

Über Pepsinglutinpepton.

Von

M. Siegfried.

(Aus der chem. Abteilung des physiologischen Institutes der Universität Leipzig.)
(Der Redaktion zugegangen am 6. März 1914.)

Durch frühere Untersuchungen¹⁾ ist nachgewiesen worden, daß das nach der Eisenmethode dargestellte und durch Umfällen in Alkohol unter bestimmten Bedingungen gereinigte Pepsinglutinpepton den Versuchen, es in mehrere Substanzen zu zerlegen, widersteht. Durch weitgehende Fraktionierung der Baryumsalze der Peptoncarbonsäuren wurden identische Fraktionen erhalten. Es sollte jetzt in erster Linie geprüft werden, ob das Pepton auch gegenüber der Kosselschen Silberbarytmethode standhält.

Behandelt man die Lösung des Peptons nach der Vorschrift Kossels mit Silbersulfat und Barythydrat, so erhält man selbst bei Verwendung des Rohpeptons, d. h. des nicht durch wiederholtes Umfällen in Alkohol gereinigten, nur einmal gefällten Peptons, im Niederschlage nur eine geringe Peptonmenge, während bei weitem die Hauptmenge aus dem Filtrate der Silberbarytfällung gewonnen wird. Dieses aus dem Filtrate dargestellte Pepton wurde untersucht.

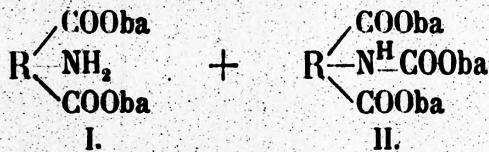
Volle Übereinstimmung zeigten die Baryumwerte der Baryumsalze mit den früher bei dem nicht mit Silberbaryt behandelten Pepton gefundenen Zahlen.

Baryumsalze von schwachen Säuren lassen sich im allgemeinen nicht dadurch herstellen, daß man die Lösung der Säuren mit Baryumcarbonat erwärmt und das Filtrat eindampft, oder daß man dieselbe mit überschüssigem Barythydrat versetzt, Kohlensäure einleitet, erwärmt und das Filtrat eindampft. Denn die Salze schwacher Säuren sind in wässriger Lösung stark hydrolysiert, sodaß die geringe Dissoziation der Kohlen-

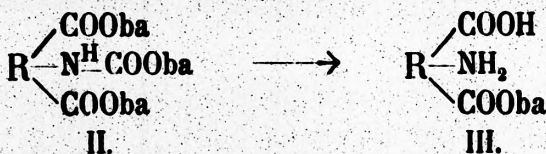
¹⁾ M. Siegfried und H. Schmitz, Diese Zeitschrift, Bd. 65, S. 295.

säure wesentlich zur Geltung kommt. So entstehen aus den bei Verwendung von Barythydrat zunächst gebildeten neutralen Salzen der einbasischen Säuren Gemische dieser Säuren und der neutralen Salze, bei mehrbasischen Säuren Gemische von neutralen Salzen, sauren Salzen und freier Säure.

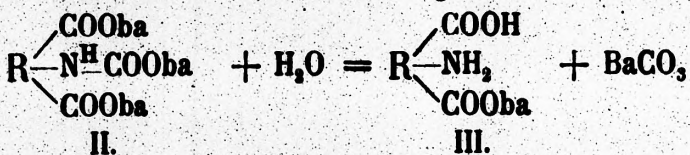
Meine Mitarbeiter und ich haben dagegen aus den Peptonen durch Barythydrat im Überschuß, Einleiten von Kohlensäure bis zur neutralen Reaktion, Erwärmen, Filtrieren und Eindampfen Baryumsalze von konstanter Zusammensetzung erhalten, und ich habe nachgewiesen, daß man auf diese Weise aus der Glutaminsäure das Baryum Salz derselben mit dem berechneten Baryumgehalte gewinnt.¹⁾ Der Grund dafür, daß sich Glutaminsäure und Peptone anders als die anderen schwachen Säuren, wie Essigsäure, verhalten, liegt in der intermediären Bildung der Salze der betreffenden Carba-minosäuren. Beim Einleiten von Kohlensäure in die baryt-alkalische Lösung hat man zunächst Gemenge von Baryum-salzen der Säure und ihren Carbaminosäuren.



Durch weitere Einwirkung der Kohlensäure wird das Salz I ebenfalls in das Salz II übergeführt, und schließlich ein Teil des letzteren durch Kohlensäure in das Salz III:



Wird dann die Mischung der Salze erwärmt, so bleibt Salz III unverändert und das Salz II geht ebenfalls in III über:



Man gewinnt also lediglich das Salz III, das einheitliche Salz der Glutaminsäure oder des Peptons.

