

# Beiträge zur Kenntniss des Magensaftes und der chemischen Zusammensetzung der Enzyme.

Von

M. Nencki und N. Sieber.

(Aus der chemischen Abtheilung des Instituts für experimentelle Medicin zu Peter-burg.)

(Der Redaction zugegangen am 1. März 1901.)

Man kann sagen, dass erst seit der Arbeit von Professor J. Pawlow und Frau Dr. Schoumow-Simanowski,<sup>1)</sup> welche zeigten, dass von gastro- und ösophagotomirten Hunden bei der Scheinfütterung reflectorisch reiner Magensaft in grossen Mengen abgesondert wird, ein wirklich reiner, von allen fremden Beimischungen freier Saft in beliebig grossen Quantitäten erhalten werden kann. Kurz nach der Veröffentlichung der Arbeit von Pawlow und Schoumow-Simanowski hat die Letztere den so gewonnenen Saft in unserem Laboratorium einer chemischen Analyse unterworfen.<sup>2)</sup> Sie benutzte dabei die Beobachtung, dass solcher Magensaft, auf 0° abgekühlt, einen amorphen, körnigen Niederschlag bildet, um das wirksame Princip durch einfache Filtration bei niedriger Temperatur aus dem Magensaft zu isoliren. Ausser den verschiedenen Analysen des frischen Saftes hat Frau Schoumow-Simanowski auch diesen körnigen Niederschlag, der Eiweissstoffe energisch verdaut, und den sie auf Grund ihrer Untersuchung als das wirksame Enzym resp. Gemisch der Enzyme des Magensaftes angesehen hat, analysirt und gefunden, dass dieser Niederschlag aus einem eigenthümlichen chlorhaltigen Eiweisskörper besteht. In der Asche desselben hat sie neben

1) Wratsch, 1890, Nr. 41.

2) Archiv f. exper. Pathologie und Pharmacologie, Bd. 33, S. 336.

minimalen Mengen von Eisen auch Phosphorsäure nachgewiesen. Zu welcher Gruppe der Eiweisskörper dieses sogenannte körnige Pepsin gehört, hat sie nicht näher bestimmt und wurde leider durch Krankheit an der Fortsetzung ihrer Untersuchung verhindert. Obgleich wir, durch die Publication von Pekelharing<sup>1)</sup> und Hammarsten<sup>2)</sup> angeregt, uns wiederholt vorgenommen haben, die Untersuchung über die Enzyme des Magensaftes wieder aufzunehmen und uns reiner Magensaft leicht zugänglich war, konnten wir, durch andere Arbeiten in Anspruch genommen, erst im Herbst des Jahres 1899 an die Ausführung unseres Vorhabens herantreten.

Bevor wir zur Beschreibung unserer eigenen Versuche und deren Resultate übergehen, halten wir es für zweckmässig, des leichteren Verständnisses wegen, die Ergebnisse der Pekelharing'schen Arbeit kurz zu recapituliren.

Pekelharing extrahirte Fundusmucosa von Schweinemägen mit 0,2%iger HCl, filtrirte unter vermindertem Druck und dialysirte das Filtrat im Pergamentschlauch gegen strömendes Leitungswasser 15—20 Stunden lang. Dadurch sank der Säuregrad des Schlauchinhalts auf etwa 0,02%, die Flüssigkeit wurde trübe von suspendirtem Niederschlag, der mittelst Centrifuge getrennt und, wiederum in 0,2% iger HCl gelöst, sich als ein äusserst wirksames Pepsin erwies. Durch wiederholtes Auflösen in 0,2% iger HCl und bei 15 bis 20 stündiger Dialysiren der Lösung, wobei er sich von Neuem ausscheidet, wurde der Körper gereinigt. Der nach dem Centrifugiren erhaltene Niederschlag, mit wenig destillirtem Wasser gewaschen und anfangs auf Fliesspapier, sodann über  $\text{SO}_4\text{H}_2$  getrocknet, bildet ein gelbes, leicht zerreibliches, kaum hygroskopisches Pulver, das wenig in Wasser, leichter in verdünnter Kochsalzlösung, namentlich bei Brüttemperatur, löslich ist. In verschiedenen verdünnten Säuren löst es sich, am besten bei Körpertemperatur, zu einer wasserklaren Flüssigkeit auf und scheidet sich flockig aus, sobald der Säuregrad bis zu einem gewissen Gehalte

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. XXII. S. 233.

2) Dessen Lehrbuch der physiol. Chem., S. 264. 4. Auflage, 1899.

erniedrigt ist. Für Salzsäure ist die Löslichkeit am geringsten bei etwa 0,02 ‰. Nach Pikelharing enthält diese Substanz, die alle Reactionen der Eiweisskörper zeigt und als ausserordentlich kräftiges Pepsin sich herausstellte, ungefähr 1,0 ‰ Phosphor. Diese sehr complicirt zusammengesetzte Verbindung ist sehr labil. Das Auswaschen durch Alkohol zerstört sie; sie verliert dabei ihre Löslichkeit in HCl und auch das Vermögen, Eiweiss zu verdauen. Wird ihre wässerige, saure Lösung schnell zum Kochen erhitzt, so wird sie gespalten: 1. in ein bei saurer Reaction unlösliches Nucleoproteid; 2. in eine Albumose und 3. in eine im warmen Alkohol leicht, in kaltem schwer lösliche, phosphorhaltige Substanz.

Pikelharing vermuthet, dass das von ihm auf die oben beschriebene Weise erhaltene Pepsin identisch sei mit dem von Frau Schoumow-Simanowski durch Abkühlen des natürlichen Magensaftes isolirten körnigen Pepsin, gibt aber nicht an, ob sein Produkt chlorhaltig sei. Nach den Analysen von Schoumow-Simanowski enthält das körnige Pepsin etwa 1 ‰ Chlor. In einer im vorigen Jahre erschienenen Mittheilung von Friedenthal,<sup>1)</sup> der den nach Pawlow's Methode erhaltenen Magensaft untersuchte, wird der Chlorgehalt des Pepsins geleugnet. Nach ihm ist die Salzsäure im Magensaft nur als freie Salzsäure enthalten. Der Gefrierpunkt des von ihm untersuchten Saftes, dessen Säuregehalt = 0,577 ‰ HCl war, lag bei  $-0,61^{\circ}$ , also fast genau übereinstimmend mit dem einer 0,577 ‰igen HCl. Aus dieser Thatsache, sagt Friedenthal, kann mit Sicherheit gefolgert werden, dass die Salzsäure nicht in einer chemischen Verbindung mit Pepsin im Magensaft enthalten ist. Vorgreifend wollen wir schon hier bemerken, dass nach unserer Meinung die Ansicht Friedenthal's eine irrige ist. Zweifellos ist das Molekulargewicht des Pepsins ein sehr hohes und je höher das Molekulargewicht, um so kleiner ist die durch die betreffende Substanz bewirkte Depression. Im Vergleich zu der starken Depression, welche durch die freie Salzsäure des

<sup>1)</sup> Archiv f. Anat. u. Physiol., Jahrg. 1900, physiol. Abth., 186.

Magensaftes bewirkt wird, ist die durch das Pepsin des Saftes bedingte eine verschwindend kleine. Der Magensaft des Hundes enthält ca. 0,3% festen Rückstand. Angenommen, dass der feste Rückstand nur aus Pepsin besteht, so sind dafür, unter der Voraussetzung, dass das Pepsin 1,0% HCl enthält, 0,003 g HCl erforderlich. Der von Friedenthal untersuchte Saft enthielt im Liter 5,77 g HCl. Von diesen 5,77 g wären danach nur 0,03 g HCl oder etwa der 0,005te Theil an Pepsin gebunden, die übrige Säure des Saftes aber als freie Säure darin vorhanden. Dass die Gefrierpunktbestimmung über die Frage, ob das Pepsin des Magensaftes Chlor enthält oder nicht, absolut nichts beweisen kann, liegt auf der Hand. Wir werden weiter unten Gründe anführen, die entschieden dafür sprechen, dass das Chlor ein integrierender Bestandtheil des genuinen Pepsinmoleküls ist.

Zu unseren Versuchen dienten und dienen noch jetzt vorwiegend 2 Hunde, von denen der eine 46 Kilo schwer, im October 1899, der andere, 23 Kilo schwer, im November des gleichen Jahres operirt wurde. Für die Magenfistel benutzten wir silberne Canülen mit leicht gewölbten Rändern. Sie haben den Vortheil, dass sie vom Magensaft nicht angegriffen werden und andererseits durch den inneren Rand die Schleimhaut nicht reizen. Die Thiere wurden mit Pferdefleisch, Brod, Hafersuppe und Milch ernährt, die ihnen durch die Magenfistel 2 Mal am Tage hineingebracht wurden. Die Nahrungszufuhr wurde so regulirt, dass die Thiere, nachdem sie von den beiden Operationen sich erholt haben, noch einige Kilo an Gewicht zunahmen und dann ihr Körpergewicht annähernd constant blieb. Von Zeit zu Zeit wurden dem verfütterten Fleisch einige Gramm Kochsalz zugesetzt. Bei sorgfältiger Pflege, Ausspülen des Magens bei eingetretener Indigestion mit Creosotwasser und peinlicher Reinlichkeit bleiben die Thiere Jahre lang gesund und liefern stets reinen Saft. Wir entnahmen unseren Hunden in der Regel 2 Mal in der Woche durch die Scheinfütterung je 400—500 ccm. Saft. Ausserdem erhielten wir öfters aus der Abtheilung von Professor Pawlow auf gleiche Weise gewonnenen Magensaft, so

dass wir genug Gelegenheit hatten, individuelle Schwankungen dieses Secretes und seine Abhängigkeit von der Ernährung zu studiren.

