

Zur Kenntnis des Pepsin-Glutinpeptons.

Von

M. Siegfried und H. Schmitz.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Universität Leipzig.)

(Der Redaktion zugegangen am 10. März 1910.)

Im Jahre 1904 ist unter der Leitung des einen von uns von Scheermesser¹⁾ mittels der Eisenmethode ein Pepsin-Glutinpepton dargestellt worden, das relativ einfach zu sein scheint und deshalb zu weiterer Untersuchung besonders einladet. Von Scheermesser wurden eine Reihe von Tatsachen aufgefunden, welche für die Einheitlichkeit des Peptons sprechen. Ehe wir an weitere Untersuchungen des Peptons herantraten, stellten wir uns die Aufgabe, von neuem die Einheitlichkeit desselben zu prüfen; es war dies besonders deshalb geboten, weil inzwischen in der fraktionierten Fällung mit Hilfe der Carbaminoreaktion ein neuer und ausgezeichneter Weg für diese Prüfung gegeben war.

I. Darstellung des Peptons.

Die Darstellung geschah im allgemeinen wie früher. Ausgangsmaterial war die beste Marke Hautgelatine von Theuerkauf und Scheibner in Leipzig. 1 kg Gelatine, 15 l Wasser, 245 ccm 25%iger Salzsäure, 5 g Pepsin Grübler, Toluol. Die Verdauungsflüssigkeit wurde Tag und Nacht ununterbrochen gerührt. Nach je 5 Tagen weitere 5 g Pepsin. Sobald die Lösung Kongopapier nicht mehr bläute (in der Regel nach 3 Tagen) wurde soviel 2%ige Salzsäure zugesetzt, bis die ganze Flüssigkeit 0,3% freie HCl enthielt. Nach 8 Tagen wird die Kongoreaktion wieder sehr schwach, es wird soviel 2%ige

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 68 (1904).

Salzsäure zugegeben, bis der Gehalt an freier Salzsäure 0,2% beträgt. Nach abermaligem Verschwinden der Kongoreaktion (nach weiteren 12 Tagen) wird die Flüssigkeit durch Zusatz 2%iger Salzsäure auf einen Gehalt von 0,1% freier Salzsäure gebracht. Nach 30 Tagen wird meist die Maximalausbeute an Pepton erhalten.

Die Kontrolle der Verdauung, d. h. die approximative Bestimmung des während der Verdauung gebildeten Peptons wurde wie früher durch Titration mit Ferriammonsulfat in ammoniumsulfatgesättigter Lösung vorgenommen, jedoch war diesmal die Titerflüssigkeit durch Auflösen von 10 g Ferriammonsulfat und 200 g Ammoniumsulfat in 250 ccm Wasser hergestellt.

Bei der weiteren Verarbeitung der Verdauungslösung wurden keine Abweichungen vorgenommen. Das als schneeweißes Pulver gefällte, mit absolutem Alkohol sorgfältig gewaschene und über Schwefelsäure getrocknete Pepton wurde umgefällt, indem auf 10 g Pepton 20 ccm Wasser und 1 ccm 25%iger Essigsäure zur Lösung verwendet wurden, und diese mit 15 ccm absoluten Alkohols vermischte Lösung in 2 l absoluten Alkohols verrührt wurden.

In 4 Darstellungen wurden an umgefälltem Pepton erhalten: 1. 25 g, 2. 40 g, 3. 35 g, 4. 35 g.

II. Beweise der Einheitlichkeit des Pepsin-Glutinpeptons.

1. Die Präparate der verschiedenen Darstellungen besitzen die gleiche elementare Zusammensetzung, welche mit der der von Scheermesser dargestellten Präparate übereinstimmt.

Analysen.

Die auf Schiffchen abgewogenen Substanzmengen werden zunächst im Vakuum über Schwefelsäure mehrere Tage getrocknet. — Wird die in größeren Mengen nach dem Absaugen erhaltene Substanz über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet und dann gleich im Schiffchen bei 70°, so kommt es vor, daß infolge der Anwesenheit von Alkohol eine teilweise Veresterung

eintritt. — Hierauf wird im Siegfriedschen Trockenapparate unter Verwendung von Äthylalkohol als Siedemittel bis zum konstanten Gewichte getrocknet. Konstanz des Gewichtes wird angenommen, wenn innerhalb 48 Stunden die Differenz der Gewichte höchstens 0,0002 g beträgt. Alle Wägungen geschehen im geschlossenen Wägegläschen.

Bei den Verbrennungen wird eine ca. 10 cm lange Schicht gekörnten, im Wasserstoffstrome reduzierten Kupfers im Rohr eingelegt, jedoch vor dieselbe nach den Absorptionsgefäßen zu wieder eine Schicht Kupferoxyd.

I. Darstellung.

1. 0,3328 g Substanz erfordern 41,2 ccm n_{10}° -S.
2. 0,2250 » » » 27,5 » »
3. 0,1868 » » gaben 0,3270 g CO_2 und 0,1120 g H_2O .
4. 0,1141 » » » 0,1996 » » » 0,0708 » »

II. Darstellung.

5. 0,2604 g Substanz erfordern 32,1 ccm n_{10}° -S.
6. 0,2466 » » » 30,1 » »
7. 0,1820 » » gaben 0,3181 g CO_2 und 0,1098 g H_2O .
8. 0,1244 » » » 0,2166 » » » 0,0734 » »

III. Darstellung.

9. 0,3468 g Substanz erfordern 43,5 ccm n_{10}° -S.
10. 0,2968 » » gaben 0,5195 g CO_2 und 0,1698 g H_2O .

IV. Darstellung.

11. 0,1294 g Substanz erfordern 16,2 ccm n_{10}° -S.
12. 0,1268 » » gaben 0,2162 g CO_2 und 0,0776 g H_2O .
13. 0,1520 » » » 0,2658 » » » 0,0910 » »

$\frac{g}{\%}$	I. Dar- stellung	II. Dar- stellung	III. Dar- stellung	IV. Dar- stellung	Mittel
C	47,74; 47,71	47,67; 47,49	47,74	47,49; 47,69	47,65
H	6,71; 6,94	6,75; 6,51	6,40	6,85; 6,70	6,69
N	17,33; 17,11	17,25; 17,04	17,56	17,53	17,30

Im folgenden sind die Werte zusammengestellt, welche Scheermesser bei umgefällten Präparaten erhalten hat.¹⁾ Bei Parallelanalysen ist der Durchschnitt der Resultate angegeben.

¹⁾ l. c., S. 80.

%	III. Darstellung			IV. Darstellung			V. Darstellung		Mittel
	Einmal umgefällt	Zweimal umgefällt	Dreimal umgefällt	Einmal umgefällt	Zweimal umgefällt	Dreimal umgefällt	Einmal umgefällt	Zweimal umgefällt	
C	47,88	47,87	47,82	47,63	47,93	47,73	47,97	48,01	47,85
H	6,81	6,85	6,70	6,66	6,78	6,67	6,68	6,74	6,74
N	16,81	16,78	17,36	17,11	17,06	17,03	16,77	16,45	16,92

Wir sind uns bewußt, daß die Übereinstimmung der elementaren Zusammensetzung allein nicht die Reinheit des Peptons beweist, da die Zusammensetzung der durch Verdauung erhaltenen Peptone nicht sehr verschieden ist. Immerhin ist es nicht wahrscheinlich, daß bei 12 in 7 verschiedenen Verdauungsversuchen erhaltenen Präparaten Gemenge von übereinstimmender Zusammensetzung erhalten werden.

