

## **Kleinere Mittheilungen.**

Von  
**Prof. E. Salkowski.**

Aus dem chem. Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.

Der Redaction zugegangen am 13. April 1899.

### **1. Ueber das erste Produkt der Verdauung des Caseins durch Pepsinsalzsäure.**

Die äussere Erscheinungsform, unter welcher die Verdauung des Caseins durch Pepsinsalzsäure verläuft, ist bekanntlich je nach den Bedingungen der Verdauung wechselnd. Setzt man Mischungen an, welche relativ viel Pepsin und relativ viel Verdauungssalzsäure gegenüber dem Casein enthalten — immer vorausgesetzt, dass das Casein von vornherein in der Verdauungssalzsäure gelöst ist und nicht in fester Form der Verdauung unterworfen wird —, bringt sie in den Thermostaten bei 38—40° und untersucht sie erst nach 24 Stunden, so findet man das äussere Ansehen fast unverändert, nur am Boden der Flasche befindet sich ein geringer Bodensatz von Paranuclein, unter Umständen fehlt auch dieser. Lässt man aber dieselbe Mischung bei Zimmertemperatur 24 Stunden stehen, oder setzt man Mischungen an, welche relativ viel Casein gegenüber dem Volumen des künstlichen Magensaftes enthalten, oder nimmt man einen pepsinarmen künstlichen Magensaft oder vereinigt man beide Bedingungen — mit einem Wort, verschlechtert man die Bedingungen der Verdauung, so findet man nach 24stündigem Verweilen der Mischung im Thermostaten eine kleisterartige, aus Paranuclein bestehende

Masse, welche  $\frac{1}{3}$  bis die Hälfte, ja auch noch mehr der Höhe des Flüssigkeitsvolumens einnimmt, sich bei fortgesetzter Verdauung nur sehr langsam löst und wohl kaum jemals vollständig verschwindet. Man hat allen Grund, anzunehmen, dass in beiden Fällen sich zuerst Paranuclein aus dem Casein abspaltet, nur mit dem Unterschied, dass unter günstigen Bedingungen das Paranuclein sofort, ganz oder zum grössten Theil, der weiteren Verdauung anheimfällt und somit gar nicht oder nur zum kleinsten Theil in die Erscheinung tritt.

Es gibt nun aber noch ein primäres Stadium der Verdauung des Caseins, welches, wie es scheint, bisher ganz übersehen worden ist, ein Stadium, in welchem noch kein Paranuclein abgespalten, das Casein aber nichtsdestoweniger schon in eine Albumose übergegangen ist, welche natürlich den ganzen Phosphorgehalt des Caseins in sich birgt. Dass dieses Stadium bisher übersehen worden ist, erklärt sich leicht dadurch, dass keine äusseren Erscheinungen auf eine Veränderung der Lösung des Caseins in der Pepsinsalzsäure hindeuten. Ich beobachtete dieses primäre Verdauungsprodukt zuerst, als ich bei Anwendung von Mischungen mit geringem Pepsingehalt die Verdauung des Caseins durch sehr niedrige Temperatur verlangsamte. Es zeigte sich aber sehr bald, dass niedrige Temperatur durchaus nicht hierzu erforderlich ist, dass vielmehr eine jede Lösung von Casein in Pepsinsalzsäure, mag der Pepsingehalt gross oder gering sein, sowohl bei Zimmertemperatur als auch bei Brufwärme diese eigenthümliche Veränderung zeigt, welche der Abspaltung des Paranucleins vorausgeht, nur mit dem Unterschied, dass der Process mit verschiedener Schnelligkeit verläuft, und zwar um so schneller, je günstiger die Bedingungen der Verdauung sind. Ist der Pepsingehalt erheblich, so können bei Körpertemperatur schon 15, ja selbst 10 Minuten genügen, um das Casein vollständig zum Verschwinden zu bringen. Mit anderen Worten: der Abspaltung des Paranucleins geht in allen Fällen die Umwandlung des Caseins in eine Albumose voraus. Das Paranuclein spaltet sich nicht aus dem Casein, sondern aus der Albumose ab. Es ist natürlich einiger-

massen schwierig, genau die Mischungsverhältnisse und Temperaturverhältnisse anzugeben, bei deren Innehaltung in einem bestimmten Zeitraum die Umwandlung des Caseins in eine Albumose vor sich geht, ohne dass es schon zur Abspaltung von Paranelein kommt, um so schwieriger, als das Pepsin des Handels ja nicht immer von gleicher Wirksamkeit ist. Wenn ich also einige Versuche beschreibe, so muss ich den Vorbehalt machen, dass der Verlauf bei etwaiger Nachprüfung, was die Dauer betrifft, möglicherweise nicht immer ganz genau den Angaben entsprechen wird.

Am bequemsten ist es, die Verdauung bei Zimmertemperatur vorzunehmen. 2 g. Pepsin Finzelberg (sogenanntes 100% ige) werden mit Wasser angerührt, filtrirt und milchzuckerfrei gewaschen, dann der Rückstand auf dem Filter mit annähernd 150 ccm. Verdauungssalzsäure (10 ccm. Salzsäure von 1,12 D. 990 Wasser) in einen Kolben gespritzt; bis zum nächsten Tag unter Umschütteln bei Zimmertemperatur stehen gelassen, in einen Messcylinder gebracht, mit Verdauungssalzsäure auf 200 ccm. aufgefüllt, durch ein trockenes Filter filtrirt. Die Pepsinlösung ist also, auf das ursprüngliche Pepsin bezogen, 1% ige.

Andererseits werden 20 g. lufttrockenes Casein in der Reibschale in 200 ccm. Wasser + 18 ccm. Halbnormallauge (2% NaOH) gelöst, in einen Messcylinder gebracht, nachgespült, das Volumen durch Wasserzusatz auf 300 ccm. gebracht und colirt oder durch lockeres Papier filtrirt. 200 ccm. der Caseinlösung = ca. 13,33 gr. Casein werden mit 750 ccm. Verdauungssalzsäure versetzt, dann 50 ccm. der obigen Pepsinlösung (= 0,5 gr. Pepsin) hinzugesetzt, so dass das Volumen = 1000 ccm. ist. Die Mischung wird in zwei Theile zu je 500 ccm. getheilt, beide in Flaschen gegossen, die eine Hälfte A in den Thermostaten gestellt, die andere B bei etwas kühler Zimmertemperatur aufbewahrt. Zur Kontrolle ist es zweckmässig, noch 50 ccm. der Caseinlösung mit 200 ccm. Verdauungssalzsäure (ohne Pepsinzusatz) zu versetzen. Diese Mischung C wird neben die Mischung B gestellt.

Nach 24 Stunden ist in A eine grosse Quantität Para-

nuclein abgeschieden. B und C sind äusserlich unverändert. C gibt auf Zusatz von Salzsäure einen reichlichen klumpigen Niederschlag, B einen sehr viel geringeren.

Nach 48 Stunden verhält sich C wie vorher, B gibt mit Salzsäure eine schwache Trübung, welche sich bald zu einer zarten gelatinösen Fällung verdichtet; die Umwandlung des Caseins in eine Albumose ist damit erreicht. Auf die geringe gelatinöse Fällung komme ich noch zurück. Setzt man nun B in den Thermostaten, so findet man nach 24 Stunden reichlich Paranuclein abgeschieden, ebenso auch nach längerer Zeit, meistens 48 Stunden, bei Stehenlassen bei Zimmertemperatur; im letztern Falle wandelt sich die Flüssigkeit in eine kleisterartige Masse um, über welcher nur eine geringe Quantität klarer Flüssigkeit steht. Die Mischung C bleibt sowohl bei Zimmertemperatur, als auch im Thermostaten unverändert. Dass die Mischung B, nachdem sie bei der angegebenen Zusammensetzung 48 Stunden gestanden hatte, nicht Casein enthält, sondern ein spezifisches Verdauungsprodukt, geht aus den Reactionen derselben im Vergleich zu der ebenso zusammengesetzten, aber pepsinfreien Mischung C nach 48stündiger Aufbewahrung hervor.

1. Zusatz von Salzsäure. B: leichte wolkige Trübung, dann schwacher gelatinöser Niederschlag. C: dicker, käsiger Niederschlag von Casein.

2. Zusatz von Natriumcarbonat bis zur alkalischen Reaction, dann Essigsäure: das gleiche Verhalten.

3. Zusatz von Salpetersäure. B: schwache Trübung, beim Stehen ziemlich schnell Gelbfärbung, die auf Zusatz von Natronlauge orange wird. C: dicker käsiger Niederschlag, der sich langsam gelb färbt.

