

## Ueber die Verseifbarkeit einiger Säureimide (Diamide) und Aminsäuren durch Fermente.

Von

Dr. **M. Gonnermann.**

---

Den in diesem Archiv Bd. 89 S. 493 veröffentlichten Untersuchungen über die Verseifbarkeit einiger Säure-Amide und -Anilide durch Fermente reihen sich die nachstehenden als Ergänzung an; es kann daher von der Wiedergabe der allgemeinen Methode des Verfahrens abgesehen und auf die erste Arbeit verwiesen werden; nur die Abweichungen, welche die Imide (Diamide) bei den einzelnen Versuchen bedingen, sollten Erwähnung finden; bemerkt soll aber hier auch sogleich werden, dass ich die Unlöslichkeit des Fluornatriums in 55% igem Alkohol, auf die ich in meiner ersten Versuchsreihe noch nicht aufmerksam geworden war, jetzt wiederholt zur Entfernung dieses oft störend wirkenden Stoffes aus den Versuchsgemischen benutzt habe.

Die verwendeten Fermente sind dieselben geblieben wie bei der ersten Versuchsreihe; die Organe — Leber und Niere — stammten gleichfalls vom Schaf. Die zur Prüfung gelangten Imide und Aminsäuren waren folgende: Oxaminsäure, Succinimid, Succinaminsäure, Dibenzamid, Disalicylamid, Phtalimid, denen sich Parabansäure anschloss. Versuche mit Diacetamid und Oximid habe ich nicht ausgeführt, weil die Darstellung dieser beiden Präparate zu umständlich ist; bei dem Diacetamid ist zudem ohne Weiteres nach meinen Versuchsergebnissen anzunehmen, dass dasselbe durch diejenigen Fermente zerlegt wird, die das Acetamid spalten<sup>1)</sup>. An Stelle des Oximids andererseits glaubte ich Oxamin-

---

1) Während diese Arbeit druckfertig war, kommt mir durch Prof. Nasse ein Abdruck eines Vortrages von F. Hofmeister: Ueber den Bau des Eiweissmolekuls, gehalten auf der 74. Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte in Karlsbad (Naturwissensch. Rundschau Bd. 17 Nr. 42 u. 43. 1902), zur Hand,

säure setzen und im Falle der Nichtzersetzung durch Fermente und Histozyne auf ein gleiches Verhalten des Oximids selbst schliessen zu dürfen.

Versuche über die Zersetzung der hier in Frage kommenden Imide im Thierkörper sind nur von Fr. Koehne<sup>1)</sup> angestellt worden; bei dem Succinimid, Dibenzamid und Phthalimid wird der von Koehne erhaltenen Resultate gedacht werden.

Succinimid und Phthalimid waren von Kahlbaum-Berlin bezogen; die übrigen Präparate habe ich selbst dargestellt.

### Oxaminsäure.

Der Darstellung der Oxaminsäure lag zunächst die Arbeit von Ost und Mente<sup>2)</sup> zu Grunde. Nach Balard<sup>3)</sup> soll das saure Ammoniumoxalat im Oelbad auf 220°—230° erhitzt werden, die Masse wird hierbei anfangs flüssig, dann teigig und bläht sich schliesslich unter Entwicklung von Ammoncarbonat auf. Ost und Mente geben die Zersetzungstemperatur bei 140° an, bis die Masse zähe wird, — es ist mir nicht gelungen, bei dieser Temperatur eine solche Masse zu erlangen, sondern dieser Zustand trat erst bei 180° ein.

Nach dieser Vorschrift arbeitend, musste bald auffallen, dass das oxaminsaure Baryum in Lösung bleiben soll, während zur Darstellung dieses Salzes oxaminsaures Ammonium durch Baryumchlorid umgesetzt wird, — d. h. oxaminsaures Baryum fällt aus<sup>4)</sup>, wie denn auch die meisten Salze der Oxaminsäure sehr schwer in Wasser löslich sind.

---

in welchem es heisst: „Das auf Eiweiss so kraftig wirkende Trypsin ist nicht im Stande, Hippursäure zu spalten oder auch nur aus sonst so labilen Saureamiden wie Acetamid und Asparagin den Ammoniakrest abzutrennen.“ Ich habe daraufhin meine Versuche wiederholt und fand die Resultate der ersten Versuchsreihe voll bestätigt: Trypsin verseift Acetamid unter Abspaltung von Essigsäure; es entwickelte sich sogar beim Eindampfen des Hauptversuches Ammoniak, welches rothes Lackmuspapier bläute, während im Controlversuch Acetamid sich verflüchtigt und blaues Lackmuspapier durch die Dämpfe schwach geröthet wird.

1) Ueber das Verhalten einiger Saureimide im thierischen Organismus. Aus dem Institut für physiol. Chemie und Pharmakologie in Rostock (Director Prof. Dr. O. Nasse). Inaug.-Dissert. Rostock 1894.

2) Berichte d. chem. Gesellsch. Bd. 19 S. 3229.

3) Annal. f. Chem. Bd. 42 S. 197.

4) Engstrom, Annal. f. Chem. 1856 S. 453.

Die Ausbeute war übrigens sehr gering.

Viel schneller und ganz glatt im Verlauf erhält man die Oxaminsäure nach Toussaint<sup>1)</sup> aus Oxamid durch Kochen mit Ammoniak; nach vierstündigem Kochen war das Oxamid vollständig gelöst und, da beim Erkalten der Lösung keine Ausscheidung erfolgte, in Oxaminsäure übergegangen; die heisse Lösung wurde filtriert und so lange eingedampft, bis beim Herausnehmen einer Probe dieselbe sofort erstarrte; dann wurde starke Salzsäure bis zur stark sauren Reaction unter Umrühren zugefügt und das Gemisch 24 Stunden stehen gelassen. Auf Zusatz der Salzsäure schied sich die Oxaminsäure sofort als weisses Pulver aus; die überstehende Flüssigkeit wurde abgossen, der Niederschlag mit alkoholhaltigem Wasser, welche zwar Salmiak, jedoch nicht Oxaminsäure löst, ausgesüsst und schliesslich auf dem Saugfilter mit verdünntem Alkohol ausgewaschen, bis Silberlösung keine Trübung bewirkte. Eine Probe des getrockneten, weissen Pulvers in heissem Wasser gelöst gab auf Zusatz von etwas Ammoniak durch Calciumchlorid keine Trübung; ebenso wurde Permanganatlösung bei Gegenwart von Schwefelsäure nach fünf Minuten nicht entfärbt, so dass ich wohl annehmen kann, dass die Oxaminsäure völlig frei von Oxalsäure war.