Hierzu kommt, daß die Baryumwerte der nach der früher gegebenen Vorschrift dargestellten Baryumsalze der Präparate aller Darstellungen übereinstimmen.

Zur Darstellung dieser Baryumsalze muß genau nach folgender Vorschrift verfahren werden: Das Pepton wird wie zur Elementaranalyse und zur Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens auf Schiffchen erst mehrere Tage über Schwefelsäure im Vakuum und dann bei 70° im Trockenapparate bis zum konstanten Gewichte getrocknet. Vorteilhaft benutzt man gleich die zur Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens verwendeten Lösungen. In die Peptonlösung wird nach Zusatz von etwas Barytwasser so lange, nicht länger, Kohlensäure eingeleitet, bis Lackmuspapier kaum alkalisch reagiert, darauf wird aufgeköcht und das klare Filtrat im gewogenen Platintiegel auf dem Wasserbade eingedampft. Zur Analyse wurden die in Platintiegeln eingedampften Baryumsalze bei 70–80° bis zum konstanten Gewichte getrocknet.

I. Darstellung.

0,3418 g Substanz gaben 0,0583 g BaSO₄ = 10,04% Ba.
 0,6526 " " " 0,1080 " " = 9,74% "

II. Darstellung.

0,0852 g Substanz gaben 0,0142 g BaSO₄ = 9,81% Ba.

0,0778 „ „ „ 0,0134 „ = 10,13%

III. Darstellung.

0,4910 g Substanz gaben 0,0850 g BaSO₄ = 10,19% Ba.

IV. Darstellung.

0,4206 g Substanz gaben 0,0708 g BaSO₄ = 9,91% Ba.

2. Die Präparate der verschiedenen Darstellungen besitzen das gleiche optische Drehungsvermögen.

Eine ganz besonders empfindliche Konstante für die Peptone ist das spezifische Drehungsvermögen. Dasselbe differiert für die aus verschiedenen Proteinkörpern nach der gleichen Methode, der Eisenmethode, erhaltenen Peptone zwischen 24,5 und 100, also im Gegensatz zur prozentigen Zusammensetzung in sehr weiten Grenzen. Wenn wie bei diesem Peptone das spezifische Drehungsvermögen über 80° ist, so kann man nicht annehmen, daß bei verschiedenen Darstellungen, bei denen nur ca. 4% des Ausgangsmaterials an Pepton gewonnen werden, und die erhaltenen Präparate zweimal in großen Mengen Alkohol gefällt werden, Produkte von gleichem spezifischen Drehungsvermögen erhalten werden, wenn ein Gemenge vorliegt.

Die Präparate wurden, wie für die Elementaranalyse, bis zum konstanten Gewichte getrocknet. Hier ist erst recht die größte Sorgfalt auf sachgemäßes Trocknen zu legen. Die untersuchten Peptonlösungen waren wasserklar und völlig farblos. Selbst bei 20 cm langer Schicht sind die Lösungen von reinem Wasser nicht zu unterscheiden.

I. Darstellung.

1. $c = 3,1420$, $l = 1$, $t = 20^\circ$, $a = -2,56^\circ (+0,01)$, $[\alpha]_D^{20} = -81,47^\circ$.

2. $c = 1,7540$, $l = 1$, $t = 20^\circ$, $a = -1,44^\circ (+0,02)$, $[\alpha]_D^{20} = -82,10^\circ$.

II. Darstellung.

$c = 1,9300$, $l = 1$, $t = 20^\circ$, $a = -1,57^\circ (+0,02)$, $[\alpha]_D^{20} = -81,35^\circ$.

III. Darstellung.

$c = 1,7470$, $l = 2$, $t = 20^\circ$, $a = -2,84^\circ (+0,01)$, $[\alpha]_D^{20} = -81,28^\circ$.

IV. Darstellung.

$c = 1,4850$, $l = 2$, $t = 20^\circ$, $a = -2,44^\circ (+0,02)$, $[\alpha]_D^{20} = -82,15^\circ$.

Nach Beendigung der Untersuchung waren die von den einzelnen Darstellungen übrigen Peptonmengen vereinigt aufgehoben worden. Etwa 1 Jahr nach der Darstellung derselben ist dann von dem einen von uns (S.) das optische Drehungsvermögen bestimmt worden:

$$c = 0,9384, l = 2, t = 20^{\circ}, \alpha = -1,55^{\circ} (\pm 0,01), [\alpha]_D^{20} = -82,58^{\circ}.$$

Das Drehungsvermögen hatte sich also auch nach ca. einjähriger Aufbewahrung des Peptons nicht geändert.

3. Die fraktionierte Fällung als Baryumsalze der Peptoncarbonsäuren führt zu gleichem, mit dem Ausgangsmaterial identischem Pepton.

Die Peptone geben ebenso wie die einfachen Aminosäuren die Carbaminoreaktion. Wird diese bei Gegenwart von Barythydrat ausgeführt, so entstehen allmählich die Baryumsalze der Peptoncarbonsäuren. Die Baryumsalze der einfachen Carbaminsäuren haben verschiedene Löslichkeit. So ist das glykokollcarbonsaure Baryum unter gleichen Bedingungen fast unlöslich, unter denen das Baryum Salz der Alanincarbonensäure ganz in Lösung bleibt. Auf diese Weise läßt sich Glykokoll vom Alanin fast vollkommen trennen.¹⁾ Ebenso hat sich die Methode im hiesigen Laboratorium zur Isolierung von Leucin, das leicht lösliches Baryumcarbaminat bildet, aus der Leucinfraction bewährt. Wie auf Seite 316 gezeigt werden wird, wird die Glutaminsäure quantitativ als Baryum Salz ihrer Carbaminsäure abgeschieden. Der eine von uns arbeitet mit Herrn Schutt diese Methode der Trennung von Aminosäuren systematisch aus. Besonders geeignet ist die Methode für die Peptonchemie dadurch geworden, daß, wie abgeschlossene, demnächst zu veröffentlichende Versuche gezeigt haben, aus Peptongemischen durch sie Fraktionen erhalten werden, welche verschieden sind, namentlich im spezifischen Drehungsvermögen stark differieren, während aus einheitlichen Peptonen identische Fraktionen gewonnen werden. Deshalb läßt sich mit der Methode entscheiden, ob ein Pepton einheitlich ist oder nicht.

¹⁾ M. Siegfried, Berl. Ber., Bd. XXXIX, S. 397 (1906).

Fraktionierung eines Peptongemisches mittels der Carbaminoreaktion.

Wir haben selbst noch mit einem Peptongemische, das Pepsinglutinpepton reichlich enthielt, einen Versuch angestellt, um von neuem zu prüfen, ob Peptongemische bei der Fraktionierung mit der Carbaminoreaktion in voneinander verschiedene Produkte zerfallen.

