

Kurz zusammengefasst lässt sich über das Verhalten der Farbstoffderivate von isomeren Benzazolen Folgendes sagen:

Die Stellung der Azogruppe in den Benzazolen ist nicht von wesentlichem Einfluss auf die Affinität ihrer Kuppelungsproducte zur Baumwollfaser; immerhin färben die im  $\alpha$ -Phenylkern gekuppelten Farbstoffe Baumwolle etwas intensiver an als ihre Isomeren.

Eine am  $\alpha$ -Phenylkern haftende Azogruppe erzeugt in ihren Farbstoffderivaten tiefere, blaustichigere Farbentöne, als eine am Benzazolkern haftende.

Befindet sich sowohl im  $\alpha$ -Phenylkern als auch im Benzazolkern je eine Azogruppe, so vertieft sich der Farbenton ganz ausserordentlich, und es steigt auch die Affinität zur Baumwollfaser in demselben Maasse.

Zürich. Universitätslaboratorium.

#### 463. M. Siegfried: Ueber Antipepton.

(Eingeg. am 1. October; mitgetheilt in der Sitzung von Hrn. H. Thierfelder.)

Bei der tryptischen Verdauung von Eiweiss entsteht bekanntlich nach den Untersuchungen Kühne's und seiner Schule das Antipepton, welches seinen Namen deshalb führt, weil es nach Kühne der weiteren Einwirkung des Trypsins überhaupt, nach Anderen nur hartnäckig widersteht. Auf diese Frage, ob das Antipepton von dem Trypsin überhaupt nicht oder nur sehr langsam zerspalten wird, werde ich gelegentlich der ausführlichen Mittheilung über das Antipepton, welche in der Zeitschrift für physiologische Chemie erfolgen soll, eingehen.

Dieses Antipepton Kühne's habe ich gelegentlich meiner Untersuchungen über die Fleischsäure<sup>1)</sup> als eine mit dieser Säure identische Säure angesprochen. Thatsächlich konnte Balke<sup>2)</sup> nachweisen, dass bei Anwendung der von Kühne angegebenen Methode der Reinigung durch Alkohol ein Antipepton gewonnen werden kann, das die Zusammensetzung und die Eigenschaften der einbasischen Fleischsäure besitzt. Dass man mit dieser Methode auch recht unreine Producte gewinnen kann, hat Fr. Kutscher<sup>3)</sup> gezeigt, welcher bei dem Versuche, nach Balke's Vorschriften Antipepton darzustellen, ein Product erhielt, welches im Wesentlichen aus dem bei der tryptischen Verdauung des Eiweisses neben dem Antipepton

<sup>1)</sup> Arch. für Anat. und Physiologie, physiol. Abthlg. 1894, 401.

<sup>2)</sup> Zeitschr. für physiol. Chem. 22, 248.

<sup>3)</sup> Zeitschr. für physiol. Chem. 26, 110; 28, 88.

entstehenden Basen und Amidosäuren bestand. In Folge dieses seines Misserfolges hat Fr. Kutscher die Behauptung aufgestellt, dass auch Balke's Antipepton in der Hauptsache aus genannten Basen und Amidosäuren bestanden habe. Diese Ansicht Kutscher's ist, wie aus dem Folgenden hervorgeht, irrtümlich.

Seitdem ich im Jahre 1894 die Ueberzeugung gewonnen hatte, dass das Antipepton eine relativ einfache Säure ist, bin ich bestrebt gewesen, eine glatte Methode aufzufinden, welche gestattete, das Antipepton aus dem Chaos von bekannten und unbekanntem Körpern, welche bei dem tryptischen Zerfall des grossen Eiweissmoleküls entstehen, rein und in guter Ausbeute zu isoliren. Ich hoffte<sup>1)</sup>, die chemische Bearbeitung der physiologisch so wichtigen Peptone würde das Fundament zur Erforschung des Eiweissmoleküls werden, indem man von den Peptonen zu den Albumosen und von diesen zum Eiweiss aufsteigen könnte. Die Auffindung einer solchen Methode hatte vor Allem mit der leichten Zersetzlichkeit der Peptone zu kämpfen, sodass Versuche, die Peptone als Condensationsproducte abzuscheiden und aus diesen zu regeneriren, fehl-schlügen.

