

Quantitative Bestimmung der Pepsinwirkung.

Von

Stefan v. Bogdándy.

(Mitteilung aus dem physiologischen Institut der Universität Budapest.)

(Der Redaktion zugegangen am 27. Januar 1913.)

Eine der genauesten Methoden zur quantitativen Bestimmung der Pepsinwirkung ist die Schützsche Polarisationsmethode,¹⁾ die aber in der Praxis sich nicht einbürgern konnte, einerseits infolge der umständlichen Darstellungsart der gebrauchten Eiweißlösung, andererseits infolge der komplizierten Ausfällung des unverdauten Eiweißes.²⁾ Das Verfahren besteht im wesentlichen in der Bestimmung des Polarisationsvermögens eines Filtrates, welches nach Zusatz von Eisenchlorid und Natriumacetat zu einer Ovalbuminlösung und hierauf folgender Hitzekoagulierung derselben erhalten wurde.

Unter den neueren Methoden ist die Volhardsche³⁾ eine jener, welche zu klinischen Arbeiten am meisten verwendet werden. Dieselbe beruht auf der Eigenschaft des Caseins, in saurer Lösung durch Natriumsulfat quantitativ gefällt zu werden, während seine Hydrolysenprodukte in Lösung bleiben. Das ausfallende Casein hält einen Teil der Säure zurück: je mehr unverdautes Casein vorhanden ist, desto mehr Säure bindet es bei seiner Fällung, desto weniger sauer wird also das Filtrat

¹⁾ E. Schütz, Diese Zeitschrift, Bd. 9, S. 577 (1887).

²⁾ Von einer detaillierten Besprechung der demselben Zwecke dienenden verschiedenen Methoden kann um so eher abgesehen werden, als Oppenheimer dieselben in der letzten Auflage seines Buches (Die Fermente, III. Aufl., Leipzig, Vogel, 1910), sowie neuestens auch Waldschmidt (Pflügers Archiv, Bd. 143, S. 189, 1911) ausführlich zusammengestellt hat.

³⁾ Volhard, München. Med. Wochenschr., 1903, Nr. 49; 1907, Nr. 9. — Oppenheimer, l. c. Spez. Teil, S. 132.

sein. Der Säuregrad des Filtrates dient demnach als Maß der Verdauung. Dieses Verfahren bietet aber mehrfache Nachteile:

1. Die Lösung des Caseins nach Volhard dauert zu lange.
2. Die zur Lösung gebrauchte Natronlauge bildet schon allein aus dem Casein durch Natriumsulfat nicht fällbare Spaltungsprodukte.¹⁾ Es ist ja allgemein bekannt,²⁾ daß das Casein Alkalien gegenüber viel weniger resistent ist, als Säuren gegenüber.

3. Eine neutrale Caseinlösung wird durch Trypsinverdauung sauer.³⁾ Die so entstehende Acidität addiert sich selbstverständlich zu derjenigen der ungebundenen Salzsäure. Bei der Volhardschen Methode muß also der Casein- und Säuregehalt der Lösung genau bekannt sein und beständig kontrolliert werden.

Ausgehend aus den beiden oben erwähnten Methoden gelang es mir, eine den bisherigen gegenüber in jeder Hinsicht einfachere und dabei doch genaue Methode zu finden. Es soll hier nicht unerwähnt bleiben, daß Zweifel⁴⁾ sich gelegentlich seiner ganz anderen Zwecken dienenden Untersuchungen nebenher einer Methode des Pepsinnachweises bediente, die auf Polarisation einer Caseinlösung beruhte. Er schreibt hierüber (S. 20): «Ich begnügte mich deshalb, bei dem mir gebotenen Material nur qualitativ auf Pepsin zu prüfen; ich glaube aber doch, daß nach der von mir eingeschlagenen Methode noch am richtigsten auch eine Abschätzung der Verdauungsintensität möglich ist.»

