

# Beiträge zur Kenntnis der Trypsinwirkung.

Von  
Dr. Karl Mays.

(Aus dem physiologischen Institut in Heidelberg.)  
(Der Redaktion zugegangen am 23. April 1903.)

## Inhalt:

Einleitung.

Herstellung von Pankreasextrakten und deren Verhalten.

Versuche zur Isolierung von «Trypsinpräparaten».

Lösungs- und Zersetzungsprodukte, die mit diesen Präparaten erzielt werden, und Vergleich mit den ursprünglichen Extrakten.

Einfluß von Wärme und Salzen auf die pankreatische Verdauung.

Schlußbemerkungen.

Wenn man die Pankreasverdauung für Spaltungsversuche an bestimmten Eiweißkörpern wissenschaftlich verwerten will, sind einfache Extrakte der Drüsen nicht geeignet, weil in solchen so viele Lösungs- und Zersetzungsprodukte sich finden, daß die den zu untersuchenden Eiweißkörpern zukommenden Produkte dadurch verdeckt werden.

Man muß also bestrebt sein, ein möglichst reines und gut wirkendes «Trypsinpräparat» zu isolieren.

Kühne<sup>1)</sup> hat ein solches herzustellen gemeint, das er als reines Trypsin bezeichnen zu dürfen glaubte, weil an ihm jede Selbstverdauung fehlte. Er hat das Präparat sehr wirksam gefunden, indem er von ihm sagt, daß es Fibrin beim Erwärmen fast momentan löse. Er hat aber nicht erwähnt, wieviel er von dem Präparat angewendete, um diese Wirkung

<sup>1)</sup> Verhandl. des naturhist.-med. Vereins zu Heidelberg. N. F. I. 1877, S. 194.

zu erzielen: man sieht also daraus nicht, wie sich das Präparat, mit dem Ausgangsmaterial quantitativ verglichen, verhielt.

Aber auch von den späteren Untersuchern, die reinere Enzymlösungen darzustellen bemüht waren, ist dieser Punkt nicht berücksichtigt worden.

Ich muß hier zunächst einiges Allgemeine über die Wirksamkeit von Pankreasextrakten anführen.

Kühne war in der Lage, bei seinen ersten Versuchen mit einem — ich glaube sagen zu dürfen — ausnahmsweise guten Material zu arbeiten. Er bediente sich dazu eines nach seinem Vorschlage hergestellten Ausgangsmaterials, nämlich Rinderpankreas, das zerkleinert und durch Alkohol- und Ätherbehandlung getrocknet war. Von der daraus nach seinen Angaben bereiteten Lösung sagt er,<sup>1)</sup> «sie muß eine vorher erwärmte Fibrinflocke in weniger als einer Minute zum Zerfall bringen und dieselbe in 5 Minuten zu einem dünnen Brei auflösen». Noch bessere Resultate hat Ewald mit einem solchen Infus zu verzeichnen. Er sagt von demselben:<sup>2)</sup> «Die Fibrinflocke zeigte schon nach einer Minute deutlich den Beginn des Zerfalls, war nach 2 Minuten schon in einzelne kleine Bröckel zerfallen; nach 3 Minuten waren nur noch Spuren vorhanden».

Die Lösungsfähigkeit von Pankreasinfusen für Eiweißkörper gibt uns zunächst ein Maß an die Hand für deren Wirksamkeit. Ob wir dadurch ein vollständiges Bild der Wirksamkeit des oder der pankreatischen Enzyme erhalten, ist fraglich; denn da in neuerer Zeit so viele Enzyme im Tierkörper gefunden worden, ist es nicht ausgeschlossen, daß auch im Pankreas mehrere Enzyme stecken, von denen vielleicht eines nur die Lösung der Eiweißkörper, andere deren Spaltung bewirken. Aber wir wissen das nicht, und ich habe bis jetzt für die Annahme mehrerer Enzyme keinen triftigen Grund gefunden, und so bleibt vor der Hand die Lösungsfähigkeit der Pankreasextrakte ein Maßstab für deren Wirkung. Sie ist

1) Unters. aus dem physiol. Institut der Universität Heidelberg, Bd. 1, 1878, S. 222.

2) Zeitschr. f. Biologie N. F., VIII, 1890, S. 1.

für größere Versuchsreihen auch bei weitem das Bequemste, da sie sofort sich dem Augenschein dokumentiert, während zur Untersuchung der Zersetzungsprodukte komplizierte und lange Zeit in Anspruch nehmende, chemische Methoden erforderlich sind. Die Untersuchung der Lösungsfähigkeit ist für eine erste Orientierung jedenfalls unerlässlich.

Aus einem ähnlichen Grunde müssen wir für solche Versuche zum Fibrin greifen. Allerdings wird sich für genauere Versuche die Mettsche Methode der Lösung kleiner Eiweißzylinder von koaguliertem Eiereiweiß mehr empfehlen; aber die Raschheit der Lösung von rohem Fibrin macht dies Material unentbehrlich. Das Fibrin ist allerdings nicht von ganz gleicher Löslichkeit. Einmal hängt diese von der Konsistenz des Fibrins ab. Man kann an diesem Material leicht lockere und derbere, mehr strangförmige Flocken unterscheiden; vielleicht bestehen auch Unterschiede je nach dem Blute, dem das Fibrin entstammt; wenn man aber darauf sieht, Fibrin einer Konsistenz und einer Provenienz anzuwenden, wenn man zu Kontrollversuchen ein und dieselbe Flocke in zwei Teile teilt, oder die rasch gemachten Versuche wiederholt, wird man keinen großen Täuschungen unterworfen sein.

Ich erwähnte vorhin, daß Kühnes erstes Arbeitsmaterial ein besonders vorzügliches war; denn ich weiß aus seinem Laboratorium, daß es später nie mehr gelang, ganz so gut wirksames Trockenpankreas zu erhalten, obwohl zu dessen Darstellung ganz die gleiche Methode angewandt wurde. Daraus erhellt eine individuelle Verschiedenheit der Pankreasdrüsen.

So schiebt es auch Maly<sup>1)</sup> auf zufällig ungünstiges Material, daß er, bei gleicher Darstellung von Trypsin wie Kühne, zu einem unwirksamen Präparat gelangte.

Da ein im hiesigen physiologischen Institut noch aus Kühnes Zeit stammendes Trockenpankreaspräparat in der Tat nicht mehr jene so außerordentlich rasch wirkenden Infuse lieferte, wie frühere, wollte ich aus frischem Pankreas gut

<sup>1)</sup> Hermann, Handbuch d. Physiologie, Bd. V, 2, S. 194.

wirkende Lösungen zu erhalten suchen. Kühne<sup>1)</sup> hat eine einfachere Art der Trypsindarstellung angegeben, die nach seiner Ansicht zwar kein reines Enzym lieferte, wohl aber ein solches, das in so geringem Grade mit Verunreinigungen behaftet war, daß letztere nicht schädeten. Die frischen Drüsen werden zu diesem Zweck mit desinfizierenden Mitteln, der Hauptsache nach mit Wasser, dem etwas Alkohol, Äther und Salicylsäure, die als Säure zu schwach ist, um einen schädlichen Einfluß auf das Enzym zu üben, dagegen etwa vorhandenes Zymogen zu spalten instande ist, zugesetzt wurden, bei 40° C. digeriert, bis das Gemisch ausgedaut ist, das heißt, bis nur noch Peptone und krystallinische Zersetzungsprodukte in Lösung sind. Die Darstellung des Trypsins beruht dann auf Aussalzen mit Ammonsulfat, das nach Kühne Trypsin vollständig ausfällt, und Reinigung dieses Niederschlages von den oben erwähnten Zersetzungsprodukten durch Auswaschen mit konzentrierter Ammonsulfatlösung. Kühne gibt an, daß er auf diese Weise sehr gut wirksame Enzymlösungen erhielt, wenn er auch zugeibt, daß sie nicht ganz so gut wirkten, wie jene, die aus Trockenpankreas dargestellt waren.

Ich schritt also zu der Darstellung von Infusen aus frischem Pankreas nach Kühnes Angaben, war aber bei mehreren Versuchen erstaunt, schlecht oder doch nur mäßig wirkende Auszüge zu erhalten.

Dagegen wirkte ein Gemisch, das über Nacht nicht im Brutofen, sondern nur bei Zimmertemperatur gestanden hatte, sehr gut. Ganz kurz, nachdem ich diese Beobachtung gemacht hatte, erschien die Arbeit von Vernon,<sup>2)</sup> der darauf aufmerksam machte, daß Pankreasinfuse in ihrer Wirksamkeit bei Temperaturen, die ungefähr der des Körpers entsprechen, rasch beeinträchtigt werden, was übrigens, wie Vernon richtig hervorhebt, schon Heidenhain angegeben hat.

Ich habe mich bald überzeugt, daß dies nicht nur bei der von mir eben erwähnten gelegentlichen Beobachtung der

<sup>1)</sup> Verh. d. naturhist.-med. Vereins zu Heidelberg, N. F., Bd. 3, S. 463. 1886

<sup>2)</sup> M. Vernon, Journ. of Physiol. XXVI, 1901.

Fall war, sondern daß Vernon in der Tat Recht hat, daß es eine allgemeine Erscheinung ist, daß Pankreasinfuse bei diesen Temperaturen bald weniger wirksam werden.

Da dies der Fall ist, so kann Kühnes sehr wirksames Trypsinpräparat entweder nur auf so ausnahmsweise gutem Material beruhen, daß ein gewisser Grad von geringerer Wirksamkeit durch die Behandlung bei 40° C. sich nicht dokumentierte, oder es gibt Ausnahmen von jener Regel der Schädigung bei 40° C, oder endlich beruhte die vorzügliche Wirksamkeit von Kühnes Trypsin darauf, daß er es in konzentrierteren Lösungen untersuchte, als dem Ausgangsinfus entsprachen.

Kühne hat diese leicht eintretende Schädigung des Enzyms des Pankreas nicht gekannt. Er hielt es nach seinen anfänglichen Versuchen für sehr resistent. Er gibt nur einmal an,<sup>1)</sup> daß bei fortgesetzter Stopfung von Trypsinlösungen mit Fibrin ein Punkt komme, wo die Wirkung so verlangsamt sei, daß daran zu denken wäre, ob das Enzym bei seiner Tätigkeit durch diese nicht etwa an Wirkung abnehme. Da er es aber unter normalen Verhältnissen für sehr resistent hielt, hatte er ein Recht, sein weiter nicht mehr veränderliches Präparat als das reine Enzym anzusehen. Kühne gibt bei dieser Darstellung des Enzyms nicht an, ob er dabei am Ende des Versuchs die Wirksamkeit seiner Lösung nochmals geprüft habe, und so wird dieser Versuch mindestens nicht eindeutig, da daran, daß der Körper nicht mehr verändert wurde, die uns jetzt bekannte Schädigung des Trypsins schuld sein konnte.

Ich gebe nun meine Erfahrungen bei der Herstellung der Pankreasextrakte aus frischen Drüsen, zunächst in der Wärme und dann bei Zimmertemperatur, und wie sich die letzteren beim Stehen mit der Zeit verändern.

#### **Herstellung der Pankreasextrakte.**

Ich habe hier die Bemerkung vorausszuschicken, daß ich bei der Herstellung von Extrakten aus frischen Drüsen im

<sup>1)</sup> Verhandl. des Heidelb. naturhist.-med. Vereins, N. S., I. 3, S. 9

Anfange sehr mit Fäulnis zu kämpfen hatte. Salicylsäure, Thymol, Chloroform, alle diese Mittel verhinderten nicht, daß sehr häufig Fäulnis eintrat. Kühne hat für seine Extraktion von frischem Pankreas besondere Desinfektionsgemische angegeben, die Salicylsäure, Thymol, Alkohol und Äther zugleich enthalten: aber auch bei genauem Einhalten seiner Vorschriften trat leicht Fäulnis ein. Es ist deshalb sehr erfreulich, daß man in neuerer Zeit im Toluol ein Desinfektionsmittel gefunden hat, das die Fäulnis so gut wie gänzlich ausschließt. Es ist mir nur einmal begegnet, daß ein damit versetztes Gemisch faulte, wohl nur, weil es mit dem Toluol nicht gut durchgeschüttelt war, was unerlässlich ist.

Da die Bakterien eine andere Zersetzung des Eiweißes bedingen als das Trypsin, muß man sich sehr vor ihnen hüten. Ihre Wirkung ist ja im allgemeinen leicht an dem üblen Geruch zu erkennen; es sind mir aber auch Fälle vorgekommen, wo derselbe fehlte und sich die Anwesenheit von Bakterien nur durch Gasentwicklung dokumentierte und dann auch durch die mikroskopische Untersuchung bestätigt wurde. Ferner kommt es vor, daß zu einer gewissen Zeit deutlich übelriechende Gemische durch Zusatz weiterer Desinfizientien wieder ganz geruchlos wurden und dann im Filtrate Bakterien sogar nicht mehr mikroskopisch nachweisbar waren. Solche Lösungen sind zu verwerfen, wenn man die Zersetzungsprodukte studieren will, die durch das Trypsin bedingt sind; in bezug auf die Lösung von Fibrin haben mir solche Gemische, die zufällig in zwei Teile geteilt waren, von denen der eine Fäulniserscheinungen zeigte, der andere nicht, keinen Unterschied ergeben.

Die Drüsen vom Schlachthofe aseptisch zu erhalten, dürfte übrigens wohl kaum möglich sein, da an der Oberfläche immer einige Verunreinigungen zu finden sind: wenn solche Drüsen aber dann mit Toluolwasser angesetzt werden und sich im Verlauf des Versuchs gar keine Erscheinungen zeigen, die auf die Wirkung von Bakterien deuten, so darf man wohl annehmen, daß diese zu einer Zeit getötet wurden, wo sie noch keinen bemerkbaren Einfluß ausüben konnten.

Ferner habe ich noch einige technische Bemerkungen voranzuschicken.

Die Drüsen wurden stets sorgfältig von Fett und möglichst von Bindegewebe befreit und in einer Fleischhackmaschine sehr gut zerkleinert.

Die Filtration geschah in der Weise, daß die Extrakte zuerst durch ein Haarsieb von den ungelösten gröberen Stücken getrennt wurden; so erhält man einen Schlamm, den man durch Papier filtrieren kann. Das Filtrat ist anfänglich oft getrübt, läuft aber in der Regel bald klar. Die Filtration geht langsam, aber stetig von statten. Zur Filtration von 2—3 Liter Extrakt sind 3—4 Tage erforderlich. Dabei muß natürlich immer auf genügende, öfters erneute Desinfektion gesehen werden. Bei Toluol genügt der Aufguß einiger Kubikcentimeter. Wo die Wirkung der Extrakte angegeben ist, ist immer die von ca. 5 ccm im Reagenrohr (vorgewärmt) auf eine Flocke rohen Fibrins im Wasserbad von 40° C. zu verstehen. Bei der Vergleichung von 2 Proben ist am meisten auf den Beginn des Zerfalls des Fibrins Wert zu legen, da auch bei gut wirkenden Lösungen die letzten kleinen Partikel lange Widerstand leisten, namentlich sind minimale Reste so gut wie vollkommene Lösung, da im Fibrin oft kleine Verunreinigungen vorkommen, die minimale Fibrinreste vortäuschen können.

Ich gebrauche in folgendem häufig P.=Pankreas: P.-E.=Pankreasextrakt.

Für die Beschreibung der Lösung des Fibrins habe ich mir eine Skala gemacht, die den Verlauf des Prozesses schrittweise zu verfolgen gestattet und die ich in folgenden Abkürzungen anwende:

- ? = fragliche Wirkung.
- Sp. Z. = Spuren von Zerfall.
- bg. Z. = beginnender
- deutl. Z. = deutlicher
- st. Z. = starker
- mäß. R. = mäßige Reste.
- kl. R. = kleine

ger. R. = geringe Reste

min. R. = minimale

Sämtliche von mir verarbeiteten Drüsen stammten, wenn nichts anderes bemerkt ist, vom Rinde.

Ich beschreibe nun die Herstellung von Pankreas-extrakten:

#### A. In der Wärme.

Ich übergehe einige Versuche, bei denen Fäulnis eingetreten war, und beginne mit:

##### 1. Pankreasextrakt vom 8. Mai 1901.

Angesetzt: 736 g P. 700 cem Salicylsäure 0.2%, 15 cem Thymol (20% ige alkoholische Lösung), 5 cem Äther. Digestion in einem Wasserbade von 40° C.

Am andern Tag fanden sich keine Organismen. Eine Fibrinflocke zeigte erst nach 1 Stunde deutlichen Zerfall.

##### 2. Pankreasextrakt vom 21. Mai 1901.

Die Drüsen wurden mit Thymolwasser gewaschen, welches dann deutlich alkalisch reagierte. Über Nacht blieben sie bei Zimmertemperatur liegen. Die geringe Menge Flüssigkeit, die sich angesammelt hatte, schien nun sauer zu reagieren, soweit dies bei dem reichen Hämoglobingehalt festzustellen war. Eine filtrierte Probe derselben löste eine Fibrinflocke in 20 Minuten nahezu auf.

Am folgenden Tage wurden die Drüsen zerkleinert = 1293 g und mit 1200 cem Wasser, 12 g Thymol, 6 g Salicylsäure, 40 cem Alkohol und 10 cem Äther in den Brutschrank gestellt.

Am 23. Mai fanden sich keine Organismen. Eine filtrierte Probe löste, alkalisch gemacht, eine Flocke Fibrin in 20 Minuten nahezu auf. Diese Wirkung ist im Vergleich mit den von Kühne und Ewald beobachteten gering, daß aber das Extrakt doch eine weitgehende zersetzende Wirkung ausübte, zeigte die reichliche Tyrosinausscheidung in einer mit Fibrin gestopften Probe am folgenden Tage, wobei das Fibrin bis auf geringe Reste in Lösung gegangen war.

##### 3. Pankreasextrakt vom 29. Mai 1901.

An diesem Tage erhielt ich Pankreas, die über Nacht im Freien liegen gelassen wurden. Am 30. Mai bewies ein deutlich unangenehmer Geruch Anfänge von Fäulnis. Dennoch wusch ich die Drüsen und zerkleinerte sie = 792 g, die mit 800 cem Wasser, Thymol und Chloroform angesetzt wurden. So blieb das Gemisch bis zum 4. Juni im Freien stehen. Nun zeigte sich kein Geruch mehr außer dem der Desinfektionsmittel, neben dem auch geringer Fäulnisgeruch leicht zu erkennen ist, und in



einer klaren Filtratprobe zeigten sich unter dem Mikroskope keine Bakterien. An diesem Tage kam das Gemisch in den Wärmeschrank. Am 5. Juni wurde eine Probe filtriert: ihre Wirkung war:

5 Min.: deutl. Z.: 15: sehr kl. R.

Am 10. Juni wurde wieder eine Probe filtriert: diese wirkte:

5 Min.: bg. Z.: 10: deutl. Z.: 1 Stunde: gelöst.

#### 4. Pankreasextrakt vom 4. Juni 1901.

Die Drüsen kamen morgens vom Schlachthofe: sie wogen, gereinigt und zerkleinert = 1040 g. Am Nachmittage wurden sie mit 3000 ccm Wasser, gepulvertem Thymol und Chloroform angesetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Am folgenden Tage kam das Gemisch in den Wärmeschrank.

Die Wirkung filtrierter Proben verhielt sich an verschiedenen Tagen folgendermaßen:

7. Juni: 5 Min.: bg. Z.: 30: nahezu gelöst.

10. Juni: 5 Min.: Sp. Z.: 10: deutl. Z.: 1 St.: noch nicht alles gelöst.

5. Juli: in 1 Stunde nicht alles gelöst.

Von da an stand das Gemisch bei Zimmertemperatur. Am 12. Dezember 1901 trat an einer Fibrinlocke erst nach einer Stunde starker Zerfall ein, erst nach mehreren Stunden Lösung.

#### 5. Pankreasextrakt vom 11. Juni 1901.

Am 11. Juni wurden angesetzt 944 g P. mit 2000 ccm Wasser, Chloroform und Thymol und das Gemisch in den Brutschrank gestellt. Am 12. Juni finden sich keine Organismen. Die Wirkung filtrierter Proben war am

12. Juni: 5 Min.: bg. Z.: 10: deutl. Z.: 15: kl. R.: 25: ger. R.

13. Juni: gleiche Wirkung.

17. Juni: 10 Min.: bg. Z.: 30: einige Reste.

Die Wirkung dieser Extrakte ist immerhin eine gute, wenn sie auch nicht den von Kühne und Ewald beobachteten gleichkommt. Um die beiden zu vergleichen, müßte man allerdings die Konzentration der Extrakte dieser Beobachter, die sie aus Trockenpankreas bereiteten, während meine aus frischen Drüsen hergestellt waren, vergleichen. Da aber, wie wir sehen werden, das Verhältnis von Drüsensubstanz und Wasser in weiten Grenzen schwanken kann, ohne die Wirkung zu beeinflussen, ist der Vergleich doch gestattet. Außerdem wird sich zeigen, daß die Extrakte, die bei Zimmertemperatur gemacht werden, eben doch bessere Resultate liefern.

Sehr auffallend schlecht war dagegen das Resultat des ersten Versuchs. Ich weiß nicht mit Bestimmtheit anzugeben, woran dies gelegen ist. Dieser Versuch wurde in einem Wasserbade von 40° C. angestellt, die anderen in einem Brutschrank, in dem die Temperatur etwas niedriger war. Bei den letzten Versuchen hatten die Drüsen

längere Zeit gelegen, ehe sie angesetzt und in die Wärme gebracht wurden, bei dem ersten wurden sie sogleich verarbeitet und auf 40° C. gebracht. Es wäre nun möglich, daß in diesem Falle noch gar kein Enzym aus dem Zymogen gebildet war und daß das letztere bei 40° C. leicht zerstört würde.

Daß die Wärme in der Tat von Bedeutung ist, lehrt der folgende Versuch, der mich zuerst auf die günstige Wirkung niederer Temperaturen aufmerksam machte.

#### 6. Pankreasextrakt vom 17. Juni 1901.

An diesem Tage erhielt ich Drüsen, die ich erst am andern Tage verarbeiten konnte. Ich hielt sie über Nacht auf Eis. Am 18. wurden sie zerkleinert = 1132 g und mit 1500 ccm Wasser und Chloroform in den Wärmeschrank gestellt. Dieser war neu angeheizt und noch nicht gut reguliert. Ich bemerkte am Nachmittage des gleichen Tages, daß seine Temperatur nur 33° C. betrug. Eine jetzt filtrierte Probe zeigte wesentlich bessere Wirkung als die bisherigen Extrakte. Nach 2 Minuten begann der Zerfall und nach 10 Minuten war vollständige Lösung der Flocke eingetreten.

Über Nacht blieb das Gemisch im Wärmeschrank, dessen Temperatur am andern Morgen = 36° C. war. Jetzt trat bei einer filtrierten Probe der Anfang des Zerfalls des Fibrins erst nach 5 Minuten ein, während der Rest der gestern filtrierten Probe, der über Nacht bei Zimmertemperatur gestanden hatte, noch von gleicher Wirkung war. Deshalb machte ich von nun an die Extrakte bei Zimmertemperatur.

### B. Bei Zimmertemperatur

und Veränderung dieser Extrakte mit der Zeit.

Bei diesen Versuchen war festzustellen, ob es bei niederen Temperaturen länger dauerte, bis die Extrakte gut wirkten, wann das Maximum der Wirksamkeit eintrat, und ob sie sich auf diesem hielten oder im Verlauf der Zeit auch hier eine Veränderung einträte.

#### 1. Pankreasextrakt vom 21. Juni 1901.

Es wurden angesetzt 1200 g zerkleinertes P. mit 1500 ccm Chloroformwasser.

Da eine filtrierte Probe am 24. Juni schon von sehr guter Wirkung war: 3 Min: bg. Z.; 5: viel gelöst; 15: ganz gelöst, so wurde das ganze Gemisch kolliert und filtriert.

Die folgenden Zahlen demonstrieren seine Wirkung und deren Abnahme auch bei Zimmertemperatur im Verlaufe der Zeit. Das Filtrat wirkte am

26. Juni: 5 Min.: sehr ger. R.

3. Juli: Wirkung ziemlich gleich.

18. Juli: 5 Min.: Sp. Z.; 10: deutl. Z.; 15: st. Z.; 25: kl. R.

26. Juli: wie am 18. Juli.

31. Oktober: 5 Min.: Sp. Z.: 40: ger. R.

12. Dezember: Fibrin in 15 Min. nahezu gelöst.

### 2. Pankreasextrakt vom 2. Juli 1901.

Die Drüsen kamen abends vom Schlachthofe und blieben über Nacht auf Eis. Am 2. Juli wurden sie zerkleinert = 1015 g und mit 1500 g Chloroformwasser und etwas Äther angesetzt. Wirkung am

3. Juli: 5 Min.: bg. Z.

5. Juli: neutral: 5 Min.: st. Z.

alkalisch: 2 Min.: bg. Z.: 5: viel gel.: 10: ger. R.

Am 8. Juli wurde das Ganze koliert und auf Filter gebracht. Wirkung des Filtrats am

12. Juli: neutral: 5 Min.: Sp. Z.: 10: st. Z.: 15: kl. R.: 20: sehr ger. R.

22. Juli: alkalisch: 5 Min.: 0: 10: deutl. Z.: 25: ger. R.

26. Juli: 10: deutl. Z.: 20: kl. R.: 30: sehr ger. R.

13. August: 5 Min.: 0: 15: st. Z.: 20: kl. R.

31. Oktober: 5 Min.: bg. Z.: 10: zieml. Z.: 15: st. Z.: 25: kl. R.: 35: min. R.: 40: gelöst.

### 3. Pankreasextrakte vom 9. Juli 1901.

Am 9. Juli erhielt ich 4 Pankreasdrüsen, die äußerlich so verschieden waren, daß ich probieren wollte, ob die verschiedene anatomische Beschaffenheit eine Verschiedenheit der Wirkung bedingte. Das Aussehen der vier Drüsen war folgendes:

1. glasig-schleimig, wenig gefärbt;
2. ebenso, aber reich an Hämoglobin;
3. körnig-opak, gelblich;
4. wie 3, aber stärker gelb.

Die 4 Drüsen wurden gesondert je mit der 4fachen Menge toluolisierten Wassers angesetzt.

Am 11. Juli wurde die Wirkung der Extrakte verglichen. Sie war überhaupt nicht besonders gut, aber ziemlich gleich.

	1.	2.	3.	4.
5 Min.: 0		0,	0.	beg. Z.,
10	st. Z.:	beg. Z.:	st. Z.:	
15	ger. R.:	st. Z.:	ger. R.:	
20	sehr ger. R.:	ger. R.:	sehr ger. R.:	
25	gelöst.	ger. R.	gelöst.	

### 4. Pankreasextrakt vom 24. Juli 1901.

Ein kleiner Teil der Drüsen wurde mit toluolisiertem Wasser, der andere mit Salicylsäure von 1<sup>o</sup>/<sub>100</sub> und Toluol und zwar gleiche Mengen Drüsensubstanz in Grammen wie Extraktionsmittel in Kubikcentimetern angesetzt. Am folgenden Tage waren beide Extrakte stark hämoglobin-

haltig, zeigten aber jetzt schon eine gute Wirkung, und zwar war dieselbe, nachdem beide alkalisch gemacht worden waren, ganz gleich. Dieses Extrakt war das einzige, bei dem sich trotz Toluolzusatz bei ganz frischen Drüsen, sogar in dem salicylsäurehaltigen Teil, Bakterien ansiedelten, übrigens ohne Fäulnisgeruch, und dieselben verschwanden auf neuen Toluolzusatz und gutes Umschütteln. Die weiteren Beobachtungen gelten für die salicylsäurehaltige Lösung. Am 29. Juli wurde das Gemisch koliert auf 35 % Magnesiumsulfat gebracht und am 1. August filtriert. Die Filtration der salzhaltigen Lösung ging rascher, als die wässriger Extrakte. Die Wirkung des Extraktes war am

25. Juli: salicylsaure und wässrige Extrakte nach Alkalischmachen gleich: 5 Min.: st. Z.: 10: Lösung.

29. Juli: Wirkung ebenso.

29. Oktober (35 %  $MgSO_4$ ): 10 Min.: bg. Z.: 15: st. Z.: 20: mäß. R.: 35: ger. R.

#### 5. Pankreasextrakt vom 12. November 1901:

An diesem Tage wurden angesetzt 1165 g zerkleinertes P. mit 2000 ccm toluolisiertem Wasser. Die Wirkung war am

13. Nov. (hämoglobinhaltig): 2 Min.: beg. Z.: 10: fast gelöst.

An diesem Tage wurde das Ganze koliert und filtriert. Das Filtrat wirkte am

15. Nov.: ebenso.

18. Nov.: 2 Min.: deutl. Z.: 5: mäß. R.: 10: gelöst

27. Nov.: 5 Min.: st. Z.: 10: kl. R.: 15: min. R.

#### 6. Pankreasextrakt vom 3. Dezember 1901:

Am 3. Dezember erhielt ich einige Drüsen, die schon 5 Tage kalt gelegen hatten. Sie zeigten keinen Geruch, wohl aber waren in oberflächlich abgeschabten Proben mikroskopisch Bakterien zu erkennen. Die Drüsen wurden dennoch angesetzt: 350 g P. mit 600 ccm toluolisiertem Wasser.