#### Methode der Darstellung von Antipepton.

Im Sinne Kühne's unterscheidet man von den Peptonen als Albumosen solche die Biuretreaction gebende, aus dem Eiweiss durch Verdauung entstehende Substanzen, welche durch Ammonsulfat fällbar sind, während die Peptone nicht durch Ammonsulfat ausgesalzen werden. Nach Kühne hat, damit eine vollständige Abscheidung der Albumosen bewirkt werde, die Ausfällung durch Ammonsulfat in der Siedehitze bei neutraler, alkalischer und saurer Reaction zu geschehen. Die Peptonpräparate, welche ich mit Hilfe der weiter unten beschriebenen Eisenfällung aus solchen, nach der Vorschrift Kühne's von Albumosen befreiten Roh-Peptonlösungen erhielt, enthielten jedoch nachweisbare Mengen von Albumosen<sup>2)</sup>. Die Präparate lösten sich zwar glatt in gesättigter Ammonsulfatlösung, auch konnte nach Sättigen ihrer Lösungen bei neutraler, saurer und alkalischer Reaction keine Ausscheidung von Albumosen beobachtet werden, es trat jedoch eine solche in Gestalt einer Trübung ein, wenn concentrirte Schwefelsäure, bezw. eine Mischung derselben mit gesättigter Ammonsulfatlösung hinzugegeben wurde. Das Gleiche gilt für das bei der Pepsinverdauung entstehende Amphopepton. Die Ursache hiervon ist eine doppelte.

<sup>1)</sup> Arch. für Anat. und Physiologie, physiol. Abthlg. 1894, 401.

<sup>2)</sup> Hierin liegt der Grund für früher (Zeitschr. für physiol. Chem. 27, 335) erhaltene unreine Producte.

Erstens gelingt es nicht, durch Sättigung mit Ammonsulfat in der Siedehitze bei neutraler, alkalischer und saurer Reaction die letzten Reste der Albumosen zu fällen. Zweitens entsteht aus dem Anti-pepton (ebenso wie aus dem Amphopepton) schon beim Eindampfen auf dem Wasserbade etwas Albumose.

Zur vollständigen Ausscheidung der Albumosen ist erforderlich, nicht nur grosse Mengen gesättigter Lösung von Ammonsulfat zu verwenden, sondern auch beträchtliche Mengen concentrirter Schwefelsäure. Man setzt so lange gesättigte Lösung von Ammonsulfat und concentrirte Schwefelsäure hinzu, bis selbst nach mehrstündigem Stehen keine Trübung mehr erfolgt. Das Filtrat von der Albumoseausscheidung ist dann farblos und lässt nur in sehr dicken Schichten einen Stich in's Weingelbe erkennen. Das Filtrat wird durch gasförmiges Ammoniak oder mit Ammonsulfat gesättigtes, wässriges Ammoniak neutralisirt und mit concentrirter Schwefelsäure bis zur stark sauren Reaction versetzt. Durch Zusatz einer Auflösung von Ferriammoniakalaun in gesättigter Ammonsulfatlösung wird ein voluminöser Eisenniederschlag (Eisenniederschlag I) gefällt. Dieser Niederschlag wird abgesaugt, sorgfältigst mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, mit Ammonsulfat verrieben, wieder abgesaugt und mit Ammonsulfatlösung ausgewaschen. Darauf wird er in Wasser verrührt und nach Zusatz von Ammoniak unter fortwährendem Umrühren bei einer Temperatur unterhalb 40° digerirt. Das Filtrat wird mit Schwefelsäure angesäuert und mit Ammonsulfat vollends gesättigt. Der Eisenniederschlag I enthält, wenn vorher nicht die letzten Reste der Albumosen gefällt waren, diese Albumosen neben Pepton, während das Filtrat vom Eisenniederschlag I völlig albumosefrei ist. Da jetzt in der durch Zersetzung des Eisenniederschlages erhaltenen Lösung diese Albumosereste leicht vollständig durch Ammonsulfat zu entfernen sind, empfiehlt es sich, in der ursprünglichen Lösung die letzten Reste von Albumosen nicht auszufällen, um nicht zu grosse Mengen gesättigte Ammonsulfatlösung zu brauchen, sondern sie erst aus der durch Zersetzung des Eisenniederschlages I erhaltenen Lösung zu entfernen. Ich sättige jetzt überhaupt nur noch bei gewöhnlicher Temperatur mit Ammonsulfat und vermeide bei der ganzen Darstellung des Peptons Temperaturen über 40°. Aus der durch Zersetzung des Eisenniederschlages I erhaltenen Lösung lassen sich die Albumosereste auch bei gewöhnlicher Temperatur durch Ammonsulfat und Schwefelsäure unter andauerndem Rühren vollständig entfernen. Die Verdauungsgemische scheinen Substanzen zu enthalten, welche der Ausfällung der Albumosen durch Ammonsulfat hinderlich sind. Sind diese entfernt, gelingt die Abscheidung der Albumosen leicht.

