

# Über das Labzymogen des Kalbsmagens.

Von  
S. G. Hedin.

(Der Redaktion zugegangen am 13. April 1911.)

Von Hammarsten wurde zuerst beobachtet, daß neutrale Wasserinfusionen von Mägen verschiedener Tiere keine oder nur eine schwache Labwirkung zeigen, daß aber diese Wirkung nach Behandlung mit Säure und Neutralisieren sehr ausgesprochen ist.<sup>1)</sup> Dieser Befund wurde von Langley bestätigt, insofern, als eine schwach alkalische Infusion erst nach Ansäuern und Neutralisieren Labwirkung zeigte.<sup>2)</sup> Aus diesen Untersuchungen geht also hervor, daß in der Magenschleimhaut ein sogenanntes Zymogen vorhanden ist, das mit Säure wirksames Lab erzeugt.

Gelegentlich Untersuchungen über die durch verschiedene Substanzen erzeugte Hemmung der Labwirkung habe ich gefunden, daß einerseits gewisse Hemmungskörper (Serum, Eierklar) durch Behandlung mit HCl zerstört oder zum mindesten gelähmt werden, andererseits eine unwirksame oder nur schwach labungserregende Mischung von Lab und solchen Hemmungskörpern durch Behandlung mit Salzsäure an Wirksamkeit zunimmt. Im Anschluß an diese Befunde habe ich auf die Möglichkeit hingewiesen, daß Labzymogen, das vollkommen wie eine Mischung von Lab und Hemmungskörper beim Behandeln mit HCl wirksames Lab erzeugt, vielleicht als eine Verbindung oder Mischung von Lab mit einem durch Säure zerstörbaren Hemmungskörper aufzufassen wäre.<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Uppsala Läkaref. förh., Bd. VIII, S. 78, 1872.

<sup>2)</sup> Journ. of Physiol., Bd. III, S. 269, 1881.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. LX, S. 374, 1909.

Seitdem habe ich Gelegenheit gefunden, dieser Frage näher zu treten. Zu dem Zwecke habe ich mir Infusionen von der Schleimhaut von Kalbsmägen in der Weise bereitet, daß 1 Teil völlig frischer Schleimhaut mit 5 Teilen Wasser, etwas  $\text{CaCO}_3$  und Toluol einen Tag bei niederer Temperatur belassen wurde. Darauf wurde die zähe Lösung filtriert, was stets langsam vonstatten ging, und im Eisschrank aufbewahrt. Das Calciumcarbonat wurde zugesetzt, um etwa gebildete Säure sofort zu binden; die Reaktion der konzentrierten Lösung war nie sauer, sondern meistens kaum nachweisbar alkalisch gegen Lackmus. Dieselbe enthielt nur in Ausnahmefällen nachweisbare Mengen von Calciumsalz. Bei der Anwendung wurde die Lösung neutralisiert für den Fall, daß dieselbe schwach alkalische Reaktion zeigte, und mit 3—8 Teilen Wasser verdünnt. Die in angegebener Weise erhaltenen, mehr oder weniger verdünnten Lösungen werde ich im folgenden der Kürze wegen schlechthin Zymogen nennen, zum Unterschied von den daraus durch Behandlung mit HCl und Neutralisieren erhaltenen Lablösungen.

Zunächst mag hervorgehoben werden, daß alle Zymogenlösungen eine deutliche Labwirkung ergaben. Dies stimmt mit einer Beobachtung von Hammarsten überein, nach welcher neutrale Infusionen von Kalbs- und Schafsmägen eine verhältnismäßig starke Labwirkung zeigen.<sup>1)</sup> Eine einigermaßen verdünnte Zymogenlösung wird bereits durch Behandlung mit 0,09% HCl bei Zimmertemperatur während 15 Minuten so weit aktiviert, daß danach keine weitere Zunahme des wirksamen Labs erfolgt. Um eine ungefähre Vorstellung über die wirksamen Labmengen vor und nach der Behandlung mit HCl zu geben, werden unten die Gerinnungszeiten von Milch, erhalten mit zwei verschiedenen Zymogenlösungen, vor und nach der Behandlung mit HCl angeführt.

Die Probe a, welche nicht mit HCl behandelt wurde, war in der Weise bereitet, daß 100 ccm Zymogen mit einer neutralen Mischung von 10 ccm 1%iger HCl-Lösung und einer damit äquivalenten Menge NaOH versetzt wurde.

<sup>1)</sup> Uppsala Läkaref. förh., Bd. VIII, S. 78, 1872.

Bei der Herstellung der Probe b wurde das Zymogen mit der Säure 15 Minuten bei Zimmertemperatur behandelt, worauf mit der NaOH-Menge neutralisiert wurde.

Mit je 1 ccm von a und b wurden dann die Gerinnungszeiten von je 10 ccm Milch genommen:

	Zymogen 1	Zymogen 2
a	28 $\frac{1}{2}$ Min.	10 Min.
b	7 $\frac{1}{2}$ »	2 $\frac{1}{2}$ »

Da die Gerinnungszeiten im allgemeinen den Labmengen umgekehrt proportional sind, war in beiden Zymogenen die wirksame Labmenge nach dem Behandeln mit HCl rund 4mal so groß wie vorher.

#### Das Enzym-Zeitgesetz für das Zymogen.

Es mag sofort bemerkt werden, daß die eben gemachte Schlußfolgerung keine strenge Gültigkeit besitzt. Wohl besteht das eben erwähnte Enzym-Zeitgesetz, nach welchem die Labmengen den Gerinnungszeiten umgekehrt proportional sich verhalten, in bezug auf das fertige, mit HCl erhaltene Lab zu Recht; aber die Labwirkung des Zymogens gehorcht diesem Gesetze nicht. Prüft man mit verschiedenen verdünnten Lösungen desselben Zymogens die Gültigkeit des Gesetzes, so weichen die gefundenen Gerinnungszeiten in der Weise von der Regel ab, daß die Gerinnungszeiten mit geringen Zymogenmengen kürzer ausfallen im Vergleich mit den mit größeren Zymogenmengen erhaltenen, als nach der Regel sich erwarten läßt. Dies geht mit aller Deutlichkeit aus folgenden Versuchen mit verschiedenen Zymogenen hervor:

Konzentration der Zymogene	Zymogen 1.	2.	3.	4.	5.
	Gerinnungszeiten in Minuten				
1	22	8	12	11	8 $\frac{1}{4}$
$\frac{1}{2}$	24 $\frac{1}{2}$	11 $\frac{1}{2}$	21	20 $\frac{1}{2}$	15
$\frac{1}{3}$	30	13 $\frac{1}{2}$	29	27 $\frac{1}{2}$	21
$\frac{1}{4}$	37 $\frac{1}{2}$	17	38	35	27 $\frac{1}{2}$
$\frac{1}{5}$	42 $\frac{1}{2}$	18 $\frac{1}{2}$	44 $\frac{1}{2}$	43	32 $\frac{1}{2}$
$\frac{1}{6}$	49	20	52	48	38

Die Abweichung von der Regel war in allen untersuchten Fällen ausnahmslos die gleiche und es unterliegt keinem Zweifel, daß die Labwirkung des Zymogens in anderer Weise sich verhält, als die des mit HCl erhaltenen Labs. Auch nach Entfernung der Salze durch zweitägige Dialyse gegen destilliertes Wasser wurde die gleiche Abweichung von dem Enzym-Zeitgesetz erhalten:

Konzentration des Zymogens	Gerinnungszeit
1	8 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Min.
1/2	13 »
1/3	15 <sup>3</sup> / <sub>4</sub> »
1/4	19 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> »

Zum Vergleich werden hier Gerinnungszeiten angeführt, welche mit Lab erhalten wurden, das aus dem Zymogen durch Behandlung mit Salzsäure (10 ccm + 2 ccm 1<sup>0</sup>/<sub>10</sub>ige HCl) während einer Nacht im Eisschrank und Neutralisieren bereitet war. Nach passender Verdünnung ergab sich:

Konzentration des Labs	Gerinnungszeiten
1	8 Min.
1/2	17 »
1/3	25 »
1/4	33 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> »

#### Das Zymogen beim Behandeln mit Alkalien.

Wird das Zymogen mit einer schwachen Lösung eines Alkalihydrates auf 37° einige Zeit erwärmt, so verliert es bald sein Vermögen, Labung hervorzurufen, und es wirkt nunmehr auf zugesetztes Lab hemmend. Die Eigenschaften des so erzeugten Hemmungskörpers sind aber verschieden je nach der Art und Konzentration des angewandten Alkalis.

