

## XXIII.

**Ueber fermentative Prozesse in den Organen.**

(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts zu Berlin.)

Von Dr. Heinrich Schwiening.

Bekanntlich gehen in den Geweben auch noch nach dem Tode chemische Prozesse vor sich, die man wohl ohne Bedenken als denen während des Lebens gleichartig ansehen kann, vorausgesetzt, dass die äusseren Bedingungen denen während des Lebens möglichst ähnlich gemacht, und namentlich anderweitige, durch von aussen herantretende Einflüsse hervorgerufene Umsetzungen u. s. w. ferngehalten werden, also besonders, wenn es gelingt, die Thätigkeit von Fäulnissbakterien zu verhindern.

Zur Entscheidung darüber, ob ein chemischer Prozess im thierischen Gewebe von überlebendem Protoplasma direct oder von einem von der Zelle gelieferten Produkte, einem Enzyme, oder von postmortalen fremden Einflüssen abhängig sei, hat E. Salkowski<sup>1)</sup> das Chloroform und das Chloroformwasser empfohlen, ein Mittel, welches bei grosser chemischer Indifferenz und Leichtflüchtigkeit starke antiseptische und für das Protoplasma deletäre Eigenschaften besitzt, ohne die Wirkung der Enzyme zu stören.

In zerkleinertem Gewebe, mit Chloroformwasser (1:10) übergossen, wird das Protoplasma abgetödtet, und Fäulniss ferngehalten, während die gelösten Fermente ganz unangegriffen bleiben. Enthalten nun die so behandelten Gewebe Fermente, so müssen diese in's Chloroformwasser übergehen; wirken diese Fermente auf Substrate der Gewebe selbst ein, so gehen die Produkte dieser Wirkung auch in das Chloroformwasser über. Man hat also in dem Chloroformwasser ein vorzügliches Mittel zur Aufsuchung von Fermenten in den Geweben, zumal sich

<sup>1)</sup> E. Salkowski, Ueber die antiseptische Wirkung des Chloroformwassers. Deutsche med. Wochenschr. 1888. No. 16.

dasselbe in Folge seiner Leichtflüchtigkeit jederzeit durch einen Luftstrom entfernen lässt.

Die erste Beobachtung über das Vorkommen solcher Fermente, welche auf die Substrate der Zelle selbst einwirken, machte Salkowski<sup>1)</sup> an der Hefe. Liess er amyllumfreie Presshefe einige Tage unter Chloroformwasser stehen, so blieb die sogenannte Selbstgährung der Hefe — Bildung von Alkohol und Kohlensäure, welche regelmässig eintritt, wenn man Hefe mit Wasser übergossen stehen lässt — aus, dagegen bildete sich eine ansehnliche Quantität linksdrehenden, gährungsfähigen Zuckers. Diese Zuckerbildung trat nicht auf, wenn man die Hefe vorher durch Erhitzen sterilisirt hat, und dann erst mit Chloroformwasser stehen lässt. Hierin lag der Anstoss für die Anordnung einer Versuchsreihe, welche Salkowski zuerst noch weiter an der Hefe anstellte, dann aber auch auf andere Gewebe ausdehnte, und der er den Namen der Autodigestion der Organe<sup>2)</sup> gegeben hat.

Die allgemeine Anordnung der Versuche war folgende:

Das betreffende Organ, einem soeben verbluteten Thiere entnommen, wird fein zerhackt und mit der zehnfachen Quantität Chloroformwasser vermischt in vorher sterilisirte Glasstöpselflaschen gespült; darauf wurden der Mischung noch einige cem Chloroform hinzugefügt, um der vollständigen Sättigung mit Chloroform sicher zu sein, dann die Mischung kräftig durchgeschüttelt und bei Brüttemperatur 60–70 Stunden digerirt.

Zu jedem derartigen Versuche gehört nun ein Controlversuch, durch welchen festzustellen ist, was von dem im Hauptversuch Ermittelten auf Rechnung der Wirkung des Wassers allein, unter Ausschluss einer jeden Fermentwirkung, bezw. auf Rechnung der nachfolgenden Procedures zu setzen ist.

Es wurde also jedesmal eine zweite, gleiche Quantität des Organbreies abgewogen, durch 1½ständiges Erhitzen im strömenden Dampf sterilisirt, und dann erst ebenso behandelt wie im Hauptversuch. Das Sterilisiren im strömenden Dampfe hat nun

<sup>1)</sup> E. Salkowski, Ueber Zuckerbildung und andere Fermentationen in der Hefe. Zeitschr. für physiol. Chem. XIII. S. 506 ff.

<sup>2)</sup> E. Salkowski, Ueber Autodigestion der Organe. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. XVII. Suppl.

eine erhebliche Bildung von Leim zur Folge, welcher in Lösung geht und die Quantität der in Lösung gegangenen, stickstoffhaltigen Substanzen zu Ungunsten des Hauptversuches vermehrt.

Dieser Fehler lässt sich leicht dadurch vermeiden, dass man im Controlversuch die abgewogene Quantität Organbrei nicht im strömenden Dampfe sterilisirt, sondern mit der etwa 10fachen Quantität Wasser zum Kochen erhitzt, erkalten lässt, dann erst das nöthige Chloroform zusetzt, gut durchschüttelt und digerirt. Im Hauptversuch muss dann ebenfalls eine Kochung stattfinden, natürlich nicht am Anfang, sondern am Ende des Verfahrens. Nunmehr sind Haupt- und Controlversuch analog, mit dem einzigen Unterschied, dass in dem Controlversuch die Kochung vor der Digestion stattfindet, zum Ausschluss der Fermentwirkung, in dem Hauptversuch nach der Digestion, also nachdem die Fermentation stattgefunden hat.

Bei dem Erhitzen zum Sieden gehen nun, wenn auch nicht in demselben Umfange wie bei  $1\frac{1}{2}$ stündigem Erhitzen im strömenden Dampfe, Substanzen, namentlich Leim, in Lösung, welche bei der Digestion allein sich nicht lösen. Man hat also in der durch Filtration der Mischung des Hauptversuches erhaltenen Lösung nicht allein die Produkte der Fermentation, sondern auch die der Einwirkung des siedenden Wassers. In quantitativer Beziehung ist allerdings dieser Uebelstand unwesentlich, da man durch Abziehen der im Controlversuche erhaltenen Werthe doch erfährt, was der Autodigestion als solcher zuzuschreiben ist. Der Nachtheil, dass Produkte des siedenden Wassers in Lösung gehen, welche das Resultat in qualitativer Beziehung trüben, lässt sich aber nicht vermeiden. Salkowski hat deshalb theils nach der einen, theils nach der anderen Versuchsanordnung gearbeitet, ich habe dagegen nur das Kochen beider Mischungen, vor und nach der Digestion angewandt.

Die Resultate Salkowski's waren folgende:

1. Die Xanthinkörper gehen in den Hauptversuchen, sowohl bei Hefe als auch im Muskel- und Leberbrei, vollständig, in dem Controlversuch nur zum Theil in Lösung; in dem Hauptversuch ist also die ganze darstellbare Quantität von Xanthinkörpern aufgetreten, so dass durch Kochen der Rückstände mit verdünnter Säure nach Kossel zur Zerlegung etwa noch vorhan-

denen Nucleins nur noch Spuren von Xanthinkörpern erhalten werden konnten; zugleich war es in „manifesten Form“ vorhanden, d. h. durch ammoniakalische Silberlösung direct vollkommen fällbar; in dem Controlversuche steckte noch ein Theil in Form von Nuclein im Organbrei — der in Lösung gegangene Antheil war aber nur zum Theil direct fällbar, zum Theil erst nach Kochen mit verdünnter  $H_2SO_4$  vor dem Silberzusatz, er war also in „latenter Form“ vorhanden.

2. In den Leberauszügen fand sich im Hauptversuch (wir wollen ihn von jetzt an der Kürze wegen A, den Controlversuch B nennen): Zucker, kein Glykogen, erhebliche Quantitäten von Leucin, Tyrosin, keine Biuretreaction, während in B nur Spuren von Zucker, reichlich Glykogen, kein Leucin und Tyrosin, Biuretreaction sich zeigt. Ferner war in A erheblich mehr organische Substanz,  $P_2O_5$  und N in Lösung gegangen als in B. Der Säuregehalt war in beiden Fällen der gleiche.

3. In den Muskelauszügen war in A keine Biuretreaction, schwache Reduction von  $CuO$  zu  $Cu_2O$  zu constatiren, während B umgekehrt gute Biuretreaction, aber keine Reduction zeigte. In beiden war kein Leucin und Tyrosin. Organische Substanz,  $P_2O_5$  und N waren in A nicht vermehrt, im Gegensatz zur Leber. Ein geringes Plus von Säuren erwies sich als Fettsäure, wahrscheinlich in Folge der fettspaltenden Wirkung der Gewebe.