Die nun folgenden Versuche mit Fermenten lehnen sich ganz denen mit Oxamid an: von den Filtraten wurden 50 ccm, entsprechend 0,25 Oxaminsäure, abgenommen, durch Ammoniak alkalisch gemacht aufgeköcht, nochmals filtrirt, das Filtrat siedendheiss mit Essigsäure übersättigt und noch heiss mit 10 %iger Calciumchloridlösung versetzt, ein entstehender Niederschlag mit heissem Wasser ausgewaschen, bis Ammoniumoxalat keine Trübung mehr gab, und auf Oxalsäure in stark schwefelsaurer Lösung durch Permanganat geprüft.

#### Versuche mit thierischen Fermenten.

Pepsin. Es wurden nur 1,6 ccm Permanganatlösung verbraucht, und blieb die Farbe eine halbe Stunde unverändert, — ganz gleich wie bei den Versuchen mit Oxamid; Oxaminsäure wird durch Pepsin nicht in Oxalsäure übergeführt.

Trypsin. Die zugesetzten 25 ccm Sodalösung wurden durch die Oxaminsäure völlig neutralisirt, so dass sich ein weiterer Zusatz

---

1) Annal. f. Chem. Bd. 120 S. 237.

von 25 ccm nöthig machte; eine Umsetzung in Oxalsäure fand nicht statt.

Ptyalin ist ohne Einwirkung.

#### Versuche mit Histozyemen.

Leber wirkt nicht auf Oxaminsäure ein, wie daraus hervorgeht, dass der Verbrauch an Permanganat sehr gering und in beiden Versuchen ziemlich das Gleiche war; es mussten bei einer Umsetzung in Oxalsäure 0,3 Oxaminsäure — ich nehme an, dass ein Theil in dem Pressrückstand geblieben ist — 76 ccm  $\frac{1}{10}$  Permanganatlösung benöthigt haben.

Niere war gleichfalls wirkungslos.

#### Versuche mit pflanzlichen Fermenten.

Maltin und Invertin sind unwirksam.

Emulsin. Das Emulsin löste sich im Hauptversuch nicht auf, jedenfalls in Folge der sauren Reaction des Gemisches; nach zweitägigem Stehen nahm ich die Prufung auf Oxalsäure vor, fand jedoch keine; ich fügte somit einem neuen Versuch 30 ccm Soda-lösung hinzu, — das Emulsin blieb in trüber Lösung, und auch in diesem Versuch war Oxalsäure nicht nachzuweisen.

Aus meinen Versuchen mit den einfachen Oxalsäure-Amiden geht hervor, dass dieselben durch alle angewandten Enzyme nicht gespalten werden, auch unzersetzt und, im chemischen Sinn, unschädlich den Thierkörper passiren, wie ich als sicher angenommen habe und durch Kobert's neue Versuche mit reinem Oxamid, wie er mir mittheilte, bestätigt worden ist. Anders dagegen steht es mit den complicirten Verbindungen — insbesondere Parabansäure, Alloxan und Alloxantin —, die nach den Versuchen von Koehne im Thierkörper fast vollkommen zerstört werden. Durch welche Kräfte dies geschieht, ergeben die anschliessenden Versuche; was das Wie angeht, so ist wohl mit Sicherheit anzunehmen, dass aus den genannten Körpern zunächst Oxalsäure abgespalten wird — bei der Parabansäure wahrscheinlich nach vorgängiger Umwandlung in Oxalursäure —, die denn, wie auch Koehne aus dem Nichtauftreten von Oxalursäure im Harn schliesst, sofort weiter zerfällt. Der Vollständigkeit wegen fuhrte ich einige Versuche mit Parabansäure

$$\text{NH} \begin{cases} \text{CO} - \text{CO} \\ | \\ \text{CO} - \text{NH} \end{cases} \text{ aus; diese geht sehr leicht unter Aufnahme von}$$

Wassermolekülen in Oxalursäure und Oxalsäure über; es ist demnach eine Umsetzung durch Fermente leicht zu erkennen, wenn im Reaktionsgemisch sich Oxalsäure nachweisen lässt. Koehne gibt als charakteristische Reaction für Parabansäure an — und bezieht sich auf „Harnanalyse“ von Neubauer und Vogel und auch Beilstein —, dass ammoniakalische Chlorcalciumlösung in der Kälte keinen Niederschlag gibt; in der „Harnanalyse“<sup>1)</sup> finde ich jedoch folgende Angabe, die sich nicht auf Parabansäure, sondern auf Oxalursäure bezieht: „Versetzt man eine wässrige, mässig verdünnte Lösung von oxalursäurem Ammon mit Chlorcalcium und Ammoniak, so entsteht kein Niederschlag; die Flüssigkeit bleibt vollkommen klar; erwärmt man dagegen die Mischung, so tritt sehr bald, noch weit vor der Siedhitze, Trübung ein, und oxalsaurer Kalk scheidet sich massenhaft aus. Dieses Verhalten ist unzweifelhaft die empfindlichste Reaction, mit welcher sich noch unglaublich kleine Mengen von Oxalursäure erkennen lassen, sobald man das Mikroskop zu Hilfe nimmt.“ —

Nach diesen Angaben Neubauer's würde also, falls in den Versuchsgemischen sich oxalsaurer Kalk ausscheidet, die Parabansäure bereits durch Einwirkung von Fermenten in Oxalursäure übergegangen sein. Wie äusserst schnell diese Umsetzung eintritt, ergeben die nachfolgenden Versuche.

