhaltenen Krystalle bestanden demnach aus Argininsilbernitrat.

Das Filtrat vom Silberbarytniederschlag wurde mit konzentrierter Salzsäure und verdünnter Schwefelsäure vom Silber und Baryum befreit und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der entstandene Niederschlag wurde in bekannter Weise zersetzt, wobei schließlich ein sirupöser Rückstand von 2,16 g erhalten wurde. Um diesen Rückstand auf Lysin zu prüfen, wandte ich die drei Isolierungsmethoden desselben an.

1. Isolirung des Lysins als Chloroplatinat: 0,8 g des Rückstandes wurden mit der berechneten Menge Platinchlorid versetzt und über Nacht stehen gelassen. Da keine Ausscheidung erfolgt war, setzte ich absoluten Alkohol bis zur Trübung zu. Krystalle setzten sich nicht ab, wohl aber schied sich eine geringe, flockige Substanz aus, die nach dem Filtrieren verworfen wurde. Auch bei weiterem Zusatz von

1) Gulewitsch, Diese Zeitschr., Bd. XXVII, S. 200.

Alkohol und Zufügen von Äther ließen sich beim Stehen in der Winterkälte keine Krystalle von Lysinplatinchlorid erhalten.

2. Isolierung des Lysins als Pikrat¹⁾: Zu 0,47 g des Rückstandes gab ich die berechnete Menge Pikrinsäure, die in Alkohol gelöst war, und ließ längere Zeit stehen. Es entstand eine geringe, gelbe Ausscheidung, die keine krystallinische Struktur zeigte. Davon wurde abfiltriert und das Filtrat zur Trockene eingedampft. Es blieb eine gelbe, glasige Masse zurück. Keine Krystalle von Lysinpikrat schieden sich ab.

3. Isolierung des Lysins als Lysursäure: Der Rest (ca. 0,6 g) des Rückstandes wurde mit konzentrierter Salzsäure versetzt und unter guter Kühlung und starkem Schütteln mit Benzoylchlorid und Natronlauge benzoyliert. Mit konzentrierter Salzsäure wurde angesäuert und der ausgeschiedene Niederschlag, bestehend aus Benzolsäure und eventuell entstandener Lysursäure abgesaugt, mit Wasser gewaschen und über Schwefelsäure im Vacuum getrocknet. Die Benzoesäure wurde mit hochsiedendem Ligroin entfernt, wobei ein geringer Rückstand blieb. Weder durch Extraktion desselben mit Aceton in der Hitze noch bei der gleichen Behandlung mit absolutem Alkohol ließen sich in der Kälte Krystalle gewinnen. Es war also keine Lysursäure entstanden.

Der aus der Lysinfraktion der Basenverarbeitung erhaltene Sirup bestand demnach nicht aus Lysin. Damit stimmt überein, daß er starke Biuretreaktion gab, und daß seine Phosphorwolframsäurefällung nicht krystallisierte. Die starke Biuretreaktion weist auf Pepton hin.

e) Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag.

Mittels Barythydrat wurden die Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure ausgefällt. Im Filtrate davon entfernte ich mittels Ammoncarbonat das überschüssige Baryum.

Die erhaltene Lösung wurde zur Trockene verdampft, der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen und so lange Silbernitrat und ammoniakalisches Silbernitrat zugesetzt, bis

1) A. Kossel, Diese Ztschr., Bd. XXV, S. 180. — Bd. XXVI, S. 586.

kein Niederschlag mehr entstand. ¹⁾ Der Silberniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt und das Filtrat vom Silbersulfid nach dem Verjagen des Schwefelwasserstoffs durch Einengen mit Alkohol und Äther stehen gelassen. Es schieden sich keine Krystalle ab, wohl aber Schmierer. Diese löste ich in wenig Wasser und leitete unter guter Kühlung Salzsäuregas bis zur Sättigung in die Lösung. Es konnte kein Glutaminsäurechlorhydrat erhalten werden.

Das Filtrat vom Silberniederschlag wurde mit Schwefelammon entsilbert, das Schwefelsilber gut ausgekocht und die vereinigten Filtrate zur Trockene verdampft. Der Rückstand wurde mit absolutem Alkohol ausgekocht, wobei das Ammonitrat in Lösung ging, die Amidosäuren ungelöst zurückblieben. Die alkoholische Ammonitratlösung ließ auf Zusatz von alkoholischem Silbernitrat und alkoholischem Ammoniak ein gelbes, sich rasch rotfärbendes Silbersalz fallen. Durch Zersetzen mit Schwefelwasserstoff wurde daraus ein Sirup gewonnen, der keine Krystalle absetzte, aber intensive Biuretreaktion gab. Es lag demnach Pepton vor. Die Amidosäuren wurden in wenig Wasser gelöst. Dazu gab ich warmen Alkohol und trug die ganze Flüssigkeit in siedenden Alkohol ein. Die ausgeschiedene, krystallinische Substanz, die rasch verschmierte, wurde in wenig Wasser gelöst und dazu warmer Alkohol bis zur Trübung gegeben. Es bildete sich ein Bodensatz, der nicht krystallisierte, und der mit Wasser und frisch gefälltem Kupferoxyd längere Zeit gekocht wurde. Die Flüssigkeit färbte sich blau und schied auf Zusatz von Alkohol blaue Krystalle eines Kupfersalzes aus, das sich als Kupferniträt auswies. Die über dem Bodensatze stehende alkoholische Flüssigkeit wurde zur Trockne verdampft, der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen und mit frisch gefälltem anhydrischem Kupferoxydhydrat gekocht. Es ließ sich durch Zusatz von Alkohol ein Kupfersalz isolieren, welches ebenfalls aus Kupferniträt bestand. Amidosäuren konnten demnach nicht gefunden werden, mit Ausnahme des Tyrosins.

¹⁾ M. Siegfried, Diese Ztschr., Bd. XXXV, S. 189.

Bei der tryptischen Verdauung des Pepsinpeptons wurden gefunden: Tyrosin, Antipepton β und α , Arginin. Dagegen ließen sich auf keine Weise Lysin und Histidin nachweisen. Die verschiedenen Fraktionen der Basenverarbeitung bestanden hauptsächlich aus Pepton. Auch bei den Versuchen, Amidosäuren aufzufinden, stieß ich auf Pepton.

Aus der Bildung der beiden Antipeptone folgt, daß im Pepsinpepton die beiden Komplexe vorhanden sind, aus denen die beiden Antipeptone hervorgehen. Demnach enthält das Pepsinpepton mindestens zwei Antigruppen, nicht, wie Kühne annimmt, nur eine.

Das Tyrosin wird bei der tryptischen Verdauung des Pepsinpeptons als solches abgespalten.

Herrn Professor Siegfried, meinem verehrten Lehrer, sage ich für die mir bei der Ausführung meiner Arbeit gewährte Unterstützung meinen herzlichsten Dank.