¹⁾ M. Siegfried, Diese Zeitschrift, Bd. 45 (1905), S. 252.

So erklärt es sich, daß man konstante einheitliche Baryumsalze der Peptone erhält, wenn man die Lösung derselben mit etwas überschüssigem Barytwasser vermischt, bei gewöhnlicher oder niederer Temperatur Kohlensäure einleitet, bis die alkalische Reaktion eben verschwindet, erwärmt, filtriert, im Platintiegel eindampft und bis zum konstanten Gewichte bei 70—80° trocknet.

Nicht völlig konstante und niedrigere Werte als früher erhalten lieferten die Bestimmungen des spezifischen Drehungsvermögens der Präparate verschiedener Darstellungen. Inzwischen habe ich bei neu dargestellten Präparaten auch höhere Werte erhalten. Ob hier eine teilweise Racemisierung durch die Einwirkung des gesättigten Barytwassers stattgefunden hat, muß erst durch weitere Versuche festgestellt werden.

Gemeinschaftlich mit Schmitz hatte ich den Carbaminoquotienten $\frac{\text{CO}_2}{\text{N}}$ als $\frac{1}{7}$ gefunden. Auch die neuen Bestimmungen an Pepsinglulinpepton, das nicht mit Silberbaryt behandelt war, gaben den gleichen Quotienten. Die aus dem Filtrate der Silberbarytfällung erhaltenen Präparate von drei verschiedenen Darstellungen lieferten im Mittel von je 2 Bestimmungen für $\frac{\text{CO}_2}{\text{N}}$ die Werte: $\frac{1}{6,88}$; $\frac{1}{7,15}$; $\frac{1}{7,08}$. Die Übereinstimmung ist also eine sehr gute.

Die Werte für formoltitrierbaren Stickstoff nach Sørensen waren bisher für das Pepsinglulinpepton nicht bekannt. Deshalb wurden sie sowohl für das nicht mit Silberbaryt behandelte Pepton als auch für das aus dem Filtrat der Silberbarytfällung dargestellte Pepton ermittelt. Für ersteres wurden 12,0% bis 12,7%, für letzteres bei den Präparaten von vier verschiedenen Darstellungen 11,5% bis 12,5% vom Gesamtstickstoff gefunden. Also auch die Mengen des formoltitrierbaren sind die gleichen.

Für van Slyke-N wurden bei dem mit Silberbaryt behandelten Pepton 10,9% bis 11,6% vom Gesamt-N gefunden bei fünf Minuten langer Einwirkung des Nitritgemischs.

Die hydrolytischen Spaltungen des mit Silberbaryt behandelten Peptons ergaben bei zwei verschiedenen Spaltungs-

versuchen übereinstimmend, daß der Argininstickstoff ungefähr $\frac{1}{4}$ des Gesamtstickstoffes beträgt. Ebenso wie früher bei dem nicht mit Silberbaryt behandelten Pepton wurde kein durch Säurehydrolyse abspaltbarer Säureamidstickstoff gefunden, ebenfalls ca. 30% durch Phosphorwolframsäure fällbarer Stickstoff und von diesem die doppelte Menge des Lysinstickstoffes an Argininstickstoff. Auch die gleichen Spaltungsprodukte wurden isoliert: Arginin, Lysin, Glykokoll, Glutaminsäure, Leucin, Prolin.

Nachdem nunmehr die Werte des Pepsinglutinpeptons für den Quotienten $\frac{\text{CO}_2}{\text{N}}$, für formoltitrierbaren und van Slyke-Stickstoff sowie für die Reaktionsfähigkeit gegenüber β -Naphthalinsulfochlorid und 4-Nitrotoluol-2-sulfochlorid¹⁾ vorliegen, ist eine Diskussion derselben möglich. Es ist bekannt, daß bei der Carbaminoreaktion die NH_2 -Gruppen der Aminosäuren vollständig, die Säureamidgruppen, also auch die NH_2 -Gruppen des Guanidins und seiner Derivate überhaupt nicht,²⁾ die Peptidgruppen bis zu einem gewissen Grade³⁾ reagieren. Das höchste in dieser Beziehung untersuchte Peptid ist allerdings nur ein Tetrapeptid, sodaß wir nicht sicher behaupten können, daß auch höhere Peptide ebenfalls teilweise und, wie das bei den einfacheren Peptiden der Fall ist, entsprechend der größeren Anzahl der Peptidgruppen mehr reagieren. So haben Abderhalden und van Slyke⁴⁾ gefunden, daß diejenigen Polypeptide, in denen Glykokoll die Aminogruppe trägt, höhere als nur für die NH_2 -Gruppe berechnete Werte nach van Slyke geben, daß aber diese Differenz mit der Länge der Kette nicht zusehends abnimmt.