Um nun aber sicher zu sein, dass die eventuell nachgewiesene Oxalsäure nur durch Einwirkung der Fermente entstanden ist, dampfte ich eine schwach durch Soda alkalisch gemachte Lösung von Parabansäure (0,5 : 100) Kahlbaum auf dem Wasserbad zur Trockne ein, nahm das blendend weisse Pulver im Wasser auf, übersättigte die Lösung mit Salzsäure, fugte Ammoniak und Chlorcalciumlösung zu und beobachtete, dass sofort ein starker Niederschlag eintrat, welcher unter dem Mikroskop krystallinische Gebilde schwer erkennen liess; jedoch erschienen die charakteristischen Formen des Calciumoxalates, als der Niederschlag in etwas Salzsäure und Wasser gelöst und Ammoniak vorsichtig übergeschichtet wurde, — bis sich die Flüssigkeit vollständig geklärt hatte.

Nach diesem überraschenden Resultat leitete ich folgende Versuche ein:

1. eine Lösung von Chlorcalcium, mit Ammoniak versetzt, wurde erwärmt und bei Seite gestellt;

---

1) Neubauer und Vogel S. 34.

2. eine Lösung von Parabansäure mit Ammoniak neutralisirt und sofort mit Chlorcalcium versetzt;
3. die gleiche Lösung drei Stunden stehen gelassen und dann mit Chlorcalcium versetzt;
4. die gleiche Lösung auf dem Wasserbad erwärmt, abgekühlt und derselben Chlorcalcium zugegeben;
5. eine Lösung von Parabansäure im Wasserbad von  $60^{\circ} \frac{1}{2}$  Stunde erwärmt, dann Ammoniak und Chlorcalcium zugefügt

und beobachtet, dass bei

1. keine Veränderung eintrat, da selbstverständlich;
2. nicht sofort ein Niederschlag entstand, jedoch nach schwachem Erwärmen;
3. ein Niederschlag nach einigen Secunden sich bildete;
4. der Niederschlag sofort eintrat;
5. nicht sofort, jedoch nach kurzem Stehen bei Zimmertemperatur ein Niederschlag entstand.

Die Niederschläge bestanden aus Calciumoxalat.

Nach diesen Versuchen wird somit die Parabansäure bei Gegenwart von Soda und Ammoniak selbst bei niedrigerer Temperatur, als sie beim Eindampfen auf dem Wasserbad erzielt wird, sowie bereits beim einfachen Erwärmen einer wässrigen Lösung derselben auf  $60^{\circ} \text{C.}$  schon in Oxalsäure umgesetzt; da nun auch eine ammoniakalische Parabansäurelösung für sich bereits nach einigen Stunden verändert wird und mit Chlorcalciumlösung einen Niederschlag von Calciumoxalat gibt, sämmtliche Versuchsflüssigkeiten aber, besonders diejenigen mit thierischen Organen, um die Eiweissstoffe zu entfernen, erwärmt oder aufgeköcht werden müssen, so können die Resultate der Versuche über die Einwirkung von Fermenten auf Parabansäure nur sehr zweifelhafter Natur sein, und habe ich aus diesem Grunde solche nicht ausgeführt; es lässt sich also leider experimentell nicht nachweisen, in welchen Organen die Bildung von Oxalursäure oder Oxalsäure aus Parabansäure vor sich geht, — vielleicht schon im Magen durch die Salzsäure oder im alkalischen Dünndarm?

### Succinimid.

Bei diesen Versuchen machte ich anfangs die Erfahrung, dass bei allen Aetherausschüttelungen der Haupt- und Controlversuche

stets ein stickstoffhaltiger Rückstand erhalten wurde; es musste mich dies befremden, da bei dem Zusatz von Phosphorsäure etwa gebildete Succinaminsäure in den Aether nicht übergehen konnte, weil diese in Aether und Alkohol unlöslich ist, und die erhaltenen Krystalle die rhombischen Tafeln des Succinimids zeigten. Es lag also die Möglichkeit nahe, dass das Succinimid sich schwerer in Aether und Alkohol löst, als in der Literatur angegeben ist, und daher der Verdampfungsrückstand nicht genügend mit Aetheralkohol ausgeschüttelt worden war.

Um die Gegenwart der Bernsteinsäure nachzuweisen, benutzte ich die Fällbarkeit von Eisenoxydlösungen durch ihre Neutralsalze in der Siedhitze; den vom Aetheralkohol ungelösten, von Succinimid völlig befreiten, getrockneten Rückstand extrahirte ich mit 55%igem Alkohol, welcher nach meinen bereits erwähnten Versuchen kaum eine Spur des sehr störend wirkenden Fluornatriums aufnimmt, dagegen Natriumsuccinat leicht löst, verdampfte das Filtrat zum Theil, neutralisirte und prüfte mit Eisenchloridlösung: eine beim Erhitzen auftretende gallertartige Ausscheidung konnte nunmehr nur durch die Gegenwart von Bernsteinsäure bedingt sein, denn Succinaminsäure färbt zwar Eisenchloridlösung dunkel blutroth, lässt jedoch kein basisches Salz beim Erhitzen ausfallen, und Succinimid gibt mit Eisenlösung überhaupt keine Farbenreaction.

#### Versuche mit thierischen Fermenten.

**Pepsin.** Das Versuchsgemisch wurde unter Zusatz von etwas Natriumbicarbonat zur Trockne eingedampft. Bernsteinsäure war nicht nachzuweisen, wohl aber trat eine Dunkelfärbung der Eisenchloridlösung ein, so dass Succinimid durch Pepsin nur in Succinaminsäure übergeführt wird.