Das zu meinen Versuchen dienende gepulverte Casein enthielt 7,3% Wasser, die getrocknete Substanz enthielt 1.08%

¹⁾ Als Beweis hierfür möge folgende Beobachtung dienen: Eine nach Volhard gelöste 5%ige Caseinlösung besaß gleich nach dem vollständigen Auflösen des Caseins eine Drehung von 0,22° im 200 mm-Rohr, 10 Stunden später eine solche von 0,25°.

²⁾ Abderhalden, Biochem. Handlex., Bd. 4, S. 114.

³⁾ So verbrauchten z. B. 50 ccm einer mit Natronlauge angefertigten 5%igen, gegen Phenolphthalein neutralen Caseinlösung, mit 10 mg Grüblerschen Trypsins 20 Stunden lang verdaut, 18 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Natronlauge bis zur angehenden Rotfärbung. — Siehe auch Bälwiss, Das Wesen der Enzym-Wirkung, Dresden, Steinkopff, 1910, S. 51.

⁴⁾ Zweifel, Untersuch. über die Verdauungsapparate d. Neugeborenen, Berlin, Hirschwald, 1874.

Asche und 15,34% N. Eine 3,5%ige Caseinlösung wurde folgendermaßen bereitet: 17,5 g Casein wurden mit 250—300 ccm destillierten Wassers gut verrührt, dann wurden 27,5 ccm normale Salzsäure zugesetzt, die Lösung in einen Meßkolben von 500 ccm gegossen, nachgewaschen, die Flüssigkeit des öfteren kräftig umgerührt, und schließlich mit destilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die vollständige Lösung geschah in einem Wasserbade von 40° unter zeitweiligem Umschütteln innerhalb $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde. Das zweimalige kräftige Umrühren, erst mit Wasser, dann nach dem Säurezusatz, ist deshalb wichtig, weil sich das Casein sonst am Boden des Gefäßes in eine klebrige gallertige Masse verwandelt und nur sehr schwer in Lösung zu bringen ist, besonders wenn das Casein in Wasser ohne Umrühren digeriert wird.

Zur Fällung des unverdauten Caseins fand ich folgendes Fällungsreagens am zweckmäßigsten: 150 g Natriumsulfat, 50 g Magnesiumsulfat, 100 ccm Alkohol (96%) mit destilliertem Wasser auf 1 l ergänzt. Eventuell sich ausscheidende Krystalle lösen sich durch schwaches Erwärmen auf 35—40°.

In weithalsige 100 ccm-Meßkolben wurden je 60 ccm Caseinlösung gebracht, entsprechende Mengen einer Lösung von Grüblerschem Pepsin in 0,2%iger Salzsäure zugesetzt, und die Kolben in ein 40°iges Wasserbad gestellt. Nach Verlauf der entsprechenden Zeit wurden 30 ccm von dem Fällungsreagens hinzugesetzt, die Flüssigkeit wurde mit destilliertem Wasser auf 100 ccm ergänzt, kräftig umgeschüttelt und durch ein Faltenfilter filtriert. Es konnte ein wasserklares, selbst in 400 mm-Röhren tadellos polarisierbares Filtrat erhalten werden, wenn der Niederschlag das Filter vollständig überzog und die erste trübe Portion des Filtrates nochmals filtriert wurde. Das Filtrat wurde mit einem Schmidt-Haenschschen Apparate mit dreiteiligem Gesichtsfeld, welcher Ablesungen von $\frac{1}{100}^{\circ}$ erlaubte, in einer 200 mm-Röhre polarisiert. Die Caseinlösung ergab nach 6—12stündigem Stehen bei 40° auf gleiche Art ausgefällt, im Mittelwerte zahlreicher Versuche eine Drehung von 0,02°; wurde die Fällung gleich nach Bereitung der Caseinlösung ausgeführt, so wurde dieselbe Drehung beobachtet. Bei

längeren Verdauungszeiten wurde die Lösung gallertartig, nach Fällung mit dem genannten Reagens konnte aber selbst in diesen Fällen ein klares Filtrat erhalten werden.