Die Wirkung einer filtrierten Probe war am

6. Dezember: 2 Min.: deutl. Z.: 8: min. R.

Am 7. Dezember wurde das Ganze koliert und durch zwei Filter filtriert. Am 16. Dezember fanden sich in dem einen Filtrat Bakterien (es wurde neu toluolisiert; später wurden darin keine, wenigstens keine lebenden Bakterien mehr beobachtet), in dem anderen keine.

Am 10. Januar war die Wirkung der beiden Filtrate ganz gleich  
2 Min.: Sp. Z.: 5: st. Z.: 10: gelöst.

Am 20. Januar wirkte das Filtrat, das Bakterien enthalten hatte:  
5 Min.: st. Z.: 10: ger. R.: 15: gelöst.

#### 7. Pankreasextrakt vom 14. Januar 1902:

Angesetzt wurden 753 g P. mit 1300 ccm toluolisiertem Wasser.

Die Wirkung filtrierter Proben war am

- 15. Januar (viel Hämoglobin): 2 Min.: Sp. Z.: 5: mäß. R.: 10: gelöst.
- 17. Januar (kaum mehr Hämoglobin-haltig): Wirkung ebenso.
- 20. Januar: Wirkung ebenso.

An diesem Tage wurde das Ganze koliert und filtriert. Die Wirkung des Filtrats war am

28. Januar die bisherigen Proben waren in neutraler Lösung an- gestellt. Heute wird die Wirkung bei neutraler und alkalischer Reaktion verglichen. In beiden Fällen ist sie gleich:

- 3 Min.: zieml. Z.; 5: mäß. R.; 10: gelöst.
- 4. Februar: 5 Min.: st. Z.; 10: sehr kl. R.; 15: ger. R.; 20: gelöst.
- 7. Februar: 5 Min.: zieml. st. Z.; 10: kl. R.; 15: ger. R.; 20: gelöst.
- 11. Februar: 5 Min.: st. Z.; 10: gelöst.

#### 8. Pankreasextrakt vom 7. Februar 1902.

Es wurden angesetzt 793 g P. mit 300 ccm Wasser und so bis zum anderen Tage stehen gelassen. Bei diesem geringen Wasserzusatz war der Zerfall der Drüsenstückchen ein auffallend geringer. Nun wurden zugefügt 1300 ccm Wasser und das Ganze auf  $\frac{1}{4}\%$  Soda und 25% Ammonsulfat gebracht. Die Wirkung filtrierter Proben war am

- 11. Februar: 5 Min.: st. Z.; 15: ger. R.; 20: gelöst.
- 12. Februar: Ebenso.
- 17. Februar: 3 Min.: bg. Z.: 5: st. Z.; 10: ger. R.; 15: gelöst.
- 25. Februar: 5 Min.: zieml. Z.; 10: mäß. R.; 15: sehr kl. R.; 20: min. R.

#### 9. Pankreasextrakt vom 7. März 1902.

An diesem Tage wurden angesetzt 1250 g P mit 500 ccm toluoli- siertem Wasser und so 3 Tage stehen gelassen. Dann wurden zugefügt 2000 ccm Wasser und das ganze auf 0,2% Soda und 20% Ammonsulfat gebracht. Wirkung am

- 17. März (viel Hämoglobin): 5 Min.: st. Z.; 10: kl. R.; 15: min. R.
- 20. März (leicht rötlich): ebenso.

Am 8. April wurde das Ganze koliert und filtriert. Das Filtrat wirkte am

- 8. April: 5 Min.: zieml. Z.; 10: kl. R.; 15: sehr ger. R.; 20: gelöst.
- 10. April: 5 Min.: zieml. Z.; 10: st. Z.; 15: kl. R.; 20: sehr ger. R.
- 14. April: 5 Min.: zieml. Z.; 10: kl. R.
- 2. Mai: 3 Min.: Sp. Z.; 5: deutl. Z.; 10: mäß. R.
- 7. Mai: 3 Min.: Sp. Z.; 5: deutl. Z.; 10: st. Z.; 15: kl. R.; 20: min. R.
- 4. Juni: 5 Min.: bg. Z.; 10: st. Z.; 15: kl. R.; 25: min. R.; 30: gelöst.

#### 10. Pankreasextrakt vom 17. April 1902.

Angesetzt wurden 1068 g P. mit 2500 ccm Wasser — Toluol — Wirkung filtrierter Proben am

- 18. April: 5 Min.: st. Z.; 10: ger. R.; 15: gelöst.

21. April: 5 Min.: st. Z.; 10: kl. R.; 20: min. R.

An diesem Tage wurde das Gemisch auf 0,3% Soda gebracht.

23. April: 3 Min.: st. Z.; 5: kl. R.; 10: min. R.

Nun wurde das Ganze auf 10% Ammonsulfat gebracht, koliert und filtriert.

24. April: 2 Min.: bg. Z.; 5: zieml. Z.; 10: ger. R.

### 11. Pankreasextrakt vom 7. Mai 1902.

Es wurden angesetzt 1138 g P. mit 2500 ccm toluolisiertem Wasser. Die Wirkung filtrierter Proben war am

9. Mai (Hämoglobin-haltig): 5 Min.: st. Z.; 10: kl. R.; 15: gelöst

Hier zeigte sich, daß unter Umständen die Reaktion von ziemlichem Einfluß ist, denn eine Probe, alkalisch gemacht, zeigte am 9. Mai eine sehr gute Wirkung:

2 Min.: st. Z.; 4: kl. R.; 6: gelöst.

Noch etwas besser war dieselbe, wenn man statt mit Soda mit Ammoniak alkalisch machte, und dies ist die beste pankreatische Wirkung, die ich überhaupt beobachtet habe. Ich gebe hier zum Vergleich die Wirkung einer mit Soda und einer mit Ammoniak alkalisch gemachten Probe vom 12. Mai:

	Soda	Ammoniak
1 Minute	?	bg. Z.
2 Minuten	zieml. Z.	st. Z.
3 „	st. Z.	kl. R.
4 „	mäß. R.	ger. R.
5 „	kl. R.	gelöst.

Nun wurde das Gemisch auf 10% Kochsalz gebracht, was auf die Wirkung kaum von Einfluß war; denn am 14. Mai, wo sich kein Hämoglobin mehr vorfand und die Reaktion der Flüssigkeit deutlich sauer war, wirkte eine filtrierte Probe, nachdem sie alkalisch gemacht war:

1 Min.: deutl. Z.; 2: st. Z.; 3: kl. R.; 5: min. R.

Am 15. Mai wurde das Pankreasgemisch auf 27% Kochsalz gebracht, koliert und filtriert. Auch jetzt war die Wirkung noch sehr gut:

3 Min.: zieml. Z.; 5: st. Z.; 10: min. R.

Endlich wurde das Filtrat mit Kochsalz ganz gesättigt, und auch jetzt war die Wirkung, wenn auch etwas verlangsamt, noch auffallend gut, nämlich am 21. Mai.

5 Min.: bg. Z.; 10: mäß. R.; 15: kl. R.

Es ist dabei zu bemerken, daß die letzten beiden Proben alkalisch gemacht worden waren, wobei ein Niederschlag entstand, von dem abfiltriert wurde.

### 12. Pankreasextrakt vom 2. Juni 1902.

Angesetzt wurden 1343 g P. mit 2700 ccm toluolisiertem Wasser.

Die Wirkung filtrierter Proben war am

3. Juni Hämoglobin-haltig, alkalisch gemacht: 5 Min.: kl. R.;  
10: sehr ger. R.

4. Juni: 2 Min.: deutl. Z.; 5: ger. R.; 10: min. R.

Das Ganze wurde nun auf 5<sup>o</sup> Kochsalz gebracht.

5. Juni schwach rötlich, deutlich sauer reagierend, wirkt, alkalisch gemacht): 2 Min.: st. Z.; 5: sehr ger. R.; 10: gelöst;

10. Juni (alkalisch gemacht): 5 Min.: kl. R.; 10: sehr ger. R.; 15: gelöst.

11. Juni (neutral resp. schwach sauer): 2 Min.: deutl. Z.; 5: mäß. R.; 10: min. R.; alkalisch gemacht: 2 Min.: zieml. Z.; 5: kl. R.; 10: sehr ger. R.

Ich reihe hier noch einen Versuch an mit einem nach Kühnes Methode hergestellten Trockenpankreaspräparat bei Zimmertemperatur und 2 Versuche mit frischen Drüsen, die anderen Tieren als dem Rinde entstammten:

### 13. Pankreastrockenpräparat.

Da ich mit dem aus im hiesigen physiologischen Institut aufbewahrten Pankreastrockenpräparat bei 40° C. nach Kühnes Vorschrift hergestellten Extrakte nicht so günstige Resultate erhalten hatte, wie sie Kühne und Ewald beschreiben, versuchte ich, wie sich bei Zimmertemperatur daraus hergestellte Extrakte verhielten.

Am 6. Juni 1901 wurden in dem Verhältnis, wie es Kühne angibt, 100 g Trockenpankreas mit 500 ccm Wasser und Chloroform angesetzt.

Am folgenden Tag war die Wirkung einer filtrierten Probe noch gering. Erst nach 25 Minuten zeigte sich Zerfall am Fibrin. Am 29. Juni war die Wirkung gut: 5 Min.: deutl. Z.; 10: st. Z. Noch besser war sie am 3. Juli:

3 Min.: bg. Z.; 5: viel gelöst.

Am 22. Juli hatte sie schon wieder abgenommen:

5 Min.: deutl. Z.; 10: mäß. R.; 20: ger. R.; 30: gelöst.

Ganz den Anforderungen von Kühne und Ewald hat das Präparat auch unter diesen Bedingungen nicht entsprochen, wenn es ihnen auch recht nahe kam.

### 14. Hammelpankreas.

Ich habe hier nur zu erwähnen, daß man auch aus Hammelpankreas in kurzer Zeit bei Zimmertemperatur sehr gut wirkende Lösungen erhält. Am 11. Juni 1902 wurden angesetzt 60 g Hammelpankreas mit 120 ccm toluolisiertem Wasser.

Schon am 13. Juni zeigte eine filtrierte, alkalisch gemachte Probe folgende Wirkung:

2 Min.: bg. Z.; 3: zieml. Z.; 5: mäß. R.; 10: ger. R.; 15: min. R.

Endlich will ich noch meine Erfahrung erwähnen mit

## 15. Hundepankreas.

Am 13. Juli 1901 wurde das Pankreas eines eben getöteten Hundes mit ungefähr der doppelten Menge toluolisierten Wassers angesetzt.

Am 17. Juli war die Wirkung einer filtrierten und alkalisch gemachten Probe eine mäßige.

10 Min.: Sp. Z.: 15: deutl. Z.: 20: st. Z.: 30: ger. R.; 45: gelöst.

Eine andere Probe wurde mit Essigsäure deutlich sauer gemacht, wobei ein Niederschlag entstand, und so 10 Minuten stehen gelassen. Jetzt wurde wieder alkalisch gemacht, wobei der Niederschlag sich nahezu wieder löste. Die Wirkung der Probe war nun eine bessere:

5 Min.: bg. Z.: 10: deutl. Z.: 20: kl. R.: 30: gelöst.

Dies dürfte wohl so zu erklären sein, daß es eine Individualität des Hundepankreas ist, daß sein Zymogen langsamer gespalten wird, oder es ist dies überhaupt der Fall, wenn ganz frische Drüsen sogleich mit Wasser angesetzt werden. Zu bedenken ist übrigens auch, daß durch das Ansäuern und Wiedernutralisieren eine ziemliche Menge Salz, essigsaures Natron, in die Lösung kommt, das, wie wir von anderen Salzen sehen werden, die pankreatische Wirkung fördern kann, wenn auch die Besserung in diesem Falle doch so bedeutend war, daß sie dem letzteren Umstände wohl nicht allein zugeschrieben werden kann. Außerdem ist daran zu denken, daß das Zymogen in wässriger Lösung leicht zerstört werden könnte und die Wirkung besser gewesen wäre, wenn man das P. von vornherein mit Essigsäure behandelt hätte.

### Zusammenfassung.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß man bei Zimmertemperatur besser wirkende Extrakte erhält als bei Temperaturen, die der Körpertemperatur nahe liegen.

Dabei geht das wirksame Prinzip sehr rasch in Lösung und das Maximum der Wirkung ist bei wässrigen Extrakten bald erreicht. Ich muß hier zufügen, daß damit die Drüsen noch nicht erschöpft sind: denn wenn man aus dem abgepreßten Rest der ersten Extrakte zweite herstellt, erhält man immer noch leidlich wirkende Auszüge, wenn deren Wirkung auch nie an die der ersten Extrakte heranreicht.

Mit der Zeit nehmen diese Extrakte an Wirksamkeit ab, aber, wie es scheint, überhaupt nicht so viel wie solche, die bei Körpertemperatur gemacht werden; jedenfalls geht die Schwächung bei niedriger Temperatur bedeutend langsamer vor sich.



Der Zeitpunkt, wann das Maximum der Wirkung eintritt und wann die Schwächung beginnt, ist bei verschiedenen Extrakten etwas verschieden. Für die Bedingungen dieser Verschiedenheit habe ich, wie für manche andere, die wir im Verlauf dieser Arbeit kennen lernen werden, noch keine genügende Erklärung gefunden.

Bei Extrakten von Rinderpankreas mit Wasser braucht man keinen Bedacht zu nehmen auf die Spaltung von Zymogen. Dieselben säuern sehr bald in einem Grade, der offenbar hinreicht, diese Spaltung zu bewerkstelligen. Vielleicht verhalten sich jedoch die Drüsen verschiedener Tiere verschieden, worauf der Versuch mit Hundepankreas zu deuten scheint.

Bei meinen Versuchen war die Schwächung erst an den Filtraten bemerkbar. Da ich die Filtration meist sehr bald vornahm, um die Extrakte zur Zeit ihrer besten Wirkung weiter zu verarbeiten, habe ich keine Erfahrung, wie sich die Extrakte verhalten, wenn sie bei Zimmertemperatur längere Zeit auf den Drüsen stehen bleiben. Nur eine Beobachtung spricht dafür, daß auch dabei mit der Zeit Schädigung eintritt. Das Pankreasextrakt vom 4. Juni 1901 war nämlich seit dem 5. Juli 1901 bei Zimmertemperatur immer noch auf den Drüsen gestanden, und hier war am 12. Dezember 1901 entschieden noch eine weitere Schädigung eingetreten. Allerdings ist in diesem Falle nicht festzustellen, ob die anfängliche Behandlung des Extraktes bei 40° C. nicht auf die folgende Schädigung auch bei Zimmertemperatur von Einfluß war.

Beim P.E. vom 21. Juni und 2. Juli 1901 hat sich nach längerer Zeit und beim P.E. vom 14. Januar 1902 nach kürzerer eine wieder etwas bessere Wirkung bemerklich gemacht. Die Besserung ist nur gering, da sie aber öfter beobachtet wurde und auch Vernon eine solche Besserung in späteren Stadien beobachtet hat, ist sie doch beachtenswert. Sie spricht vielleicht für eine anfängliche Bindung des Trypsins an Lösungsprodukte, die bei der Zersetzung dieser wieder aufgehoben wird.

Das ganze Verhalten der Extrakte ist für den Hauptzweck unserer Aufgabe, die Herstellung vollwirksamer, reinerer Enzym-

präparate von Wichtigkeit. Da die Extrakte auch bei Zimmertemperatur an Wirksamkeit einbüßen, wird man sie zur Erreichung dieses Zweckes eben ziemlich früh zu verarbeiten haben: allerdings werden die Lösungsprodukte, die in früherer Zeit noch vorhanden sind und erst später leichter wegzu-schaffenden Zersetzungsprodukten Platz machen, dabei hinderlich sein. Es ist bei der leichten Löslichkeit des Enzyms jedenfalls noch zu versuchen, ob nicht bei sehr niederen Temperaturen neben dem Enzym weniger Stoffe in Lösung gehen, soweit diese nicht auf einfacher Extraktion beruht; die übrigens auch bei sehr niederen Temperaturen geringer sein kann, sondern eine Funktion der Selbstverdauung ist, die dabei jedenfalls möglichst hintangehalten würde.

Die Extraktion mit Salzen ist aus verschiedenen Gründen gemacht worden. Auf die Extrakte haben sie im allgemeinen keinen ungünstigen Einfluß. Gereinigtere Enzymlösungen werden aber, wie wir sehen werden, manchmal — allerdings nicht immer — durch sie vor der Verminderung ihrer Wirkung mit der Zeit geschützt. So konnten sie diese Wirkung auch in den Extrakten ausüben, wenn dieselbe tatsächlich auch hier weniger zum Ausdruck kam. Weiter werden wir sehen, daß durch den anfänglichen Zusatz gewisser anderer Salze als zur Darstellung der reineren Enzympräparate verwendet wurden oder der gleichen in bestimmter Konzentration, unwirksame Niederschläge entfernt werden konnten. Und da das Filtrieren solcher salzhaltigen Lösungen meist besser von statten geht als das der wässerigen Lösungen, war es angezeigt, diese schon vor der Filtration zuzusetzen. Da aber der Salzzusatz etwaige Spaltung von Zymogen hindern könnte, wurden in diesen Fällen die Drüsen zuerst kurze Zeit mit Wasser angesetzt und erst dann auf die gewünschte Salzkonzentration gebracht.

Da Kochsalz bis zu sehr hohen Konzentrationen zugesetzt werden kann, ohne das Trypsin wesentlich zu schwächen, so daß man annehmen konnte — was auch Kühnes Erfahrungen entspricht —, daß das Enzym dadurch nicht ausgefällt wird, so lag es nahe, zu versuchen, ob nicht durch Extraktion der Drüsen mit ganz konzentrierter Kochsalzlösung,

die ja viele Eiweißkörper aussalzt, respective hier nicht in Lösung gehen ließe, von vornherein reinere Enzymlösungen erhalten werden könnten.

Ein solcher Versuch hatte aber kein günstiges Resultat.

Am 6. November 1901 wurde ein Pankreas zerkleinert, mit Kochsalz zerrieben, mit wenig konzentrierter Kochsalzlösung übergossen und Steinsalz hineingestellt. Am folgenden Tage wurde eine Probe filtriert und mit Wasser verdünnt. Diese Lösung enthielt allerdings etwas Enzym, aber nur sehr wenig, da eine Fibrinlocke erst nach Stunden davon angegriffen wurde. Vielleicht war aber in diesem Falle nur Zymogen in Lösung gegangen, und es wurde deshalb eine Probe nach Heidenhain mit Essigsäure behandelt. Aber auch dies hatte keinen nennenswerten Erfolg.

Der Versuch hat aber in einer anderen Beziehung großes Interesse. Das Extrakt zeigte gar keine Biuret- und nur eine sehr geringe Xanthoproteinsäurereaktion. Es gab aber auf Zusatz von Essigsäure bis zur kräftig sauern Reaktion einen reichlichen amorphen Niederschlag. Es findet sich also in Pankreasextrakten und zwar, wie wir später sehen werden, auch in wässrigen, ein Körper, der mit Essigsäure fällbar ist und keine Eiweißreaktionen gibt.

Ich habe dieser Methode bisher vielleicht doch zu wenig Aufmerksamkeit geschenkt: denn nachdem das Gemisch 3 Monate gestanden hatte, zeigte eine filtrierte Probe, mit der gleichen Menge Wasser verdünnt, doch nicht unerhebliche Wirkung auf Fibrin. Leider habe ich damals versäumt, wieder auf sonstige Lösungsprodukte zu untersuchen. Ich verdünnte damals das Ganze mit der gleichen Menge Wasser und untersuchte nach einem weiteren Monat. Nun war die Wirkung recht gut, die Lösung gab aber eine starke Biuretreaktion. Da übrigens Trypsin auch in ganz konzentrierten Salzlösungen seine Wirksamkeit nicht ganz verliert, ist diese Art der Extraktion, die jedenfalls langer Zeit bedarf, wobei eben doch Selbstverdauung eintreten kann, wohl nicht gerade aussichtsreich.

Eine auffallende Tatsache läßt sich aus den oben geschilderten Pankreasextrakten ableiten, daß nämlich ihre

Wirkung innerhalb gewisser Grenzen ziemlich unabhängig ist von der Menge des Wassers, das zur Extraktion der Drüsen verwandt wird. Man bekommt bei Anwendung von der gleichen Menge Wasser wie das Gewicht der Drüsen oder bei der doppelten ziemlich gleich wirkende Extrakte.

Der auffallend geringe Zerfall der Drüsen bei Anwendung von wenig Wasser, wie dies beim P.E. vom 7. Febr. 1902 der Fall war, wo zuerst auf 730 g Drüsensubstanz nur 300 ccm Wasser angewandt wurden, deutet vielleicht darauf, daß auf diese Weise keine sehr gut wirkenden Extrakte erhalten werden.

Auf der andern Seite war die Wirkung der 4 Extrakte vom 9. Juli 1901, wo sehr viel Wasser angewandt wurde, nämlich das 4fache des Drüsengewichtes, auch etwas geringer. Hier kann aber auch die von Vernon beobachtete eigentümliche Tatsache vorliegen, daß einzelne Drüsen immer weniger gute Extrakte liefern als mehrere zusammengenommen. Wie weit dabei etwas Ähnliches wie die ebenfalls von Vernon beobachtete Tatsache der Aktivierung schlecht wirkender Extrakte durch kleine Mengen gut wirkender oder, allgemein gesagt, Unterstützung der Wirkung des Extraktes einer Drüse durch die Extrakte anderer in Betracht kommt, weiß ich nicht zu sagen.

Sicher ist, daß bei Wassermengen, die zwischen diesen Extremen liegen, innerhalb weiter Grenzen gleich wirkende Extrakte erhalten werden. Es stimmt dies mit Heidenhains Anschauung überein, daß tryptisch wirkende Lösungen die Grenze überschreiten können, jenseits welcher sich die Menge des darin enthaltenen Enzyms nicht mehr in Unterschieden der Lösungsgeschwindigkeiten ausdrückt.<sup>1)</sup> Was hierfür der Grund ist, ist eine andere Frage. Man weiß, daß durch die Anhäufung von Lösungsprodukten in einer tryptischen Lösung die Wirkung des Trypsins, wenn auch nicht, wie dies bei dem Pepsin unter gleichen Bedingungen der Fall ist, aufgehoben, so doch sehr verlangsamt wird. Es ist nun daran zu denken, daß konzentriertere Lösungen vielleicht mehr Enzym enthalten, dessen zu erwartende raschere Wirkung aber durch die dabei reichlicheren Lösungsprodukte kompensiert wird.

<sup>1)</sup> Hermanns Handb. d. Physiol., Bd. 5, Heft 1, S. 187.

### Versuche zur Isolierung von „Trypsinpräparaten“.

Im ganzen bekommt man also durch Extraktion von Pankreas bei Zimmertemperatur mit Wasser, verdünnten Alkalien, Salicylsäure oder Neutralsalzen sehr gut tryptisch wirkende Lösungen, aus denen nun Präparate herzustellen waren, die von vielem Unwirksamen befreit, möglichst ebenso gut wirkende Lösungen geben, wie die Extrakte selbst. Dies zu erkennen, ist ihre Lösung in der gleichen Menge Flüssigkeit erforderlich.

Auf diese Weise die Wirkung der Präparate festzustellen, halte ich für nötig. Wir haben gesehen, daß das Trypsin ein leicht zu schädigender Körper ist; ob diese Schädigung qualitativ oder nur quantitativ ist, ist uns aber bis jetzt nicht bekannt. Auch bei der Darstellung von Enzympräparaten kann eine Schädigung eintreten, von der das gleiche gilt; und wir müssen zunächst wissen, ob wir mit entsprechenden Präparatlösungen auch gleiche Wirkung erzielen, wie mit den Extrakten selbst. Das nächste Kriterium hierfür wird wieder die Geschwindigkeit der Lösung von Fibrin sein, wenn ich mir auch wohl bewußt bin, daß dadurch das Enzym noch nicht vollständig charakterisiert ist. Um dies zu erreichen, müssen alle Zersetzungsprodukte studiert werden, eine Aufgabe, die zunächst außerhalb des Rahmens dieser Arbeit liegt, wenn ich auch einige Beobachtungen darüber gemacht habe, die ich, da man daraus schon Wichtiges ersieht, mitteilen werde.

Es war zu erwarten, daß die aus Pankreasextrakten hergestellten Präparate die gleichen Eigenschaften haben würden wie jene, daß sie nämlich leicht, besonders in der Wärme, geschädigt würden. Diese Schädigung bei Körpertemperatur, bei der der Saft doch im Organismus zu wirken hat, ist eine sehr auffallende Tatsache. Es fragt sich aber sehr, ob wir mit unsern experimentell gemachten Extrakten den Wirkungen des Saftes gleichkommen, oder ob nicht dessen Wirkung im Tierkörper durch irgend etwas anderes garantiert wird.

Etwas ist aber schon lange bekannt, daß die Wirkung von Pankreasextrakten von gewissen Substanzen beeinflusst

wird, namentlich von Salzen.<sup>1)</sup> Ferner hat Biernazky<sup>2)</sup> bei Kühne gefunden, daß diese und andere Körper das Trypsin bei noch höheren Temperaturen, die im allgemeinen schon sehr rasch schädlich wirken, vor der Zerstörung bis zu einem gewissen Grade bewahren. So war zu hoffen, durch diese oder ähnliche Mittel auch die Dauerhaftigkeit der Extrakte zu erhöhen, und ebenso von Präparatlösungen, wenn man letztere nur einmal von unverminderter Wirkung dargestellt hatte.

Die bisherigen Versuche, gereinigtere Enzymlösungen darzustellen, leiden alle daran, daß die damit Beschäftigten nicht mit der Tatsache der Schädigung des Enzyms durch Zeit und Wärme rechneten. Außerdem gibt es noch andere Gründe, warum ich einige in neuerer Zeit angegebene Isolierungsmethoden nicht direkt adoptiert habe.

Mochizuki<sup>3)</sup> hat eine angereicherte Enzymlösung dargestellt durch partielle Alkoholfällung, von der er zwar auch nicht ihre Wirkung im Verhältnis zum angewandten Pankreasextrakt angibt, wohl aber sagt, daß sie Fibrin rasch und vollständig löse. Mochizuki digerierte frische Pankreas mit Toluolwasser bei 40° C. 16 Tage lang, dann fällte er mit der gleichen Menge Alkohol von 96% einen wenig wirksamen Niederschlag aus und fällte das Filtrat davon nochmals mit der gleichen Menge Alkohol, löste diesen Niederschlag auf und dialysierte die Lösung. Endlich digerierte er dieselbe nochmals 30 Tage bei 40° C.

Ich kann die Alkoholbehandlung nicht unbedingt empfehlen. Man kann zwar aus Pankreasextrakten mit Alkohol Niederschläge gewinnen, die, wenn sie gleich in verdünnter Soda-lösung gelöst werden, recht gute Enzymlösungen geben. Im allgemeinen aber habe ich gesehen, daß die Alkoholbehandlung das Trypsin leicht schädigt. Übrigens habe ich entgegen den Erfahrungen von Mochizuki schon durch Fällung von Pankreasextrakten mit der gleichen Menge Alkohol ziemlich gut wirkende

1) S. Podolinski, Beiträge zur Kenntnis des pankreatischen Eiweißfermentes. Breslau 1876.

2) Zeitschr. f. Biol., XXVIII, N. F. X, S. 49.

3) Hofmeisters Beiträge, Bd. I, S. 44.

Lösungen erhalten. Dies erklärt sich aber daraus, daß ich, um das Trypsin zur Zeit des Maximums seiner Wirkung zu erhalten, auf frühere Stadien der Extraktion und Zimmertemperatur angewiesen war, wobei in den Extrakten anders geartete Niederschläge entstehen konnten, die Trypsin mit sich niederreißen können, das sich ja an alle möglichen in seiner Lösung suspendierte Dinge leicht anheftet.

Der gleiche Umstand macht sich bei der Methode von Jakob<sup>1)</sup> geltend. Auch hier hat sich ergeben, daß in den früheren Stadien der Verdauung schon bei Sättigungsgraden des Ammonsulfats, die nach Jakob noch kein Trypsin ausfällen, Niederschläge erhalten werden, die sehr viel, bisweilen den größern Teil des Wirksamen enthalten.

Im allgemeinen wird man aber die Aussalzung als schonendstes Fällungsmittel betrachten müssen, wenn man z. B. bedenkt, daß Eiweißkörper bei dieser Methode nicht denaturiert werden, und ich habe mich bald überzeugt, daß man dadurch Niederschläge erhalten kann, die wenigstens das eine Postulat erfüllen, daß sie, in gleicher Menge Wasser gelöst, die gleiche Wirkung hatten wie die ursprünglichen Extrakte.

Zunächst fragt es sich nun aber, welche Salze anzuwenden waren. Durch Kühnes Erfahrungen wissen wir, daß Kochsalz gar nicht, Ammonsulfat dagegen vollständig das Enzym ausfällt. Diese Salze sind die beiden Extreme, die Eiweiß und eiweißartige Körper aussalzen. In der Mitte steht wohl das Magnesiumsulfat, welches also auch zu probieren war. Vielleicht war doch durch fraktionierte Fällung mit dem einen oder andern dieser Salze oder durch Kombination mehrerer oder auch die anfängliche Anwendung anderer eiweißfällender Mittel die Möglichkeit gegeben, Unwirksames zu entfernen, um so auch dem andern Postulate zu genügen, neben dem Enzym möglichst wenig andere Substanz in Lösung zu erhalten, überhaupt also möglichst substanzarme Lösungen zu bekommen.