**Trypsin.** Der alkoholische Verdampfungsrückstand, mit sehr wenig Wasser aufgenommen, wurde durch verdünnte Salzsäure genau neutralisirt; auf Zusatz von Eisenchlorid und Erwärmung entstand eine tief braunrothe Flüssigkeit, welche beim Kochen keine Ausscheidung gab; eine andere Probe entwickelte mit Kalilauge Ammoniak, so dass ich annehmen möchte, dass auch durch Trypsin keine Abspaltung von Bernsteinsäure aus Succinimid bewirkt, sondern nur Succinaminsäure gebildet wird.

**Ptyalin** ist ohne Einwirkung.

### Versuche mit Histozyemen.

Der filtrirte, unter Zusatz von etwas Natriumbicarbonat eingedampfte Digestionsauszug wurde eingedampft, der Rückstand durch Aetheralkohol vom Succinimid befreit, das Ungeloste nach Verdampfen der Flüssigkeit mit 55 %igem Alkohol ausgezogen und nach Neutralisation der Lösung auf die Umsetzungsproducte weitergeprüft, wie bei den Enzymen angegeben. Leider störte der Extractionsfarbstoff in der Lösung die Farbenreaction etwas.

**Leber.** Die möglichst verdünnte Lösung wurde nach dem genauen Neutralisiren mit Eisenchloridlösung versetzt und bis zum Sieden erhitzt; es entstand hierbei ein dunkelrother, gelatinöser Niederschlag, und da eine Probe, mit starker Kalilauge gekocht, kein Ammoniak entwickelte, durch die entwickelten Dämpfe weder Curcumapapier gebräunt noch rothes Lackmuspapier geblaut wurde, so kann auf Abwesenheit von Succinimid und Succinaminsäure sicher geschlossen werden: es ist durch das Leberhistozym aus Succinimid Bernsteinsäure abgespalten worden, welche auch andererseits beim Ausschütteln der mit Phosphorsäure übersättigten Lösung mit Aether und Verdampfen desselben in Krystallen erhalten wurde.

**Niere.** Die mit Aether und 55 %igem Alkohol ausgezogenen Rückstände wurden in Wasser gelöst und mit Eisenchloridlösung versetzt: Succinaminsäure und Bernsteinsäure waren nicht nachzuweisen; Nierenhistozym ist ohne Wirkung.

Aus den erwähnten Versuchen von Koehne ergibt sich klar, dass bei Fütterungsversuchen mit Hunden nur ein sehr geringer Theil des in den Körper eingebrachten Materials denselben unzersetzt passirt, der grösste Teil dagegen im Thierkörper in Bernsteinsäure umgewandelt wird und diese selbst dann, wie die Untersuchungen von v. Longo<sup>1)</sup> und Erdmann<sup>2)</sup> zeigen, in demselben vollkommen zerfällt.

### Versuche mit pflanzlichen Fermenten.

Maltin, Invertin und Emulsin sind ohne Einwirkung auf Succinimid.

---

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 1 S. 214.

2) Ebenda, Anmerkung.



### Succinaminsäure.

Durch die soeben mitgetheilten, mit Succinimid angestellten Versuche ist erwiesen, dass die meisten Fermente wirkungslos sind, die wirksamen aber, Pepsin und Trypsin, dieses Imid zwar spalten, aber auch nur bis zur Bildung von Succinaminsäure. So sind denn Prüfungen mit diesen beiden zuletzt genannten Fermenten naturgemäss überflüssig; die mit den übrigen waren voraussichtlich erfolglos, doch habe ich sie der Vollständigkeit wegen noch angestellt. Ebenso habe ich auch noch Versuche mit Leberhistozym gemacht, um festzustellen, ob Succinaminsäure nicht allein im Entstehungszustande, sondern auch als geschlossenes Molekül zerlegt wird.

Zur Darstellung der Succinaminsäure hat sich mir am meisten folgendes Verfahren bewährt: Ein Gemisch von 30,0 Succinimid, 48,5 — die äquivalente Menge — Barythydrat und 200,0 frisch ausgekochten destillirten Wassers wurde im Erlenmayer-Kolben mit eingesenktem Thermometer bis 75° 24 Stunden erwärmt; da bei dieser Temperatur sich kein Ammoniak entwickelt, so ist die Einwirkung des Baryumhydroxyds auf Succinaminsäure weniger energisch, als bei Anwendung von Calciumhydroxyd beobachtet.

Vortheilhaft ist es, sich erst Barytwasser frisch darzustellen, da sich immer wieder etwas Baryumcarbonat ausscheidet, und in das Filtrat bei 75° C. das Succinimid einzutragen; dasselbe löst sich sofort, und eine spätere schwache Trübung von Baryumcarbonat kann man unberücksichtigt lassen. Zum Abscheiden der Säure aus dem succinaminsauren Baryum soll eine geringe Menge des Salzes unzerlegt bleiben; ich entnahm daher der alkalischen Lösung 30 ccm, fällte die übrige Menge mit verdünnter Schwefelsäure genau aus und fugte die zurückbehaltene Menge zu; das Filtrat wurde vorsichtig concentrirt, in eine grosse Menge mit etwas Aether vermischten Alkohols unter stetem Ruhren in dünnem Strahl eingegossen und die Ausscheidung einige Tage zur volligen Klärung beiseitegestellt. Das mit Aetheralkohol ausgewaschene feine weisse Pulver gab in Wasser gelöst auf Zusatz von Eisenchloridlösung beim Erwärmen eine tief dunkle Färbung, beim Kochen jedoch keine Ausscheidung, so dass das Präparat frei von Bernsteinsäure war. Diese Reaction benutzte ich zur Erkennung der Succinaminsäure für sich wie auch neben Bernsteinsäure; eine dunkelgefärbte Flüssigkeit mit einem gallertigen Niederschlag beim Kochen enthält beide Säuren;

ist die Flüssigkeit dagegen über dem Niederschlag farblos, so war nur Bernsteinsäure zugegen: denn Succinimid gibt mit Eisenchlorid keine Reaction. Da sich bernsteinsaures Natrium, wie mich Versuche lehrten, leicht in 55 %igem Alkohol auflöst, Fluornatrium dagegen wie schon erwähnt, nicht, so bedarf es demgemäss nur des Ausschüttelns der bei den Versuchen erhaltenen Verdampfungsrückstände mit verdünntem Alkohol, um in dieser Lösung nach genauer Neutralisation direct auf Bernsteinsäure prüfen zu können; ausserdem verdampfte ich die alkoholische Lösung auf dem Wasserbad, nahm den Rückstand mit wenig Wasser auf und versetzte mit viel Alkohol, filtrirte die Ausscheidung ab, wusch mit Alkohol nach, löste in Wasser und prüfte weiter.

