

Ueber das Verhalten des Trypsins gegen einfachere chemische Verbindungen.

Von
Wl. Gulewitsch.

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)
(Der Redaction zugegangen am 4. Juni 1899.)

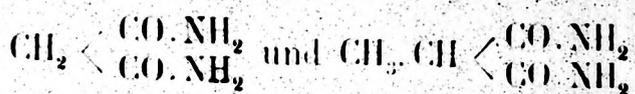
I. Mittheilung.

Durch zahlreiche und mühevollere Untersuchungen ist die Thatsache festgestellt, dass bei der tryptischen Verdauung der Eiweissstoffe das grosse und äusserst complicirt zusammengesetzte Molekül derselben schliesslich in eine Menge von verschiedenen, einfacher gebauten Verbindungen zerfällt. Wie aber dieser Zerfall vor sich geht, welche chemische Bindungen im Eiweissmolekül durch die Wirkung des Trypsins angegriffen und gelöst werden, ob dabei nicht etwa neue Bindungen erscheinen und neue Moleküle aus den entstandenen Bruchtheilen gebildet werden, kurz gesagt, was für ein Mechanismus der tryptischen Verdauung der Eiweissstoffe zu Grunde liegt, darüber gibt die biologische Chemie bis jetzt keine Antwort.

Die Kenntniss des Mechanismus der tryptischen Verdauung wird nicht nur den stufenweisen Zerfall des Eiweissmoleküls verständlich machen; sie wird auch den Schlüssel zur Aufklärung der chemischen Constitution der Eiweissstoffe und somit einen bedeutenden Beitrag zur Lösung eines der theoretisch interessantesten und praktisch wichtigsten Probleme: des der Eiweiss-synthese, liefern.

Aus denselben Gründen, nach welchen man für die Polysaccharide die Möglichkeit der Vereinigung von Resten ein-

facher gebauter Kohlehydratgruppen zu complicirten Molekülen durch direkte Kohlenstoffbindungen ausschliesst und die Bindung derselben durch die Sauerstoffatome annimmt, ist auch für die Eiweissstoffe die Vermuthung wenig plausibel, dass die durch Trypsineinwirkung so leicht zu lösenden Bindungen direkte Vereinigungen der Kohlenstoffatome untereinander seien. Damit ist aber bei weitem noch nicht gesagt, dass die einzelnen Gruppen im Eiweissmolekül durch Sauerstoffatome verbunden sind, da für die Eiweissstoffe noch die Möglichkeit vorhanden ist, dass die einzelnen Theile des Moleküls derselben durch die verschiedenen stickstoffhaltigen Gruppen im Zusammenhang stehen. Durch die bekannten Untersuchungen von Schützenberger ist sogar die Annahme plausibel gemacht, dass wenigstens ein Theil der im Eiweissmolekül vorhandenen Bindungen von dieser letzteren Art ist. Die meines Wissens zuerst von Morochowetz¹⁾ erwähnte Thatsache, dass bei der tryptischen Verdauung die Biuretreaction schliesslich verschwindet, lässt noch keinen Schluss über die durch Trypsin anzugreifenden Bindungen des Eiweissmoleküls zu, da über die die Biuretreaction bedingenden Gruppen des Eiweissmoleküls noch nichts bekannt ist, und durch die Untersuchungen von H. Schiff²⁾ bewiesen ist, dass auch diejenigen Körper, in welchen die stickstoffhaltigen Bindungen fehlen, diese Reaction geben können, wie z. B. folgende Substanzen:



Es ist selbstverständlich auch die Möglichkeit denkbar, dass die verschiedenen im Eiweissmolekül vorhandenen Reste von einfacheren Molekülen durch die verschiedenartigen Bindungen zu einer grossen Einheit vereinigt sind.

Die Untersuchung des Mechanismus der tryptischen Eiweissverdauung durch das Studium des Abbauprocesses der Eiweissstoffe unter der Einwirkung von Trypsin scheint zur Zeit nur wenig Erfolg zu versprechen, vor Allem in Folge der

¹⁾ L. Morochowetz, Petersburger medic. Wochenschr., N. F., 3. Jahrg. 1886, S. 135.

²⁾ H. Schiff, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 29, S. 298.

äusserst complicirten und verwickelten Verhältnisse, die dabei vermuthlich stattfinden. Mehr Erfolg kann man vielleicht durch Versuche über das Verhalten des Trypsins gegen einfachere chemische Verbindungen erzielen, indem man von diesen nach und nach zu den complicirteren aufsteigt. Es müssen doch irgend welche Körper vorhanden sein, die den Eiweissstoffen ähnlich durch das Trypsin zerspalten werden! Es wäre ganz sonderbar, wenn nur die Eiweisskörper durch das Trypsin angreifbar wären, um so mehr, als auch die Eiweisskörper selbst ohne Zweifel eine verschieden complicirte Zusammensetzung haben.

Dass die Versuche in dieser Richtung nicht erfolglos bleiben werden, zeigt die Arbeit von A. Kossel und A. Mathews,¹⁾ welche gefunden haben, dass Protamine, die im Vergleich mit Eiweissstoffen viel einfacher zusammengesetzt sind, durch das Trypsin unter Bildung von Hexonbasen und unter Verschwinden der Biuretreaction zerspalten werden.

Andere Versuche die Einwirkung des Trypsins auf einfachere Substanzen betreffend fehlen bis jetzt meines Wissens vollständig. Die zahlreichen Beobachtungen über das Schicksal der per os gegebenen Substanzen im Organismus können hier nicht in Betracht kommen, auch in den Fällen nicht, wo ihr Resultat negativ war, da unveränderter Durchgang der eingeführten Substanzen durch den Organismus nur dadurch bedingt sein kann, dass sie im Magen resp. im Darm resorbirt werden, bevor sie der Wirkung des Trypsins in genügendem Maasse unterlegen sind: auch können die Zerspaltungsprodukte durch synthetische Vorgänge im Organismus in die ursprünglichen Verbindungen zurückverwandelt sein.