Roh-Pepsin-Glutinpepton, durch Eindampfen der alkoholischen Mutterlauge einer Peptondarstellung im Vakuum erhalten, wurde mit 5 g Pepsin-Fibrinpepton vereinigt, in Wasser gelöst und durch Einrühren in absoluten Alkohol gefällt. Nach Absaugen, Waschen mit Alkohol und Trocknen über Schwefelsäure im Vakuum wurden 10 g Peptongemisch erhalten.

$$c = 1,2040, t = 20^{\circ}, l = 2, \alpha = -1,65^{\circ} (\pm 0,02), [\alpha]_{D}^{20} = 68,52^{\circ}.$$

Zu dieser Bestimmung und den folgenden wurden die Substanzen mit den oben für das Trocknen des reinen Pepsin-Glutinpeptons beobachteten Kautelen getrocknet.

In die Lösung von 8 g des Peptongemisches in 150 ccm kalt gesättigten Barytwassers wurde unter Eiskühlung Kohlensäure bis zur schwach alkalischen Reaktion eingeleitet, darauf wurden 4 g feingepulvertes Baryumoxydhydrat durch Schütteln in der Mischung gelöst, wieder Kohlensäure bis zur schwach alkalischen Reaktion eingeleitet, wieder mit 4 g Barythydrat geschüttelt, Kohlensäure eingeleitet und nach Schütteln mit weiteren 7 g Barythydrat abgesaugt und der Niederschlag I mit Barytwasser gewaschen. Im Filtrate wurden 2,5 g Barythydrat aufgelöst, Kohlensäure eingeleitet, dann 2,5 g Barythydrat, Kohlensäure, dann 5 g Barythydrat. Der entstandene Niederschlag II wurde wieder abgesaugt und mit Barytwasser gewaschen.

Niederschlag I, Niederschlag II und das Filtrat wurden getrennt bei 40°, unter Zusatz von Ammoniumcarbonat zerlegt, die erhaltenen Lösungen der Peptonfraktionen im Vakuum eingedampft und durch Einrühren in absoluten Alkohol gefällt.

I. Fraktion.

$$c = 0,9590, t = 20^{\circ}, l = 2, \alpha = -1,09^{\circ}, [\alpha]_{D}^{20} = -56,86^{\circ}.$$

II. Fraktion.

$c = 0.9800$, $t = 20^\circ$, $l = 2$, $\alpha = -1,23^\circ (\pm 0.01)$, $[\alpha]_D^{20} = -62,76^\circ$.

III. Fraktion.

$c = 0.7610$, $t = 20^\circ$, $l = 2$, $\alpha = -1,20^\circ (\pm 0,01)$, $[\alpha]_D^{20} = -78,83^\circ$.

Man sieht also, daß durch die Fraktionierung mit Hilfe der Carbaminoreaktion aus dem Peptongemenge verschiedene Produkte erhalten wurden.

Fraktionierung des Pepsin-Glutinpeptons mittels der Carbaminoreaktion.

I. Versuch. Zu der konzentrierten Lösung von 10 g Pepton der ersten Darstellung wurden 200 ccm kaltgesättigter Barytlösung gegeben: Kohlensäure unter Eiskühlung bis zur schwach alkalischen Reaktion eingeleitet. Nach Zusatz von 100 ccm Barytlösung wurde abgesaugt und mit eisgekühltem Barytwasser nachgewaschen = Niederschlag I.

Das Filtrat vom Niederschlage I wurde, wie in dem Versuche mit dem Peptongemische angegeben, abwechselnd mit Barythydrat und Kohlensäure unter Eiskühlung behandelt; es wurden 30 g, dann 20 g gepulvertes Barythydrat verwendet und schließlich vor dem Absaugen 200 ccm gesättigtes Barytwasser dazugegeben. Das Filtrat vom Niederschlage II wurde der Reihe nach mit 30, 30 und 15 g Barythydrat geschüttelt und nach jedem Zusatze desselben mit Kohlensäure fast neutralisiert = Niederschlag III.

Aus den Niederschlägen I, II und III, sowie aus dem Filtrate vom Niederschlage III wurde, wie oben angegeben, das Pepton isoliert: es wurden somit 4 Fraktionen erhalten.

I. Fraktion.

1. 0,1301 g Baryumsalz gaben 0,0238 g $\text{BaSO}_4 = 10,76\%$ Ba.

2. $c = 1,7520$, $t = 20^\circ$, $l = 1$, $\alpha = -1,14^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = -65,07^\circ$.

II. Fraktion.

1. 0,1836 g Baryumsalz gaben 0,0314 g $\text{BaSO}_4 = 10,03\%$ Ba.

2. $c = 1,8890$, $t = 20^\circ$, $l = 1$, $\alpha = -1,54^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = -81,53^\circ$.

III. Fraktion.

1. 0,1342 g Baryumsalz gaben 0,02224 g $\text{BaSO}_4 = 9,82\%$ Ba.

2. $c = 2,5310$, $t = 20^\circ$, $l = 1$, $\alpha = -2,08^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = -82,18^\circ$.

IV. Fraktion.

1. 0,1356 g Baryumsalz gaben 0,0234 g $\text{BaSO}_4 = 10,15\%$ Ba.

2. $c = 1,6470$, $t = 20^\circ$, $l = 1$, $a = -1,35^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = -81,96^\circ$.

Man sieht, daß das Pepton der ersten Fraktion, deren Menge übrigens nur $0,4 \text{ g} = 4\%$ des zur Fraktionierung verwendeten Peptons betrug, einen etwas höheren Ba-Gehalt des Baryumsalzes und ein wesentlich niedrigeres Drehungsvermögen als die Peptone der anderen Fraktionen und das Ausgangsmaterial ($[\alpha]_D^{20} = -81,79^\circ$, Ba = $10,05\%$) besaß. Spuren von Verunreinigungen sind in dieser ersten Fraktion ausgeschieden worden, und bei der Empfindlichkeit des spezifischen Drehungsvermögens machen sie sich stark geltend. Hingegen sind die Fraktionen II bis IV identisch, sie stimmen im Baryumgehalt ihrer Baryumsalze sowie im spezifischen Drehungsvermögen überein.

II. Versuch. 30 g Pepton der II. Darstellung in 600 ccm Barytwassers gelöst, bis zum I. Niederschlag: Kohlensäure, 15 g Barythydrat, Kohlensäure, 15 g Barythydrat, Kohlensäure, 30 g Barythydrat: bis zum II. Niederschlage: Kohlensäure, 20 g Barythydrat, Kohlensäure, 20 g Barythydrat, Kohlensäure, 40 g Barythydrat: bis zum III. Niederschlage: Kohlensäure, 25 g Barythydrat, Kohlensäure, 25 g Barythydrat, Kohlensäure, 50 g Barythydrat: bis zum IV. Niederschlage: Kohlensäure, 30 g Barythydrat, Kohlensäure, 30 g Barythydrat, Kohlensäure, 60 g Barythydrat: bis zum V. Niederschlage: Kohlensäure, 35 g Barythydrat, Kohlensäure, 35 g Barythydrat, Kohlensäure, 70 g Barythydrat.