Die albumosefreie, mit Ammonsulfat gesättigte Lösung, die durch Zersetzung des Eisenniederschlages I gewonnen ist, wird bei stark saurer Reaction mit einer Lösung von Eisenammoniakalaun in gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Der Niederschlag wird abgesaugt und sorgfältigst wie oben beschrieben mit Ammonsulfat ausgewaschen.

Das Filtrat von dem Eisenniederschlage I wird unter kräftigem Umrühren mit gepulvertem Eisenammoniakalaun unter vorsichtigem Zusatz concentrirten Ammoniaks vermischt, jedoch so, dass die Reaction stets sauer bleibt. Der entstehende voluminöse Eisenniederschlag II muss eine hellbraune Farbe besitzen. Der Eisenniederschlag wird abgesaugt und sorgfältigst mit gesättigter Ammonsulfatlösung ausgewaschen, mit Ammonsulfatlösung verrieben und wieder abgesaugt und gewaschen. Am besten wird er mit Ammoniak zersetzt und aus dem Filtrate nach Sättigen mit Ammonsulfat wieder durch ammon-sulfatgesättigte Lösung von Ferriammoniakalaun gefällt, abgesaugt und gewaschen.

Der Eisenniederschlag II wird in Wasser verrührt und unter Zusatz von etwas Schwefelsäure gelöst. In diese Lösung wird eine bei 40° gesättigte Lösung von Aetzbaryt bis zum kleinen Ueberschusse eingetragen, das Filtrat vom Baryt- und Eisen-Niederschlage wird durch Kohlensäure vom Baryt befreit und das Filtrat vom Baryumcarbonat im Vacuum eingedampft. Der fast farblose Rückstand reagirt stark sauer, besteht aber noch zum Theil aus dem Ammonsalz des Peptons. Er wird in verdünnter Essigsäure zum dünnen Syrup gelöst, dieser wird mit Alkohol so lange, bis die zunächst entstehende Trübung noch verschwindet, vermischt und in absoluten Alkohol unter kräftigem Rühren eingetragen. Das ausgeschiedene Pepton wird abgesaugt, mit Alkohol und Aether gewaschen und über Schwefelsäure im Vacuum getrocknet. Es ist ein schneeweisses, nicht zerfliessliches Pulver, das intensiv sauer reagirt, nicht bitter, sondern angenehm sauer schmeckt. Es ist frei von Essigsäure, wie der negative Ausfall der Kakodylreaction ergiebt. Auch ohne Anwendung von Essigsäure erhält man die freie Säure, wenn man das Pepton auf 80° erhitzt. Während es beim Eindampfen auf dem Wasserbade zum Theil in Albumose übergeht, bilden sich beim Erhitzen der Substanz im Trockenschrank auf 80° bis zur Gewichtsconstanz kaum nachweisbare Spuren von Albumose. Bei sorgfältigem Arbeiten und Verwendung reinen Barytes erhält man völlig aschefreies Pepton. Es enthält keine quantitativ bestimmbaren Mengen Schwefels, wenn auch die Schwefel-Trockenprobe, bei der, wie ich gezeigt habe<sup>1)</sup>, noch 0.0000005 g Schwefel erkannt werden, positiv ausfällt. Keines der

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 347.

dargestellten Präparate gab die Millon'sche Reaction, sondern nur eine Braunfärbung. Alle Präparate gaben intensiv rothe Biuret-reaction.