Nach dem Vorschlag des Herrn Prof. A. Kossel, dem ich für die Ueberlassung dieses interessanten Themas zu vielem Dank verpflichtet bin, habe ich einige Versuche über das Verhalten des Trypsins gegen einfachere Verbindungen ausgeführt. Zwar habe ich bis jetzt fast nur negative Resultate erhalten, doch seien auch diese mitgetheilt, da auch die negativen Resultate von Wichtigkeit sind, indem sie den Kreis der Tryp-

¹⁾ A. Kossel und A. Mathews, diese Zeitschr., Bd. 25, S. 190.

Einwirkung einschränken und somit per exclusionem zu der Aufsuchung der von Trypsin angreifbaren Substanzen führen können. Selbstverständlich ist es nicht leicht, die zu solchen Versuchen passenden Substanzen ausfindig zu machen, da die Angreifbarkeit derselben durch das Trypsin nicht nur von einer besonderen Constitution, sondern auch von einer bestimmten Configuration abhängig sein kann, wie es die höchst interessanten Versuche von E. Fischer¹⁾ über die Einwirkung von Enzymen auf verschiedene Stereoisomere zeigen. Darum kann die Lösung der Aufgabe nur nach einer grossen Zahl negativer Versuche erzielt werden.

Ein weiterer praktisch sehr ungünstiger Umstand ist der, dass in der Pankreasdrüse nicht Trypsin allein, sondern noch ein diastatisches und ein fettzerspaltendes Ferment vorhanden sind. Um die Einwirkung dieser beiden letzteren Enzyme zu eliminiren, müssen sie zuerst zerstört werden, was durch die Selbstverdauung des Pankreasextracts resp. durch andere Operationen ohne Mühe zu erzielen ist, zugleich aber die Abschwächung des Trypsins selbst herbeiführen kann.

Eine andere Complication kann auch darin bestehen, dass bis jetzt noch nicht nachgewiesen ist, dass das Trypsin aus einem einzigen Fermente und nicht aus einem Gemenge von mehreren Enzymen besteht, die in ihrer Einwirkung etwas differiren, so dass derselbe Körper durch ein Präparat des Trypsins zerspalten werden, durch ein anderes unangegriffen bleiben kann. Existiren doch verschiedene Enzyme, die die Spaltung der Kohlehydrate in bestimmten Richtungen ausführen und den einen Körper dieser Gruppe zerspalten, während sie den anderen intact lassen.

Für meine Versuche habe ich verschiedenartige Präparate des Trypsins benutzt.

So habe ich z. B. eine tryptisch wirkende Flüssigkeit nach Hammarsten's²⁾ Verfahren dargestellt, indem ich fein zerhacktes

1) E. Fischer, diese Zeitschr., Bd. 26, S. 60.

2) O. Hammarsten. Lehrbuch der physiol. Chem., 3. Aufl. 1895, S. 265.

Pankreas mit 8—10 Theilen Wasser, welches 0,03% Ammoniak enthielt, 24 Stunden bei Zimmertemperatur digerirt, dann abfiltrirt und das Filtrat mit verdünnter Essigsäure vorsichtig fällte: der entstandene Niederschlag wurde möglichst schnell abfiltrirt, mit verdünnter Sodalösung digerirt und nach einiger Zeit abfiltrirt. Das Volumen der Flüssigkeit betrug $\frac{3}{4}$ der ersten Lösung, der Gehalt an Soda war 0,25—0,3%. Diese tryptisch wirkende Flüssigkeit will ich als Tr. A. bezeichnen.

Eine andere tryptisch wirkende Flüssigkeit habe ich nach folgendem Verfahren dargestellt: 17 Pankreasdrüsen wurden mit etwas Thymol und Chloroform¹⁾ versetzt und 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur liegen lassen. Dann wurde jedes Pankreas getrennt fein zerhackt und während 20 Stunden mit 4 Gewichtstheilen einer wässerigen Lösung digerirt, die in 1 L. 1 gr. wasserfreies Natriumcarbonat, 1 gr. Thymol und 5 cem. Chloroform enthielt. Von jeder Portion wurde je eine kleine Probe zur Prüfung mit Fibrin auf ihre tryptische Wirkung entnommen: von 17 Pankreasdrüsen wurde eine kräftige Wirkung bei nur 7 constatirt und diese für die weitere Verarbeitung benutzt. 3 Portionen wurden filtrirt und mit Soda bis 0,5% Gehalt gemischt, dann im Brütöfen 48 Stunden digerirt (Tr. B.). Die anderen 4 Portionen wurden auf dieselbe Weise 4 × 24 Stunden digerirt, filtrirt und in Pergamentschläuchen 8 × 24 Stunden im fließenden Wasser unter Zusatz von Thymol dialysirt, dann mit 0,3% Soda versetzt und filtrirt (Tr. C.).

Für die meisten Versuche habe ich das von Dr. Grübler-Dresden bezogene Präparat: Trypsinum siccum Grübler angewandt (Tr. D.).

Die Verdauungskraft der verschiedenen von mir benutzten Präparate war sehr ungleich, wie es bei den Trypsinpräparaten leider so oft beobachtet wird. Als Verdauungsprobe dienten

1) Bei allen meinen Versuchen habe ich besonderes Gewicht darauf gelegt, dass dem Trypsin die bacteriellen Fermente nicht beigemischt waren; darum sind alle Operationen antiseptisch unter Anwendung von Thymol und Chloroform durchgeführt.