In seiner Abhandlung spricht Pekelharing die Vermuthung aus, dass das von ihm aus Schweinemagen dargestellte künstliche Pepsin identisch sei mit dem körnigen Pepsin, das Frau Schoumow-Simanowski durch Abkühlung des natürlichen Magensaftes vom Hunde erhalten hat. Nach unseren Versuchen ist diese Vermuthung durchaus richtig. Wir können ferner ergänzend hinzufügen, dass nach gleichem Verfahren, wie das für seine Extracte angewendete, auch aus natürlichem Magensaft ein Pepsin erhalten wird, das in jeder Beziehung genau so wie das Pepsin von Pekelharing sich verhält und nach dem üblichen Sprachgebrauch als damit identisch erklärt werden könnte.

Wird frischer Magensaft von gastro- und ösophagotomirten Hunden in Portionen von ca. 500 ccm. im Pergamentschlauch<sup>1)</sup> gegen die 20fache Menge destillirten Wassers 24 Stunden lang dialysirt, so wird der Schlauchinhalt trübe und der Säuregehalt erheblich vermindert, sodass die Acidität des Schlauchinhalts auf 0,025—0,03% sinkt. Die trübe Flüssigkeit haben wir in Centrifugenflaschen etwa 15 Stunden bei 0° stehen gelassen, wobei sich ein Theil der Trübung zu Boden setzte und beim nachherigem Centrifugiren ein fest am Boden des Gefässes haftender, klebriger Niederschlag entstand, während die Flüssigkeit meistens vollkommen klar wurde. Lässt man Magensaft gegen fliessendes Wasser und längere Zeit dialysiren, so geht der in den ersten 24 Stunden entstandene Niederschlag wieder in Lösung über, kann aber durch Zusatz von Salzsäure bis zu 0,02—0,03% von Neuem hervorgerufen werden. Also genau so, wie dies Pekelharing von seinem künstlichen Magensaft angibt.

1) Der von uns verwendete Dialysenschlauch aus Pergamentpapier wurde stets vor dem Gebrauch mit 0,5% iger HCl gefüllt und mehrere Tage lang gegen fliessendes Wasser dialysirt. Wir fanden, dass die Schlauchwand an Wasser nicht unerhebliche Mengen von Calciumsulfat abgibt, die vorerst entfernt werden mussten.

Der abfiltrirte und mit wenig 0,02%iger Salzsäure ausgewaschene Centrifugenniederschlag löst sich in 0,2—0,5%iger Salzsäure bei der Bruttemperatur vollkommen klar auf und die Lösung hat alle Eigenschaften des ursprünglichen Magensaftes, nur ist die Enzymwirkung ein wenig schwächer. Dies rührt davon her, dass ein Theil des Pepsins noch immer in der Schlauchflüssigkeit gelöst bleibt. Wird Magensaft zum Kochen erhitzt, so scheidet sich daraus das Nucleoproteid, auf das wir noch später zurückkommen werden. Wir haben nun in 100 ccm. des ursprünglichen Saftes das durch die Hitze fällbare Nucleoproteid bestimmt und einen grösseren Theil des gleichen Saftes gegen die 10fache Menge destillirten Wassers 24 Stunden lang dialysirt, nach dem Stehen in der Kälte und Centrifugiren, den Niederschlag abfiltrirt, in 100 ccm. des Filtrates durch Kochen das Nucleoproteid gefällt und den abgeschiedenen Nucleoproteidniederschlag nach dem Waschen und Trocknen gewogen. Aus der Gewichts-differenz der beiden Nucleoproteidniederschläge haben wir dann berechnet, wie viel Pepsin unter diesen Verhältnissen noch in Lösung blieb. In 3 Bestimmungen erhielten wir folgende Zahlen:

Hund A: in 100 ccm. des ursprünglichen Magensaftes gefunden Nucleoproteid 0,0688 g. In 100 ccm. des Filtrates vom Centrifugenniederschlage gefunden 0,0126 g = 18,3% Nucleoproteid in Lösung geblieben.

Hund A: aus 100 ccm. des Magensaftes erhalten = 0,085 g Nucleoproteid, in 100 ccm. des Filtrates vom Centrifugenniederschlag gefunden 0,0196 g Nucleoproteidniederschlag = 23% Pepsin in Lösung geblieben.

Hund B: aus 100 ccm. frischen Magensaftes erhalten 0,0932 g Nucleoproteid und aus 100 ccm. des Filtrates vom Centrifugenniederschlag erhalten 0,0204 g Nucleoproteid oder in Lösung gebliebenes Pepsin 21,88%.

Im Mittel aus den 3 Bestimmungen bleibt also etwa der fünfte Theil des Pepsins in Lösung. Immerhin ist die durch das Dialysiren und Centrifugiren aus dem Magensaft erhaltene Pepsinmenge viel grösser, als die des durch die Kälte abgeschiedenen körnigen Pepsins. Im Mittel aus den 3 Be-

stimmungen von Frau Schoumow-Simanowski beträgt die durch die Kälte abgeschiedene Pepsinmenge von der im Magensaft enthaltenen kaum 5<sup>o</sup> o.

Wir haben vergleichsweise einerseits den ursprünglichen Magensaft, andererseits den Centrifugenniederschlag, in dem ursprünglichen Volumen gleich starker Salzsäure gelöst, auf ihre Wirkung auf geronnenes Eiereiweiss, Milch und Albumosen geprüft. Im Mittel aus 30 Versuchen war die Verdauungskraft für geronnenes Eiereiweiss, nach Mette bestimmt, für den gelösten Centrifugenniederschlag etwa auf  $\frac{1}{4}$  herabgesetzt; ebenso gerann die Milch etwas später und auch die Bildung des Plasteins aus Albumosen nach Danilewski war verzögert und seine Menge geringer. Man kann aber auch umgekehrt durch concentrirtere Lösungen des Centrifugenniederschlags viel energischere Enzymwirkung als beim ursprünglichen Magensaft erzielen. So haben wir beispielsweise den Centrifugenniederschlag von 500 ccm. Magensaft in 100 ccm. 0,5<sup>o</sup> iger Salzsäure durch 15 Minuten langes Stehen im Thermostaten in Lösung gebracht. Die Verdauungskraft des ursprünglichen Magensaftes, nach Mette bestimmt, war = 4,7 mm, die Verdauungskraft des Niederschlages dagegen 7,6 mm. Ein anderer Theil der letzteren Lösung wurde mit 0,1<sup>o</sup> iger Normalnatronlauge genau neutralisirt und 1,0 ccm. davon zu 10 ccm. frischer, brutwarmer Milch zugesetzt, worauf die Milch fast momentan coagulirte. Nach 15stündigem Stehen im Thermostaten war das Caseingerinnsel vollkommen gelöst und nur mit darauf schwimmender Fettschicht bedeckt. Ebenso gab Albumoselösung, nach Danilewski bereitet, einen viel reichlicheren Niederschlag von Plastein als ceteris paribus der ursprüngliche Magensaft. Aus dem Magensaft können auf diese Weise sehr wirksame Enzymlösungen bereitet werden; einfacher ist es allerdings, durch Aussalzen des Saftes mittelst Ammoniumsulfat die Enzyme daraus zu isoliren und durch Vermischen mit Zucker, Eiweiss oder Glycerin in haltbarer Form aufzubewahren. Wie schon oben erwähnt, gibt Pekkelharing an, dass der von ihm erhaltene Centrifugenniederschlag, rasch zum Kochen erhitzt, in ein Nucleoproteid, eine Albumose und

in eine in Alkohol lösliche Substanz zerfällt. Nach seinen Analysen enthält das Nucleoproteid 0,3% Phosphor und gibt, mit verdünnter Schwefelsäure gekocht, Alloxurbasen. Friedenthal,<sup>1)</sup> der mit Recht gegen Pikelharing betont, dass das Pepsin aus dem neutralisirtem Magensaft nicht durch Aufkochen, sondern durch die kochende verdünnte Salzsäure gefällt wird, ergänzt die Beobachtungen Pikelharing's dahin, dass aus dem Nucleoproteid nicht allein Alloxurbasen, sondern auch Pentose abgespalten wird. Die Natur der in Alkohol löslichen Substanz, die Pikelharing als Spaltungsprodukt des genuinen Pepsins ansieht, hat er nicht näher festgestellt und nur ermittelt, dass sie, mit Soda und Salpeter geschmolzen, eine phosphorreiche Asche gibt.