#### Versuche mit thierischen Fermenten.

Ueber Pepsin und Trypsin ist das oben Gesagte zu vergleichen.

Ptyalin war wirkungslos.

#### Versuche mit Histozymen.

Hier kam es darauf an, in Folge des stark gefärbten Digestionsauszuges, die Eisenreaction deutlich zu machen; es wurde daher der alkalische Verdampfungsrückstand zunächst mit Aether ausgeschüttelt, um Fett zu beseitigen; den Rückstand zog ich mit 55 %igem Alkohol aus, um Natriumsuccinat in Lösung zu bekommen, und nach mehrmaligem Wiederlösen, Schütteln mit Aether u. s. w. blieb schliesslich ein schwach gelblichgefärbter Rückstand, welcher, in Wasser gelöst und neutralisirt, mit Eisenlösung geprüft werden konnte.

Leber. Es trat beim Aufkochen der Probeflüssigkeit mit Eisenlösung eine starke Dunkelfärbung ein, jedoch keine Fällung, so dass ich annehmen muss, dass ein Theil der Succinaminsäure noch unzersetzt vorhanden ist, ein Theil derselben jedoch in Bernsteinsäure übergeführt, diese aber zweifellos weiterzerlegt ist, weil Succinimid durch Leber in Bernsteinsäure übergeführt wird.

Niere. Beim Erhitzen mit Eisenchloridlösung entstand keine gelatinöse Ausscheidung, so dass eine Bildung von Bernsteinsäure nicht anzunehmen ist.

#### Versuche mit pflanzlichen Fermenten.

Die pflanzlichen Fermente Invertin, Maltin und Emulsin sind wirkungslos auf Succinaminsäure.

### Dibenzamid.

Dieses Präparat musste erst dargestellt werden, und sollen nach Barth und Senhofer<sup>1)</sup> in ein Gemisch von 7 Theilen rauchender Schwefelsäure und 4 Theilen wasserfreier Phosphorsäure allmählich 7 Theile Benzonitril eingetragen, die Masse durchgeschüttelt und nach einigen Stunden mit viel Wasser versetzt werden. Die Krystalle krystallisirt man aus Alkohol um.

Nach dieser einfach erscheinenden Vorschrift kommt man nicht zum Ziel, denn dem dick-öligem Säuregemisch sind die vorgeschriebenen Mengen Benzonitril „allmählich“ — d. h. doch nach und nach oder in kurzen Pausen — nicht zuzufügen, weil bereits nach der Zusetzung der Hälfte an Benzonitril die Gesamtmischung steinhart wurde. Den zweiten Versuch mit 50,6 Benzonitril führte ich mit besserem Erfolg so aus, dass ich das Säuregemisch in einen starken Porzellanmörser gab und unter stetem Rühren ununterbrochen in dünnem Strahl die völlige Menge Benzonitril zufügte; hierbei trat natürlich eine Erwärmung ein, welche etwas Benzonitril verflüchtigte, allein das Gemisch konnte bis zuletzt, wenn auch schwierig durch seine steife Consistenz, gut durchgerührt werden, — ein „Durchschütteln“, wie ich es zuerst nach der Originalvorschrift im Kolben vornehmen wollte, ist geradezu unmöglich.

Die Masse war bald steinhart geworden, blieb bis zum nächsten Tag stehen, liess sich sehr schwer kleinstückenweis aus dem Mörser bringen, — Porzellanschalen gehen hierbei sicher entzwei; die Stücke zerrieb ich fein, fugte wenig Wasser hinzu und erzielte dadurch nach einiger Zeit ein gleichmässiges, syrupöses Gemisch, welches, noch etwas mehr verdünnt, unter Rühren in die 300fache Menge Wassers an Benzonitril eingegossen, schnell eine milchige Flüssigkeit gab, aus sehr feinen Flöckchen von Dibenzamid bestehend. Die vollständige Ausscheidung des Productes dauert mindestens drei Tage; der abfiltrirte, ausgesüsste und abgepresste Niederschlag wurde in heissem Alkohol gelöst, auf dem Wasserbad mit warmem Wasser bis zur eintretenden Trübung versetzt und die Flüssigkeit zur Krystallisation beiseitegestellt; die Mutterlaugen wurden weiterverarbeitet, als noch farblose, geruchfreie Krystalle sich ausschieden.

---

1) Berichte d. chem. Gesellsch. Bd. 9 S. 975.

Die Ausbeute betrug gegen 16 % des Benzonitrils, — immer eine geringe.

Unlöslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol, zeigt das Benzdiamid unter dem Mikroskop die der Benzoëssäure ähnlichen Fahnengruppen wie auch grosse Nadeln, so dass der sichere Nachweis der Säure erschwert ist, wenn nicht die rhombischen Platten mit den abgesetzten Längsseiten vorhanden sind. Alle Versuchsgemische wurden mit etwas Natriumbicarbonat eingedampft, der Rückstand mit Wasser wieder aufgenommen, das Filtrat eingengt, mit Phosphorsäure übersättigt, mit Aether öfter ausgeschüttelt, diese Lösung vorsichtig verdampft: das mikroskopische Bild sowie die Eisenreaction gaben mir die Sicherheit von der Gegenwart der Benzoëssäure oder Hippursäure.