2 gr. zwischen Filtrirpapier abgepresstes Fibrin,¹⁾ das mit Alkohol in keiner Berührung war: das zerkleinerte Fibrin wurde mit 10 cem. 0,6% iger Sodalösung gemischt, dazu 10 cem. der zu prüfenden Flüssigkeit zugesetzt, und das Reagensglas mit der Mischung in das Wasserbad bei 38—44° gebracht. Tr. A. löste das Fibrin bei diesen Bedingungen nur langsam, nämlich in 1 $\frac{1}{4}$ Stunde.²⁾ Durch Tr. B. vor seinem Digeriren im Brütöfen wurde das Fibrin in 35—40 Minuten, durch Tr. C. vor Digeriren in 25—30 Minuten aufgelöst; nach dem Digeriren und nach dem Dialysiren (bei Tr. C.) nahm aber die Verdauungskraft beider Präparate auffallend ab. Tr. D., von welchem ich zwei Präparate hatte, verdaute kräftig: 0,1 gr.³⁾ in 15 cem. 0,5% iger Sodalösung gelöst, brachten 2 gr. Fibrin in 17 bis 20 Minuten zur Lösung, so dass das Fibrin vor den Augen so zu sagen schmolz. Auch dieses kräftig wirkende Präparat war gegen die Digerirung bei Brüttemperatur sehr empfindlich; einige in dieser Richtung gemachten Versuche haben gezeigt, dass die Trypsinlösung, je länger sie vorher, d. h. ohne Fibrin, erwärmt wurde, desto mehr in ihrer Wirkung abgeschwächt war. Nach Erwärmen in der sodahaltigen Lösung im Brütöfen während 19 Stunden konnte Tr. D. bei ganz denselben Bedingungen wie früher das zugesetzte Fibrin erst in 22 Stunden auflösen: das der Wirkung der Brüttemperatur während 1 $\frac{1}{4}$ Stunde ausgesetzte Tr. D. löste das Fibrin in 3 $\frac{1}{2}$ Stunden u. s. w., und sogar die vorher nur $\frac{1}{4}$ Stunde bei Brüttemperatur erwärmte Lösung des Tr. D. vermag das Fibrin erst in 70 Minuten lösen. Ich will diese Thatsache an dieser Stelle nur notiren, ohne

1) Durch einige Kontrollproben mit gekochten Trypsinlösungen wurde bewiesen, dass dieses Fibrin bei Brüttemperatur ohne Mitwirkung des Trypsins nicht gelöst wird.

2) Damit will ich keineswegs sagen, dass die Hammarsten'sche Methode schlechte Resultate gibt; wie es aus der Beschreibung der Darstellung von Tr. B. und Tr. C. zu sehen ist, sind die kräftig wirkenden Pankreasdrüsen nicht so leicht zu erhalten, und es ist wohl möglich, dass die für die Darstellung von Tr. A. genommenen Pankreasdrüsen schon an sich schwach wirkend waren.

3) In diesen 0,1 gr. war wohl nur eine ganz geringe Menge von Trypsin selbst vorhanden.

derselben eine Erklärung oder eine Verallgemeinerung zu geben. Es ist zu bemerken, dass die Trypsinlösungen auch am Ende der weiter unten beschriebenen Versuche ihre Verdauungskraft nicht vollständig verloren haben und die zugesetzten Fibrinflocken allerdings sehr langsam verdauten.

Alle Trypsinpräparate waren frei von dem fettzerspaltenden Fermente, wie es durch die Proben mit Olivenöl und mit Salol nachgewiesen wurde. Diastatisches Ferment war in einer Lösung von Tr. A. vorhanden, in einer anderen abwesend; Tr. B., Tr. C. und ein Präparat von Tr. D. enthielten ebenfalls keine Spuren von diastatischem Fermente; die diastatische Wirkung von einem anderen Präparate des Tr. D. war kaum bemerkbar; nach 15stündigem Digeriren im Brütöfen mit Stärkekleister wurden nur Spuren von reducirendem Zucker gefunden.

Die chemischen Präparate, die ich als Versuchsobjecte benutzt habe, habe ich theils von Kahlbaum resp. aus einer Apotheke bezogen, theils selbst dargestellt.

Die Versuche wurden so angestellt, dass etwa 0,1—0,5 gr. Substanz mit 20 ccm. der Trypsinlösungen A und C resp. mit 0,13 gr. des in 20 ccm. 0,5^o iger Sodalösung gelösten Tr. D. gemischt und dazu 0,02 gr. gepulvertes Thymol resp. 3 Tropfen Chloroform¹⁾ zugesetzt wurden. Um zu wissen, ob die Substanz sich nicht etwa schon beim Digeriren mit Soda allein zersetzt, wurden jedesmal auch die Kontrollversuche ausgeführt, indem unter den gleichen Bedingungen wie im Hauptversuch gekochte Trypsinlösung angewandt wurde. Die Mischungen wurden im Brütöfen in Reagenzgläsern, resp. in Kölbchen²⁾ bei 38—41^o digerirt. Die Versuchsdauer betrug 5—17 Tage, nur je 2 Versuche mit Phenetol und Aethylanilin und 1 Versuch mit Hippursäure, sowie 2 Versuche mit Salol dauerten 35—65 Stunden; jede Substanz, ausser Salol, wurde wenigstens in je einem Versuche

1) Chloroform wurde in den Versuchen zugesetzt, wo das Vorkommen des Phenols in der Flüssigkeit zu entdecken war.