Auch in dieser Hinsicht stimmen unsere, an reinem Magensaft gemachten, Beobachtungen mit den Angaben Pikelharing's überein. Wird frischer Magensaft, oder der in 0,5% iger HCl gelöste Centrifugenniederschlag rasch zum Kochen erhitzt, so entsteht ein reichlicher, flockiger Niederschlag, vorwiegend aus dem Nucleoproteid, zum geringeren Theil aus der in Alkohol löslichen Substanz bestehend. In dem Filtrat davon gibt Ammoniumsulfat, bis zur Sättigung eingetragen, einen flockigen Niederschlag, der die Biuretreaction gibt und offenbar die Albumose Pikelharing's ist. Das auf dem Filter durch Waschen mit Alkohol von der darin löslichen Substanz befreite Nucleoproteid, mit verdünnter Schwefelsäure zersetzt, gibt sowohl die Alloxurbasen wie auch die Pentose. Von der Anwesenheit der letzteren haben wir uns sowohl durch die Orcin- wie durch die Resorcin-Probe respective die charakteristischen Absorptionsbänder im Spectrum überzeugt.

Frau Schoumow-Simanowski hat in ihrem nur durch die Kälte abgeschiedenen Pepsin nach langem Waschen mit Alkohol keine Phosphorsäure gefunden. Pikelharing vermuthet, dass gerade durch Alkohol das Pepsin angegriffen wird und dabei seinen Phosphor verliert. Diese Vermuthung ist insofern richtig, als die in Alkohol lösliche Substanz, die zu-

1) Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abth., Jahrg. 1900, S. 186.

sammen mit dem Nucleoprotein ausfällt, phosphorhaltig ist. Wenn aber schon durch Waschen mit Alkohol diese Substanz entfernt werden kann, so lag die Vermuthung nahe, dass sie dem ursprünglichen Centrifugenniederschlag entweder nur mechanisch beigemischt ist oder, was wahrscheinlicher, zu einer sehr lockeren Verbindung mit dem Pepsin verbunden sei. Eine weitere Consequenz dieser Hypothese ist es, dass ebenso leicht, wenn nicht leichter, wie durch Waschen mit Alkohol, auch durch Waschen mit Wasser, resp. die Dialyse eine Abspaltung einzelner Bestandtheile aus dem ursprünglichen Molekül des Pepsins geschieht. In dieser Annahme wurden wir noch bestärkt, als wir fanden, dass nach 24stündiger Dialyse von 500 ccm. Magensaft gegen die 10fache Menge destillirten Wassers das Aussenwasser des Dialysators, auf ein kleines Volumen verdunstet, sehr starke Reactionen auf Phosphorsäure, Schwefelsäure, Sulfo-cyansäure, Kalk, Magnesia und Eisen gab. Bezüglich des letzteren Elementes im Magensaft sind die Angaben der Autoren nicht übereinstimmend. Bunge sagt in seinem Lehrbuch der physiologischen und pathologischen Chemie,<sup>1)</sup> dass von den in den Darm sich ergießenden Secreten nach den bisherigen Analysen der Magensaft das eisenreichste und weit eisenreicher als die Galle sei. In einer vor Kurzem erschienenen Publication widerspricht dieser Angabe Bunge's Charles Dehrée,<sup>2)</sup> der den Saft aus einem nach der Methode von Frouin isolirten Blindsacke des Magens analysirte. Dehrée bestimmte das Eisen in dem Saft colorimetrisch und fand, dass darin nur Spuren von Eisen enthalten sind. Nach seinen Bestimmungen secernirte ein 16 kg schwerer Hund in dem Magensaft innerhalb 24 Stunden nicht mehr als 0,25 mg Eisen.

Um den wahren Sachverhalt zu ermitteln und dadurch auch einen besseren Einblick in die chemische Zusammensetzung des Pepsins zu erhalten, haben wir den Phosphor- und Eisengehalt und zwar: 1. in dem reinen Magensaft, 2. in dem aus dem Magensaft erhaltenen Centrifugenniederschlag und 3. in dem mit Alkohol ausgewaschenen Nieder-

1) 3. Auflage, 1894, Seite 87.

2) Journal de Physiolog. et Patholog. générale, t. 2. page 524, 1900.

schlage bestimmt. Ausserdem bestimmten wir in dem Centrifugenniederschlage den Chlorgehalt vor und nach der Behandlung mit Alkohol. Durch diese Bestimmungen bezweckten wir, eine Aufklärung über die mehr oder weniger feste Bindung dieser Elemente im Pepsinmolekül zu erhalten.

Bei dem geringen Gehalte des Magensaftes resp. des Pepsinniederschlages an diesen Elementen mussten wir erst einige analytische Schwierigkeiten überwinden und zuverlässige Bestimmungsmethoden ermitteln. Nach mehrfachen Versuchen sind wir bei folgendem Verfahren stehen geblieben.

Die bis zum constanten Gewichte bei  $110^{\circ}$  C. getrocknete Substanz wurde im Porzellantiegel mit einem einfachen Brenner bei sehr langsam steigender Temperatur verascht. Solche Veraschung von 0,5 bis 2,0 g Substanz erfordert 20 bis 30 Stunden. Die Asche hatte immer eine röthliche Färbung, vom Eisenoxyd herrührend. Qualitativ wurde darin auch Kalk nachgewiesen. Da wo es sich nicht um Aschebestimmung handelte, wurde der trockene Niederschlag durch Schmelzen mit Kali und Salpeter direkt verbrannt und in beiden Fällen die Asche in möglichst wenig Salzsäure gelöst und aus der Lösung zunächst die Phosphorsäure mit Molybdänlösung gefällt. Der nach 24stündigem Stehen abgeschiedene Molybdänniederschlag wurde durch ein kleines, aschefreies Filter filtrirt, mit möglichst wenig einer Lösung von salpetersaurem Ammon in Salpetersäure ( $5\% \text{NO}_3 \text{NH}_4 + 1\% \text{NO}_3 \text{H}$ ) nachgewaschen, in  $\text{NH}_3$  gelöst und die nicht mehr als 30 bis 50 ccm. betragende Lösung mit etwas Magnesiainmixtur gefällt. Der nach 2- bis 3tägigem Stehen abgeschiedene Niederschlag wurde wie üblich als pyrophosphorsaure Magnesia gewogen.

Das Filtrat vom Molybdänniederschlag wird mit Ammoniak übersättigt und einige Stunden auf dem warmen Wasserbade digerirt. Das abgeschiedene Eisenoxyd, dem öfters Kalk beigemischt ist, auf ein kleines Filter filtrirt, wird vollkommen ausgewaschen, in Salzsäure gelöst und nach Knorre<sup>1)</sup> mit Nitroso- $\beta$ -Naphthol in essigsaurer Lösung gefällt. Nach

<sup>1)</sup> G. Knorre, Berichte der Deutschen chem. Gesellschaft Bd. 20, S. 283 und Zeitschrift für analytische Chemie, Bd. XXVIII, S. 234.

3tägigem Stehen wird der Niederschlag filtrirt, mit 50%iger Essigsäure nachgewaschen, getrocknet, unter Zusatz von etwas Ammonnitrat geglüht und als Eisenoxyd gewogen.

Diese gewichtsanalytische Bestimmung des Eisens ist, selbst da, wo nur einige Milligramme gewogen werden, jeder colorimetrischen Bestimmung vorzuziehen. Wir haben versucht, das Eisen mit dem Ferrometer von Jolles zu bestimmen, erhielten aber keine übereinstimmenden Zahlen. Die Nüance des erhaltenen sulfocyan-sauren Eisenoxyds war häufig eine andere, als wie die der Normallösung und blieb auch bei wechselnden Concentrationen von der Normallösung verschieden. In der Vermuthung, dass in der Asche neben Eisen auch Mangan enthalten sein könnte, haben wir die Asche des Magensaftes wiederholt nach dem empfindlichen Verfahren von P. Pichard<sup>1)</sup> auf Mangan geprüft. Das Resultat war stets negativ.

Da, wo wir neben Phosphorsäure und Eisen auch Chlor bestimmen wollten, wurde die abgewogene Substanz nach Carius mit reiner, starker Salpetersäure und etwas Silbernitrat im zugeschmolzenen Rohre — bei grösseren Substanzmengen in 2 verschiedenen Röhren — Anfangs 2 Tage lang auf dem Wasserbade, wobei jeden Tag die Gase herausgelassen wurden, hernach bei 200°, bis kein Druck mehr vorhanden war, erhitzt. Der Röhreninhalt wurde hierauf sammt dem Waschwasser bis zum Verjagen der Salpetersäure auf dem Wasserbade verdunstet, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, das abgeschiedene AgCl auf ein gewogenes trockenes Filter gebracht und nach dem Trocknen bei 110° zurückgewogen. Aus dem Filtrate vom AgCl wurde das überschüssige Ag durch HCl gefällt, das Filtrat davon auf dem Wasserbade verdunstet, der Rückstand mit etwas Wasser aufgenommen und daraus zunächst die Phosphorsäure, sodann das Eisen, wie oben angegeben, abgeschieden.