Die folgenden Versuche wurden zunächst begonnen als Wiederholungen der Salkowski'schen Untersuchungen unter Berücksichtigung einzelner besonderer Fragen, welche Salkowski schon am Schluss seiner Arbeit angeregt hat. Im Laufe der Untersuchungen tauchten aber eine Menge anderer, mit der Autodigestion nicht direct in Zusammenhang stehender Fragen auf, die ich berücksichtigen zu müssen glaubte, so dass der Titel der Arbeit „Ueber fermentative Prozesse in Organen“ mir geeigneter schien als: Autodigestion der Organe.

#### Versuch I.

Die möglichst schnell abpräparierte Musculatur eines durch Verbluten aus der Carotis getödteten Kaninchens wird gut zerkleinert, in 2 Theile zu je 250 g getheilt; der eine wird, mit 2500 ccm Chloroformwasser übergossen, in einer sterilisirten Flasche bei Brüttemperatur digerirt (Hauptversuch A); während der zweite Theil zuerst mit 2500 Wasser aufgekocht, nach dem

Erkalten mit  $12\frac{1}{2}$  ccm Chloroform versetzt, nun erst in einer sterilisirten Flasche digerirt wird (Controlversuch B). Nach 48 stündiger Digestion wird der Inhalt der Flasche A in einer Schale zum Sieden erhitzt und einige Minuten darin erhalten.

Der Inhalt der Flasche B wird in diesem Versuche nicht noch einmal erhitzt.

Beide Flüssigkeiten werden colirt, nachgewaschen; der Auszug von A ist ziemlich klar, hellgelb, der Auszug von B ziemlich trübe. Die Reaction ist bei beiden neutral. Sie werden auf dem Wasserbade bis unter 250 ccm eingedampft, nach dem Erkalten auf 250 ccm aufgefüllt und nochmals filtrirt. Der Auszug von A ist jetzt absolut klar, der von B bleibt trübe.

Es wurden folgende Bestimmungen ausgeführt:

#### I. Trockenrückstand.

a) 20 ccm von A lieferten, auf dem Wasserbade bis zur Trockne eingedampft und bei  $110^{\circ}$  bis zur Gewichtsconstanz getrocknet

0,6998 Trockenrückstand, darin

0,5115 Organisches,

0,1883 Salze.

b) 20 ccm von B lieferten, ebenso behandelt

0,6706 Trockenrückstand, darin

0,4911 Organisches,

0,1796 Salze.

Die Aschenrückstände von A und B in  $\text{H}_2\text{O} + \text{HCl}$  gelöst und die Gesammtphosphorsäure bestimmt:

A: 0,0650  $\text{P}_2\text{O}_5$

B: 0,0605  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

#### II. Zuckerreactionen.

Von A und B werden etwa 20 ccm durch Erwärmen von Chloroform<sup>1)</sup> befreit, nach dem Erkalten wieder auf 20 ccm aufgefüllt.

Die Trommer'sche Probe mit NaOH und  $\text{CuSO}_4$  giebt in beiden Auszügen keine deutliche Zuckerreaction, wenngleich eine leichte Reduction, bei A stärker als bei B, bemerkbar ist.

Um zu untersuchen, ob  $\text{Cu}_2\text{O}$  sich zwar gebildet, aber nicht ausgefallen ist, wird HCl und KCNS hinzugefügt (Bildung von  $\text{CuCl}_2$  und Umwandlung desselben in völlig unlösliches Kupfersulfocyanür): in A ein sehr erheblicher Niederschlag, in B viel geringer.

Reaction mit Fehling'scher Lösung fällt ebenfalls nicht beweisend aus.

#### III. Milchsäurebestimmung.

200 ccm von jeder Flüssigkeit werden bis zur Syrupconsistenz eingedampft (Reaction neutral), mit absolutem Alkohol gefällt, filtrirt, das Filtrat

<sup>1)</sup> Die Auszüge wurden, da es nicht möglich war, alle Untersuchungen unmittelbar nach dem Eindampfen vorzunehmen, stets mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und so vor dem Verderben geschützt in gut schliessenden Flaschen stehen gelassen.

zur Entfernung des Alkohols eingedampft. Der Rückstand in Wasser aufgenommen, mit Barytwasser bis zu alkalischer Reaction versetzt, zur Entfernung etwaiger Fettsäuren durch Seifenbildung, filtrirt, nachgewaschen. Das Filtrat wird zur Entfernung des Fettes mit Aether ausgeschüttelt, darauf mit 5 ccm Orthophosphorsäure versetzt und nun je 5—6 mal mit immer neuen Mengen Aether ausgeschüttelt.

Der Aether wird abdestillirt, der Destillationsrückstand mit Aether nochmals ausgewaschen, der Aether verdunstet. Der Rückstand wird in Wasser gelöst, filtrirt, in gewogenem Schälchen mehrmals eingedampft, im Exsiccator getrocknet. Der hellgelbe, syrupöse Rückstand wiegt bei A 0,119, bei B 0,117 g. Wieder in Wasser gelöst, mit Zinkoxyd gekocht, filtrirt, nachgewaschen, bis zu beginnender Krystallisation eingedampft, dann über  $\text{H}_2\text{SO}_4$  stehen gelassen. Es ergibt sich bei A 0,158 g, bei B 0,181 g Zinc. paraceticum.

Die Krystalle, die schön weiss und rein aussehen, werden in Wasser gelöst, mit  $\text{H}_2\text{S}$  vom Zink befreit, filtrirt, eingedampft — beide Portionen zeigen die Uffelmann'sche Reaction.

Die mit Aether ausgeschüttelten wässrigen Rückstände werden, auf dem Wasserbade vom Aether befreit, zur Entfernung der  $\text{P}_2\text{O}_5$  mit Barytwasser versetzt, filtrirt, vom überschüssigen Ba mittelst  $\text{CO}_2$  befreit, filtrirt, eingeeengt, in Wasser aufgenommen, mit Alkohol gefällt, filtrirt; der Alkohol wird aus den Filtraten vertrieben, die Rückstände auf 50 ccm aufgefüllt. Beide Portionen werden mit Essigsäure neutralisirt, mit bas. Bleiacetat gefällt, filtrirt, die Filtrate mit  $\text{NH}_3$  und Bleiessig versetzt und zum völligen Ausfällen stehen gelassen. Darauf werden die Fällungen filtrirt: 1) Der Filtrerrückstand in Wasser aufgenommen, mit  $\text{H}_2\text{S}$  entbleit, filtrirt, das Filtrat eingedampft. Der Rückstand ist bei A erheblich grösser als bei B. Leider geht durch Zerbrechen des Kolbens ein Theil von A verloren, so dass genauere quantitative Bestimmungen nicht möglich sind. Beide Rückstände werden auf 30 ccm aufgefüllt:

Trommer'sche Probe bei beiden nicht beweisend, wenngleich bei A eine gewisse Reduction eingetreten ist. Dasselbe Resultat ergeben die mit frisch bereiteter Fehling'scher Lösung angestellten Versuche.

Auf Zusatz von  $\text{HCl}$  und  $\text{KCNS}$  fällt in A ein ziemlich reichlicher, in B gar kein Niederschlag aus.

Die beiden Reste zeigen deutliche Kohlehydratreaction (Zusatz von  $\alpha$ -Naphthol und concentr.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und Bildung von Furfurol).

Beim Stehenlassen von A, in Wasser gelöst, fällt ein Niederschlag aus, der unter dem Mikroskop den Verdacht auf Leucin erweckt, dessen Natur aber nicht näher untersucht wurde.

2) Das Filtrat wird mit  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  vom Blei befreit, filtrirt, eingedampft, Trommer'sche Probe: weder A noch B positive Zuckerreaction, wenn auch in A leichte Reduction sichtbar.

Auf Zusatz von  $\text{HCl}$  und  $\text{KCNS}$  in beiden Portionen ein dichter Niederschlag; in A jedoch viel stärker als in B. Da Kreatinin theils

die Trommer'sche Probe stört, theils das  $\text{CuO}$  in Lösung halten kann, wird die Weyl'sche Kreatininprobe (auf Zusatz von  $\text{NaOH}$  mit Nitroprussidnatrium  $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}$  rubinrothe Färbung und rasches Gelbwerden) angestellt und fällt auch intensiv aus.

Xantbinkörper fallen auf Zusatz von ammoniakalischer Silberlösung nicht aus.