Analysen und Molekulargewichtsbestimmungen führten zu der Formel einer einbasischen Säure  $C_{10}N_3H_{17}O_5$ . Diese Formel unterscheidet sich von der von mir für die Fleischsäure aufgestellten  $C_{10}N_3H_{15}O_5$  nur durch den Mehrgehalt von 2 Atomen Wasserstoff. Es ist möglich, dass dieser Unterschied thatsächlich besteht, es liegt jedoch näher, auch für die Fleischsäure die Formel  $C_{10}N_3H_{17}O_5$  anzunehmen, da die von mir<sup>1)</sup> für die Fleischsäure veröffentlichten Analysenwerthe von den 6 Kohlenstoff-, 5 Stickstoff- und 5 Wasserstoff-Bestimmungen verschiedener Präparate auch auf die Formel  $C_{10}N_3H_{17}O_5$  stimmen. Im Folgenden stelle ich die Mittelwerthe dieser Analysen mit den berechneten zusammen:

	Ber. für $C_{10}N_3H_{15}O_5$ .	Gef. für Fleischsäure.	Ber. für $C_{10}N_3H_{17}O_5$ .
C	46.69 pCt.	46.63 pCt.	46.33 pCt.
H	5.84 »	6.24 »	6.56 »
N	16.33 »	16.15 »	16.21 »

Weitere Untersuchungen werden zwischen der Formel  $C_{10}N_3H_{17}O_5$  und  $C_{10}N_3H_{15}O_5$  zu entscheiden haben.

Als Ausgangsmaterial für die Darstellung des Antipeptons diente theils ausgewaschenes Blutfibrin, theils Witte's Pepton. Hierbei wurde ein sehr wirksames Trypsin von G. Grübler in Dresden benutzt. Die Verdauung dauerte drei bis neun Wochen bei Körpertemperatur im Thermostaten.

	Gefundene Procente					Berechnete Procente für $C_{10}N_3H_{17}O_5$
	Präp. I	Präp. II	Präp. III	Präp. IV	Präp. V	
C	46.39	46.84	46.64	46.46	46.35	46.33
H	6.72	6.93	6.59	6.60	6.52	6.56
N	16.36	16.32	16.45	16.51	15.84	16.21

Die Präparate I, II und V waren durch Verdauung von Fibrin, die Präparate III und IV durch die von Witte's Pepton gewonnen. Präparat II war aus dem alkoholischen Filtrate des Präparates I durch Eindampfen desselben im Vacuum und Fällen mit Alkohol dargestellt. Präparat IV wurde durch Lösen des Präparates III in Wasser und Fällen durch Alkohol erhalten.

Die Bestimmung des Molekulargewichtes durch die Ermittlung der Gefrierpunktniedrigung in wässriger Lösung nach Beckmann ergab (Präparat IV) 286, bezw. 298. Berechnet ist 259.

<sup>1)</sup> Archiv f. Anatomie und Physiol. Physiol. Abthlg. 1894, 407.

Aus der Säure wurden das Zink- und Baryum-Salz durch kurzes Kochen mit Zinkoxyd, bezw. frisch gefälltem Baryumcarbonat hergestellt. Das eingeeengte Filtrat wurde in Alkohol gefällt, die schneeweissen, lockeren Pulver über Schwefelsäure im Vacuum getrocknet.

Zinksalz aus Präp. II: Zn 11.33.

» » » III: » 11.67.

$(C_{10}N_3H_{16}O_5)_2Zn$ . Ber. » 11.18.

Baryumsalz aus Präp. IV: Ba 21.05.

$(C_{10}N_3H_{16}O_5)_2Ba$ . Ber. Ba 20.98.