Zunächst wollen wir den beim Behandeln mit sehr schwacher Natronlauge erhaltenen Hemmungskörper ins Auge fassen. Das Zymogen war wie oben S. 188 angegeben (1 Teil Schleimhaut auf 5 Teile Wasser) erhalten und wurde vor der Anwendung mit 3 Volumen Wasser verdünnt. Die Lauge war

0,005 normal; auf 10 ccm verdünnter Zymogenlösung kamen 2 ccm Lauge, und die Mischung war also in bezug auf NaOH 0,00082 normal. Nach verschiedenen, bei den Versuchen angegebenen Zeiten bei 37° wurde mit titrierter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> neutralisiert. Hierauf wurde ein Teil mit HCl 15 Min. bei Zimmertemperatur behandelt (10 ccm + 1 ccm 1<sup>o</sup>/<sub>10</sub>ige HCl) und neutralisiert, während ein anderer Teil, ohne mit HCl behandelt zu werden, mit der entsprechenden Menge Salzlösung versetzt wurde. Dann wurde geprüft, wie die so erhaltenen Lösungen zu bereits fertigem Lab sich verhielten. Dies geschah in der Weise, daß gleiche Volumina (2 ccm) der Zymogenproben zu gleichen Volumina (1 ccm) einer Lablösung gesetzt wurden, worauf die Mischungen 15 Min. bei 37° gehalten wurden. Dann wurden mit 10 ccm Milch die Gerinnungszeiten genommen. Enthält eine Zymogenprobe wirksames Lab, so addiert sich dessen Wirkung zu der der Lablösung, und die Gerinnungszeit fällt folglich kürzer aus als die einer Kontrollösung ohne Zymogen. Wirkt die Zymogenprobe dagegen hemmend, so wird eine längere Gerinnungszeit erhalten als mit der Kontrollprobe. Natürlich muß die Menge des in allen Mischungen vorhandenen Labs so gewählt werden, daß eine etwaige Zunahme oder Abnahme dessen Wirkung sich leicht nachweisen läßt. Ein Versuch mit in oben angegebener Weise erhaltenen Zymogenproben ergab:

Nach 5 Min. mit NaOH:

	Gerinnungszeit
1 ccm Lab + 2 ccm H <sub>2</sub> O	14 Min.
1 » » + 2 » Zym. beh. mit NaOH	17 »
1 » » + 2 » » » » » und mit HCl	1 »

Nach 15 Min. mit NaOH:

1 ccm Lab + 2 ccm H <sub>2</sub> O	14 Min.
1 » » + 2 » Zym. beh. mit NaOH	29 »
1 » » + 2 » » » » » und mit HCl	1 »

Der mit NaOH erzeugte Hemmungskörper nahm also in diesem Falle mit der Zeit der Behandlung zu; ferner war derselbe mit HCl leicht zerlegbar.

Behandlung desselben Zymogens mit 0,01-n.-NaOH (Mi-

schung folglich 0,0017 normal) in der gleichen Weise 10 Min. bei 37° ergab:

	Gerinnungszeit
1 ccm Lab + 2 ccm H <sub>2</sub> O	13 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Min.
1 » » + » » Zym. beh. mit NaOH	28 »
1 » » + 2 » » » » » und mit HCl	1 »

oder etwa die gleiche Hemmung wie vorher 0,005-n.-NaOH nach 15 Min. bei 37°. Die Versuche mit sehr verdünnter Lauge wurden nicht weiter verfolgt, da es sich herausstellte, daß Behandlung des Zymogens mit NH<sub>3</sub> den gleichen Hemmungskörper ergab und zwar mit besserer Ausbeute.

In anderen Versuchen wurde mit stärkerer Natronlauge behandelt; dieselbe war 0,14 normal, und da auf 10 ccm Zymogenlösung 1 ccm Lauge kam, war die Mischung bezüglich des Natronhydrats 0,013 normal. Die Zeit der Einwirkung der Lauge wurde so kurz wie 5 Min. bei 37° gewählt. Dann wurde wie oben mit titrierter Säure neutralisiert und mit HCl behandelt resp. mit entsprechender Salzmenge versetzt. In folgendem Versuch wird zugleich die mit dem ursprünglichen, (nicht mit NaOH behandeltem) nur mit Salz versetzten Zymogen erhaltene Gerinnungszeit angeführt:

Lab ohne Zymogen	20 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Min.
» + Zymogen mit Salz	12 »
» + » beh. mit NaOH	49 »
» + » » » » und mit HCl	98 »

Wie ersichtlich, enthielt das ursprüngliche Zymogen freies Lab, was immer der Fall ist. Nach Behandeln mit NaOH hemmte dasselbe die Labwirkung; diese Hemmung wurde aber durch Behandlung während 15 Min. mit HCl verstärkt.

Die Zunahme der Hemmungswirkung wächst anfangs mit der Zeit der Einwirkung der Salzsäure:

Lab ohne Zymogen	12 Min.
» + Zym. beh. mit NaOH	19 »
» + » » » » und mit HCl	5 Min. 34 »
» + » » » » » » »	10 » 35 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> »
» + » » » » » » »	15 » 39 »

In einem Versuch habe ich die Einwirkung von HCl bei 37° und durch eine längere Zeit verfolgt; dabei wurde zunächst eine Steigerung der Hemmung und darauf eine Abnahme derselben bis zum vollständigen Verschwinden beobachtet:

Lab ohne Zymogen		15 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Min.
» + Zym. beh. mit NaOH.		20
» + » » » » und mit HCl	15 Min.	44
» + » » » » » » » »	30 »	41
» + » » » » » » » »	45 »	36 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> »
» + » » » » » » » »	60 »	31 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> »
» + » » » » » » » »	75 »	24 »
» + » » » » » » » »	105 »	21
« + » » » » » » » »	210 »	15 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> »

Nach Aufkochen des mit 0,14 normalem Natronhydrat behandelten und neutralisierten Zymogens hielt sich dessen Hemmungsvermögen in einem Falle unverändert, in einem anderen war es etwas gesteigert. Ein mit Alkali und Säure behandeltes Zymogen ergab:

Lab ohne Zymogen	13 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Min.
» mit nicht gekochtem Zym.	68 »
» mit gekochtem Zym.	keine Labung in 3 St.

In einem Versuch habe ich das nämliche Zymogen einerseits mit Alkali (5 Min.) und dann mit Salzsäure (30 Min.) wie oben behandelt, andererseits zunächst mit Säure (30 Min.) und dann mit Natronlauge (5 Min.).

Die Gerinnungszeiten waren in ersterem Falle:

Lab ohne Zymogen	13 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Min.
» mit Zym.	56 »

und in letzterem:

Lab ohne Zymogen	21 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Min.
» mit Zym.	22 »

In letzterem Falle war also praktisch kein Hemmungskörper erzeugt und zugleich alles Lab zerlegt.

Die Versuche über die Behandlung von Zymogen mit NaOH haben also ergeben, daß durch kurze Behandlung mit NaOH in 0,00082—0,0017 normaler Lö-

sung ein Hemmungskörper erzeugt wird, der durch HCl sehr leicht zerlegt wird; Lauge in 0,013 normaler Lösung erzeugt einen Hemmungskörper, dessen Wirkung durch HCl zunächst gesteigert wird.

Da Ammoniak wegen seiner schwächeren Dissoziation voraussichtlich nicht in dem gleichen Grade wie ein fixes Alkali auf den Hemmungskörper verändernd einwirkt, habe ich in meinen meisten Versuchen dasselbe in solcher Konzentration angewandt, daß die Mischung mit Zymogen in bezug auf  $\text{NH}_3$  0,017 normal war. Zunächst mögen zwei Versuche angeführt werden, in welchen ich die Einwirkung von  $\text{NH}_3$  mit der von NaOH verglichen habe.

10 ccm Zymogen wurden einerseits mit 2 ccm 0,1-normalem  $\text{NH}_3$  und andererseits mit 2 ccm 0,01-normaler NaOH 10 Min. bei  $37^\circ$  behandelt und mit 2 ccm titrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  neutralisiert. Dann wurden Teile von beiden Proben einerseits mit HCl (5 ccm +  $\frac{1}{2}$  ccm 1%ige HCl) 15 Min. bei Zimmertemperatur behandelt und neutralisiert, andererseits mit der entsprechenden Menge Salz versetzt. Dann wurde wie gewöhnlich mit Lab geprüft.