4. Neutralisiren mit Natriumcarbonat, Ansäuern mit Essigsäure. Zusatz von concentrirter Kochsalzlösung bewirkt in B starke Trübung, die sich beim Erhitzen klärt (zumeist nicht völlig), beim Erkalten wiedererscheint.

5. Etwas Natronlauge und Kupfersulfat. B: intensive Biuretreaction. C: schwache Biuretreaction.

6. Zusatz von  $\frac{1}{2}$  Volumen Natronlauge von 1,34 D be-

wirkt bei B starke gleichmässige weisse Trübung, bei C keine Veränderung.

7. Mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  neutralisirt, schmeckt B intensiv bitter, C hat einen faden Geschmack.

Diese Reactionen zeigen ohne allen Zweifel, dass sich das Casein in eine Albumose umgewandelt hat.

Ueber eine von diesen Reactionen möchte ich noch einige Worte hinzufügen, nämlich die mit  $\frac{1}{2}$  Volumen Natronlauge. Sie kommt nicht allein dieser Caseinalbumose zu, sondern lässt sich an jeder nicht zu dünnen Lösung demonstrieren, welche Verdauungsprodukte des Caseins enthält, mag sich schon Paranuclein abgeschieden haben oder nicht. Dieses Verhalten von Caseinverdauungslösung ist mir lange bekannt, aber, wie es scheint, nirgends beschrieben.

Wie bereits erwähnt, kann man diese Umwandlung des Caseins in Albumose auch in sehr kurzer Zeit erreichen, z. B. wenn man gleiche Volumina der oben angegebenen sauren Caseinlösung C und der Pepsinlösung mischt und bei  $40^\circ$  digerirt, schon in einer Viertelstunde. Stets aber handelt es sich um eine spezifische Pepsinwirkung, d. h. Fermentwirkung, denn die saure Caseinlösung ohne Pepsinzusatz kann man wochenlang stehen lassen, ohne dass das Casein sich verändert. Eine allmählich auftretende wolkige Ausscheidung besteht nicht aus Paranuclein, sondern aus Schimmelpilzen. Ebenso wenig führt die Digestion der sauren Pepsinlösung bei  $40^\circ$  zur Albumosebildung.

Labcasein verhält sich ganz ebenso, wie das Säurecasein.

Die Pepsinverdauung des Caseins verläuft somit in drei Stadien: 1. Uebergang des Caseins in eine Albumose, 2. Abspaltung von Paranuclein aus dieser, 3. allmähliche Auflösung des Paranucleins und weitere Verdauung der Albumose. Während es nicht möglich ist, das zweite und dritte Stadium scharf von einander zu trennen — stets geht bei der Abspaltung von Paranuclein aus dem Casein oder, wie man jetzt richtiger sagen muss, aus der phosphorhaltigen Caseinalbumose, mindestens ein Theil des Paranucleins in Lösung, man erhält

stets phosphorhaltige Albumose — während diese Trennung also nie scharf gelingt, ist die Auseinanderhaltung des ersten und zweiten Stadiums sehr leicht, da die Abspaltung des Paranuclains eine gewisse Zeit erfordert und man ausserdem auch, um ganz sicher zu sein, den Process unterbrechen kann, ehe noch alles Casein in Albumose übergegangen ist.

Was die Darstellung der Albumose betrifft, so sind hierüber bis jetzt nur Vorversuche angestellt.

Die Verdauungsflüssigkeit wurde möglichst genau mit Natriumcarbonatlösung neutralisirt, mit Essigsäure angesäuert, filtrirt, eingedampft, von einer geringen Quantität ausgeschiedener gelblicher Tröpfchen abgegossen, die Lösung der Dialyse unterworfen bis zur Entfernung der Chloride, die etwas trüb gewordene Flüssigkeit nochmals filtrirt, in Alkohol absolutus gegossen, durch Zusatz einer Spur Kochsalz eine Ausscheidung bewirkt, diese abfiltrirt und mit Alkohol und Aether entwässert. Das so erhaltene äusserst feine, schneeweisse Pulver löst sich in Wasser mit einer geringen Trübung auf, welche auf Zusatz von Spuren von Kochsalz oder Natriumcarbonat oder Salzsäure verschwindet. Die Substanz ist durch ihr Verhalten zu Essigsäure + Kochsalz und die Biuretreaction als Albumose charakterisirt.

Ich habe vorhin erwähnt, dass die in angegebener Weise erhaltenen Caseinalbumoselösungen mit Salzsäure eine zarte gelatinöse Trübung bezw. Niederschlag gaben, welcher von Casein durchaus verschieden ist. Das äussere Ansehen desselben erinnert an Paranuclain. Es war wegen der kleisterartigen Beschaffenheit dieses Niederschlages sehr schwierig, auch nur eine kleine Quantität desselben in einem zur Analyse geeigneten Zustand zu erhalten, ich will auch nicht behaupten, dass die schliesslich erhaltene Substanz — den eingeschlagenen Weg kann ich hier wohl übergehen —, an welcher ich eine Phosphorbestimmung ausgeführt habe, den Anspruch auf Reinheit erheben kann. Die Phosphorbestimmung ergab für 0.1491 g. bei 110° getrocknet 0.0069 g. Magnesiumpyrophosphat = 1.23% Phosphor. Die Substanz ist also reicher an Phosphor als das Casein und die Abspaltung einer solchen aus der Caseinalbumoselösung durch blosse Salzsäurewirkung ist jedenfalls nicht ohne Interesse.

## **2. Ueber die Bildung von Skatolessigsäure bei der Eiweissfaulniss.**

Bei den in Gemeinschaft mit meinem Bruder H. Salkowski in Münster i. W. ausgeführten Untersuchungen über die Eiweissfaulniss haben wir seiner Zeit in einem Falle — es handelt sich um einen an Fibrin angestellten Versuch von 13tägiger

Dauer, welcher in der Tabelle I auf S. 432 Bd. VIII dieser Zeitschrift mit Nr. IV bezeichnet ist — das Auftreten einer Säure neben wenig Skatolcarbonsäure beobachtet, von welcher festgestellt wurde, dass sie bei 133—134° schmolz und mit Salpetersäure + Kaliumnitrit nicht, wie die Skatolcarbonsäure, einen rothen, sondern einen gelben Niederschlag gab, bezw. in sehr verdünnten Lösungen eine intensive Gelbfärbung. Die Beziehung dieser Säure, welche nur in geringer Menge erhalten war, zu Skatol wurde damals nicht erkannt, weil die Elementaranalyse der zu geringen Menge wegen nicht ausgeführt werden konnte und die Säure im Röhrchen, ziemlich hoch über den Schmelzpunkt erhitzt, beim Destilliren des Rückstandes mit verdünnter Natronlauge kein Skatol lieferte.

Nachdem dann M. Nencki<sup>1)</sup> unter den vom Rauschbrandbacillus bei Abschluss von Sauerstoff gebildeten Produkten die Skatolessigsäure entdeckt und beschrieben hatte — in geringer Menge auch des Bacillus liquefaciens magnus und spinosus —, konnte bei der Uebereinstimmung der Eigenschaften — Schmelzpunkt und Reaction mit Kaliumnitrit in saurer Lösung — kaum ein Zweifel sein, dass die damals beobachtete Säure Skatolessigsäure gewesen war.

Zufällig fielen mir nun kürzlich Reste von jenem Versuch Nr. IV in die Hände. Dieselben stellten harzige Massen dar, wie sie sich in grösserer oder geringerer Quantität stets beim Abtreiben der flüchtigen Säuren mit überhitztem Wasserdampf behufs Darstellung der Oxysäuren, Skatolcarbonsäure und Bernsteinsäure bilden (vgl. das Schema in Bd. IX, S. 10 dieser Zeitschrift). Die genauere Betrachtung dieser Massen ergab nun, dass sie reichlich mit Krystallen durchsetzt waren.

Zur Gewinnung der krystallinischen Substanz wurde die harzige Masse mit Wasser ausgekocht, die Lösung durch dichtes Papier filtrirt, welches die harzigen resp. öligen Antheile grösstentheils zurückhielt. Aus dem Filtrat schied sich beim Abkühlen eine noch etwas unreine Säure aus, welche durch Binden an Ammoniak, Behandeln der Lösung mit Knochenkohle, Ausfällen

<sup>1)</sup> Sitzungsber. der Wiener Akad. d. W. Bd. XCVIII, Abth. II b, 1889.

mit Salzsäure und wiederholtes Umkrystallisiren aus Wasser in sehr schmalen, etwa  $\frac{1}{2}$  cm. langen, fast völlig weissen, unregelmässig gezackten Tafeln vom Schmelzpunkt 133 bis 134° erhalten wurde.