Aus diesen 5 Niederschlägen und dem Filtrate der fünften wurden durch Zersetzen mit Wasser unter Zusatz von Ammoniumcarbonat bei 40° , Eindampfen der Peptonlösung im Vakuum, Fällen durch Eingießen in absoluten Alkohol und Trocknen über Schwefelsäure 6 Fraktionen des Peptons erhalten, welche folgende Werte gaben:

I. Fraktion.

1. $c = 1,1350$, $t = 20^\circ$, $l = 2$, $a = -1,50^\circ (+0,02)$, $[\alpha]_D^{20} = -66,07^\circ$.

2. $c = 1,4180$, $t = 20^\circ$, $l = 2$, $a = -1,85^\circ (+0,02)$, $[\alpha]_D^{20} = -65,23^\circ$.

3. 0,2300 g Baryumsalz gaben 0,0406 g $\text{BaSO}_4 = 10,39\%$ Ba.

II. Fraktion.

1. $c = 1,6490$, $t = 20^\circ$, $l = 2$, $\alpha = -2,69^\circ (\pm 0,04)$, $[\alpha]_D^{20} = -81,56^\circ$
2. 0,2714 g Baryumsalz gaben 0,0462 g $\text{BaSO}_4 = 10,02\%$ Ba.

III. Fraktion.

1. $c = 1,0640$, $t = 20^\circ$, $l = 2$, $\alpha = -1,72^\circ (\pm 0,01)$, $[\alpha]_D^{20} = -80,83^\circ$
2. 0,1882 g Baryumsalz gaben 0,0319 g $\text{BaSO}_4 = 9,98\%$ Ba.

IV. Fraktion.

1. $c = 0,8900$, $t = 20^\circ$, $l = 2$, $\alpha = -1,45^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = -81,46^\circ$
2. 0,1385 g Baryumsalz gaben 0,0237 g $\text{BaSO}_4 = 10,07\%$ Ba.

V. Fraktion.

1. $c = 1,2970$, $t = 20^\circ$, $l = 2$, $\alpha = -2,08^\circ (\pm 0,02)$, $[\alpha]_D^{20} = -80,18^\circ$
2. 0,1960 g Baryumsalz gaben 0,0336 g $\text{BaSO}_4 = 10,09\%$ Ba.

VI. Fraktion.

1. $c = 1,1090$, $t = 20^\circ$, $l = 2$, $\alpha = -1,80^\circ (\pm 0,01)$, $[\alpha]_D^{20} = -81,15^\circ$
2. 0,2121 g Baryumsalz gaben 0,0362 g $\text{BaSO}_4 = 10,04\%$ Ba.

Die Ausbeuten an Pepton betragen bei diesem Versuche:

I. Fraktion	4 g	= 13,5%	des angewendeten	Peptons
II. "	3,5 "	= 11,7%	"	"
III. "	6,5 "	= 21,7%	"	"
IV. "	3 "	= 10 %	"	"
V. "	3,5 "	= 11,7%	"	"
VI. "	3,5 "	= 11,7%	"	"
Gesamt: 24,0 g		= 80%	"	"

Auch hier lieferte die I. Fraktion ein Baryumsalz von etwas höherem Baryumgehalt als der des Baryumsalzes des Ausgangsmateriales (10,13%), und zwar ist die Differenz sehr gering (+ 0,26), hingegen differiert das spezifische Drehungsvermögen dieser Fraktion wieder bedeutend (— 65,7 statt — 81,3).

Hingegen sind die II. bis VI. Fraktion völlig identisch, die Baryumwerte der Baryumsalze sowohl wie die Werte des spezifischen Drehungsvermögens stimmen unter sich und mit den Werten des Ausgangsmateriales überein.

Also auch bei der so weitgehenden Fraktionierung hat sich das Pepsin-Glutinpepton als Individuum erwiesen.

4. Die Peptonpräparate der verschiedenen Darstellungen und Fraktionen besitzen den gleichen Quotienten $\frac{\text{CO}_2}{\text{N}} \left(= \frac{1}{7} \right)$.

Bekanntlich ist der Quotient $\frac{\text{CO}_2}{\text{N}}$ für intermediäre Eiweißspaltungsprodukte eine der wichtigsten, neben dem spezifischen Drehungsvermögen wohl die wichtigste Konstante. Er ist sehr genau bestimmbar und differiert bedeutend bei den verschiedenen Körpern. Für Dipeptide wurde er zu 1 : 1,63 bis 1 : 1,79 gefunden,¹⁾ beim Tetrapeptid Triglycylglycin 1 : 3,29, bei letzterem also ungefähr halb so groß wie bei ersterem. Das sind also etwa ebensgroße Unterschiede, als wenn der Kohlenstoffgehalt von 2 ähnlichen Verbindungen bei der einen 30%, bei der anderen 60% beträge.

Hätte man bei der Hydrolyse eines Eiweißkörpers ca. 4% des Ausgangsmateriales einer Mischung ähnlicher Körper, etwa zweier Aminosäuren, von denen die eine 30, die andere 60% C besitze, dadurch erhalten, daß man die Hauptmenge der übrigen Spaltprodukte durch eine Fällungsreaktion — entsprechend hier der Ausfällung der Albumosen durch Ammoniumsulfat — abgeschieden und die beiden Aminosäuren etwa als Silbersalze niedergeschlagen, dann aus den Silbersalzen die Aminosäuren und aus diesen wieder die Silbersalze dargestellt, aus diesen die Aminosäuren gewonnen, diese durch Einrühren in große Mengen Alkohol in feinen Körnchen gefällt, sie wieder gelöst und wieder in Alkohol in feinen Körnchen gefällt, wer würde es für möglich halten, daß das so erhaltene Produkt bei 4 von Anfang an verschiedenen Darstellungen jedesmal genau ein und dieselben Werte für C, etwa 45% liefern würde? Und daß, wenn man dieses Aminosäuregemenge als Baryumsalze ihrer Carbaminsäuren in eine Reihe von Fraktionen zerlegte, die aus den einzelnen Fraktionen gewonnenen Produkte ebenfalls wieder 45% C bei der Elementaranalyse geben würden?

¹⁾ M. Siegfried und H. Liebermann, Diese Zeitschr., Bd. LIV, S. 437 (1908).

Nun aber besitzt das Pepsin-Glutinpepton gar den Quotienten $\frac{1}{7}$, d. h. die Zahl x ist 7 mal so groß wie beim Glykoll und etwa 4 mal so groß wie bei Dipeptiden, und bei 4 von Grund an verschiedenen Darstellungen wurde derselbe Quotient gefunden und ebenso bei den 2 durch die Carbaminoreaktion erhaltenen Fraktionen, bei denen er bestimmt wurde!

Bestimmung des Quotienten $\frac{\text{CO}_2}{\text{N}}$.

Auch hier wurden die Substanzen unter den oben angegebenen Kautelen in einzelnen Schiffchen bis zum konstanten Gewicht getrocknet, was unbedingt notwendig ist, um jede Spur Ammoniak zu beseitigen.

$$\frac{\text{CO}_2}{\text{N}} = \frac{1}{x}$$

Pepton der	g CaCO ₃	ccm n/10-Säure	x
I. Darstellung	0,0210	14,7	7,00
	0,1056	74,1	7,02
	0,1328	92,8	6,99
II. Darstellung	0,0330	23,1	7,00
	0,0468	33,0	7,05
III. Darstellung	0,0640	45,4	7,09
IV. Darstellung	0,0384	26,85	6,99
III. Fraktion der Fällung als Ba-Carbaminopepton (S. 304)	0,0448	29,8	6,65
	0,0226	15,5	6,80
IV. Fraktion der Fällung als Ba-Carbaminopepton (S. 304)	0,0284	19,6	6,90
	0,0350	24,1	6,88

Durch die sub 1—4 mitgeteilten Resultate ist nun definitiv der Beweis geführt, daß das Pepsin-Glutinpepton ein einheitlicher Körper ist.