1 ccm Lab + 2 ccm $\text{H}_2\text{O}$	13 $\frac{1}{2}$ Min.
1 " " + 2 " Zym. beh. mit $\text{NH}_3$	42 $\frac{1}{2}$ "
1 " " + 2 " " " " " und mit HCl	1 "
1 " " + 2 " " " " NaOH " " "	28 "
1 " " + 2 " " " " " " " " "	1 "

In dem anderen Versuche waren die Volumina und das Verfahren die gleichen wie im ersten Versuche. Nur waren die angewandten Lösungen von  $\text{NH}_3$  und NaOH beide 0,1-normale. Die Resultate waren:

Lab ohne Zymogen	12 Min.
" + Zym. beh. mit $\text{NH}_3$	15 $\frac{1}{2}$ "
" + " " " " und mit HCl	1 $\frac{1}{2}$ "
" + " " " NaOH " " "	69 "
" + " " " " " " " "	60 "

Die Hemmung nach Behandlung mit  $\text{NH}_3$  war im ersten Versuche bedeutend, im zweiten geringer, verschwand aber beim Behandeln mit HCl in beiden Fällen. Die Verschiedenheit

zwischen dem mit  $\text{NH}_3$  und dem mit  $\text{NaOH}$  erzeugten Hemmungskörper geht aus dem letzten Versuche hervor, wo  $\text{NH}_3$  und  $\text{NaOH}$  in der gleichen molekularen Konzentration angewandt wurden. Der mit  $\text{NaOH}$  erhaltene Hemmungskörper wurde nur gering durch  $\text{HCl}$  beeinflusst.

Im folgenden Versuch habe ich die Konzentration der  $\text{NH}_3$ -Lösung sowie die Zeit der Einwirkung variiert. Auf 10 ccm Zymogenlösung kamen 2 ccm  $\text{NH}_3$ -Lösung. Die Konzentration des Ammoniaks in der Mischung mit Zymogen sowie die Zeit der Einwirkung werden unten angegeben.

Lab ohne Zymogen		13 Min.
$\text{NH}_3$ 0,004-normal, 5 Min. bei $37^\circ$		25 $\frac{1}{2}$ »
» 10 »		31 »
» 15 »		33 »
$\text{NH}_3$ 0,008-normal, 5 »		31 »
» 10 »		35 »
» 15 »		39 $\frac{1}{2}$ »
$\text{NH}_3$ 0,017-normal, 10 »		50 $\frac{1}{2}$ »
» 15 »		50 $\frac{1}{2}$ »

Die erzeugte Hemmung steigt also bis zu einer gewissen Grenze mit der Konzentration des Ammoniaks und mit der Zeit der Einwirkung.

Bei allen folgenden Versuchen habe ich auf 10 ccm Zymogen 2 ccm 0,1-norm.  $\text{NH}_3$  angewandt, was einer 0,017-normalen  $\text{NH}_3$ -Lösung entspricht, und 10—30 Min. auf  $37^\circ$  erhitzt.

Alle Versuche mit  $\text{NH}_3$  und frisch vorbereitetem Zymogen haben eindeutig eine hemmende Substanz ergeben, obwohl etwas verschieden stark hemmend mit verschiedenen Zymogenen. Zugleich stellte sich heraus, daß der Hemmungskörper konstant sehr leicht durch  $\text{HCl}$  zerstört wurde, indem die hemmende Zymogenlösung beim Behandeln mit  $\text{HCl}$  labungserregend wurde. Nur einige Versuche können hier angeführt werden:

Lab ohne Zymogen	Zym. I.	Zym. II.
	13 Min.	11 Min.
» + Zym. beh. mit $\text{NH}_3$	24 »	27 »
» » » und mit $\text{HCl}$ 2 $\frac{1}{2}$	»	2 $\frac{1}{2}$ »

In folgendem Versuch wurde zunächst gezeigt, daß das Zymogen vor der Behandlung mit  $\text{NH}_3$  wirksames Lab enthielt, indem dasselbe die Wirkung von Lab verstärkte:

Lab ohne Zymogen 16 Min.  
 » mit Zymogen 4 $\frac{1}{2}$  »

Nach darauffolgender Behandlung mit  $\text{NH}_3$  resp.  $\text{NH}_3$  und  $\text{HCl}$  wurde erhalten:

Lab ohne Zymogen 21 Min.  
 » + Zymogen behandelt mit  $\text{NH}_3$  40 »  
 » + » » » » und mit  $\text{HCl}$  1 $\frac{1}{2}$  »

Wenn das Zymogen vor der Behandlung mit  $\text{NH}_3$  im Eisschrank aufbewahrt wird, scheint keine wesentliche Änderung des daraus herstellbaren Hemmungskörpers vor sich zu gehen. Folgender Versuch ergibt die durch Behandlung mit  $\text{NH}_3$  verschiedene Tage nach dem Filtrieren des Zymogens von der Schleimhaut erhaltenen Gerinnungszeiten:

	0 Tag	1 Tag	2 Tage	6 Tage
Lab ohne Zymogen	15 Min.	15 Min.	14 Min.	14 Min.
» mit » A	39 »	38 »	36 »	43 »
» » B	30 »	27 »	25 »	26 »

Auch nach langem Dialysieren des Zymogens wird mit  $\text{NH}_3$  Hemmungskörper erzeugt. Nach 5tägigem Dialysieren gegen destilliertes Wasser ergab sich:

1 ccm Lab + 2 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  11 Min.  
 1 » » + 2 » Zym. beh. mit  $\text{NH}_3$  48 »  
 1 » » + 2 » » » » » und mit  $\text{HCl}$  2 »

Auch hält sich der mit  $\text{NH}_3$  aus dem Zymogen erhaltene Hemmungskörper anscheinend mit unveränderten Eigenschaften längere Zeit im Eisschrank. So ergab ein Präparat, das nach der Behandlung mit  $\text{NH}_3$  und Neutralisieren 3 Wochen aufbewahrt worden war, folgende Gerinnungszeiten:

Lab ohne Hemmungskörper 18 Min.  
 » mit Hemmungskörper 50 »  
 » » » behandelt mit  $\text{HCl}$  1 »

Nach Erwärmen dieses Hemmungskörpers, 1 Stunde auf 37°, war dessen Hemmungsvermögen dasselbe wie vor dem

Erhitzen. Mit diesem Hemmungskörper wurde der Einfluß des Aufbewahrens bei  $37^{\circ}$  auf eine Mischung von Lab und Hemmungskörper untersucht. Eine Mischung von 10 ccm Lab und 20 ccm Hemmungskörper wurde bei  $37^{\circ}$  gehalten, und zu verschiedenen Zeiten wurde mit 3 ccm derselben die Gerinnungszeit von 10 ccm Milch bestimmt. Kontrolle ohne Hemmungskörper.

Ohne Hemmungskörper	10	Min.
Sofort nach dem Mischen	17	»
Nach 5 Min. bei $37^{\circ}$	$30\frac{1}{2}$	»
» 10 » » »	$32\frac{1}{2}$	»
» 15 » » »	33	»
» 20 » » »	33	»
» 25 » » »	33	»

In einem anderen Versuch wurden zwei gleiche Mischungen von Lab und Hemmungskörper bei verschiedenen Temperaturen gehalten — die eine bei  $18^{\circ}$  und die andere bei  $37^{\circ}$ . — und nach verschiedenen Zeiten mit gleichen Volumen von beiden die Gerinnungszeiten bei  $37^{\circ}$  genommen:

	$18^{\circ}$		$37^{\circ}$	
	17	Min.	25	Min.
5 Min. nach dem Mischen	17	Min.	25	Min.
10 » » » »	$20\frac{1}{2}$	»	28	»
15 » » » »	$22\frac{1}{2}$	»	29	»
20 » » » »	24	»	$28\frac{1}{2}$	»
25 » » » »	25	»	29	»
30 » » » »	25	»	29	»

Mit dem gleichen Hemmungskörper wurde geprüft, ob die Menge des anwesenden Wassers auf die Menge des durch den Hemmungskörper neutralisierten Labs irgend welchen Einfluß ausübt. Zu dem Zwecke wurden folgende Mischungen hergestellt:

1 ccm Lab	+	1 ccm Hemmungskörper	+	2 ccm $H_2O$	A
1 »	»	1 »	»	1 »	B
1 »	»	1 »	»	ohne	C
1 »	»	3 »	»	$H_2O$	D

Die Mischungen wurden 45 Minuten bei  $37^{\circ}$  gehalten, da voraussichtlich während dieser Zeit die durch den Hemmungskörper neutralisierte Labmenge einen konstanten Betrag

erreichen würde. Dann wurden alle Mischungen durch Zugabe von Wasser zu B und C auf dasselbe Volumen (4 ccm) gebracht und darauf sofort 10 ccm Milch zugefügt. Die Gerinnungszeiten waren:

Mit D (ohne Hemmkörper)	15	Min.
» A » » »	30	»
» B » » »	30	»
» C » » »	30 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	»

Wie aus den eben dargelegten Versuchen ersichtlich, ist die Wirkung des mit  $\text{NH}_3$  erhaltenen Hemmkörpers bis zu einer gewissen Grenze größer, eine je längere Zeit die Mischung von Lab und Hemmkörper vor dem Zusatz der Milch aufbewahrt wird und bei je höherer Temperatur. Ferner ist die während dieses Aufbewahrens anwesende Menge von Wasser für die Menge des schließlich neutralisierten Labs ohne Belang. In den genannten Beziehungen stimmt also der Hemmkörper mit dem von mir vorher untersuchten Hemmkörper des normalen Serums völlig überein.<sup>1)</sup> Auch mit Rücksicht darauf, daß beide durch  $\text{HCl}$  leicht ihr Hemmungsvermögen verlieren, ist Übereinstimmung vorhanden.

Aus den angeführten Versuchen geht hervor, daß die mit  $\text{NH}_3$  erzeugte hemmende Lösung durch die Einwirkung von  $\text{HCl}$  sein Hemmungsvermögen einbüßt und nunmehr wirksames Lab enthält. Wenn man aber die Menge des aus dem Zymogen herstellbaren Labs vor und nach dessen Erhitzen mit  $\text{NH}_3$  vergleicht, so ergibt sich, daß nach der Behandlung mit  $\text{NH}_3$  weniger Lab erhalten wird, als vor derselben.

Dasselbe Zymogen wurde einerseits mit  $\text{NH}_3$  30 Minuten bei  $37^\circ$  behandelt (A), andererseits mit der entsprechenden Menge  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  versetzt (B). Mit diesen Lösungen wurden folgende Gerinnungszeiten erhalten:

Lab + 2 ccm $\text{H}_2\text{O}$	18	Min.
» + 2 » A	38	»
» + 2 » B	6	»

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. LX, S. 102, 1909.

Dann wurden A und B in der gleichen Weise mit HCl 3 Stunden bei Zimmertemperatur behandelt. Mit 1 ccm der Lösungen in der Verdünnung 1 : 20 H<sub>2</sub>O ergab sich:

Mit A 14 Min.  
» B 8<sup>1</sup>/<sub>2</sub> »

Folgender Versuch beweist, daß parallel mit der Zunahme des Hemmungsvermögens unter der Behandlung mit NH<sub>3</sub> die aus dem Zymogen herstellbare Labmenge abnimmt. Die Hemmung nach verschiedenen Zeiten mit NH<sub>3</sub> geht aus folgender Tabelle hervor:

Lab + 2 ccm H <sub>2</sub> O	Gerinnungszeit
	13 Min.
» + 2 » Zymogen behandelt m. NH <sub>3</sub> 10 Min.	38
» + 2 » » » » » 20 »	46
» + 2 » » » » » » 30 »	48
» + 2 » » » » » » 40 »	48 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>
» + 2 » » » » » » 50 »	49
» + 2 » » » » » » 60 »	49 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>

Nach 4 Stunden mit HCl bei Zimmertemperatur wurden mit 1 ccm der Lösungen in der Verdünnung 1 : 50 H<sub>2</sub>O folgende Gerinnungszeiten erhalten:

Ohne Behandlung mit NH <sub>3</sub>	11 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Min.
Nach 10 Min.	15 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> »
» 20 »	19 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> »
» 30 »	21 »
» 40 »	24 »
» 50 »	25 »
» 60 »	27 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> »

Aus dem bereits mit HCl behandelten Zymogen oder dem fertigen Lab läßt sich mit NH<sub>3</sub> kein Hemmungskörper herstellen. Beim Behandeln von Lab mit NH<sub>3</sub> wird, wenn die Lablösung verdünnt ist, alles Lab zerlegt; ist die Lablösung konzentriert, so kann es eintreffen, daß ein Teil des Labs der Einwirkung von NH<sub>3</sub> hartnäckigen Widerstand leistet. Konzentriertes Zymogen wurde mit HCl (10 ccm + 2 ccm 1%ige HCl) eine Nacht im Eisschrank behandelt.

Darauf wurde neutralisiert und mit  $\text{NH}_3$  (10 ccm + 2 ccm 0,1-norm.  $\text{NH}_3$ ) angegebene Zeiten bei  $37^\circ$  behandelt und neutralisiert. Bei der gewöhnlichen Prüfung mit Lab ergab sich:

Lab + 2 ccm $\text{H}_2\text{O}$		15 Min.
+ 2 » Zymogen beh.	$\frac{1}{2}$ Std. mit $\text{NH}_3$	$4\frac{1}{2}$ »
+ 2 » »	1 » » »	$5\frac{1}{2}$ »
+ 2 » »	$1\frac{1}{4}$ » » »	$5\frac{1}{2}$ »

Irgend welche Hemmungssubstanz habe ich aber dabei nicht erhalten. Dagegen kann es eintreffen, daß verdünntes und mit  $\text{NH}_3$  behandeltes Lab unter erneutem Einfluß von  $\text{HCl}$  eine hemmende Substanz entstehen läßt, welche offenbar mit dem oben beschriebenen säurelabilen Hemmungskörper nichts zu tun hat. Möglicherweise ist dieselbe mit dem unter dem Einfluß von relativ starker Natronlauge erzeugten, gegen  $\text{HCl}$  relativ beständigen Hemmungskörper verwandt oder identisch (S. 192 u. 193).

Nach dem eben Gesagten wird bei der Bildung von Hemmungskörper unter der Einwirkung von  $\text{NH}_3$  auf das Labzymogen Lab zerstört. Auf der anderen Hand wird bei der gleichen Behandlung von fertigem, mit  $\text{HCl}$  aus dem Zymogen hergestellten Lab kein Hemmungskörper erzeugt, obwohl dabei das Lab reichlich zerlegt wird. Bei dem Entstehen von Lab aus dem Zymogen unter dem Einfluß von Salzsäure wird demnach entweder der Hemmungskörper oder möglicherweise irgend welche Muttersubstanz desselben zerlegt. Parallel mit der Zerstörung von Lab im Zymogen entsteht also freier Hemmungskörper und parallel mit der Zerlegung von Hemmungskörper wird freies Lab erzeugt. Diese Ergebnisse werden am einfachsten in der Weise erklärt, daß das Zymogen lediglich eine Verbindung ist zwischen Lab und dem mit  $\text{HCl}$  zerlegbaren Hemmungskörper. In der neutralen Infusion der Schleimhaut ist ein geringer Überschuß von Lab vorhanden. Mit  $\text{NH}_3$  kann dieses Lab sowie ein Teil des gebundenen zerlegt werden, und die resultierende Lösung wirkt deshalb nach Neutralisieren hemmend auf freies Lab. Mit  $\text{HCl}$  wird der so erzeugte Hemmungskörper sowie ein Teil oder vielleicht alles von dem am

Lab gebundenen zerlegt und folglich wirkt die mit HCl behandelte Lösung nach Neutralisieren wieder labungserregend.