Die Eigenschaften der Substanz entsprachen durchaus den von Nencki für die Skatolessigsäure angegebenen, von welchen, wie Nencki hervorhebt, die Reaction mit Kaliumnitrit und Essigsäure besonders charakteristisch ist. Nencki beschreibt dieselbe folgendermassen:

Versetzt man eine Lösung, die Skatolessigsäure enthält, mit einer concentrirten Lösung von salpetrigsaurem Kali und säuert mit etwas Essigsäure an, so bildet sich in wenigen Augenblicken ein Magma von feinen gelben Krystallnadeln der Nitrosoverbindung.

Genau so verhält sich die vorliegende Säure. Wie bereits erwähnt, war diese Reaction auch schon an der früher erhaltenen Säure beobachtet worden, als diese behufs Identificirung mit Skatolcarbonsäure mit Salpetersäure + Kaliumnitrit versetzt worden war.

Die Elementaranalyse<sup>1)</sup> der über Schwefelsäure getrockneten Substanz ergab folgende Zahlen:

1) 0.2000 g. gaben 0.5111 CO<sub>2</sub> und 0.1070 H<sub>2</sub>O;

2) 0.1502 g. gaben 9.8 cem. N bei 17° T. und 760 mm. Bar.

Hieraus ergibt sich:

	Gefunden:	Berechnet für C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> :
C	69,70%	69,84%
H	5,94%	5,87%
N	7,54%	7,40%

Die Substanz ist also unzweifelhaft Skatolessigsäure. Aus der Mutterlauge wurde durch Eindampfen noch etwas Skatolcarbonsäure erhalten.

Die Quantität der erhaltenen Skatolessigsäure war nicht unbedeutend. Obwohl die Darstellung mit einigen Verlusten verbunden war, wurde immer noch etwas über 1 g. in analysenreinem Zustand erhalten. Da in dem betreffenden Fäulnissver-

1) Für die Analyse bin ich Herrn C. Neuberger zu Dank verpflichtet.



sich nach Ausweis der Tabelle auf S. 432, Bd. VIII dieser Zeitschrift 386 gr. Eiweiss durch Fäulniss zersetzt waren, so beträgt die erhaltene Quantität der Säure mindestens 0,26<sup>o</sup> c des Eiweisses. Nun ist in diesem Falle noch etwas Skatolcarbonsäure aufgetreten und 1,05<sup>o</sup> c Indol festgestellt worden. Daraus geht in Uebereinstimmung mit früher gemachten Befunden hervor, dass die präformirte Skatolgruppe im Eiweiss — wenn man annimmt, dass auch das Indol von dieser stammt — eine nicht unbeträchtliche Grösse darstellt.

Ebenso wurde kürzlich bei einem zu Übungszwecken angestellten Fäulnissversuch aus Fibrin ca. 0,3 g. Skatolessigsäure erhalten und durch Schmelzpunkt und Reactionen identificirt.

Eine Erklärung dafür, dass in diesen beiden Fällen fast nur Skatolessigsäure statt Skatolcarbonsäure aufgetreten ist, vermag ich nicht zu geben: die Art der Anstellung des Versuches, der Verlauf der Fäulniss, die Verarbeitung der Faulflüssigkeit waren genau so wie in den anderen Versuchen, welche nicht Skatolessigsäure, sondern Skatolcarbonsäure lieferten.

Jedenfalls werden die Beobachtungen von Nencki über das Auftreten von Skatolessigsäure durch die beiden vorliegenden Beobachtungen erweitert: es geht aus denselben hervor, dass die Skatolessigsäure nicht ausschliesslich das Produkt anaërober Bakterien ist, wie man aus den Versuchen Nencki's, welche unter Ausschluss von Sauerstoff angestellt sind, wohl schliessen könnte, sondern dass sie auch unter Bedingungen entstehen kann, in denen auf die Ausschliessung von Sauerstoff nicht Bedacht genommen ist, und in Versuchen, in denen die Bakterien keine anderen sind, als diejenigen, welche sich in der Regel durch spontane Aussaat in mit alkalisirtem Wasser angerührtem Fleisch entwickeln, da mit solchen die Fibrinmischungen geimpft worden waren.

### 3. Ueber eine langsam verlaufende Eiweisspaltung.

Die erhöhte Aufmerksamkeit, welche in neuerer Zeit der Frage der Bildung von Zucker aus Eiweiss ausserhalb des Körpers zugewendet wird, hat mich an eine alte Beobachtung

erinnert, welche ich nicht veröffentlicht habe, weil sie zu isolirt war. Da ich jetzt Gelegenheit gehabt habe, dieselbe Beobachtung aufs Neue zu machen, scheint es mir angemessen, sie zur Kenntniss zu bringen, wenn auch die Deutung des Befundes noch ganz unsicher ist.

Ich theile zunächst meine älteren Beobachtungen in der Form mit, in der ich sie im Januar 1893 gemacht und zum Zweck der beabsichtigten Publication niedergeschrieben habe.

In Bd. XXV der Zeitschrift für Biologie (N. F. VII), S. 92, habe ich die Veränderungen beschrieben, welche mit Fäulnisbakterien infectirtes, unter Chloroformwasser aufbewahrtes Fibrin allmählich erlitten hatte. Es hatte sich damals ergeben, dass das Fibrin sich im Laufe von 6 Wochen bei vollständiger Abwesenheit von Fäulnisserscheinungen zum grössten Theil zu einer durch Filtriren leicht völlig zu klärenden, eiweissreichen, Spuren von Albumosen und Pepton enthaltenden Flüssigkeit gelöst hatte. Die Flüssigkeit erwies sich beim Ueberimpfen auf Nährgelatine steril. Auch nach weiteren 7 Monaten war die Flüssigkeit noch steril, der Eiweissgehalt hatte sehr abgenommen, und an Stelle desselben waren Protalbumose, Heteroalbumose und Dysalbumose aufgetreten. Ein Rest dieser Flüssigkeit nun, ohne weiteren Chloroformzusatz aufbewahrt, wurde am 20. Januar 1893, im Ganzen 5½ Jahre nach der ersten Untersuchung, aufs Neue untersucht. Die Flüssigkeit war von goldgelber Farbe, erwies sich auch jetzt noch als ganz klar und beim Ueberimpfen auf Nährgelatine steril. Am Boden der Flasche hatte sich ein Niederschlag gebildet, der so fest haftete, dass die Flüssigkeit leicht davon abgegossen werden konnte. Derselbe, auf dem Filter gesammelt und gewaschen, erwies sich nach der mikroskopischen Untersuchung als ausschliesslich aus Tyrosin bestehend. Er wurde in Ammoniak gelöst, die Lösung eingedampft, der Rückstand bei 110° getrocknet und gewogen, das Gewicht betrug 0.171 gr. Die Reactionen bewiesen, dass es sich in der That um Tyrosin handelte, Xanthinbasen waren darin nicht nachweisbar.

Die Flüssigkeit wurde durch Aufkochen von einem noch darin enthaltenen coagulablen Eiweisskörper befreit. Das Filtrat, von

minimal alkalischer Reaction, gab nach völligem Erkalten mit Essigsäure eine nicht unerhebliche, sich ziemlich schnell zusammenballende, klebrige Fällung, von welcher abfiltrirt wurde.

Dieser abfiltrirte und ausgewaschene Niederschlag zeigte folgendes Verhalten:

In Wasser unlöslich, löst er sich in 5%iger Kochsalzlösung fast ganz klar auf, die abfiltrirte Lösung gerinnt nicht beim Kochen, bleibt vielmehr, abgesehen von einer kaum sichtbaren, staubförmigen Trübung, ganz klar. Sie gibt mit Essigsäure Fällung, welche sich beim Erwärmen löst, beim Abkühlen wieder erscheint. Sie gibt Biuretreaction, ferner mit Salpetersäure Fällung, welche sich im Ueberschuss, wenn auch nicht ganz vollständig, wieder löst. Diese Lösung wird beim Stehenlassen bald citronengelb, auf Zusatz von Natronlauge orange.