2) Die schwer löslichen Körper wurden in Kölbchen digerirt, um eine möglichst grosse Berührungsfläche zwischen der Substanz und der Trypsinlösung zu erzielen.

auch etwa 1 Monat lang digerirt: die Versuche mit Biuret wurden erst nach 2¹/₂—3 Monaten abgebrochen.

Die Entscheidung der Frage, ob die betreffende Substanz durch das Trypsin zersetzt wurde oder nicht, sollte in meinen Versuchen gewöhnlich durch Aufsuchen der Zersetzungsprodukte gegeben werden. Von diesen Zersetzungsprodukten kommen hier am meisten in Betracht Anilin, Phenol und Essigsäure.

Das eventuell sogar in Spuren vorhandene Anilin konnte leicht durch die äusserst empfindliche Chlorkalkreaction entdeckt werden. Zu dem Zwecke versetzte ich die zu prüfende, im Allgemeinen durch das Abdestilliren der Versuchslösung erhaltene Flüssigkeit (2—3 Fractionen von je 2—5 ccm.) mit einigen Tropfen der filtrirten Mischung von Chlorkalk mit Wasser (1:20). Bei Anwesenheit von Anilin entsteht dabei eine sehr intensive röthlich-violette Färbung: ein Ueberschuss des Reagens ist insofern schädlich, als dabei, besonders bei Gegenwart von sehr geringer Menge des Anilins, die Färbung sehr bald in eine braune übergeht oder sogar verschwindet. 20 ccm. der Lösung von Tr. A. mit 0,009 gr. Anilin versetzt, gaben eine ganz deutliche Reaction, sowohl unmittelbar, wie auch im Destillate. Bei der Gegenwart von Phenol oder Thymol nimmt die Reaction eine mehr blaue Nuance an und kann sogar eine rein blaue Färbung geben. Das mit Aethylanilin geschüttelte und filtrirte Wasser liefert mit einem Ueberschuss von Chlorkalk eine grau-blaue Färbung: wenn man aber die filtrirte Lösung nur mit wenigen Tropfen von Chlorkalk versetzt, dann ist die Gegenwart von Aethylanilin nicht störend, da es die Färbung nur nach längerem Stehen, Anilin aber sofort oder nach einigen Secunden gibt.

Zur Auffindung des Phenols (in den meisten Fällen im Destillate der mit Weinsäure angesäuerten Flüssigkeit) war die Reaction mit Bromwasser direkt nicht anwendbar, da die Körper, welche bei ihrer Spaltung Phenol liefern sollten, dieselbe oder die ähnliche Reaction geben, wohl aber konnte man diese Reaction benutzen, wenn man die dabei erhaltene äusserst schwache Trübung mit der im Kontrollversuche zu beobachtenden verglich. Auch die Reaction mit Chlorkalk und

Ammoniak wurde häufig angewandt: nach meinen Versuchen lässt sie bei vorsichtiger Ausführung noch 1 : 10000 Phenol deutlich erkennen.

Die Menge der abgespaltenen Essigsäure wurde quantitativ bestimmt, indem die Flüssigkeit mit 0.5 gr. Weinsäure und 280 ccm. Wasser versetzt, 200 ccm. davon abdestillirt und mit $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge titirt wurden. Dabei wurde auch berücksichtigt, dass die für den Versuch genommene Substanz beim Digeriren mit Sodalösung allein die Essigsäure theilweise abspalten kann, und dass beim Digeriren der Trypsinlösung selbst flüchtige Säuren entstehen und darin von vornherein als Salze enthalten sein können. Darum wurde jedesmal: 1. die Menge der flüchtigen Säuren bestimmt, welche in der Flüssigkeit nach Digeriren der Substanz mit der ungekochten (S) und 2. mit der gekochten (A) Trypsinlösung enthalten ist; aus einigen Versuchen mit Trypsinlösungen allein wurde die Menge der in der Trypsinlösung präformirt (B) enthaltenen und der darin während des Digerirens (C) gebildeten flüchtigen Säuren festgestellt. Die Menge der Essigsäure, welche in Folge der Zerspaltung der zu prüfenden Substanz durch das Trypsin entstanden ist, kann dann aus der Gleichung:

$$X = S - A + B - C$$

berechnet werden. Fast alle Versuche mit der Bestimmung der während des Digerirens abgespaltenen Essigsäure wurden mit Tr. D. ausgeführt, wo die Portionen B und C der flüchtigen Säuren sehr gering waren. Zur Neutralisation der in 0,13 gr. Tr. D. von vornherein vorhandenen flüchtigen Säuren wurden nur 0,4 resp. 0,25 resp. 0,25 — im Mittel 0,3 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH verbraucht: C war für 0,13 gr. Tr. D. nach 12tägigem Digeriren 0,40 resp. 0,30 resp. 0,35 — im Mittel 0,35 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH gleich. Für andere Präparate des Trypsins, besonders für den natürlichen Pankreassaft, können diese Werthe vermuthlich grösser sein.

Jetzt gehe ich zu der Beschreibung der Versuche über. Für jede Substanz sind die Anzahl der damit ausgeführten Versuche und die benutzten Trypsinpräparate angegeben.

Phenetol, $C_6H_5 \cdot O \cdot C_2H_5$, von Kahlbaum bezogen. Siede-

punkt = 169—170° (750 mm. Bar.).¹⁾ Phenol konnte, nach Digeriren mit Trypsin weder in der Flüssigkeit unmittelbar, noch im Destillate derselben gefunden werden (3 Versuche: Tr. A.). Alkohol war im Destillate durch die Probe mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure²⁾ auch nicht zu entdecken (2 Versuche: Tr. D.).