Wird ein bereits mit  $\text{NH}_3$  behandeltes Zymogen mit einer solchen Menge fertigen Labs versetzt, daß dieselbe wieder eben labungserregend wirkt, so erwirbt dasselbe bei erneuerter Behandlung mit  $\text{NH}_3$  noch einmal hemmende Eigenschaften, allem Anschein nach in dem gleichen Grade wie vorher. In einem Versuche über diesen Gegenstand hemmte das einmal mit  $\text{NH}_3$  behandelte Zymogen wie folgt:

Lab + 2 ccm $\text{H}_2\text{O}$	6 Min.
» + 2 » Zymogen	22 $\frac{1}{2}$ »

Mit diesem Zymogen wurden folgende Mischungen hergestellt:

17 ccm Zymogen + 5 ccm $\text{H}_2\text{O}$	. . . . . A
17 » » + 5 » Lab	. . . . . B

Wie zu erwarten war, ergab die Mischung A Hemmung, während B freies Lab enthielt:

Lab + 2 ccm $\text{H}_2\text{O}$	13 $\frac{1}{2}$ Min.
» + 2 » A	39 »
» + 2 » B	9 »

Nach abermaligem Behandeln mit  $\text{NH}_3$  hemmten beide Mischungen praktisch gleich stark:

Lab + 2 ccm $\text{H}_2\text{O}$	13 $\frac{1}{2}$ Min.
» + 2 » A	41 »
» + 2 » B	45 »

In einem anderen Versuche wurde das ammoniakbehandelte Zymogen folgendermaßen mit Lab versetzt:

30 ccm Zym. + 15 ccm verdünntes Lab	. . . . . A
30 » » + 7,5 » » + 7,5 ccm $\text{H}_2\text{O}$	B
30 » » + 5 » » + 10 » »	C

Nach 2 Stunden bei  $37^\circ$  wurden mit 2 ccm der Mischungen folgende Gerinnungszeiten erhalten:

Mit A	11 $\frac{1}{2}$ Min.
» B	22 »
» C	28 »

Nach Behandlung mit  $\text{NH}_3$  und Neutralisieren hemmten die Mischungen wie folgt:

Lab + 2 ccm $\text{H}_2\text{O}$	16	Min.
» + 2 » A	51	»
» + 2 » B	48	»
» + 2 » C	49 $\frac{1}{2}$	»

In diesen Fällen war also die Hemmung nach der zweiten  $\text{NH}_3$ -Behandlung die gleiche unabhängig von der Menge des zugesetzten Labs.

Wenn zu dem ursprünglichen Zymogen geringe Mengen Lab zugegeben werden, habe ich auch die bei der  $\text{NH}_3$ -Behandlung gebildete Menge Hemmungskörper von der vorhandenen Labmenge unabhängig gefunden. In einem Falle wurden Mischungen bereitet wie folgt:

15 ccm Zymogen + 40 ccm $\text{H}_2\text{O}$ + 5 ccm Lab . . . A
15 » » + 40 » » + 5 » $\text{H}_2\text{O}$ . . . B

Ein Teil von A wurde 30 Minuten auf  $37^\circ$  erwärmt; darauf wurden die drei Lösungen wie gewöhnlich mit  $\text{NH}_3$  behandelt. Dann ergaben sich folgende Gerinnungszeiten:

Lab + 2 ccm $\text{H}_2\text{O}$	15 $\frac{1}{2}$	Min.
» + 2 » A erwärmt auf $37^\circ$	42	»
» + 2 » A nicht erwärmt	43	»
» + 2 » B	44 $\frac{1}{2}$	»

Anders stellt sich aber die Sache, wenn dem ursprünglichen Zymogen Labmengen zugesetzt werden, welche der im Zymogen selbst vorhandenen Menge von Lab gleichkommen oder sie übertreffen.

Um solche Fälle zu prüfen, habe ich konzentriertes Zymogen mit konzentriertem Lab versetzt, das aus demselben Zymogen mit  $\text{HCl}$  erhalten war. In einem Versuche wurde folgendermaßen verfahren: 5 ccm Zymogen + 15 ccm konzentriertes Lab wurden zunächst 30 Minuten bei  $37^\circ$  gehalten und dann 1 Stunde wie oben mit  $\text{NH}_3$  behandelt und neutralisiert (A). Eine gleiche Mischung wurde sofort nach dem Herstellen mit  $\text{NH}_3$  behandelt und neutralisiert (B). Eine Mischung von 5 ccm Zymogen + 15 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  wurden sofort

mit  $\text{NH}_3$  behandelt und neutralisiert (C). Dann wurde mit Lab folgende Gerinnungszeiten erhalten:

1 ccm Lab + 2 ccm $\text{H}_2\text{O}$	13 $\frac{1}{2}$ Min.
1 „ „ + 2 „ A	13 $\frac{1}{2}$ „
1 „ „ + 2 „ B	22 „
1 „ „ + 2 „ C	33 $\frac{1}{2}$ „

In einem anderen Versuche mit anderem Zymogen konnte der gleiche Einfluß der Enzymmenge nachgewiesen werden. Die Lösungen waren wie die entsprechenden Lösungen des vorangehenden Versuches erhalten:

1 ccm Lab + 2 ccm $\text{H}_2\text{O}$	15 Min.	
1 „ „ + 2 „ B		26 „
1 „ „ + 2 „ C		35 $\frac{1}{2}$ „

In diesen zwei Versuchen zeigt also das Hemmungsvermögen eine ausgesprochene Abhängigkeit von der Menge vorhandenen Labs. Das mit Lab versetzte Zymogen ergab bei der Behandlung mit  $\text{NH}_3$  eine geringere Hemmung als das nur mit Wasser verdünnte Zymogen, und zwar wurde in dem ersten Versuche nach Erwärmen der Lab-Zymogen-Mischung (A) noch weniger Hemmung (überhaupt keine) erhalten als ohne Anwärmen (B).

Als allgemeines Resultat der Versuche, bei welchen dem Zymogen vor der Behandlung mit Ammoniak Lab zugesetzt wurde, ergibt sich also, daß eine geringe Labmenge keinen ausgesprochenen Einfluß auf die bei der  $\text{NH}_3$ -Behandlung gebildete Menge Hemmungskörper ausübt, wohl aber kommt ein solcher Einfluß nach Zugabe von größeren Labmengen zustande, und zwar wird in solchen Fällen um so weniger Hemmungskörper erhalten, je mehr Lab vorhanden ist. Dies hängt vielleicht mit der oben erwähnten Tatsache zusammen, daß in einer verdünnten Lablösung alles Lab durch Ammoniak leicht zerlegt wird, während in einer konzentrierten Lablösung ein Teil des Labs der Einwirkung von Ammoniak hartnäckig widersteht. Man kann sich wohl denken, daß in einer konzentrierten Lablösung irgend welche Substanz (z. B. Eiweiß) in solchen Mengen vorhanden ist, daß dieselbe einen

Teil des Labs vor Einwirkung schützen kann. Andererseits liegt nach dem oben Gesagten das Freiwerden von Hemmungskörper an Zerstörung von Lab. Man kann sich auch denken, daß der vorhandene Hemmungskörper von einer größeren Labmenge — besonders beim Erwärmen der Mischung — mehr bindet als von einer geringeren. Bei der darauf folgenden Behandlung mit  $\text{NH}_3$  wird deshalb das Lab in der Probe mit der größeren Labmenge nicht in dem gleichen Umfange zerlegt wie in der mit geringerer Labmenge, und folglich wird im ersteren Falle weniger Hemmungskörper frei als im letzteren. Nach dieser Betrachtungsweise schützt also der im Zymogen vorhandene Hemmungskörper bis zu einem gewissen Grade das Lab gegen die zerstörende Einwirkung von Ammoniak.

In der Weise dürfte wohl auch die Tatsache zu deuten sein, daß bereits fertiges, durch Behandlung von Zymogen mit  $\text{HCl}$  und Neutralisieren erhaltenes Lab der Einwirkung von Ammoniak leichter unterliegt als das Lab in dem entsprechenden Zymogen. Daß dem so ist, geht aus folgendem Versuch hervor.