Das Filtrat von der Essigsäurefällung, durch Eindampfen von Essigsäure befreit, wurde in 2 gleiche Hälften getheilt. Die eine Hälfte wurde weiter eingedampft. Während des Eindampfens schieden sich Häute von Leucin ab, welches leicht als solches zu constatiren war (mikroskopische Form, Sublimirbarkeit, Geruch nach Amylanin bei stärkerem Erhitzen). Die eingedampfte Masse zeigte ausgeprägt süssen, hinterher etwas bitteren Geschmack. Möglicher Weise hängt derselbe vom Leucin ab. Die Existenz eines süssschmeckenden Leucins ist zwar meines Wissens nicht bekannt, da aber das Glycocoll süss schmeckt, so ist es sehr wohl denkbar, dass es auch ein süssschmeckendes Leucin gibt.

Die andere Hälfte wurde etwa bis zur ursprünglichen Concentration verdünnt (Hälfte des ursprünglichen Volumens). Die N-Bestimmung nach Kjeldahl ergab  $0.589\% \text{ N} = 3.68\% \text{ Eiweiss}$ . Es fanden sich in ihr Albumosen, dagegen nur Spuren von Pepton.

Durch diese Beobachtungen ist festgestellt, dass das Fäulnissenzym, abgetrennt von den Fäulnissbakterien, von welchem bisher nur hydrolytische Wirkungen beobachtet waren — wenn man sich der Anschauung anschliesst, dass der Vorgang der Albumose- und Peptonbildung ein hydrolytischer ist — auch tryptische Wirkungen entfalten kann.

Bei Anstellung der Biuretreaction mit dem erwähnten Filtrat von der Essigsäurefällung war mir nun aufgefallen, dass die Reactionsmischung beim Erhitzen eine rein rothe Färbung annahm, wie man sie bei Anstellung der Trommer'schen Probe an schwachen, albumosehaltigen Traubenzuckerlösungen beobachtet. In der That enthielt die Flüssigkeit reichlich Kupferoxydul. Der Zusatz von Rhodanammoniumlösung bewirkte in der mit Salzsäure angesäuerten Reactionsflüssigkeit eine reichliche weisse Ausscheidung von Cuprorhodanid. Auch gewöhnliche Albumosen geben unter diesen Umständen Reduction, aber die Reaction mit Rhodanammon ist bei denselben Concentrationsverhältnissen unvergleichlich schwächer. Die Versuche, die Stärke der Reduction durch die Quantität des gebildeten Cuprorhodanids festzustellen, führte zu keinen brauchbaren Resultaten, da die erhaltenen Werthe zu sehr schwankten.

Einen Anhalt über die Quantität der reducirenden Substanz gewährt indessen folgender Versuch.

5 ccm. der Flüssigkeit wurden mit 10 ccm. Fehling'scher Lösung erhitzt, 10 Minuten im Sieden erhalten. Die Mischung wurde grüngelb, es schied sich feinvertheiltes Kupferoxydulhydrat aus. Nunnmehr wurde verdünnt, mit Salzsäure angesäuert, dann mit 2<sup>o</sup> iger Rhodanammonlösung gefällt: es entstand ein reichlicher weisser Niederschlag. Beim Abfiltriren ergab sich, dass das Filtrat fast vollständig kupferfrei war. Das Kupfer aus 10 ccm. Fehling'scher Lösung war also vollständig reducirt, das Reductionsvermögen entsprach also mindestens 1% Zucker.

So wenig wahrscheinlich damals auch die Annahme war, dass die reducirende Substanz etwa Zucker sein könnte, benutzte ich doch den noch vorhandenen Rest der Flüssigkeit zur Prüfung der Gährfähigkeit.

1) Eine kleine Quantität der Flüssigkeit wurde mit Presshefe gut durchgeschüttelt, in ein Gährungsröhrchen A gefüllt, Quecksilberschluss, Aufbewahrung im Thermostaten bei 38–39°. Nach 20 Stunden war in der Kuppe des Gährungsröhrchens A ein etwa linsengrosses Gasbläschen zu constatiren, in der Kontrollröhre B ein wenig mehr als stecknadelkopfgrosses.

Nach 44 Stunden war in dem Rohr A 1 cm. der Länge mit Gas gefüllt, kein Fäulnissgeruch zu bemerken, die Gasblase in B nur ganz wenig vergrössert. Das Gas in Röhre A wurde durch Natronlauge völlig absorbirt bis auf einen minimalen Rest; die Flüssigkeit zeigte noch Reductionsvermögen, ob ebenso stark wie vorher, lässt sich bei dem Mangel quantitativer Bestimmungen nicht sagen.

2) In einem zweiten Versuch wurde noch ein drittes Röhrechen C mit 3%iger Albumosepeptonlösung aus Fibrin durch Pepsinverdauung und Hefe aufgestellt.

Nach 24 Stunden war in A ein etwa linsengrosses Bläschen sichtbar, in B ein etwa stecknadelkopfgrosses, in C etwas mehr wie in B.

Nach 48 Stunden war in A  $4\frac{1}{2}$  cm. der Röhrenlänge mit Gas gefüllt, B unverändert, in C etwa  $2\frac{1}{2}$  cm. mit Gas gefüllt.

Die Mischung C hatte ausgesprochen fauligen Geruch, das Gas wurde von Natronlauge unvollständig absorbirt, es blieb etwa 1 cm unabsorbirt.

Die Flüssigkeit A zeigte keine Spur von Fäulnissgeruch. Das Gas wurde vollständig bis auf ein etwa linsengrosses Bläschen durch Kalilauge absorbirt.

Wenn nun auch der Kontrollversuch mit Peptonlösung durch Fäulniss complicirt war, so steht doch soviel fest, dass die untersuchte Flüssigkeit unter dem Einfluss von Hefe ein ausschliesslich aus Kohlensäure bestehendes Gas in nicht unerheblicher Menge entwickelte. Damit war mein Material erschöpft.

Kürzlich fand ich nun unter den Vorräthen des Laboratoriums eine Flüssigkeit in etwas grösserer Quantität, welche mich in den Stand setzte, meine damalige Beobachtung zu kontrolliren. Die betreffende Glasstöpselflasche trug folgende Bezeichnung:

Fibrin in Chloroformwasser. Ende April 1888; zerflossen gefunden Ende Juni 88, filtrirt.

Die Flüssigkeit, Anfang 1899 untersucht, war von bräunlicher Farbe, minimal alkalischer Reaction, klar bis auf einen geringen pulverigen Bodensatz, von welchem abfiltrirt wurde, sie roch kaum noch merklich nach Chloroform. Beim Erhitzen entstand ein nicht unerhebliches Coagulum, das erkaltete Filtrat gab, wie in der ersten Beobachtung, mit Essigsäure, einen Eiweissniederschlag. Das Filtrat von diesem gab leichte Violettfärbung mit Bromwasser, enthielt Albumosen und Pepton, Leucin und Tyrosin, welche leicht durch Eindampfen zu erhalten

waren. Die eingedampfte syrupöse Masse schmeckte süß, hinterher bitter.

10 ccm. des enteiwissten Filtrats, das natürlich in Folge des Verdampfens beim Kochen etwas concentrirter war, als die ursprüngliche Flüssigkeit, hinterliessen beim Eindampfen, Trocknen, Veraschen 0,414 gr. organische Trockensubstanz, 0,004 gr. Asche.

10 ccm. des mit Essigsäure ausgefällten enteiwissten Filtrats hinterliessen 0,3862 gr. organische Trockensubstanz, 0,0034 gr. Asche.

Das Hauptinteresse richtete sich natürlich auf die Reductions-fähigkeit und die etwaige  $\text{CO}_2$ -Entwicklung mit Hefe. Die Versuche über den ersteren Punkt wurden sowohl mit dem enteiwissten, als auch mit dem ausserdem noch mit Essigsäure behandelten Filtrat angestellt — beide verhielten sich gleich — die Versuche über den zweiten Punkt nur mit dem enteiwissten, um nicht noch eine Complication durch die Anwesenheit der Essigsäure hineinzutragen.

Die Flüssigkeit reducirt Kupferoxyd in alkalischer Lösung, gab jedoch keine Ausscheidung von Oxydul. In der mit Salzsäure angesäuerten Probe bewirkt Rhodanammion einen reichlichen weissen Niederschlag von Caprorhodanid: Ferricyan-kalium, in geringer Menge zugesetzt, einen rothbraunen Nieder-schlag. Eine zum Vergleich benutzte Albumoselösung wirkt gleichfalls etwas reducirend, jedoch unvergleichlich schwächer.

Beim Erhitzen mit Silbernitrat, Ammoniak und Natron-lauge bildete sich ein schöner Silberspiegel: einen solchen konnte ich mit Albumoselösung nie erhalten, obwohl auch hier die Mischung in Folge der Reduction schwarzbraun wurde.