#### Versuche mit thierischen Fermenten.

**Pepsin.** Beim Verdampfen des ätherischen Auszuges auf dem Deckglas zeigten sich federfahnenartige Gebilde, die wohl auf Benzoëssäure schliessen liessen; nach dem völligen Eindampfen im Schälchen resultirten neben den grossen, balkenförmigen Krystallen des Dibenzamids, auch die Tafeln der Benzoëssäure; es wird sonach das Dibenzamid durch Pepsin zum Theil in Benzoëssäure übergeführt.

**Trypsin;** eine Verseifung des Dibenzamids war nicht eingetreten.

**Ptyalin** ist ohne Einwirkung.

#### Versuche mit Histozy men.

**Leber.** Der ätherische Auszug, erhalten aus dem mit Phosphorsäure angesäuerten Rückstand, gab beim Verdampfen tafelförmige Krystalle, die als Benzoëssäure angesehen werden konnten; beim Kochen mit starker Lauge entwickelte sich jedoch auch Ammoniak, welches rothes Lackmuspapier bläute; desshalb wurde der Verdampfungsrückstand mit verdünnter Sodalösung längere Zeit digerirt, die Flüssigkeit abfiltrirt, mit Phosphorsäure übersättigt, mit Aether ausgeschüttelt und dieser verdampft: es erschienen nunmehr die charakteristischen Krystalle der Benzoëssäure mit ihren abgesetzten Längsseiten wie auch gekreuzte Complexe der Hippursäure. Ein anderer Theil der Flüssigkeit wurde mit einem Tropfen Eisenchloridlösung versetzt und erhitzt: es entstand eine tief blutrothe Färbung, welche meiner Ansicht nach in diesem Fall nur auf die Gegenwart von Benzoëssäure zurückzuführen ist; eine isabellfarbene Ausscheidung von basischem hippursäurem Eisen trat allerdings nicht ein.

Es wirkt also das Leberhistozym auf Dibenzamid in gleicher Weise verseifend ein wie auf Benzamid.

Niere. Durch das Nierenhistozym wird Dibenzamid gleichfalls in Benzoësäure übergeführt.

Aus den Fütterungsversuchen von Koehne geht hervor, dass das Dibenzamid im Thierkörper unter Bildung von Benzoësäure zersetzt und diese als Hippursäure ausgeschieden wird.

#### Versuche mit pflanzlichen Fermenten.

Bei den Einwirkungen von Invertin, Maltin und Emulsin waren Verseifungsproducte nicht nachzuweisen.

#### Disalicylamid.

Dieses Präparat stellte ich nach der Vorschrift von Schulerud<sup>1)</sup> dar durch Ueberleiten von Salzsäuregas über in einem Verbrennungsrohr vertheiltes und langsam erhitztes Salicylamid. Das erstarrte Umsetzungsproduct, eine gelbliche Masse, wurde mit warmem Wasser so lange verrieben und abgeschwemmt, bis eine Probe mit sehr verdünnter, fast farbloser, durch einige Tropfen Salzsäure angesauerter Eisenchloridlösung keine Blaufärbung mehr gab. Disalicylamid ist in Wasser unlöslich, schwer löslich in Aether, ziemlich leicht in heissem Alkohol; die alkoholische Lösung wird durch Eisenchlorid roth gefärbt. Zusatz von Eisenchlorid zu in Wasser vertheiltem Disalicylamid ruft keine Färbung hervor<sup>2)</sup>. Den Nachweis von gebildeter Salicylsäure konnte ich auf gleiche Weise wie bei Salicylamid ausführen, da auch das Disalicylamid in concentrirter Ammoniumacetatlosung nicht löslich ist; doch ich zog vor, die Versuchsgemische zum Theil nach benoethigter Zugabe von Natriumcarbonat einzudampfen, das Natriumsalicylat durch Wasser auszuziehen, die filtrirte Lösung mit Phosphorsäure zu übersättigen und den Verdampfungsrückstand auf Salicylsäure zu prüfen.

#### Versuche mit thierischen Fermenten.

Pepsin. Der Aetherrückstand wurde fein zerrieben und mit concentrirter Ammonacetatlösung unter Zusatz einiger Tropfen Salz-

---

1) Journal f. pr. Chemie Bd. 2 H. 2 S. 289.

2) Beilstein Bd. 2 S. 1499.

säure vermischt, diese Lösung mit Wasser verdünnt, das Filtrat mit Eisenchlorid geprüft — in diesem Falle konnte allein Salicylsäure zugegen sein —; es entstand eine tiefblaue Farbenreaction, so dass ich annehmen musste, dass das Disalicylamid durch Pepsin in Salicylsäure übergeführt worden ist. Allein, der Controlversuch mit gekochtem Pepsin gab bei gleichem Verfahren die gleiche, wenn auch scheinbar schwächere Farbenreaction! Nach dieser auffallenden Erscheinung schien es mir möglich, dass die — wenn auch sehr geringe — Menge der in beiden Fällen zugesetzten Salzsäure bereits Salicylsäure abgespalten haben könnte. Nun hatte ich in den gleichzeitig angestellten Trypsinversuchen beobachtet, dass in beiden Fällen, also auch bei Verwendung von gekochtem Trypsin, Salicylsäure gebildet wurde. Das führte mich denn zu der Vermuthung, die Spaltung werde durch das kohlen saure Natrium veranlasst, welches ja den Trypsin-Versuchsgemischen von vornherein zugesetzt, in den Pepsinversuchen aber in gewohnter Weise zum Neutralisiren benutzt worden war, in dem letzteren Falle nicht ohne Vermeiden eines kleinen Ueberschusses von Soda. In der That zeigte sich, dass auch ganz schwache Sodalösung allein das Disalicylamid spaltet, wenn auch, wie dies bei der Unlöslichkeit des Amids begreiflich ist, nur zu einem kleinen Theil. Ob das Pepsin gar nicht auf Disalicylamid einwirkt, war nun freilich auch nicht entschieden; ich möchte aber die Einwirkung schliesslich doch als nicht vorhanden bezeichnen, da Aether aus den sauer gebliebenen Versuchsgemischen keinen Eisenchlorid bläuenden Stoff aufnahm.