Jetzt ist die Möglichkeit gegeben, durch das Studium dieses immer noch recht komplizierten Moleküles einen Schritt weiter in der Kenntnis der Konstitution des Eiweißes vorzudringen.

III. β -Naphthalinsulfo- und o-Nitrotoluolsulfoderivate des Pepsin-Glutinpeptons.

Die Tatsache, daß das Pepsin-Glutinpepton den Quotienten $\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{7}$ besitzt, kann verschieden erklärt werden. An und für sich kann dies bedeuten, daß von 7 N-Atomen eins, oder etwa von 21 N-Atomen 3 reagieren. Wir wissen aber, daß bei der Carbaminoreaktion auch die Peptidgruppen bis zu einem gewissen Grade reagieren. Trifft also die nächstliegende Annahme, daß im Pepsin-Glutinpepton Peptidgruppen vorhanden sind, zu, so würde die Zahl 7 für x bedeuten, daß von einer größeren Anzahl als 7 N-Atomen eins quantitativ reagiert, also eine NH_2 -Gruppe bildet, und außerdem teilweise die Peptidgruppen. Wenn wir Peptide bei der Hydrolyse von Proteinkörpern erhalten, namentlich wenn die Hydrolyse durch Säuren geschieht, so ist damit nicht bewiesen, daß die Peptidgruppen im Ausgangskörper vorhanden sind. Die beständige Glycylglycincarbonsäure besitzt keine Peptidgruppe¹⁾ und reagiert daher überhaupt nicht bei der Carbaminoreaktion.²⁾ Und doch entsteht sie über den Ester aus dem Glycylglycin, einem Peptid.

Durch Darstellung des β -Naphthalinsulfo- und Orthonitrotoluolsulfoderivates hofften wir zu erfahren, welche Gruppen bei der Carbaminoreaktion an der Bindung der Kohlensäure beteiligt wären. Es war zu erwarten, daß, wenn lediglich von 7 N-Atomen das einer Aminogruppe reagiert, auf 7 N-Atome auch 1 Naphthalinsulfo- bzw. Orthonitrotoluolsulfogruppe in das Molekül des Peptons eintritt, während, wenn Peptidgruppen bei der Carbaminoreaktion beteiligt sind, 1 Naphthalinsulfo- bzw. Orthonitrotoluolsulfogruppe auf mehr als 7 N-Atome eintritt.

β -Naphthalinsulfopepsinglutinpepton.

Bei der Möglichkeit, für hochmolekulare Körper aus den feststehenden Analysenwerten mehrere Formeln zu berechnen,

¹⁾ H. Leuchs und W. Manasse, Berl. Ber., Bd. XL, S. 3235 (1907).

²⁾ M. Siegfried und H. Liebermann, Diese Zeitschrift, Bd. LIV, S. 443 (1908).

ist es nicht tunlich, Formeln aufzustellen. Wenn wir hier die schon von Scheermesser berechnete einfachste Formel $C_{23}H_{39}N_7O_{10}$ benutzen, so geschieht dies lediglich, um einen Ausdruck der procentischen Zusammensetzung für die Diskussion der Versuche zur Verfügung zu haben. Nach dem, was oben gesagt worden ist, sind auch aus der Tatsache, daß der Quotient $\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{7}$ gefunden wurde, keine Schlüsse auf die Berechtigung der gerade 7 N-Atome enthaltenden Formel zu ziehen und ist etwa anzunehmen, daß die wahre Formel ein Vielfaches dieser einfachsten Formel sein müsse.

Zur Darstellung des β -Naphthalinsulfopepsin-Glutinpeptons wurden auf je $C_{23}H_{39}N_7O_{10}$ 4 Moleküle β -Naphthalinsulfochlorid genommen. Die von der ätherischen Lösung getrennte alkalische Lösung wurde in verdünnte Salzsäure gegossen, wobei sich die Substanz als amorphe Körnchen ausschied. Die abgeseugte und mit Wasser chlorfrei gewaschene Substanz wurde über Schwefelsäure bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Ausbeute 70% der Theorie. Löslich in viel heißem Wasser, Alkohol, Eisessig, Aceton. Fp. 205—210°. Die Verbindung wurde dreimal und zwar aus Peptonpräparaten dreier Darstellungen hergestellt.

Analysen.

Die Substanzen wurden über Schwefelsäure bis zum konstanten Gewicht getrocknet und in der Silberschale mit Ätznatron (e natrio) und Salpeter verschmolzen.

- I. Darstellung aus dem Pepton der ersten Darstellung:
0,2476 g gaben 0,1228 g $BaSO_4$. S = 6,81%.
 - II. Darstellung aus dem Pepton der dritten Darstellung:
0,2152 g Substanz gaben 0,1092 g $BaSO_4$. S = 6,97%.
 - III. Darstellung aus dem Pepton der fünften Fraktion der zweiten Carbaminofraktionierung:
0,2526 g Substanz gaben 0,1238 g $BaSO_4$. S = 6,73%.
- Es berechnet sich für $C_{10}H_7SO_2 \cdot C_{23}H_{38}N_7O_{10}$: S = 4,19%.
- „ „ „ „ $(C_{10}H_7SO_2)_2 \cdot C_{23}H_{37}N_7O_{10}$: S = 6,72%.

Es haben also auf die einfachste Formel des Peptons berechnet 2 Moleküle β -Naphthalinsulfochlorid reagiert.

4-Nitrotoluol-2-sulfopepsinglutinpepton.

Das Derivat wurde zweimal analog dem β -Naphthalin-sulfoderivat dargestellt.

Der Körper ist löslich in siedendem Alkohol, Eisessig, Aceton. Fp. 165° — 170° .

Analysen der über Schwefelsäure bis zum konstanten Gewichte getrockneten Substanz:

I. Darstellung aus Pepton der ersten Darstellung:

0,3688 g Substanz gaben 0,1714 g BaSO_4 . S = 6,38%.

II. Darstellung aus Pepton der dritten Fraktion der zweiten Carbaminofraktionierung:

0,2452 g Substanz gaben 0,1174 g BaSO_4 . S = 6,57%.

S berechnet für $(\text{C}_6\text{H}_3\text{NO}_2\text{CH}_3\text{SO}_2)_2 \cdot \text{C}_{43}\text{H}_{37}\text{N}_7\text{O}_{10}$ = 6,58%.

Sowohl die Analysen des Naphthalinsulfoderivates als die des Nitrotoluolsulfoderivates haben somit ergeben, daß 2 Moleküle der Chloride auf 7 Atome N des Peptons reagiert haben, also ein Resultat, das mit keinem der beiden erwarteten übereinstimmt. Hieraus ist zu schließen, daß noch andere als NH_2 -Gruppen des Peptons, welche die Carbaminoreaktion geben, mit den Chloriden reagiert haben; es ist an Hydroxylgruppen zu denken, dabei aber zu berücksichtigen, daß die Tyrosin-Gruppe dem Pepsinglutinpepton fehlt.