Nachdem während der Verdauung Produkte mit verschiedenem spezifischen Drehungsvermögen entstehen, kann keineswegs behauptet werden, daß das Drehungsvermögen des Filtrates der Menge des verdauten Caseins und somit der Stärke der Pepsinwirkung vollständig proportional wäre. Derselbe Einwand gilt selbstverständlich für alle Methoden der Pepsin- und Trypsinbestimmung, bei welchen irgend eine Eigenschaft der Verdauungsprodukte als Maß dient; eine Ausnahme bildet nur Abderhaldens¹⁾ Dipeptidmethode.

Um zu erfahren, inwiefern die hier geschilderte Methode mit den übrigen übereinstimmende Resultate ergibt, bestimmte ich einerseits gleichzeitig das Drehungsvermögen und den N-Gehalt meiner Filtrate, andererseits untersuchte ich, inwiefern meine Resultate die bisher gefundenen Gesetzmäßigkeiten der Dynamik der Pepsinwirkung bestätigen.

Zu diesem Ende wurden zunächst drei Versuchsserien mit wechselnden Pepsinkonzentrationen, konstanter Caseinkonzentration von 3,5% und konstanter Versuchsdauer von 6 bzw. 10 Stunden ausgeführt. Der N-Gehalt wurde in 20 ccm des polarisierten Filtrates nach Kjeldahl bestimmt und auf die ganze Flüssigkeitsmenge umgerechnet. Für jede Reihe wurde die Drehung und der N des Filtrates der ohne Pepsinzusatz gehaltenen Caseinlösung bestimmt, und zu 0,04, 0,02 und 0,01°, resp. 1,45, 0,98, 0,94 mg N gefunden. Die Werte sind nach Abzug dieser Korrekturen angegeben. Um auch über die Art der Verdauungsprodukte, die in das Filtrat übergangen, irgend eine Aufklärung zu erhalten, wurden 50 ccm des Filtrates mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der N des Filtrates wurde ebenfalls nach Kjeldahl bestimmt und auf die ganze Flüssigkeitsmenge umgerechnet. Die durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Substanzen bildeten nur einen kleinen Teil der im Filtrate enthaltenen Stoffe und nahmen an Menge mit steigender

¹⁾ Abderhalden und Koelker, Diese Zeitschrift, Bd. 51, S. 294 1907. — Oppenheimer, l. c., Spez. Teil, S. 178.

Pepsinkonzentration langsam zu. Dies kann nur in der Weise gedeutet werden, daß während der Verdauung hauptsächlich komplexere Spaltprodukte entstanden sind. Zur Illustrierung der Versuchsergebnisse mögen die folgenden Zahlen dienen:

1. Versuchsreihe.

a¹⁾ = 293,2 mg N; t = 6 Stunden.

mg Pepsin	Beobachtete Drehung	Beob. N des Filtrates in mg	N/Drehung	x Arrh.	x Sch.	N des PW-Säurefiltrates in mg
0,1	0,22	14,14	64	—	—	3,4
1,0	0,84	57,33	68	63,0	58,1	5,3
2,5	1,35	94,15	70	94,7	91,8	8,2
5,0	1,82	128,94	71	127,0	129,9	9,3
10,0	2,31	165,90	72	166,2	183,7	12,6

2. Versuchsreihe.

a = 297,63 mg N; t = 10 Stunden.

mg Pepsin	Beobachtete Drehung	Beob. N des Filtrates in mg	N/Drehung	x Arrh.	x Sch.	N des PW-Säurefiltrates in mg
0,1	0,32	19,81	62	—	—	6,3
0,3	0,64	42,35	66	45,5	41,7	7,4
1,5	1,43	97,86	68	95,2	93,3	9,8
3,0	1,90	134,26	71	128,3	131,9	10,5
6,0	2,42	168,70	70	167,8	186,5	9,7

3. Versuchsreihe.

a = 294,70 mg N; t = 6 Stunden.

mg Pepsin	Beobachtete Drehung	Beob. N des Filtrates in mg	N/Drehung	x Arrh.	x Sch.
0,1	0,20	13,72	69	—	—
1,0	0,84	57,33	68	63,1	58,4
2,5	1,36	95,83	70	94,9	92,3
10,0	2,31	166,18	72	166,8	184,7

¹⁾ a = die zum Versuch verwendete Menge des Caseins.