Ferricyan-kalium wurde in der mit Natriumcarbonat ver-setzten Flüssigkeit in ausserordentlicher Menge zu Ferrocyan-kalium reducirt, Albumoselösung von gleichem Gehalt reducirt zwar auch etwas, aber unvergleichlich schwächer.

Der Sicherheit wegen wurde nun noch Leucin auf seine etwaigen reducirenden Eigenschaften geprüft. Es diene hierzu 1. ein sehr reines Präparat, welches Herr Dr. H. Schwiening<sup>1)</sup> seiner Zeit aus Kaninchen-muskeln durch <Autodigestion> erhalten hatte. Dasselbe hat schon

1) Virchow's Arch. Bd. 136, S. 473.

einmal zu einigen Versuchen<sup>1)</sup> gedient. Es ist von demselben damals festgestellt worden, dass es aschefrei ist, bei 259—260° schmilzt und minimal nach links dreht. Ich wählte absichtlich dieses Leucin, weil es gleichfalls durch eine langsam wirkende Fermentation aus Eiweiss gebildet war. 2. Ein Präparat, welches aus mit Wasser erschöpftem, entfettetem Fleisch durch Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure dargestellt war. Beide Präparate verhielten sich ganz gleich. In verdünnter Natronlauge gelöst, gaben sie mit Kupfersulfat tiefblaue Lösungen, welche, wie zu erwarten war, beim Kochen keine Reduction zeigten, auch keine weisse Trübung nach Zusatz von Salzsäure und Rhodanamm. Mit Natronlauge, Ammoniak und Silbernitrat trat bei starkem Kochen Schwärzung, an einzelnen Stellen auch Andeutung von Silberspiegel ein. Ferricyankalium unter Zusatz von Natriumcarbonat wurde beim Erhitzen insoweit reducirt, dass die mit Essigsäure angesäuerte Lösung sich mit Eisenchlorid tief blau färbte, ohne dass sich indessen, wie bei der Flüssigkeit, ein Niederschlag ausschied.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die reducirenden Eigenschaften der Flüssigkeit jedenfalls nicht auf den Gehalt an Leucin zurückgeführt werden können.

Von weiteren Eigenschaften der Flüssigkeit erwähne ich, dass die  $\alpha$ -Naphtholprobe zwar anscheinend positiv ausfiel, aber doch recht schwach, ein Osazon trotz wiederholter Bemühungen nicht in krystallinischer Form erhalten werden konnte.

Die Versuche hinsichtlich der Entwicklung von  $\text{CO}_2$  mit Hefe im Gährungsröhrchen hatten ein ziemlich wechselndes Resultat hinsichtlich der Quantität des gebildeten  $\text{CO}_2$ .

Gasentwicklung mit völliger oder fast völliger Absorption des gebildeten Gases durch Natronlauge wurde in allen Fällen beobachtet. Das wiederholt erhaltene Maximum an Gas betrug nach 48 Stunden  $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$  Centimeter der Länge des Gährungsröhrchens. In dem Kontrollröhrchen mit Hefe und Wasser war nach dieser Zeit so gut wie gar kein Gas zu constatiren, wohl aber in der Röhre, welche Albumosepeptonlösung (aus Fibrin durch Pepsinverdauung dargestellt) enthielten. Das Gas betrug hier bis zu 1 Centimeter der Länge des Röhrchens, jedoch war nur etwa die Hälfte bis höchstens  $\frac{2}{3}$  davon durch Natronlauge absorbirbar und die Flüssigkeit roch faulig. Was die Ursache des wechselnden Resultates betrifft, so schien das

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Biologie, Bd. 32, S. 471.

Alter der Hefe von Einfluss zu sein. Frisch eingekaufte Hefe — es wurde stets Presshefe benutzt — gab nie eine so starke Gasentwicklung, wie solche, welche 1—2 Tage, vor Verdunstung geschützt (Einwickeln in Schreibpapier, dann in Filtrirpapier, welches gut mit Wasser durchtränkt wurde, dann Pergamentpapier), bei einigen Graden über Null aufbewahrt gewesen war. Man könnte zur Erklärung dieser Differenz annehmen, dass in der aufbewahrten Hefe mehr Spaltpilze vorhanden waren, welche auf das Eiweiss einwirkten, dann hätte aber ein grösserer Antheil des Gases unabsorbirbar sein müssen, wie im andern Fall, da sich bei der Spaltung doch auch Wasserstoff entwickelt und die Flüssigkeit hätte fauligen Geruch zeigen müssen. Beides war nicht der Fall. In jedem Fall trat die  $\text{CO}_2$ -Entwicklung langsam ein, nach 24 Stunden war meistens erst etwa  $\frac{1}{2}$  Centimeter des Röhrchens von Gas eingenommen. Länger wie höchstens 48 Stunden wurde nicht beobachtet.

Einige Versuche wurden über die Quantität der entwickelten  $\text{CO}_2$  angestellt. 100 ccm. des auseocoagulirten Filtrats wurden in einem Kolben mit 1—1 $\frac{1}{2}$  gr. Hefe versetzt, welcher mit einem zweiten, titrirtes Barytwasser enthaltenden Kolben in Verbindung stand. Die entwickelte Kohlensäure musste das Barytwasser passiren, welches seinerseits gegen Absorption von  $\text{CO}_2$  aus der Luft durch einen aufgesetzten Will-Varentrapp'schen, Barytwasser enthaltenden Absorptionsapparat geschützt war. Nach 48 bzw. 44 Stunden wurde die  $\text{CO}_2$  durch Erwärmen des Gährungskolbens und Durchleiten eines Luftstroms völlig zur Absorption gebracht.

Im ersten Versuch wurden 100 ccm. Barytwasser verwendet, von welchem 10 ccm. 10,6 ccm. Oxalsäurelösung erforderten, von welcher 1 ccm. 1 mgr.  $\text{CO}_2$  entsprach. Am Ende des Versuches wurde das Barytwasser<sup>1)</sup> filtrirt und titirt. 50 ccm. desselben brauchten zur Neutralisation 2,55 ccm. Oxalsäure, also 100 ccm. 5,1 ccm. Da 100 ccm. des ursprünglichen Barytwassers 106 ccm. Oxalsäure entsprachen, so sind  $106 - 5,1 = 101,9$  mgr.  $\text{CO}_2$  gebildet.

1) Das Volumen desselben betrug 99 ccm., 1 ccm. kann man als am Kolben hängengeblieben ansehen.



In einem zweiten Versuch wurden wieder 100 cem. Barytwasser von welchem 10 cem. 10.3 cem. Oxalsäure erforderten, in den Kolben gefüllt. Auch in den vorgelegten Absorptionsapparat wurden 15 cem. dieses Barytwassers eingefüllt. Da dieses am Ende des Versuches von aussen her nur ganz leicht getrübt erschien, sich beim Durchleiten von Luft aber sehr stark trübte, so hielt ich es für richtiger, dasselbe mit in Rechnung zu ziehen. Es waren also im Ganzen 115 cem. Barytwasser angewendet, entsprechend 118.45 mgr.  $\text{CO}_2$ . Das Barytwasser wurde nach 44-stündiger Digestion bei  $38^\circ$  aus dem Kolben und dem Absorptionsapparat in einem Messcylinder gebracht, nachgespült, das Volumen von 150 mit ausgekochtem Wasser hergestellt, filtrirt. Es ist selbstverständlich, dass alle diese Manipulationen möglichst schnell ausgeführt wurden. 50 cem. des Filtrates brauchten in 2 Versuchen jedesmal 2,4 cem. Oxalsäure, die ganze Quantität also 7.2. Somit sind  $118.45 - 7.2 = 111.25$  mgr.  $\text{CO}_2$  gebildet.

Beide Versuche waren leider durch Fäulniss complicirt; weitere Versuche in dieser Richtung habe ich nicht angestellt, da mir die Durchführung ohne diese Complication bei den mir zur Zeit zu Gebote stehenden Mitteln aussichtslos erschien, ausserdem mein Material bis auf ein Minimum erschöpft war. Man müsste wohl Reinculturen von Hefe anwenden und aseptisch arbeiten. In den vorliegenden Versuchen war dieses nicht erreicht, obwohl der ganze Apparat längere Zeit im strömenden Dampf erhitzt worden war.

Gährversuche mit den beiden oben erwähnten Leucinpräparaten verliefen, wie nicht anders zu erwarten war, gänzlich negativ.