Gegen Formol nach Sørensen⁵⁾ reagieren die Amino-

¹⁾ M. Siegfried und Schmitz, l. c.

²⁾ M. Siegfried und C. Neumann, Diese Zeitschrift, Bd. 54 (1908), S. 423.

³⁾ M. Siegfried und H. Liebermann, Ebenda, S. 437.

⁴⁾ E. Abderhalden und D. van Slyke, Ebenda, Bd. 74 (1911), S. 505.

⁵⁾ S. P. L. Sørensen, Biochem. Zeitschrift, Bd. 7 (1908), S. 45.

gruppen ebenfalls vollständig, die Säureamidgruppen, so auch die NH_2 -Gruppen des Guanidins und seiner Derivate, nicht. Die für den Carbaminoquotienten, die für formoltitrierbaren Stickstoff und die für van Slyke-Stickstoff gefundenen Werte ergeben übereinstimmend, daß von dem Stickstoff des Pepsinglutinpeptons etwa 12% «reaktionsfähig» sind.

Von Kossel¹⁾ und seinen Schülern ist festgestellt worden, daß in den Protaminen, den einfachsten Eiweißkörpern, freie Guanidin-Amido-Gruppen des Arginins vorhanden sind, welche also weder gegen Kohlensäure noch gegen Formol, noch gegen salpetrige Säure, van Slyke, reagieren, und daß bei den Lysin enthaltenden die eine Aminogruppe der Lysinkomplexe, die also gegen Kohlensäure, Formol und salpetrige Säure vollständig reagiert, frei ist. Analog ist anzunehmen, daß auch im Pepsinglutinpepton die eine Aminogruppe des Lysins frei ist. Da etwa 12% des Gesamtstickstoffs des Pepsinglutinpeptons «reaktionsfähig» sind, so müßten, wenn dieser reaktionsfähige Stickstoff lediglich durch den Lysinkomplex bedingt wäre, etwa 24% Lysinstickstoff bei der Spaltung des Pepsinglutinpeptons erhalten werden. Dies ist aber nicht der Fall. Der Argininstickstoff des Pepsinglutinpeptons beträgt höchstens ca. ein Viertel des Gesamtstickstoffs, und der Lysinstickstoff die Hälfte des Argininstickstoffs. Somit ist die Menge des reaktionsfähigen Stickstoffs ungefähr doppelt so groß als die Hälfte des Lysinstickstoffs. Neben der freien Aminogruppe des Lysinkomplexes muß also noch eine weitere reaktionsfähige Aminogruppe angenommen werden. Dies würde mit der vor kurzem von van Slyke und Birchard²⁾ gemachten Beobachtung, daß die Menge des van Slyke-Stickstoffs bei diesen doppelt so groß als die Menge des halben Lysinstickstoffs ist, im Einklang stehen. Wenn ebenso wie in den Protaminen die Arginin-Guanidin-

¹⁾ A. Kossel und E. L. Kennaway, Diese Zeitschrift, Bd. 72 (1911), S. 486. — A. Kossel und A. P. Cameron, Ebenda, Bd. 76 (1912), S. 456. — A. Kossel und F. Weiss, Ebenda, Bd. 78 (1912), S. 402. — A. Kossel und N. Gawrilow, Ebenda, Bd. 81 (1912), S. 274.

²⁾ D. van Slyke und F. J. Birchard, Journ. of bioch. chem. Bd. 16 (1914), S. 539.

Amidogruppe im Pepsinglutinpepton frei ist, würden auf eine freie Lysin-Aminogruppe, eine freie Arginin-Amidogruppe und noch eine freie Aminogruppe vorhanden sein.

Die Analysen der Naphthalinsulfo- und Nitrotoluolsulfo-derivate des Pepsinglutinpeptons hatten es wahrscheinlich gemacht,¹⁾ daß die doppelte Anzahl derjenigen Gruppen, welche gegen Kohlensäure und Formol reagieren, mit den Säurechloriden reagieren. Man könnte diese nur gegen Säurechloride reaktionsfähigen Gruppen in Prolinkomplexen suchen, da die NH-Gruppe des Prolins gegen Säurechloride reagiert.²⁾ Aber diese Gruppe ist auch formoltitrierbar,³⁾ und nach Kossel⁴⁾ ist, weil sich das Prolin in den Protaminen gegen Formol indifferent verhält, anzunehmen, daß der Stickstoff der Prolingruppe in den Protaminen tertiär ist. Immerhin wäre es nicht ausgeschlossen, daß die NH-Gruppe des Prolinkomplexes im Eiweiß sich gegenüber Formol anders verhält als gegen Säurechloride, wenn auch das Prolin selbst gegen beide reaktionsfähig ist. Das Verhalten entsprechender Prolinpeptide gegen Formol ist meines Wissens nicht bekannt.