Zymogen wurde einerseits mit  $\text{HCl}$  (10 ccm Zymogen + 2 ccm 1%ige  $\text{HCl}$ ) eine Nacht im Eisschrank aktiviert und neutralisiert (A), andererseits mit der entsprechenden Menge Salz versetzt (B). Dann wurden beide Lösungen in der Verdünnung 1:10  $\text{H}_2\text{O}$  mit  $\text{NH}_3$  (10 ccm + 2 ccm 0,1-n- $\text{NH}_3$ ) 1 Stunde bei  $37^\circ$  behandelt und mit titrierter Säure neutralisiert. Darauf wurden Proben von beiden mit  $\text{HCl}$  2 Stunden bei Zimmertemperatur behandelt und neutralisiert. Andere Proben wurden mit dem entsprechenden Volumen Salzlösung versetzt. Die Prüfung geschah mit gewöhnlichem Lab:

Lab + 2 ccm $\text{H}_2\text{O}$	16	Min.
» + 2 » Lab (A) behandelt mit $\text{NH}_3$	10	»
» + 2 » » » » » und mit $\text{HCl}$	11 $\frac{1}{2}$	»
» + 2 » Zym. (B) » » » »	38	»
» + 2 » » » » » und mit $\text{HCl}$	2	»

Obwohl also das Lab (A), wie immer, viel mehr aktives Enzym enthielt als das entsprechende Zymogen (B), ergab

dasselbe nach der Behandlung mit  $\text{NH}_3$  und mit  $\text{HCl}$  eine viel schwächere Labwirkung als das in gleicher Weise behandelte Zymogen. Der Hemmungskörper schützt offenbar bis zu einem gewissen Grade das Lab gegen den zerstörenden Einfluß des Ammoniaks. Diese Ergebnisse stehen mit einer Angabe von Langley in vollkommenem Einklang, der zufolge das Zymogen der Einwirkung von Alkalien besser widersteht als bereits fertiges Lab.<sup>1)</sup>

#### Das Labzymogen verglichen mit einer Mischung von fertigem Lab mit Serum.

Von dem bereits Angeführten stützt alles die Ansicht, daß das sogenannte Labzymogen lediglich eine Verbindung ist zwischen Lab und einer hemmenden Substanz, und bisher ist nichts gefunden, das mit dieser Ansicht nicht in Einklang zu bringen wäre. Wird das Zymogen mit  $\text{HCl}$  behandelt, so wird der Hemmungskörper zum Teil oder vollständig zerlegt und die Labwirkung wird verstärkt; wird das Zymogen mit schwachem Ammoniak behandelt, wird das Lab zum Teil zerstört, und ein Teil des Hemmungskörpers wird folglich aktiviert.

Es würde deshalb von Interesse sein, zu erfahren, ob die Verbindung zwischen Lab und dessen Hemmungskörper im Serum wie das Zymogen sich verhält. Um dieser Frage näher zu treten, habe ich sehr konzentriertes Lab mit neutralisiertem, verdünntem und darauf dialysiertem Serum vermischt und zwar in solchen Mengen, daß die Mischung auch nach langem Erhitzen auf  $37^\circ$  eine schwache Labwirkung zeigte und also von vornherein in dieser Beziehung wie das Zymogen sich verhielt.

In einem Versuche mit Ochsen Serum wurde die Mischung 3 Stunden bei  $37^\circ$  gehalten. Dann wurde ein Teil davon mit  $\text{NH}_3$  ( $10 + 2$  ccm  $0,1\text{-n-NH}_3$ )  $\frac{1}{2}$  Stunde bei  $37^\circ$  behandelt und neutralisiert, ein anderer Teil wurde mit der entsprechenden Menge  $\text{Am}_2\text{SO}_4$ -Lösung versetzt. Proben von beiden Lösungen

<sup>1)</sup> Journ. of Physiol., Bd. III, S. 269, 1881.

wurden dann einerseits mit HCl  $1/2$  Stunde bei Zimmertemperatur behandelt und neutralisiert, andererseits mit der entsprechenden Menge NaCl-Lösung versetzt. Dann wurde mit der gleichen Labmenge wie gewöhnlich geprüft, ob mit den so erhaltenen 4 Lösungen Labwirkung oder Hemmungswirkung zu erzielen war:

1 ccm Lab	+	2 ccm H <sub>2</sub> O		16 $1/2$ Min.
1 »	»	+ 2 »	Mischung nicht behandelt mit NH <sub>3</sub>	7 $1/2$ »
1 »	»	+ 2 »	» » » » » »	»
			aber mit HCl	1 $1/2$ »
1 »	»	+ 2 »	Mischung beh. mit NH <sub>3</sub>	62 »
1 »	»	+ 2 »	» » » » und mit HCl	15 »

Die Mischung enthielt also zu Anfang des Versuches freies Lab, das mit HCl an Menge zunahm: mit NH<sub>3</sub> erwarb die Mischung hemmende Eigenschaften, welche mit HCl verschwanden. Die gleichen Resultate, wenn auch die Hemmung weniger ausgesprochen war, habe ich in anderen Versuchen mit Ochsen Serum bekommen, wie z. B. aus folgenden Ziffern zu ersehen ist:

1 ccm Lab	+	2 ccm H <sub>2</sub> O		16 Min.
1 »	»	+ 2 »	Mischung nicht behandelt mit NH <sub>3</sub>	8 $1/2$ »
1 »	»	+ 2 »	» » » » » »	»
			aber mit HCl	1 »
1 »	»	+ 2 »	Mischung beh. mit NH <sub>3</sub>	22 »
1 »	»	+ 2 »	» » » » und mit HCl	12 »

Zugleich ist zu ersehen, daß mit HCl in beiden Fällen — mit und ohne vorangegangene Behandlung mit NH<sub>3</sub> — Lab frei wird, daß aber die ganze Labmenge nach Behandlung mit NH<sub>3</sub> geringer ist, als wenn keine Behandlung mit NH<sub>3</sub> vorangegangen ist. Bei der Behandlung mit NH<sub>3</sub> wird also ein Teil des Labs zerstört, und eben an dieser Zerstörung von Lab liegt das Freiwerden des Hemmungskörpers ganz wie beim Zymogen.

Andere Versuche wurden mit neutralisiertem und dialysiertem Pferdeserum angestellt. Eine Mischung von Kalbslab und Pferdeserum wurde 1 Stunde bei 37° gehalten. Dann wurde

wie in den Versuchen mit Ochsen Serum verfahren. Die Resultate waren:

1 ccm Lab	+ 2 ccm H <sub>2</sub> O	17½ Min.
1 »	» + 2 » Mischung nicht behandelt mit NH <sub>3</sub>	5½ »
1 »	» + 2 » » » » » » » »	»
	aber mit HCl	2 »
1 »	» + 2 » Mischung beh. mit NH <sub>3</sub>	41 »
1 »	» + 2 » » » » » und mit HCl	11 »

Die Ergebnisse sind also die gleichen wie mit dem Ochsen Serum und mit dem Kalbszymogen. Aus der Lab-Serum-Verbindung wird mit HCl Lab frei und mit NH<sub>3</sub> Hemmungskörper; im ersteren Falle wird Hemmungskörper zerstört, im letzteren Lab.

Die aus der Lab-Serum-Mischung durch NH<sub>3</sub> freiwerdende Menge von Hemmungskörper ist ferner von der Menge des zugesetzten Labs abhängig, sowie auch von der Zeit, während welcher dasselbe auf den Hemmungskörper vor der Behandlung mit NH<sub>3</sub> einwirkt. Folgender Versuch beleuchtet das eben Gesagte. Mischungen wurden wie folgt hergestellt:

15 ccm Pferdeserum	+ 15 ccm Lab	+ 5 ccm H <sub>2</sub> O	A	
15 »	»	+ 20 »	+ 5 »	B

A und B wurden 1 Stunde auf 37° erwärmt; eine dritte Mischung B<sub>1</sub>, welche die gleichen Bestandteile wie B enthielt, wurde nicht erwärmt, sondern sofort nach dem Herstellen weiter behandelt. Proben von den drei Mischungen wurden wie gewöhnlich mit NH<sub>3</sub> behandelt und neutralisiert resp. mit der entsprechenden Menge von Am<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung versetzt. Dann wurde wie gewöhnlich mit Lab geprüft.

Lab	+ 2 ccm H <sub>2</sub> O	13 Min.
»	+ 2 » von A nicht beh. mit NH <sub>3</sub>	13½ »
»	+ 2 » » » beh. mit NH <sub>3</sub>	120 »
»	+ 2 » von B nicht beh. mit NH <sub>3</sub>	3 »
»	+ 2 » » » beh. mit NH <sub>3</sub>	27 »
»	+ 2 » von B <sub>1</sub> beh. mit NH <sub>3</sub>	keine Labung in 3 Stunden.