Wird Magensaft selbst in Vacuo bei 35 bis 40° verdunstet, so schwärzt sich der Rückstand durch die stark con-

<sup>1)</sup> Compt. rend. t. 176, p. 550 und 1882, auch Maly's Jahresber. für Thierchemie 1898, S. 521.

centrirte Salzsäure, was eine genaue Bestimmung des festen Rückstandes beeinträchtigt. Wir haben daher im Magensaft, wo uns die Aschebestimmung nicht nothwendig war, den Säuregehalt titrimetrisch bestimmt und mit der genau erforderlichen Menge Natronhydrat neutralisirt. Die neutrale Lösung wurde auf dem Wasserbade verdunstet, sodann auf 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, von dem Trockengewicht das Gewicht des entstandenen NaCl abgezogen und so der Gehalt an festem Rückstande im Saft ermittelt.

In der folgenden Tabelle geben wir zunächst den Gehalt des Saftes an festem Rückstand, Phosphor und Eisen, die beiden letzten in Procenten des festen Rückstandes. Für jede Bestimmung wurden je 400 cem. Magensaft, wie eben angegeben, mit Natronhydrat neutralisirt und verarbeitet.

Tabelle Nr. I.

Nr.	Säuregehalt auf HCl bezogen in 100 cem. des Magensaftes	Fester Rückstand in 100 cem. des Saftes in g	Phosphorgehalt in Procenten des festen Rückstandes	Eisengehalt in Procenten des festen Rückstandes
1	0,55 %	0,2632 g	0,71 %	0,61 %
2	0,50 %	0,3647 >	0,24 %	0,20 %
3	0,56 %	0,3319 >	0,27 %	0,44 %
4	0,54 %	0,3405 >	0,22 %	0,28 %
5	0,51 %	0,4074 >	0,25 %	0,63 %
6	0,54 %	0,1600 >	0,54 %	0,36 %
7	0,52 %	0,2972 >	0,37 %	0,67 %
8	0,51 %	0,2872 >	0,73 %	0,47 %
Im Mittel	0,53 %	0,306 g	0,41 %	0,42 %

Die Tabelle II gibt die Chlor-, Phosphor- und Eisenbestimmungen in dem durch Centrifuge abgeschiedenen Pepsinniederschlage, der auf folgende Weise gewonnen wurde:

Frischer Magensaft wurde im Pergamentschlauch 24 Stunden lang gegen die zehnfache Menge destillirten Wassers dialysirt, der trübe Schlauchinhalt 15 bis 20 Stunden bei 0° stehen gelassen und sodann centrifugirt, wobei am Boden der Flaschen ein teigiger, schleimiger Niederschlag sich absetzte, von welchem die obenstehende, meistens ganz klare Flüssigkeit vollkommen abgégossen werden konnte. Der klebrige

Niederschlag, der sich leicht von der Wand löste, wurde auf ein Filter gebracht und, ohne weiter gewaschen zu werden, vom Filter mit einem Spatel abgehoben und auf Uhrgläser im Vacuo über concentrirter  $\text{SO}_4\text{H}_2$  und Aetznatron getrocknet. Nach dem Trocknen liess sich die Substanz leicht pulvern und verlor bei  $107^\circ$  im Luftbade fast nichts mehr an Gewicht. Nachdem wir so von 2 bis 4 Liter Saft Pepsin gesammelt haben, wurde darin nach dem oben beschriebenen Verfahren zunächst das Chlor, sodann die Phosphorsäure und hierauf das Eisen bestimmt.

Tabelle Nr. II.

Nr.	Durch die Centrifuge abgeschiedenes Pepsin bei $107^\circ$ getrocknet	in Procenten des trockenen Pepsins		
		Chlor	Phosphor	Eisen
1	0,7784 g	0,48 %	0,104 %	0,117 %
2	0,5130 »	0,47 %	0,148 %	0,151 %
3	1,0372 »	0,48 %	0,073 %	0,11 %
4	0,4304 »	0,47 %	0,091 %	0,18 %
Im Mittel		0,475 %	0,104 %	0,16 %

In einer dritten Versuchsreihe haben wir den auf gleiche Weise durch die Centrifuge erhaltenen Pepsinniederschlag auf dem Filter so lange mit 96%igem Alkohol gewaschen, bis das Filtrat nicht mehr auf Chlor reagirte. Die Substanz wurde hierauf bis zum constanten Gewichte bei  $105^\circ$  getrocknet, im Porcellantiegel verascht und in der Asche die Phosphorsäure, das Eisen und in einem Falle auch das Chlor bestimmt. Die erhaltenen Zahlen sind in der Tabelle Nr. III zusammengestellt.

Tabelle Nr. III.

Nr.	Pepsinnieder- schlag mit Alko- hol gewaschen und bei $105^\circ$ getrocknet in g	Asche in Procenten des trockenen Pepsins	Eisen in Procenten des trockenen Pepsins	Phosphor in Procenten des trockenen Pepsins	Chlor in Procenten des trockenen Pepsins
1	1,813 g	0,457 %	0,119 %	0,046 %	—
2	2,1758 »	0,389 %	0,158 %	0,045 %	0,188 %
3	0,6622 »	0,439 %	—	0,091 %	—
4	0,7108 »	0,309 %	0,068 %	0,055 %	—
Im Mittel		0,399 %	0,115 %	0,059 %	0,188 %

Aus dem Vergleich der in den 3 obigen Tabellen gegebenen Zahlen glauben wir folgende Schlüsse ziehen zu dürfen:

1. Zunächst fällt auf der geringe Gehalt an festen Stoffen im Magensaft des Hundes, bei dem wir vorwiegend diese Bestimmungen gemacht haben. Der Hund, an dem die Frau Schoumow-Simanowski ihre Versuche angestellt hat, hatte in seinem Saft im Minimum  $0,428\%$ , im Maximum  $0,6\%$ , im Mittel  $0,53\%$  festen Rückstand. Ihr Versuchshund erhielt täglich 700 g Fleisch, 600 g Brod, 1 Liter Milch und 1 Liter Wasser. Unser 26 Kilo schwerer Hund erhielt täglich 1,2 Kilo Fleisch, 400 g Brod und 1 Liter Hafersuppe. Obgleich die Zufuhr an Wasser eine geringere war, ist bei unserem Hunde der Gehalt an festem Rückstand ein kleinerer. Dies hat seinen Grund darin, dass unser Hund verhältnissmässig weniger Kohlehydrate erhielt. Als wir das Verhältniss der Nahrungsstoffe in der Weise änderten, dass der Hund 500 g Fleisch, 600 g Brod und 1 Liter Hafersuppe erhielt, schwankte der Gehalt an festem Rückstand zwischen  $0,3—0,4\%$ , war also entschieden merklich höher als wie bei überwiegender Fleischnahrung.

Den geringsten Schwankungen, nicht allein bei diesem Hunde, sondern, wie wir dies auf Grund zahlreicher Bestimmungen des Magensaftes anderer Hunde sagen können, ist die Acidität des Magensaftes unterworfen. Beim schwankenden Gehalte an festem Rückstand, Eisen und Phosphorsäure ist der Gehalt an Salzsäure ein relativ constanter.

Im Mittel aus den acht Bestimmungen in frischem Magensaft ist der Phosphorgehalt desselben, auf festen Rückstand bezogen,  $= 0,41\%$  und der des Eisens  $= 0,42\%$ . Beide Zahlen sind aber bei demselben und gleich ernährten Hunde grossen Schwankungen unterworfen. Den höchsten Gehalt an diesen beiden Elementen fanden wir in frischem Magensaft, schon geringer in dem durch die Centrifuge abgeschiedenen und am geringsten in dem mit Alkohol gewaschenen Pepsin.

Ein Vergleich der drei Tabellen zeigt ferner noch folgende Eigenthümlichkeiten:

Wenn wir das Verhältniss von Phosphor zu Eisen, wie es im phosphorsauren Eisen ( $\text{PO}_4\text{Fe} = 31 : 56$ ) enthalten ist,

berücksichtigen (s. Tabelle Nr. I), so enthält der Magensaft erheblich mehr Phosphorsäure, als es zur Bindung sämtlichen Eisens erforderlich ist. Umgekehrt zeigt die Tabelle Nr. II, dass hier das Verhältniss von Phosphor zu Eisen fast ein äquivalentes ist. Wir fanden im Mittel auf 1 Theil Phosphor 1.6 Theile Fe, während das Aequivalent  $31 : 56 = 1 : 1,8$  ist. Freilich schwanken die einzelnen Bestimmungen, wie es bei so geringen Mengen dieser Elemente kaum anders zu erwarten war, in ziemlich weiten Grenzen. Die Tabelle Nr. III zeigt uns, dass durch Waschen mit Alkohol das Pepsin mit dem Lecithin fast die Hälfte des Phosphors verliert, der Verlust an Eisen aber ist nur ein geringer.