Zur Untersuchung auf Alkohol wurde der Inhalt der beiden Gärungskolben benutzt, sowie die Gährflüssigkeit eines dritten Versuches, bei welchem das enteiwaisste Filtrat von 100 cem. vor dem Zusatz von Hefe im Kolben kochend auf etwa die Hälfte eingedampft und dann wieder auf ca. 100 cem. aufgefüllt war, um etwa präformirten Alkohol auszuschliessen. Die betreffenden Flüssigkeiten wurden destillirt, die ersten 10 cem. für sich aufgefangen. In 2 Versuchen wurde starke Jodoformbildung constatirt, in dem dritten Aldehydbildung bei Erhitzen mit Kaliumchromat und Schwefelsäure. Die späteren Antheile der Destillate gaben nur andeutungsweise Jodoformreaction. Controllversuche mit  $1 - 1\frac{1}{2}$  gr. Hefe und 100 cem. Wasser ergaben keine nachweisbare Quantität Alkohol.

Schliesslich möchte ich noch eine zufällige Beobachtung nicht unerwähnt lassen. Jedesmal, wenn eine Probe der enteweissten Flüssigkeit (Filtrat) locker bedeckt stehen blieb, trübte sie sich durch Bakterienentwicklung und es trat schon nach 24—48 Stunden ein unverkennbarer, ja sogar ziemlich starker Geruch nach Fruchtäther — Erdbeergeruch — auf (von verschiedenen unbefangenen Beobachtern als solcher constatirt), welcher später durch Fäulnisgeruch complicirt wurde, jedoch immer noch deutlich wahrnehmbar war. Der Versuch, diesen Ester darzustellen, scheiterte an der zu geringen Quantität.

Ist man nun zu der Annahme berechtigt, dass die untersuchte Flüssigkeit gährungsfähigen Zucker enthält? Ich glaube nicht, dass man diese Frage bejahen kann. Es ist zwar stets durch Hefe aus derselben Kohlensäure entstanden und, soweit darauf untersucht ist, auch Alkohol constatirt und sie hatte stark reducirende Eigenschaften, aber es ist nicht nachgewiesen, dass die Quantität des Alkohols der der Kohlensäure entsprach; dies schien vielmehr nicht der Fall zu sein, die reducirenden Eigenschaften waren nach der Behandlung mit Hefe nicht verloren gegangen und es ist nicht gelungen, ein Osazon zu erhalten. Weiterhin fragt es sich, ob für die  $\text{CO}_2$ -Entwicklung unter dem Einfluss der Hefe keine andere Erklärung zulässig ist, als die, dass die Flüssigkeit eine Substanz enthält, aus welcher die Hefe  $\text{CO}_2$  abspaltet. Wäre es nicht vielleicht auch denkbar, dass die Flüssigkeit eine Substanz enthält, welche die sogenannte Selbstgährung der Hefe in hohem Maasse begünstigte und beschleunigte? Dagegen sprechen die Versuche, in welchen die Quantität der entwickelten Kohlensäure bestimmt wurde. Zu diesen wurde 1—1½ g. Presshefe genommen. Da die Presshefe durchschnittlich bei der Hydrolyse mit verdünnter Säure nach früheren Versuchen von mir 8,1% Zucker liefert,<sup>1)</sup> so würde also im Maximum 0,12 gr. Zucker entstehen und dieser bei völliger Vergärung 0,06 gr.  $\text{CO}_2$  liefern können. Das ist weniger, als in den Gährversuchen erhalten worden ist, zudem

1) Diese Zeitschr., Bd. XIII, S. 535.

war die Hefe in den Versuchen zum grössten Theil unverändert vorhanden.

Es fragt sich nun weiter, aus welchem Material diese  $\text{CO}_2$  liefernde Substanz entstanden ist und durch welchen Vorgang.

Was die erste Frage betrifft, so glaube ich mit Bestimmtheit sagen zu können: das Material kann nur ein Spaltungsproduct des Eiweisses sein. Das Fibrin wird vor der Conservirung mit Chloroformwasser stets so gut gewaschen, dass ihm vom Blute her nichts von reducirenden oder gäh- rungsfähigen Substanzen anhaften kann, und eine andere Quelle kommt nicht in Betracht. Dass das wirksame Ferment aus Fäulnissbakterien stammte, hat insofern eine gewisse Wahrscheinlichkeit für sich, als das Fibrin trotz aller Sorgfalt beim Waschen sicher Fäulnissbakterien enthielt: es ist indessen nicht unbedingt als sicher anzunehmen, da der Gehalt des Fibrins an Fäulnissbakterien jedenfalls als sehr gering anzunehmen ist und eine weitere Entwicklung im Chloroformwasser nicht stattgehabt haben kann. Man ist also nicht unbedingt zu dieser Annahme der Abstammung des tryptisch wirkenden Ferments gedrängt, es erscheint vielmehr auch eine andere Erklärung möglich. Vor einigen Jahren habe ich nachgewiesen, dass die Gewebe eiweisspaltende Fermente enthalten, welche in Chloroformwasser ihre Wirkung entfalten, in besonders reichlicher Menge die Leber, aber auch das Muskelgewebe. Ich erinnere daran, dass sich auch aus ganz frischen Kaninchenmuskeln, wenn sie lange in Chloroformwasser aufbewahrt werden, beträchtliche Quantitäten von Leucin ohne jede Spur von Fäulniss bilden.<sup>1)</sup> Es ist wohl denkbar, dass Spuren eines solchen Ferments auch im Blut vorhanden sind und sich auf das Fibrin bei Ausscheidung desselben aus dem Blut niederschlagen.<sup>2)</sup>

Es liegt sehr nahe, die Frage aufzuwerfen, ob ähnliche Veränderungen, wie durch dieses langsam wirkende Ferment,

1) H. Schwiening, Virchow's Archiv, Bd. 136, S. 473.

2) Wenn ich nicht irre, bevorzugen Dastre, sowie Arthaus und Huber diese Erklärung für ihre Beobachtung über die Veränderungen des Fibrins in Salpeterlösung und Fluornatriumlösung.

nicht auch durch die Wirkung des Trypsins auf Eiweiss hervor-  
gebracht werden können. Ich bin mit Versuchen hierüber  
beschäftigt und behalte mir ein Urtheil hierüber noch vor.

#### 4. Zur Frage über den Einfluss der Kohlehydrate auf die Eiweissfäulniss.

Um zu prüfen, ob die bekannte antiseptische Wirkung  
der Kohlehydrate unter Umständen zu einer völligen Aufhebung  
der Fäulniss führen könne, liess ich eine kleine Quantität  
frischen Blutes (ca. 80 ccm.) mit Rohrzucker gesättigt, in einem  
Glasstöpselglas bei Zimmertemperatur stehen. Bei wiederholter  
Prüfung zeigte die Mischung zu keiner Zeit Fäulnissgeruch,  
dagegen trat allmählich ein unverkennbarer Geruch nach Essig-  
äther auf. Nachdem die Mischung ca. 1<sup>1</sup>/<sub>4</sub> Jahre gestanden  
hatte, wurde sie genauer untersucht.

Das vorher flüssige Blut fand sich in eine bräunlich-  
schwarze geléeartige Masse umgewandelt, welche ziemlich stark  
sauer reagirte und, wie bereits erwähnt, unverkennbar nach  
Essigäther roch, von Fäulnissgeruch war absolut nichts zu  
bemerken. Es wurden zunächst einige Abimpfungen auf Nähr-  
gelatine vorgenommen, die Proben blieben steril. Bei der mikro-  
skopischen Untersuchung konnten keine Bakterien entdeckt  
werden, dagegen fanden sich zahlreiche Schimmelpilzfäden und  
Sporen. Die Abimpfung auf zur Entwicklung von Schimmel-  
pilzen geeigneten Nährmedien ist leider versäumt worden.

Zur Untersuchung wurde die gelatinöse Masse mit dem  
gleichen Volumen Wasser kräftig durchgeschüttelt, wodurch  
eine bräunlich gefärbte, etwas trübe Lösung erhalten wurde.  
Eine filtrirte Probe mit etwas Wasser verdünnt ergab bei der  
spectroskopischen Untersuchung den Streifen des sauren Häma-  
tins, jedoch nur schwach ausgebildet. Der Zusatz von Mineral-  
säuren änderte nichts an dem Befund. Das Hämoglobin ist  
also durch Säurewirkung gespalten, das Hämochromogen oxydirt,  
ein Theil des Hämatins aber wohl weiter verändert.