Dieser Zweck konnte vielleicht auch durch die Dialyse

---

<sup>1)</sup> Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol., Bd. 46, S. 28.

unterstützt werden, und endlich war zu probieren, wenigstens einen unwirksamen Körper zu entfernen, den Kühne als Leukoïd bezeichnet hat, durch die Behandlung mit Essigsäure.

Ich gehe nun dazu über, meine Erfahrungen mit diesen Aussalzungsmethoden zu schildern.

### **Aussalzung von Pankreasextrakten durch Magnesiumsulfat.**

#### **1. Pankreasextrakt vom 21. Mai 1901.**

Sättigung einer Probe dieses Extraktes mit Magnesiumsulfat am 24. Mai ergab eine Trübung, die auf einem Filter gesammelt und abgepreßt wurde. Das Filter, mit der gleichen Menge Wasser extrahiert wie die Probe, ergab eine Lösung, die, alkalisch gemacht, eher besser auf Fibrin bei 40° C. wirkte als das Extrakt selbst.

#### **2. Pankreasextrakt vom 11. Juni 1901.**

a) Eine Probe dieses Extraktes wurde am 13. Juni in ganz gleicher Weise behandelt, wie die unter 1. erwähnte. Der in gleicher Menge Wasser wiedergelöste Niederschlag war nicht ganz so gut wirksam wie das P. E. selbst.

Es wurde deshalb das Filtrat von der mit Magnesiumsulfat gesättigten Lösung untersucht, und es zeigte sich, daß dieses noch wirksam war, wenn man es mit der gleichen Menge Wasser verdünnte.

Wurde nun das magnesiumsulfatgesättigte Filtrat mit etwas mehr des Salzes auf 40° C. erwärmt, so entstand nochmals ein wirksamer Niederschlag, und das Filtrat davon zeigte, mit der gleichen Menge Wasser verdünnt, keine lösende Wirkung mehr auf Fibrin.

b) Gleiche Proben, von denen die eine jedoch mit Soda deutlich alkalisch gemacht worden war, wurden mit Magnesiumsulfat ausgesalzen. Die beiden Niederschläge waren aber in ihrer Wirkung ganz gleich und diese war kaum anders als die des P. E. selbst.

Die bisherigen Pankreasextrakte waren im Wärmeschrank gemacht, die folgenden bei Zimmertemperatur:

#### **3. Pankreasextrakt vom 21. Juni 1901.**

a) Am 24. Juni wurde eine Probe mit Magnesiumsulfat gesättigt. Der Niederschlag wirkte wie das P. E. selbst.

b) Eine Aussalzung aus dem alkalisch gemachten Extrakte (1,4% Soda) ergab eine Fällung, die gelöst ziemlich ebenso wirkte wie das P. E. selbst.

Das Filtrat von dieser Fällung, mit der gleichen Menge Wasser verdünnt, war noch wirksam.

#### **4. Pankreasextrakt vom 2. Juli 1901.**

a) Am 20. Juli wurde eine Probe dieses Extraktes mit der gleichen Menge konzentrierter Magnesiumsulfatlösung versetzt, so daß es halb-



gesättigt war. Es entstand dabei ein Niederschlag, der, gelöst und alkalisch gemacht, gar nicht auf Fibrin wirkte. Eine im Filtrat vorgenommene Ganzsättigung hatte den günstigen Erfolg, daß der dabei entstehende Niederschlag sehr gering war und nahezu wie das P. E. selbst wirkte, das übrigens zu dieser Zeit schon selbst nicht unerheblich an Wirkung eingebüßt hatte. Das salzgesättigte Filtrat war in diesem Falle wenig wirksam, eine Fibrinflocke zeigte darin, nachdem es mit der gleichen Menge Wasser versetzt war, erst nach einer Stunde beginnenden Zerfall.

b) Eine andere Probe dieses P. E. wurde am 26. Juli zuerst auf 1/4 % Soda gebracht und dann mit Magnesiumsulfat halbesättigt. Dabei entstand überhaupt keine Trübung. Nun wurde ganz und zuletzt auch bei 40° C. gesättigt. Der Niederschlag wirkte nicht ganz so gut wie das P. E., und dabei war nahezu alles Wirksame ausgefällt, da im mit Wasser verdünnten Filtrat eine Fibrinflocke erst nach 2 1/2 Stunden Spuren von Zerfall zeigte. Ob hier wohl die Wärme in der kurzen Zeit (es stand nur 1/2 Stunde bei 40° C.) schädlich war?

#### 5. Pankreasextrakt vom 24. Juli 1901.

Proben dieses Extraktes wurden mit Magnesiumsulfat fraktioniert gefällt. Halbesättigung mit Magnesiumsulfat (29. Juli), sei es, daß diese durch Zusatz der gleichen Menge konzentrierter Salzlösung oder durch Eintragen des Salzes in das Extrakt in Substanz bis zu 35%, was etwa der Halbesättigung entspricht, bewerkstelligt wurde, ergab geringe flockige Fällungen von geringer Wirksamkeit (erst nach 1 1/2 Stunden deutlicher Zerfall), so daß diese als unwesentlich entfernt werden konnten. Sättigung der Filtrate davon bei 40° C. ergab Niederschläge, die etwas geringer wirkten als das P. E. selbst. In einem Falle war die Wirkung der Lösung eines solchen Niederschlages 1) gegenüber dem P. E. (2)

1. 5 Min.: st. Z.; 10: mäß. R.; 15: ger. R.

2. 5 Min.: st. Z.; 10: gelöst.

Aber die Filtrate von diesen Niederschlägen, einerlei ob dieselben in neutraler (resp. schwach saurer) oder alkalischer Lösung vorgenommen wurden, waren noch recht wirksam; in dem oben erwähnten Falle wirkte eine mit der gleichen Menge Wasser verdünnte Filtratprobe so, daß eine Fibrinflocke in 15 Minuten deutlichen Zerfall zeigte. Es stellte sich später in diesem Falle heraus, daß die Lösung bei 40° C. nicht vollständig mit dem Salz gesättigt war; aber auch nachdem dies sicher erreicht war, wirkte das mit Wasser in gleicher Menge verdünnte Filtrat noch so, daß an einer Fibrinflocke sich nach einer halben Stunde deutlicher Zerfall zeigte.

Da die Magnesiumsulfatfällung sich als unvollständig erwies, wurde versucht, ob aus dem mit dem Salz halbesättigten Filtrate nicht vielleicht durch Alkohol das Wirksame ausgefällt werden könnte.

Zunächst wurde das halbgesättigte Extrakt mit der gleichen Menge 96%igen Alkohols versetzt. Dabei entstand ein vorwiegend krystallinischer Niederschlag, der nur teilweise in Wasser löslich war, und dessen Lösung auf Fibrin keine Wirkung hatte. Das Filtrat davon wurde abermals mit der gleichen Menge Alkohol versetzt, wobei ein käsiger Niederschlag entstand, der in Wasser leicht und vollkommen löslich war. Eine Probe desselben, besonders gesammelt und in der entsprechenden Menge Wasser gelöst, wirkte nicht so gut wie das P. E. selbst (10 Min.: zieml. Z.: 30: gelöst), er gab aber keine Spur von Biuretreaktion; wohl aber beim Ansäuern und Erhitzen ein mäßiges Koagulum und die Xanthoproteinreaktion. Der ganze Niederschlag wurde nun in wenig Wasser gelöst, mit Thymol und Toluol desinfiziert und der Dialyse unterworfen, wovon später.

#### 6. Pankreasextrakt vom 12. November 1901.

Ebenfalls fraktionierte Magnesiumsulfatfällung. Am 13. November, wo das Extrakt schon ausgezeichnet wirkte (2 Min.: bg. Z.: 10: fast gelöst), wurde es auf 35% des Salzes gebracht; das Filtrat davon bei Zimmertemperatur ganz gesättigt. Der dabei entstehende Niederschlag wirkte, wieder gelöst, nahezu wie das P. E.:

2 Min.: 0: 5: deutl. Z.: 10: mäß. R.: 15: ger. R.

Bei 40° C. entstand ein weiterer Niederschlag und nachdem dieser in der Lösung des Kaltniederschlags gelöst war, wirkte die Lösung noch besser:

2 Min.: bg. Z.: 5: mäß. R.: 15: gelöst;

also jetzt so gut wie das P. E. selbst. Nachdem die Lösung 3 Tage gestanden hatte, hatte sie kaum an Wirkung eingebüßt.

Der in der Kälte durch Sättigung entstandene Niederschlag gab, wieder gelöst, gar keine Biuretreaktion, der bei 40° C. entstandene eine schwache.

### Zusammenfassung.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß man durch Sättigung mit Magnesiumsulfat im allgemeinen gut wirkende Niederschläge erhält. Indessen treten hier Verschiedenheiten zu Tage, für die noch keine genügende Erklärung zu finden ist. In einem Falle wurde durch das Salz bei Sättigung in der Kälte alles ausgefällt; meist, wie es scheint, namentlich bei wirksameren Extrakten, ist dies jedoch nicht der Fall; und dann fällt bei 40° C. weiteres Wirksame aus, aber auch dann nicht immer vollständig. Die Reaktion, bei der gefällt wird, neutral oder alkalisch, ist auf die Wirkung der Sättigungsfällungen ohne Einfluß.

Es empfiehlt sich, vor der Sättigung erst halb zu sättigen. Dabei tritt wohl manchmal keine Fällung ein (in diesem Falle war das P. E. alkalisch gemacht worden), in anderen Fällen entsteht aber ein mehr oder weniger starker Niederschlag, den man, da er nur geringe Wirksamkeit besitzt, entfernen kann. Man kann dann durch Ganzsättigung sehr gut wirkende Niederschläge von geringerer Masse erhalten. Von einem solchen stellte sich heraus, daß er keine Biuretreaction gab. Eine biuretfreie Fällung wurde auch in einem halb mit Magnesiumsulfat gesättigten P. E. durch Alkoholfällung erhalten, die aber von weniger guter Wirkung war.

In einem Falle (P. E. vom 21. Mai 1901) wirkte der Salzniederschlag eher besser, als das P.-E. selbst. Ich will darauf kein zu großes Gewicht legen, da der Unterschied doch unbedeutend war. Wenn man aber, wie beim P. E. vom 24. Juli 1901, durch Magnesiumsulfatsättigung einen Niederschlag erhält, der in seiner Wirkung nahe an die des Extraktes herankommt, aber das Filtrat davon noch so wirksam findet, so ist man geneigt, anzunehmen, daß die ausgesalzenen Niederschläge zusammengenommen von besserer Wirkung wären, als das P. E. selbst, daß sich das Enzym in diesem nicht unter den für seine Wirkung günstigsten Bedingungen befände.

#### **Aussalzung von Pankreasextrakten durch Ammonsulfat.**

##### **1. Pankreasextrakt vom 21. Juni 1901.**

Am 29. Juni wurde eine Probe dieses Extraktes alkalisch gemacht (4% Soda) und auf 65% Ammonsulfatsättigung gebracht. Der Niederschlag, gelöst, wirkte sehr gut, eher besser als das P.E. selbst. Das Filtrat davon wurde dann ganz gesättigt. Der dabei entstehende Niederschlag war gering und ganz unwirksam auf Fibrin.

##### **2. Pankreasextrakt vom 2. Juli 1901.**

a) Am 12. Juli wurde eine Probe zuerst auf 50%, das Filtrat auf 75% und das Filtrat davon ganz gesättigt. Der 50%ige Niederschlag war ziemlich beträchtlich, die anderen gering. Alle 3 Niederschläge waren wirksam: immer noch, wenn auch unbedeutend, der letzte (dies steht in Widerspruch zu der sub 1. gemachten Beobachtung, indessen wurde dort aus alkalischer Lösung gefällt).

Zum Vergleich der Wirkung der Niederschläge der 50% - (1. und der 75% - 2.) Sättigung diene folgende Tabelle, in der sich unter (3.

die Wirkung des P.E. selbst zu dieser Zeit findet und endlich unter 4.) die Wirkung dieses Extraktes, nachdem darin eine kleine Menge Ammonsulfat (etwa entsprechend der an den Niederschlägen haftenden) gelöst war.

1. 7 Min.: Sp. Z.: 10; bg. Z.: 15; deutl. Z.: 30; ger. R.: 50; gel.

2. 5 Min.: Sp. Z.: 10; deutl. Z.: 15; st. Z.: 20; kl. R.: 30; gel.

3. 5 Min.: Sp. Z.: 10; st. Z.: 15; kl. R.: 30; gel.

4. 5 Min.: 0; 10; deutl. Z.: 15; mäß. R.: 30; sehr ger. R.

b) Am 12. Juli wurde eine Probe des P.E. auf 30% Ammonsulfat-sättigung gebracht. Da der Niederschlag sehr gering war, wurde am folgenden Tage sofort auf 50% gesättigt. Dieser Niederschlag, der auch nicht sehr beträchtlich war, gesammelt mit 50% gesättigter Ammonsulfatlösung ausgewaschen und wieder gelöst, wirkte gering:

20 Min.: bg. Z.: 30; st. Z.: 1 St. mäß. R.

Das Filtrat wurde ganz gesättigt. Der dabei entstehende Niederschlag wirkte, gelöst und alkalisch gemacht, so gut wie das P.E. selbst an diesem Tage, nämlich:

5 Min.: deutl. Z.: 10; st. Z.: 15; kl. R.: 25; sehr g. R.: 35; gel.

So gut dies Resultat war, so hatte doch die Lösung dieses Ammonsulfatniederschlages einen großen Nachteil. Nachdem sie nämlich 24 Stunden (neutral) gestanden war, war sie in ihrer Wirksamkeit ganz auffallend verringert und zwar eine bei Zimmertemperatur gestandene Probe (1.) etwas weniger als eine, die über Nacht im Wärmeschrank bei 38° C. war. (2.)

1. 15 Min.: Sp. Z.: 20; deutl. bg. Z.: 25; etwas mehr Zerfall; 50; kl. R.

2. 15 Min.: 0; 20; Sp. Z.: 25; wie bei 1.; 50; kl. R.

Nach weiteren 9 Tagen Stehen bei Zimmertemperatur war übrigens keine weitere Schädigung mehr zu bemerken.

### 3. Pankreasextrakt vom 3. Dezember 1901.

a) Eine Ammonsulfatsättigung ergab am 10. Januar 1902 (in einer Probe, in der sich Bakterien gefunden hatten, die aber durch neuen Zusatz von Desinfektionsmitteln abgetötet worden waren) einen Niederschlag, der von ungefähr der gleichen Wirkung war (1.) wie das P.E. selbst. (2.)

1. 5 Min.: st. Z.: 10; fast gelöst.

2. 5 Min.: st. Z.: 10; gelöst.

War in dem vorigen Versuche die rasche Abnahme der Wirkung der Lösung beim einfachen Stehen bei Zimmertemperatur auf eine Wirkung des Ammonsulfats geschoben worden, so stellte sich bei diesem Versuche heraus, daß das nicht die Ursache sein konnte; denn am anderen Tag war diese Lösung noch von nahezu der gleichen Wirkung. Selbst nach 9 weiteren Tagen war kaum eine Abnahme der Wirkung zu bemerken.

b) Auch bei diesem P. E. wurde eine fraktionierte Ammonsulfat-fällung gemacht (13. Januar 1902). Der bei 60% -Sättigung entstandene

Niederschlag enthielt mehr Wirksames, als der bei Ganzsättigung entstandene.

#### 4. Pankreasextrakt vom 14. Januar 1902.

Am 13. Februar wurde eine Probe alkalisch gemacht und mit Ammonsulfat gesättigt, der Niederschlag mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, bis die Waschflüssigkeit keine Biurettreaktion mehr gab, abgepreßt, vom Filter abgeschabt und auf eine Glasplatte ausgestrichen. Am andern Tag war er trocken. Er war nur teilweise löslich; ein Sodaextrakt desselben wirkte besser als ein wässriges. Eine 0,87%ige Lösung des Präparates entsprach (wenn es ganz löslich gewesen wäre) dem ursprünglichen P. E. (In Wahrheit ist der Prozentgehalt dieser Präparatlösungen geringer an aus dem P. E. stammenden Substanzen, da in den Niederschlägen immer viel Salz von der Darstellung haftet.) Eine solche Lösung gab eine Biurettreaktion von mehr violetter Farbe, die aber beim Kochen bestehen blieb.

Da es sich, nach der violetten Biurettreaktion zu urteilen, vielleicht um unverändertes Eiweiß handelte, versuchte ich, ob nach langer Alkoholbehandlung des Trockenpräparates dieses nicht unlöslich gemacht werden konnte; aber nach dreimonatlichem Stehen unter Alkohol gab eine Lösung immer noch die Biurettreaktion und enthielt noch etwas von einem bei 40° C. mit Essigsäure fällbaren Körper.

Ich gebe hier die Wirkung des P. E. zur Zeit der Darstellung dieses Trockenpräparates (1); die der entsprechenden Lösung des Trockenpräparates (2) und diejenige des gleichen Präparates nach Alkoholbehandlung (3) (letztere Lösung war sogar etwas konzentrierter).

	(1)	(2)	(3)
5 Min.	st. Z.	bg. Z.	—
10 „	ger. R.	st. Z.	deutl. Z.
20 „	gelöst	ger. R.	zieml. Z.
30 „	—	gelöst	—
40 „	—	—	ger. R.
60 „	—	—	gelöst

Man sieht hieraus, daß die Lösung des Trockenpräparates etwas geringer wirkt als das P. E. selbst, doch ist dies unbedeutend. Wir werden später sehen, daß das Eintrocknen häufig dem Trypsin sehr schädlich ist. Nach der Alkoholbehandlung zeigte sich aber das Präparat in seiner Wirkung nicht unerheblich geschwächt.

#### 5. Pankreasextrakt vom 7. Februar 1902.

a) am 11. Februar wirkte ein Ammonsulfatsättigungsniederschlag wie das ursprüngliche Extrakt.

b) Am 12. Februar wurde eine Probe alkalisch gemacht und mit Ammonsulfat gesättigt (das Filtrat davon ist wirkungslos) und der

Niederschlag getrocknet. Eine 1<sup>o</sup>ige Lösung desselben entspricht dem P. E. Eine solche Lösung wirkte kaum anders (1) als das P. E. (2).

	(1)	(2)
5 Min.	zieml. Z.	st. Z.
10 „	kl. R.	—
15 „	ger. R.	ger. R.
20 „	gelöst	gelöst

Diese Präparatlösung reagierte deutlich sauer, obwohl aus alkalischer Lösung gefällt war, sie gibt Biuretreaktion; beim Ansäuern Trübung und beim Kochen ein ziemliches Coagulum. Bei dieser Probe wurde ferner konstatiert, daß durch das Ammonsulfat nicht alles Biuretegebende ausgesalzen wird, indem das Filtrat vom Ammonsulfatniederschlag diese Reaktion auch noch gab.

c) Am 17. Februar wurde eine Probe des Extraktes mit Ammonsulfat gesättigt. Der Niederschlag wurde so lange mit konzentrierter Ammonsulfatlösung gewaschen, bis das Filtrat keine Biuretreaktion mehr gab, dann gepreßt und getrocknet. Eine Lösung von 0,8<sup>o</sup> dieses Trockenpräparats entsprach dem ursprünglichen P. E. (Das Präparat war übrigens nur in verdünnter Sodalösung ganz löslich; aber nur das in Wasser Lösliche enthielt das Wirksame.) Die Lösung wirkte nicht sehr gut: 5 Min. ?; 10: zieml. Z.; 15: kl. R.; 20: ger. R.; 25: min. R.; sie gab beim Erhitzen ein beträchtliches Coagulum und das Filtrat davon eine deutliche Biuretreaktion.

d) Ein am 26. Februar ganz in der gleichen Weise wie das eben beschriebene dargestellte Trockenpräparat ergab ein etwas abweichendes Resultat. Das dem ursprünglichen P. E. entsprechende wässrige Extrakt war auffallend weniger wirksam als dieses. Auch hier löste sich nur ein Teil in Wasser auf; der Rest, in verdünnter Soda gelöst, war diesmal von ziemlicher Wirksamkeit.

Bei diesem Versuch stellte sich eine beachtenswerte Tatsache heraus. Nachdem nämlich der Ammonsulfatniederschlag vom Filter möglichst sorgfältig abgeschabt war, wurde dieses mit Wasser extrahiert und zwar mit der gleichen Menge, wie das zum Versuch angewandte P. E. Dieses Filterextrakt wirkte auffallend gut. Ich gebe hier zum Vergleich: 1. die Wirkung des P. E. selbst zur Zeit der Darstellung dieses Trockenpräparates, 2. die des wässrigen, 3. die des Sodaextraktes desselben und 4. des Filterextraktes:

1. 5 Min.: zieml. Z.; 10: mäß. R.; 15: sehr kl. R.; 20: min. R.
2. 5 „ ?; 10: zieml. Z.; 20: kl. R.; 25: min. R.; 30: gelöst.
3. 5 „ bg. Z.; 10: kl. R.; 15: min. R.
4. 5 „ bg. Z.; 10: st. Z.; 15: kl. R.

Auch in dem diesem Versuche direkt vorausgehenden war eine auffallend gute Wirkung eines in gleicher Weise hergestellten Filterextraktes aufgefallen, nur war dort nicht die gleiche Menge Wasser an-

gewandt, wie das P. E. selbst, weshalb eine quantitative Beurteilung der Wirkung unmöglich war. Es scheint also, daß, wie sich das Trypsin leicht an Niederschläge heftet, es auch gewissermaßen in das Filter kriechen kann; indessen auch das ist nicht konstant. Ich habe später mehrfach darauf geachtet, aber das Phänomen nie so ausgeprägt gefunden, wie in diesem Falle.

e Am 27. Februar wurde eine größere Menge dieses P. E. (1 Liter) verarbeitet. Es wurde mit Ammonsulfat gesättigt, nachdem es mit Soda kräftig alkalisch gemacht worden war, wodurch vielleicht vermieden werden konnte, daß das resultierende Präparat eine saure Lösung gab und dieses vielleicht auch eine bessere Wirkung versprach. Zu dem gleichen Zwecke wurde der Ammonsulfatniederschlag mit gesättigter Ammonsulfatlösung, die mit Ammoniak deutlich alkalisch gemacht worden war, ausgewaschen, bis das Filtrat biuretfrei war, und der Niederschlag getrocknet. Auch in diesem Falle war das Filtrat von dem Ammonsulfatniederschlage ganz unwirksam auf Fibrin; das Filterextrakt zeigte nicht die auffallend gute Wirkung, wie in den vorhin erwähnten Fällen.

Das Trockenpräparat wog 7,55 g und entspricht also einer 0,75 %igen Lösung.

Eine solche Lösung, alkalisch gemacht, wirkte wie das ursprüngliche P.E. zu dieser Zeit; nämlich 5 Min.: deutl. Z.; 10: kl. R.; sie zeigte aber deutliche Biuretreaktion, wurde von Essigsäure getrübt und gab beim Erhitzen ein deutliches Coagulum.

#### 6. Pankreasextrakt vom 7. März 1902.

Waren bisher die Niederschläge, die bei Ammonsulfatsättigung entstanden, meist von guter Wirkung, gleich oder nahezu so wie das ursprüngliche P.E., so gab die gleiche Behandlung bei diesem P.E. (8. April 1902) kein so günstiges Resultat.

Der P.E. war allerdings schon längere Zeit vorher auf 20 % Ammonsulfat gebracht worden; daß dies aber ohne Einfluß ist, geht aus dem zuletzt beschriebenen Versuch hervor, wo das P.E. sogar auf 25 % Ammonsulfat gebracht worden war. Man hat es eben hier mit einer jener Inkonstanzen zu tun, die einem bei Pankreasextrakten häufig begegnen. Die Wirkung der Lösung des feuchten Niederschlages wurde durch Zusatz von etwas Ammonsulfat gebessert. Die Salzsättigung wurde am 8. April vorgenommen. Ich gebe hier die Wirkung des P.E. an diesem Tage (1), die der Lösung des Niederschlages (2) und die der gleichen Lösung nach Zusatz einiger Tropfen konzentrierter Ammonsulfatlösung (3).

1. 5 Min.: zieml. Z.; 10: kl. R.; 15: sehr ger. R.; 20: gelöst.

2. 5 " : 0; 10: bg. Z.; 20: st. Z.; 30: kl. R.; 40: gelöst.

3. 5 " : bg. Z.; 10: st. Z.; 15: kl. R.; 20: gelöst.

## 7. Pankreasextrakt vom 7. April 1902.

Bei diesem P.E. wirkte die Lösung eines getrockneten Ammonsulfatniederschlages wieder gut, nämlich:

3 Min.: bg. Z.: 5: st. Z.: 10: ger. R.,

also ziemlich ebenso gut wie das P.E. am gleichen Tage (22. April).

Die Lösung des Salzniederschlages gab bei diesem P.E. eine mehr violette Biuretreaktion.

## 8. Pankreasextrakt vom 2. Juni 1902.

a) Eine Ammonsulfatsättigung ergab hier am 10. Juni einen Niederschlag, der alles Wirksame enthielt. Um beim Trocknen möglichst die Dissoziation des Salzes zu verhindern, wurde dasselbe unter einem großen Trichter, unter dem zugleich ein Schälchen mit Ammoniak stand, also in einer Ammoniakatmosphäre getrocknet. Eine 0,8%ige Lösung des Präparates entsprach dem P.E. Eine solche gab deutliche Biuretreaktion. Die Wirkung war (1) im Vergleich mit dem P.E. am gleichen Tage 2):

1. 5 Min.: deutl. Z.: 10: kl. R.; 20: min. R.

2. 2 " : deutl. Z.: 5: mäß. R.; 10: min. R.

Da dies ein ziemlich gutes Resultat war, wenn die Wirkung des Niederschlages auch nicht ganz die des P.E. erreichte, sollte aus dem ganzen P.E. auf diese Weise ein Trockenpräparat hergestellt werden; es wurde jedoch dabei eine fraktionierte Fällung vorgenommen, um in den einzelnen Fraktionen eventuell eine mehr oder weniger große Reinheit des Enzyms zu erzielen. Es wurden daher:

b) 3 Liter P.E. am 23. Juni mit 120 ccm Sodalösung von 10% und 400 g Ammonsulfat versetzt. Von einem dabei entstehenden, geringen Niederschlage wurde abfiltriert. Das Filtrat wirkte noch sehr gut: 5 Min: st. Z.: 10: ger. R.; 15: gelöst. Weitere 400 g Ammonsulfat erzeugen darin einen starken flockigen Niederschlag. Dieser wurde gesammelt, gepreßt, in 300 ccm Wasser gelöst (eine Probe davon, dem P.E. entsprechend aufs 10fache verdünnt und auf 5% NaCl gebracht, wirkte: 10 Min.: zieml. Z.: 15: kl. R.; 20: ger. R., alkalisch gemacht und nochmals mit Ammonsulfat ausgesalzen. Abermals gesammelt, gepreßt und in einer Ammoniakatmosphäre getrocknet: Präparat I.

Eine Probe des Filtrats von dem Niederschlage, der durch die zweiten 400 g Ammonsulfat entstanden war, wurde mit Ammonsulfat gesättigt. Der Niederschlag, gesammelt und ohne vorheriges Trocknen in der entsprechenden Menge Wasser gelöst, wirkte:

5 Min.: zieml. Z.: 10: mäß. R.; 20: sehr ger. R.

Das ganze Filtrat wurde nun mit Ammonsulfat gesättigt, der Niederschlag gesammelt (das Filtrat davon, mit Wasser verdünnt, war wirkungslos auf Fibrin), abgepreßt und wie der erste getrocknet: Präparat II.



Von Präparat I entsprach eine 0.4% ige Lösung dem P.E. Eine solche, alkalisch gemacht, wirkte:

5 Min.: ?; 10: st. Z.; 20: kl. R.; 25: min. R.

Auf 5% NaCl gebracht, wirkte sie:

5 Min.: zieml. Z.; 10: kl. R.,

also besser als vor dem Trocknen!

Von Präparat II entsprach eine 0.3% ige Lösung dem P.E. Eine solche, alkalisch gemacht und auf 5% NaCl gebracht, wirkte:

5 Min.: bg. Z.; 10: mäß. R.; 20: ger. R.; 25: min. R.,

also etwas geringer als vor dem Trocknen.

Wie sich die Wirkung dieser Präparate gegenüber dem P.E. stellte, weiß ich leider nicht zu sagen, da ich an dem Tage, als die Darstellung begonnen wurde, versäumte, die Wirkung des letzteren zu konstatieren. 12 Tage vorher hatte es allerdings wesentlich besser gewirkt.

Merkwürdig ist, daß eine dem P.E. entsprechende Lösung von beiden Präparaten zusammen, nämlich 0.4 von I und 0.3 von II, kaum anders wirkte, als das besser wirkende Präparat I, nämlich auf 5% Kochsalz gebracht:

5 Min.: deutl. Z.; 10: kl. R.

### Zusammenfassung.

Da die Aussalzungen mit Magnesiumsulfat ergeben hatten, daß dadurch meist nur ein Teil des Wirksamen aus Pankreasextrakten gefällt wird, wurde zu denen mit Ammonsulfat geschritten. Dieses Salz fällt schon bei Zimmertemperatur alles Wirksame aus. Aber diese Niederschläge sind ziemlich massig, geben beim Kochen ein reichliches Coagulum und mehr oder weniger deutliche Biuretreaktion.