Experimentelles.

Der experimentelle Teil ist hauptsächlich von H. Streubel (Diss. Leipzig 1911) ausgeführt worden.

Die Darstellung

der Peptonpräparate geschah zunächst, wie von M. Siegfried und H. Schmitz angegeben. Das aus dem ersten Eisenniederschlage gewonnene Pepton wurde in vorgeschriebener Weise in Alkohol gefällt, abgesaugt, mit Alkohol sorgfältig gewaschen, über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet und ohne weitere Umfällung der Silberbarytmethode unterworfen. Hierbei wurden z. B. 15 g des Peptons in wenig Wasser gelöst so lange mit einer heiß gesättigten wässerigen Lösung von Silbersulfat vermischt, bis die Tüpfelprobe mit Barytwasser positiv ausfiel. Nach

¹⁾ M. Siegfried und H. Schmitz (l. c.)

²⁾ E. Fischer und P. Bergell, Berl. Ber., Bd. 35 (1902), S. 31779.

³⁾ Sörensen, l. c.

⁴⁾ A. Kossel und Gawrilow, l. c., S. 276.

dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde mit feingepulvertem Barythydrat (Kahlbaum, «Zur Analyse mit Garantieschein»; auch bei der Darstellung des Peptons war ausschließlich dieses Präparat verwendet worden) gesättigt, abgesaugt und der Niederschlag mit gesättigtem kaltem Barytwasser ausgewaschen. Das Filtrat, das sich schon beim Filtrieren dunkel gefärbt hatte, wurde mit Schwefelsäure angesäuert, mit Schwefelwasserstoff behandelt, der Überschuß des letzteren durch Durchleiten von Luft entfernt, das Filtrat mit kleinem Überschusse von Barythydrat SO_4 -frei gemacht, das Filtrat vom Baryumsulfat mit Ammoncarbonat versetzt, das barytfreie Filtrat im Vakuum eingedampft. Der in wenig Wasser unter Zusatz eines Kubikzentimeters Eisessig gelöste Rückstand wurde in die hundertfache Menge absoluten Alkohols unter schnellem Rühren mittels Motors eintropfen gelassen. Das Pepton fällt äußerst fein aus und läßt sich deshalb nur sehr langsam absaugen. Nach sorgfältigem Waschen mit absolutem Alkohol wurde es über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet.

Zu allen Bestimmungen wurde das Pepton im trockenen Luftstrom bei der Siedetemperatur des Äthylalkohols unter Benutzung des früher beschriebenen Trockenapparates bis zum konstanten Gewichte getrocknet, was in der Regel bei tags und nachts ununterbrochenem Trocknen acht Tage und länger dauerte. Aus 1 kg Gelatine erhielten wir nach Anwendung der Silberbarytmethode meist ca. 30 g exsikkatortrockenes Pepton.

1. Baryumsalz.

Auch zur Darstellung des Baryumsalzes ist es unbedingt notwendig, das Pepton vor der Verwendung in einzelnen Schiffchen verteilt in oben angegebener Weise bei Siedetemperatur des Alkohols bis zum konstanten Gewichte zu trocknen; damit jede Spur Ammonsalz in das Pepton übergeführt wird.

Die Salze wurden durch Zusatz von Barytwasser zur Peptonlösung, Einleiten von Kohlensäure, bis eben die Reaktion nur schwach alkalisch war, Erwärmen auf dem Wasserbade, Filtrieren, Eindampfen in gewogenen Platintiegeln und Trocknen bis zum konstanten Gewichte bei $70-80^\circ$ dargestellt.

Analysen:

1. 0,2115 g Ba-Salz gaben 0,0361 g BaSO₄. Ba = 10,05%.
2. 0,2129 „ „ „ 0,0363 „ „ „ = 10,00%.

2. Spezifisches Drehungsvermögen.

Für $[\alpha]_D^{20}$ wurden bei den Präparaten von drei verschiedenen Darstellungen erhalten: — 72,33°; — 70,95°; — 71,64°; — 67,57°; — 65,81°; — 66,15°; — 68,86°; 70,00°. Diese Werte differieren einigermaßen untereinander und sind niedriger als die von Schmitz und mir für das nicht aus dem Filtrate der Silberbarytfällung dargestellte Pepton gewonnenen (— 81,67° im Durchschnitt).