Rechnet man die bei den quantitativen Bestimmungen erhaltenen Resultate auf 1000 g Muskel um, so ergibt sich Folgendes:

Aus 1000 g Muskel sind in Lösung gegangen:	Im Haupt- versuch (A)	Im Control- versuch (B)	Differenz zwischen AB
Organische Substanz . . .	25,575	24,555	+1,02
Aschenbestandtheile, darin .	9,415	8,975	+0,44
Phosphorsäure . . . . .	0,325	0,3025	+0,023
Milchsäure, als Zinc. paralact. berechnet . . . . .	0,790	0,905	—0,115.

1. Vergleichen wir die gewonnenen quantitativen Resultate, betreffend die Trockenrückstände mit denen, die Salkowski an den Muskeln gefunden, so zeigt sich, dass zwar hier organische Substanz sowohl wie Salze und Phosphorsäure darin im Hauptversuch vermehrt sind — im Gegensatz zu den anderen Resultaten, wo nur für die Mineralsubstanzen eine geringe Zunahme constatirt werden konnte. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Versuche an der Leber kommen aber auch diese geringen Zunahmen kaum in Betracht.

2. Milchsäure fehlt nicht, wie Salkowski nach den ersten Versuchen annahm, sondern ist, wenn auch in sehr geringer Menge, vorhanden. Insofern bestätigen meine Versuche jedoch die früheren, dass der Prozess der Autodigestion keinen vermehrenden Einfluss hat auf die Bildung von in Wasser löslichen Säuren. Weitere Versuche sollen über diesen Punkt noch näheren Aufschluss geben.

3. Eigenthümliche Verhältnisse zeigten sich bei dem Versuche, Zucker im Muskelauszuge nachzuweisen. Dass eine reducirende Substanz in dem ursprünglichen Auszuge, sowohl in A wie in B vorhanden ist, kann wohl mit Sicherheit behauptet werden, ebenso dass A stärker reducirte als B. Auch der starke Niederschlag in A bei Zusatz von  $\text{HCl}$  und  $\text{KCNS}$  ist ein Beweis, dass Reduction von  $\text{CuO}$  zu  $\text{Cu}_2\text{O}$  eingetreten ist. Ob diese Reduction jedoch von Traubenzucker herrührt, ist damit nicht erwiesen.

Auch das Verhalten der mit Aether extrahirten wässrigen Rückstände lässt die Anwesenheit einer reducirenden Substanz als sicher erscheinen. Die Anwesenheit von Kreatinin legt die Vermuthung nahe, dass das Ausfallen von  $\text{Cu}_2\text{O}$  dadurch verhindert ist.

Die Alkoholniederschläge waren leider durch ein Versehen vernichtet, konnten also keiner Probe unterzogen werden.

4. Die Xanthinkörper, über deren Verhalten Salkowski genauere Mittheilungen gemacht, müssen bei der längeren Behandlung schon an irgend einer Stelle ausgefallen sein — ein neuer Beweis, dass es nicht möglich ist, mehrere Versuche an demselben Material vorzunehmen, ohne Fehler zu machen und Verluste zu erleiden.

#### Versuch II.

Ein kräftiger Hund wird durch Verbluten aus der Carotis getödtet. Darauf wird so schnell wie möglich die Schenkelmusculatur fein zerhackt; 5 Portionen à 300 g werden schnell abgewogen und folgendermaassen behandelt:

A. 300 g werden mit Chloroformwasser, 3000 ccm in sterilisirter Flasche bei Brüttemperatur digerirt etwa 70 Stunden lang; darauf aufgekocht, colirt, die Colatur eingedampft und wie Hauptversuch A in Versuch I weiter behandelt.

B. 300 g werden mit 3000 ccm Wasser aufgekocht, nach dem Erkalten mit dem entsprechenden Chloroform versehen, und bei Brüttemperatur etwa 70 Stunden lang digerirt. Darauf gelinde erhitzt, colirt, die Colatur eingedampft und ebenso weiter behandelt.

C. 300 g werden mit 3000 ccm Wasser extrahirt, bis 40–50 Grad erwärmt, filtrirt; Filtrat wird gekocht und eingedampft. Der Extract ist schön klar. Die weitere Behandlung ist ebenso wie in A und B.

D. 300 g werden gekocht, filtrirt, das Filtrat wird eingedampft und wie oben weiter behandelt.

E. 300 g werden 48 Stunden lang bei Zimmertemperatur liegen gelassen, ohne dass bakterielle Veränderungen weder sichtbar sind noch mit dem Geruch wahrgenommen werden. Darauf in 1200 ccm Wasser  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 40–45 Grad digerirt, nachdem es bei Zimmertemperatur etwas aufgeweicht. Nachdem es colirt ist, wird der Rückstand nochmals zerhackt, digerirt, colirt, ausgepresst. Die vereinigten Colaturen werden enteiwisst, filtrirt, das Filtrat eingedampft, und so weiter behandelt.

Die gewonnenen Resultate, deren quantitative Ergebnisse ich in einer Tabelle unten folgen lasse, sind leider wenig zufriedenstellend.



Es zeigte sich, dass alle Zinkpräparate mehr oder minder durch schmierige Massen verunreinigt waren. Die angestellten Trocknungen bei  $100^{\circ}$  ergaben trotzdem, mit einer Ausnahme C, annähernden Krystallwassergehalt, von 12,18—13,92 pCt. (12,9 ist der theoretische Krystallwassergehalt), Zahlen, wie sie von anderen Autoren als beweisend angeführt werden.

Zur genaueren Untersuchung wurde der Zinkgehalt geprüft: die Salze wurden in Wasser unter Zusatz einiger Tropfen HCl gelöst, bis fast zum Sieden erhitzt, tropfenweise mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  versetzt, bis zu deutlicher Alkalescenzenz, darauf mehrere Minuten gekocht, durch ein aschefreies Filter decantirt und dies 3—4mal wiederholt. Das Filter wird dann mit kochendem Wasser nachgewaschen, bis das Wasser keine Chlorreaction und die Natriumflammenreaction nur noch Spuren von Na ergaben. Darauf wurde das Filter getrocknet, verbrannt, das gebildete Zinkcarbonat durch Glühen in Zinkoxyd verwandelt und dieses gewogen.

Es ergab sich nun, dass nur die Portion D, d. i. diejenige, welche nach dem gewöhnlichen Gang für die Milchsäurebestimmung behandelt war, dass nur diese einen dem Gewicht einigermaassen entsprechenden Zinkgehalt hatte: 33,34 pCt., statt 33,25 pCt.

Nimmt man an, es wäre alles vorhandene Zink nur an Milchsäure gebunden gewesen und berechnet man daraus die dem vorhandenen Zinkoxyd entsprechenden Mengen Zinkparalactat, so erhält man die Zahlen, die ich in der Columnne 7 der folgenden Tabelle eingefügt habe. Die Differenz zwischen diesen berechneten Zahlen und den gewonnenen Gewichten würde auf Verunreinigungen zu setzen sein. Hierbei zeigt sich, dass wieder Portion D am wenigsten verunreinigt wäre.

Ver- suchs- num- mer	Gewicht des Zinkparalactats		Gewichtsver- lust nach Trocknen bei $100^{\circ}$ C.		Menge des ge- wonnenen ZnO abso- in lut pCt.		Zinkpara- lactat, d. gewon- nenen ZnO entsprech.		Differenz zwischen ge- wogenem u. berechnete- tem Zink- paralactat	
	+ Kry- stall- wasser 1.	— Kry- stall- wasser 2.	abso- lut 3.	in pCt. 4.	5.	6.	33,2 7.	8.		
A.	0,3735	0,3255	0,047	12,58	0,069	21,19	0,2075	0,118		
B.	0,3805	0,3275	0,053	13,92	0,0685	20,91	0,2060	0,1215		
C.	0,319	0,2908	0,0285	9,81	0,09	30,94	0,2707	0,02		
D.	0,427	0,368	0,059	13,81	0,119	32,34	0,3579	0,01		
E.	0,509	0,4425	0,062	12,18	0,1145	25,88	0,3444	0,098.		

Zwischen A und B herrscht jedoch eine merkwürdige Uebereinstimmung.

Die Menge des bei der Analyse gewonnenen Zinkoxyds ist bei beiden Portionen fast gleich, in Procenten berechnet sind die Unterschiede auch nur gering, und die diesem Zinkgehalt entsprechenden Mengen von Zinkparalactat zeigen so minimale Differenzen, dass sie bei derartigen, immerhin nicht ganz zuverlässigen Darstellungsmethoden gar nicht in Betracht kommen.

Nimmt man hinzu, dass auch die ursprünglich gewonnenen Zahlen fast genau übereinstimmen, so wird man, glaube ich, mit gutem Gewissen sagen können, dass in beiden Versuchsmischungen gleichviel bezw. gleich wenig Milchsäure vorhanden ist.