Aethylanilin, $C_6H_5.NH.C_2H_5$ (Kahlbaum). Siedepunkt = 206—207° (750 mm. Bar.). Kein Anilin im Destillate der mit Trypsin digerirten Substanz (3 Versuche: Tr. A., Tr. D.).

Carbanilsaures Aethyl, $C_6H_5.NH.COOC_2H_5$ (Kahlbaum). Schmelzpunkt 48,5—49°. Diese Substanz zersetzt sich unter Bildung der Spuren von Anilin schon beim Destilliren mit 1% iger Sodalösung: in Folge dessen wurden die Reactionen auf Anilin mit der nicht destillirten Flüssigkeit ausgeführt. Anilin war in der Flüssigkeit nach dem Digeriren mit Trypsin nicht nachweisbar (1 Versuch mit Tr. C.: 2 Versuche mit Tr. D.). Phenol (1 Versuch: Tr. C.) und Alkohol (Probe mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure:²⁾ 1 Versuch mit Tr. C.: 2 Versuche mit Tr. D.) konnten in dem Destillate der mit Weinsäure angesäuerten Flüssigkeit ebensowenig gefunden werden.

Phenacetin, $(CH_3CO)NH.C_6H_4.OC_2H_5$ (aus einer Apotheke). Die mit Trypsin digerirte und dann mit Salzsäure neutralisirte Flüssigkeit wurde auf ihr Verhalten gegen Eisenchlorid und gegen Chlorkalk resp. Natriumhypochlorit geprüft, wobei kein p-Aminophenetol, $NH_2.C_6H_4.OC_2H_5$ gefunden wurde (1 Versuch: Tr. C.). Im Destillate derselben Flüssigkeit war der Alkohol durch die Probe mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure²⁾ nicht zu entdecken. Beim Digeriren mit Trypsin bildete sich auch keine Essigsäure: in 2 Versuchen (Tr. D.) entsprach die Menge der flüchtigen Säuren, die in Folge der Spaltung der Substanz durch Trypsin entstanden, d. h. X: — 0,15 resp. 0,0 ccm. ¹/₁₀ NaOH, wobei A, d. h. die Menge der in der Flüssigkeit nach dem Digeriren der Substanz mit gekochter Trypsinlösung

1) Alle Temperaturangaben sind corrigirt.

2) Die Jodoformprobe war leider nicht anwendbar, da die Substanz selbst bei dieser Probe braune amorphe Niederschläge gibt.

gefundenen flüchtigen Säuren, 0,7 resp. 0,3 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH gleich war; in einem Versuche mit Tr. C. war $S = 0,2$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH gleich.

Diphenylharnstoff, $\text{CO} < \begin{matrix} \text{NH.C}_6\text{H}_5 \\ \text{NH.C}_6\text{H}_5 \end{matrix}$ (Kahlbaum).
Schmelzpunkt = 243° . Nach dem Digeriren mit Trypsin kein Anilin im Destillate (2 Versuche: Tr. D.).

Sulfocarbanilid, $\text{CS} < \begin{matrix} \text{NHC}_6\text{H}_5 \\ \text{NHC}_6\text{H}_5 \end{matrix}$ (Kahlbaum). Mit einer Sodalösung darf die Substanz nicht destillirt werden, da dabei eine geringe Menge von Anilin und Schwefelwasserstoff entsteht. Unmittelbar in der Flüssigkeit waren nach Digeriren mit Trypsin weder Anilin noch Schwefelwasserstoff vorhanden (je 2 Versuche mit Tr. C. und Tr. D.).

Acetylharnstoff, $\text{CO} < \begin{matrix} \text{NH}_2 \\ \text{NH}(\text{COCH}_3) \end{matrix}$, habe ich nach dem Verfahren von Zinin¹⁾ aus Harnstoff und Acetylchlorid dargestellt und durch vier Mal wiederholte Krystallisation aus heissem Wasser und einmaliges Umkrystallisiren aus heissem Alkohol gereinigt. Die Substanz schmolz bei 216° ; nach Zinin schmilzt sie bei 200° , nach Behrend²⁾ bei 212° . Die Menge der durch Einwirkung von Tr. D. abgespaltenen Essigsäure (X) waren: 0,5: 0,25: 0,65: 0,5 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH: $A = 1,3$: 1,8: 2,3: 2,9; die Menge der für die Versuche genommenen Substanz war 0,10—0,27 gr. Da die Substanz somit beim Destilliren nach der Digestion mit Soda allein schon eine merkliche Menge Essigsäure lieferte, waren die Resultate dieser Versuche zweifelhaft. Es wurde noch ein Versuch in grösserem Massstabe ausgeführt, indem 0,5 gr. Acetylharnstoff mit 0,65 gr. Tr. D. in 100 ccm. 0,5%iger Sodalösung gelöst, 13 Tage lang digerirt wurden: $X = 0,0$: $A = 5,2$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH. Somit war keine Zersetzung der Substanz eingetreten und die früher gefundenen Schwankungen in der Menge der Essigsäure waren zufällige. Die Grösse von A ist der Menge der genommenen Substanz ungefähr proportional.

1) Zinin, Ann. der Chemie, Bd. 92, S. 405.

2) Behrend, Ibid., Bd. 229, S. 30.

Biuret, $\text{NH}_2\text{CO.NH.CO.NH}_2$, habe ich nach dem Verfahren von Wiedemann¹⁾ aus Harnstoff dargestellt und die mit Bleiessig behandelte Substanz drei Mal aus heissem Wasser, ein Mal aus heissem verdünnten Ammoniak und nochmals aus heissem Wasser umkrystallisirt. Der Schmelzpunkt des Biurets wird zu 190° angegeben,²⁾ doch bildet die Substanz bei $189\text{—}190^\circ$ nur eine halbflüssige Masse, die bald wieder dicker zu werden und zu sublimiren anfängt.