3. Der Carbaminoquotient $\frac{CO_2}{N}$.

Auch vor der Bestimmung dieses Quotienten muß das Pepton in oben beschriebener Weise getrocknet werden.

Zunächst wurden zwei Bestimmungen an einem nicht mit Silberbaryt behandelten Peptonpräparat, das neu dargestellt war, ausgeführt. Die Werte stimmen mit den früher erhaltenen überein.

1. 0,0552 g CaCO₃ = 39,30 ccm n_{10} -S n. Kj. CO₂:N = 1:7,12.
2. 0,0604 „ „ = 42,46 „ „ „ „ CO₂:N = 1:7,03.

Entsprechende Werte lieferten die Bestimmungen mit den Präparaten von drei verschiedenen Darstellungen unter Anwendung der Silberbarytmethode.

- | | | | | | |
|------------------|----|----------------------------|---|-----------------------|-----------------------------|
| II. Darstellung: | a) | 0,0557 g CaCO ₃ | = | 37,0 ccm n_{10} -S. | CO ₂ :N = 1:6,64 |
| | b) | 0,0428 „ | = | 30,5 „ | CO ₂ :N = 1:7,12 |
| III. | a) | 0,0590 „ | = | 43,05 „ | CO ₂ :N = 1:7,29 |
| | b) | 0,0411 „ | = | 28,80 „ | CO ₂ :N = 1:7,00 |
| IV. | a) | 0,0502 „ | = | 35,2 „ | CO ₂ :N = 1:7,01 |
| | b) | 0,0653 „ | = | 45,75 „ | CO ₂ :N = 1:7,15 |

4. Die Formoltitrierung nach Sørensen.

Die Bestimmungen wurden sowohl an Pepton, das nicht mit Silberbaryt behandelt war, als auch an solchen Präparaten, die aus dem Filtrate des Silberbarytniederschlags dargestellt waren, ausgeführt.

Abgewogene Mengen des wie oben beschrieben auf einzelnen Schiffchen bis zum konstanten Gewichte getrockneten Peptons wurden in Maßkölbchen gelöst. Gleiche Teile der Lösung wurden erstens unter Zusatz von Alizarin als Indikator, zweitens nach Zusatz der Formolmischung unter Verwendung von Thymolphthalein titriert; die bei der ersten Titrierung erhaltenen Werte wurden von den bei der zweiten gewonnenen abgezogen. Die angegebenen Gewichte des Peptons sind die in der abgemessenen Menge der Lösung enthaltenen des Peptons.

Als Stickstoffgehalt des Peptons wurde der im Mittel von 3 Bestimmungen erhaltene 17,6% der Berechnung der Prozente des Formol-N vom Gesamt-N zugrunde gelegt.

A. Pepsinglutinpepton, nicht mit Silberbaryt behandelt
(IV. Darstellung).

1.	0,3865 g Pepton erf.	3,02 ccm n_{10} -NaOH.	Formol-N: 12,5% des Ges.-N
2.	0,2700 » » »	2,06 » » »	12,0% » » »
3.	0,8843 » » »	6,98 » » »	12,7% » » »

B. Pepsinglutinpepton aus dem Filtrate des Silberbaryt-Niederschlages.

I. Darstellung:

1.	0,2126 g Pepton erf.	1,54 ccm n_{10} -NaOH.	Formol-N: 11,5% des Ges.-N
2.	0,3186 » » »	2,42 » » »	12,1% » » »
3.	0,5137 » » »	3,83 » » »	11,8% » » »

II. Darstellung:

1.	0,5138 g Pepton erf.	3,87 ccm n_{10} -NaOH.	Formol-N: 11,9% des Ges.-N
2.	0,4050 » » »	3,09 » » »	12,2% » » »

III. Darstellung:

1.	0,3537 g Pepton erf.	2,79 ccm n_{10} -NaOH.	Formol-N: 12,5% des Ges.-N
2.	0,3537 » » »	2,74 » » »	12,4% » » »

Übereinstimmende Werte habe ich bei Bestimmungen an einem kürzlich von Herrn Dr. R. Zimmermann hergestellten, mit Silberbaryt behandelten Pepton erhalten. Hierbei wurden die Lösungen zunächst unter Tüpfeln auf Lackmuspapier neutralisiert, dann mit Formolmischung versetzt und nach Zusatz der Thymolphthaleinlösung titriert.

1.	0,6606 g Pepton erf.	9,5 ccm n_{10} -NaOH.	Formol-N: 11,5% des Ges.-N
2.	0,4599 » » »	7,1 » » »	12,3% » » »

5. Stickstoffbestimmung nach van Slyke.

Diese Bestimmungen wurden von R. Zimmermann an dem kürzlich dargestellten mit Silberbaryt behandelten Pepton ausgeführt. Dauer der Einwirkung der salpetrigen Säure: ca. 5 Minuten.