Die zwei verschiedenen Verfahren ergaben also nahezu übereinstimmende Resultate, wie dies aus der vierten Rubrik ersichtlich ist. Zur Feststellung dessen, inwieweit die von mir beobachteten Werte die Gesetzmäßigkeiten der Dynamik der Pepsinwirkung rechtfertigen, berechnete ich meine Resultate einerseits nach der Schützschens Formel¹⁾:

$$x = \kappa a \sqrt{pt}$$

andererseits nach der Arrheniusschen.¹⁾

$$\kappa = \frac{1}{pt} \left(a \ln \frac{a}{a-x} - x \right).$$

Hierbei bedeutet x die verdaute Eiweißmenge pro 100 ccm-Lösung in Milligramm N, a die angewandte Caseinmenge gleichfalls in Milligramm N, p die zugesetzte Pepsinmenge in Milligramm. Die Berechnung der $x_{\text{Arrh.}}$ geschah auf folgende Weise:²⁾ Die Gleichung wurde erst etwas umgestaltet:

$$\kappa = \frac{a}{pt} \left(\log \text{nat} \frac{1}{1 - \frac{x}{a}} - \frac{x}{a} \right).$$

Aus den Versuchsdaten wurden einerseits die $\frac{pt}{a}$, andererseits die $\left(\ln \frac{1}{1 - \frac{x}{a}} - \frac{x}{a} \right)$, und aus den entsprechenden Wert-

paaren die κ berechnet und das arithmetische Mittel der letzteren genommen, und zwar wurden hierfür aus später zu erwähnenden Gründen nur die ersten fünf Versuchsreihen in Betracht gezogen. Ferner wurden die ersten Werte dieser fünf Reihen außer acht gelassen, da ihre κ -Werte stark abwichen. Mit dem durchschnittlichen $\kappa = 1,32$ wurden nun sämtliche $\frac{\kappa pt}{a}$ gebildet.

Da nun:

$$\frac{\kappa pt}{a} = \ln \frac{1}{1 - \frac{x}{a}} - \frac{x}{a},$$

¹⁾ Arrhenius, Immunochemie, Leipzig 1907, S. 43. — Höber, Physik. Chem. d. Zelle u. Gewebe, III. Aufl., Leipzig, Engelmann, 1911, S. 609—10. Oppenheimer l. c. Spez. Teil. S. 135.

²⁾ Es sei mir gestattet, Herrn Prof. Th. v. Kármán für seine Freundlichkeit, mich in dieser Berechnung unterwiesen zu haben, auch an dieser Stelle meinen besten Dank abzustatten.

so konnten die jeweils entsprechenden $\frac{x}{a}$ aus einer graphischen Darstellung der Funktion

$$\ln \frac{1}{1 - \frac{x}{a}} - \frac{x}{a},$$

wobei für die Abszissen $\frac{x}{a}$ Werte von 0,1—0,8 eingesetzt wurden,

abgelesen werden. Durch Multiplikation mit dem entsprechenden a wurden endlich die $x_{\text{Arrh.}}$ gefunden. $\kappa_{\text{Sch.}}$ wurde aus denselben Daten berechnet, zu 0,0809 im arithmetischen Mittel gefunden und die mitgeteilten $x_{\text{Sch.}}$ damit berechnet.

Da sich aus Reihe 1—3 ein nahezu vollständiger Parallelismus zwischen N-Gehalt und Drehungsvermögen herausstellte, wurden diese Reihen mit den beobachteten N-Werten berechnet. Zur Berechnung nach der Arrheniusschen Formel mußten wir die beobachteten Drehungen der Reihen 4—5 aber auf Milligramm N umrechnen, da a in diesen Einheiten angegeben ist. Zur Umrechnung wurden aus den mitgeteilten Werten der Reihe 1—3 die $0,01^\circ$ entsprechenden N-Mengen berechnet, graphisch aufgetragen, mit Hilfe der Schwerpunktmethod e eine ausgeglichene Kurve gelegt, und die den verschiedenen Drehungen entsprechenden Umrechnungsfaktoren an dieser Kurve abgelesen. Durch Multiplikation mit diesen Faktoren wurden die «berechneten N-Mengen des Filtrates» der Reihen 4—5 gewonnen.