Mit Biuret wurde untersucht, ob die Biuretreaction bei längerem Digeriren mit Trypsinlösung verschwindet oder nicht. Bei Tr. C. (3 Versuche) wurde nach 3 Monaten keine Abschwächung der Biuretreaction im Vergleich mit der der Kontrollproben gefunden, sogar in dem Versuche nicht, wo nur 0.02 gr. Biuret genommen wurde. Ebenso wenig konnte eine Zersetzung des Biurets in einem Versuche mit Tr. D. constatirt werden, wo die Intensität der Reactionen mit Hülfe eines Colorimeters geschätzt wurde.

Acetanilid, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NH(COCH}_3\text{)}$ (aus einer Apotheke). Beim Digeriren der Substanz mit Trypsinlösung war keine Bildung von Anilin (1 Versuch: Tr. C.) und keine Abspaltung von Essigsäure zu constatiren (2 Versuche mit Tr. D.: $X = -0.2$ resp. 0.0 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH: $A = 0.4$ resp. 0.2 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH).

o-Acettoluid, $\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)\text{NH(CO.CH}_3\text{)}$ (Kahlbaum). Schmelzpunkt = $109\text{—}109.5^\circ$. Durch Einwirkung von Tr. D. entstand kein Toluidin (1 Versuch) und wurde keine freie Essigsäure gebildet (2 Versuche: $X = 0.0$ resp. 0.3 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH: $A = 0.3$ resp. 0.5 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH).

Sulfanilsäure, $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{OH}$ (Kahlbaum). Im Destillate des Gemisches war kein Anilin vorhanden (2 Versuche: Tr. D.).³⁾

Hippursäure, $(\text{C}_6\text{H}_5\text{CO)NH.CH}_2\text{COOH}$ (Kahlbaum). Beim Digeriren dieses Präparates mit Petroläther waren in der Lösung keine Spuren von Benzoësäure zu entdecken; Schmelzpunkt

1) Wiedemann, Ann. d. Chem., Bd. 68, S. 324.

2) Beilstein, Handb. der organ. Chem., I, S. 1307.

3) Die Substanz selbst gibt mit Natriumhypochlorit eine orange bis rothe Färbung.

= 190.5—191.5°. Für die Versuche wurde die Säure mit Natriumcarbonat neutralisirt: es wurden 3 Versuche mit je 0.5 gr. Hippursäure und 20 ccm. der Lösung von Tr. A., 1 Versuch mit 0.1 gr. Hippursäure und 0.13 gr. Tr. D. und 1 Versuch mit 0.9 gr. Hippursäure und 0.65 gr. Tr. D. angestellt. Nach Digeriren während 8—37 Tagen wurden die Mischungen drei Mal mit Petroläther extrahirt, dann mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und wiederum zwei Mal mit Petroläther geschüttelt. Nach Abdestilliren des Petroläthers von diesen zwei letzten Auszügen blieben nur winzige fettartige Rückstände, die keine Reactionen der Benzoësäure gaben: der in dem Versuche mit 0.9 gr. Hippursäure erhaltene und über Schwefelsäure getrocknete Rückstand wog z. B. nur 0.0008 gr.

Anilid der Phenoxylessigsäure (Phenylätherglykolsäure), $C_6H_5.O.CH_2.CO.NH.C_6H_5$, habe ich aus der Phenoxylessigsäure dargestellt, welche nach Verfahren von Giacosa¹⁾ durch Einwirkung von Natronhydrat auf eine Mischung von Phenol und Chloressigsäure erhalten wurde. Die Phenoxylessigsäure wurde mit Thierkohle entfärbt und zweimal aus heissem Wasser umkrystallisirt. Die reine Säure wurde dann mit Anilin bei 150—155° erwärmt²⁾ und das gebildete rohe Anilid vier Mal aus heissem Alkohol krystallisirt. Die reine trockene Substanz schmolz bei 100°: nach Fritzsche liegt der Schmelzpunkt bei 99°. Die Verbindung enthielt keine Spuren von freiem Anilin resp. von dessen Salze. Beim Kochen mit Wasser ging ein geringer Theil der Substanz in das Destillat über, welches in Folge dessen eine schwache Opalescenz mit Bromwasser gab. Anilin wurde dabei nicht abgespalten, aber nach kurzem Kochen der Substanz mit 1%iger Sodalösung wurde eine schwache Reaction auf Anilin erhalten: dieselbe Reaction wurde (wenigstens in einigen Versuchen) auch beim Digeriren des Anilids mit 1%iger Sodalösung bei Brüttemperatur beobachtet. In Folge dieser leichten, obgleich sehr geringen Zersetzlichkeit der Substanz wurde bei den Versuchen mit

1) P. Giacosa, Journ. f. prakt. Chem., [2], Bd. 19, S. 396.

2) P. Fritzsche, Journ. f. prakt. Chem., [2], Bd. 20, S. 280.