Der Vergleich der Tabellen I und II zeigt uns auch, dass ein erheblicher Theil des Eisens und der Phosphorsäure bei der Dialyse in das Aussenwasser übergeht. Von 0,42% sinkt der Eisengehalt auf 0,16% und der des Phosphors von 0,41% auf 0,10%.

Das anscheinend äquivalente Verhältniss von Phosphor zu Eisen, sowie der constante Chlorgehalt im Centrifugenniederschlag machten auf uns den Eindruck, dass wir ein chemisches Individuum vor uns haben. Wir haben daher auch die übrigen Elemente in dem in Tabelle II sub Nr. 4 angeführten Präparate bestimmt und erhielten folgende Zahlen:

0.5024 g im Porzellantiegel geglüht, hinterliessen 0,0029 g Asche = 0,57%

0.2522 g = 0,2508 g aschefreier Substanz gaben 0,4714 g  $\text{CO}_2$  und 0,1520 g  $\text{H}_2\text{O}$  = 51,26% C und 6,74% H.

0.2610 g gaben 19,8 ccm. N-Gas bei 759 mm. Barometerstand und 16,8° Temperatur über 30% KOH oder 14,33% N aschefrei berechnet.

0.7784 g gaben 0,0865 g  $\text{SO}_4\text{Ba}$  oder 1,5% S.

Diese Zahlen sind nur wenig abweichend von der von Frau Schoumow-Simanowski für das durch die Kälte oder durch Ammonsulfat abgeschiedene Pepsin, zumal wenn man berücksichtigt, dass sie ihre Analysen ohne Abzug der Asche berechnete. Der grösste Unterschied betrifft das Chlor, wovon wir in dem durch die Centrifuge abgeschiedenen Pepsin etwa nur halb so viel gefunden haben. Gross ist aber der Unterschied im Phosphorgehalte zwischen dem unsrigen und dem

von Pekelharing bereiteten Pepsin. Nach Pekelharing<sup>1)</sup> enthält sein Pepsin gegen 1% Phosphor. Wir fanden in unserem Pepsin nur den zehnten Theil davon.

Aus der Tabelle Nr. III geht hervor, dass durch Waschen mit Alkohol der Pepsinniederschlag erheblich viel an Chlor und Phosphor verloren hat. Nach langem Waschen mit Alkohol hat diese Substanz auch ihre Enzymeigenschaften verloren. Sie verdaut Eiweiss nicht, bringt Milch nicht zur Gerinnung und verwandelt die Albumosen nicht in Plasteine. Wird dagegen der Centrifugenniederschlag kurze Zeit und rasch mit Alkohol gewaschen, jedoch so, dass in dem mit Wasser verdünnten Filtrate Silbernitrat keine Trübung erzeugt, so löst sich der sofort vom Filter abgehobene Niederschlag in 0,5% HCl auf und ist in allen den drei Enzymrichtungen, wenn auch etwas schwächer als der nicht mit Alkohol gewaschene Centrifugenniederschlag, wirksam. Ihren Nucleoproteidcharakter hat die Substanz insofern behalten, als sie nach dem Waschen mit Alkohol, mit verdünnter Schwefelsäure gekocht, sowohl die Alloxurbasen, als auch die Pentosereactionen gibt.

Um zu erfahren, wieviel das durch die Centrifuge abgeschiedene Pepsin durch Waschen mit Alkohol am Gewichte verliert, haben wir 0,7741 g der bei 110° getrockneten Substanz im Extractionsapparate mit heissem Alkohol so lange behandelt, bis der letztere nichts mehr aufnahm. Die alkoholische Lösung wurde auf dem Wasserbade verdunstet und der Rückstand im Vacuo über  $\text{SO}_4\text{H}_2$  getrocknet. Sein Gewicht war = 0,0772 g oder 9,97%. In dem mit heissem Alkohol völlig erschöpften Pepsin wurde noch Chlor, Phosphor und Eisen bestimmt. Von den 2 ersten Elementen wurden nur minimale Mengen gefunden. Der Eisengehalt schien dagegen nicht vermindert zu sein. Wir fanden darin 0,10% Cl, 0,08% P und 0,185% Fe. vom Gewichte des trockenen, mit Alkohol extrahirten Pepsins.

Dass beim Waschen des Centrifugenniederschlages mit Alkohol eine darin lösliche phosphorhaltige Substanz ausgewaschen wird, hat schon Pekelharing angegeben, jedoch über ihre Natur nichts Näheres mitgetheilt. Nach unseren

<sup>1)</sup> l. c. S. 236.

Beobachtungen verbleibt nach Verdunsten des Alkohols eine wachsartige, amorphe Masse, die auf Platinblech wie Fett mit russender Flamme verbrennt und die in Aether, wenn auch weniger leicht, löslich ist. Der nach Verdunsten des Aethers hinterbliebene Rückstand, mit Kali geschmolzen, mit wenig Wasser aufgenommen und angesäuert, gibt mit Molybdänlösung den charakteristischen gelben Niederschlag von Phosphormolybdänsäure. In Wasser ist diese wachsartige Substanz nur theilweise löslich, theilweise schwimmen Oeltropfen darauf, die unter dem Mikroskope die bekannten für das Lecithin charakteristischen Myelinformen zeigen. Alles dies spricht dafür, dass das durch die Centrifuge abgeschiedene Pepsin Lecithin enthält, das schon durch Waschen mit Alkohol aus dem Pepsin entfernt wird. Leider war die Menge dieser lecithinartigen Substanz zu gering, um ausser den qualitativen Reactionen durch genauere Elementaranalysen ihre Zusammensetzung festzustellen. Wir hoffen in einiger Zeit die dafür nöthigen Quantitäten zu gewinnen und behalten uns weitere Mittheilungen darüber vor. Es sei nur bemerkt, dass die im Pepsin enthaltene Lecithinmenge, die nach der obigen Bestimmung circa 10% beträgt, in Wirklichkeit eine grössere sein muss. Wir haben bei der Dialyse des vollkommen klaren Magensaftes auch das Aussenwasser gesammelt und genauer untersucht. Dieses Aussenwasser wurde mit reiner Soda bis zu ganz schwach saurer Reaction neutralisirt, auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen verdunstet und qualitativ, zum Theil auch quantitativ auf die aus dem Saft in das Aussenwasser übergegangenen Bestandtheile geprüft. Wir haben auf diese Weise das Aussenwasser von über 10 Liter Magensaft verarbeitet und darin Stoffe nachgewiesen, die wir direkt im Saft nicht nachweisen konnten. So hat der eine von uns<sup>1</sup> schon früher beobachtet, dass der Magensaft Sulfoeyansäure enthält; öfters, jedoch nicht immer, war der Gehalt des Saftes an dieser Säure so gross, dass wenige Cubikcentimeter davon, mit einigen Tropfen Eisenchlorid versetzt, gelbrothe bis rothe

<sup>1</sup> Berl. chem. Ber., Bd. 28, Seite 1318.

Färbung zeigten. Andererseits haben wir im Magensaft anderer Hunde die Sulfoeyansäure auch dann vermisst, wenn wir 100 bis 300 ccm. des Saftes mit Natronlauge neutralisirten, auf dem Wasserbade zur Trockne verdunsteten, den Rückstand mit wenig Alkohol extrahirten und nach dem Ansäuern mit Eisenchlorid auf Sulfoeyansäure prüften. Es stimmt dies mit der kürzlich publicirten Mittheilung von Frouin<sup>1)</sup> überein, der selbst nach Verarbeitung von 500 ccm. Magensaft darin keine Sulfoeyansäure finden konnte. In dem Saft des Hundes, an dem wir jetzt die meisten Bestimmungen gemacht haben, war ebenfalls, selbst nach Verarbeitung von 300 ccm., keine Sulfoeyansäure nachweisbar; als wir aber 6 Liter des Saftes vom gleichen Hunde dialysirten, war in dem auf ein kleines Volumen eingeengten Aussenwasser Sulfoeyansäure mit Sicherheit vorhanden; denn alle darauf bezüglichen Reactionen fielen jetzt positiv aus. Bemerkenswerth ist es, dass der zweite bei unseren jetzigen Versuchen benutzte und gleich ernährte Hund in seinem Saft soviel Sulfoeyansäure hatte, dass eine Probe davon durch Eisenchlorid sofort röthlichgelb gefärbt wurde. Wir kommen daher zu dem Resultat, dass Sulfoeyansäure zwar ein constanter Bestandtheil des Magensaftes ist, jedoch öfters in so geringen Mengen darin vorkommt, dass trotz der empfindlichen Reagentien, die wir zum Nachweis der Sulfoeyansäure besitzen, manchmal grössere Mengen des Saftes zum Nachweis dieser Säure verarbeitet werden müssen.