Es wurde also bei der Behandlung mit NH<sub>3</sub> um so mehr Hemmungskörper frei, je weniger Lab am Anfang zugegen war. Auch wurde nach einer Stunde Erhitzen der Lab-Serum-Mischung auf 37° bei darauf folgender Behandlung mit NH<sub>3</sub> weniger Lab

frei, als wenn die Behandlung mit  $\text{NH}_3$  sofort nach dem Herstellen der Mischung vorgenommen wurde. Dieselben Resultate sind dem folgenden Versuch zu entnehmen: Mischungen wurden wie folgt hergestellt:

10 ccm verd. Serum	+	10 ccm Lablösung	A
10 " " "	+	10 " $\text{H}_2\text{O}$	B

A wurde 30 Minuten bei  $37^\circ$  gehalten, dann mit  $\text{NH}_3$  wie gewöhnlich 30 Minuten bei  $37^\circ$  behandelt und neutralisiert. Eine andere Mischung  $A_1$  wurde ganz wie A bereitet, aber sofort nach dem Herstellen in der gleichen Weise wie A mit  $\text{NH}_3$  behandelt. B wurde auch mit  $\text{NH}_3$  behandelt und neutralisiert, während eine andere Mischung  $B_1$ , welche wie B hergestellt wurde, ohne Behandlung mit  $\text{NH}_3$  zu der entsprechenden Menge  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung gesetzt wurde. Bei darauf folgender Prüfung der Lösungen mit der gleichen Menge Lab ergab sich:

1 ccm Lab	+	2 ccm $\text{H}_2\text{O}$	$6\frac{1}{2}$ Min.
1 " " "	+	1 " A	$8\frac{1}{2}$ "
1 " " "	+	1 " $A_1$	$14\frac{1}{2}$ "
1 " " "	+	1 " B	80 "
1 " " "	+	1 " $B_1$	keine Labung in 3 Std.

Vor der Behandlung mit  $\text{NH}_3$  enthielten sowohl A wie  $A_1$  wirksames Lab, da 2 ccm von A eine Gerinnungszeit von 7 Minuten ergaben. Nach der Behandlung mit  $\text{NH}_3$  wurden Proben von sämtlichen Mischungen mit  $\text{HCl}$  (10 ccm + 2 ccm 1%ige  $\text{HCl}$ ) 2 Stunden bei Zimmertemperatur behandelt. Dann wurde wie gewöhnlich mit Lab geprüft:

Lab	+	2 ccm $\text{H}_2\text{O}$	13 Min.
"	+	2 " A	13 "
"	+	2 " $A_1$	13 "
"	+	2 " B	$11\frac{1}{2}$ "
"	+	2 " $B_1$	$11\frac{1}{2}$ "

Die in den Mischungen vorhandenen Hemmungskörper waren folglich alle durch  $\text{HCl}$  zerlegbar; die Mischungen B und  $B_1$ , welchen kein Lab zugegeben worden war, ergaben sogar eine kürzere Gerinnungszeit als das Lab allein, was ich bereits vorher gefunden habe.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. LX, S. 91, 1909.

Außer den bereits hervorgehobenen Resultaten ist aus dem letzten Versuche folgendes hervorzuheben:

Die Gerinnungszeiten (erste Tabelle) mit Lab und B (ammoniakbehandeltem Serum) verglichen mit der mit Lab und B<sub>1</sub> (demselben Serum, nicht behandelt mit NH<sub>3</sub>) zeigt, daß der Hemmungskörper im Serum durch Ammoniak etwas geschädigt wird. Aus den Gerinnungszeiten mit A verglichen mit der mit B<sub>1</sub> ist ferner zu ersehen, daß nach dem Erwärmen von Serum mit Lab (A) nur ein geringer Teil des Hemmungskörpers durch Ammoniak aktiviert werden kann. Schließlich ist aus der zweiten Tabelle zu folgern, daß bei der Ammoniakbehandlung der Mischungen A und A<sub>1</sub> alles in denselben vorhandene Lab zerstört wurde.

Die zwei letzten Versuche zeigen zugleich, daß aus einer Lab-Serum-Mischung mit NH<sub>3</sub> um so mehr Hemmungskörper freigemacht werden kann, je weniger Lab am Anfang zugegen war und eine je kürzere Zeit dasselbe auf den Hemmungskörper vor dem Zugeben von NH<sub>3</sub> einwirkte. Andererseits ist aus meinen bereits vorher publizierten Untersuchungen über die Hemmung der Labwirkung zu ersehen, daß die Verbindung zwischen Lab und Hemmungskörper bis zu einer gewissen Grenze in ausgiebiger Weise erfolgt, eine je längere Zeit die reagierenden Substanzen miteinander in Berührung gelassen werden.<sup>1)</sup> Die Verbindung gewinnt offenbar mit der Zeit an Festigkeit. Nach den obigen Versuchen nimmt die Festigkeit auch mit der Labmenge zu, indem mit zunehmender Labmenge weniger Hemmungskörper durch NH<sub>3</sub> freigesetzt werden kann. Wenn dem so ist, so muß man auch erwarten, daß die Menge von Hemmungskörper von Bedeutung sein muß für die durch HCl aus einer Verbindung Lab-Hemmungskörper freiwerdende Menge von Lab. Bei früheren Versuchen über diesen Gegenstand habe ich aus der Verbindung von Lab mit dem Hemmungskörper im Serum durch Behandlung mit HCl nur einen Teil des Labs wieder in wirksamer Form erhalten können, obwohl der freie Hemmungskörper durch HCl in der gleichen Menge vollkommen vernichtet werden konnte.<sup>1)</sup> Das Lab schützt

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. LX, S. 89 u. 95, 1909.

offenbar den Hemmungskörper zum Teil gegen die Einwirkung der Säure. Und wie eben angedeutet wurde, läßt sich erwarten, daß das Lab um so mehr Hemmungskörper schützt, je mehr von dem letzteren vorhanden ist, oder daß die mit HCl aktivierte Labmenge mit der Menge von Hemmungskörper abnimmt. Daß dies der Wirklichkeit entspricht, geht aus folgendem Versuch hervor.

Mischungen von Lab und neutralem Pferdeserum wurden bereitet wie folgt:

15 ccm Lab	+	10 ccm H <sub>2</sub> O			A
15 „	„	+ 2,5 „ Serum	+	7,5 ccm H <sub>2</sub> O	B
15 „	„	+ 5 „	„	+ 5 „	C
15 „	„	+ 10 „	„	„	D

Die Mischungen wurden 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Stunden auf 37° erhitzt und dann 3 Stunden mit HCl wie oben bei Zimmertemperatur gehalten und neutralisiert. Darauf wurde die Labmenge mit je 1 ccm bestimmt. Es wurde erhalten

mit A	10	Min.
B	14 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	„
C	16 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	„
D	18	„

Eine Probe, welche wie D bereitet war, wurde nicht auf 37° erhitzt, sondern sofort mit HCl behandelt; dieselbe ergab: 15 Minuten.

In einer Mischung von 10 ccm der Serumlösung + 15 ccm H<sub>2</sub>O wurde mit HCl in 3 Stunden bei Zimmertemperatur aller Hemmungskörper zerlegt:

Lab	+	2 ccm H <sub>2</sub> O	21 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Min.
„	+	2 „ Mischung	18 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> „

Wie ich vorher immer gefunden habe, ergab die Probe mit Serum sogar eine kürzere Gerinnungszeit als die Kontrollprobe ohne Serum,<sup>1)</sup> was wahrscheinlich an dem Vorhandensein einer geringen Labmenge im Serum liegt. Die Ziffern des angeführten Versuches bestätigen das oben Gesagte auch insofern, daß nach Erhitzen einer Labserummischung auf 37°

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. LX., S. 91, 1909.

bei darauffolgender Behandlung mit HCl weniger Lab frei wird, als ohne Erhitzen.

Eine Mischung von Lab + Serum verhält sich also insofern wie das Zymogen, als aus beiden mit HCl Lab frei wird und mit  $\text{NH}_3$  Hemmungskörper. Auch die Abhängigkeit der mit  $\text{NH}_3$  freiwerdenden Menge Hemmungskörper von der Menge vorhandenen Labs ist in beiden Fällen die gleiche. Nehmen wir an, daß auch das Zymogen aus Lab und Hemmungskörper gebildet ist, so muß die Menge von Lab sehr groß sein, und es kann folglich nicht wundernehmen, daß von dem Hemmungskörper nur sehr wenig in wirksamer Form wieder erhalten werden konnte.