Die Niederschläge können meist getrocknet werden, ohne etwas oder viel von ihrer Wirksamkeit einzubüßen. Da ich inzwischen mit anderen Niederschlägen die Erfahrung gemacht hatte, daß sie beim Trocknen weniger wirksam werden und dies auf Dissoziation von den Niederschlägen anhaftendem Salz beziehen zu müssen glaubte, versuchte ich, hier einen solchen Niederschlag unter einem großen Trichter, unter dem sich zugleich ein Schälchen mit Ammoniak befand, also in einer Ammoniakatmosphäre zu trocknen. Das Resultat war ein gutes, aber anderen Präparaten, die nicht so behandelt waren, gegenüber nicht das beste, sodaß diese Vorsichtsmaßregel bei diesen Niederschlägen — wir werden sehen.

daß sie bei anderen von Vorteil zu sein scheint — wohl nicht geboten ist.

Langes Liegen dieser Trockenpräparate in Alkohol vermindert ihre Wirksamkeit, während ich verschiedene Male zu beobachten Gelegenheit hatte, daß Trockenpräparate ohne Alkoholbehandlung nach langer Zeit von gleicher Wirkung waren.

Da Jacoby<sup>1)</sup> als untere Grenze der Fällbarkeit des Trypsins eine 65 %ige Sättigung mit Ammonsulfat angegeben hat, war es angezeigt, fraktionierte Fällungen mit diesem Salz vorzunehmen. Meine Resultate weichen von denen Jakobys ab, was aber wohl darin seinen Grund hat, daß Jacoby seine Extrakte verarbeitete, nachdem sie wochenlang im Brutschrank gestanden hatten. Da meine Fällungen nach kürzerer Zeit und meist bei Pankreasextrakten, die nur bei Zimmertemperatur gestanden hatten, gemacht wurden, so waren hier offenbar andere Fällungen zu erwarten als bei Jakobys Extrakten, die schon bei geringeren Sättigungsgraden entstehen und das Trypsin auf sich niederschlagen konnten.

Die untere Fällungsgrenze kann unter diesen Umständen recht tief liegen. Bei dem P.E. vom 2. Juni 1902 erzeugte schon ein Salzgehalt von 25—26 %, also etwa 34 % Sättigung, einen Niederschlag von ziemlicher Wirksamkeit. Beim P.E. vom 2. Juli 1901 war ein Niederschlag von 50 % Sättigung von ziemlicher Wirkung. Bei diesem Extrakte wurde aber die untere Grenze in auffallender Weise verschoben durch eine scheinbar geringfügige Modifikation. Eine Probe war nämlich einen Tag lang bei 30 % Sättigung gestanden, und da der Niederschlag sich sehr gering zeigte, nun erst auf 50 % Sättigung gebracht worden. Jetzt entstand auch dabei nur eine mäßigere Fällung, als wenn das Extrakt gleich auf 50 % Sättigung gebracht wurde, und dieser Niederschlag war auch nur von geringer Wirkung.

Zu einer vollständigen Ausfällung des Trypsins scheint unter den Umständen, unter denen ich arbeitete, eine Ganz-

1) Archiv f. exper. Pathologie, u. Pharmakologie, Bd. XLVI, S. 28.

sättigung nicht nötig zu sein: bei dem P.E. vom 2. Juli 1901 war allerdings der Niederschlag, der nach 75 %iger Sättigung durch vollständige Sättigung entstand, noch etwas — wenn auch wenig — wirksam: bei dem P.E. vom 21. Juni 1901 wurde aber bei 65 % Sättigung schon alles Wirksame ausgefällt.

Die Ammonsulfatsättigungsfällungen sind im allgemeinen von guter Wirksamkeit: nicht immer ganz so gut wie das P.E. selbst, manchmal aber doch auch nicht unerheblich geringer, wie dies namentlich bei der unter 5 c erwähnten Fällung der Fall war. Vielleicht war dort das Trocknen des Präparates daran schuld, was, wie wir sehen werden, öfter einen schädigenden Einfluß hat.

Manchmal wirkt, wie dies auch bei den Magnesiumsulfatfällungen der Fall war, ein solcher Niederschlag etwas besser, als das Extrakt, und wenn das auch hier wenig ist, so wird doch der dort gemachte Schluß dadurch unterstützt. Aber auch hier kommen Fälle vor, die noch mehr dafür sprechen.

Wenn Ganzsättigungsniederschläge von gleicher Wirkung sind, wie das P.E. selbst, nachdem schon vorher etwas Wirksames ausgefällt war, wie sich dies bei dem P.E. vom 2. Juli 1901 (b) zeigte, oder wenn das (Soda-)Extrakt des getrockneten Niederschlages nahezu wie das P.E. selbst wirkt, während das Extrakt des Filters, auf dem der Niederschlag gesammelt worden war, auch noch von sehr guter Wirkung ist, so muß man auch hier annehmen, daß das Gesamtdargestellte von besserer Wirkung sein mußte, wie das P.E. selbst.

Man hätte erwarten müssen, daß die Lösung sämtlicher sich so verhaltender Niederschläge in der gleichen Menge Wasser wie das P.E., aus dem sie hergestellt war, auch besser wirken würden, wie das P.E. selbst, oder das Lösen eines Niederschlages in der schon vorhandenen und mit der gleichen Menge Wasser wie das P.-E. hergestellten Lösung eines anderen die Wirkung dieser ersten Lösung verbessert hätte, wie dies z. B. bei den Magnesiumsulfatniederschlägen vom P.E. vom 12. November 1901 (Nr. 6) der Fall war. Ich habe dies mit den eben besprochenen Niederschlägen nicht gemacht, dagegen gaben Ammonsulfatniederschläge aus dem P.E. vom 2. Juni

1902 in dieser Beziehung ein negatives Resultat. Eine Lösung des ziemlich gut wirkenden Trockenpräparates Nr. I wurde nämlich durch das Auflösen einer entsprechenden Menge des Trockenpräparates II in der Lösung von I nicht gebessert.

Ein Umstand schien sehr gegen die Ammonsulfatfällungen zu sprechen, nämlich der, daß die Lösung eines auf diese Weise dargestellten Trockenpräparates, die von sehr guter Wirkung war, schon nach 24stündigem Stehen bei Zimmer-temperatur eine auffallende Schwächung zeigte (P.E. vom 2. Juli 1901). Von da an blieb sie ziemlich konstant. Ich war geneigt, das auf eine schädigende Wirkung des Salzes zu schieben, das ja immer in ziemlicher Menge den Niederschlägen anhafte; aber diese Schädigung trat nicht immer ein, wie die Haltbarkeit einer solchen Lösung bei dem P.E. vom 3. Dezember 1901 (a) lehrt, die ihre sehr gute Wirkung tagelang bewahrte.

### **Kombination von verschiedenen Salzen und von anderen Fällungsmitteln mit Salzen.**

#### **I. Kombination von Kochsalz und Ammonsulfat.**

##### **A. Kochsalzfällung aus saurer oder saurer und alkalischer Lösung.**

Ausgehend von der Tatsache, daß Kochsalz aus saurer Lösung Eiweißkörper und, teilweise, Albumosen fällt, wurde versucht, diese Methode anzuwenden in der Absicht, dadurch viel Unwirksames zu entfernen, um dann das Wirksame mit Ammonsulfat auszusalzen.

##### **1. Pankreasextrakt vom 3. Dezember 1901.**

Als Säure wurde zunächst eine schwache Säure genommen, von der man weiß, daß sie dem Trypsin nicht schadet, die Salicylsäure. Der erste Versuch fiel nicht befriedigend aus:

a) Am 15. Januar 1902 wurde P. E. auf 1‰ Salicylsäure gebracht. Dabei entstand ein Niederschlag von geringer Wirkung. Im Filtrat erzeugte Sättigung mit Ammonsulfat ebenfalls einen geringen Niederschlag, der aber, wieder gelöst, auch nicht besonders gut wirkte. Das Filtrat von diesem Niederschlag war unwirksam. Besser war das Resultat bei einem zweiten Versuch.

b) Auch diesmal (15. Januar 1902), wurde das P. E. auf 1‰ Salicylsäure gebracht, dann aber mit Kochsalz ganz gesättigt. Nun wurde filtriert, alkalisch gemacht und nochmals mit Kochsalz gesättigt. Dabei

entstand wieder ein Niederschlag, von dem abermals abfiltriert wurde. Dieser Niederschlag enthielt kaum etwas in Wasser Lösliches und scheint hauptsächlich aus Salzen zu bestehen. Die Kochsalzniederschläge sind von geringer Wirkung. Im gesättigten alkalischen Kochsalzfiltrat erzeugte Ammonsulfat einen mäßigen Niederschlag, der, wiedergelöst, violette, beim Kochen bestehen bleibende Biuretreaktion gibt und gut wirkt 1., wenn auch nicht so gut wie das P. E. selbst (2).

1. 5 Min.: zieml. Z.; 10: kl. R.; 15: min. R.

2. 5 Min. st. Z.; 10: gelöst.

## 2. Pankreasextrakt vom 14. Januar 1902.

Weiter wurde versucht, statt der Salicylsäure die Essigsäure anzuwenden.

a. Am 20. Januar wurde eine Probe des Extraktes auf 1" Eisessig gebracht. Dabei entstand eine Trübung. Wurde nun mit Kochsalz gesättigt, so entstand ein Niederschlag. Dieser war in Wasser nicht ganz löslich. Das Lösliche zeigte sich aber, alkalisch gemacht, von guter Wirkung, nämlich:

5 Min.: zieml. Z.; 10: kl. R.; 15: min. R.

(Auch zur Extraktion dieses Niederschlages war die gleiche Menge Wasser wie das in Arbeit genommene P. E. angewandt).

Das kochsalzgesättigte saure Filtrat wurde nun mit Soda deutlich alkalisch gemacht, nochmals mit Kochsalz vollständig gesättigt, wobei eine Trübung entstand, von der abfiltriert wurde. Dies Filtrat wirkte auch noch sehr gut auf Fibrin, nämlich, mit der gleichen Menge Wasser verdünnt:

5 Min.: deutl. Z.; 10: kl. R.; 15: min. R.

Um aus diesem gesättigten, alkalischen Kochsalzfiltrat weiteres mit Ammonsulfat auszufällen, wurde in dasselbe ein Dialysorschlauch mit konzentrierter Ammonsulfatlösung und überschüssigen Krystallen dieses Salzes eingehängt. Diese Methode hat den Vorteil, daß man nach Sättigung das überschüssige Salz leicht mit dem Schlauch wieder herausnehmen kann, während von dem nicht diffundierenden Enzym nichts in den Schlauch gelangt. Durch diese Methode wurde in einem früheren Falle, wo die Bedingungen dazu gegeben waren, alles Wirksame ausgefällt, so daß man sieht, daß hier wirklich ein ausgiebiger Austausch stattfindet. Die Methode ist unter Umständen von großem Vorteil; sie wurde aber von mir nur in seltenen Fällen angewandt, weil die Sättigung auf diese Weise doch weniger rasch geht als durch Zerreiben und Schütteln mit den betreffenden Salzen, wobei in der Regel die feinflockigen, in der Mutterlauge suspendierten Niederschläge sich leicht von den sich rasch zu Boden setzenden Salzkristallen dekantieren lassen. In dem vorliegenden Falle hatte die Methode den Vorteil, daß dabei erkannt wurde, daß durch die Sättigung mit Ammonsulfat nur ein feiner, vorwiegend kristallinischer Niederschlag entstand, von dem sich wenig in Wasser löste.

Diese Lösung hatte nur eine geringe Wirkung auf Fibrin, wohl nur durch mechanisch mitgerissenes Enzym: erst nach 20 Min. zeigte sich beginnender Zerfall.

b) Eine andere Probe dieses P. E. wurde am 23. Januar auf 1% Eisessig und auf 20% NaCl gebracht. Das klare Filtrat davon wurde alkalisch gemacht, wobei nochmals eine geringe Trübung entstand, von der abfiltriert wurde. Das Filtrat davon wurde mit Ammonsulfat gesättigt. Die Fällung, die dabei entstand, war gering, aber, gesammelt, gepresst und wieder gelöst, von guter Wirkung, wenn auch nicht so gut wie das P. E. selbst, nämlich, schwach alkalisch gemacht:

5 Min.: zieml. Z.; 10: mäß. R.; 15: ger. R.

## 2. Pankreasextrakt vom 17. April 1902.

Bei diesem P. E. wurde nur konstatiert, daß hier ebenfalls noch NaCl-Sättigung in saurer Lösung (am 24. April 1902) und Wieder-alkalisch-machen, Sättigung mit Ammonsulfat nur einen geringen Niederschlag erzeugt.

## B. Kochsalzfüllung aus alkalischer oder neutraler Lösung.

### 1. Pankreasextrakt vom 14. Januar 1902.

a) Am 22. Januar wurde eine Probe mit Soda alkalisch gemacht und auf 30% NaCl gebracht. Das Filtrat davon wurde mit Ammonsulfat gesättigt. Der dabei entstehende Niederschlag wurde gesammelt. Das Filtrat davon war noch wirksam, wenn auch nicht sehr rasch; es wirkte, mit der gleichen Menge Wasser verdünnt:

30 Min.: kl. R.; 40: gelöst.

obwohl durch weiteres Eintragen von Ammonsulfat nach längerer Zeit kein weiterer Niederschlag darin entstand. Der Niederschlag, in der entsprechenden Menge Wasser gelöst, gab schwache, aber deutliche Biuretreaktion und wirkte neutral recht gut auf Fibrin (1), noch besser nach dem Schwach-alkalisch-machen (2), wenn auch nicht ganz so gut wie das P. E. selbst (3).

1. 5 Min.: bg. Z.; 15: min. R.

2. 5 Min.: st. Z.; 10: ger. R.

3. 3 Min.: zieml. Z.; 5: mäßige R.; 10: gelöst, und zwar war die Wirkung des P. E. selbst, neutral und alkalisch, ganz gleich.

b) Am 25. Januar wurde eine Probe des P. E. alkalisch gemacht und auf 18% Kochsalz gebracht. Das Filtrat davon wurde mit Ammonsulfat gesättigt und filtriert. Im Filtrat waren am andern Tag Krystalle ausgeschieden. Es wirkte mit der gleichen Menge Wasser verdünnt nur sehr schwach auf Fibrin, erst nach 2 Stunden trat etwas Zerfall ein. Der Niederschlag, in entsprechender Menge Wasser gelöst, gab deutliche, aber mehr violette Biuretreaktion. Die Lösung wirkte ziemlich gut auf Fibrin:

5 Min.: zieml. Z.: 10: mäß. R.: 15: sehr ger. R.:

also kaum anders als in dem letzten Versuch nach 30%iger Sättigung mit Kochsalz.

c) Am 30. Januar wurde eine größere Menge (800 cem) P.E. alkalisch gemacht und auf 18% Kochsalz gebracht, filtriert und das Filtrat mit Ammonsulfat gesättigt. Der nicht unbedeutliche Niederschlag wurde gesammelt. Das Filtrat davon, mit der gleichen Menge Wasser verdünnt, war nur wenig wirksam: an einer Flocke Fibrin zeigte sich erst nach 2 Stunden etwas Zerfall. Eine Probe des Niederschlags, besonders gesammelt und in der gleichen Menge Wasser gelöst, gab nur eine schwache, mehr violette Biuretreaktion und wirkte ziemlich gut, nämlich neutral:

5 Min.: zieml. Z.: 15: ger. R.

Der ganze Niederschlag wurde in 100 cem Wasser gelöst, gut thymolisiert und thymolisiert und am 2. Februar 1902 der Dialyse unterworfen, was in diesem Kapitel besprochen werden wird.

## 2. Pankreasextrakt vom 17. April 1902.

a) Am 24. April wurde eine Probe dieses (alkalischen und 10% Ammonsulfat enthaltenden) P.E. mit Kochsalz gesättigt und filtriert. Der Kochsalzniederschlag war in Wasser und Sodalösung nur wenig löslich und von unbedeutender Wirkung. Das Filtrat wurde mit Ammonsulfat gesättigt, wobei ebenfalls, wie oben nach Kochsalzsättigung in saurer Lösung, nur eine geringe Trübung entstand. Diese, auf ein Filter gesammelt und in der entsprechenden Menge Wasser gelöst, gab gar keine Biuretreaktion, wohl aber, auf ca. 1% Eisessig gebracht, eine Trübung und bei 40° C. einen flockigen Niederschlag. Die Wirkung dieser Lösung war aber nicht besonders gut, nämlich schwach alkalisch gemacht:

5 Min.: ?; 10: st. Z.: 15: kl. R.: 20: min. R.

Nach viertägigem Stehen bei Zimmertemperatur war sie übrigens noch von gleicher Wirkung.

Die geringere Wirksamkeit erklärte sich aber dadurch, daß bei diesem Extrakt nach der alkalischen Kochsalzsättigung durch Ammonsulfat bei Zimmertemperatur nur ein Teil des Wirksamen ausgefällt wurde, während ein nicht unbedeutlicher Teil in Lösung blieb, wie ein zweiter Versuch lehrte:

b) Am 1. Mai 1902 wurden 100 cem des alkalischen P.E. mit Kochsalz gesättigt und das Filtrat davon mit Ammonsulfat. Der dabei entstehende Niederschlag wurde gesammelt und getrocknet. In 50 cem Wasser, also der Hälfte des angewandten P.E., gelöst, hatte er schwach alkalisch gemacht, folgende Wirkung:

5 Min.: ?; 10: deutl. Z.: 15: mäß. R.: 20: kl. R.: 25: ger. R.

Das Filtrat davon wurde nun im Wärmeschrank mit Ammon-

sulfat gesättigt. Hierbei entstand ein neuer Niederschlag: das Filtrat von diesem Niederschlage wirkte, mit gleicher Menge Wasser verdünnt, noch etwas, aber nur schwach, auf Fibrin. Erst nach 40 Min. zeigten sich Anzeigen von Zerfall. Dieser Niederschlag ohne vorheriges Trocknen ebenfalls in 50 ccm Wasser gelöst, wirkte alkalisch:

5 Min.: deutl. Z.; 10: st. Z.; 15: kl. R.; 25: min. R.

Beide Niederschläge wirken also in Anbetracht der Konzentration nicht besonders gut. Wurden aber gleiche Teile der Lösungen der beiden Niederschläge vereinigt, so daß jetzt die Konzentration dem ursprünglichen P.E. entsprach, so war die Wirkung eine gute, wenn sie auch nicht ganz der des P.E. selbst gleichkam, nämlich:

5 Min.: deutl. Z.; 10: mäß. R.; 20: sehr ger. R.; 25: min. R.

Ein nochmaliges Aussalzen dieser vereinigten Lösungen und Wiederrösen des dabei entstandenen Niederschlages hatte keinen schädlichen Einfluß auf die Wirkung. Zu bemerken ist noch, daß der im Wärmeschrank entstehende Niederschlag sich bei Zimmertemperatur wieder auflöst, so daß man also im Wärmeschrank filtrieren muß.

Die geringe Substanzmenge dieser Niederschläge und die fehlende Biuretreaktion (bei dem Warmniederschlage war allerdings eine solche, aber eine sehr schwache, vorhanden) machten es wünschenswert, das ganze P.E. so zu behandeln, um eine größere Menge eines wirksamen Präparates zu erhalten. Leider war der Erfolg in bezug auf die Wirkung kein guter. Es wurden nämlich:

c Am 2. Mai 1902 3 Liter P.E. (alkalisch) mit Kochsalz gesättigt. Es zeigte sich, daß schon dabei etwas Wirksames ausgefällt wurde. Dieser Niederschlag wurde, allerdings ohne vorheriges Auswaschen, mit 100 ccm Wasser extrahiert. Dabei wird nur wenig gelöst; die so konzentrierte Lösung war aber recht wirksam auf Fibrin:

5 Min.: zieml. Z.; 10: kl. R.; 20: gelöst.

Das Filtrat vom Kochsalzniederschlage wirkte aber noch sehr gut, nämlich, mit der gleichen Menge Wasser verdünnt:

5 Min.: deutl. Z.; 10: mäß. R.; 15: ger. R.; 25: gelöst.

Dieses Filtrat wurde nun mit Ammonsulfat bei Zimmertemperatur gesättigt. Eine Probe dieser Lösung mit dem darin suspendierten Niederschlage wurde besonders filtriert und der abgepresste Niederschlag in einer der Probe gleichen Menge Wasser gelöst. Diese Lösung, alkalisch gemacht, wirkte:

5 Min.: Sp. Z.; 15: st. Z.; 30: ger. R.

Der Hauptniederschlag wurde ebenfalls gesammelt und in wenig Wasser (200 ccm) gelöst, um daraus nochmals ausgesalzen zu werden. Vor dem Aussalzen wurde eine Probe der so konzentrierten Lösung untersucht. Sie wirkte auf Fibrin:

2 Min.: deutl. Z.; 5: ger. R.; 8: gelöst.



Eine weitere Probe auf das Volumen des ursprünglichen P.E. verdünnt, zeigte gar keine Biuretreaktion und wirkte, alkalisch gemacht:  
10 Min.: deutl. Z.; 20: mäß. R.; 30: ger. R.; 40: min. R.

Die Hauptmasse der konzentrierten Lösung des Ammonsulfatkaltniederschlags wurde mit 2 cem Sodalösung von 10° versetzt und nochmals mit Ammonsulfat ausgesalzen; der Niederschlag gesammelt, gepreßt, vom Filter genommen und auf eine Glasschale zum Trocknen ausgestrichen. Das Trockenpräparat (b) wog 2.17 g. Eine 0.07° ige Lösung (mit anhaftendem Salz) entsprach also dem ursprünglichen P.E. Eine solche Lösung hatte aber keine sehr gute Wirkung auf Fibrin, nämlich:

15 Min.: eb. bg. Z.; 25: zieml. Z.; 40: st. Z.; 60: mäß. R.

Das Filtrat vom Ammonsulfatkaltniederschlag wurde im Wärmeschrank abermals mit Ammonsulfat gesättigt und im Wärmeschrank filtriert. Dies Filtrat hatte, mit gleicher Menge Wasser verdünnt, nur eine sehr geringe Wirkung auf Fibrin: erst nach 2 Stunden Spuren von Zerfall. Der Niederschlag wurde abgepreßt und in 200 cem Wasser gelöst.

In dieser Konzentration wirkte die Lösung:

2 Min.: deutl. Z.; 5: kl. R.; 9: gelöst.

In einer dem P. E. entsprechenden Verdünnung zeigte die Lösung nur Spuren von Biuretreaktion und wirkte alkalisch gemacht:

5 Min.: Sp. Z.; 10: st. Z.; 15: kl. R.; 20: ger. R.; 25: min. R.

Auch diese konzentrierte Lösung wurde nochmals mit Ammonsulfat ausgesalzen, nachdem sie alkalisch gemacht worden war. Der Niederschlag gesammelt, abgepreßt und getrocknet wog 4.42 g: Präparat H. Dem ursprünglichen Pankreasextrakt entsprach also eine 0.15° ige Lösung.

Eine solche Lösung wirkte genau so wie die entsprechende von Präparat I.

Eine Lösung von Präparat I und II zusammen in einer dem P. E. entsprechenden Menge Wasser, resp. verdünnter Sodalösung, da von Wasser nur ein Teil gelöst wurde, wirkte:

10 Min.: bg. Z.; 20: st. Z.; 40: sehr kl. R.; 55: min. R.

Diese Wirkung steht also sehr beträchtlich hinter der des verarbeiteten Pankreasextraktes zurück. Von ungünstigem Einfluß ist das einfache Trocknen der Salzniederschläge an der Luft. Aber auch die Lösungen der feuchten Niederschläge wirkten bei dieser Darstellung im grossen nicht so gut, wie bei der oben unter b) erwähnten Probedarstellung, und wenn auch schon durch das Kochsalz etwas Wirksames ausgefällt war, so war doch die gleiche Methode auch bei b) angewandt worden. Da beide Darstellungen an aufeinander folgenden Tagen begonnen wurden, so ist auch ein Unterschied in der Zeit, wann dieselben vorgenommen wurden, nicht für die Unterschiede verantwortlich zu machen.

Da die Lösung der beiden Präparate I und II schon eine sehr substanzarme ist, war zu versuchen, ob ihre Wirkung nicht durch Zusatz von Salzen gebessert werde; dies war aber nicht der Fall; denn ein Zusatz bis zu 5% Kochsalz hatte auf die Wirkung kaum einen Einfluß. Wurden dagegen die Präparate I und II zusammen statt mit verdünnter Sodalösung mit durch Ammoniak schwach alkalisch gemachtem Wasser extrahiert resp. gelöst, so war die Wirkung eine etwas bessere, nämlich:

10 Min.: deutl. Z.; 15: st. Z.; 20: mäß. R.; 25: ger. R.; 40: sehr ger. R.; 45: gelöst.

### 3. Pankreasextrakt vom 7. Mai 1902.

Bei diesem P. E. ergab die kombinierte Kochsalz- und Ammonsulfatfällung bessere Resultate als bei dem zuletzt erwähnten:

a) Da das Ammoniak sich als vorteilhaft für die Wirkung des Trypsins gezeigt hatte, wurde am 12. Mai eine Probe des P. E. mit Ammoniak deutlich alkalisch gemacht und mit Kochsalz gesättigt. Das Filtrat wurde mit Ammonsulfat gesättigt. Der dabei entstehende Niederschlag erscheint stärker als der bei dem letzten P. E. (dort war am 7., hier am 5. Tage die Aussalzung vorgenommen, welcher Zeitunterschied wohl kaum in Betracht kommt). Der Ammonsulfatniederschlag wurde getrocknet. Im Filtrat davon entstand bei 40° C. mit mehr Ammonsulfat ein weiterer Niederschlag. (Das Filtrat davon war noch wirksam. Eine Fibrinflocke zeigte darin, nachdem es mit der gleichen Menge Wasser verdünnt war, nach  $\frac{1}{2}$  Stunde beginnenden Zerfall; nach 1 Stunde war sie bis auf kleine Reste gelöst. Vielleicht war die Sättigung bei 40° C. keine ganz vollkommene.) Der bei 40° C. entstandene Niederschlag wurde bei 40° C. gesammelt. Dabei kam ziemlich viel Salz mit aufs Filter. Es wurde dann abgepreßt und mit dem getrockneten Kaltniederschlage zusammen in einer dem verwendeten P. E. entsprechenden Menge Wasser, das durch Ammoniak alkalisch gemacht war, gelöst. Diese Lösung wirkte: 2 Min.: bg. Z.; 5: ziendl. Z.; 10: kl. R. Dabei zeigte die Fibrinflocke eine Art Schrumpfung, sie sah wie angenagt aus. Daran war vielleicht die reichliche Salzmenge schuld, die mit dem Niederschlage gelöst war. Deshalb wurde die Lösung nochmals mit Ammonsulfat gesättigt und mit dem suspendierten Niederschlage sorgfältig vom überschüssigen Salz abgegossen, der Niederschlag gesammelt und abgepreßt. Um beim Trocknen der schädlichen Wirkung einer etwaigen Dissociation des Ammonsulfats entgegen zu wirken, wurde der Niederschlag unter einer grossen Glasglocke in einer Ammoniakatmosphäre getrocknet. Das Trockenpräparat, wieder gelöst, wirkte in der Tat sehr gut, eher etwas besser als die Lösung, aus der es gefällt war. Eine 0.25% ige Lösung entsprach dem P. E. Eine solche gab eine schwache Biuretreaktion und wirkte, mit Soda alkalisch gemacht:

2 Min.: deutl. Z.; 5: mäß. R.; 10: min. R.

Allerdings war die Wirkung des P. E. selbst zu dieser Zeit noch besser, nämlich, mit Soda alkalisch gemacht:

2 Min.: st. Z.: 3: kl. R.: 5: min. R.

Obwohl dies ein sehr gutes Resultat war, sollte bei einem weiteren Versuch die Sättigung bei 40° C. umgangen werden. Das Filtrieren im Wärmeschrank ist immer umständlich, und außerdem müßten größere in Angriff genommene Quantitäten längere Zeit bei 40° C. stehen bis zur Sättigung, so daß die Temperatur schädigend einwirken könnte. Endlich war es vorteilhafter, möglichst die ganze Enzymmenge mit einer Fällung zu erhalten. Dies konnte vielleicht erreicht werden, wenn man nach der Sättigung mit Kochsalz das Filtrat verdünnte und dann mit Ammonsulfat ausfällte, wie ja auch in dem Versuch 2 b) dieser Versuchsreihe durch Sättigung mit Ammonsulfat aus einer kochsalzhaltigen, aber nicht konzentrierten Lösung ein gutes Resultat erzielt worden war.

Das Ergebnis dieses Versuches war jedoch kein durchaus günstiges. Die Wirkung des schließlich erhaltenen Präparates war zwar, allerdings unter bestimmten Bedingungen, auch eine gute, aber es war mehr, dem Gewichte nach.