Die Alkoholrückstände von A und B werden in heissem Wasser gelöst, auf 100 ccm gebracht. 25 ccm davon werden mit Knochenkohle entfärbt: beide zeigen keine Biuretprobe.

Je 10 ccm werden nach Kjeldahl auf N untersucht:

A in 10 ccm 0,0854 g N.

B in 10 ccm 0,056 g N.

Also in den ganzen Alkoholrückständen

A 0,854 g N. B 0,56 g N.

Wenn man auch aus diesen Zahlen keinen Schluss ziehen kann auf die absolute Menge des in Lösung gegangenen N, da sie nur aus den Alkohol-fällungen berechnet sind, so beweisen sie doch wiederum, dass bei der Auto-digestion der Muskeln mehr N frei wird als aus vorher gekochten Muskeln.

Die wässrigen Rückstände von der Aetheranschüttelung von A und B werden mit Phenylhydrazin und essigsaurem Natron (1:2) etwa  $1\frac{1}{2}$  Stunden gekocht; in A fällt ein ziemlich reichlicher Niederschlag aus, in B kommen fast nur harzige Massen zur Ausscheidung.

### Versuch III.

Ein grosser Hund wird durch Verbluten aus der Carotis getödtet; möglichst schnell werden Stücke aus der Schenkelmuskulatur von Fett und Bindegewebe gereinigt, zerhackt und in 2 Portionen à 400 g getheilt, die wie A und B in Versuch I behandelt werden.

Die quantitativen Ergebnisse waren folgende:

1) Milchsäures Zink aus A

über  $H_2SO_4$  getrocknet . . . 0,2245

bei 100° getrocknet . . . 0,1970

Verlust 0,0275 g = 12,2 pCt.

Der Gehalt an Zink, als Oxyd berechnet, ergibt sich zu 29,18 pCt.

## 2) Milchsäures Zink aus B

über  $\text{H}_2\text{SO}_4$  getrocknet . . . 0,2380bei  $100^\circ$  getrocknet . . . 0,211

Verlust 0,027 g = 10,92 pCt.

Der Gehalt an Zink, als Oxyd berechnet, ergibt sich zu 32,31 pCt.

Die wässrigen Rückstände der Aetherausschüttelung in Versuch II und III werden von der Phosphorsäure mit Baryt und von dem überschüssigen Baryt mit  $\text{CO}_2$  befreit, und dann mit salzsaurem Phenylhydrazin + Natriumacetat (1 : 2) versetzt, filtrirt; die Filtrate werden im Wasserbade  $1\frac{1}{2}$  Stunden erhitzt:

In A reichliche Ausscheidung,

in B gar keine Ausscheidung.

Der Schmelzpunkt des aus Versuch IIIA erhaltenen Niederschlages wurde ohne vorherige Reinigung bei  $184^\circ$  gefunden. Das Präparat wurde dann mit alkoholhaltigem Aether übergossen und unter gutem Umrühren einige Stunden stehen gelassen, filtrirt, mit Aether nachgewaschen, getrocknet. Der Schmelzpunkt liegt jetzt bei  $194^\circ$ . Der Schmelzpunkt des aus Versuch IIA erhaltenen Niederschlages liegt ursprünglich bei  $182^\circ$ , nach der Reinigung bei  $195^\circ$ .

Der Schmelzpunkt für Glykosazon liegt bei  $205^{01}$ ). 193 bis  $194^\circ$  ist der Schmelzpunkt für Galactosazon. Es ist vor der Hand höchst unwahrscheinlich und kaum anzunehmen, dass es wirklich Galactose sei, welche hier mit Phenylhydrazin in Verbindung gegangen sei. Möglicherweise würde es gelingen, durch nochmaliges Reinigen einen höheren Schmelzpunkt zu finden, der dem der Glykose entspricht. Weitere Untersuchung mit grösseren Mengen Materials müssen hierüber noch angestellt werden.

Nach Abschluss der Arbeit (dieselbe wurde im Wintersemester 1892/93 ausgeführt) ist eine Mittheilung von Pomarnoff (Zeitschrift f. physiol. Chemie XVIII, Heft 6, ausgegeben den 23. März 1893) erschienen, nach welcher derselbe gleichfalls Phenylglykosazon aus Muskeln, jedoch immer nur in sehr geringer Quantität erhalten und analysirt hat.

<sup>1)</sup> E. Fischer, Verbindungen des Phenylhydrazins mit den Zuckerarten. II. Bericht d. d. chem. Gesellsch.

Eine besondere Betrachtung verdienen die Verhältnisse der Milchsäure im Fleische, welcher in den letzten Jahrzehnten eine grosse Zahl von Forschern ihre Arbeit gewidmet haben; leider zeigt die Literatur sehr wenig Uebereinstimmung und weder die Frage der Entstehung, noch die des Ursprunges kann als entschieden betrachtet werden.

Von den 4 möglichen Säuren der Formel  $C_3H_6O_3$  kommen in physiologisch-chemischer Bedeutung nur die beiden Modificationen der Aethylidenmilchsäure oder Isopropylglykolsäure  $CH_3-CH(OH)-COOH$  in Betracht, die optisch inactive Gährungsmilchsäure, auch  $\alpha$ -Oxypropionsäure, und die optisch active rechtsdrehende Paramilchsäure, früher, auch jetzt noch Fleischmilchsäure genannt.

Von den beiden anderen von der Formel  $CH_2(OH)-CH_2-COOH$  ist die Hydracrylsäure gar nicht im Organismus gefunden worden, das Vorkommen der Aethylenmilchsäure oder  $\beta$ -Oxypropionsäure ist noch streitig.

Die  $\alpha$ -Oxypropionsäure oder Gährungsmilchsäure ist zuerst von Scheele in saurer Milch entdeckt, wo sie durch den Milchsäurebacillus entsteht. Die Paramilchsäure wurde zuerst von Liebig<sup>1)</sup> im Fleischextract gefunden.

Die beiden isomeren Säuren zeigen namentlich in ihren Salzen grosse Verschiedenheiten; über den in ihrem Krystallwassergehalt sich zeigenden Unterschied siehe Genaueres in der Anmerkung.

Anmerk. Das Zinksalz der Gährungsmilchsäure krystallisirt mit 3, das der Paramilchsäure mit 2 Moleculen Krystallwasser. Salkowski hat schon vor mehreren Jahren festgestellt, dass das gährungsmilchsaure Zink über  $H_2SO_4$  im Exsiccator stehend nach einiger Zeit, etwa 14 Tagen, sein gesamntes Krystallwasser (18,18 pCt. seines Gewichtes) verliert. Daher ist die gewöhnliche Angabe bei der Herstellung des Zinksalzes, die Lösung bis zur beginnenden Krystallisation einzudampfen und dann über  $H_2SO_4$  stehen zu lassen, wenig geeignet, richtige Resultate zu erzielen, da stets von vornherein etwas Krystallwasser darin verloren geht. Es lag nahe, auch für die Paramilchsäure die gleiche Eigenschaft anzunehmen, zumal sich in der Literatur über ein verschiedenes Verhalten der beiden Zinksalze nichts findet. Ueberhaupt schreiben weder die gebräuchlichen Hand- und Lehrbücher der organischen Chemie älteren und neueren Datums (Limpricht, Wöhler,

<sup>1)</sup> J. Liebig, Annal. d. Chem. und Pharm. Bd. 62. S. 326.

Kolbe, Richter, Beilstein) noch die der physiologischen Chemie (Lehmann, Kuehne, Marchand, Liebig, Hammersten, Hoppe-Seyler) etwas über das Verhalten der Lactate über  $H_2SO_4$ , nur Gmelin giebt von dem Zinc. lacticum an, dass „es nichts über Vitriol verliere“. Bei  $100-110^\circ$ , lauten die übereinstimmenden Angaben, verliert das gährungsmilchsaure Zink sehr schnell, das Zinkparalactat sehr langsam sein Krystallwasser. Nun hat Werther <sup>1)</sup> in letzter Zeit angegeben, dass das Zinc. paralacticum über  $H_2SO_4$  1 Molecül (6,5 pCt.) verlöre.

Um diesen Widerspruch zwischen dem gährungsmilchsauren und paramilchsauren Zink, wie er in den Angaben und Versuchen von Gmelin, Salkowski und Werther sich zeigt, zu controliren, habe ich eine Anzahl von Portionen der beiden Salze theils über  $H_2SO_4$ , theils über  $CaCl_2$  längere Zeit hindurch stehen lassen und von Zeit zu Zeit das Gewicht festgestellt. Das dabei benutzte Zinc. parataticum war aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium des Herrn Dr. Grübler-Leipzig bezogen. Es löste sich in Wasser vollständig bis auf minimale Spuren von  $ZnO$ . Sein Krystallwassergehalt bei  $100-110^\circ$  bestimmt, betrug 13,16 pCt.