IV. Hydrolyse des Pepsin-Glutinpeptons durch Schwefelsäure.

1. Der durch Phosphorwolframsäure fällbare und nicht fällbare N.

Es ist nicht angängig, den nach der sog. Hausmannschen Methode erhaltenen, durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoff als den Stickstoff der Hexonbasen in Rechnung zu setzen; denn wir wissen nicht, was dieser Phosphorwolframsäureniederschlag enthält. Wohl aber ist die von dem einen von uns modifizierte Methode sehr geeignet, um in den Werten des durch Phosphorwolframsäure fällbaren und nicht fällbaren Stickstoffs wertvolle Konstanten für das Ausgangsmaterial zu schaffen. Allerdings ist es notwendig, genau die vorgeschriebenen¹⁾ Bedingungen einzuhalten.

¹⁾ M. Siegfried, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 57 (1904).

2 g Pepton wurden auf Schiffchen verteilt im Apparate unter Anwendung von Alkohol als Siedemittel bis zum konstanten Gewichte getrocknet. Dies ist auch hier nötig, um das Pepton sicher ammoniakfrei zu erhalten.

Mit 50 ccm Wasser + 25 g konzentrierter Schwefelsäure 12 Stunden am Rückflußkühler gekocht: auf 200 ccm aufgefüllt.

1. 10 ccm der Lösung verbr. nach Kjeldahl 12,3 ccm $\frac{1}{10}$ -S } 12,4 ccm
2. 10 " " " " " " } im Mittel.

Korrektionswert: 500 ccm der Mutterlauge erfordern a) 8,3 ccm.
b) 8,1 ccm, im Mittel für 1000 ccm 16,4 ccm.

1. 40 ccm der Spaltungslösung erfordern im Niederschlage 12,2 ccm $\frac{1}{10}$ -S
im Filtrate 36,5

2. 40 " " " " " " Niederschlage 12,3
im Filtrate 36,7

Niederschlag im Mittel: 12,25 ccm. Korrektion für 100 ccm Filtrat und 50 ccm Waschflüssigkeit + 2,05 ccm.

Korr. ccm für Niederschlag 14,3 ccm = 28,8% vom Gesamt-N.

Filtrat im Mittel 36,6 ccm, Korrektion - 2,05 ccm = korr. 34,55 ccm = 69,7% vom Gesamt-N.

NH₃-N wurde ebenso wie früher von Scheermesser nicht gefunden.

2. Isolierung und Bestimmung der Spaltungsprodukte.

Erste Spaltung. 20 g Pepton der III. Darstellung mit der Mischung von 150 ccm Wasser und 75 g konzentrierter Schwefelsäure 12 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Nach Verdünnen mit ca. gleichem Volumen Wasser von Spuren Huminsubstanzen filtriert und auf 500 ccm aufgefüllt.

Gesamt-N: je 5 ccm erfordern a) 24,6 ccm, b) 24,3 ccm, c) 24,5 ccm, d) 24,3 ccm: im Mittel 24,43 ccm $\frac{1}{10}$ -S.

Der Rest der Lösung (480 ccm) wurde auf 1440 ccm mit Wasser verdünnt, sodaß die Lösung 5% Schwefelsäure enthielt. Mit zunächst 50 ccm 10%iger, dann 200 ccm 30%iger und schließlich 20 ccm 10%iger Phosphorwolframsäurelösung gerade ausgefällt, das Ganze auf dem Wasserbade erwärmt, nach 16 stündigem Stehen bei 20° abgenutscht, mit 200 ccm 5%iger PWS + 5%iger H₂SO₄ ausgewaschen. Der PWS-Niederschlag unter Zusatz von Ammoniak in Wasser auf dem

Wasserbade gelöst, mit Barythydrat im geringen Überschusse versetzt. Niederschlag abgenutscht, mit heißem Wasser ausgewaschen, zweimal von der Nutsche genommen und mit heißem Wasser verrieben, wieder abgenutscht, mit heißem Wasser ausgewaschen. Die vereinigten Filtrate und Waschwässer mit Ammoncarbonat vom geringen Barytüberschusse befreit, filtriert, eingedampft, wiederholt mit Wasser eingedampft, in Wasser gelöst, auf 250 ccm aufgefüllt.

10 ccm der Lösung erfordern nach Kjeldahl:

a) 26,7 ccm, b) 26,7 ccm $\frac{1}{10}$ -S.

Arginin-N. Die Bestimmung geschah nach Kossel mit Silbersulfat und Barythydrat; der Silberbarytniederschlag wurde kjeldahlisiert.

Je 10 ccm der Lösung gaben eine Silberbarytfällung, die a) 18,4 ccm, b) 18,6 ccm $\frac{1}{10}$ -S erforderten, im Mittel also 18,5 ccm.

$$\frac{18.5 \cdot 25 \cdot 500 \cdot 100}{2443 \cdot 480} = 19.7\%$$

vom Gesamt-N, also rund $\frac{1}{5}$. Wenn also das Arginin quantitativ aus einem vorgebildeten Argininkomplexe entsteht, so müßte, da das Arginin 4 N-Atome besitzt, das Pepton wenigstens 20 Atome N im Moleküle enthalten, die empirische Zusammensetzung also etwa der dreifachen Formel der oben angeführten einfachsten entsprechen.

Wenn, was nicht bekannt ist, in diesem Falle durch Phosphorwolframsäure außer Arginin nur Lysin gefällt wird, beträgt, da 69,3% Arginin-N von dem durch Phosphorwolframsäure fällbaren N gefunden wurde, der Lysin-N ca. 31%: es würde dann auf 1 Molekül Arginin 1 Molekül Lysin kommen.

Die Isolierung des Arginins und Lysins als Salze ist schon von Scheermesser geschehen.

Die Verarbeitung des Filtrates vom Phosphorwolframsäureniederschlage.

Das Filtrat wurde mit Barythydrat (pro analysi, Kahlbaum, alkalifrei) in kleinem Überschusse ausgefällt, der Niederschlag abgenutscht, sorgfältig mit heißem Wasser gewaschen, von der Nutsche genommen, mit heißem Wasser verrieben, wieder abgesaugt und gewaschen. Die vereinigten Filtrate und

Waschwässer wurden mit Ammoniumcarbonat vom Barytüberschusse befreit, eingedampft, wiederholt mit Wasser eingedampft, in Wasser gelöst und auf 200 ccm aufgefüllt.

Wir haben zunächst den prozentischen Stickstoffgehalt des in der Lösung vorhandenen Substanzgemenges ermittelt, um zu sehen, ob N-reiche oder -arme Aminosäuren darin prävalieren. Zu dem Zwecke wurden parallel je 2 ccm der Lösung in Wägegläschen eingedampft und bei 80° bis zum konstanten Gewicht getrocknet, darauf der Rückstand, dessen Gewicht also bekannt war, kjeldahlisiert.

1. 0,1452 g Substanz erfordern 17,0 ccm n_{10} -S. N = 16,39%.
2. 0,1430 " " " 16,8 " " = 16,46%.