Ich gebe hier die Beschreibung des Versuches:

b) Am 30. Mai wurden 100 cem. P. E., das inzwischen mit Kochsalz gesättigt worden war, mit Soda und Ammoniak alkalisch gemacht und nochmals mit Kochsalz vollständig gesättigt. Nach dem Abfiltrieren von dem dabei entstandenen Niederschlage wurde das Filtrat mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und nun mit Ammonsulfat ausgesalzen. (Das Filtrat davon, mit der gleichen Menge Wasser verdünnt, wirkte sehr schwach auf Fibrin. Erst nach 2 Stunden zeigte sich beginnender Zerfall.) Der Niederschlag wurde gepreßt, vom Filter genommen und getrocknet. Er wog 0,44 g. Ein entsprechendes Extrakt mit verdünnter Sodalösung wirkte nicht sehr gut:

10 Min.: bg. Z.: 15: deutl. Z.: 35: ger. R.

Dabei trat wieder eine Schrumpfung der Fibrinflocke ein. Da dies in dem vorigen Versuch an einer zu großen Salzmenge gelegen zu haben schien, wurde versucht, das Salz durch Baryumcarbonat zu entfernen. In der Tat wirkte das Filtrat davon wesentlich besser, und es trat vor der Lösung des Fibrins keine Schrumpfung ein:

5 Min.: zieml. Z.: 10: mäß. R.: 15: ger. R.

Seltamerweise wirkte aber auch ein einfach wässriges Extrakt des Trockenpräparates, das erst nach der Extraktion alkalisch gemacht worden war, besser und ohne Schrumpfung:

5 Min.: deutl. Z.: 10: kl. R.

Noch besser wirkte das Extrakt, wenn es auf 5% NaCl gebracht und alkalisch gemacht worden war:

5 Min.: st. Z.: 10: min. R.

Diese Lösung war allerdings wenig haltbar; denn am andern

Tag (sie war über Nacht neutral, aber mit 5% NaCl gestanden) wirkte sie, wieder alkalisch gemacht:

5 Min.: ?; 10: zieml. Z.; 20: kl. R.; 30: ger. R.; 35: min. R.

c) Ehe ich diese letzte Erfahrung gemacht hatte, hatte ich schon begonnen, das ganze P. E. in der unter b) angeführten Weise zu behandeln. Es wurde alkalisch mit Kochsalz gesättigt, das Filtrat mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und dann mit Ammonsulfat ausgesalzen. Nun aber wurde der dabei entstehende Niederschlag, nachdem er gepreßt und vom Filter genommen war, mit Baryumcarbonat zerrieben und dann getrocknet.

Das Resultat war kein günstiges; denn ein dem P. E. entsprechendes wässriges Extrakt wirkte, nachdem es alkalisch gemacht war:

10 Min.: bg. Z.; 20: deutl. Z.; 30: st. Z.; 45: maß. R.

Durch Zusatz von Kochsalz wurde es nur wenig gebessert, ebenso wenig durch Ammonsulfat oder Ammoniak. Auch die Extraktion des Präparates mit verdünnter Sodalösung hatte keinen besseren Erfolg.

## II. Kombination von Magnesium- und Ammonsulfat.

Da die Kombination von Kochsalz und Ammonsulfat manche Vorteile bot, da aber durch das Kochsalz aus alkalischer Lösung nur wenig Unwirksames entfernt wurde, so konnten vielleicht durch die anfängliche Behandlung mit einem Salz, das überhaupt stärker fällende Eigenschaften hat wie das Kochsalz, ohne schon so früh Wirksames auszufällen wie das Ammonsulfat, nämlich dem Magnesiumsulfat und nachfolgender Ammonsulfatsättigung noch bessere Resultate erzielt werden. Indessen hat dies Verfahren andere Nachteile, sodaß es sich weniger empfiehlt. Der Versuch, der in dieser Richtung gemacht wurde, war folgender:

Pankreasextrakt vom 17. April 1902.1)

Am 28. April wurde eine Probe dieses Extraktes auf 20% Magnesiumsulfat gebracht, wobei ein Niederschlag entstand, von dem abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde alkalisch gemacht und mit Ammonsulfat gesättigt. Dabei schien ein nicht bedeutender amorpher Niederschlag zu entstehen, daneben aber, und deshalb war der amorphe Niederschlag schwer zu erkennen, entstand ein sehr feiner, sich lange in Suspension haltender krystallinischer Niederschlag, sei es, daß ein Salz das andere aussalzte, oder daß ein neues Salz entstand, der kaum von dem amorphen zu trennen war. Der Niederschlag, gesammelt, war zwar von ziemlicher Wirkung und zeigte nur geringe Biüretreaktion, da aber seine Wirkung doch auch geringer war als die des P.E., habe ich diese Kombination nicht weiter in Anwendung gebracht.

1) Ich habe diesen Versuch erst später gemacht; sachlich gehört er aber hierher.

### III. Kombination von Magnesium- und Natriumsulfat.

Pankreasextrakt vom 12. November 1901.

Am 15. November wurde eine größere Menge dieses P. E. (200 ccm) auf 35° Magnesiumsulfat gebracht und filtriert. Das Filtrat wurde bei Zimmertemperatur mit Magnesiumsulfat gesättigt (eine Probe des Magnesiumsulfatniederschlags, in Wasser gelöst, gab diesmal eine schwache Biuretreaktion).

Eine Probe des kaltgesättigten Filtrats wurde zunächst bei Zimmertemperatur mit Natriumsulfat gesättigt. Der dabei entstandene Niederschlag, in der gleichen Menge Wasser gelöst, zeigte nur eine sehr zweifelhafte Biuretreaktion und wirkte:

5 Min.: bg. Z.; 10: st. Z.; 15: ger. R.; 20: min. R.

Aber das Filtrat war auch noch wirksam, nämlich mit der gleichen Menge Wasser verdünnt:

20 Min.: bg. Z.; 40: st. Z.; 1 St.: ger. R.

Dies Filtrat wurde deshalb bei 40° C. nochmals mit Natriumsulfat gesättigt. Der dabei entstehende Niederschlag gab eine schwache Biuretreaktion und wirkte, in gleicher Menge Wasser gelöst, auffallend gut im Vergleich zu der (allerdings mit Wasser aufs Doppelte verdünnten) Lösung, aus der er gefällt war, nämlich:

5 Min.: deutl. Z.; 10: kl. R.; 15: ger. R.; 20: gelöst.

Am folgenden Tage hatte diese Lösung noch genau die gleiche Wirkung.

Durch die Sättigung mit Natriumsulfat bei 40° C. war aber alles Wirksame ausgefällt, da das Filtrat, mit der gleichen Menge Wasser verdünnt, sich auf Fibrin ganz wirkungslos zeigte.

Der Hauptmagnesiumsulfatniederschlag wurde gesammelt und getrocknet: Präparat I.

Das Filtrat davon wurde in ganz der gleichen Weise behandelt wie die Proben, und es lieferten, nach dem Trocknen, der Natriumsulfatkalt-niederschlag: Präparat II und der Natriumsulfatwarmniederschlag: Präparat III.

Präp. I wog 5,45 g

» II » 1,68 »

» III » 1,28 »

Da 1200 ccm P. E. in Arbeit genommen waren, entsprach also dies Lösungen:

für Präp. I von 0,45 %

» » II » 0,14 %

» » III » 0,107 %

Die Lösungen dieser Präparate waren nicht von der erwarteten Wirkung.

Präp. I in 0,5 % iger Lösung wirkte:

5 Min.: Sp. Z.: 10: zieml. Z.: 15: st. Z.: 20: maß. R.: 25: kl. R.  
30: ger. R..

Eine 1%ige Lösung dieses Präparates war dagegen von recht guter Wirkung:

5 Min.: st. Z.; 10: ger. R.; 15: gelöst.

Präp. II wirkte in etwas konzentrierterer Lösung, als dem P. E. entsprochen hätte, nämlich in 0.2%iger Lösung:

3 Min.: ?; 10: deutl. Z.; 15: zieml. Z.; 20: st. Z.; 25: maß. R.

Präp. III, ebenfalls in 0.2%iger Lösung:

5 Min.: bg. Z.; 10: zieml. Z.; 15: st. Z.; 20: maß. R.

Das Gleiche mit verdünnter Sodalösung statt mit Wasser extrahiert, etwas besser:

5 Min.: bg. Z.; 10: maß. R.; 15: kl. R.; 20: ger. R.

Merkwürdig war, daß eine Lösung aller 3 Präparate zusammen im Verhältnis von Präp. I: 1% ; Präp. II: 0.1% ; Präp. III: 0.1% nicht besser, sondern eher etwas weniger gut wirkte, als eine 1%ige Lösung von Präp. I allein, nämlich:

5 Min.: bg. Z.; 10: maß. R.; 15 ger. R.; 20: min. R.

Vor dem Sammeln der Niederschläge der Hauptdarstellung, die Präp. II und III lieferten, waren Proben mit den suspendierten Niederschlägen abgemessen und besonders filtriert worden. Die Niederschläge waren abgepreßt und noch feucht in der gleichen Menge Wasser wieder gelöst worden.

Diese Lösungen wirkten sehr gut, nämlich die Lösung des Natriumsulfatkaltniederschlags:

5 Min.: zieml. Z.; 10: kl. R.; 15: ger. R.; 20 gelöst;  
die des Natriumsulfatwarmniederschlags:

5 Min.: st. Z.; 10: ger. R.; 15: gelöst;

eine Wirkung, die der des P. E. selbst ziemlich nahe kommt. Dieses wirkte nämlich am 18. November:

2 Min.: deutl. Z.; 5: maß. R.; 10: gelöst.

Wenn man bedenkt, daß die Lösungen der Trockenpräparate etwas konzentrierter waren, als die der feuchten Niederschläge, so erkennt man, daß das Trocknen an der Luft ungünstig einwirkte. Da die Präparate II und III in Wasser ganz löslich waren, kann es sich dabei nicht etwa um Bindung von Enzym an unlösliche Körper handeln.

#### IV. Essigsäure und Trichloressigsäure.

Bei der Kombination von Ammonsulfatfällung mit vorausgehender Kochsalzfällung aus saurer Lösung war von dem Gedanken ausgegangen worden, durch letztere unwirksame Eiweiß- und andere Körper auszufällen. Das Verfahren führte nicht zum Ziele, weil schon durch das Kochsalz viel Wirksames gefällt wurde und im noch wirksamen Filtrate Ammonsulfat nur sehr unvollkommene Fällungen erzeugte. Es wurde

daher ein anderes eiweißfällendes Mittel versucht, die Trichloressigsäure und außerdem die Essigsäure allein, die schon Kühne zur Ausfällung eines indifferenten Körpers, den er Leukoid genannt hatte, benutzt hatte. Nach den Untersuchungen von Umber<sup>1)</sup> dürfte es wohl kaum zweifelhaft sein, daß es sich hier um die Nucleinsäure handelt, die nach ihm als Zersetzungsprodukt der Nucleoproteide der Drüsen in reichlicher Menge in den Pankreasextrakten vorkommt.

### A. Essigsäure.

Pankreasextrakt vom 7. Februar 1902.

Eine Probe dieses P. E. wurde mit Essigsäure kräftig angesäuert. Dabei entstand eine starke Trübung. Im Filtrat davon erzeugte weitere Essigsäure nichts mehr. Wieder alkalisch gemacht, hatte dies Filtrat nichts von seiner Wirksamkeit eingebüßt; aber, wie schon Kühne angegeben hat, wird mit Essigsäure in der Wärme noch mehr ausgefällt. In der Tat gaben Lösungen, die in der Kälte mit Essigsäure keine Trübung mehr gaben, bei 40° C. neue, recht beträchtliche Niederschläge und zwar immer wieder von neuem. Ich bin bis zu 6% Eisessig gegangen und auch dabei entstand bei 40° C. noch eine neue Trübung. So hoher Säuregehalt schadet aber dem Trypsin, wie nach dem Wieder-Alkalischemachen dieser Lösungen auch konstatiert werden konnte. Als ich diesen Versuch machte, hatte ich übersehen, daß das P. E. schon eine ziemliche Menge Salz enthielt, nämlich 25% Ammonsulfat, so daß es sich bei der Fällung mit Essigsäure auch um andere, nämlich Eiweißkörper, handeln konnte. Ich habe deshalb den Versuch nochmals an einem P. E. kontrolliert, das nur mit Wasser hergestellt war. Dieses wurde zunächst auf 1% Eisessig gebracht; dabei entstand ein Niederschlag bei 40° C., von dem abfiltriert wurde. Das Filtrat blieb nun bei 40° C. klar; auf Zusatz von weiterer Essigsäure entstand aber eine neue Trübung. So wurde fortgefahren bis zu 4% Eisessig; aber auch in dem bei 40° C. an sich wieder klar bleibenden Filtrat erzeugte weiterer Zusatz von Essigsäure bis zu 6% Eisessig eine neue — nun allerdings geringe — Trübung.

Es gibt aber eine andere Methode, Lösungen zu erhalten, die frei sind von dem durch Essigsäure fällbaren Körper, wenn man nämlich Trockenpräparate mit verdünnter Essigsäure extrahiert. Ich nahm dazu ein Präparat des gleichen P. E., das oben unter den Ammonsulfatfällungen (5 d) erwähnt ist. Wurde dies mit einer dem P. E. gleichen Menge von verdünnter Essigsäure, die 1% Eisessig enthielt, extrahiert, so gab das Extrakt weder in der Kälte, noch bei 40° C. eine Spur von Trübung. Aber, wie oben erwähnt wurde, daß Wasser nur einen Teil dieses Trockenpräparates löste, so auch die Essigsäure.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. klin. Mediz., Bd. 43, Heft 3 u. 4.

der Rest war in Sodalösung löslich und gab, angesäuert, in der Kälte eine Trübung, bei 40° C. eine flockige Fällung. Nach dem Alkalisieren wirkte das Essigsäureextrakt aber nicht besser als das wässrige, das auch nicht gut wirkte. Die Lösung gab eine deutliche Biuretreaktion und beim Erhitzen ein mäßiges Coagulum.

Wendet man schwächere Essigsäure an, so wird etwas mit mehr Essigsäure bei 40° C. Fällbares extrahiert, ebenso wenn man zur Extraktion 1%ige Essigsäure in geringerer Menge anwendet.

Besser war das Resultat bei dem oben (unter S. 5 c) erwähnten Trockenpräparat. Ein Extrakt desselben mit der gleichen Menge 1%iger Essigsäure wie das ursprüngliche P. E. wirkte nach dem Wieder-Alkalisieren ebensogut, wie das hier auch gut wirksame Wasserextrakt. Ich kann aber nicht unerwähnt lassen, daß weitere, in der gleichen Weise angestellte Versuche öfters auch ein weniger günstiges Resultat hatten.

### *B. Trichloressigsäure.*

Da man in der Trichloressigsäure ein starkes eiweißfällendes Mittel besitzt, war auch diese zu probieren. Vielleicht wurde auch damit neben Eiweiß die Nucleinsäure ausgefällt.

Dabei hat sich gezeigt, daß bei nicht allzugroßem Zusatz wohl ein Niederschlag erzeugt wurde, daß aber im Filtrat davon sogar noch coagulables Eiweiß vorhanden war. Alkalisches gemacht, wirkte dies Filtrat noch recht gut auf Fibrin. Wurde aber von vornherein mehr Trichloressigsäure angewandt, so hatte das alkalisch gemachte Filtrat sehr an Wirksamkeit eingebüßt.

### **Zusammenfassung.**

Das Versetzen von Pankreasextrakten mit Kochsalz hat, selbst wenn dies nicht bis zur Sättigung geschieht, im allgemeinen den Vorteil, daß eine darauf folgende Sättigung mit Ammonsulfat geringere Niederschläge erzeugt, nicht etwa weil durch das Kochsalz schon vieles Unwirksame ausgefällt würde; denn die Kochsalzfällungen bei alkalischer Reaktion sind selbst bei Sättigung gering, sondern das Ammonsulfat fällt dann überhaupt weniger aus. Es zeigen sich aber darin auch Verschiedenheiten, indem z. B. beim P.E. vom 7. Mai 1902 dieser Niederschlag etwas stärker war wie bei andern, wenn auch immerhin noch wesentlich geringer als Ammonsulfat-sättigungsfällungen allein. Trotzdem daß diese Niederschläge im allgemeinen gering sind, ist in ihnen unter den gleich zu



beschreibenden Bedingungen das meiste Wirksame enthalten. Da Kochsalz aus saurer Lösung viel mehr Eiweißkörper fällt als aus neutraler oder alkalischer, wurde dies zuerst probiert. Dies ist aber nicht statthaft, da in diesem Falle sich schon viel, ja, wie es scheint, das meiste Wirksame in diesem Niederschlag befindet, wenigstens wenn als Säure Essigsäure angewandt wird. Nimmt man statt dieser Salicylsäure, so war das Resultat in einem Falle ein günstigeres.

Aber auch wenn man das P.E. zuerst alkalisch macht und mit Kochsalz sättigt, fallen die darauffolgenden Ammonsulfatniederschläge geringer aus. Die bei alkalischer Lösung mit Kochsalz entstehenden Niederschläge sind wohl auch etwas wirksam, wie man namentlich sieht, wenn man einen solchen, der in einer größeren Menge P.E. entstanden ist, in wenig Wasser löst: die Wirkung ist aber doch so gering, daß der Niederschlag vernachlässigt werden kann. Eine Ammonsulfat-sättigung pflegt dann einen Niederschlag zu erzeugen, der manchmal gar keine Biuretreaktion gibt. Er enthält manchmal das meiste Wirksame (P.E. vom 14. Januar 1902), öfter jedoch ist er von mäßiger Wirkung. Dies kommt aber daher, daß in diesen Fällen nach vorheriger Kochsalzsättigung das Ammonsulfat in der Kälte nicht mehr alles Wirksame ausfällt: denn wenn man die Filtrate davon bei 40° C. von neuem mit Ammonsulfat aussalzt, entsteht ein neuer wirksamer Niederschlag. Aber auch das Filtrat davon zeigt noch eine, wenn auch schwache, Wirkung. Da der in der Wärme entstandene Niederschlag sich beim Abkühlen wieder löst, muß auch im Wärmeschrank filtriert werden.

Ich hatte bei der Fällung mit Kochsalz aus saurer Lösung noch nicht auf den Umstand geachtet, daß Ammonsulfat nach Kochsalzbehandlung in der Kälte nicht alles Enzym ausfällt, und es wäre dort vielleicht bei 40° C. mehr Wirksames ausgefallen: indessen empfiehlt sich diese Methode, wie oben erwähnt, schon deshalb nicht, weil das Kochsalz aus saurer Lösung schon viel Wirksames ausfällt. Auch die bei 40° C. entstehenden Niederschläge sind nicht so wirksam wie das P.E. selbst: hier aber tritt der Fall ein, daß durch Ver-

einigung der Kalt- und Warmniederschläge eine bessere Wirkung erzielt wird.

Diese Erfahrung, an kleineren Proben gemacht, sollte beim P.E. vom 17. April 1902 für das ganze Extrakt verwertet werden. Hier waren aber, obwohl in der gleichen Weise verfahren wurde, wie bei den Proben, schon die feuchten Niederschläge etwas weniger wirksam wie bei jenen, und dieselben büßten beim Trocknen an der Luft noch erheblich an ihrer Wirksamkeit ein. Eine Lösung der beiden Trockenpräparate (Kalt- und Warm-Ammonsulfatniederschlag) in der dem P.E. entsprechenden Menge Wasser stellte eine 0,22 % Lösung dar, war also in Anbetracht des Umstandes, daß den Niederschlägen immer viel Salz anhaftet, von sehr geringem Gehalt an dem P.E. entstammender Substanz, was, wie wir sehen werden, von Bedeutung ist. Die Erfahrungen am P.E. vom 7. Mai 1902 haben gezeigt, daß man eine recht substanzarme Lösung (0,25 % mit Salz) mit dieser Methode erzielen kann, die, trotzdem daß einer der beiden Niederschläge vorher getrocknet war und beide Niederschläge zusammen gelöst und nochmals mit Ammonsulfat ausgesalzen waren, nahezu wirkt wie das P.E. selbst. Es scheint, daß hierbei das Trocknen des Niederschlages in einer Ammoniakatmosphäre das günstige Resultat bedingte, da ähnliche Niederschläge (P.E. vom 17. April 1902, c) beim Trocknen gelitten hatten. In diesem Falle war auch durch die Sättigung bei 40° C. nicht alles Wirksame ausgefällt. Da aber das aus diesem Extrakt erhaltene Präparat so gut wirksam war, dürfte auch dieser Fall darauf deuten, daß sich das Enzym im P.E. selbst nicht unter den für seine Wirkung günstigsten Bedingungen findet.

Die Methode der Kombination von Kochsalzsättigung in alkalischer Lösung und Ammonsulfat hat also ziemliche Vorteile: da aber gut wirkende, substanzarme Lösungen immer noch Biuretreaktion geben, von der wenigstens die Warmniederschläge nicht ganz frei sind, und der Methode eine gewisse Unzuverlässigkeit zugeschrieben werden muß, so kann sie nicht unbedingt empfohlen werden.

Wenn man das Kochsalz anfänglich nicht bis zur Sät-

tigung angewendet, so bleibt bei höheren Konzentrationen nach der Kaltsättigung mit Ammonsulfat immer noch viel Wirksames in Lösung, bei Konzentrationen, die etwa einer Halbsättigung mit Kochsalz entsprechen, wird durch das Ammonsulfat zwar das meiste Wirksame schon in der Kälte gefällt, die Niederschläge sind aber schon von größerer Masse.

Immerhin sind auch diese Niederschläge geringer als Ammonsulfatfällungen allein, und es ist damit ein Verfahren an die Hand gegeben, das eine modifizierte Kochsalz-ammonsulfatmethode zuläßt. Man kann nämlich zunächst das P.E. alkalisch mit Kochsalz sättigen und filtrieren. Das Filtrat wird mit der gleichen Menge Wasser verdünnt, so daß es nun eine halbgesättigte Kochsalzlösung darstellt, und nun mit Ammonsulfat ausgesalzen. Ein so behandeltes P.E. (7. Mai 1902) ergab ein Trockenpräparat, von dem eine 0,44%ige Lösung dem P.E. entsprach von ziemlich guter Wirkung. (Das eigentümliche Verhalten eines Sodaextraktes dieses Präparates, seine Besserung durch Ausfällen des Ammonsulfates mit Baryumcarbonat und die ungünstige Wirkung dieses letzteren Salzes bei einer größeren Darstellung will ich hier nur noch einmal beiläufig erwähnen und verweise wegen der Einzelheiten auf die Beschreibung der Versuche.) Diese letzte Lösung wurde noch gebessert, wenn man sie auf 5% Kochsalz brachte, sie zeigte sich aber wenig haltbar. In einem anderen Falle (P.E. v. 17. April 1902 — Hauptdarstellung) war Kochsalz von geringem Einfluß auf das nicht gut wirkende Trockenpräparat-extrakt, dagegen zeigte dies, durch Ammoniak alkalisch gemacht, eine nicht unwesentliche Verbesserung.

Von anderen Salzkombinationen wurde noch die von Magnesium- und Ammonsulfat versucht, die wegen des dabei entstehenden feinen krystallisierten Niederschlages unbequem ist, und außerdem die Kombination von Magnesium und Natriumsulfat. Das dazu verwandte P.E. war das schon bei den Aussalzen mit Magnesiumsulfat allein erwähnte vom 12. November 1901. Wie dort wurde das Extrakt zuerst auf 35% des Salzes gebracht und das Filtrat damit in der Kälte ganz gesättigt. Entgegen dem dort beschriebenen Niederschlage

zeigte derselbe diesmal eine — wenn auch schwache — Biuretreaktion. In dem gesättigten Magnesiumsulfatfiltrat erzeugt nun Natriumsulfat einen neuen Niederschlag, der aber auch noch nicht alles Wirksame enthält: dieses wird aber von dem Salze bei 40° C. vollständig ausgesalzen. Die Natriumsulfatniederschläge sind sehr substanzarm und von guter Wirkung; der in der Wärme entstehende nahezu so gut wie das P.E. selbst. Da aber der Kaltniederschlag und der Magnesiumsulfatniederschlag auch recht wirksam sind, so hat man hier durch die Isolierung wieder mehr Wirksames erhalten, als in dem P.E. enthalten zu sein schien.

Der Natriumsulfatkaltniederschlag gab kaum eine, der Warmniederschlag eine schwache Biuretreaktion. Die Lösung des letzteren zeigte sich am folgenden Tage in ihrer Wirkung nicht verringert.

Leider verlieren diese Natriumsulfatniederschläge sehr an Wirksamkeit durch das Trocknen an der Luft (bei dem Magnesiumniederschlage wurde keine Bestimmung der Wirkung des feuchten Niederschlages gemacht). Sie sind sehr substanzarm. Von dem Kaltniederschlage (+ Salz) entspricht eine 0,14%ige Lösung, von dem Warmniederschlage eine 0,107%ige Lösung dem P.E.

Die Lösung des Magnesiumpräparates, die in konzentrierter Lösung, als dem P.E. entspricht, gut wirkt, wird aber durch Lösen der Natriumsulfatpräparate in derselben in entsprechendem Verhältnis nicht gebessert.

Ich reihe an diese Übersicht der Kombinationssalzfällungen noch die Resultate der anfänglichen Behandlung mit Essigsäure und Trichloressigsäure. Die letztere, als stark eiweißfällendes Mittel bekannt, hat gezeigt, wie schwer die coagulablen Körper des P.E. auszufällen sind, wenn man das Fällungsmittel nicht in allzugroßer Menge anwendet; in letzterem Falle ist es dem Enzym schädlich.

Von der Essigsäure war zu erwarten, daß sie einen Körper, das Leukoid Kühnes, das sich wahrscheinlich mit der Nucleinsäure Umbers deckt, ausfalle; aber auch hier muß man zur vollständigen Ausfällung dieses Körpers so hohe

Säuregrade bei 40° C. anwenden, daß sie dem Enzym schädlich werden.

Von diesem Körper ganz freie Lösungen, die aber auch noch Coagulables und Biuretgebendes enthalten, erhält man durch Extraktion von Trockenpräparaten mit 1%iger Essigsäure, die davon nur wenig löst. Diese Lösungen sind, wieder alkalisch gemacht, manchmal — leider nicht immer — von guter Wirksamkeit.

### Die Dialyse.

Die Niederschläge, die man durch Aussalzen erhielt, waren, namentlich wenn dazu nur ein einziges Salz verwendet wurde, von ziemlicher Masse und man durfte erwarten, wie dies ja schon Kühne getan hat, durch die Dialyse neben dem an den Niederschlägen haftenden Salz auch andere Stoffe zu entfernen und so das Postulat substanzarmer Lösungen zu erfüllen.

Das Resultat war, daß diese Lösungen an Wirksamkeit einbüßen, oder daß wenigstens die Lösung von Fibrin in ihnen verzögert wird, daß ihre Lösungsfähigkeit aber durch Zusatz von Salzen wieder erhöht werden kann.

#### 1. Pankreasextrakt vom 21. Juni 1901.

Die Lösung der Magnesiumsulfatfällung dieses Extraktes, die wie das P. E. selbst gewirkt hatte (vgl. oben), wurde nach der von Kühne eingeführten Methode der Dialyse in einem Pergamentschlauch, der in fließendes Wasser gehängt wird, dieser Operation unterworfen. Dabei entstand ein Niederschlag. Von demselben löste sich nur wenig in verdünnter Sodalösung und diese Lösung hatte nur eine sehr geringe Wirkung auf Fibrin, aber auch die von dem bei der Dialyse entstandenen Niederschläge filtrierte Flüssigkeit war weniger wirksam, als man — auch die durch die bei der Dialyse entstehende Verdünnung in Betracht gezogen — hätte erwarten sollen. Diese Lösung wurde auf einem flachen Teller bei 40° eingedampft und der Trockenrückstand in einer dem P. E. entsprechenden Menge Wasser, worin er leicht und vollkommen löslich war, wieder gelöst. Auch die Wirkung dieser Lösung war sehr vermindert.

#### 2. Pankreasextrakt vom 24. Juli 1901.

Die Lösung des oben bei den Magnesiumsulfataussalzen, aus halbgesättigter Lösung mit Alkohol ausgefällt und in wenig Wasser

gelösten Niederschlages wurde am 9. August dialysiert. Nach 3tägiger Dialyse war das Volumen der Gesamtflüssigkeit, die auf mehrere Dialysorschläuche verteilt worden war, auf 800 ccm gestiegen (während ursprünglich 1400 ccm P. E. verarbeitet wurden). In den Schläuchen befindet sich ein Niederschlag. Dieser wurde gesammelt, mit einer entsprechenden Menge verdünnter Sodalösung extrahiert und auf Fibrin probiert. Die Lösung zeigte sich etwas wirksam, aber gering, jedenfalls schwächer als das Filtrat. Die Wirkung des letzteren war aber auch sehr vermindert. Es wirkte, wie es war, also konzentrierter als das P. E., so, daß, nachdem es alkalisch gemacht war, eine Fibrinflocke nach 10 Min. Spuren von Zerfall, aber erst nach 30 Min. einigermaßen deutlichen Zerfall zeigte. Wurde aber etwas Kochsalz zugesetzt, so war die Wirkung etwas besser, nämlich:

10 Min.: bg. Z.: 30: ziemi. Z.; 50: mäf. R.

Das Filtrat gab keine Biuretreaktion, schwache Xanthoproteinsäurereaktion, aber beim Ansäuern und Kochen ein mäßiges Koagulum.