Trypsin die Intensität der Reaction auf Anilin mit der in den Kontrollproben erhaltenen Reaction verglichen, wobei kein Unterschied beobachtet werden konnte. Es ergab sich also, dass kein Anilin durch Einwirkung von Trypsin auf das Anilid der Phenoxylessigsäure abgespalten war (je 2 Versuche mit Tr. C. und Tr. D.). Ebenso wenig konnte Phenol im Destillate der mit Weinsäure angesäuerten Flüssigkeit entdeckt werden (2 Versuche mit Tr. C.; 1 Versuch mit Tr. D.).

o-Acetylamidobenzoësäure, $\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot\text{C}_6\text{H}_4\cdot\text{COOH}$, wurde durch Oxydation des *o*-Acetoluids mit Kaliumpermanganat nach Verfahren von Bedson und King¹⁾ dargestellt. Die rohe Säure wurde mit Thierkohle entfärbt und dreimal aus kochendem Wasser umkrystallisirt. Die erhaltene Substanz schmolz bei $180-181^\circ$; von Bedson und King ist der Schmelzpunkt zu $179-180^\circ$ angegeben. Für die Versuche wurde die Säure als Natronsalz benutzt. Durch die Einwirkung des Tr. D. wurde keine Abspaltung der Essigsäure constatirt: $X = 0,0; - 0,1; + 0,05$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH; $A = 0,2 - 0,5$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH.

Salol, $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{COO}\cdot\text{C}_6\text{H}_5$, (aus einer Apotheke) schmolz bei 42° . Da diese Substanz, wie es Nencki²⁾ nachgewiesen hat, durch Soda bei Brüttemperatur zersetzt wird, so musste ich die Menge der bei den Versuchen abgespaltenen Salicylsäure resp. die Menge des zurückgebliebenen Salols mit den Kontrollproben vergleichend bestimmen. Zu dem Zwecke habe ich 1.1 gr. Salol mit 100 ccm. 0.5 % iger Sodaaflösung, so viel Thymol, als noch vollständig gelöst wurde, und 0.65 gr. Tr. D. während 65 Stunden bei Brüttemperatur digerirt, das zur Krystallisation gebrachte Salol auf einem gewogenen Filter abfiltrirt, mit 35 ccm. kaltem Wasser ausgewaschen und über Schwefelsäure getrocknet; sowohl in diesem wie auch in dem Kontrollversuch wurden 96% des Salols zurückerhalten. Als 0.04 gr. Salol mit 50 ccm. Wasser, 0.04 gr. Soda, 0.33 gr. Tr. D.

1) P. P. Bedson and A. J. King. Journ. of the chem. Soc., Bd. 37, S. 752.

2) M. Nencki. Therap. Monatsh., 1887, November (Maly's Jhrsb., Bd. 17, S. 85).

und ein wenig Thymol digerirt wurden, ergab die colorimetrische Bestimmung, dass die Menge der abgespaltenen Salicylsäure 0,0007 gr. betrug: bei dem Kontrollversuch wurden 0,0006 gr. Salicylsäure gefunden.

Essigsalicylsäure, $(\text{CH}_3\text{CO})\text{O.C}_6\text{H}_4\text{COOH}$, habe ich nach dem Verfahren von Kraut¹⁾ durch Erwärmen der Salicylsäure mit Acetylchlorid dargestellt und zweimal aus viel kochendem Wasser, worin die Substanz schwer löslich ist, umkrystallisirt. Die erhaltene Verbindung schmolz bei 120° : Kraut gibt den Schmelzpunkt zu $118\text{—}118,5^\circ$ an. Die Farbenreaction mit Eisenchlorid ist zum Nachweis der Abspaltung der Salicylsäure durch Trypsin nicht anwendbar, da dieselbe Reaction auch Essigsalicylsäure gibt. Bei der Bestimmung der Menge der abgespaltenen Essigsäure (3 Versuche mit Tr. D. und Natriumessigsalicylat) wurden folgende Werthe gefunden: $X = \text{—} 0,1$; $0,0$; $0,0$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH: $A = 1,9$; $0,4$; $1,1$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH.

p-Diacetylamidophenol, $(\text{CH}_3\text{CO})\text{O.C}_6\text{H}_4\text{NH}(\text{COCH}_3)$, wurde nach dem Verfahren von Ladenburg²⁾ durch Erwärmen von p-Amidophenol mit Essigsäureanhydrid dargestellt. Die Substanz, dreimal aus kochendem Wasser unter Zusatz von Thierkohle umkrystallisirt, schmolz bei $153,5^\circ$: von Ladenburg ist der Schmelzpunkt zu $150\text{—}151^\circ$ angegeben. Beim Digeriren des p-Diacetylamidophenols mit Tr. D. wurden gefunden: $X = 0,35$; $0,75$; $2,25$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH: $A = 1,4$; $2,0$; $2,6$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH:³⁾ bei einem Versuch mit Tr. C. waren $X = 1,5$ und $A = 3,8$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH. Da die Resultate dieser Versuche zweifelhaft waren, so habe ich noch zwei Versuche in grösserem Massstabe gemacht, indem ich 0,8 resp. 1,3 gr. p-Diacetylamidophenol, 100 ccm. 0,5%iger Sodalösung und 0,65 gr. Tr. D. genommen habe: diese Versuche dauerten 11 resp. 13 Tage: $X = 5,7$ resp. $9,7$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH: $A = 5,9$ resp. $8,7$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH. Somit war in allen 6 Versuchen eine grössere

1) K. Kraut. Annal. der Chem., Bd. 150, S. 10.

2) Ladenburg. Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 9, S. 1528.

3) Die Menge der für die Versuche genommenen Substanz war: 0,13; 0,21; 0,30 gr.; die Dauer der Versuche war: 13; 10; 38 Tage. Somit ändern sich X und A in demselben Sinne, wie die Menge der genommenen Substanz und die Dauer der Versuche.

Abspaltung der Essigsäure in den Proben constatirt, wo das Trypsin wirkungsfähig war: die Bestimmung der Menge von A zeigt, dass das p-Diacetylamidophenol schon durch 0,5% ige Sodalösung allein deutlich zersetzt wird.