Als wir nun das Aussenwasser von 10 Liter Magensaft auf circa 100 ccm. concentrirten und die Lösung mit HCl ansäuerten, schied sich gegen unsere Erwartung eine ölige Fettschicht ab, die beim Stehen in der Kälte halbfest wurde und unter dem Mikroskope ausser Oeltropfen auch Fettkrystalle, denn beides war in Aether löslich, enthielt. Die ganze Flüssigkeit wurde jetzt mit Aether ausgeschüttelt und der Aetherextract auf dem Wasserbade verdunstet. Es hinterblieb ein Rückstand von halbfestem Fett, das, mit Kali und Salpeter

<sup>1)</sup> Comp. rend. Soc. biol., Bd. 51, Seite 583–584 und Maly's Jahresh. f. 1899, S. 344.

geschmolzen, mit Ammoniummolybdat eine starke Reaction auf Phosphorsäure gab. Wir schliessen daraus, dass schon durch Waschen mit Wasser, resp. durch die Dialyse aus dem Pepsin ein Theil des Lecithins entfernt wird.

Ausser Sulfoeyansäure und Lecithin enthält das Aussenwasser, und zwar in relativ erheblicher Menge auch Eisen und Phosphorsäure. Wir haben beispielsweise das Aussenwasser von 1 Liter Magensaft gegen 10 Liter Wasser dialysirt, dann verdunstet und darin 0,0052 g P und 0,0036 g Fe gefunden. Ob diese beiden Elemente durch Dissociation aus dem Pepsinmolekül abgespalten würden oder nur in Form von Salzen im Magensaft enthalten waren, lässt sich nicht entscheiden. Uns ist die erste Annahme die wahrscheinlichere.

Alle die von uns gemachten Beobachtungen sprechen entschieden dafür, dass das als Enzym wirksame Pepsinmolekül ein sehr labiles und complex zusammengesetztes ist. Das Eiweissmolekül ist in diesem Nucleoproteid, abgesehen von Eisen, Phosphorsäure und Pentose, auch noch mit Lecithin und Chlor verbunden.

Was das Chlor betrifft, so haben wir schon oben gezeigt, dass die Gefrierpunktsbestimmung zu der Entscheidung der Frage, ob das Chlor im Magensaft nur als freie Salzsäure oder zum Theil an das Pepsin gebunden vorkommt, nichts beweisen kann. Wir haben aber gesehen, dass selbst nach völligem Auswaschen des Pepsins mit Alkohol, wo der Waschalkohol nicht die geringste Reaction zeigt, das Pepsin noch immer, zwar minimale Mengen, Chlor enthält, die aber viel zu gross sind, um sie auf Rechnung des etwa nicht ausgewaschenen Chloralkalis zu bringen. Ein analoges Verhalten können wir aus eigener Erfahrung mit einer viel beständigeren chlorhaltigen Verbindung — nämlich dem Hämin. — anführen.

Durch langes Waschen der Häminkrystalle mit kaltem Wasser wird ihr Chlorgehalt von 5,4% auf weniger wie 1% herabgedrückt. Das Chlor der Häminkrystalle ist nicht als Salzsäure darin enthalten, sondern sehr wahrscheinlich an Eisen gebunden. Werden die Häminkrystalle in Alkalien gelöst, so wird unter Bildung von Chloralkali das Chlor durch Hydroxyl

ersetzt. Das Hämin wird in Hämatin verwandelt. Aber selbst durch überschüssiges Alkali und langes Auswaschen ist die Verseifung nie eine absolut vollständige und das Hämatin enthält 0,1—0,4% Chlor.

In Bezug auf das Lecithin ist es bekanntlich F. Hoppe-Seyler, der zuerst die Vermuthung ausgesprochen hat, dass der phosphorhaltige Körper im Eidotter — das Vitellin — eine Verbindung mit Lecithin, ein Lecithalbumin sei. Später hat Leo Liebermann<sup>1)</sup> aus verschiedenen drüsigen Organen und speciell aus der Magenschleimhaut solche Lecithalbumine dargestellt und auf ihre Beziehung zu den Nucleinen hingewiesen. Liebermann constatirte, dass diese sauer reagirenden Lecithalbumine durch lange Behandlung mit Alkohol den grössten Theil des Lecithins, wenn auch nicht vollständig, verlieren. Offenbar hatte schon Liebermann die gleiche Substanz, allerdings in verändertem Zustande, in den Händen; die später Pekelharing aus der Magenschleimhaut und wir aus dem Magensaft durch Dialyse erhalten haben. Auf Grund seiner Untersuchungen ist H. J. Bing<sup>2)</sup> zu dem Resultate gekommen, dass das Jecorin von Drechsel eine additionelle Verbindung von Lecithin und Zucker sei. Solche molekulare Additionsprodukte wurden vom gleichen Autor von Lecithin mit den verschiedensten Substanzen, wie: Kochsalz, Natriumlactat, Morphin, Salicin u. s. w. dargestellt. Sie verhalten sich alle ähnlich wie das Jecorin, indem sie in Aether lösliche Verbindungen bilden, die durch Alkohol gefällt werden. Durch überschüssigen Alkohol werden sie wiederum ganz oder theilweise gelöst. Immer mehr bricht die Erkenntniss durch, dass in den organisirten Wesen das Vorkommen solcher unbeständiger, schon durch Wasser oder Alkohol leicht zersetzbarer Additionsverbindungen für die verschiedenen Zwecke des Stoffwechsels ein sehr verbreitetes ist.

Dass das Lecithin dem Pepsin nicht etwa mechanisch beigemischt ist, geht auch daraus hervor, dass der Saft im

1) Pflüger's Archiv, Bd. 50, S. 25—56 und Bd. 54, S. 573 f. und Maly's Jahresber. f. 1891, S. 240 und 167; 1892, S. 260; 1893, S. 32 und 239.

2) Skandin. Archiv f. Physiol., Bd. 9, S. 333; Bd. 11, S. 166.

Vacuo auf ein kleines Volumen concentrirt werden kann, wobei sich ebenso wie beim Abkühlen oder der Dialyse das wirksame, mit Lecithin verbundene Pepsin abscheidet. Bei hinreichender Entfernung der Salzsäure fällt also nicht etwa das Lecithin zuerst aus, sondern das mit dem Lecithin zu einem Ganzen verbundene Eiweissmolekül. Wird bei fortgesetzter Dialyse der Schlauchinhalt noch säureärmer gemacht, so geht der entstandene Niederschlag wieder als Ganzes in Lösung, ohne dass etwa das Lecithin von dem Eiweissmolekül sich abspaltet.

Bei objectiver Betrachtung können wir uns der Ansicht nicht verschliessen, dass das aus den Schleimhäuten verschiedener Thiere (Hund, Schwein, Pferd) von Pechelharng bereitete, sowie das durch die Abkühlung, durch die Dialyse oder durch das Aussalzen mit Ammonsulfat aus dem Magensaft erhaltene Pepsin den Eindruck einer einheitlichen Substanz macht und trotz der verschiedenen Darstellungsverfahren immer dasselbe Produkt, theilweise nur durch mehr oder weniger eingreifende Behandlung verändert, erhalten wird.

Wir kennen nun drei verschiedene Functionen des Magensaftes und zwar: 1. die peptonisirende oder eiweissverdauende Wirkung, 2. die Labwirkung und 3. die von Danilewski entdeckte und von seinen Schülern Okuneff, Lawrow und namentlich Sawjalow (vergl. Maly's Jahresber. für 1899, S. 55 u. 58) genauer untersuchte Wirkung des Saftes auf Albumosen, wodurch sie in unlösliche, dem geronnenen Eiweiss ähnliche Verbindungen übergeführt werden. Wenn auch die Labwirkung und die Plasteinbildung aus Albumosen analoge Erscheinungen sind und vielleicht durch dieselbe Enzymgruppe bewirkt werden, so ist doch die verdauende Wirkung des Pepsins eher eine entgegengesetzte der Casein- und Plasteinbildung. Da nun das durch die Kälte oder durch die Dialyse abgeschiedene Pepsin, wie wir auf Grund zahlreicher Versuche sagen können, sowohl Eiweiss verdaut als wie auch Milch zur Gerinnung bringt und Albumosen in Plasteine verwandelt, so müssten nach der herrschenden Ansicht über die specifische Wirkung der Enzyme, in diesem durch Dialyse abgeschiedenen Pepsin mindestens zwei, mög-

licher Weise auch drei verschiedene Enzyme enthalten sein. Nach unserer Meinung hat aber auch eine andere Vorstellung über die Natur der Enzyme ihre Berechtigung, sobald wir uns nur die Eigenschaften der so complex zusammengebauten Moleküle, denen wir bei physiologisch-chemischen Untersuchungen auf jedem Schritt begegnen, näher vergegenwärtigen. Diese andere Vorstellung ist nämlich die, dass ein und dasselbe Molekül verschiedenartige Enzymwirkungen haben kann.

Halten wir uns an die Maxwell'sche Definition einer Molekel, so wird darunter derjenige Stofftheil der Materie verstanden, der sich bei der Bewegung als ein Stück bewegt, wenn man bei der Bewegung den Mittelpunkt der Masse in Betracht zieht. Innerhalb der Molekel gibt es dann noch eine Bewegung der Constituenten in Bezug auf den Mittelpunkt. Nehmen wir ferner an, dass die Constituenten der Molekel Atome sind, aus welchen eben die Molekel besteht, und dass jedes Atom als Punkt sich bewegt, so muss jedes Atom in drei Richtungen des Raumes sich bewegen können und deshalb die Zahl der Variablen zur Bestimmung der Lage und Configuration der Atome schon dreimal grösser sein als wie die Atomzahl in der Molekel.