Die etwas trübe Lösung wurde nun destillirt. Da eine  
Vorprüfung an einer kleinen Probe gezeigt hatte, dass sich  
die Flüssigkeit ohne störende Gerinnung erhitzen lasse, so

konnte die Destillation direkt vorgenommen werden, was jedenfalls der Destillation im Dampfstrom mit Rücksicht auf die Concentration des Destillates vorzuziehen war. Ein Verlust an Essigäther war dabei nicht ganz zu vermeiden, wie das Auftreten des Geruches nach diesem bei der Destillation zeigte. Es wurde zunächst nur eine kleine Quantität, ca. 25 cem., abdestillirt, das sauer reagirende Destillat mit Natriumcarbonat schwach alkalisirt und fractionirt. Als erste Fraction wurde das aufgefangen, was bei einer Temperatur bis 93° überging, als zweite das zwischen 93 und 100° Uebergehende, alsdann wurde die Destillation unterbrochen. Die erste Fraction betrug etwa 3 cem., die zweite etwa 8 cem.

Die erste Fraction, von neutraler Reaction, roch ausgeprägt nach Essigäther. Da der Versuch, denselben rein darzustellen, aussichtslos war, beschränkte ich mich auf den Nachweis, dass bei der Verseifung dieser Flüssigkeit Essigsäure entsteht: der Nachweis des entstehenden Alkohols wurde leider durch den Alkoholgehalt der Flüssigkeit unmöglich gemacht. Zur Verseifung wurde die erste Fraction in ein Stöpselglas gegossen, welche 20 cem. Halbnormallauge enthielt, und einige Tage stehen gelassen, dann 10.05 cem. Normal-säure hinzugesetzt, welche den angewendeten 20 cem. der etwas zu starken Halbnormallauge genau entsprachen, und mit Halbnormallauge zurücktitrirt. Es wurden 2.2 cem Halbnormallauge zur Neutralisation gebraucht, entsprechend 66 mgr. Essigsäure = 88 mgr. Essigäther.<sup>1)</sup> Die erhaltene Lösung wurde mit Schwefelsäure angesäuert und destillirt, das Destillat mit Natriumcarbonat neutralisirt und eingedampft, der Rückstand gab mit arseniger Säure erhitzt starken Kakodylgeruch. Es ist somit nachgewiesen, dass die allmählich abgespaltene Säure Essigsäure war.

Die zweite Fraction roch nach Alkohol, brannte mit

1) Der Umstand, dass die Halbnormallauge ein wenig zu stark war, ist bei der Berechnung nicht in Betracht gezogen. Die Verseifung in der Kälte wurde — nachdem ein Vorversuch mit Essigäther gezeigt hatte, dass sie ausführbar ist — gewählt, um vor der Bildung von Säure durch Einwirkung des Natronhydrats auf den Alkohol sicher zu sein.

bläulicher Flamme, gab mit Jodjodkaliumlösung Jodoform, mit Kaliumchromat und Schwefelsäure intensive Grünfärbung und Aldehydgeruch: ein Streifen zusammengelegten Filtrirpapiers, welcher mit ammoniakalisch-alkalischer Silberlösung getränkt war, wurde beim Einführen in das betreffende Reagensglas momentan tief schwarz gefärbt. Die zweite Fraction bestand somit der Hauptsache nach aus verdünntem Aethylalkohol. Indol war in derselben nicht nachweisbar.

Der im Fractionskölbchen gebliebene Rest wurde auf dem Wasserbad zur Trockne gedampft: ein Theil mit arseniger Säure erhitzt: starker Kakodylgeruch, ein anderer in Wasser gelöst, mit ganz verdünnter Salzsäure neutralisirt (minimal saure Reaction), dann Eisenchlorid hinzugesetzt: Rothfärbung der Lösung, beim Kochen Ausscheidung von basisch essigsäurem Eisenoxyd unter Entfärbung der Flüssigkeit.

In den ersten 25 cm. des Destillats sind somit Alkohol, Essigäther und freie Essigsäure nachgewiesen.

Die in dem Destillationskolben gebliebene, ganz schwach sauer reagirende Flüssigkeit wurde durch Wasserzusatz auf 150 ccm., also annähernd das frühere Volumen, gebracht, von einem geringen schwärzlichen Rückstand abfiltrirt. Von dem Filtrat wurde eine Probe mit ca.  $\frac{1}{4}$  Volumen concentrirter Kochsalzlösung und einigen Tropfen Essigsäure erhitzt, vom ausgeschiedenen Eiweiss abfiltrirt. Das etwas gelbliche Filtrat zeigte an einem auf Traubenzucker graduirten Halbschattenapparat  $1.6^{\circ}$  Linksdrehung, der Rohrzucker war also invertirt, ob vollständig, ist nicht untersucht. Auf Zusatz von Natronlauge und wenig Kupfersulfat trat schwache Biuretreaction ein, mehr Kupfersulfat lieferte eine tiefblaue Flüssigkeit, die schon bei gelindem Erwärmen rothes Kupferoxydul in Menge ausschied. Eine andere Probe desselben Filtrats wurde mit Ammonsulfat in Substanz gesättigt: schwache Trübung durch ausgeschiedene Albumose, das Filtrat gab keine deutliche Biuretreaction.

Die Hauptmenge der filtrirten Flüssigkeit wurde mit Schwefelsäure stark angesäuert, etwa die Hälfte abdestillirt: das Destillat reagirt schwach sauer, enthält Essigsäure, aber weder Phenol noch Indol, gibt noch schwache Jodoformreaction. Der

im Kolben gebliebene Destillationsrückstand wurde mit Aether ausgeschüttelt, der Aetherauszug verdunstet; in dem dabei bleibenden Rückstand war weder Skatolcarbonsäure, noch eine aromatische Oxysäure nachweisbar.

Es ist somit festgestellt, dass eine so eminent fäulnissfähige Flüssigkeit, wie das Blut, keine Fäulnisszersetzung erfährt, wenn sie mit Rohrzucker gesättigt ist, soweit sich dieses durch eine vereinzelt Beobachtung feststellen lässt. In der Mischung haben sich nur Schimmelpilze angesiedelt (von denen übrigens makroskopisch nichts zu bemerken war), welche, auf den Rohrzucker einwirkend, aus demselben Alkohol, Essigsäure und Essigäther gebildet haben. Die Spaltung des Hämoglobins ist ein secundärer, auf das Auftreten von Essigsäure zu beziehender Vorgang.

Die Essigätherbildung hat ein gewisses Interesse; allerdings bilden sich auch bei der Gährung des Weinmostes zusammengesetzte Aether, namentlich der sogenannte Oenanthäther, den man in der Regel wohl als ein Gemisch von Capronsäureester und Caprinsäureester ansieht, allein in diesem Falle ist es nicht ausgeschlossen, dass die Säuren schon präformirt im Most vorhanden sind, während das hier sicher nicht der Fall ist, vielmehr augenscheinlich zwei Prozesse, Alkoholgährung und Essigsäurebildung, welche beide auf Zersetzung des Rohrzuckers beruhen, neben einander verlaufen und die lange Dauer des Vorgangs zur Esterbildung Veranlassung gegeben hat.

##### 5. Ueber den Einfluss von Schwefelwasserstoff auf Kohlenoxydblut.

E. Harnack hat kürzlich u. A. nachgewiesen,<sup>1)</sup> dass beim Durchleiten von  $H_2S$  durch eine Lösung von CO-Hämoglobin Sulfohämoglobin auftritt, dass somit die Angabe von Hoppe-Seyler, wonach Schwefelwasserstoff allein auf Hämoglobin nicht einwirkt, sondern nur bei Gegenwart von  $O_2$ , in diesem Umfange nicht richtig ist, wenn auch soviel

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 558.

darin richtig ist, dass bei Abwesenheit von Sauerstoff keine Grünfärbung und keine tiefgreifende Zersetzung des Hämoglobins eintritt. Harnack erwähnt dabei (l. c. S. 570), dass Lewisson<sup>1)</sup> zwar die Versuche von Hoppe-Seyler auch mit Wasserstoff und Kohlenoxyd wiederholt habe, aber hiermit auch nur bewiesen habe, dass (was Niemand bezweifelt) eine Zersetzung von Blutfarbstoff durch  $H_2S$  nur bei Anwesenheit von  $O_2$  erfolgt. In einer Anmerkung auf derselben Seite sagt Harnack: Lewisson's Versuche, soweit sie sich auf CO-Hämoglobin beziehen, sind später auch von E. Salkowski (Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. VII, S. 114) bestätigt worden, aber bewiesen wird doch immer nur, dass unter diesen Umständen keine tiefgreifende Zersetzung, keine Braunfärbung eintritt.