Mit Trypsin sind nach dem oben Mitgetheilten Versuche unmöglich.

Ptyalin war ohne Einwirkung, weil die Eisenreaction direct vorgenommen wurde und ausblieb.

#### Versuche mit Histozyten.

Bei der Empfindlichkeit des Disalicylamids Alkalien gegenüber musste ich zunächst feststellen, ob nicht auch das alkalisch reagirende Fluornatrium bereits einwirken könnte. Das ist aber auch bei längerer Digestion offenbar nicht der Fall, ich brauchte also nicht auf die Verwendung des Fluornatriums in meinen wiederholten Versuchen zu verzichten; nur musste der Zusatz von Soda bei den Nierenversuchen fortbleiben; da in den Hauptversuchsgemischen und in den Controlversuchen mit gekochten Organen sich Salicylsäure nachweisen

liess, führe ich diese auffallende Erscheinung darauf zurück, dass nach meiner Beobachtung sich das Disalicylamid bereits in 50 %igem Alkohol löst und demgemäss Eisenchlorid eine Blaufärbung entstehen lassen musste. Die Gemische der neuen Versuchsweise wurden nach der Digestion aufgeköcht, das Filtrat bis zum Syrup eingedampft, diesem etwas Ammonacetat zugefügt, die Lösung mit Wasser verdünnt und filtrirt: Disalicylamid muss als unlöslich zurückbleiben, während, eventuell unter Zusatz von etwas Salzsäure, Eisenchloridlösung im Filtrat Salicylsäure erkennen lassen wurde.

**Leber.** Die Filtrate gab ich in sehr verdünnte, mit einigen Tropfen Salzsäure versetzte Eisenchloridlösung: in beiden Versuchen trat nunmehr keine Bläuung oder die Rothfärbung der Salicylreaction ein, so dass ich als erwiesen annehmen muss, dass das Leberhistozym auf Disalicylamid nicht verseifend einwirkt.

**Niere.** Diese Versuche waren also ohne Zusatz von Soda ausgeführt, und schien mir daher der Erfolg zweifelhaft. Desshalb überraschte es mich, dass bereits das Filtrat vom Hauptversuch mit Eisenchlorid eine kirschrothe Färbung gab, während bei dem Controlversuch diese Reaction nicht eintrat. Im weiteren Verlauf trat die Reaction im Hauptversuch sehr deutlich auf, und nehme ich als erwiesen an, dass Nierenhistozym aus Disalicylamid Salicylsäure abspaltet, jedoch wohl in geringerem Maasse als bei Gegenwart von Soda.

#### Versuche mit pflanzlichen Fermenten.

Invertin, Maltin und Emulsin sind bei Abwesenheit von Soda wirkungslos.

#### Phtalimid.

Auch bei diesen Versuchen traten bedeutende Schwierigkeiten ein, da Phtalimid sowie die Phtalsäure fast gleiche Lösungsverhältnisse und Krystallform zeigen. Die eingetretene Verseifung sollte constatirt werden, wenn Phtalsäure sicher nachgewiesen worden ist; diese würde sich in den Versuchslösungen an Natrium gebunden vorfinden, wenn auch die bisher angewendete Methode eingehalten wird. Landsberg<sup>1)</sup> gibt an, dass die Phtalimidsalze beim Behandeln mit Säuren Phtalimid wieder abscheiden; dagegen

---

1) Liebig's Annalen Bd. 215 S. 181

hat Koehne<sup>1)</sup> gefunden, dass aus einer wässrigen Phtalimidnatriumlösung — dieses konnte sich wohl beim Eindampfen der Versuchslösung mit Soda bilden — auf Zusatz von Salzsäure bei Zimmertemperatur in 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> bis 2 Tagen, sogar nach ganz kurzer Zeit nicht Phtalimid, sondern Phtalsäure ausgeschieden wird. Nach dieser Beobachtung Koehne's wäre es also absolut unmöglich, genau nachzuweisen, ob die gefundene Menge Phtalsäure während der Einwirkung der Fermente und Histozyne aus Phtalimid entstand oder bereits beim Zerlegen des Phtalimidnatriums durch Phosphorsäure abgeschieden worden ist; aber es bildet sich, wie ein besonderer Versuch zeigte, beim Digeriren und Eindampfen des Phtalimids mit Soda die erwähnte Natriumverbindung nicht; es schied sich aus dem Aetherauszug der mit Phosphorsäure stark angesäuerten Rückstände immer wieder nur Phtalimid aus. Es stand also nichts im Wege, bei den Versuchen selbst oder nachträglich Soda zu verwenden. So wurden denn die Gemische unter Zusatz von etwas Natriumbicarbonat auf dem Wasserbad eingedampft, mit 93 %igem Alkohol, welcher auch phtalsaures Natrium löste, verrieben und mit einer grösseren Menge 24 Stunden unter häufigem Umschütteln digerirt, das Filtrat eingedampft, der Rückstand eventuell in Wasser gelöst, das Filtrat mit Phosphorsäure übersättigt, durch Aether ausgeschüttelt und dieser verdampft: der Rückstand konnte nur Phtalsäure sein.

#### Versuche mit thierischen Fermenten.

**Pepsin.** Beim Verreiben des Verdampfungsrückstandes mit 93 %igem Alkohol entstand bei dem Hauptversuch eine milchige Trübung, aus welcher sich dann eine weisse Ausscheidung absetzte; bei dem Controlversuch trat diese Erscheinung nicht ein, sondern es blieb bei geringer Trübung des Alkohols ein sandiger, sich schnell absetzender Rückstand. Die auf dem Wasserbad eingedampften Filtrate gaben einen weingelb gefarbenen Rückstand; in wenig Wasser aufgenommen, mit etwas Phosphorsäure versetzt, entstand bei dem Hauptversuch eine sandige Ausscheidung, während bei dem Controlversuch mit gekochtem Ferment die Lösung klar blieb. Der beim Verdampfen des ersten Aetherauszuges erhaltene Rückstand wurde nochmals in Aetheralkohol gelöst, und aus dieser Lösung schieden

---

1) Dissertation. Rostock 1894.



sich sternförmig gruppirte, faserige Krystalle wie auch lange Nadeln aus, welche denen entsprachen, die aus einer alkoholischen Lösung von reiner Phtalsäure erhalten wurden. Pepsin führt Phtalimid in Phtalsäure über.