Vergegenwärtigen wir uns jetzt, dass die Molekel der complexeren Verbindungen aus einigen Hunderten und, wie bei Eiweisskörpern, aus mehreren Tausenden von Atomen bestehen, von denen wir wissen, dass sie bei der Einwirkung schon der gelindesten Reagentien, wie Wasser, verdünnte Säuren u. s. w. in mehrere, relativ noch sehr complexe Molekel zerfallen, so kommen wir zu dem Schlusse, dass in einer Riesenmolekel, die aus Eiweiss, Lecithin, Pentose, Phosphorsäure, Chlor u. s. w. besteht, die Bewegungen der einzelnen Atome einerseits so bestimmt werden, als ob sie aus den einzelnen Gruppen, nämlich des Eiweisses, des Lecithins, der Pentose u. s. w. beständen und wiederum andererseits die Bewegungen der Lecithinmolekel, der Pentosenmolekel u. s. w. muss in einer bestimmten Weise beeinflusst werden, damit der Charakter der aus ihnen bestehenden Riesenmolekel als Ganzes gewahrt bleibe.

Wir haben dafür ein vorzügliches Beispiel im Häm-

globin, das zu 94% aus Globin und zu etwa 6% aus einem farbigen Complex — dem Hämochromogen — besteht. Das Hämochromogen geht sofort an der Luft in das inerte, relativ wenig veränderliche Hämatin über. Durch die lockere Verbindung mit Globin erhält das Hämochromogen ganz andere Eigenschaften: es oxydirt sich an der Luft langsamer, indem es in Oxyhämoglobin übergeht, welches letztere sehr leicht den Sauerstoff abgibt und wiederum zu Hämoglobin wird. Die Spannung und die Bewegung der Atome in einer solchen Riesenmolekel werden in bestimmter Weise modificirt und den Zwecken der Organismen angepasst.

In einer solchen Riesenmolekel hätten wir dann ausser dem Hauptmittelpunkte noch Centra 2., 3., 4. u. s. w. Ordnung, die für die Bewegungen der einzelnen Atome massgebend sind und die wir füglich als Seitenmolekel mit eigenen Mittelpunkten bezeichnen können. Da das Riesenmolekel des Pepsins beim Aufkochen des Magensaftes in Nucleoproteid, Albumose, Lecithin und Salzsäure zerfällt, so würden alle die genannten Verbindungen als Seitenmolekel oder Theilmolekel 1. Ordnung aufzufassen sein. Das Nucleoproteid zerfällt ferner mit Säuren gekocht in Eiweiss, Pentose und Alloxurbasen: das Lecithin in Fettsäuren, Glycerin, Phosphorsäure und Neurin. Die jetzt erhaltenen Spaltungsprodukte würden Theilmolekel 2. Ordnung sein u. s. w.

Das Bedürfniss nach einer solchen Auffassung der hoch-complexen Molekel zur Erklärung physiologisch-chemischer Vorgänge hat offenbar Ehrlich zur Aufstellung seiner Seitenkettentheorie veranlasst. — In einer Riesenmolekel werden die Theilmolekel verschiedener Ordnung verschiedene Configurationen haben und kann daher eine und dieselbe Molekel anscheinend ganz verschiedene Functionen verrichten. Wissen wir doch von den einfachsten Aminosäuren, dass sie einerseits wie Basen, andererseits wie Säuren sich verhalten. Die Auffassung ist daher durchaus correct, dass die gleiche Riesenmolekel vermöge einer von ihren Seitenmolekeln auf Eiweiss hydrolysirende Wirkung hat, während sie vermöge einer anderen ebenfalls in ihr vorhandenen Theilmolekel die Lab-

wirkung hervorruft. Wir wollen mit dieser Erklärung nicht sagen, dass es nicht Enzyme gibt, die als ganze Molekel nur eine einzige, ihnen spezifische Enzymwirkung ausüben. Zwischen solchen einfachsten Enzymen und dem sogenannten lebendigen Protoplasma, das als ein einziges Riesenmolekül die verschiedenartigen Enzymwirkungen ausübt, würden die Molekel mit mehrfacher Enzymwirkung in der Mitte stehen.

Zu dieser Kategorie von Enzymen würde also auch das Pepsinmolekül gehören. Speciell was das eiweisslösende Theilmolekül des Pepsinmoleküls betrifft, sind wir der Ansicht, dass in ihm das Chlor enthalten ist. Dafür spricht der Umstand, dass auch durch ganz verdünnte Alkalien die eiweisslösende Wirkung des Pepsins sofort vernichtet wird. Es erinnert diese Erscheinung lebhaft an die Umwandlung des Hämins in Hämatin. Schon durch ganz verdünnte Alkalien wird das Chlor durch Hydroxyl ersetzt und das sehr reactionsfähige Hämin, das z. B. schon durch 1%ige Salzsäure ätherificirt wird, geht in das beständige, inerte Hämatin über.

Durch Neutralisation mit Alkali wird im Pepsin die Labgruppe nicht zerstört. Wie bekannt, ist das Labferment selbst bei alkalischer Reaction wirksam. Ebenso wird nicht allein durch den sauren, sondern auch durch den schwach alkalisch gemachten Magensaft und durch die käuflichen Labpräparate das Danilewskische Plastein aus den Albumosen gebildet. Ob die Caseingerinnung und die Plasteinbildung auf gleichem chemischen Prozesse beruhen, resp. durch die gleiche Enzymmolekel hervorgerufen werden, ist noch eine offene Frage. Jedenfalls ist Sawjalow im Irrthum, wenn er behauptet, dass durch das Labferment aus den Albumosen verschiedener Abstammung ein und dasselbe Plastein entsteht. Der Vorgang der Plasteinbildung erfordert noch eine viel genauere Untersuchung, zumal im günstigsten Falle nur etwa der vierte Theil der Albumose in Plastein verwandelt wird. So erhielt Sawjalow *ceteris paribus* aus Protalbumose 10,09%, aus Heteroalbumose 26,59%, aus Deuteroalbumose 2,85%, aus Amphopepton 0,92% und aus Antipepton 0,0% Plastein. (S. 137 seiner Dissertation, russisch.)

Da die käuflichen Pepsinpräparate mehr oder weniger verändertes Pepsin enthalten, so sind sie, wie auch zu erwarten war, bezüglich der dreifachen Enzymwirkung nicht gleich. Wir haben in dieser Hinsicht das Pepsin Witte, das Pepsin von Jensen & Langebek-Petersen in Kopenhagen und ein von der chemisch-technischen Fabrik Waldemar Mayer's Wwe. & Sohn in Rewal bezogenes flüssiges Labferment untersucht. Die beiden ersten Präparate sind trockene Pulver, das Witte'sche stark zuckerhaltig und ihre wässerigen Lösungen reagiren schwach sauer. Das Rewal'sche Labferment reagirt alkalisch.

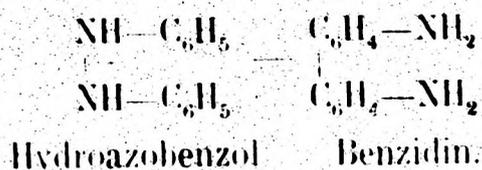
Die zwei ersten pulverigen Präparate hatten die dreifache Enzymwirkung des Pepsins in verschiedenem Grade. Am stärksten war die verdauende Wirkung beim Pepsin Witte, während das Pepsin Jensen-Langebek die stärkste Labwirkung zeigte. Dagegen war hier die Plasteinwirkung sehr gering. Das alkalische flüssige Labferment verdaute Eiweiss nicht. 1 cem. davon coagulirte 10 cem. brutwarmer Milch innerhalb 2 Minuten und bildete relativ die grösste Menge Plastein aus Danilewski's Albumose. Zu einer 10<sup>o</sup> wigen brutwarmen Lösung des letzteren zugesetzt, erzeugte das Rewal'sche Präparat sofort darin eine Trübung und nach einer halben Stunde war schon die ganze Menge des Plasteins als dicker Bodensatz abgeschieden.

Hier ist noch ein Umstand zu berücksichtigen. — Es ist möglich und sogar wahrscheinlich, dass in den Extracten der Magenschleimhaut und auch im natürlichen Magensaft die Enzymgruppen nicht alle im activen Zustande sich befinden. Es bedarf einer kleinen Atomverschiebung in der Seitenmolekel, deren Natur uns bis jetzt unbekannt ist, damit das Zymogen zu Zymase wird.

Es ist leicht begreiflich, dass eine so hoch complexe Molekel, wie die des Pepsins aus verschiedenen Theilmolekeln bestehend, nicht die gleiche Cohäsionskraft wie eine einfache nur aus mehreren Atomen bestehende Molekel haben kann. An den letzteren wurden die Grundgesetze der Lehre von Atomen und Molekülen ermittelt. Die hoch zusammengesetzten

Moleküle, obgleich sie nach gleichen Grundgesetzen aufgebaut sind, können nicht ohne Zersetzung allen den physikalischen Veränderungen wie die einfachen Moleküle unterworfen werden.