Dabei zeigte sich nun, dass Parazinklatat über  $H_2SO_4$  durchweg in den ersten 21—24 Tagen gar nichts am Gewicht abnahm, dann ganz allmählich etwas leichter wurde, bis es, nachdem es etwa 75—80 Tage gestanden, einen grösseren Gewichtsverlust zeigte, und zwar war z. B. eine Portion um 1,94 pCt., eine andere um 3,9 pCt. leichter geworden. Das gährungsmilchsaure Zink, welches theilweise in demselben Exsiccator über derselben  $H_2SO_4$  gestanden, hatte dagegen schon nach 9 Tagen 6,5 pCt., also 1 Molecül verloren und zeigte, nach 75 Tagen, wahrscheinlich schon bedeutend früher, völligen Verlust des Krystallwassers (18,29 pCt.). Ueber  $CaCl_2$  zeigte das paramilchsaure Zink dasselbe Verhalten, d. h. nach 70 Tagen einen Verlust von 8,9 pCt., während hier die Gährungsmilchsäure nach 59 Tagen um 2,55 pCt. abgenommen hatte. Die angeführten Zahlen zeigen also, dass die Paramilchsäure durchaus nicht constant 1 Molecül über  $H_2SO_4$  verliert, wie Werther angiebt. Die Zahlen stehen in einem eigenthümlichen Verhältniss zu einander: 3,9 ist etwa  $\frac{1}{2}$  Molecül, 1,94 etwa  $\frac{1}{4}$  Molecül, beide allerdings etwas zu viel. Weit entfernt, hieraus etwa schliessen zu wollen, dass der Krystallwasserverlust der Paramilchsäure sich in bestimmten Bruchtheilen eines Molecüls bewege, je nach irgend welchen bisher unbekannten Verhältnissen, — glaube ich vielmehr, dass man von einem constanten Verlust über  $H_2SO_4$  gar nicht reden kann. Vielleicht ist ein Molecül das Maximum, welches es verlieren kann, jedenfalls scheinen dabei bei verschiedenen Präparaten auch verschiedene Verhältnisse zu herrschen. Eins glaube ich aber als sicher hinstellen zu können, dass das paramilchsaure Salz gleich seinem Verhalten bei  $100^\circ$  nur sehr langsam sein Krystallwasser abgiebt,

<sup>1)</sup> M. Werther, Ueber die Milchsäurebildung und den Glykogenverbrauch im quergestreiften Muskel in der Thätigkeit und bei der Todtenstarre. Pflüger's Archiv. Bd. 46. S. 70 und 76.

und dass darin ein bemerkenswerthes Unterscheidungsmerkmal zur Gährungsmilchsäure liegt, welches schon nach kurzer Zeit grössere Mengen des Wassers verliert und nach verhältnissmässig kurzer Zeit dasselbe ganz verloren hat.

Was nun die Milchsäure im Fleisch betrifft, so sind die Angaben darüber noch nicht ganz abgeschlossen. Ob, wie Heintz<sup>1)</sup> angiebt, auch die Gährungsmilchsäure im Fleisch vorkommt, ist wohl durchaus nicht sicher.

Wislicenus<sup>2)</sup>, der die genauesten Untersuchungen über diesen Gegenstand angestellt, ist zu dem Resultat gekommen, dass die Milchsäure im Fleische ein Gemisch von 2 verschiedenen Säuren sei, von denen die eine, die Hauptmenge, nach rechts dreht, gut krystallisirbare Salze bildet und mit der Aethylidenmilchsäure isomer ist; Heintz hat dieser dann den Namen Paramilchsäure gegeben. Daneben kommt eine andere Säure in viel geringerer Menge vor, die in ihren Salzen sehr geringes Krystallisationsvermögen besitzt, deren Zinksalz nur einen zerfliesslichen Gummi bildet; dies soll die Aethylenmilchsäure sein.

M. Siegfried<sup>3)</sup> hat diese wenig krystallisirende Milchsäure in neuerer Zeit in Form eines basischen Salzes abgeschieden und glaubt sie als Acetylmilchsäure erkannt zu haben. Er leitet sie ab von einer Vereinigung von milchsaurem und essigsaurem Zink beim Kochen ihrer Lösungen und glaubt, aus dem fast regelmässigen Vorkommen von Essigsäure im Muskel das Vorkommen dieses nicht krystallisirenden Lactates erklären zu können.

Da die eigentliche Milchsäure durch Gährung entsteht, so lag es nahe, auch für die Bildung der Paramilchsäure den Grund in einem Gährungs- oder wenigstens in einem enzymatischen Prozesse zu suchen. R. Maly<sup>4)</sup> fand auch bei Einwirkung von Magenschleimhaut auf Zucker etwa in der Hälfte der Fälle neben

<sup>1)</sup> Heintz, Ueber die Natur der Milchsäure im Fleisch. *Annal. d. Chem. u. Pharm.* Bd. 157. S. 314.

<sup>2)</sup> Wislicenus, Ueber die isomeren Milchsäuren. II. *Annal. d. Chem. u. Pharm.* Bd. 167. S. 302 ff.

<sup>3)</sup> M. Siegfried, Ueber die Aethylenmilchsäure. *Ber. d. d. chem. Gesellschaft.* 22. S. 2711 ff.

<sup>4)</sup> R. Maly, Ueber die Entstehung der Fleischmilchsäure (Paramilchsäure) durch Gährung. *Ber. d. d. chem. Gesellschaft.* 1874. Bd. 7. S. 1567.

Gährungsmilchsäure auch Paramilchsäure. Uebrigens ist in neuerer Zeit vielfach Bildung von Fleischmilchsäure durch Bakterien beobachtet worden, z. B. von Nencki und Sieber<sup>1)</sup> durch den *Micrococcus acidi paralactici*, den Rauschbrandbacillus, und manchen anderen. Ob man nun diese fermentative Entstehung aus Kohlehydraten auch auf den Organismus übertragen kann, ist eine andere Frage. Es handelt sich zuerst darum, unter welchen Bedingungen entsteht Milchsäure in den Muskeln bezw. wird sie vermehrt?

Die frühere Ansicht von der Bildung der Milchsäure bei der Thätigkeit des Muskels und der dadurch hervorgerufenen sauren Reaction des thätigen gegenüber der amphoteren Reaction des ruhenden Muskels (Du Bois-Reymond) wurde später von Astaschewsky<sup>2)</sup> bestritten, welcher in tetanisirten Muskeln keine freie Milchsäure auffinden konnte; selbst wenn er die Milchsäure durch HCl frei macht, ist die Menge derselben in tetanisirten Muskeln geringer als in ruhenden, ja in gelähmten Muskeln. Pflüger, Warren<sup>3)</sup> und Blome<sup>4)</sup> vertraten dieselbe Ansicht.

Im Gegensatz hierzu hatten schon Spiro<sup>5)</sup> nach anstrengender Muskelthätigkeit im Blute Fleischmilchsäure in nicht unerheblichen Mengen gefunden, vor Kurzem auch G. Colasanti und B. Moscatelli<sup>6)</sup> aus 15—20 Liter frischen Harn nach anstrengendem Marsche 0,48 g Zinc. paralacticum gewonnen. Direct im Froschmuskel hatte Marcuse<sup>7)</sup> die Vermehrung der

<sup>1)</sup> M. Nencki und N. Sieber, Ueber die Bildung von Paramilchsäure durch Gährung des Zuckers. Monatshefte für Chem. 10. 532—540.

<sup>2)</sup> Astaschewski, Ueber die Säurebildung und den Milchsäuregehalt der Muskeln. Zeitschr. f. physiol. Chem. IV. S. 397.

<sup>3)</sup> Warren, Ueber den Einfluss des Tetanus der Muskeln auf die in ihm enthaltene Säure. Pflüger's Archiv. Bd. 24. S. 391—406.

<sup>4)</sup> Blome, R., Beiträge zur Chemie des gestreiften Muskels. Arch. für experiment. Pathol. u. Pharm. 28. S. 113—125.

<sup>5)</sup> Spiro, Zur Physiologie der Milchsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. I. S. 111—118.

<sup>6)</sup> G. Colasanti und B. Moscatelli, Die Fleischmilchsäure im Harn der Soldaten nach anstrengenden Märschen. Estratto dal Bullettino della R. Accademia Medica di Roma. Anno XIII. 1886—1887. Fasc. VIII.