Trypsin. Die erhaltenen Krystalle bestanden theils aus Phtalimid — es entwickelte sich beim Kochen mit Lauge Ammoniak —, theils aus Phtalsäure, weil eben ersteres etwas in Wasser löslich ist. Im Controlversuch fand sich nur etwas Phtalimid; auch Trypsin wirkt verseifend.

Ptyalin war ohne Einwirkung.

### Versuche mit Histozy men.

Den Versuchsgemischen wurde nach dem Erkalten, wenn nöthig etwas Natriumbicarbonat bis zur schwach alkalischen Reaction zugefügt und die Flüssigkeit sechs Stunden unter öfterem Schütteln stehen gelassen; das weitere Verfahren war wie bei den Fermenten.

Leber. Der Verdampfungsrückstand war gefärbt und wurde nochmals mit Alkohol ausgezogen; beim langsamen Verdunsten resultirten vorherrschend die langen Nadeln der Phtalsäure; da jedoch beim Kochen mit Lauge sich Ammoniak entwickelte, so ist es zweifellos, dass auch Phtalimid zugegen war und durch das Leberhistozym Phtalimid zum grössten Theil in Phtalsäure übergeführt wird.

Niere. Der ätherische Verdampfungsrückstand war äusserst gering; in dem verbliebenen gelblichen Syrup waren nur spärliche Phtalsäurenadeln zu finden, auch bei erneutem Auflösen in heissem Alkohol und Verdunsten desselben; ich möchte daher annehmen, dass die in der Leber bereits entstandene Phtalsäure während des Passirens der Nieren völlig zerstört wird.

Vergleicht man diese Erscheinungen mit den Resultaten, welche Koehne bei seinen Fütterungsversuchen erhielt, sowie mit den Berichten Juvalta's<sup>1)</sup> über die Zerstörbarkeit der Phtalsäure im Thierkörper, so wird meine Ansicht über die Wirkung des Nierenhistozyms Bestätigung finden.

---

1) Zeitschr. f phys. Chemie Bd. 12 S. 26.

Versuche mit pflanzlichen Fermenten.

Invertin und Maltin sind wirkungslos.

Emulsin. Die beiden Versuche unterschieden sich bereits beim Auflösen der ätherischen Verdampfungsrückstände in Wasser; bei dem Hauptversuch entstand eine klare, gelbliche Lösung, während bei dem Controlversuch mit gekochtem Emulsin eine milchige Trübung eintrat; beim Ansäuern mit Phosphorsäure und Ausschütteln mit Aether waren wieder getrennte, klare Schichten vorhanden. Bei dem Controlversuch war Phtalimid unverkennbar zu constatiren, während aus dem Hauptversuch sich erst nach einigen Tagen Phtalsäurekrystalle ausschieden; es wirkte also das Emulsin ähnlich wie auf Acetamid und Formanilid verseifend auf Phtalimid ein. —

Zum Schluss lasse ich noch einmal eine Gesamtübersicht der Resultate aus meinen beiden Versuchsreihen folgen. In den horizontalen Reihen fallen sämtliche Oxalsäurederivate aus, wie an einer anderen Stelle bereits hervorgehoben. In den verticalen Reihen fallen die Enzyme Ptyalin, Invertin und Maltin aus, und es ist wohl mit der grössten Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass auch die nicht untersuchten Enzyme dieser Gruppe die Säureimide nicht zerlegen. Das verschiedene Verhalten der anderen Enzyme lässt sich einstweilen wohl noch nicht in ein einfaches Bild zusammenfassen; der Wirkungsbezirk eines jeden Fermentes wird sich erst

Saureamide und -Anilide, Imide und Aminsäuren	Pepsin	Trypsin	Ptyalin	Leber (Schaf)	Niere (Schaf)	Invertin	Maltin	Emulsin
Formamid . . . . .	—	—	—	+	+	—	—	—
Acetamid . . . . .	—	+	—	+	—	—	—	+
Oxamid . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—
Succinamid . . . . .	—	—	—	+	—	—	—	—
Benzamid . . . . .	—	—	—	+	+	—	—	—
Salicylamid . . . . .	—	—	—	—	+	—	—	—
Formanilid . . . . .	+	+	—	+	+	—	—	+
Acetamid . . . . .	+	+	—	—	—	—	—	—
Oxanilid . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—
Benzanilid . . . . .	—	—	—	—	+	—	—	—
Oxaminsäure . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—
Succinimid . . . . .	+	+	—	+	—	—	—	—
Succinaminsäure . . . . .	—	—	—	+	—	—	—	—
Dibenzamid . . . . .	+	—	—	+	+	—	—	—
Disalicylamid . . . . .	—	—	—	—	+	—	—	—
Phtalimid . . . . .	+	+	—	+	+	—	—	+

Parabansäure: Bei dieser Verbindung lässt sich das verseifende Organ nicht sicher bestimmen.

nach Prüfung an den verschiedenartigsten Körpern bekannter Constitution feststellen lassen <sup>1)</sup>); hervorgehoben könnte wohl die Leistungsfähigkeit der Leber werden; ihr kommt die der Niere sehr nahe, doch ist Beides im Allgemeinen bekannt aus früheren Untersuchungen.

---

1) Vgl. hierzu die Arbeiten von Fischer, Zeitschr. f. phys. Chemie Bd. 26 S. 71. 1898. — Chem. Ber. Bd. 27 S. 2992.

---