Die oben mitgeteilten Versuchsreihen 1—3 wurden mit variiertem p , die folgenden 4.—5. mit variiertem t , die 6.—11. mit variiertem a , die 12. und 13. Versuchsreihe mit variiertem Salzsäurekonzentration ausgeführt, während alle übrigen Variablen konstant gehalten wurden. Bei den Reihen 4—5 wurde für die Drehung des Kontrollversuches $0,01$ resp. $0,07^\circ$ abgezogen. Für die weiteren Versuche wurde bei 4% Casein $0,02$, bei 2% $0,01^\circ$ und bei niedrigeren Caseinkonzentrationen gar nichts abgezogen, laut dem Ergebnis besonders hierfür angestellter Versuche.

4. Versuchsreihe.

a = 295,2 mg N; Pepsin = 2,5 mg.

t in Minuten	Beobachtete Drehung	Berechn. N des Filtrates in mg	N/Dreh- ung ¹⁾	x Arrh.	x Sch.
14,4	0,215	13,9	65	—	—
144	0,83	56,2	68	63,2	58,5
360	1,38	95,8	69	94,8	92,5
720	1,78	126,3	71	127,8	130,8
1440	2,33	166,8	72	167,1	185,0

5. Versuchsreihe.

a = 295,2 mg N; Pepsin = 3 mg.

t in Minuten	Beobachtete Drehung	Berechnetes N des Filtrates in mg	N/Dreh- ung ¹⁾	x Arrh.	x Sch.
20	0,30	19,9	65	—	—
60	0,68	46,0	67	45,5	41,4
140	1,08	74,0	69	67,6	63,2
300	1,45	100,5	70	94,8	92,5
1200	2,45	175,9	72	167,1	185,0

6. Versuchsreihe.

Pepsin = 0,4 mg; t = 7 Stunden.

mg N (a)	Beobachtete Drehung
97,8	0,63
147,6	0,65
195,7	0,63
245,4	0,63
295,2	0,63

7. Versuchsreihe.

Pepsin = 0,05 mg; t = 12 Stunden.

mg N (a)	Beobachtete Drehung
42,2	0,20
56,2	0,24
84,3	0,23
168,7	0,23

8. Versuchsreihe.

Pepsin = 0,25 mg; t = 12 Stunden.

mg N (a)	Beobachtete Drehung
84,3	0,49
168,7	0,61
253,0	0,62
337,3	0,62

9. Versuchsreihe.

Pepsin = 0,09 mg; t = 48 Stunden:

mg N (a)	Beobachtete Drehung
84,3	0,57
168,7	0,70
253,0	0,69
337,3	0,69

¹⁾ an der ausgeglichenen Kurve abgelesen.

10. Versuchsreihe.¹⁾

Pepsin = 0,5 mg; t = 0,5 Stunden.

mg N (a)	Beobachtete Drehung
10,5	0,045
21,1	0,055
42,2	0,075
84,3	0,095
168,7	0,09

11. Versuchsreihe.

Pepsin = 5 mg; t = 0,25 Stunden.

mg N (a)	Beobachtete Drehung
42,2	0,30
84,3	0,33
168,7	0,38
253,0	0,39
337,3	0,38

12. Versuchsreihe.

Pepsin = 3 mg; t = 12 Stunden,
a = 295,2.

Salzsäure %	Beobachtete Drehung
0,13	1,85
0,16	1,99
0,19	2,06
0,22	2,00
0,28	1,98
0,34	1,92
0,40	1,87

13. Versuchsreihe.

Pepsin = 1,5 mg; t = 13 Stunden,
a = 295,2.