1. 0,2062 g Pepton lief. 7,1 ccm N, 744 mm Bar., 20° T. = 10,9% v. Ges.-N.
2. 10 ccm einer Peptonlösung, von der je 5 ccm nach Kjeldahl 22,1 und 22,2 ccm n_{10} -S. erf., lieferten nach van Slyke 12,4 ccm N bei 747 mm Bar., 20° v. Sl.-N = 11,19% v. Ges.-N.
3. 10 ccm derselben Lösung lieferten nach van Slyke 12,8 ccm N bei 747 mm Bar., 20° v. Sl.-N = 11,59% v. Ges.-N.

6. Spaltungen des aus dem Filtrate der Silberbarytfällung dargestellten Pepsinglutinpeptons.

I. Spaltung. Ca. 9 g, wie oben beschrieben auf Schiffchen bis zum konstanten Gewicht getrocknetes Pepton der ersten Darstellung wurden 12 Stunden mit der Mischung von 50 ccm Wasser und 25 g konzentrierter Schwefelsäure vor dem Rückflußkühler gekocht. Die mit Wasser verdünnte und filtrierte Lösung wurde auf 500 ccm aufgefüllt.

Gesamt-N. 10 ccm der Lösung erfordern nach Kjeldahl im Mittel von 3 Bestimmungen 20,45 ccm n_{10} -Säure.

Säureamid-N. Je 20 ccm erfordern bei der Destillation mit Magnesia usta nach Müller¹⁾ 0,1 ccm und 0,3 ccm. Ammoniak hatte sich also bei der Säurehydrolyse nur in Spuren gebildet. Säureamid-N fehlt also auch diesem Pepton.

Arginin-N. Je 25 ccm der Spaltungslösung erforderten im Silberbarytniederschlage nach Kjeldahl a) 13,5 ccm, b) 13,8 ccm, c) 12,0 ccm n_{10} -Säure. Mittel aus a und b: 13,65 ccm = 26,7% vom Gesamt-N.

Der durch Phosphorwolframsäure fällbare Stickstoff.

Korrektionswert:²⁾ je 500 ccm Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlage erforderten 8,4 und 8,3 ccm n_{10} -Säure nach Kjeldahl = 16,7 ccm pro Liter Filtrat, 8,37 ccm für Waschflüssigkeit.

¹⁾ F. Müller, Diese Zeitschrift, Bd. 38 (1903), S. 286.

²⁾ M. Siegfried, Diese Zeitschrift, Bd. 43 (1904), S. 557.

Je 25 ccm der Spaltungslösung wurden in vorgeschriebener Weise mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, der Niederschlag unter Messung des Filtrates und der Waschflüssigkeit getrennt mit 5% PWS—5% H_2SO_4 ausgewaschen und kjeldahlisiert. Verbraucht korr. a) 14,72 ccm und b) 15,02 ccm n_{10} -Säure = 29,1% vom Gesamtstickstoff.

II. Spaltung. Ca. 5 g des mit Silberbaryt behandelten Peptons der dritten Darstellung, auf Schiffchen wie oben angegeben bis zum konstanten Gewichte bei ca. 70° getrocknet, 12 Stunden mit 40 ccm Wasser + 20 g konzentrierter Schwefelsäure gekocht. Auf 500 ccm aufgefüllt.

Gesamt-N. 10 ccm erforderten im Mittel nach Kjeldahl 12,73 ccm n_{10} -Säure.

Arginin-N. Die Silberbarytniederschläge von je 50 ccm der Lösung erforderten a) 16,8, b) 17,0 ccm n_{10} -Säure nach Kjeldahl = 26,5% vom Gesamt-N.

Verteilung des durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffs auf Arginin und Lysin.

315 ccm der Spaltungslösung wurden nach Zusatz des halben Volumens Wasser zunächst mit 10%iger, dann mit 30%iger und schließlich wieder mit 10%iger Lösung von mit Äther gereinigter Phosphorwolframsäure versetzt, bis eben kein Niederschlag mehr entstand, die Mischung auf dem Wasserbade erwärmt und andern Tags abgesaugt und mit 5% PWS—5% H_2SO_4 ausgewaschen. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde in Wasser von ca. 40° verteilt und nach Zusatz von etwas Ammoniak mit einem geringen Überschusse von Barythydrat zersetzt; das Filtrat vom Barytniederschlage nach Ausfällung des überschüssigen Barythydrates durch etwas Ammoncarbonat und Filtrieren auf dem Wasserbade eingedampft und wiederholt zur völligen Entfernung des Ammoniaks mit Wasser abgedampft. Von der auf 250 ccm gebrachten Lösung erforderten 25 ccm im Mittel 8,9 ccm n_{10} -Säure nach Kjeldahl. Der Silberbarytniederschlag von 25 ccm derselben Lösung erforderte 6,2 ccm n_{10} -Säure. Hieraus berechnet sich Arginin-N = 69,6% von dem durch PWS fällbaren N.