Da die stickstoffreichste Aminosäure, welche sich in dem Filtrate vom Phosphorwolframsäureniederschlag finden konnte, das Glykokoll, 18,6% N enthält, deuten diese Zahlen darauf hin, daß Glykokoll in großen Mengen vorhanden sein mußte.

Hierauf wurde die Lösung (195 ccm) eingedampft und der dünne Sirup mit Salzsäure gesättigt, mit einem winzigen Krystall Glutaminsäurechlorhydrat geimpft und 14 Tage im Eisschrank (+ 4°) aufbewahrt. Das auskrystallisierte Glutaminsäurechlorhydrat wurde auf Glaswolle abgesaugt und mit eiskalter rauchender Salzsäure farblos gewaschen. Nach dem Trocknen über Kalihydrat betrug die Menge 1,7 g.

Aus der Mutterlauge wurde nach Einengen in gleicher Weise 1,5 g Chlorhydrat gewonnen. Zur Identifizierung wurde jede Fraktion für sich aus Wasser durch Sättigen mit Salzsäure unkrystallisiert, abgesaugt, mit rauchender Salzsäure gewaschen und über Ätzkali bis zum konstanten Gewichte getrocknet.

I. Fraktion.

1. 0,2124 g erfordern 12,0 ccm n_{10} -S nach Kjeldahl.

2. Substanz in 20%iger Salzsäure gelöst, $c = 2,4950$, $t = 20^\circ$, $l = 2$, $\alpha = + 1,16^\circ (\pm 0,01)$.

II. Fraktion.

0,1834 g erfordern 10,2 ccm n_{10} -S.

Gefunden:

N 7,91%, 7,79%

Berechnet:

7,64%

$[\alpha]_D^{20} + 28,94^\circ$ (für Glutaminsäure berechnet).

Angegeben: $[\alpha]_D^{20} = \text{E. Fischer und Th. Dörpinghaus}^1)$
 $+ 30,85^\circ + 28,21^\circ + 31,91^\circ$; E. Fischer und R. H. Aders²⁾
 $+ 28,21^\circ$, Fr. Müller³⁾ $+ 28,21^\circ$.

Im ganzen waren also 3,2 g Glutaminsäurechlorhydrat erhalten worden, das entspricht 0,2292 g N und 164 ccm n_{10} -S.

Somit beträgt nach diesem Versuche der Glutaminsäure-N
 $\frac{164 \cdot 200 \cdot 100 \cdot 500}{195 \cdot 24,43 \cdot 100 \cdot 480} = 7,2\%$ vom Gesamt-N.

Das Filtrat vom Glutaminsäurehydrat wurde eingeeengt und ohne vorheriges Sättigen mit Salzsäure im Eisschrank aufbewahrt. Die ganze Masse erstarrte zum Krystallbrei. Derselbe wurde abgenutscht, mit Aceton farblos gewaschen, die Krystalle aus Wasser + Aceton umkrystallisiert. Die Analyse ergab N = 17,92%, Cl = 44,87%, berechnet für Glykokollchlorhydrat N = 12,61%, Cl = 31,53%. Sie erwiesen sich ammoniakalisch. Durch wiederholtes Umkrystallisieren aus ammoniakalischem verdünntem Alkohol wurde reines Glykokoll erhalten.

Fp. 240° . Eine mit Glykokoll zusammengeriebene Probe gab den gleichen Schmelzpunkt.

0,1040 g Substanz erfordern 13,7 ccm n_{10} -S.

Gefunden: Berechnet für $\text{CH}_2 \cdot \text{NH}_2 \cdot \text{COOH}$:

N. 18,44% 18,66%.

Zur vollständigen Abscheidung des Glykokolls wurde die Carbaminoreaktion benutzt.

Das Filtrat vom Glykokollchlorhydrat wurde mit Silbersulfat, Schwefelwasserstoff, Barythydrat, Ammoniumcarbonat behandelt; der durch Eindampfen des letzten Filtrates erhaltene Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst, mit 1 l kalt gesättigter Barytlösung vermischt; in Eis gekühlt, etwas Phenolphthalein, Kohlensäure bis zur schwach alkalischen Reaktion eingeleitet. Mit Barytwasser bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt, 12 Stunden bei 0° stehen gelassen. Nach dieser Zeit war die Reaktion wieder schwach alkalisch geworden; es wurde wieder Barytwasser zugegeben und abgesaugt, der

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 475 (1902).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 78 (1902).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 265 (1903).

Niederschlag mit halbgesättigtem eisgekühltem Barytwasser gewaschen. Im Filtrate wurde noch 3mal eine Fällung mit der Carbaminomethode erzeugt. Aus dem Niederschlage wurde lediglich Glykokoll erhalten, das als Kupfersalz identifiziert wurde.

0,1034 g Substanz verloren bei 110° 0,0080 g an Gewicht und gaben
0,0358 g CuO.

Gefunden:	Berechnet für $(\text{CH}_2\text{NH}_2\text{COO})_2\text{Cu} \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$:
H ₂ O 7,74%	7,84%
Cu 29,98%	Berechnet für $(\text{CH}_2\text{NH}_2\text{COO})_2\text{Cu}$: 30,09%

Aus dem Filtrate der letzten Carbaminofällung wurde ein Säuregemisch erhalten, das in einen in absolutem Alkohol nicht oder kaum löslichen Teil und in einen in absolutem Alkohol löslichen Teil durch wiederholtes Lösen in absolutem Alkohol und Fällen mit Äther getrennt wurde. Der erstere Teil ging durch einen Unfall verloren. Von dem letzteren wurden schließlich 1,65 g der aus der Lösung in absolutem Alkohol durch Äther gefällten Substanz, die nach dem Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure vollständig in absolutem Alkohol löslich war, gewonnen. Die Lösung derselben drehte nach links. Nach Racemisieren durch Erhitzen mit Barythydrat im Rohr auf 150°¹⁾ wurde aus der regenerierten Säure durch Kochen mit anhydriischem Kupferoxydhydrat ein Kupfersalz dargestellt, das aus der wässrigen Lösung beim Einengen auskristallisierte. Dasselbe färbte sich bereits beim Trocknen über Schwefelsäure violett und verlor bei 110° das Krystallwasser.

Analysen:

0,1160 g Substanz verloren bei 110° 0,0126 g an Gewicht.

0,1034 g der bei 110° bis zum konstanten Gewicht getrockneten Substanz gaben 0,1544 g CO₂, 0,0520 g H₂O und 0,0288 g Cu.

Gefunden:	Berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{Cu} + 2\text{H}_2\text{O}$:
H ₂ O 10,86%	10,98%
	Berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{Cu}$:
C 40,81%	41,23%
H 5,47%	5,49%
Cu 22,28%	21,81%

Nach nochmaligem Umkrystallisieren wurden folgende Werte erhalten:

¹⁾ E. Fischer, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 167 (1901).

0,1058 g Substanz verloren bei 110° 0,0116 an Gewicht. $H_2O = 10,96\%$.
 0,0942 g der bei 110° bis zum konstanten Gewicht getrockneter Substanz
 gaben 0,1412 g CO_2 , 0,0458 g H_2O und 0,0258 g CuO .