Salzsäure %	Beobachtete Drehung
0,10	1,02
0,15	1,44
0,20	1,50
0,25	1,47
0,30	1,44
0,35	1,48
0,40	1,32
0,50	1,31

Die Versuchsreihen 1—5 ergaben übereinstimmend mit den bisherigen Feststellungen, daß die nach Arrhenius berechneten Werte, den tatsächlich beobachteten im allgemeinen näher lagen, als die nach Schütz berechneten, wobei sich die Arrheniussche Formel besonders bei vorgeschrittener Verdauung als überlegen erwies. Dieselben Zahlen bestätigen auch sehr schön die von Brücke gefundene, durch Arrhenius betonte Gesetzmäßigkeit,²⁾ daß gleichen Produkten aus Verdauungszeit und Pepsinkonzentration gleich starke Verdauungswirkungen entsprechen, wie aus folgenden Zusammenstellungen ersichtlich ist:

¹⁾ In 400 mm-Röhre abgelesen, auf 200 mm reduziert.

²⁾ Herzog und Oppenheimer, l. c. Allg. Teil, S. 241.

p mg Pepsin	t Minuten	$p \times t$	Beobachtete Drehung
0,1	360	36	0,22
2,5	14,4	36	0,215
1,0	360	360	0,84
2,5	144	360	0,83
2,5	360	800	1,35
2,5	360	800	1,38
5,0	360	1800	1,82
2,5	720	1800	1,78
10,0	360	3600	2,31
2,5	1440	3600	2,33
0,1	600	60	0,32
3,0	20	60	0,30
0,3	600	180	0,64
3,0	60	180	0,68
1,5	600	900	1,43
3,0	300	900	1,45
6,0	600	3600	2,42
3,0	1200	3600	2,45

Die mit variierten Caseinkonzentrationen ausgeführten Versuchsreihen 6—9 zeigten eine nahezu vollständige Unabhängigkeit von der Caseinkonzentration: nur die ersten Werte waren immer etwas kleiner als die folgenden. Die angewandten Caseinkonzentrationen schienen also den angewandten Pepsinmengen gegenüber zu groß zu sein, da ja die Fermentwirkung bekanntlich¹⁾ bei großem Substratüberschuß nur von der Fermentmenge abhängt und von der Substratkonzentration unabhängig ist, wie sie auch umgekehrt bei hoher Fermentkonzentration von derselben unabhängig ist, und nur von der Substanzmenge abhängt. Es wurden deswegen die Reihen 10—11 angeschlossen, bei welchen die Caseinkonzentration im Verhältnis zur Pepsinkonzentration kleiner gewählt und in größerem Umfange variiert

¹⁾ Arrhenius, l. c. S. 40. — Bayliss, l. c. S. 57.

wurde. Dieselben zeigten auch eine Abhängigkeit der Verdauungsgröße von der Caseinkonzentration. Die aus den beobachteten Werten nach Arrhenius und Schütz berechneten κ ergaben aber so bedeutende Unterschiede und zwar Abnahme mit steigender Caseinkonzentration, daß ein weiteres Rechnen mit derselben illusorisch gewesen wäre. Die Arrheniussche Formel muß also irgendwie modifiziert werden, um den Versuchsergebnissen mit variierten Caseinkonzentrationen gerecht zu werden, und zwar so, daß sich schon bei relativ kleinen Substratkonzentrationen eine Unabhängigkeit der x von denselben ergebe.

Versuchsreihe 12 und 13 zeigt, daß die Proteolyse anfangs mit der Säurekonzentration zunimmt, dann zwischen 0,15 und 0,35% HCl ungefähr konstant bleibt, um dann wieder zu sinken. Schütz stellte zwischen proteolytischer Wirkung und Säuregrad einen gewissen Zusammenhang fest,¹⁾ der aber nur bis zu 0,2% HCl Gültigkeit besaß; da wir einem so beschränkten Zusammenhange keine größere Wichtigkeit beimessen können, unterließ ich die entsprechenden Berechnungen.

Aus den angeführten Daten darf wohl gefolgert werden, daß die geschilderte Methode der quantitativen Pepsinbestimmung viel einfacher ausführbar ist, als die bisherigen, und dabei präzise und mit den bisherigen Methoden übereinstimmende Resultate liefert.

¹⁾ E. Schütz u. Huppert, Pflügers Archiv, Bd. 80, S. 490 (1900).