Salicylsäureanilid, $C_6H_4(OH)CO.NH.C_6H_5$, wurde nach dem Verfahren von Kupferberg¹⁾ (durch Einwirkung von Phosphortrichlorid auf ein Gemisch von Salicylsäure und Anilin) dargestellt und fünfmal aus heissem, verdünntem Alkohol unter Zusatz von Thierkohle umkrystallisirt. Die reine Substanz schmolz bei 136,5—137°; von Kupferberg ist der Schmelzpunkt zu 132° angegeben; nach Wanstrat liegt er bei 134 bis 135°. Mit Eisenchlorid gibt die Substanz eine violette Färbung. Bei der Einwirkung von Trypsin war keine Abspaltung von Anilin zu constatiren (1 Versuch mit Tr. C.; 3 Versuche mit Tr. D.).

ab-Acetylphenylhydrazin, $C_6H_5.NH.NH(COCH_3)$, habe ich nach dem Verfahren von E. Fischer²⁾ aus Phenylhydrazin und Essigsäureanhydrid dargestellt und durch dreimal wiederholte Krystallisation aus kochendem Wasser unter Zusatz von Thierkohle gereinigt. Die Verbindung schmolz bei 128—129°; nach E. Fischer schmilzt sie bei 128,5°. Durch die Einwirkung von Tr. D. wurde keine Essigsäure abgespalten: X = — 0,25 resp. + 0,25 ccm. ¹/₁₀ NaOH: A = 1,1 resp. 0,7 ccm. ¹/₁₀ NaOH.

Bis jetzt habe ich somit folgende Verbindungen auf ihr Verhalten gegen Trypsin untersucht:

- | | |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| 1) $C_6H_5.O.C_2H_5$ | 11) $NH_2.C_6H_4.SO_4OH$ |
| 2) $C_6H_5.NH.C_2H_5$ | 12) $C_6H_5.CO.NH.CH_2.COOH$ |
| 3) $C_6H_5.NH.CO.O.C_2H_5$ | 13) $C_6H_5.O.CH_2.CO.NH.C_6H_5$ |
| 4) $(CH_3.CO)NH.C_6H_4.OC_2H_5$ | 14) $(CH_3.CO)NH.C_6H_4.COOH$ |
| 5) $C_6H_5.NH.CO.NH.C_6H_5$ | 15) $OH.C_6H_4.CO.O.C_2H_5$ |
| 6) $C_6H_5.NH.CO.NH.C_6H_5$ | 16) $(CH_3.CO)O.C_6H_4.COOH$ |
| 7) $NH_2.CO.NH(COCH_3)$ | *17) $(CH_3.CO)O.C_6H_4.NH(COCH_3)$ |
| 8) $NH_2.CO.NH.CO.NH_2$ | 18) $OH.C_6H_4.CO.NH.C_6H_5$ |
| 9) $C_6H_5.NH(COCH_3)$ | 19) $C_6H_5.NH.NH(COCH_3)$ |
| 10) $CH_3.C_6H_4.NH(COCH_3)$ | |

1) H. Kupferberg, Journ. f. prakt. Chem., [2], Bd. 16, S. 442.

2) E. Fischer, Ann. der Chem., Bd. 190, S. 129.

Die mit diesen 19 Verbindungen ausgeführten Versuche haben ein negatives Resultat geliefert. Die einzige Ausnahme bilden 6 Versuche mit *p*-Diacetylamidophenol, $(\text{CH}_3\text{CO})\text{O}\cdot\text{C}_6\text{H}_4\cdot\text{NH}(\text{COCH}_3)$, bei denen ein constantes Plus an Essigsäure bei den Versuchen mit wirksamen Trypsinlösungen gefunden wurde. Vorläufig kann ich aber mein Urtheil über diese Versuche nur mit Reserve aussprechen, da die Substanz schon beim Digeriren mit Soda allein merklich zersetzt wird. Doch ist es auffallend, dass alle Versuche ohne Ausnahme eine grössere Zersetzung der Substanz in den Proben zeigen, wo die Trypsinlösung vorher nicht gekocht wurde, sonst aber alle Bedingungen der Versuche die gleichen waren. Weitere in dieser Richtung auszuführende Untersuchungen sollen zeigen, ob auch die anderen Verbindungen von der dem *p*-Diacetylamidophenol analogen Constitution durch Trypsin zerspaltten werden oder nicht. Für das *p*-Diacetylamidophenol beträgt die Menge der vermuthlich durch das Trypsin selbst zersetzten Substanz etwa 20%, wenn die Abspaltung von nur einem Reste der Essigsäure statt hat, resp. etwa 10%, wenn die beiden Reste derselben abgespaltet werden.

Was die Versuche mit der Hippursäure betrifft, so existirt hier ein scheinbarer Unterschied zwischen den von Blank im Laboratorium von Nencki¹⁾ und den von mir erhaltenen Resultaten, da Blank mit dem Grübler'schen Trypsin eine Zerspaltung der Hippursäure gefunden hat. Da aber, wie mir mitgetheilt wurde, die Methode der Darstellung von Trypsin in der neueren Zeit von Grübler geändert wurde, so ist dieser Unterschied wohl durch Verschiedenheit der verwendeten Trypsin-Präparate zu erklären. Man kann z. B. vermuthen, dass das von Blank für seine Versuche benutzte Trypsin auch das fettzerspaltende Ferment enthalten hat, während das von mir verwendete Präparat davon, wie gesagt, frei war.

Ich gedenke meine Versuche über die Wirkung des Trypsins auf einfachere Verbindungen fortzusetzen und auch den natürlichen Pankreassaft zu diesem Zwecke zu benutzen.

Strassburg, den 3. Juni 1899.

1) M. Nencki, Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 20, S. 377.