Bei der gleichen Bestimmung unter Verwendung eines kürzlich dargestellten Präparates habe ich für Arginin-N: 67,2% des durch Phosphorwolframsäure fällbaren N erhalten. Auch bei dem aus dem Filtrate der Silberbarytfällung dargestellten Peptone verhält sich also Arginin-N: Lysin N = 2 : 1.

Isolierung der Spaltungsprodukte.

Als Spaltungsprodukte des Pepsinglutinpeptons waren früher Arginin, Lysin, Glykokoll, Glutaminsäure, Leucin und Prolin nachgewiesen worden. Es sollte geprüft werden, ob das mit Silberbaryt behandelte Pepton dieselben Produkte bei der Hydrolyse liefert.

Das zu dem Spaltungsversuche verwendete Pepton (ca. 35%) wurde nicht erst mit Alkohol gefällt und dann mit Silberbaryt behandelt, sondern es wurde das durch Verdampfen der aus dem umgefällten Eisenniederschlage erhaltenen Lösung im Vakuum gewonnene Pepton in Wasser gelöst und direkt mit Silberbaryt behandelt. Aus dem Filtrate des Silberbarytniederschlages wurde dann wie beschrieben das Pepton dargestellt und durch Fällen in Alkohol gereinigt. Es wurde mit der Mischung von 250 ccm Wasser und 125 g Schwefelsäure 12 Stunden gekocht. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser auf 2,5 l verdünnt und mit Phosphorwolframsäure gerade ausgefällt. Durch Erwärmen auf dem Wasserbade ging die Fällung fast völlig in Lösung. Am andern Tage wurde der Krystallbrei abgesaugt und mit 5%iger PWS—5% H_2SO_4 ausgewaschen. Aus dem Phosphorwolframsäureniederschlage wurden Arginin als Silber-salz, Lysin als Platinsalz isoliert.

Argininsilbernitrat. Es wurden 2,6 g aus Alkohol und Äther krystallisiertes Salz mit 25,95% Ag erhalten. Dasselbe wurde nochmals umkrystallisiert. Fp. 181°.

1. 0,1821 g Substanz gaben 0,0479 g Ag = 26,30%.

2. 0,1605 „ „ „ 0,0429 „ „ = 26,71%. Ber. 26,50%.

Lysin. Das Filtrat des Arginin-Silberbarytniederschlages wurde mit Salzsäure vom Silber, durch Schwefelsäure vom Baryum befreit, auf 5% Schwefelsäure gebracht und mit

Phosphorwolframsäure ausgefällt. Aus diesem Niederschlage wurden nach Eindampfen und Trocknen über Schwefelsäure 2,1 g basischen Lysins gewonnen. Von der auf 100 ccm aufgefüllten wässrigen Lösung wurden 25 ccm stark eingengt mit 2 g geschmolzenem Platinchlorid versetzt und das Lysinplatinchlorid durch Alkohol und Äther krystallisiert. Nach nochmaligem Umkrystallisieren gaben

1. 0,1834 g über Schwefelsäure im Vakuum getrocknete Substanz:

$$0,0596 \text{ g Pt} = 32,51\%$$

$$\text{Ber. für } C_6H_{14}N_2O_2 \cdot PtCl_6H_2 + C_2H_5OH: \text{Pt} = 32,37\%$$