In einer Mischung von Lab und Serum konnte nach der Behandlung mit HCl ein Teil des dabei außer Wirkung gesetzten Hemmungskörpers beim Aufbewahren der neutralisierten Lösung wieder in wirksamer Form auftreten.<sup>1)</sup> Beim Zymogen habe ich eine derartige Erholung des Hemmungskörpers noch nicht beobachtet.

Ich möchte also die Frage unentschieden lassen, ob der Hemmungskörper im Zymogen identisch ist mit dem im Serum. Es ist aber ohnehin klar, daß das Zymogen oder die wässerige, neutrale Infusion der Magenschleimhaut stets eine geringe Menge Blut enthalten muß, und immerhin liegt die Möglichkeit vor, daß ein Teil der Hemmung davon herrühren kann. Mit Rücksicht hierauf ist es von einigem Interesse, das Hemmungsvermögen von Kalbsserum mit dem von ammoniakbehandeltem Zymogen zu vergleichen. Zu dem Zwecke habe ich mir von demselben Tiere Zymogenlösung und Serum bereitet. Im allgemeinen wird angenommen, daß das Blut  $\frac{1}{13}$ — $\frac{1}{19}$  des Körpers ausmacht. Da der abgeschabten Magenschleimhaut viel Waschwasser anhaftet, können wir annehmen, daß der Blutgehalt desselben nicht  $\frac{1}{15}$  des Gewichtes überstieg. Die Schleimhaut wurde mit 5 Teilen Wasser behandelt und nach Filtrieren wurde die Lösung mit 3 Volumen Wasser verdünnt. Vor der Behandlung mit  $\text{NH}_3$  war also der Blutgehalt der Lösung auf höchstens

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. LX, S. 95, 1909.

$\frac{1}{360}$  zu veranschlagen. Bei der Behandlung mit  $\text{NH}_3$  kamen auf 10 ccm Lösung 2 ccm  $\text{NH}_3$ -Lösung und beim Neutralisieren außerdem noch 2 ccm  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung. Die fertige Lösung enthielt also höchstens  $\frac{1}{500}$  Blut. Um das Serum auf dieselbe Verdünnung zu bringen und derselben die entsprechende Menge  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  zuzuführen, habe ich dasselbe zunächst mit 360 Teilen Wasser verdünnt und dann mit der Mischung von  $\text{NH}_3$  und  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt. Die Zymogenlösung und die verdünnte Serumlösung wurden dann mit Lab auf Hemmungsvermögen geprüft. In einem Falle ergab sich:

Lab	+	2 ccm $\text{H}_2\text{O}$	14 $\frac{1}{2}$ Min.
»	+	2 » Serum	14 $\frac{1}{2}$ »
»	+	2 » Zymogen	30 »

In einem anderen Versuch wurde das verdünnte Serum einerseits wie oben mit  $\text{Am}_2\text{SO}_4$ -Lösung versetzt, andererseits wie das Zymogen mit  $\text{NH}_3$  behandelt und neutralisiert:

Lab	+	2 ccm $\text{H}_2\text{O}_4$	14 Min.
»	+	2 » Serum mit Salz	13 $\frac{1}{2}$ »
»	+	2 » Serum beh. m. $\text{NH}_3$	13 »
»	+	2 » Zymogen	30 $\frac{1}{2}$ »

In keinem Falle war also irgend eine von dem Serum herrührende Hemmung nachzuweisen, während das Zymogen eine ausgesprochene Hemmung ergab. Allem Anschein nach rührt die hemmende Substanz von der Magenschleimhaut her, und dieselbe wird wahrscheinlich daselbst gebildet.

In bezug auf eine als Lab wirkende Mischung von Lab + Serum wäre es ferner von Interesse, zu erfahren, ob dieselbe in der gleichen Weise von dem Enzym-Zeitgesetz abweicht wie das Zymogen. Ich habe Versuche angestellt, um diese Frage etwas zu beleuchten, und dabei gefunden, daß Mischungen, welche nur wenig Serum enthalten, dem Gesetze ganz gut folgen. Mischungen von Lab und Serum, welche viel Serum enthalten und trotzdem eine mäßige Labwirkung zeigen, weichen aber von der Regel ab und zwar in der gleichen Richtung wie konzentrierte Zymogenlösungen, wenn auch nicht in so ausgesprochenem Grade wie diese:

Konzentration der Mischung	Gerinnungszeiten		
	I.	II.	III.
1	8 <sup>3</sup> / <sub>4</sub> Min.	9 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Min.	17 Min.
1/2	16	18 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	28 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>
1/3	23	25	40 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>
1/4	30	32	54

Die Nichtgültigkeit der Enzym-Zeitregel für Zymogenlösungen sowie für als Lab wirkende Mischungen von Lab und Serum liegt offenbar an dem Vorhandensein der Hemmungskörper. Wenn man annimmt, daß dieselben beim Zugeben der Milch durch das Casein von der Verbindung mit dem Lab zum Teil verdrängt werden, und daß in einer geringeren Zymogenmenge resp. geringeren Menge von Lab-Serum-Mischung verhältnismäßig mehr Hemmungskörper verdrängt wird als in einer größeren, so muß man in letzterem Falle eine verhältnismäßig kürzere Gerinnungszeit erhalten als im ersteren, wie bei den Versuchen gefunden wurde.

### Zusammenfassung.

Aus den vorstehenden Untersuchungen ergibt sich:

1. Eine möglichst neutrale Infusion des Kalbsmagens (Labzymogen) enthält immer wirksames Lab, das aber in mehreren Beziehungen von dem mit Salzsäure erhaltenen Lab sich unterscheidet.

2. Das im Zymogen vorhandene wirksame Lab gehorcht nicht dem Enzym-Zeitgesetz, sondern ergibt für geringe Zymogenmengen eine verhältnismäßig kürzere Gerinnungszeit als für größere (S. 189 u. 190).

3. Schon längst ist es bekannt, daß das Zymogen mit Salzsäure behandelt an labungserregender Fähigkeit zunimmt. Aus vorstehenden Versuchen ergibt sich, daß das Zymogen, wenn es in einer 0,017 normaler Lösung von Ammoniak kurze Zeit auf 37° erwärmt und dann neutralisiert wird, sein labungserregendes Vermögen einbüßt und nunmehr die Wirkung zugesetzten Labs hemmt (S. 195). Diese Hemmungswirkung verhält sich in vielen Beziehungen wie die Hemmung durch

neutrales Serum (S. 198). Unter Einwirkung von Salzsäure verschwindet das Hemmungsvermögen sehr schnell, und die Lösung wird wieder labungserregend. Nach der Behandlung mit Salzsäure kann derselbe Hemmungskörper durch Behandlung mit Ammoniak nicht wieder hergestellt werden (S. 199).

4. Eine Mischung von viel Lab und viel Serum, welches eine schwache Labwirkung zeigt, weicht in der gleichen Weise wie das Zymogen von dem Enzym-Zeitgesetz ab (S. 213). Eine solche Mischung erzeugt mit Salzsäure behandelt freies Lab unter Zerlegung des im Serum vorhandenen Hemmungskörpers. Wird anderseits eine Mischung von viel Lab mit viel Serum mit schwachem Ammoniak behandelt, so wird Hemmungskörper aktiviert unter Zerstörung von Lab (S. 205).

Diese Ergebnisse machen eine gute Stütze für die Ansicht aus, daß das Zymogen lediglich als eine Verbindung zwischen Lab und einem Hemmungskörper zu betrachten ist. Aus dieser Verbindung, die immer einen geringen Überschuß an Lab enthält, wird das Lab durch Einwirkung von Salzsäure frei und zwar in der Weise, daß Hemmungskörper zerlegt wird. Ob der Hemmungskörper vollständig oder nur zum Teil zerlegt wird, läßt sich zurzeit nicht entscheiden. Anderseits wird mit Ammoniak in passender Verdünnung der Hemmungskörper zum Teil frei und zwar durch Zerstörung von Lab. Ein Teil des Hemmungskörpers bleibt aber bei der Behandlung mit Ammoniak in Verbindung mit Lab, was daraus hervorgeht, daß die hemmende Lösung nach Behandlung mit Salzsäure und Neutralisieren wieder labungserregend wird. Der im Zymogen vorhandene Hemmungskörper kann nicht von in der Schleimhaut eingeschlossenem Serum herrühren, da das Kalbsserum in entsprechender Verdünnung die Labwirkung nicht hemmt (S. 211).

---