<sup>7)</sup> Marcuse, Ueber die Bildung der Milchsäure bei der Thätigkeit des Muskels und ihr weiteres Schicksal im Organismus. Pflüger's Archiv. Bd. 39. S. 425.

Milchsäure durch die Arbeit nachgewiesen und Moritz Werther (a. a. O.) dieselben Resultate an Kaninchenmuskeln erzielt.

Ferner entsteht sicher Milchsäure bei der sogenannten Todtenstarre, was wohl von keinem Autor bestritten ist.

Es liegt, worauf schon Salkowski hindeutet, etwas Paradoxes darin, dass ein und dieselbe Säure einerseits bei gesteigerter Leistung gebildet wird, andererseits im Tode. Allerdings liegen Angaben vor, dass die Muttersubstanz der Milchsäure in beiden Fällen nicht dieselbe sei. Dass es in beiden Fällen dieselbe Milchsäure ist, schliesst M. Werther (a. a. O.) aus dem gleichen Krystallwassergehalt der beiden Zinksalze. Während nemlich die Annahme nahe lag, die Milchsäure aus dem Muskelglykogen entstehen zu lassen, und auch einige Autoren, wie Nasse<sup>1)</sup> und Werther (a. a. O.) eine Abnahme des Glykogens bei der Starre beobachtet haben, hat Boehm<sup>2)</sup> in zahlreichen Versuchen bei der Todtenstarre keine Abnahme des Glykogens constatiren können, trotzdem er eine Milchsäurevermehrung fand. Dass bei der Thätigkeit dagegen stets das Glykogen verbraucht wird, ist bisher nicht bestritten worden, alle darüber gemachten Angaben [Nasse, Brücke und Weiss<sup>3)</sup>, Kuelz<sup>4)</sup>, Marcuse (a. a. O.) u. A.] sprechen von einer starken Abnahme, so dass man sich doch der Annahme, die Milchsäure entstehe aus den Kohlehydraten, nicht entziehen kann. Experimentell hat nun Berlinerblau<sup>5)</sup> zu beweisen versucht, dass die Kohlehydrate in den Geweben in Milchsäure übergehen können. Schon Gaglio<sup>6)</sup> hatte nachgewiesen, dass die im nor-

<sup>1)</sup> Nasse, O., Zur Anatomie und Physiologie der quergestreiften Muskelsubstanz. Leipzig 1882. F. C. W. Vogel.

<sup>2)</sup> Boehm, Ueber das Verhalten des Glykogens und der Milchsäure im Muskelfleisch mit besonderer Berücksichtigung der Todtenstarre. Pflüger's Archiv. Bd. 23. S. 44.

<sup>3)</sup> S. Weiss, Zur Statik des Glykogens im Thierkörper. Sitzungsber. d. Wien. Akad. 69. I. Abth.

<sup>4)</sup> E. Kuelz, Beiträge zur Kenntniss des Glykogens. Festschrift zum 50jährigen Doctorjubiläum des Herrn C. Ludwig. 1890.

<sup>5)</sup> Berlinerblau, Ueber das Vorkommen der Milchsäure im Blute und ihre Entstehung im Organismus. Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 23. S. 333.

<sup>6)</sup> Gaglio, Die Milchsäure im Blute und ihre Ursprungsstätten. Du Bois-Reymond's Archiv f. Physiol. 1886. S. 400.



malen Blut stets vorhandenen Spuren von Milchsäure bei Durchströmungsversuchen durch die Niere und Lunge vermehrt werden, dass es sich dabei auch wirklich um neugebildete Milchsäure handelt, da aus der Niere selbst nur minimale Spuren dargestellt werden können, Versuche, die später von W. Wissocowitsch<sup>1)</sup> mit demselben Erfolge auf die Leber ausgedehnt wurden. Berlinerblau leitete nun durch die Hintertheile von Kaninchen und Hunden Blut, dem er Dextrose, Glykogen, ferner Propionsäure und Buttersäure zugesetzt; es fand sich, dass schon nach einmaliger Durchleitung die Milchsäuremenge des Blutes um 50 pCt. gestiegen war. Er nimmt an, dass das Glykogen zuerst in Dextrose, und dann in Milchsäure übergehe. Dass für diese Durchleitungsversuche nicht postmortale Vorgänge in Betracht kommen, hat Gaglio (a. a. O.) dadurch bewiesen, dass gefrorene, also abgetödtete Lungen nicht mehr im Stande sind, Milchsäure zu bilden und abzugeben.

Dass in meinen Versuchen überhaupt Milchsäure vorhanden ist in nennenswerthen Quantitäten, lässt sich erstens leicht durch die Muskelaction der Thiere vor und beim Verbluten erklären. Zweitens kommt noch die Starre hinzu, der doch alle Portionen theils durch das Erwärmen, theils spontan (Versuch IV Port. E) verfallen sind.

Dass in allen Portionen A und B gleichviel Milchsäure gefunden ist, kann man, glaube ich, trotz der Verunreinigung der einzelnen Theile, wie schon oben erwähnt, annehmen.

Dass nun im Versuch II in den Portionen C und D (auch in E) so bedeutend mehr Milchsäure gebildet ist, findet seine leichte Erklärung in der Annahme von Salkowski, dass die Milchsäurebildung nur ein Lebensphänomen, kein Absterbephänomen sei. In den Theilen A und B ist die Möglichkeit für den Muskel, noch Lebensäusserungen von sich zu geben, auf ein Minimum beschränkt, bzw. gleich Null. In A hat das Chloroform seine deletäre Wirkung ausgeübt. B ist möglichst schnell zum Sieden erhitzt. Die Portion D dagegen ist, ehe sie zum Sieden erhitzt wurde, längere Zeit auf einer für die

<sup>1)</sup> Wissocowitsch, Die Gewinnung der Milchsäure aus der künstlich durchleiteten Leber. Du Bois-Reymond's Archiv. 1887.

Lebensäusserung günstigen Temperatur erhalten, C ist gar nicht bis zum Sieden erhitzt.

Wäre nun die Todtenstarre, d. h. die Contraction beim Absterben, die Ursache für die Milchsäurebildung, so müsste in allen Theilen gleich viel zu finden sein, nach der Angabe von Ranke, jedenfalls dürfte der Unterschied zwischen A-B und C-D nicht so gross sein, da A und B ebenso gut dieser Todtenstarre verfallen sind wie C und D. Das Plus in C und D muss also auf Rechnung anderer Vorgänge gesetzt werden, und da ist es wohl am natürlichsten, an eine überlebende Thätigkeit des Muskels zu denken, zumal wenn man die oben erwähnten Versuche von Berlinerblau und Gaglio in Betracht zieht, die ja doch auch zu dem Schluss kamen, dass nur lebendes Gewebe Milchsäure bilde. Es würde also die Säure so lange gebildet werden, wie der Muskel noch lebt, d. h. also noch im ersten Stadium der Starre, wo noch eine Restitutio ad integrum möglich ist.

G. Salomon<sup>1)</sup> hat schon vor längerer Zeit constatirt, dass im Leichenblut constant Hypoxanthin vorkomme, im lebenden Aderlassblute fast nie, und dieselbe Beobachtung an Milchsäure gemacht, wenn auch nicht mit gleicher Regelmässigkeit. Er spricht dabei von einer „postmortalen Anhäufung“ der Milchsäure im Blute, die während des Lebens im Muskel gebildet, aber sofort weiter oxydirt werde und erst nach dem Tode Gelegenheit fände, sich anzusammeln. Diese Ansicht stimmt mit unseren Untersuchungen überein — ob die von Salomon noch erwiesene directe Bildung der Milchsäure auch nur während des Ueberlebens des Blutes gebildet wird oder ihre Entstehung einer Art von Gährung der Kohlehydrate im Blute verdankt, bedürfte eigener Untersuchungen.

Auch die Portion E unterstützt die Ansicht, dass möglichst lange überlebende Muskeln mehr Milchsäure bilden als schnell der Starre anheimgegebene; kann man also von einer „postmortalen Anhäufung“ der Milchsäure sprechen, so ist eine postmortale Bildung derselben als nicht richtig zu bezeichnen. Lieber wird man die Bildung der Milchsäure als vital und

<sup>1)</sup> G. Salomon, Ueber die Verbreitung von Hypoxanthin und Milchsäure im thierischen Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 1878. 2. S. 65.

ultravital benennen können, nicht der Tod ist die Ursache der Milchsäurebildung, sondern das Leben des Muskels, sobald dies dahin ist, hört auch die Milchsäurebildung auf, oder wie Salkowski schreibt: „Der Muskel bildet nicht Milchsäure, weil er abstirbt, sondern weil er lebt, und nur, so lange er lebt; das Absterben setzt der weiteren Milchsäurebildung eine Grenze. Diese Anschauung hebt die Paradoxie auf, die darin liegt, dass ein und dieselbe Säure einerseits bei gesteigerter Leistung gebildet wird, andererseits beim Tode.“

#### Versuch IV.

Die Leber des in Versuch I benutzten Kaninchens wird unmittelbar nach dem Verbluten fein zerhackt und in 2 Theile zu je 55 g getheilt, die genau wie die beiden Muskelportionen in Versuch I behandelt werden. Dabei wird die Portion B etwas länger eingekocht, da durch ein Versehen mehr als die 10fache Quantität Wasser hinzugefügt wurde, — ein Fehler, der sich später in einem Punkte bemerkbar machen wird.