Dies Filtrat wurde, gut toluolisiert, aufbewahrt. Es büßte mit der Zeit sehr an Wirksamkeit ein. Am 28. Oktober zeigte eine Fibrinflocke erst nach 15 Minuten beginnenden Zerfall (nachdem etwas Kochsalz zugesetzt war) und am 24. Februar 1902 traten unter den gleichen Bedingungen, erst nach einer Stunde, Spuren von Zerfall an Fibrin ein.

Bemerkenswert ist, daß zu dieser letzten Zeit (es wurde früher nicht untersucht) auch nach dem Kochen keine Biuretreaktion vorhanden war, was der Fall hätte sein müssen, wenn Kühnes Anschauung richtig wäre, daß das Trypsin beim Kochen in koagulables Eiweiß und Antipepton zerfällt. Nun war jetzt in der Lösung, nach der Wirkung zu urteilen, nur wenig Trypsin mehr vorhanden, aber wenn dies vorher schon im Sinne Kühnes gespalten gewesen wäre und das Antipepton durch Trypsin nicht weiter verändert wird, so hätte die Lösung ja an und für sich schon die Peptonreaktion geben müssen.

### 3. Pankreasextrakt vom 14. Januar 1902.

Die oben bei der kombinierten Kochsalz-ammonsulfatfällung unter B1c) erwähnte konzentrierte Lösung jenes Niederschlages, dessen Wirkung, in einer der Konzentration des P. E. entsprechenden Lösung, eine gute war:

5 Min.: ziemi. Z.: 15: ger. R.

war am 2. Februar 1902 der Dialyse unterworfen worden. Schon am folgenden Tage waren nur noch Spuren von Cl und  $H_2SO_4$  nachzuweisen. In den Dialysorschläuchen war ein starker Niederschlag entstanden. Die Gesamtflüssigkeit war von 100 ccm auf 150 ccm gestiegen. Eine Probe dieser wurde abfiltriert und, dem ursprünglichen P. E. ungefähr entsprechend, auf das 5fache verdünnt. Diese Lösung hatte nur eine geringe Wirkung auf Fibrin:

20 Min.: Sp. Z.: 30: deutl. Z.

Auffallend war, daß das unverdünnte Filtrat im Verhältnis zum verdünnten von ziemlich geringer Wirkung war:

15. Min.: Sp. Z.: 20; deutl. Z.: 25; maß. R.; 1 St.: ger. R.

Wurde diesem aber etwas Kochsalz zugesetzt und schwach alkalisch gemacht, so war die Wirkung besser:

10 Min.: zieml. Z.: 20; kl. R.: 30; gelöst.

Eine unfiltrierte Probe der dialysierten Flüssigkeit wurde mit etwas Sodalösung versetzt. Dabei löste sich der Niederschlag auf. Diese Lösung, aufs 5fache verdünnt, wirkte besser als das verdünnte Filtrat allein, nämlich:

10 Min.: bg. Z.: 20; zieml. Z.: 30; st. Z.

Diese Lösung wurde aber durch Zusatz von Kochsalz sehr wesentlich gebessert:

5 Min.: zieml. Z.: 10; st. Z.: 15; kl. R.

Dies steht im Widerspruch zu dem P. E. selbst, bei dem weder die Reaktion noch der Zusatz von Kochsalz einen Einfluß auf die Wirkung hatte (vgl. S. 440 u. 496). Dies dürfte so zu erklären sein, daß das Trypsin in wässrigen Lösungen schlecht lösend auf Fibrin wirkt. Diese lösende Wirkung wird unterstützt durch Salze; ob es im Pankreasextrakt selbst auch Salze oder nur Salze sind, die seine rasch lösende Wirkung bedingen, bleibt dahingestellt. Solche verdünnte Lösungen sind übrigens auch sehr wenig haltbar, denn eine nur über Nacht bei Zimmertemperatur gestandene Probe wirkte am folgenden Tage, nachdem sie jetzt erst, um den Niederschlag zu lösen, alkalisch gemacht und mit Kochsalz versetzt war, weniger als die schon gestern so behandelte Probe, welche letztere auch heute noch von gleicher Wirkung war. Damit ist also eine unterstützende und schützende Wirkung des Kochsalzes konstatiert.

Die Hauptmasse der dialysierten Flüssigkeit wurde filtriert, das Filtrat toluolisiert und aufgehoben, der Niederschlag abgepreßt, vom Filter genommen und getrocknet. Das Filtrat gab kaum eine Biotreaktion, während der Niederschlag diese recht deutlich zeigte. Der getrocknete Niederschlag wog 0.272 g. Da ursprünglich 800 cem P. E. verarbeitet wurden, würde dies daher einer 0,034%igen Lösung entsprechen. Eine 0.05%ige Lösung desselben in verdünnter Soda wirkte nach Zusatz von etwas Kochsalz:

10 Min.: Sp. Z.: 20; zieml. Z.: 30; maß. R.

Also nicht gerade gut. Dieser Niederschlag wird wohl durch das Trocknen an Wirksamkeit eingebüßt haben (eine genaue Prüfung einer Lösung des feuchten Niederschlages allein wurde nicht gemacht), aber man sieht daraus, daß man an organischer Substanz recht arme Lösungen erhalten kann, die nimmer noch eine nicht ganz unerhebliche Wirkung zeigen.

In konzentrierter alkalischer Lösung (0.25%) wirkte das Präparat nach Zusatz von etwas Kochsalz sehr gut:

5 Min.: st. Z.: 10; sehr kl. R.: 15; gelöst.

Am anderen Tag wirkte aber diese Lösung, trotz des Kochsalzzusatzes weniger:

5 Min.: bg. Z.: 10: zieml. Z.: 15: mäß. R.: 20: kl. R.: 25: ger. R.

### Zusammenfassung.

Bei der Dialyse von Lösungen der Salzfällungen pflegt ein Niederschlag zu entstehen. Das Enzym verteilt sich dabei in verschiedenen Fällen verschieden auf Niederschlag und Lösung. Ist dasselbe auf beide ungefähr gleich verteilt, so wirkt eine Probe, in der der Niederschlag durch Soda wieder zur Lösung gebracht ist, besser als das bei der Dialyse gelöst Gebliebene oder die Sodalösung des Niederschlages allein. Das gelöst Gebliebene zeigt unter Umständen gar keine Biuretreaktion und nur schwache Xanthoproteinsäurereaktion (P. E. v. 24. Juli 1901).

Im allgemeinen ist die Wirkung des Dialysierten sehr verringert, und wird es noch mehr beim Eindampfen bei 40° C. Die Wirkung kann aber durch Zusatz von Salzen ganz erheblich gebessert werden. Beim P. E. vom 24. Juli 1901 war dies allerdings nur in geringem Maße der Fall, wohl aber bei dem P. E. vom 14. Januar 1902. Die dialysierte Salzniederschlagslösung dieses Extraktes verlor schon am andern Tage noch wesentlich von ihrer Wirksamkeit, aber auch dies wurde durch den Zusatz von Kochsalz verhindert. Das Kochsalz übt also unter Umständen eine unterstützende und schützende Wirkung auf das Enzym aus. Es scheint daraus hervorzugehen, daß substanzarme Lösungen des Trypsins schlecht wirken und leicht vernichtet werden, was vielleicht auch den Schlüssel dazu gibt, warum substanzarme Salzniederschläge schon beim Trocknen an der Luft so sehr an Wirksamkeit einbüßen.

Bisher haben meine Versuche gezeigt, daß man aus Pankreasdrüsen durch Extraktion bei Zimmertemperatur Lösungen erhalten kann, die in bezug auf die Auflösung von Fibrin von sehr guter Wirkung sind. Weiter habe ich gezeigt, daß man durch verschiedene Aussalzungsverfahren reinere Enzympräparate erhalten kann, die oft ebenso gut wirken wie



die Extrakte selbst. Es fragt sich nun zunächst, wie sich diese Präparatlösungen den Pankreasextrakten gegenüber im weiteren Verlauf der Verdauung verhalten, und ob wir mit diesen und mit den Pankreasextrakten selbst Verdauungsversuche bei Zimmertemperatur unternehmen dürfen. Zur Beantwortung dieser Fragen sind wir auf die Untersuchung der Lösungs- und Zersetzungsprodukte unter diesen Verhältnissen im Vergleich mit den bei 40° C. entstehenden angewiesen, und ich gehe zu den von mir gemachten Erfahrungen über, wenn sie auch längst nicht erschöpfend sind.

## Lösungs- und Zersetzungsprodukte.

### I. Beobachtungen an Pankreasextrakten.

#### A. Selbstverdauung.

##### 1. Pankreasextrakt vom 4. Juni 1901.

Nachdem dieses Extrakt auf den zerkleinerten Drüsen einen Monat im Wärmeschrank gestanden hatte (5. Juli), gab eine filtrierte Probe desselben beim Kochen noch ein — allerdings geringes — Koagulum, während schon am 7. Juni die Biuretreaktion sehr schwach ausgefallen war. Vom 5. Juli ab stand das Extrakt, immer noch auf den Drüsen bei Zimmertemperatur. Nach beinahe 9 Monaten (18. März 1902) gab dasselbe immer noch ein geringes Koagulum, aber keine Biuretreaktion mehr. Bei einem mikroskopischen Präparate schied sich am Deckglasrand nur Leucin aus. Das Pankreasextrakt war zu dieser Zeit noch wirksam. Allerdings wurde es nicht selbst geprüft, aber eine wiedergelöste Ammonsulfatfällung wirkte noch:

15 Min.: Sp. Z.; 30: deutl. Z.; 45: ziemi. Z.

##### 2. Pankreasextrakt vom 11. Juni 1901.

Eine Probe dieses P.E., nachdem es 24 Stunden im Wärmeschrank gestanden hatte, filtrierte, gab eine sehr deutliche Biuretreaktion. Angesäuert und gekocht, gab es ein reichliches Koagulum und im Filtrat davon war die Biuretreaktion ebenso deutlich. Kochsalzsättigung erzeugte in neutraler Lösung gar keine Fällung; in saurer eine mäßige Trübung.

Dieses P.E. blieb bis zum 17. Juni im Wärmeschrank, an diesem Tage wurde das Extrakt koliert und filtrierte. Von da ab stand das Filtrat bei Zimmertemperatur. Am 4. Juli zeigte das Filtrat beim Kochen nur noch Opaleszenz. Die Biuretreaktion fiel schwach aus, beim Kochen verschwand sie, auch beim Zusatz von mehr Kupfersulfat.

## 3. Pankreasextrakt vom 18. Juni 1901.

Am 19. Juni gab eine filtrierte Probe ein reichliches Koagulum beim Kochen, nachdem das Extrakt über Nacht auf dem Drüsenbrei im Wärmeschrank gestanden hatte. Sättigung mit Kochsalz gab keine Fällung.

## 4. Pankreasextrakt vom 21. Juni 1901.

Von hier ab wurden alle Extrakte bei Zimmertemperatur gemacht. Das Extrakt wurde am 24. Juni koliert und filtriert. Am 31. Oktober 1901 gab das Filtrat bei ziemlich guter Wirkung (vergl. S. 438) kaum eine Biuretreaktion.

## 5. Pankreasextrakt vom 2. Juli 1901.

Am 8. Juli koliert und filtriert. Am 11. November 1901 zeigte das Filtrat, nachdem es am 31. Oktober noch ziemlich gut gewirkt hatte (vergl. S. 438), gar keine Biuretreaktion. Beim Erhitzen entstand ein beträchtliches Koagulum; das Filtrat davon gab ebenfalls keine Biuretreaktion, wohl aber das Koagulum selbst, nachdem es in der Natronlauge gelöst war. Dies ist wichtig, weil daraus hervorgeht, daß ein biuretgebender Körper in Lösung sein kann, in diesem Falle koagulables Eiweiß, ohne daß die Reaktion direkt erkannt wird.

## 6. Pankreasextrakte vom 9. Juli 1901.

Filtrierte Proben dieser Extrakte zeigten alle 4 nach 2 Tagen eine mäßige Biuretreaktion; dieselbe neigte leicht zum Violett, blieb aber beim Kochen bestehen.

## 7. Pankreasextrakt vom 14. Januar 1902.

Bei diesem Pankreasextrakte habe ich weniger die Produkte der Selbstverdauung als eines der Lösung zu erwähnen. Wurde nämlich am 15. Januar eine Probe filtriert und in destilliertes Wasser getropft, so entstand eine Trübung. Stärker war die Trübung, wenn das Filtrat in verdünnte Salzsäure (0,2%) getropft wurde. Es dürfte sich hier um Myosin handeln, das aus den Drüsen extrahiert wird. Dasselbe wird bei Zimmertemperatur vom Trypsin langsam angegriffen; denn am 7. Februar 1902 trat diese Trübung in Salzsäure immer noch ein, wenn sie auch bedeutend schwächer geworden war. Im Widerspruch steht damit die Beobachtung vom P.E. vom 18. Juni 1901, indem dort am folgenden Tage durch Sättigung mit Kochsalz keine Fällung eintrat, wodurch doch Myosin ausgesalzen wird; es müßte denn gerade sein, daß dort die Wärme eine rasche Zersetzung dieses Körpers durch das Trypsin begünstigt hätte.

## 8. Extrakt aus Trockenpankreas.

Es stand mir dazu ein Trockenpankreaspräparat zu Gebot, was

schon vor einigen Jahren im hiesigen physiologischen Institut nach Kühnes Vorschrift hergestellt war.

Am 26. Juni 1901 setzte ich davon 100 g mit 500 ccm Wasser unter Zusatz von Chloroform an und ließ es bei Zimmertemperatur stehen. Am andern Tag war eine Probe des Gemisches noch wenig wirksam, indem eine Fibrinflocke erst nach 25 Min. beginnenden Zerfall zeigte. Am 5. Juli war dagegen die Wirkung eine recht gute geworden = 5 Min.: st. Z.: 15: gelöst. Angesäuert und gekocht, schied sich ein starkes Koagulum aus und die Lösung zeigte eine intensive, auch beim Kochen bestehen bleibende Biuretreaktion. Das Extrakt war am 4. Juli filtriert worden. Am 9. Juli hatte sich kein Tyrosin ausgeschieden; aber auch beim Eindampfen auf dem Objektträger war mikroskopisch nur Leucin zu erkennen. Erst am 28. Oktober 1901 begann sich in dem filtrierten Extrakt Tyrosin auszuschcheiden.

Aber auch bei Proben, die in der Wärme gestanden waren, war der negative Tyrosinbefund auffallend.

Eine Probe, die 3 Tage im Wärmeschrank gestanden hatte, gab ein dem Anscheine nach etwas geringeres Koagulum als die Proben bei Zimmertemperatur; auch hier schied sich beim Eindampfen auf dem Objektträger nur Leucin aus.

Selbst bei einer Probe die 21 Tage im Wärmeschrank gestanden hatte, fand unter den gleichen Bedingungen nur Leucinausscheidung statt.

## B. Verdauung von Fibrin.

Zunächst wurde der Unterschied der Lösung einer Fibrinflocke in der Wärme und bei Zimmertemperatur festgestellt; dazu wurde eine Probe des P.E. vom 21. Juni 1901 verwendet. Am 28. Juni wurde eine solche in zwei gleiche Teile geteilt, in jeden eine Fibrinflocke gebracht und die eine Probe bei Zimmertemperatur, die andere im Wasserbad von 38° C. beobachtet. Der Zeitunterschied in der Lösung war ein beträchtlicher. Während bei 38° C. die Flocke in 5 Minuten nahezu gelöst war, fand sich bei Zimmertemperatur nach 10 Minuten starker Zerfall, nach 30 Minuten geringe Reste und nach einer Stunde erst vollständige Lösung. Bei zwei alkalisch gemachten Proben waren die Lösungszeiten die gleichen wie bei den neutralen.

Eine größere Menge Fibrin wurde von diesem Extrakt bei Zimmertemperatur im Verlauf von 4 Stunden zu einer trüben, aber dünnen Flüssigkeit verwandelt, die leicht abfiltriert werden konnte und auf dem Filter einen verhältnismäßig geringen Rest zurückließ.

War damit eine gut lösende Wirkung konstatiert, so konnte auch gezeigt werden, daß auch bei Zimmertemperatur eine weitere Zersetzung eintritt, denn in dem filtrierten Fibrinverdauungsgemisch, das bis da immer bei Zimmertemperatur gestanden hatte, zeigte sich am 4. Juli

eine sehr reichliche Tyrosinausscheidung. Daneben fand sich aber noch viel einfach gelöstes Eiweiß; denn die Flüssigkeit gab beim Kochen ein reichliches Koagulum. Die Biuretreaktion fiel deutlich aus und blieb bei genügendem Kupfersulfatzusatz auch beim Kochen bestehen.

#### Pankreasextrakt vom 11. Juni 1901.

Eine Probe dieses P.E., das im Wärmeschrank hergestellt war, wurde am 17. Juni filtriert, alkalisch gemacht, mit Fibrin gestopft und in den Wärmeschrank gestellt. Nach einigen Tagen konnte klar abfiltriert werden.<sup>1)</sup> Das Filtrat wurde in den Wärmeschrank gestellt. Nach 17 Tagen entstand beim Ansäuern und Kochen ein mäßiges flockiges Koagulum. Nach weiteren 26 Tagen fanden sich Bakterien darin, aber kein Fäulnisgeruch. Die Lösung wurde neu desinfiziert und wieder in den Wärmeschrank gestellt. Am 12. November 1901 war noch eine deutliche, wenn auch schwache Biuretreaktion zu konstatieren. Die Wirkung der Lösung auf eine neue Fibrinflocke war noch vorhanden, aber schwach; dieselbe ging erst im Laufe des Tages bei 40° C. in Lösung.

#### Pankreasextrakt vom 2. Juli 1901.

1. Am 5. Juli wurde eine (etwas verdünnte) Probe dieses Extraktes mit Fibrin gestopft und in den Wärmeschrank gestellt. Am folgenden Tage: trübe Flüssigkeit, die leicht und klar filtrierte. Das Filtrat wirkt nun auf Fibrin:

30 Min.: bg. Z.; 50: ger. R.

Es gab schon heute beim Ansäuern und Kochen nur ein geringes, flockiges Koagulum. Die Biuretreaktion fiel sehr intensiv aus, und blieb beim Kochen bestehen.

2. Am 25. Juli wurde eine Probe des Extraktes mit Fibrin gestopft und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach einigen Stunden war das Fibrin in eine Grütze verwandelt und am andern Tag in eine sirupöse trübe Flüssigkeit, die bald klar filtrierte. Ein Tropfen davon, in destilliertes Wasser gebracht, ergab eine Fällung, die auf Zusatz von etwas Kochsalzlösung verschwand. In verdünnte Salzsäure getropft, gab es keine Trübung. Es kann sich hier um Heteroalbumose handeln, wahrscheinlicher jedoch um Globulin, was sich ja bekanntlich in Pankreasverdauungen bei Anwendung von rohem Fibrin findet. Auffallend war auch hier die schwere Aussalzbarkeit des Körpers durch Kochsalz. Erst bei ganz vollständiger Sättigung entstand eine Fällung, stärker nach vorherigem Ansäuern. Die Lösung zeigte sich noch wirksam, eine in eine Probe gebrachte Fibrinflocke zeigte bei 40° C. nach 30 Min. starken Zerfall.

<sup>1)</sup> Solche Verdauungsgemische pflegen anfangs trüb, nach einiger Zeit aber klar zu filtrieren. Die Filtration geht aber meist sehr langsam.

Am 9. August wurde von viel Tyrosin abfiltriert. Das Filtrat gab in Wasser getropft nur noch eine Trübung, beim Kochen ein starkes Koagulum. Die Biuretreaktion war deutlich, verschwand aber beim Kochen. Wurde mehr Kupfersulfat hinzugesetzt, so wurde die Flüssigkeit beim Kochen dunkelbraun-gelb. Am andern Tag hatte sich in der Probe ein Niederschlag abgesetzt, die darüber stehende Flüssigkeit war schön kirschrot. Diese wurde abgegossen und wieder erwärmt, dabei bläute die Farbe etwas ab, beim Zusatz von mehr Kupfersulfat und abermaligem Kochen blieb sie aber bestehen.

Am 28. Oktober wurde nochmals von viel Tyrosin abfiltriert. Die Wirkung des Filtrates auf Fibrin bei 40° C. war:

30 Min.: bg. Z.: 45: st. Z.: 1 St.: mäß. R.

Beim Kochen bildete sich ein reichliches Koagulum. Die Biuretreaktion fiel im Nichtkoagulierten violett aus, beim Kochen wurde die Farbe rot.

Am 17. Februar 1902 wurde wieder von wenig Tyrosin abfiltriert. Beim Kochen entstand ein ziemliches Koagulum. Im Filtrat davon war die Biuretreaktion sehr deutlich. Nun stellte ich das Verdauungsgemisch in den Wärmeschrank. Am 24. Februar gab die Lösung beim Kochen immer noch ein Koagulum, das aber geringer zu sein schien. Im Filtrat davon war die Biuretreaktion sehr deutlich, verschwand aber beim Kochen, auch beim Zusatz von mehr Kupfervitriol.

Wirkung zeigte das Gemisch immer noch auf Fibrin bei 40° C., nämlich:

30 Min.: bg. Z.: 45: zieml. Z.: 1 St.: mäß. R.; 2 St.: gelöst.

#### Extrakt aus Trockenpankreas.

Gegenüber den oben erwähnten geringen Tyrosinmengen, die bei diesem Extrakt bei der Selbstverdauung wahrgenommen wurden, war die reichliche Ausscheidung dieses Körpers bei einer Fibrinverdauung bemerkenswert. Eine solche wurde am 10. Juli bei Zimmertemperatur angesetzt. Am 11. Juli stellte dieselbe eine trübe Flüssigkeit dar, die klar filtriert wurde. Am 15. Juli hatte sich reichlich Tyrosin ausgeschieden, von dem abfiltriert wurde. Die Lösung gab beim Kochen starkes Koagulum und intensive, beim Kochen bestehen bleibende Biuretreaktion. Am 22. Juli war eine neue Tyrosinausscheidung eingetreten.

## II. Beobachtungen an Enzympräparaten.

### 1. Pankreasextrakt vom 21. Mai 1901.

Zwei Magnesiumsulfatfällungen, eine aus neutraler, eine aus alkalischer Lösung, die beide gleich gut gewirkt hatten (vgl. oben: Aussalzung von P. E. durch Magnesiumsulfat 2 b), wurden am 13. Juni 1901 mit Fibrin gestopft und ins Wasserbad von 40° C. gestellt. Nach 4½ Stunden war das Meiste gelöst und es konnte eine leicht opalisierende

Flüssigkeit abfiltriert werden. Das Filtrat wurde am 14. Juni wieder warm gestellt. Am 15. Juni wurde von viel Tyrosin abfiltriert. Das Filtrat gab beim Ansäuern und Kochen ein starkes Koagulum und das Filtrat davon eine intensive Biuretreaktion. Am 17. Juni war in dem Gemisch ein flockiger Niederschlag entstanden, von dem nur langsam und nicht ganz klar abfiltriert werden konnte. Auch in diesem Filtrat entstand beim Kochen noch ein beträchtliches Koagulum. Dagegen erzeugte am 5. Juli Ansäuern und Kochen nur noch eine leichte Trübung. Schon am 2. Tage der Verdauung wirkte eine Probe des Gemischs langsam lösend auf Fibrin, nach 30 Minuten war erst starker Zerfall eingetreten und erst nach einer Stunde war die Flocke bis auf geringe Reste gelöst.

## 2. Pankreasextrakt vom 24. Juli 1901.

Durch Dialyse einer Magnesiumsulfatfällungslösung war aus diesem Extrakt eine verhältnismäßig reine und substanzarme Enzymlösung erhalten worden. Das Filtrat des Dialysierten enthielt in diesem Falle die Hauptmasse des Wirksamen. Allerdings war dies Filtrat schon sofort wenig wirksam und büßte mit der Zeit noch sehr an Wirksamkeit ein. Kochsalzzusatz besserte dieselbe nur wenig.

a) Am 31. Oktober wurde eine Probe dieses Filtrats alkalisch gemacht und mit einer mäßigen Menge Fibrin in ein Wasserbad von 40° C. gestellt. Zu dieser Zeit (resp. am 28. Oktober) war die Wirkung des Filtrats derart, daß sich an einer Flocke Fibrin, nachdem etwas Kochsalz zugesetzt war, nach 15 Minuten beginnender Zerfall zeigte.

Der jetzt angestellte Verdauungsversuch wurde ohne Kochsalzzusatz gemacht. So wirkte diese Lösung auf die größere Menge Fibrin recht schwach. Nachdem das Gemisch über Nacht bei 40° C. gestanden war, zeigte sich das Fibrin allerdings zerbröckelt; es schien aber noch wenig gelöst zu sein, denn in einer filtrierten Probe gab der Zusatz von Essigsäure zwar eine geringe Trübung, die aber beim Kochen kaum vermehrt wurde; auch viel Alkohol gab nur eine geringe Fällung. Das Gemisch wurde wieder warm gestellt. Am 2. November gab Zusatz von Essigsäure wieder eine geringe Trübung, wurde davon abfiltriert und gekocht, so entstand nun aber ein mäßiges Koagulum. Am 4. November entstand beim schwachen Ansäuern keine Trübung mehr, aber beim Kochen ein deutliches Koagulum. Im Filtrat davon ließ sich beim Eindampfen auf dem Objektträger kein Leucin und Tyrosin erkennen; wurde aber mit Alkohol gefällt, wobei auch nur ein geringer Niederschlag entstand, und das Filtrat davon in einer Schale eingedampft, so blieb eine sirupöse Masse, in der reichlich Leucin und Tyrosin auskrystallisierten. Die Lösung wirkte noch auf Fibrin, aber sehr schwach, erst nach 2 Stunden zeigte sich beginnender Zerfall.

b) Eine andere Probe des Filtrates vom Dialysierten wurde

am 28. Oktober 1901 alkalisch gemacht, etwas Kochsalz zugesetzt, mit Fibrin gestopft und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Am 31. Oktober stellt das Gemisch einen dünnen Rahm dar, von dem nach einiger Zeit ein klares Filtrat erzielt wird. In destilliertes Wasser getropft, entsteht eine starke Trübung. Aus der alkalischen Lösung fällt Sättigung mit Kochsalz viel aus. Am 8. Februar 1902 war das Gemisch auf Fibrin bei 40° C. noch wirksam, wenn auch langsam: erst nach 2 Stunden trat deutlicher Zerfall ein. Beim Eindampfen auf dem Objektträger scheidet sich Leucin und Tyrosin aus. Am 11. Februar entstand beim Eintropfen in destilliertes Wasser keine Trübung mehr. Bei Zusatz von Natronlauge: starke Trübung; deutliche Biuretreaktion. Bei schwachem Ansäuern entsteht eine Trübung, im Filtrat davon beim Kochen ein mächtiges Koagulum.

c) Sogar gekochtes Fibrin wird von dieser schwach wirkenden Enzymlösung bei Zimmertemperatur angegriffen und sogar ohne Zusatz von Soda und Kochsalz. Ein solches Gemisch wurde am 13. Dezember 1901 angesetzt. Am folgenden Tage zeigte sich das Fibrin deutlich angenagt. Da am 18. Dezember eine filtrierte Probe des Gemisches kaum mehr auf (ungekochtes) Fibrin wirkte, indem erst nach 24 Stunden etwas Zerfall zu erkennen war, wurde der Versuch am 19. Dezember abgebrochen. Das Gemisch wurde filtriert, angesäuert und gekocht und nochmals filtriert. In diesem Filtrat erzeugte viel Alkohol einen mäßigen, klebrigen Niederschlag. Die Biuretreaktion fiel deutlich aus. Eine Ausscheidung von Leucin und Tyrosin war aber weder direkt, noch nach dem Eindampfen des Alkohols zu erkennen. Allerdings ist zu erwähnen, daß die alkoholische Lösung zu einer leicht trocknenden, harten, zuletzt rissig werdenden Masse eindampfte, aus der wohl die Ausscheidung von Krystallen erschwert war.

### 3. Pankreasextrakt vom 14. Januar 1902.

Aus diesem P. E. war durch kombinierte Kochsalz- und Ammonsulfatbehandlung ein Niederschlag erhalten, der gelöst und der Dialyse unterworfen worden war. Diese Lösung war nach Lösung des bei der Dialyse entstandenen Niederschlages durch Soda und Zusatz von etwas Kochsalz gut wirksam und hatte sich auch als haltbar erwiesen.

a) Eine solche Probe wurde am 4. Februar mit Fibrin gestopft und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 3 Tagen wurde filtriert. Das Filtrat blieb weiter bei Zimmertemperatur stehen. Am 1. Mai 1902 war viel Tyrosin ausgeschieden, von dem abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde angesäuert und gekocht (leider habe ich über die Menge des Koagulums keine Aufzeichnungen gemacht); das Filtrat davon gab eine deutliche Biuretreaktion, die aber beim Kochen abblaste. Wurde mehr Kupfersulfat zugesetzt, so wurde die Probe beim Kochen mifarben. Am andern Tag hatte sich ein Niederschlag gebildet und die darüber stehende Flüssigkeit war rötlich-violett. Eine andere Probe des

Verdauungsgemisches wurde mit viel Alkohol gefällt. Der dabei entstehende Niederschlag gab eine schön purpurne Biuretreaktion und die Farbe blieb beim Kochen bestehen.