Ich kann nun nicht anerkennen, dass ich die Angaben von Lewisson bestätigt habe. Zunächst könnte man aus der Form der Anmerkung von Harnack vielleicht schliessen, dass ich selbst auf die Uebereinstimmung meiner Beobachtungen mit denen Lewissons hingewiesen habe. Das ist nicht der Fall: ich konnte das nicht thun, weil ich die Arbeit von Lewisson nicht gekannt habe — sein Name kommt in meiner Mittheilung auch gar nicht vor —, die Schlussfolgerung der Bestätigung gehört vielmehr Harnack an und ich kann die Berechtigung dieser Schlussfolgerung nicht anerkennen.

An der von Harnack citirten Stelle sage ich: Abgesehen von der spectrokopischen Untersuchung haben wir zur Unterscheidung an Kohlenoxydblut und genuinem Blut nur die Natronprobe von Hoppe-Seyler. Es erscheint mir daher nicht überflüssig, eine unterscheidende Reaction mitzutheilen, welche auf der grösseren Resistenz (im Original nicht gesperrt) des Kohlenoxydhämoglobins gegen Schwefelwasserstoff beruht.

Verdünt man sauerstoffhaltiges Blut so weit, dass eben die Trennung des breiten Absorptionsstreifens (in 1 cm. dicker Schicht) sichtbar wird — etwa 20—24 Tropfen oder 0,9—1 ccm.

<sup>1)</sup> Virchow's Arch., Bd. 36, S. 15.



Blut auf 50 ccm. Wasser —, versetzt die Lösung im Reagensglas mit  $1\frac{2}{3}$ — $\frac{3}{4}$  Volumen gesättigten Schwefelwasserstoffwassers und schüttelt einige Mal durch, so verfärbt sich die Lösung in einigen Augenblicken und wird endlich in wenigen Minuten schmutzig grün unter Bildung von Schwefelmethämoglobin.

Führt man denselben Versuch mit Kohlenoxydblut aus, so verändert sich die rothe Farbe der Lösung nicht merklich. In beiden Fällen entsteht allmählich ein flockiger Niederschlag, der sich langsam absetzt, der Farbenunterschied ist jedoch trotz der Trübung sehr deutlich.

In diesen Versuchen ist also relativ wenig Schwefelwasserstoff angewendet und der Luft freier Zutritt gestattet. Dagegen ist in den Versuchen von Lewisson der Sauerstoff der Luft sorgfältig ausgeschlossen, und es ist bei einer Verdünnung des Blutes von 1:100 ein Schwefelwasserstoffstrom durchgeleitet. Die Versuchsbedingungen sind also bei mir ganz andere als bei Lewisson, aus meinen Versuchen kann man meines Erachtens weder etwas für noch gegen diesen Autor entnehmen. Aus meinen Beobachtungen folgt nur soviel, dass CO-Hämoglobin in einer verdünnten Blutlösung sehr viel resistenter gegen Schwefelwasserstoff ist, als O-Hämoglobin. Das habe ich gesagt und das halte ich auch — mit einer gewissen Einschränkung, auf die ich weiter unten zu sprechen komme — aufrecht. Diese grössere Resistenz des CO-Hämoglobins gegen  $H_2S$  schliesst sich der bekannten grösseren Resistenz des CO-Hämoglobins gegenüber verschiedenen Reagentien, z. B. Ferrocyankalium + Essigsäure, Tannin, Metallsalze etc., an.

Von meinen damaligen Versuchen her befinden sich noch drei zugeschmolzene Röhren in meinem Besitz, von denen zwei die Kohlenoxydproben enthalten, eine die Probe mit gewöhnlichem Blut. Es hatte ein gewisses Interesse, zu sehen, wie sich die Proben jetzt, nach 16—17 Jahren, verhalten. In allen Röhren befindet sich eine klare, über einem geringen, schmutzig gefärbten Bodensatz stehende Flüssigkeit. In den Kohlenoxydproben ist dieselbe hell kirschroth gefärbt, in der Probe mit gewöhnlichem Blut grüngelb. Die beiden ersten Proben zeigen

ein schönes klares Spectrum von Kohlenoxydhämoglobin, beide ausserdem noch einen schmalen schwachen Absorptionsstreifen, in der einen Probe deutlich ausgeprägt, in der anderen nur angedeutet. Dieser Streifen entspricht seiner Lage nach dem Harnack'schen Sulfhämoglobinstreifen, es hat also eine Einwirkung von  $H_2S$  auf das CO-Hämoglobin stattgefunden. Die grünlich-gelbe Flüssigkeit aus dem genuinen Blut zeigt keinen deutlichen Absorptionsstreifen.

Ich habe oben gesagt, dass ich meine damaligen Beobachtungen nur mit einer gewissen Einschränkung aufrecht erhalte. In jetzt angestellten Versuchen hat sich nämlich der Unterschied zwischen genuinem und CO-Blut weit weniger markant herausgestellt als früher, namentlich aber verlief die Einwirkung des Schwefelwasserstoffwassers auf das Oxyhämoglobin weit langsamer. Worin die Ursache dieser auffallenden Abweichung liegt, ob vielleicht in der Art des angewendeten Blutes — wenn man Blut von Schlachtthieren kauft, so kann man hier nie bestimmt wissen, von welchem Thier das Blut stammt —, oder worin sonst, vermag ich nicht zu sagen. Auf's deutlichste geht der Unterschied der beiden Blutarten — CO-Blut und genuines — aber hervor aus der von Katayama<sup>1)</sup> beschriebenen Probe mit Schwefelammonium und Essigsäure.

Nach Kenntnissnahme der Arbeit von Lewisson scheint mir übrigens die Sachlage in einem Punkt doch etwas anders zu sein, als man nach der Darstellung von Harnack annehmen könnte. Nach Harnack's Darstellung (l. c. S. 570) könnte es scheinen, dass Lewisson die spectroskopische Untersuchung nicht vorgenommen habe; ich will nicht behaupten, dass diese Deutung unbedingt zwingend ist, aber man kann sich derselben doch schwer entziehen. Dem ist nun aber nicht so. Lewisson hat die Spectraluntersuchung ausgeführt. Indem er seine Versuchsanordnung beschreibt, sagt er (l. c., S. 16):  
Jetzt konnte ein starker  $CO_2$ -Strom durch das Cylinderglas streichen (welches nämlich die Blutlösung enthielt), ohne dass

<sup>1)</sup> Virchow's Archiv, Bd. 114, S. 53. — Maly's Jahresbericht f. 1889, S. 108.

die Beobachtung durch den Spectralapparat dadurch einen Augenblick unterbrochen zu werden brauchte.<sup>1)</sup> Dasselbe gilt für die Versuche mit Wasserstoff und Kohlenoxyd.

Ferner sagt Lewisson S. 17: »Wurde darauf die bisher verschlossene Röhre mit einem behufs völliger Austreibung des in dem Apparat befindlichen Sauerstoffs schon eine gute Viertelstunde in Gang gewesenen Schwefelwasserstoffapparat in Verbindung gebracht und der Verschluss hier aufgehoben, während er an der bisher mit dem Kohlensäureapparat verbunden gewesenen Röhre hergestellt wurde, so trat gleichwohl keine Veränderung der Blutlösung ein, weder in der Farbe, noch in der Klarheit, noch in dem Verhalten vor dem Spectralapparat.<sup>1)</sup> So oft hingegen nach Hinfortnahme des Schwefelwasserstoffapparats der atmosphärischen Luft der Zutritt gestattet wurde, so trat in jedem Falle, gleichgültig ob der Schwefelwasserstoff eine kürzere oder längere Zeit hindurchgeleitet war, sehr bald der Streifen des Hämatins im Roth zu dem breiten des sauerstofffreien Hämoglobins hinzu. Die Blutlösung nahm dabei eine schmutziggrüne Färbung an und zeigte nach einiger Zeit eine deutliche Schwefelabscheidung. Dieselbe Beschreibung macht Lewisson hinsichtlich des durch Wasserstoff reducirten Hämoglobins und des CO-Hämoglobins.

Der «Hämatinstreifen» ist wahrscheinlich der Sulfhämoglobinstreifen Harnack's. Warum Lewisson im Widerspruch mit Harnack denselben nicht auch bei Ausschliessung von Sauerstoff erhalten hat, bleibt unaufgeklärt.

<sup>1)</sup> Im Original nicht gesperrt.