Wir können z. B. Eiweiss nicht in den flüssigen, geschweige in den gasförmigen Zustand überführen. Andererseits muss eine so hoch complicirte Molekel die grösste Mannigfaltigkeit und Verschiedenheit gegenüber den chemischen, thermischen, elektrischen und auch mechanischen Agentien haben. Wir wissen, dass die meisten Eiweissstoffe nicht die Temperatur von über 60°, die Einwirkung der verdünnten Säuren, Alkalien, der Metallsalze, des Alkohols u. s. w. vertragen, ohne dabei molekulare Veränderungen zu erleiden. Die Gerinnung der Eiweissstoffe durch die Hitze beruht jedenfalls auf einer solchen Atomverschiebung aus einem labilen in einen mehr stabilen Zustand. Dabei erleidet wohl selten das ganze Riesenmolekül eine Polymerisation in dem Sinne, wie dies z. B. beim Uebergang der Cyansäure in die Cyanursäure der Fall ist, sondern es findet meistens die Atomverschiebung in einer Theilmolekel zu einer stabileren Form statt, ähnlich wie dies z. B. der Fall ist beim Uebergang des wenig beständigen Moleküls des Hydroazobenzols in die mehr stabile des Benzidins.



Ein solches Riesenmolekül mit verschiedenen Zymasemolekeln ist nach unserem Dafürhalten auch der wirksame Stoff des Hefepresssaftes. Ausser der von Buchner constatirten Bildung von Kohlensäure und Alkohol ist darin nach Cremer<sup>1)</sup> auch ein glycogenbildendes und nach Martin Hahn<sup>2)</sup> ein proteolytisches Enzym enthalten.

Unter den von Thier- und Pflanzenkörpern abgesonderten Enzymen gehört der Magensaft zu denjenigen, die am wenigsten fremde Beimischungen enthalten. Es ist ein Secret ad hoc, das einerseits das Eiweiss der Nahrung lösen und andererseits

1) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 32, S. 2062—2064.

2) Maly's Jahresber. f. 1899, S. 935.

mittelst des Labenzym in eine für den Organismus nöthige Form überführen soll. Die genauere Untersuchung dieses Secretes hat gezeigt, dass das wirksame Princip darin ein höchst complicirter, aus Eiweissstoffen, Lecithin und Pentose zusammengesetzter Körper ist, der ausserdem in seinem Molekül Chlor, Phosphorsäure und Eisen enthält. Die Untersuchung dieser Substanz hat aber ferner ergeben, dass die der organischen Chemie entlehnten Reinigungs- und Trennungsmethoden, wie das Waschen mit Wasser, Alkohol u. s. w., zersetzend auf diese Substanzen einwirken. Wir ersen hieraus, wie illusorisch die Hoffnung ist, mittelst der bisherigen Isolirungs- und Trennungsmethoden chemisch reine Enzyme darzustellen. Um diesen Zweck zu erreichen, müssen erst neue, viel weniger eingreifende Untersuchungsmethoden gefunden werden.

Zum Schlusse möchten wir noch eine Thatsache bezüglich der Eiweissnatur der Enzyme hervorheben, die übrigens schon von Pekkelharing in richtiger Weise beleuchtet wurde. Wiederholt wurde angegeben, dass durch Pepsinlösungen, die nicht die geringste Eiweissreaction zeigen, Eiweissstoffe doch verdaut werden. Ohne behaupten zu wollen, dass jedes Enzym nothwendig eine Proteinsubstanz sein muss, zweifeln wir nicht daran, dass das Pepsin ein complicirt zusammengesetzter Eiweisskörper ist: nur ist der, sozusagen, physiologische Nachweis der Enzyme ein viel empfindlicherer als wie die eigentlichen chemischen Eiweissreagentien. Nach den Bestimmungen von F. Hofmeister<sup>1)</sup> ist die Biuretreaction die mindestempfindliche. In einer alkalisch gemachten Lösung von 1:2000 gab vorsichtiger Zusatz von Kupfersulfat noch röthliche Färbung, in einer Lösung von 1:10000 nicht mehr. Zusatz von concentrirter Salpetersäure, sowie Kochen der mit concentrirter Kochsalzlösung und Essigsäure versetzten Flüssigkeit ergab bei 20000facher Verdünnung noch eine deutliche Trübung. Bei derselben Concentration fiel auch die Millon'sche Probe noch positiv aus, nicht aber in den

---

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. II, S. 291.

verdünnteren Proben. Ferrocyankalium und Essigsäure brachten noch in 50000facher Verdünnung deutliche Trübung hervor, nicht mehr deutlich aber bei 100000facher Verdünnung. Von den weniger für Eiweiss und mehr für Alkaloide charakteristischen Reagentien ergaben Tannin, Phosphorwolframsäure, Jodquecksilberkalium und Jodwismuthkalium noch in sauren Lösungen 1:100000 merkliche Trübungen. Pektinring gibt aber an, dass einige Hundertstel eines Milligramms, ja selbst  $\frac{1}{1000}$  mg von seinem Pepsin in einigen Stunden eine Fibrinflocke auflösten.

In unseren Versuchen verdauten Lösungen, die in 10 cem. halbprocentiger HCl 0,05 g des Magensaftes enthielten, Fibrin in einigen Stunden, und ihre Verdauungskraft für geronnenes Eiweiss, nach Motte bestimmt, war gleich 1,2 mm. In 1000 g des Saftes sind ca. 3 g festen Rückstands enthalten. Nehmen wir an, dass der ganze feste Rückstand nur aus Pepsin besteht, so waren in 1 cem. der Lösung nur 0,000015 g Pepsin enthalten. Eine Menge, die noch durch die Alkaloidreagentien, nicht aber durch die gewöhnlichen Eiweissreagentien nachweisbar ist. In der That verhielt sich unsere Lösung gegenüber den Eiweissreagentien und selbst gegen Jodquecksilber- und Jodwismuthkalium negativ.

Herr Dr. Dzierzowski, der gerade zu gleicher Zeit mit der Untersuchung der pflanzlichen Enzyme in unserem Institute beschäftigt war, überbrachte uns ca. 100 cem. des frischen, vollkommen klaren Saftes von *Nepenthes*, hauptsächlich von *Nepenthes messteriana* herrührend. Dieser Saft, von schwach saurer Reaction, der innerhalb einer Viertelstunde bei Bruttetemperatur Fibrin vollkommen auflöste, gab mit den oben citirten Eiweissreagentien nicht die geringste Trübung resp. Färbung. Als Herr Dzierzowski aber diesen Saft im Vacuum bei 30° verdunstete, gab der auf einige Cubikcentimeter eingeengte Rückstand sowohl mit Salpetersäure, wie mit Essigsäure und Ferrocyankalium deutliche Trübung und wurde mit Millon's Reagens bei gelindem Erwärmen roth angefärbt.

Einen schlagenden Beweis dafür, dass der physiologische

Nachweis dieser labilen Proteine unvergleichlich empfindlicher als der chemische ist, haben wir in den Antitoxinen, welche allen bisherigen Untersuchungen zufolge den Enzymen sehr nahe stehen und ebenfalls zu den labilen, complexen Eiweissstoffen gehören.

1 cem. des hochwerthigen, antidiphtheritischen Serums enthält 400—800 Antitoxineinheiten — im Mittel 600 Einheiten — . In 0,00166 cem. ist also eine Heileinheit enthalten. 100 g Serum enthalten durchschnittlich 6 g Eiweisskörper. 1 cem. des 600 fach verdünnten Serums enthält demnach 0,0001 g Eiweiss.

Das Diphtherieantitoxin ist in dem Globulinniederschlage des Serums enthalten. Nehmen wir an, dass der zehnte Theil des Serum-eiweisses aus Antitoxin besteht, was sicher viel zu hoch gegriffen ist, so würde 1 cem. des 600 fach verdünnten Serums etwa 0,00001 g Antitoxin enthalten. Als Einheit des Antitoxins gilt die 10 fache Heildose, resp. eine einfache Heildose ist in 0,1 cem. enthalten. Ein millionstel Gramm-Eiweiss kann also durch Heilung eines durch sicher tödtliche Diphtherietoxindose infectirten Meerschweins physiologisch nachgewiesen werden. Durch chemische Reagentien ist dies nicht möglich.

Von ähnlichen, wie den oben auseinandergesetzten, Anschauungen ausgehend haben wir eine Untersuchung des pankreatischen Saftes unternommen. Wir können schon jetzt mittheilen, dass aus dem klaren, nach Pawlow's Methode gewonnenen Saft wir in den Alkoholätherextracten Lecithin nachgewiesen haben. Ob es uns gelingen wird, die verschiedenen pankreatischen Enzyme getrennt zu isoliren, oder ob hier analoge Verhältnisse wie beim Magensaft sich herausstellen werden, das ist die Hauptaufgabe, deren Lösung wir anstreben.