Die freie Säure hält, namentlich wenn sie aus concentrirten Lösungen gefällt ist, ausserordentlich hartnäckig Alkohol zurück. Es ist nichts Seltenes, dass ein Präparat im Exsiccator über concentrirter Schwefelsäure über Nacht sein Gewicht nicht controllirbar verändert und noch 10 pCt. und mehr Alkohol enthält.

Aus dem Eisenniederschlag I (S. 2854) erhält man eine zweite Säure, die sich von der ersten durch einen Mehrgehalt von  $CH_3$  unterscheidet.

Wird der wie oben geschilderte, umgefällte Eisenniederschlag I, der jetzt vollständig frei von Albumoseverbindungen ist, mit Ammoniak zersetzt, und das Filtrat durch Barythydrat von der Schwefelsäure befreit, so erhält man nach Eindampfen im Vacuum, Lösen des Rückstandes in verdünnter Essigsäure und Fällen mit Alkohol eine einbasische Säure von der Zusammensetzung  $C_{11}H_{19}N_3O_5$ . Da der die Säure  $C_{10}H_{17}N_3O_5$  enthaltende Niederschlag bei Gegenwart von Schwefelsäure viel leichter löslich ist, als der die Säure  $C_{11}H_{19}N_3O_5$  enthaltende Niederschlag, so fällt die Säure  $C_{10}H_{17}N_3O_5$  im Eisenniederschlag I nur in geringem Grade aus; durch das Umfällen des Eisenniederschlags wird dieser jedoch frei von jener Säure erhalten, denn bei verschiedenen Darstellungen wurde dieselbe Zusammensetzung für die Säure gefunden, und diese Zusammensetzung bleibt auch beim Umfällen der Säure constant. Genauere Angaben über die Löslichkeit der beiden Eisenniederschläge werde ich in der ausführlichen Mittheilung machen.

Die Säure  $C_{11}H_{19}N_3O_5$  ist, durch Alkohol gefällt, ebenfalls ein lockeres, schneeweisses, nicht zerfliessliches Pulver, das nur mit der Trockenprobe nachweisbare Spuren von Schwefel enthält. Keines der dargestellten Präparate gab die Millon'sche Reaction, sondern nur eine Braunfärbung. Alle Präparate gaben intensive Biuretreaction. Die Säure bildet ebenfalls beim Eindampfen ihrer Lösungen auf dem Wasserbade Albumose und zwar scheinbar leichter als die Säure  $C_{10}H_{17}N_3O_5$ .

	Gefundene Procente				Berechnete Procente für $C_{11}N_3H_{19}O_5$
	Präp. I	Präp. II	Präp. III	Präp. IV	
C	48.31	47.91	48.69	48.33; 48.53	48.35
H	7.11	6.93	7.08	6.90; 6.56	6.97
N	15.33	15.38	14.93	15.75; 15.71	15.38

Präparat I, II, IV waren durch Verdauung von Witte's Pepton, Präparat III durch Verdauung von Fibrin gewonnen. Präparat II ist das umgefällte Präparat I.

Die Bestimmung des Molekulargewichts durch Ermittlung der Gefrierpunktserniedrigung nach Beckmann ergab für Präparat II das Molekulargewicht von 259, bezw. 262; für Präparat III 284, bezw. 307. Berechnet ist 273.

Durch kurzes Kochen mit Zinkoxyd und frisch gefälltem Baryumcarbonat wurden Zink- und Baryum-Salz erhalten.

Zinksalz aus Präp. IV: Zn 10.47.

$(C_{11}N_3H_{18}O_5)_2Zn$ . Ber. Zn 10.73.

Baryumsalz aus Präp. IV: Ba 20.12.

» » » III: » 19.95.

$(C_{11}N_3H_{18}O_5)_2Ba$ . Ber. Ba 20.12.

Weil die beiden Säuren  $C_{10}N_3H_{17}O_5$  und  $C_{11}N_3H_{19}N_5$  regelmässig von constanter Zusammensetzung erhalten werden und weil sie auch nach dem Umfällen, bezw. fractionirten Fällen die constante Zusammensetzung besitzen, sind sie als Individuen anzusehen. Es fragt sich, in wie weit bietet die Eisenfällung in ammonulfatgesättigter Lösung Sicherheit, dass nicht andere bei der tryptischen Verdauung entstehende Producte mitgefällt werden? In erster Linie handelt es sich um die auch bei der Spaltung mit Salzsäure aus dem Eiweiss entstehenden Basen und Amidosäuren.