Gefunden: C = 40,87%, H = 5,42%, Cu = 21,88%.

Aus den Analysenwerten und dem charakteristischen Verhalten des Kupfersalzes, beim Trocknen violett zu werden, geht mit Sicherheit hervor, daß die isolierte Säure Prolin war.

Zweite Spaltung. Die Aufgabe dieses Versuches bestand in erster Linie darin, die alkoholschwerlösliche Fraktion aus dem Filtrate der Carbaminofällung, welche bei der ersten Spaltung verloren gegangen war, zu untersuchen.

10,0386 g über Schwefelsäure getrockneten Peptons mit der Mischung von 80 ccm Wasser und 40 g konzentrierter Schwefelsäure 12 Stunden am Rückflußkühler gekocht, auf 25 ccm aufgefüllt.

Je 2,5 ccm erfordern: a) 12,2 ccm, b) 12,3 ccm, im Mittel 12,25 ccm
 n_{10}° -S-Gesamt-N.

Der Rest der Lösung (245 ccm) auf 784 ccm mit Wasser verdünnt, mit Phosphorwolframsäure gefällt usw., wie im ersten Spaltungsversuche.

Abscheidung des Glykokolls und der Glutaminsäure mit Hilfe der Carbaminoreaktion.

Das aus dem Filtrate des Phosphorwolframsäureniederschlages erhaltene Aminosäuregewicht in wenig Wasser gelöst, dazu 600 ccm gesättigtes Barytwasser, Eiskühlung, Phenolphthalein, Kohlensäure, 30 g feingepulvertes Barythydrat eingerührt. Kohlensäure, Barytwasser bis zur stark alkalischen Reaktion, abgesaugt, mit halbgesättigtem Barytwasser gewaschen = Niederschlag I. In das Filtrat unter Eiskühlung 30 g Barythydrat verrührt, Kohlensäure, 15 g Barythydrat, Kohlensäure, Barythydrat bis stark alkalische Reaktion, abgesaugt, mit halbgesättigtem eisgekühltem Barytwasser gewaschen = Niederschlag II. Die vereinigten Niederschläge I und II mit Wasser unter Zusatz von Ammoniumcarbonat auf dem Wasserbade zersetzt, das Filtrat vom Baryumcarbonat eingedampft. Der völlig ammoniakfrei eingedampfte Rückstand in Wasser gelöst, auf 200 ccm aufgefüllt.

5 ccm erfordern 17,3 ccm n_{10}° -S.

Somit beträgt die Menge des Stickstoffes der durch die Carbaminofällung abgeschiedenen Aminosäuren: 692 ccm. d. i. vom Gesamt-N:

$$\frac{692 \cdot 250 \cdot 100}{1225 \cdot 245} = 57,6\%$$

170 ccm der Lösung wurden mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht, durch abwechselnden Zusatz von Silbernitratlösung und ammoniakalischer Silbernitratlösung wurde das glutaminsaure Silber gefällt, dessen Menge nach Absaugen, Auswaschen mit Wasser und Trocknen über Schwefelsäure 3,4180 g betrug. Da der N-Gehalt des Silbersalzes 3,88% ist, enthält die als Silbersalz abgeschiedene Glutaminsäure 0,1326 g N = 94,7 ccm n_{10} -S. Also wurden erhalten vom Gesamt-N:

$$\frac{94,7 \cdot 100 \cdot 200 \cdot 250}{1225 \cdot 170 \cdot 245} = 9,3\%$$

Diese Zahl ist höher, als die im ersten Versuche erhaltene (7,3), in welchem die Glutaminsäure direkt ohne vorherige Abscheidung als Carbaminosalz als Chlorhydrat gewonnen worden war. Der Grund hierfür liegt in der vollständigen Abscheidung der Glutaminsäure als Carbaminosalz. Tatsächlich läßt sich in dem Filtrate des Carbaminobarytniederschlags keine Glutaminsäure mit Hilfe der sehr empfindlichen Methode, Fällung durch Silbernitrat und ammoniakalische Silberlösung, nachweisen.

Im ersten Spaltungsversuche war gezeigt worden, daß nach Ausfällung mit Phosphorwolframsäure und Abscheidung der Glutaminsäure durch die Carbaminofällung lediglich Glykokoll abgeschieden wird. Deshalb darf man die Differenz des durch die Carbaminoreaktion gefällten Stickstoffes und des Glutaminsäurestickstoffes als Glykokollstickstoff ansehen.

$$\text{Glutaminsäure-N} = \frac{94,7 \cdot 250 \cdot 200}{245 \cdot 170} = 114 \text{ ccm } n_{10}\text{-S.}$$

$$\text{Gesamt-N der Carbaminofällung} = \frac{692 \cdot 250}{245} = 707 \text{ ccm } n_{10}\text{-S.}$$

also Glykokoll-N: 593 ccm,

$$\text{d. i. vom Gesamt-N: } \frac{593 \cdot 100}{1225} = 49,2\%$$

Die Abscheidung des Leucins.

Aus dem Filtrate der letzten Carbaminofällung wurden nach Entfernen des Barytes durch Krystallisation mit Alkohol

zwei Fraktionen erhalten, die gleichmäßig in Drusen krystallisiert waren. Das Gewicht beider zusammen betrug 1,35 g. Zur Racemisierung wurde die Säure mit Barythydrat am Rückflußkühler gekocht. Die Lösung der regenerierten Säure wurde wiederholt mit Tierkohle gekocht; schließlich krystallisierte die Säure in völlig farblosen, in Wasser schwerlöslichen Blättchen aus. Fp. 265°.

Die Lösung von 0,2 g zu 20 ccm mit 20%iger Salzsäure erwies sich im 2 dm-Rohr als inaktiv.

1. 0,1014 g Substanz gaben 0,2034 g CO₂ und 0,0894 g H₂O.
2. 0,0862 " " erfordern 6,75 ccm n/10-S.

	Gefunden:	Berechnet für C ₆ H ₁₃ NO ₂ :
C	54,71%	54,96%
H	9,86%	9,92%
N	10,96%	10,69%

Der Umstand, daß das Leucin durch Umkrystallisieren aus der durch Alkohol abgeschiedenen Substanz, deren Menge 1,35 g betrug, rein erhalten wurde, macht es wahrscheinlich, daß diese 1,35 g fast nur aus Leucin bestanden haben. Diese Menge würde 8,5% des Gesamtstickstoffs entsprechen. Es ist aber zu berücksichtigen, daß die Säure wiederholt mit Tierkohle umkrystallisiert werden mußte, um farblos zu werden, und daß die Abscheidung der Rohsäure durch Alkohol keine quantitative ist, sodaß die bei der Hydrolyse entstandene Menge Leucin größer oder kleiner sein kann.

Bei der Hydrolyse des Pepsinglutinpeptons wurden somit gefunden:

Arginin-N	=	19,7%
Lysin-N	=	9,1%
(unter der S. 311 gemachten Voraussetzung)		
Glykokoll-N	=	49,2%
Glutaminsäure-N	=	9,3%
Leucin		
Prolin.		

Für die letzten beiden Aminosäuren, deren Menge nicht exakt bestimmbar ist, die aber einwurfsfrei isoliert wurden, verbleibt somit zusammen 12,7% N.