Nach 69stündiger Digestion wurden die Colaturen eingedampft und auf 200 ccm aufgefüllt. A ist vollkommen klar, B milchig trübe. Durch Zusatz von einigen Tropfen Chloroform werden sie vor dem Verderben geschützt.

Es wurden folgende Bestimmungen ausgeführt:

#### I. Trockenrückstand.

a) 20 ccm von A lieferten 0,491 Trockenrückstand, worin 0,439 Organisches und 0,052 Salze.

b) 20 ccm von B lieferten 0,481 Trockenrückstand, worin  
0,431 Organisches und  
0,050 Salze.

In der salzsauren Aschenlösung die Gesamtmphosphorsäure bestimmt:

Für je 20 ccm A: 0,015  $P_2O_5$

B: 0,0175  $P_2O_5$ .

#### II. Zuckerreactionen.

Die Trommer'sche Probe fällt in A sehr deutlich aus. In B zeigt sich beim Stehenlassen eine gewisse Reduction.

Als nach mehreren Wochen behufs einer Controle die Trommer'sche Probe mit dem Auszuge B, der während der Zeit mit Chloroformzusatz bei Zimmertemperatur gestanden hat, wiederholt wird, ergibt sich die bemerkenswerthe Thatsache, dass jetzt auch B sehr deutliche Reduction giebt und das gebildete  $Cu_2O$  in reichlicher Menge ausfällt.

#### III. Bestimmung der in Aether löslichen Substanzen.

Je 150 ccm von A und B werden bis zur Syrupconsistenz eingedampft und genau so behandelt wie die Muskelauszüge bei der Milchsäurebestimmung. (Versuch I, III.)

Die beiden gleich geringen Destillationsrückstände werden nach Trocknen über  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in Wasser mit Zusatz von etwas Natriumcarbonat gelöst und mit  $\text{HCl}$  angesäuert, dann zum Verdunsten stehen gelassen. Die Rückstände erweisen sich als etwas Fettsäure und hauptsächlich Chloride.

Die wässerigen, mit Aether ausgeschüttelten Rückstände werden mit Barytwasser von der  $\text{H}_2\text{PO}_4$  befreit; der überschüssige Baryt wird mit  $\text{CO}_2$  entfernt, die Flüssigkeiten werden filtrirt, eingedampft.

Die eingedampften Extracte werden mit den Alkoholniederschlägen in heissem Wasser gelöst, vereinigt, die vereinigten Flüssigkeiten auf 150 ccm aufgefüllt.

A und B geben beide positive Trommer'sche Probe.

Bei der Polarisation ergibt A eine Drehung nach rechts  $+2,2$  (im kleinen, 5 cm langen Rohre), zeigt B trotz 4fachen Verdünnens nur ein ganz schwarzes Gesichtsfeld.

Die quantitativen Ergebnisse waren, für 1000 g Leber berechnet:

Aus 1000 g Leber sind in Lösung gegangen:	Im Haupt- versuch A	Im Control- versuch B	Differenz zwischen A-B (auf A bezogen)
Organische Substanz . .	79,81	78,36	+1,45
Aschenbestandtheile . .	9,45	9,09	+0,36
Gesamtmphosphorsäure .	2,73	3,18	-0,45.

1) Die gewonnenen quantitativen Resultate stehen mit den von Salkowski gefundenen in einem gewissen Widerspruch. Der Trockenrückstand in A ist nur um 1,45 vermehrt als in B, gegen 12,24 bei Salkowski, die organische Substanz war um 0,36 gegen 0,74, ja die Phosphorsäure zeigt in B ein Plus von 0,45. Wahrscheinlich ist dies auf längeres Kochen zurückzuführen.

2) Bemerkenswerth sind die Ergebnisse bei der Prüfung auf Zucker. Dass von vornherein eine ganz geringe Reduction auch in B vorhanden war, also Zucker in der Leber präformirt vorkommt, steht fest und wird wohl auch jetzt von Niemand mehr bestritten. Dass aber der Auszug B, trotz des langen Kochens einfach nach etwas längerem Stehen unter Chloroform bei Zimmer-temperatur reichliche Mengen von Zucker enthielt, kam uns sehr unerwartet. Entsprechend zeigten auch die vereinigten Alkoholniederschläge und die mit Aether ausgeschüttelten wässerigen Rückstände sowohl in A als auch in B Reduction und Ausfallen von  $\text{Cu}_2\text{O}$  — der Versuch war auch erst nach längerem Stehen der Leberauszüge angefangen, während die erste Prüfung auf Zucker bald nach Herstellung der Auszüge angestellt war. Dass

die Polarisation bei B kein Ergebniss hatte, lag einfach an der grossen Menge Glykogen, während in A die Glykogen-Jodreaction von vornherein negativ ausgefallen war.

Ueber das spätere Auftreten von Zucker in dem Leberauszuge B sollen noch weiter unten einige genauere Versuche berichtet werden.

#### Versuch V.

Die Leber des im Versuch II benutzten Hundes wird fein zerhackt, und in 3 Theile à 180 g getheilt. Die ersten beiden Portionen A und B werden wie im ersten Leberversuch behandelt. Die dritte Portion C wird mit Chloroformwasser übergossen, fein zerrieben, colirt, die Colatur wird im Kühlen stehen gelassen, damit sich die zelligen Elemente so viel wie möglich absetzen, darauf filtrirt. Das Filtrat — es werden, da es sehr langsam filtrirt, nur 1135 ccm benutzt — wird mit dem nöthigen Chloroform versetzt bei Brüttemperatur 72 Stunden lang digerirt.

A und B werden nach der Digestion wie in Versuch II behandelt, dann auf 360 ccm aufgefüllt und mit einigen Tropfen Chloroform versetzt, um erst 4 Wochen später genauer untersucht zu werden.

In C hat sich nach der Digestion ein reichlicher Niederschlag gebildet. Um den Gang der Untersuchung A und B parallel zu gestalten, wird derselbe nicht erst abfiltrirt, sondern es wird die Flüssigkeit erst aufgeköcht, dann erst filtrirt — der Filtrerrückstand wird unter Alkohol aufbewahrt — das Filtrat eingedampft und auf 300 ccm aufgefüllt, und mit einigen Tropfen Chloroform ebenfalls vor dem Verderben geschützt.

Die Auszüge von A und B sehen bernsteingelb, klar aus, B ist weisslich getrübt.

1. Zuckerreactionen: Trommer'sche Probe: in allen 3 Flüssigkeiten positiv, am deutlichsten in B; in A und C wird sie durch reichliche Pepton- und Albumosenbildung verdeckt.

2. Glykogenreaction ist in allen 3 Portionen undeutlich. Daher werden je 50 ccm mit Alkohol gefällt, die Alkoholfällungen nach der Brücke'schen Methode weiter behandelt, d. h. abwechselnd mit Quecksilberjodidjodkalium und Salzsäure versetzt, der entstandene Niederschlag abfiltrirt, das Filtrat mit Alkohol gefällt. In A fällt ein ganz geringer, in B ein ziemlich reichlicher, in C gar kein Niederschlag aus.

Der abfiltrirte Niederschlag in B ergibt aber auch jetzt keine Glykogen-Jodreaction.

Die Filtrate der Alkoholfällungen werden von Alkohol befreit, eingedampft und in Wasser gelöst: Alle 3 Lösungen zeigen Zuckerreaction.

3. Je 200 ccm der Leberauszüge werden mit je 50 ccm  $H_2SO_4$  destillirt. Je 100 ccm des Destillates werden mit Normallauge titirt: schon nach einem Tropfen tritt Rothfärbung ein.

Säuren sind also nur in geringem Maasse übergegangen, von einem

quantitativen Unterschiede der Säurebildung bei den verschiedenen Behandlungsweisen der Leber kann gar keine Rede sein.

Die Reste der Destillate werden eingedampft: Die weissen amorphen Rückstände sind alle in concentr.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  löslich, unter Entwicklung eines Buttersäuregeruches, der bei A am intensivsten, bei B am schwächsten hervortritt.