2. 0,1603 g bei 110° getrockn. Substanz: 0,0559 Pt = 34,87%

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

Das aus dem Filtrate des Phosphorwolframsäureniederschlages erhaltene Aminosäuregemisch wurde zur Abscheidung der Glutaminsäure und des Glykokolls carbaminiert. Zu den in wenig Wasser gelösten Aminosäuren wurden 1,8 l eisgekühltes, gesättigtes Barytwasser gegeben und nach Zusatz von etwas Phenolphthalein unter Eiskühlung Kohlensäure bis zum Verblässen der roten Färbung eingeleitet. Hierauf 90 g feingepulvertes Barythydrat eingerührt und Kohlensäure wieder bis zur schwach alkalischen Reaktion, schließlich mit Barytwasser stark alkalisch gemacht, abgenutscht, mit eisgekühltem halbgesättigten Barytwasser gewaschen. Das Filtrat wurde noch zweimal, nach Zusatz von 90 g und 45 g Barythydrat carbaminiert und nach Zusatz von Barytwasser abgesaugt. Der wie der erste Niederschlag gewaschene zweite Niederschlag wurde mit dem ersten vereinigt in Wasser suspendiert und nach Zusatz von Ammoniumcarbonat auf dem Wasserbade zersetzt. Der durch Eindampfen des Filtrats vom Baryumcarbonat erhaltene Rückstand wurde in wenig Salzsäure gelöst und unter Eiskühlung mit Salzsäure gesättigt. Allmählich wurden in verschiedenen Krystallisationen im ganzen 6,8 g Glutaminsäurechlorhydrat gewonnen. Das umkrystallisierte Chlorhydrat schmolz bei 206—208°.

1. 0,1715 g Substanz gaben 0,1358 g AgCl. Cl = 19,58%

$$\text{Ber. für } C_5H_9NO_4 \cdot HCl = 19,34\%$$

2. 0,2333 g Substanz erf. 12,55 ccm $\frac{N}{10}$ -S. N = 7,53%

$$\text{Ber. für } C_5H_9NO_4 \cdot HCl = 7,63\%$$

Das Filtrat des Glutaminsäurechlorhydrates wurde mit Wasser eingengt und der ausgeschiedene Krystallbrei vom Glykokollchlorhydrat abgesaugt und anhaltend mit Aceton gewaschen. Nach Verbrauch von ca. 1 g Aceton war das Chlorhydrat fast farblos. Aus diesem Chlorhydrate wurde durch Krystallisieren aus warmem ammoniakalischen Alkohol und Umkrystallisieren Glykokoll Fp. 236—238° erhalten.

1. 0,2247 g Substanz gaben 0,2668 g CO_2 und 0,1369 g H_2O .

2. 0,2147 „ „ erf. 28,65 ccm $n_{10}^{\circ}\text{-S}$.

Gefunden:	Ber. für $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$:
C = 32,37%	32,00%
H = 6,78%	6,71%
N = 18,90%	18,66%

Aus dem Filtrate der Carbaminoniederschläge wurden Aminosäuren gewonnen, die durch fortgesetztes Behandeln mit Alkohol in eine in Alkohol lösliche und unlösliche Fraktion zerlegt wurden. Aus letzterer wurde Leucin erhalten, das bei 264—265° schmolz und folgende Werte bei der Analyse gab:

1. 0,2811 g Substanz erf. 21,04 ccm $n_{10}^{\circ}\text{-S}$.

2. 0,1948 „ „ gaben 0,1702 g H_2O und 0,3896 g CO_2 .

Gefunden:	Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$:
C = 54,62%	54,96%
H = 9,81%	9,92%
N = 10,44%	10,68%

Ein Teil des Leucins wurde in das Kupfersalz übergeführt. Dieses war in viel warmem Methylalkohol fast völlig löslich.

Die aus der alkoholischen Fraktion erhaltenen Krystalle wurden, da sie voraussichtlich aus Prolin bestanden, im Bombenrohr zur Racemisierung mit Baryhydrat erhitzt. Da das Rohr explodierte, war eine weitere Untersuchung nicht möglich.

Das Prolin wurde aber als Kupfersalz aus dem Filtrate des Phosphorwolframsäureniederschlags der Spaltung der 9 g Pepton erster Darstellung isoliert. Auch hier lieferten die Carbaminoniederschläge Glykokoll und Glutaminsäure, von denen das erstere als Kupfersalz isoliert und durch Analysen charakterisiert wurde.

Aus dem Filtrate der Carbaminofällung wurde Prolin erhalten, das nach Racemisierung durch Erhitzen mit Barythydrat bei ca. 150° in das Kupfersalz übergeführt wurde. Das hellblaue Salz wurde schon beim Trocknen über Schwefelsäure etwas violett, noch mehr beim Trocknen im Trockenschrank bei 110° .

I. 0,1090 g Substanz verloren bei 110° 0,0119 g = 10,92%.

2 H₂O ber. für C₁₀H₁₆N₂O₄Cu + 2 H₂O = 10,99%.

II. 0,0971 g bei 110° getr. Substanz gaben 0,0268 g CuO. Cu = 22,05%.

Ber. für C₁₀H₁₆N₂O₄Cu: Cu = 21,79%.

Somit sind als Spaltungsprodukte des aus dem Filtrate der Silberbarytfällung dargestellten Pepsinglutinpeptons: Arginin, Lysin, Glutaminsäure, Glykokoll, Leucin und Prolin isoliert worden.