Das Verdauungsgemisch wirkte zu dieser Zeit noch mäßig auf Fibrin, allerdings war nach 20 Minuten bei 40° C. noch keine Wirkung zu erkennen. Die Probe blieb dann über Nacht bei Zimmertemperatur stehen, am andern Morgen war die Fibrinflocke gelöst.

b) Ein Extrakt des Filters, auf dem der Niederschlag, dessen Lösung der Dialyse unterworfen wurde, gesammelt worden war, mit wenig Wasser war von guter Wirkung (5 Min.: zieml. Z.; 20: gelöst). Es gab ein Koagulum beim Kochen, aber kaum Biuretreaktion, die erst nach längerem Stehen deutlich wurde.

Dies Extrakt wurde in 2 Teile geteilt, von denen der eine am 14. Februar 1902 mit Fibrin gestopft wurde. Das Gemisch blieb einige Stunden bei 40° C stehen, wobei schon nach 20 Minuten starke Erweichung des Fibrins eintrat; sodann bei Zimmertemperatur. Nach 5 Tagen wurde filtriert und die andere Hälfte des Extraktes zugesetzt, um reichlich Enzym zu haben. Nach 16 Tagen wurde von viel Tyrosin abfiltriert. Die Wirkung war noch recht gut: 5 Min.: bg. Z.; 15: ger. R. In destilliertes Wasser getropft, entstand keine Trübung, aber beim Kochen ein reichliches Koagulum. Im Filtrat davon war die Biuretreaktion deutlich, beim Kochen bestehen bleibend. Nun wurde das Gemisch in den Wärmeschrank gestellt. Nach weiteren 11 Tagen gab es beim Kochen nur noch eine Trübung. Die Biuretreaktion fiel mehr violett aus und verschwand beim Kochen. Das Gemisch war noch wirksam, wenn auch weniger: 15 Min.: bg. Z.; 25: st. Z.; 40 ger. R.

#### 4. Pankreasextrakt vom 17. April 1902.

a) Verschiedene Ammonsulfat-Kalt- und Warmfällungen aus diesem P. E. waren vereinigt worden. Die Lösung war einige Zeit gestanden, ehe sie zu einem Verdauungsversuch verwendet wurde, woher wohl ihre nicht gerade sehr rasche Wirkung rühren mochte. Diese war nämlich:

10 Min.: zieml. Z.; 15: st. Z.; 30: ger. R.

Sie wurde auf  $\frac{1}{4}\%$  trockene Soda gebracht, in 2 Teile geteilt, die beide mit Fibrin gestopft wurden (15. V.) Die eine Probe wurde bei Zimmertemperatur stehen gelassen (1), die andere im Wärmeschrank (2). Am Abend desselben Tages waren beide Gemische zu dünnen, rahmigen Flüssigkeiten geworden; am folgenden Tage wurden beide filtriert. Beide filtrierten langsam, das Filtrat war leicht opalisierend.

Am 29. Mai fand sich in (2) Tyrosin ausgeschieden, in (1) nicht.

Am 4. Juni gab (1) beim Ansäuern und Kochen ein beträchtliches Koagulum, das Filtrat davon deutliche Biuretreaktion; die Farbe wurde beim Kochen heller, aber in der Nuance mehr zwirbelrot.



2) gab beim Ansäuern und Kochen nur eine geringe, feinflockige Trübung. Das Filtrat verhielt sich in bezug auf die Biuretreaktion wie (1).

b) Eine in wenig Wasser gelöste Probe eines Ammonsulfat-kaltniederschlags war von sehr guter Wirkung:

2 Min.: deutl. Z.; 5: ger. R.; 8: gelöst.

Sie wurde am 5. Mai mit reichlich Fibrin beschickt, welches in 5 Min. bei 40° C. nahezu gelöst war. Am Abend kam die Probe in den Wärmeschrank. Am 27. Mai wurde filtriert. Die Filtration ging ziemlich gut und die Lösung war noch ziemlich wirksam, nämlich:

10 Min.: bg. Z.; 15: ziemi. Z.; 20: mäß. R.; 30: sehr kl. R.; 45: gelöst.

Angesäuert und gekocht gab das Gemisch ein geringes, flockiges Koagulum. Das Filtrat davon gab eine sehr deutliche Biuretreaktion, die sich beim Kochen entfärbte.

#### 5. Pankreasextrakt vom 12. November 1901.

Bei diesem P. E. habe ich die Wirkung der ausgesalzenen Präparate auf eine Albumoselösung zu erwähnen. Aus den Trockenpräparaten, die oben erwähnt wurden, wurde eine Lösung hergestellt, indem 0,5 g Präp. I, 0,1 g Präp. II und 0,1 g Präp. III zusammen mit 50 ccm Wasser extrahiert wurden. Das Filtrat wirkte recht gut auf Fibrin, nämlich: 5 Min.: deutl. Z.; 10: mäß. R.; 15: ger. R.; 20: min. R. In 40 ccm dieser Lösung wurden am 10. Dezember 1901 0,8 g eines Protoalbumosepräparates gelöst, das vor längerer Zeit im hiesigen physiologischen Institut dargestellt war. Die Lösung dieses Präparates an sich gab eine sehr gute Biuretreaktion. Dieses Gemisch wurde bei Zimmertemperatur stehen gelassen und von Zeit zu Zeit auf die Biuretreaktion untersucht. Am 29. Januar 1902 fiel die Biuretreaktion bedeutend schwächer aus als am Anfang, und am 9. April 1902 war dieselbe ganz geschwunden. Die Lösung wirkte zu dieser Zeit noch immer ziemlich gut auf eine Flocke Fibrin bei 40° C., nämlich:

10 Min.: ziemi. Z.; 15: kl. R.; 20: ger. R.; 30: gelöst.

### Zusammenfassung.

Die Hauptergebnisse dieser Beobachtungen über Lösungs- und Zersetzungsprodukte sind folgende:

Man kann in der Wärme sowohl als auch in der Kälte Pankreasextrakte erhalten, die eine schwache oder gar keine Biuretreaktion geben und dabei doch noch wirksam sind.

Sehr schwer wird durch die Verdauung ein Körper bewältigt, der als genuines Eiweiß aufzufassen ist, da er beim Erhitzen auskoaguliert und der sich in Pankreasextrakten

auch nach langem Verweilen in der Wärme, wenn auch in geringer Menge, noch vorfinden kann. Dieser Körper kann, isoliert, selbst noch die Biuretreaktion geben, wenn sie auch im ganzen P. E. nicht mehr erkannt wird.

Auch bei der Verdauung von Fibrin wird ein koagulabler Körper gefunden, aber dieser wird in der Wärme zum größten Teil oder ganz weiter zersetzt, was deshalb nicht sicher zu entscheiden ist, weil sich eben im P. E. selbst der eben erwähnte resistente Körper findet. Jedenfalls geht aber die Zersetzung der größten Menge derselben bei gut wirkenden Extrakten in der Wärme rasch, da bei einer mit Fibrin gestopften Probe vom P. E. vom 2. Juli schon am folgenden Tag nur noch ein geringes Koagulum beim Erhitzen entstand. Bei Zimmertemperatur wird dieser Körper jedoch mindestens langsamer angegriffen, da er sich hier nach längerer Zeit in nicht unbeträchtlicher Menge findet; dennoch unterliegt auch dabei ein Teil des Eiweißes weiterer Zersetzung, wie namentlich aus der reichlichen Tyrosinausscheidung hervorgeht.

Die Biuretreaktion habe ich bei Fibrinverdauungen nie ganz schwinden gesehen; trotzdem daß die Extrakte am Ende der Versuche noch, wenn auch oft nur noch schwach, wirksam waren. Sie kann aber, namentlich in der Wärme, recht schwach werden, oder nachweislich nur einem kongulablen Körper zukommen. Für die Salzfällungslösungen hat sich ergeben, daß man keinen Grund hat, sie nicht an Stelle der Pankreasextrakte zu verwenden. Ihre Wirkung ist am Ende der Verdauungsversuche selbst in der Wärme nicht ganz aufgehoben. Auch sehr schwach wirkende Lösungen bringen Fibrin zur Lösung und bilden Zersetzungsprodukte.

Aber auch von diesen Lösungen werden gewisse koagulable Eiweißkörper in der Kälte nur sehr schwer angegriffen, während sie in der Wärme bis auf geringe Reste weiter zersetzt werden.

Für die Biuretreaktion gilt das Gleiche wie bei den Pankreasextrakten.

Wenn man sehr vollständige Verdauung bezweckt, wird man also Pankreasextrakte und Salzfällungslösungen bei Körper-

temperatur wirken lassen müssen. Da dabei viel Enzym zerstört wird, wird es sich empfehlen, von Zeit zu Zeit neues zuzugeben.

Vielleicht gibt die schwere Angreifbarkeit eines Teiles des Eiweißes in der Kälte ein Mittel in die Hand, aus diesem große Molekülkomplexe zu trennen.

### **Einfluss von Wärme und Salzen auf die Trypsinwirkung.**

Ich habe mehrfach den Einfluß von Wärme und Salzen auf die Wirkung von Pankreasextrakten oder von Lösungen der daraus ausgesalzenen Niederschläge erwähnt, will aber, da diese Beobachtungen in der Arbeit zerstreut sind, dieselben hier nochmals zusammenfassen und noch einiges zufügen.

Zunächst will ich wiederholen, daß ich die längst bekannte Tatsache, daß es für die Trypsinwirkung ein Temperaturoptimum gibt, was sich zunächst darin ausdrückt, daß eine Fibrinflocke bei Körpertemperatur resp.  $40^{\circ}\text{C}$ . rascher gelöst wird, als bei niederen Temperaturen, nochmals besonders konstatiert habe.

Ich wiederhole ferner hier, daß man bei Zimmertemperatur besser wirkende Extrakte bekommt als bei  $40^{\circ}\text{C}$ ., und daß sich deren Wirkung länger auf ziemlich gleicher Höhe erhält.

Wenn aus diesen Beobachtungen schon der schädigende Einfluß der Wärme hervorging, habe ich doch noch einige speziell zur Feststellung dieser Tatsache angestellte Versuche zu erwähnen, die ich hier zusammenstelle:

#### **A. Einfluß der Wärme auf Pankreasextrakte.**

##### **1. Pankreasextrakt vom 18. Juni 1901.**

Dieses Extrakt hatte, nachdem es nur einige Stunden bei ziemlich niedriger Temperatur gestanden hatte ( $33^{\circ}\text{C}$ .), eine sehr gute Wirkung:

2 Min: deutl. Z.; 10: fast gelöst.

Eine filtrierte Probe, die, alkalisch gemacht, eine Stunde lang bei  $40^{\circ}\text{C}$ . gestanden hatte, verhielt sich kaum anders.

Zwei ebenfalls filtrierte Proben, die über Nacht, die eine neutral, die andere alkalisch, bei  $36^{\circ}\text{C}$ . gestanden hatten, waren am andern Tage deutlich geschwächt, und zwar beide gleich. Beide wirkten:

5 Min.: Sp. Z.; 20: gelöst.

##### **2. Pankreasextrakt vom 21. Juni 1901.**

Am 27. Juni löste eine filtrierte Probe dieses P.E. eine Fibrinflocke in 5 Minuten bis auf geringe Reste auf. Bei einer Probe, die über

Nacht neutral, in der Wärme gestanden hatte, zeigte sich an einer Fibrinflocke nach 5 Minuten erst beginnender Zerfall, während dieser bei einer Probe, die über Nacht alkalisch warm gestanden hatte, erst nach 10 Minuten eintrat.

Eine andere Probe dieses P.E. war vom 25. Juni bis 30. Juli 1901 im Wärmeschrank gestanden. An letzterem Tage wirkte sie kaum anders (1) als das während dieser Zeit bei Zimmertemperatur gehaltene P.E. (2):

1. 10 Min.: deutl. Z.; 30: kl. R.

2. (26. Juli): 5 Min.: Sp. Z.; 10: deutl. Z.; 15: st. Z.; 25: kl. R.

### 3. Pankreasextrakt vom 2. Juli 1901.

Dasselbe wirkte am 5. Juli: 5 Min.: st. Z.; eine Probe, die über Nacht im Wärmeschrank gestanden hatte, zeigte in der gleichen Zeit kaum beginnenden Zerfall.

### 4. Pankreasextrakt vom 14. Januar 1902.

Am 28. Januar wirkte dieses P.E. neutral und alkalisch gleich:  
3 Min.: zieml. Z.; 5: mäß. R.; 10: gelöst.

Die Proben, in denen diese Wirkung konstatiert wurde, blieben 6 Stunden im Wasserbad von 40° C. stehen. Nach dieser Zeit wurde in denselben eine zweite Flocke Fibrin gelöst. Die Lösung ging folgendermaßen von statten:

neutr.      alkal:

5 Min.: st. Z.; sehr st. Z.

10 » kl. R.; sehr kl. R.

### 5. Trockenpankreasextrakt vom 26. Juni 1901.

Am 3. Juli war die Wirkung dieses aus Kühneshem Trockenpankreas mit Wasser bei Zimmertemperatur hergestellten Extraktes:

3 Min.: eben bg. Z.; 5: viel gelöst.

Eine Probe, die über Nacht im Wärmeschrank gestanden hatte, wirkte:  
7 Min.: bg. Z.; 20: gelöst.

Am 10. Juli wirkten 2 Proben, von denen die eine neutral, die andere alkalisch 3 Tage warm gestanden hatten, ganz gleich:

5 Min.: bg. Z.; 10: deutl. Z.

Am 22. Juli wirkte eine Probe, die 3 Tage warm gestanden hatte (1) gegen eine normale (2):

1. 5 Min.: 0; 10: deutl. Z.; 20: kl. R.; 30: sehr ger. R.

2. 5 » deutl. Z.; 10: mäß. R.; 20: ger. R.; 30: gelöst.

## B. Einfluß von Salzen auf die Trypsinwirkung.

In dieses Kapitel gehört zunächst die Reaktion, bei der ein Pankreasextrakt wirkt, da man die Extrakte, wenn man sie alkalisch haben will, mit einem Salz, der Soda, auf diese Reaktion bringt. Pankreas-

saft ist bekanntlich kräftig alkalisch; auch ein wässriges Extrakt der Drüsen pflegt am ersten Tage alkalisch zu sein, was nur zu bestimmen ist, wenn der Hämoglobingehalt der verwendeten Drüsen ein geringer ist. Gewöhnlich ist aber schon am folgenden Tage die Reaktion neutral oder schwach sauer.

Im allgemeinen wird heute angenommen, daß Pankreasextrakte, die keine Vorstufe, sondern das fertige Enzym enthalten, bei alkalischer Reaktion am besten wirken. Dies ist aber nur mit Einschränkungen richtig.

Einmal wirken wässrige Extrakte an sich gewöhnlich sehr gut, sodann kann gezeigt werden, daß sie manchmal nach Sodazusatz genau die gleiche Wirkung haben. Dies war der Fall beim P.E. vom 14. Januar 1902. In anderen Fällen ist dies dagegen nicht der Fall. Das P.E. vom 7. Mai 1902 löste, mit Soda alkalisch gemacht, Fibrin etwas rascher als ohne diese; noch besser war die Wirkung, wenn man statt mit Soda mit Ammoniak alkalisch machte.

#### Kochsalz.

Das P.E. vom 2. Juli 1901 wirkte am 13. August (1): nach Zusatz einiger Tropfen konzentrierter Kochsalzlösung (2)

1. 5 Min.: 0; 10: mäß. Z.; 15: st. Z.; 20: kl. R.

2. 5 „ mäß. Z.; 10: ziemi. Z.; 15: mäß. R.; 20: ger. R.

Kochsalz wirkte also hier auf ein nicht auf der Höhe seiner Wirksamkeit stehendes P.E. bessernd.

Bei einem Extrakt, das an und für sich sehr gut wirksam war, hatte der Zusatz von Kochsalz keinen Einfluß. Beim P. E. vom 7. Mai 1902 zeigte eine 10% Kochsalz enthaltende Probe genau die gleiche Wirkung wie eine ohne diesen Zusatz. Selbst bei 27% Kochsalz war kaum ein Unterschied zu bemerken, deutlich war dieser erst bei vollständiger Sättigung, aber auch hier war die Herabsetzung der Wirkung eine recht unbedeutende. Ebenso wenig hatte Zusatz von Kochsalz und Soda einen Einfluß am 4. Februar 1902 bei dem an diesem Tage noch sehr gut wirkenden P. E. vom 14. Januar 1902.

Aus dem P. E. vom 7. Mai 1902 war durch Sättigen mit Kochsalz und Aussalzen des mit Wasser verdünnten Filtrats mit Ammonsulfat ein Präparat hergestellt worden, dessen wässriges Extrakt gut auf Fibrin wirkte (1). Bei dieser Lösung war aber die Wirkung etwas — wenn auch nicht sehr viel — besser, wenn sie auf 5% Kochsalz gebracht wurde (2):

1. 5 Min.: deutl. Z.; 10: kl. R.

2. 5 Min.: st. Z.; 10: min. R.

Bei Trockenpräparaten, die aus dem P. E. vom 17. April 1902 nach Kochsalzsättigung durch Ammonsulfatfällung bei Zimmertemperatur und bei 40° C. erhalten waren, hatte Kochsalzzusatz keinen bessernden Einfluß.

Der Zusatz von Kochsalz zeigte sich bisher also nirgends schädigend, aber auch nur wenig bessernd auf tryptische Lösungen. Sehr auffallend war dagegen seine bessernde Wirkung bei dialysierten Lösungen. Unerklärlicher Weise aber nicht in jeden Falle, denn eine dialysierte Lösung eines aus dem P. E. vom 24. Juli 1901 nach Halbsättigung mit Magnesiumsulfat durch Alkoholfällung erhaltenen Niederschlages wurde durch Kochsalzzusatz kaum gebessert.

Dagegen war dies der Fall bei einer dialysierten Lösung, die aus dem P. E. vom 14. Januar 1902 stammte. Dieses Extrakt war, nachdem es auf 18% Kochsalz gebracht worden war, mit Ammonsulfat ausgesalzen und die Lösung des dabei entstandenen Niederschlages dialysiert worden. Die dialysierte Flüssigkeit wirkte, nachdem ein bei der Dialyse entstandener Niederschlag durch Soda in Lösung gebracht worden war (1), nach Zusatz von etwas Kochsalz wesentlich besser (2):

1. 10 Min.: bg. Z.; 15: deutl. Z.; 30: st. Z.
2. 5 Min.: ziemi. Z.; 10: st. Z.; 15: kl. R.

Noch in einer anderen Beziehung zeigte sich hier der Kochsalzzusatz von günstigem Einfluß. Die dialysierte Lösung zeigte sich nämlich schon am folgenden Tage erheblich geschwächt, während die Probe, die mit Kochsalz versetzt war, noch ebenso wirkte wie Tags zuvor. Damit war also auch eine schützende Wirkung des Kochsalzes konstatiert. Aber auch hierin zeigen sich bis jetzt unerklärliche Verschiedenheiten; denn ein Extrakt des bei der Dialyse entstandenen und getrockneten Niederschlages zeigte trotz Kochsalzzusatz am folgenden Tag eine geringere Wirkung. Ebenso zeigte das Kochsalz bei der vorhin erwähnten Präparatlösung aus dem P. E. vom 7. Mai 1902 keine schützende Eigenschaft, da auch hier die Wirkung einer solchen kochsalzhaltigen Lösung am anderen Tag wesentlich geringer war.

### Magnesium- und Natriumsulfat.

Ob diese Salze in mäßiger Menge einen besonderen Einfluß auf tryptische Lösungen haben, darüber habe ich keine Erfahrung; daß ein größerer Zusatz des Magnesiumsalzes ziemlich hemmend wirkt, geht aus einem Versuch hervor, den ich mit dem P. E. vom 21. Juni 1901 anstellte.

Dieses Extrakt wirkte am 24. Juni sehr gut (1); mit der gleichen Menge konzentrierter Magnesiumsulfatlösung versetzt, war die Wirkung dagegen so wesentlich verzögert, wie sie durch Verdünnen mit Wasser nicht gewesen wäre (2).

1. 3 Min.: bg. Z.; 5: viel gelöst; 15: vollkommene Lösung.
2. 15 Min.: bg. Z.; 30: noch viel ungelöst.

Bei dem gleichen P. E. konnte nachgewiesen werden, daß sich ein gelöster Magnesiumsulfatsättigungsniederschlag, der wie alle diese

Niederschläge nicht unbeträchtliche Mengen des Salzes enthielt, ungefähr ebenso haltbar zeigte, wie das P. E. selbst.

Am 27. Juni löste das P. E. eine Fibrinflocke in 5 Minuten bis auf geringe Reste auf; die Niederschlagslösung zeigte an einer solchen nach 5 Minuten starken Zerfall. Nachdem beide bis zum 19. Juli bei Zimmertemperatur gestanden hatten, wirkten beide ganz gleich:

5 Min.: Sp. Z.; 10: bg. Z.; 15: st. Z.; 20: kl. R.

Da die Lösung des Magnesiumniederschlags anfänglich etwas geringer wirkte, war sie also verhältnismäßig sogar etwas weniger geschwächt als das P. E.

Nun wurde die Niederschlagslösung in den Wärmeschrank gestellt (36—37° C.).

Am 22. Juli wirkte sie (1), am 2. August (2):

1. 10 Min.: Sp. Z.; 20: mäß. Z.; 35: st. Z.; 55: kl. R.

2. 15 Min.: bg. Z.; 20: zieml. Z.; 60: kl. R.

Sie wurde also in der Wärme am Anfang erheblich, später weniger geschädigt.

Eine aus dem P. E. vom 2. Juli 1901 hergestellte Lösung eines Niederschlags, der am 26. Juli nach Halbsättigung mit Magnesiumsulfat durch Ganzsättigung mit diesem Salz erhalten war, wirkte (2) ziemlich wie das P. E. selbst (1). Am 29. Oktober 1901 war die Wirkung des letzteren (3), die der Niederschlagslösung (4):

1. 5 Min.: 0; 10: deutl. Z.; 15: st. Z.; 20: kl. R.; 30: sehr ger. R.

2. 5 Min.: ?; 10: deutl. Z.; 15: zieml. Z.; 20: mäß. R.; 30: ger. R.

3. 5 Min.: bg. Z.; 10: zieml. Z.; 15: st. Z.; 25: kl. R.; 35: min. R.

4. 5 Min. 0; 10: bg. Z.; 15: zieml. Z.; 30: mäß. R.; 35: kl. R.; 45: ger. R.

Während also hier das P. E. in der späteren Zeit eher ein wenig besser wirkte, hatte die Niederschlagslösung eine geringe Verzögerung ihrer Wirkung erfahren.

Bei dem P. E. vom 12. November 1901 konnte ich konstatieren, daß die Magnesium- und Natriumsulfat-Niederschläge beim Stehen bei Zimmertemperatur — wenigstens im Verlauf von 24 Stunden — keine Schwächung erfahren.

### Ammonsulfat.

Auffallend verschieden gestaltet sich die Einwirkung von Ammonsulfat auf tryptische Lösungen.

Bei dem P. E. vom 2. Juli 1901 hatte der Zusatz einiger Tropfen konzentrierter Ammonsulfatlösung zu einer Probe im Reagensglase eine schwach verzögernde Wirkung. Das P. E. ohne das Salz wirkte (1), mit demselben (2):

1. 5 Min.: Sp. Z.; 10: st. Z.; 15: kl. R.; 20: sehr ger. R.

2. 5 Min.: 0; 10: deutl. Z.; 15: mäß. R.; 20: ger. R.

Bei dem gleichen P.E. hatte zu einer späteren Zeit, als es an sich schon etwas geschwächt war (26. Juli 1901), ein gleicher Zusatz von Ammonsulfat gar keinen Einfluß. Beide Proben wirkten:

5 Min.: 0; 10: deutl. Z.; 15: st. Z.; 20: kl. R.; 30: sehr ger. R.

Beim P.E. v. 17. April 1902 hatte Zusatz von 20 % Ammonsulfat einen wenig verzögernden Einfluß. Es wirkte P.E. am 22. April (1); das gleiche auf 20 % Ammonsulfat gebracht (2):

1. 2 Min.: bg. Z.; 3: st. Z.; 8: min. R.

2. 2 Min.: ? : 3: deutl. Z.; 8: sehr ger. R.

Der Einfluß von Ammonsulfat auf Pankreasextrakte ist also im ganzen gering, aber eher etwas hindernd: Lösungen von ausgesalzenen Niederschlägen, auch wenn sie durch Aussalzen mit diesem Salze selbst gewonnen wurden, können dagegen durch Zusatz von weiterem Ammonsulfat in ihrer Wirkung gebessert werden.

In dieser Beziehung ist die Lösung eines Präparates sehr lehrreich, das unter «Aussalzung von P.E. durch Ammonsulfat» 5 c (P.E. v. 7. Febr. 1902) erwähnt wurde. Die Wirkung dieser Lösung war gegenüber der des P.E. selbst (1) keine sehr gute (2).

1. 5 Min.: st. Z.; 10: ger. R.; 15: gelöst.

2. 5 Min.: ? ; 10: ziemi. Z.; 15: kl. R.; 25: min. R.

Durch Zusatz von etwas konzentrierter Ammonsulfatlösung wurde sie gebessert:

5 Min.: ziemi. Z.; 10: kl. R.; 15: ger. R.; 20: min. R.

Die Lösung war, dem P.E. entsprechend, eine 0,8 %ige. Eine 0,4 %ige, die (übrigens nach Zusatz von etwas Sodalösung) natürlich schwächer wirkte (1), wurde aber durch Zusatz von etwas konzentrierter Ammonsulfatlösung verhältnismäßig mehr gebessert (2):

1. 5 Min.: 0; 10: ? ; 10: deutl. bg. Z.; 20: ziemi. Z.; 30: st. Z.; 40: kl. R.

2. 5 Min.: bg. Z.; 10: st. Z.; 15: kl. R.

Eine ähnliche bessernde Wirkung hatte Zusatz von etwas konzentrierter Ammonsulfatlösung beim P.E. vom 7. März 1902 (vergl. oben: «Aussalzung v. P.E. mit Ammonsulfat» 6).

Ich habe früher erwähnt («Aussalzung v. P.E.: mit Ammonsulfat» 2b. P.E. v. 2. Juli 1901), daß sich die Lösung einer Ammonsulfatfällung als sehr wenig haltbar erwies, indem sie schon nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur, noch mehr in der Wärme, erheblich in ihrer Wirkung herabgesetzt war, daß diese Schädigung aber nur die anfängliche gute Wirkung betraf, während die Lösung dann ziemlich stationär blieb.

In anderen Fällen trat aber eine solche Schädigung überhaupt nicht ein, so in dem unter 3.a. erwähnten Fall (P.E. vom 3. Dezember 1901).

Auch Ammonsulfatniederschläge, die nach vorheriger Koch-



salzbehandlung erhalten wurden, waren in Lösung haltbar, so der unter «Kochsalzfällung aus alkalischer oder neutraler Lösung» 1. b. angeführte (P.E. vom 14. Januar 1902).

Seine Lösung wirkte am 25. Januar 1902:

5 Min.: zieml. Z.; 10: mäß. R.; 15: sehr ger. R.;

am 28. Januar:

5 Min.: deutl. Z.; 10: st. Z.; 15: ger. R.

Wenn also die Wirkung auch etwas langsamer war, nachdem die Lösung 3 Tage bei Zimmertemperatur gestanden hatte, so war die Schädigung doch bedeutend geringer als in dem vorhin erwähnten Fall nach 24stündigem Stehen, obgleich die Wirkung der Lösung im vorliegenden Falle eine noch etwas bessere war, wie in jenem, wo wir ja gesehen haben, daß gerade die erste kräftige Wirkung rasch abnahm.

Ebenso war die unter 2 a) des gleichen Kapitels erwähnte Lösung (P.E. vom 17. April 1902), die übrigens nicht so gut wirkte, nach 4tägigem Stehen bei Zimmertemperatur noch von ganz gleicher Wirkung; dagegen mußte die geringere Wirkung von einer Lösung verschiedener Ammonsulfatniederschläge des gleichen P.E. (vergl. Lösungs- und Zersetzungsprodukte II 4. a., P.E. vom 17. April 1902) darauf geschoben werden, daß dieselbe einige Tage gestanden hatte. An der gleichen Stelle ist ein Parallelfibrinverdauungsversuch bei Zimmertemperatur und im Wärmeschrank erwähnt, dem ich hier hinzufüge, daß die Lösung am Ende des Versuchs in der Wärme stärker geschädigt war als in der Kälte. Die ursprüngliche Wirkung der Lösung war (1); nach der Verdauung bei Zimmertemperatur (2) und im Wärmeschrank (3).

1. 10 Min.: zieml. Z.; 15: st. Z.; 30: ger. R.

2. 15 Min.: eben bg. Z.; 30: zieml. Z.; 1 St.: kl. R.; 1.40: gelöst.

3. 30 Min.: bg. Z.; 1 St.: st. Z.; 2 St.: ger. R.

Da wir oben gesehen haben, daß, wenn eine Schwächung der Ammonsulfatfällungslösungen eintritt, diese in der Wärme stärker ist als bei Zimmertemperatur, ist in dem eben erwähnten Falle kaum zu entscheiden, ob auch hier nur die Wärme die Ursache der größeren Wirkungsverminderung war, oder ob die größere Aufgabe, die an das Enzym gestellt war, da die Verdauung in der Wärme eine weitergehende war, daran Schuld trug.