Eine Verunreinigung der nach der angegebenen Methode dargestellten Peptone durch die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Basen ist schon deshalb ausgeschlossen, weil die Peptone in verdünnter Lösung überhaupt nicht durch Phosphorwolframsäure fällbar sind und weil sich die in stärkeren Lösungen durch Phosphorwolframsäure-Schwefelsäure erhaltenen Niederschläge im Ueberschusse des Fällungsmittels leicht auflösen. Ferner werden die Amidosäuren: Glykocoll, Alanin, Leucin, Asparaginsäure und Glutaminsäure in ammonulfatgesättigter Lösung nicht durch Ferriammoniakalaun gefällt. Ich habe schliesslich Versuche mit allen bei der Zersetzung des Eiweisses durch Salzsäure entstehenden Producten in der Weise angestellt, dass nach möglichster Verjagung der Salzsäure auf

dem Wasserbade der die Zersetzungsproducte enthaltende Syrup in Wasser gelöst, mit Ammoniak neutralisirt und nach Sättigen mit Ammonsulfat in der für die Abscheidung des Peptons beschriebenen Weise mit Ferriammoniakalaun behandelt wurde. Hierbei wurden mehrere Versuche mit kleineren Mengen Eiweiss, mehrere mit je 500 g angestellt. Es entstanden nicht sofort, wie bei den Peptonlösungen, Ausscheidungen, aber nach einiger Zeit bildeten sich Trübungen und Niederschläge, deren Menge im Verhältniss zu dem verwendeten Eiweiss gering war.

Die Bemühungen, aus ihnen nach dem für die Peptonniederschläge geschilderten Verfahren Substanzen zu gewinnen, lieferten nur sehr geringe, beim Eindampfen der barytfrei gemachten Lösungen hinterbleibende Rückstände. Durch Ausspülen der Abdampfschalen mit wenig Wasser und Eingiessen der Flüssigkeit in Alkohol liessen sich keine Niederschläge erzielen.

Die Säuren  $C_{10}N_3H_{17}O_5$  und  $C_{11}N_3H_{19}O_5$ , von denen die Erstere bei meinen Versuchen in bei weiten grösseren Mengen als die Zweite entstand, möchte ich vorläufig als  $\alpha$ - und  $\beta$ -Antipepton unterscheiden.  $\alpha$ -Antipepton ist also eine einbasische Säure von der Formel:  $C_{10}N_3H_{17}O_5$ ,  $\beta$ -Antipepton eine einbasische Säure von der Formel:  $C_{11}N_3H_{19}O_5$ .

Das hier Mitgetheilte dürfte den durch die Publicationen Kutscher's verbreiteten Irrthum, das Antipepton sei im Wesentlichen ein Gemenge von Basen und Amidosäuren, endgültig beseitigen.

Hrn. E. Singewald danke ich für seine Unterstützung durch Ausführung von Elementaranalysen.

#### 464. Richard Möhlau und Ernst Kegel:

Ueber die Condensation von Benzhydrolen mit Paraoxyazokörpern, ein Beitrag zur Frage der Constitution der Paraoxyazoverbindungen.

[Mittheilung aus dem Laboratorium für Farbenchemie und Färbereitechnik der Technischen Hochschule zu Dresden.]

(Eingegangen am 3. October; mitgeth. in der Sitzung von Hrn. P. Jacobson.)

Die Constitution der Oxyazokörper ist bis in die neueste Zeit Gegenstand der Erörterung und experimentellen Prüfung gewesen.

Ihre Bildung aus Diazosalzen und Phenolen und die Thatsache, dass die aus ihnen mit Alkali und Halogenalkylen entstehenden Aether Sauerstoffäther sind, haben ihre Auffassung als hydroxylirte Azokörper begünstigt.