Da also mehr oder weniger isolierte Enzympräparate durch Ammonsulfat bei Zimmertemperatur und noch mehr in der Wärme geschädigt werden können, war es nötig, zu wissen, ob das Salz an und für sich die tryptischen Lösungen weniger haltbar machte. Da aber substanzarme Enzymlösungen überhaupt leicht an Wirksamkeit einbüßen und davor nicht immer durch Salzzusatz geschützt werden, war man auf substanzreichere Lösungen angewiesen, wozu wohl am besten die Pankreasextrakte selbst dienen.

In dieser Hinsicht habe ich zunächst zu bemerken, daß die oben erwähnte, zu der späteren Zeit mit etwas Ammonsulfat versetzte Probe des P.E. vom 2. Juli 1901, obgleich sie von nicht mehr ganz guter Wirkung war, am folgenden Tage etwas geschwächt war: nicht so sehr wie die Lösung des aus dem gleichen P.E. durch Aussalzen mit diesem Salz erhaltenen Niederschlages, aber doch mehr, als man bei P.E. für gewöhnlich zu sehen gewohnt ist. Ich gebe hier die Wirkung vom 26. (1) und vom 27. Juli 1901 (2)

1. 5 Min.: 0; 10: deutl. Z.; 15: st. Z.; 30: sehr ger. R.

2. 5 Min.: 0; 10: Sp. Z.; 15: deutl. Z.; 35: kl. R.

In der Wärme dagegen war eine stärkere Schädigung durch den Zusatz von Ammonsulfat gegenüber einem P.E. selbst nicht zu bemerken. Ich habe dafür einen Versuch am P.E. vom 14. Jan. 1902 angestellt. Am 7. Februar wurden 80 ccm dieses Extraktes alkalisch gemacht und in zwei gleiche Teile geteilt. Zu dem einen wurden 20 ccm einer gesättigten Ammonsulfatlösung gesetzt (wobei eine geringe Trübung entstand, von der abfiltriert wurde), zu den anderen 20 ccm Wasser. Die Wirkung beider Proben war insofern verschieden, als der Beginn des Fibrinzerfalles bei der mit Wasser verdünnten später eintrat (1) als bei der mit Salzlösung versetzten (2); der weitere Verlauf war ganz gleich:

1. 5 Min.: 0; 10: mäß. R.; 15: kl. R.; 20: sehr ger. R.

2. 5 Min.: zieml. Z.; 10: mäß. R.; 15: kl. R.; 20: sehr ger. R.

Beide Proben kamen in den Wärmeschrank, der zu dieser Zeit auf 38° C. eingestellt war. Am 11. Februar verhielten sich die beiden Proben folgendermaßen:

1. 5 Min.: 0; 10: ?; 15: bg. Z.; 20: zieml. Z.; 30: mäß. R.

2. 5 Min.: 0; 10: bg. Z.; 15: zieml. Z.; 20: st. Z.; 30: kl. R.

Da das P.E. selbst am Tage des Beginns des Versuches wirkte:

5 Min.: mäß. R.; 10: gelöst,

so sieht man, daß dasselbe durch Verdünnen mit Wasser eher weniger gut wirkte (späterer Beginn des Zerfalls) als wenn es mit der gleichen Menge konzentrierter Salzlösung versetzt wurde, und daß die salzhaltige Lösung in der Wärme nicht mehr geschädigt würde; eher schien das Salz einen etwas schützenden Einfluß zu haben.

Bemerkenswert ist endlich der Einfluß von Ammonsulfat als Extraktionsmittel der Drüsen. Das P.E. vom 7. Februar 1902 war mit 25 % Ammonsulfatlösung gemacht worden. Am 25. Februar wirkte dieses Extrakt (1). Eine filtrierte Probe, die 24 Stunden im Wärmeschrank gestanden hatte (2):

1. 5 Min.: zieml. Z.; 10: mäß. R.; 15: sehr kl. R.; 20: min. R.

2. 5 Min.: st. Z.; 10: ger. R.; 15: min. R.; 20: gelöst.

Hier wurde also ein P.E. in der Wärme etwas gebessert. Das dürfte so zu erklären sein, daß die Salzlösung in der Wärme etwas mehr Enzym frei macht.

Die Probe (2) kam wieder in den Wärmeschrank. Am 4. III. wirkte sie:

5 Min.: 0; 10: mäß. Z.; 15: st. Z.; 20: kl. R.; 30: sehr ger. R.

Die Besserung durch das Salz ist jedenfalls also nur vorübergehend, später macht sich der schädigende Einfluß der Wärme geltend. Bei dem vorigen Versuch war dies am vierten Tage noch nicht der Fall, hier aber zeigte er sich deutlich, nachdem die Lösung 7 Tage lang warm gestanden hatte.

### Zusammenfassung.

Der Einfluß der Wärme und der Salze ist auf tryptische Lösungen ein so verschiedener, daß man kaum bestimmt voraussagen kann, wie diese Faktoren wirken: es scheint sehr von der Beschaffenheit der Lösung abzuhängen und wann dieselben einwirken, wie die Art dieser Einwirkung ist. Im ganzen dürfte sicher sein, daß verdünnte, substanzarme Lösungen durch Wärme und Zeit mehr geschwächt werden als konzentriertere. Für die Wirkung der Wärme steht fest, daß sie tryptische Lösungen mehr schädigt gegenüber niedrigeren Temperaturen. Dabei habe ich die Reaktion von wechselndem Einfluß gefunden. Einmal wurde eine alkalische Lösung in 24 Stunden mehr geschwächt als eine neutrale (P. E. vom 21. Juni 1901), ein andermal war die Reaktion ohne Einfluß (P. E. vom 18. Juni 1901). Bei kürzerer Dauer der Wärmeeinwirkung (6 Stunden) fiel die Wärmewirkung sogar zugunsten der alkalischen Lösung aus.

Von ebenso wechselndem Einfluß ist auch die Reaktion für die Wirkung der tryptischen Lösungen, wie sie an der Auflösung von Fibrin erkannt wird.

Der Einfluß der Wärme ist, wie dies auch Vernon angibt, derart, daß kräftig wirkende Lösungen mehr geschädigt werden als weniger wirksame.

Vernon hat daraus auf die Existenz mehrerer Enzyme im Pankreas geschlossen: ich kann ihm aber darin nicht unbedingt beipflichten. Die Möglichkeit muß ja zugegeben werden, daß diese Erklärung richtig ist, aber sie scheint mir nicht die einzige und für die wichtige Frage nicht entscheidend. Jedenfalls glaube ich, daß man auch mit der Annahme eines

Enzyms auskommt, wenn man z. B. für einen Teil desselben eine gewisse Bindung annimmt, die es zerstörenden Einflüssen weniger zugänglich macht.

Auch für den Einfluß der Salze auf tryptische Lösungen kommen offenbar Faktoren in Betracht, die sich noch nicht ganz überschauen lassen, da auch hier sehr große Verschiedenheiten vorkommen.

Größere Konzentrationen von Salzen wirken hemmend auf die Lösungsgeschwindigkeit ein. Am weitesten kann mit dem Kochsalz gegangen werden. Für dieses Salz ist der Versuch reiner, weil es das Trypsin nicht ausfällt: aber die andern Salze wirken doch schon bei Konzentrationen verlangsamend, die noch unter ihrem Fällungsvermögen liegen.

Durch Salze werden Pankreasextrakte im allgemeinen weniger beeinflusst als Salzniederschlaglösungen. Es scheinen in jenen Substanzen vorhanden zu sein, die bis zu einem gewissen Grade die Wirkung des Enzyms unterstützen und es vor der Zerstörung schützen. Ob dies in den Pankreasextrakten Salze sind oder andere Substanzen, ist bis jetzt nicht zu entscheiden: jedenfalls sind jene eine Art der Substanzen, die in Salzniederschlaglösungen diesen Einfluß haben. In den letzteren sind allerdings Salze schon immer vorhanden, indem sie den Niederschlägen anhaften. Die auf diese Weise in die Lösung gelangenden Salzmengen sind aber offenbar meist nicht hinreichend, um das Enzym seine volle Wirksamkeit entfalten zu lassen.

Alle diese Gesichtspunkte sind bei dem Einfluß der Salze im Auge zu behalten. Kochsalz besserte ein P. E. (P. E. vom 2. Juli 1901), das an sich schon an Wirkung eingebüßt hatte, bei einem gut wirksamen (P. E. vom 14. Januar 1902) war sein Zusatz ohne Einfluß, dagegen wurde eine Präparatlösung (P. E. vom 7. Mai 1902) trotz guter Wirkung noch gebessert. Es ist charakteristisch, daß dies eine jener substanzarmen Lösungen war von einem Präparat, das durch Kombination von Kochsalz und Ammonsulfat erhalten war.

Daß es wirklich substanzarme und auch salzarme Lösungen sind, die durch Zusatz von Kochsalz gebessert werden können,

zeigte ein Präparat von P. E. vom 14. Januar 1902 nach der Dialyse, bei dem das Kochsalz auch die auffallend rasche Schädigung dieser verdünnten Lösung bei Zimmertemperatur verhinderte: obwohl in andern Fällen diese unterstützende Wirkung geringer war (Dialyse des Präparats aus P. E. vom 24. Juli 1901) und auch die schützende Wirkung nicht immer zu Tage trat (getrockneter, bei der Dialyse entstandener Niederschlag vom Präparat aus P. E. vom 14. Januar 1902 und Präparatlösung aus P. E. vom 7. Mai 1902).

Die Lösung eines Niederschlags, der durch Magnesiumsulfat erhalten war (P.-E. vom 21. Juni 1901), zeigte sich ebenso haltbar bei Zimmertemperatur wie das P. E. selbst, in der Wärme wurde sie auch geschädigt, im Anfang mehr, später weniger. Dagegen zeigte sich eine Magnesiumsulfatfällungslösung aus dem P. E. vom 2. Juli 1901 bei Zimmertemperatur etwas weniger haltbar als das P. E. selbst.

Lösungen von Natriumsulfatniederschlägen zeigten sich — wenigstens kurze Zeit — haltbar.

Ammonsulfatlösung verzögerte die Wirkung eines gut wirkenden P. E. (P. E. vom 2. Juli 1901), war dagegen später bei dem gleichen Extrakte, nachdem dies an und für sich von geringerer Wirkung geworden war, ohne Einfluß. Die Schädigung war aber selbst bei Zusatz bis zu 20 % des Salzes (P. E. vom 17. April 1902) nur gering.

Von zwei Proben des P. E. vom 14. Januar 1902, von denen die eine mit Wasser, die andere mit gleicher Menge konzentrierter Ammonsulfatlösung versetzt war, wirkte die letztere eher etwas besser. In der Wärme wurden beide geschädigt, die salzhaltige Probe jedenfalls nicht mehr als die andere.

Ammonsulfatfällungslösungen können durch Zusatz von mehr Ammonsulfat in ihrer Wirkung gebessert werden (P. E. vom 7. März 1902) und es ist bemerkenswert, daß dies bei verdünnteren Lösungen in verhältnismäßig höherem Grade der Fall ist (P. E. vom 7. Februar 1902).

In einem Falle zeigte sich eine Ammonsulfatfällungslösung von auffallend geringer Haltbarkeit schon bei Zimmer-

temperatur, noch weniger in der Wärme; namentlich wurde sie anfangs bei guter Wirkung geschädigt, während sie später stationär blieb (P. E. vom 2. Juli 1901). In andern Fällen trat aber eine solche Schädigung nicht ein (P. E. vom 3. Dezember 1901), selbst nicht bei den substanzarmen Lösungen, die durch Kombination von Kochsalz und Ammonsulfat erhalten werden, einerlei ob deren Wirkung nicht so gut war (P. E. vom 17. April 1902) oder ob sie gut wirkten (P. E. vom 14. Jan. 1902).

Beim P. E. vom 17. April 1902 wurde gezeigt, daß bei der Fibrinverdauung eine Ammonsulfatfällungslösung in der Wärme mehr geschwächt wurde als bei Zimmertemperatur.

### Schlußbemerkungen.

Die Aufgabe, die das Ziel dieser Arbeit war, aus Pankreas-Extrakten ein Trypsinpräparat herzustellen, das ebenso gut wirkte, wie die Extrakte selbst, das möglichst gering an Masse war und — wenn dies zu erreichen war — eiweißfrei, das endlich, nachdem es getrocknet war, jederzeit zur Bereitung von Lösungen mit den genannten Eigenschaften zur Verfügung stehen sollte, hat in derselben keine vollkommene Lösung erfahren. Ich konnte zwar diesen Forderungen einzeln gerecht werden, ein Präparat, das sie alle durchaus befriedigt hätte, ist nicht erzielt worden.

Die Schwierigkeiten, die zu überwinden sind, sind hauptsächlich die, daß bei den Aussalzungsmethoden, die sich ihrer schonenden Eigenschaften wegen am meisten empfehlen, entweder zu viel anderes neben dem Wirksamen ausgefällt wurde, oder aber nicht alles Wirksame, und daß substanzarme Lösungen wenig haltbar oder solche Niederschläge schon beim Eintrocknen an der Luft geschädigt werden können.

Konstatiert konnte werden, daß es möglich ist, das Enzym so vollständig in Niederschlägen zu erhalten, daß diese, in einer dem verarbeiteten Pankreasextrakt entsprechenden Menge Wasser gelöst, von gleicher Wirkung waren. Manchmal waren diese Lösungen sogar besser wirksam, als das Pankreasextrakt selbst oder, wenn eine solche Lösung von gleicher

Wirkung war, konnte noch ziemlich viel Wirksames in der Mutterlauge gefunden werden, was sich daraus erklären dürfte, daß in den Extrakten Bedingungen gegeben sind, die das Enzym in seiner vollen Wirksamkeit hemmen.

Ich habe sehr substanzarme Lösungen erzielt, die noch recht gut wirkten, wenn auch nicht das ganze wirksame Prinzip des Extraktes in ihnen enthalten war.

Es ist endlich gelungen, Präparate zu erhalten, in denen das Eiweiß auf ein Minimum reduziert war, die gar keine Biuret- und (P. E. vom 24. Juli 1901 nach der Dialyse einer Alkoholfällung eines mit Magnesiumsulfat halbgesättigten Extraktes) nur eine sehr schwache Xanthoproteinsäurereaktion gaben. Ich halte es aber noch nicht für gerechtfertigt, selbst wenn die Eiweißreaktionen ganz fehlen sollten, deshalb dem Enzym eiweißartige Natur abzusprechen, da, wenn es überhaupt eine rein darstellbare Substanz ist, seine Masse so gering sein wird, daß sie unterhalb der durch Reaktionen charakterisierbaren Grenze liegt, eine Anschauung, die dadurch unterstützt wird, daß wir gesehen haben, daß ein die Biuretreaktion gebender Körper unter Umständen nicht direkt erkannt wird. Dies kann bei dem Trypsin auch an einer Bindung liegen, wie auch Kühnes Trypsinpräparat erst nach dem Kochen Biuretreaktion gab. Auf der andern Seite möchte ich zu bedenken geben, daß, wenn man solche Lösungen schon von Anfang an, als man zur Isolierung der Enzyme schritt, erhalten hätte, man diesen vielleicht überhaupt den Eiweißcharakter nicht vindiziert hätte.

Ich bin übrigens doch meiner Aufgabe nahe gekommen, indem ich Präparate erhielt, die allen den gemachten Forderungen nahezu entsprachen. Ich verweise hier namentlich auf ein Trockenpräparat aus dem P. E. vom 7. Mai 1902, das durch kombinierte Kochsalz- und Ammonsulfatsättigung erhalten war, von dem eine 0,25%ige Lösung (mit dem anhaftenden Salze) dem P. E. entsprach, das nur eine schwache Biuretreaktion gab und (1) fast wirkte wie das P. E. (2) selbst!

1. 2 Min.: deutl. Z., 5: mäß. R., 10: min. R.

2. 2 Min.: st. Z., 3: kl. R., 5: min. R.

Wenn ich das mit einem käuflichen Präparat vergleiche, das aus dem zuverlässigen Laboratorium von Dr. Grübler stammt, so fällt der Vergleich zugunsten meines aus. Jenes wirkte nämlich in 1%iger Lösung: 5 Min.: bg. Z., 30: min. R.

Das Trypsin ist ein so labiler Körper und wird durch so viel nicht immer vorherzusehende Umstände geschwächt, daß man bis jetzt kaum eine bestimmte Methode zu dessen Darstellung unbedingt empfehlen kann. Man kann sogar, wenn man nach dem Muster gelungener Probedarstellungen größere Mengen von Extrakt verarbeitet, zu weniger günstigen Endresultaten gelangen.

Da aber gezeigt wurde, daß man das Enzym vollständig ausfällen kann, und daß Präparate, die weniger gut wirken, wenn Lösungen von größerer Konzentration angewandt werden, besser wirken, woraus man wohl schließen darf, daß der Verlust bei der Darstellung ein quantitativer ist, so wird man das Hauptgewicht nicht auf vollwirksame Präparate legen, wenn dies auch ein möglichst anzustrebendes Ideal bleibt.

Am meisten dürften fraktionierte Magnesiumsulfatfällungen und Kombination von Kochsalz und Ammonsulfat zu empfehlen sein. Wenn man damit, namentlich in der Kälte, nicht alles Enzym erhält, so kann dann doch noch das meiste bei 40° ausgesalzen werden. Man kann versuchen, die Lösungen dieser Fällungen zu dialysieren, wenn sie an und für sich noch nicht von zweckentsprechender Reinheit sind. Der Zerstörbarkeit beim Trocknen ist vielleicht dadurch abzuhelpen, daß man den Niederschlägen mehr Salz oder andere indifferente Körper zusetzt. Unter diesen Bedingungen können auch dialysierte Lösungen möglicherweise zur Trockne eingedampft werden, ohne an Wirksamkeit einzubüßen. Endlich wird sich zu weiterer Reinigung die Essigsäure empfehlen, namentlich die Extraktion von Trockenpräparaten mit einer dem P. E. entsprechenden Menge einer solchen, die 1% Eisessig enthält, um diese Extrakte nach dem Neutralisieren oder Alkalischemachen zu verwenden. (Merkwürdig schwer ist auf alle diese Arten eine Verunreinigung zu entfernen, nämlich die Reste einer koagulablen Substanz.) Man darf trotz des



schwankenden Charakters des Trypsins hoffen, daß man mit Glück und Geschicklichkeit im Arbeiten auf diese Weise doch zu Präparaten gelangt, die allen Anforderungen entsprechen, und wenn ich dies auch noch nicht erreicht habe, glaube ich doch den richtigen Weg dazu betreten zu haben.

Da verdünnte Enzymlösungen leicht in ihrer Wirksamkeit geschädigt werden, durch Zusatz von Salzen aber davor bewahrt werden können, wird es noch eine weitere Aufgabe sein, festzustellen, welche Salze und in welchen Konzentrationen sie diesen Zweck am besten erfüllen. Beiläufig will ich hier nur bemerken, daß durch das so verschiedene Verhalten tryptischer Lösungen gegen Mineralsalze auch ein Licht geworfen werden kann in den Streit, ob die Galle die pankreatische Wirkung unterstützt, wenn man annimmt, daß die gallensauren Alkalien sich jenen Salzen ähnlich verhalten.

Von großem Interesse ist die Frage nach den biuretgebenden Körpern bei der Pankreasverdauung. Für Extrakte aus Drüsen haben meine Versuche bestätigt, daß sie ganz schwinden kann.

Kutscher<sup>1)</sup> ist durch das Verschwinden der Biuretreaktion bei Pankreasverdauungen zu einer anderen Ansicht von der tryptischen Wirkung gekommen wie Kühne. Letzterer war bekanntlich der Ansicht, daß die eine Hälfte des Eiweißes nur bis zum Pepton, dem Antipepton, gebracht würde, während die andere Hälfte, das Hemipepton, weiter gespalten würde in krystallinische Zersetzungsprodukte. Kutscher dagegen nimmt an, daß auch diese Hälfte von dem Trypsin in ähnliche krystallisierbare Zersetzungsprodukte gespalten werde, und es ist ihm in der Tat gelungen, aus biuretfreien oder nahezu freien Pankreasverdauungen eine viel größere Menge von krystallinischen Produkten zu isolieren als Kühne, sodaß man ihm zustimmen muß, daß in seinen Verdauungsgemischen am Ende nichts Wesentliches war, was man als Antipepton hätte ansehen können. Kutscher hat

<sup>1)</sup> Die Endprodukte der Trypsinverdauung, Habilitationsschrift von Dr. Fr. Kutscher, Straßburg, Trübner, 1899.

ferner auch bei der Verdauung von Fibrin<sup>1)</sup> nach der kurzen Zeit von 48 Stunden nur eine zweifelhafte Biuretreaktion gefunden.

Ich möchte nun zunächst dagegen halten, daß ich bei guten Fermentlösungen, deren Wirkung bis zuletzt kontrolliert wurde, nach langer Verdauung von Fibrin, anfänglich bei Zimmer-, zuletzt bei Körpertemperatur die Biuretreaktion nicht habe verschwinden sehen. Allerdings verschwand die Farbe beim Kochen. Darauf legt Kutscher Wert, wie er S. 21 seiner Habilitationsschrift andeutet, und wie ich von ihm persönlich weiß. Er will die Biuretreaktion nur dann anerkennen, wenn sie auch beim Kochen bestehen bleibt. Wie er selbst sagt, kann die Färbung aber hier durch reduzierende Substanzen verschwinden, und solche sind in den Pankreasverdauungen als Spaltungsprodukte der Nucleoproteide sicher vorhanden. Außerdem habe ich gezeigt, daß biuretgebende Körper in einer komplizierten Lösung vorhanden sein können, ohne direkt erkannt zu werden. Indessen scheint es sich dabei hauptsächlich um hartnäckige Reste koagulabler Körper zu handeln, und ich muß zugeben, daß auch bei meinen Verdauungsgemischen die Reaktion doch immerhin recht schwach war und nicht recht passen will zu Kühnes Anschauung, wonach die ganze eine Hälfte des Eiweißes nicht weiter als bis zum Pepton verändert werden soll.

Aber ich habe noch einen, wie mir scheint, schwerer wiegenden Einwand gegen Kutschers Anschauung. Kühne ist bei seinen pankreatischen Verdauungen, die zu reichlichen Mengen Antipepton geführt haben, meist von Material ausgegangen, das durch die peptische Verdauung schon in Amphopepton umgewandelt war. Wo er nun von diesem ausgegangen ist, hat er am Ende der tryptischen Verdauung die Biuretreaktion niemals schwach gefunden. Wenn er ferner von isolierten Antikörpern ausging, sind seine Beobachtungen über die Resistenz des Antipeptons so bestimmt, und er konnte, wenn ihm auch die übrigen krystallinischen Zersetzungsprodukte hätten entgehen sollen, sogar die Bildung des so leicht auf-

1) Ber. der deutsch. chem. Gesellsch. zu Berlin, Bd. 33, 3, S. 3457.

findbaren Leucins und Tyrosins so sicher ausschließen, daß gegenteilige Beobachtungen immer zu einer Kritik herausfordern müssen. Und ich meine, es sei Kutschers Versuchen noch eine andere Deutung zu geben. Ich denke dabei an die schwere Angreifbarkeit der Antikörper. Es wäre denkbar, daß sie bei gewöhnlichen Pankreasverdauungen überhaupt nicht gelöst würden oder, wenn sie einmal gelöst waren, in das auch für das Pankreas nur schwer zu bewältigende Antialbumid übergegangen wären. Bei Verdauungen, bei denen Pankreasdrüsen angewandt werden, muß ja immer ein ansehnlicher Rest zurückbleiben, der das Bindegewebe und wohl auch einen großen Teil der Kerne enthält, der in neutraler oder alkalischer Lösung nicht gelöst wird: und in diesen Resten steckend, könnten leicht die Antikörper übersehen werden. Ich möchte hier ferner auf einen Versuch Kühnes verweisen,<sup>1)</sup> wo er Fibrin direkt der Pankreasverdauung unterwarf, und dessen Resultat er so zusammenfaßte: «Wie man sieht, bewältigt die Trypsinverdauung das Fibrin wohl vollständig, indem sie dasselbe in ganzer Menge spaltet, es entgeht aber ein Teil der Umwandlung in Pepton, weil die abgespaltene Antialbumose zu dem am schwersten und nur unter besondern Bedingungen vom Trypsin vollständig zu peptonisierenden Antialbumid wird. Kühne hat das Drüsenpepton auch von geringer Biuretreaktion gefunden,<sup>2)</sup> aber es sind im Eiweiß der Pankreasdrüsenzellen entweder keine Körper der Antigruppe vorhanden, oder es handelt sich auch hier darum, daß sie überhaupt schwer in Lösung gehen. Daß ich bei der Protoalbumose die Biuretreaktion habe ganz verschwinden sehen, stimmt mit Picks<sup>3)</sup> Anschauung von der Heminatur dieses Körpers überein.

Um die Frage sicher zu entscheiden, muß man also von klaren und bei der Verdauung klar bleibenden Lösungen ausgehen, die sicher einen Antikörper in Lösung enthalten, wozu sich wohl die Peptone der Pepsinverdauung am besten eignen. Wenn man eine Flocke Fibrin in einer tryptischen Verdauungs-

1) Zeitschr. f. Biologie, Bd. 29, Heft 2, S. 196.

2) Zeitschr. f. Biologie, Bd. 29, N. F., XI, S. 324.

3) Diese Zeitschr., Bd. XXVIII, S. 219.

lösung löst, kann man häufig eine nahezu klare Lösung erhalten. Auch eine solche wäre dafür zu verwenden, vorausgesetzt, daß sie bei der weiteren Verdauung klar bleibt; löst man aber mehr Fibrin auf, oder stopft man gar eine tryptische Lösung mit demselben, so resultieren nie klare Lösungen, und wenn ich auch im Laufe dieser Arbeit öfters gesagt habe, daß in den letzteren Fällen das Fibrin sich bis auf geringe Reste löse, so ist dies doch nur ein Urteil des Augenscheines: etwas bleibt immer auf dem Filter zurück, über dessen tatsächliche Masse man sich erst durch Wägung vergewissern müßte.

Eine andere Deutung des vollständigen Gespaltenwerdens des Eiweißes durch Pankreasextrakte in krystallisierte Produkte wäre noch die, daß die Drüse — vielleicht nur machmal — Erepsin enthielte. Dagegen spräche wohl das bisweilen doch sicher nur sehr langsame Verschwinden der Biuretreaktion, während das Erepsin, wie Cohnheim<sup>1)</sup> gezeigt hat, diese Wirkung sehr rasch ausübt. Es wäre aber denkbar, daß nur das isolierte Ferment so rasch wirkte, um so mehr, als man in neuerer Zeit nicht nur gegenseitige Unterstützung von Enzymen beobachtet hat, sondern diese sich nach den interessanten Untersuchungen Weinlands<sup>2)</sup> auch gegenseitig hemmen können.

Ich habe begonnen, diese Frage zu verfolgen. Nach Cohnheim wird das Erepsin allmählich gefällt bis zu einer 60%igen Sättigung mit Ammonsulfat. Ein Versuch, den ich angestellt habe, indem ich ein Pankreasextrakt, das bei Zimmertemperatur bereitet war und über ein Jahr gestanden hatte, auf 50% Ammonsulfatsättigung brachte, scheiterte aber daran, daß in diesem Falle schon bei diesem Sättigungsgrade, trotz der späten Verarbeitung des Extraktes, etwas tryptisch Wirkendes gefällt wurde, was aus der Lösung von Fibrin hervorging.

Ich ergreife sehr gern diese Gelegenheit, um Herrn Prof. A. Kossel meinen verbindlichsten Dank zu sagen, daß er es mir ermöglicht hat, in dem mir lieb gewordenen Heidelberger

1) Diese Zeitschr., Bd. XXXIII, S. 451 u. Bd. XXXV, S. 134.

2) Zeitschr. f. Biologie N. F. 7, Bd. 26, S. 1.

physiologischen Institut auch fernerhin zu arbeiten, daß er mich dabei aufs freigebigste mit Material versehen hat und daß er mich mit seinem Rat unterstützte

### Nachtrag.

Nach Abschluß dieser Arbeit habe ich einige Erfahrungen gemacht, die ich schon hier veröffentlichen möchte, da sie einige meiner ausgesprochenen Anschauungen modifizieren:

1. Bei einem sehr gut wirkenden P. E., das mit einer mäßigen Menge Fibrin mehrere Tage bei 40° C. gestanden hatte, war so vollkommene Lösung eingetreten, daß eine geringe Trübung unmöglich auf das Ungelöstbleiben oder Wiederausfallen des Antikörpers bezogen werden konnte. Diese Lösung gab am Ende des Versuchs gar keine Biuretreaktion. Ich stehe nicht an, dies, zunächst wenigstens für sehr wirksame Extrakte, für eine Unterstützung der Anschauung Kutschers zu erklären.

2. Aus einem P. E. wurde ein gut wirkendes Trockenpräparat durch Kombination von Magnesium- und Natriumsulfatfällung hergestellt. Eine 0,4%ige Lösung desselben entsprach dem P. E. Bei einer Veraschung dieses Präparates stellte sich heraus, daß darin überhaupt nur 6% Organisches enthalten war, sodaß also eine dem P. E. entsprechende Lösung desselben nur 0,024% organische Substanz enthielt.

### **Berichtigung.**

In meiner Arbeit: «Beiträge zur Kenntnis der Trypsinwirkung» ist S. 512, Nachtrag, Nr. 2 zu streichen.

K. Mays.