Die Destillationsrückstände werden auf 250 ccm aufgefüllt, und je 25 ccm davon nach Kjeldahl auf N untersucht. Diese enthalten bei

A 0,0826 g N

B 0,0532 g N

C 0,0542 g N

oder gleich für 1000 g Leber berechnet

A 8,26 g N

B 5,32 g N

C 6,66 g N.

Der unter Alkohol aufbewahrte Filtrerrückstand von C wird in Wasser unter Zusatz von etwas  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  verrieben und bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann filtrirt. Das Filtrat giebt mit Essigsäure keinen Niederschlag. Der Filtrerrückstand wird mit Verdauungsflüssigkeit verrieben und bei 38—40° digerirt: nach 24 Stunden ist die gesammte Menge vollkommen gelöst. Einige ungelöste Flocken erweisen sich als Fasern vom Filtrirpapier. Die Lösung zeigt starke Biuretreaction.

Der Zweck dieses Versuches war, zu untersuchen, ob gelöste Fermente die Ursache der bei der Autodigestion eingetretenen Veränderungen sind. Es wurde deshalb die dritte Portion möglichst von zelligen Bestandtheilen befreit, — unter dem Mikroskop fand sich nur nach Durchsuchung vieler Gesichtsfelder eine Leberzelle — und wurde so, man kann sagen zellenfrei, digerirt. Da das Filtriren des III. Theiles sehr langsam von statten ging, wurde Sorge getragen, dass weder die Fermente noch die Zellen, so weit sie überhaupt noch lebend waren, ihr Temperaturoptimum hatten: es wurde die Filtration theilweise am kalten Fenster, theilweise sogar in der kalten Luft vor dem Fenster vorgenommen. Wir glauben also jede vorherige Einwirkung etwa nicht löslicher Fermente ausschliessen zu können.

Dass nun doch dieselben Veränderungen auch in diesen blossen Leberauszügen vor sich gegangen sind während der Autodigestion, spricht wohl mit Entschiedenheit dafür, dass es gelöste Fermente, sogenannte Enzyme sind, welche diese Wirkungen ausüben. Für die Zuckerbildung bestätigt dies die

allgemeine Ansicht, im Gegensatz zu Dastre<sup>1)</sup>, Florence Eves<sup>2)</sup> und Foster<sup>3)</sup>, welche die rasche Zuckerbildung in der absterbenden sowohl als auch in der lebenden Leber nicht auf der Thätigkeit einer Diastase, sondern auf einer in anderer Weise wirkenden Thätigkeit des Protoplasmas der Leberzellen beruhend ansehen.

Besonders wichtig erscheint mir noch der Destillationsversuch zu sein, dass in keiner der 3 Portionen Säure in nennenswerther Quantität gebildet wird.

Um die Bildung von Zucker in der frisch gekochten Leber näher zu untersuchen, wurden noch folgende Versuche angestellt:

#### Versuch VI.

Die Leber des im Versuch X (Controlversuch II) benutzten Kaninchens wird, sofort nach dem Verbluten von den grossen Gallengängen und der Gallenblase befreit, in 2 Theile zu je 26,5 g getheilt, und diese als Hauptversuch A und Controlversuch B nach Versuch II behandelt.

1. Sofort nach dem Auffüllen auf 100 ccm werden die beiden Portionen auf Zucker untersucht:

a) A sowohl wie B zeigen Reduction, bei B fallen jedoch erst nach langem Stehen einige wenige Spuren von  $\text{Cu}_2\text{O}$  aus.

b) 10 ccm von B werden mit Alcohol absolutus gefällt, filtrirt, der Alcohol verjagt, mit dem Rückstand wird die Trommer'sche Probe angestellt: positiv.

2. Glykogenreaction:

in A negativ,

in B positiv.

Die noch vorhandenen Reste der Auszüge werden mit Chloroform versetzt, stehen gelassen. Nach 3 Wochen wieder untersucht zeigte auch der Controlversuch B starke Trommer'sche Probe.

Es hat sich also auch hier wieder in dem gekochten Leberauszuge Zucker gebildet bzw. der von Anfang an vorhanden gewesene Zucker sich bedeutend vermehrt.

Um die Bildung von Zucker während der kurzen Zeit des Zerhackens und des Kochens auf das geringste Maass zu beschränken, wird eine andere Kaninchenleber folgendermaassen verarbeitet:

<sup>1)</sup> Dastre, Arch. de physiol. norm. et pathol. 1888. p. 70.

<sup>2)</sup> Florence Eves, Einige Versuche über das Leberferment. Journ. of physiol. 5.

<sup>3)</sup> Foster, Journ. of anat. and physiol. I.

## Versuch VII.

Die Leber des in Versuch X (Controlversuch III) benutzten Kaninchens wird sofort nach dem Verbluten in siedendes Wasser hinein zerschnitten, aufgekocht, dann in der Reibschale verrieben, und nochmals aufgekocht. Ein kleiner Theil (I) wird abfiltrirt, der Haupttheil (II) wird in desinficirter Flasche nach Chloroformzusatz bei 40—42° digerirt. Theil I wird sofort auf Zucker untersucht, mit NaOH und  $\text{CuSO}_4$ : Leichte Reduction tritt ein, beim Stehenlassen ganz geringe Ausscheidung von  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Theil II wird nach 72stündiger Digestion stehen gelassen. Ein kleiner Theil wird sofort abfiltrirt, vom Chloroform durch Aufkochen befreit, und nach Trommer auf Zucker untersucht:

Dasselbe Resultat wie in Theil I. Nach einigen Wochen wird wieder die Trommer'sche Probe angestellt, welche diesmal, wie erwartet wurde, stark positiv ausfiel.

Diese Thatsache, dass in unmittelbar nach dem Tödteten der Thiere gekochter Leber bei längerem Stehen unter Chloroformzusatz nicht unerhebliche Quantitäten Zucker entstehen, während zuerst nur minimale Spuren von Zucker nachweisbar waren, steht der wohl ziemlich allgemein herrschenden Meinung über die Zuckerbildung als einen enzymatischen Prozess in gewissem Widerspruch. Die Wirksamkeit der Enzyme wird nach allgemeiner Annahme meist schon bei unter dem Siedepunkt des Wassers liegenden Temperaturen [60°, W. Paschutin<sup>1)</sup>] aufgehoben. Es dürfte also in einem gekochten Leberauszuge keine Vermehrung der ursprünglichen Zuckerspuren eintreten, da ja das diastatische Ferment in dem Auszuge abgetödtet sein soll. Um so auffallender ist die lebhaftete Zuckerbildung in unseren Versuchen. Dass das zum Zweck der Sterilisirung zugesetzte Chloroform keinen Einfluss dabei gehabt hat, wurde an mehreren Controlversuchen gezeigt: Glykogenlösungen, etwa  $\frac{1}{2}$  pCt., sowohl in destillirtem Wasser als auch in etwa 0,6procentiger NaCl-Lösung unter Chloroformzusatz bei Zimmer- und Brüttemperatur stehen gelassen, zeigten auch nach wochenlangem Stehen keine Zuckerreaction.

Nun haben schon früher Abeles<sup>2)</sup> 1876 und J. Seegen

<sup>1)</sup> W. Paschutin, Versuche mit Fermenten, welche Stärke und Rohrzucker in Traubenzucker verwandeln. Archiv von Reichert. 1871. S. 305.

<sup>2)</sup> Abeles, Beitrag zur Lehre von den saccharificirenden Fermenten im thierischen Organismus. Medicinische Jahrbücher. II. Heft. 1876.



und Kratschmer<sup>1)</sup> 1877 dieselbe Thatsache mitgetheilt, Angaben, die auffallender Weise in den Lehrbüchern keine Erwähnung gefunden haben.

Abeles fand in vollständig zerkochtem Leberbrei, nachdem derselbe über Nacht bei 10° C. gestanden hatte, reichliche Zuckermengen. Diese Thatsache lässt sich nur durch die Annahme erklären, dass beim Erkalten die durch die Siedehitze nur unterbrochene Wirksamkeit des Fermentes sich wieder herstellt, was seiner Meinung nach sehr unwahrscheinlich ist, oder dass das Ferment sich in der erkalteten Masse frisch entwickelt. Das nach der Erlenmeyer'schen Methode aus der zerhackten Leber isolirte Ferment saccharificirte Lösungen von ganz reinem Glykogen in 12—24 Stunden vollständig.

Seegen und Kratschmer wandten sich gegen die Auffassung von Abeles, dass eine Neubildung des diastatischen Fermentes in den Leberauszügen eingetreten sei, da in ihren Versuchen „das Leberdecoct nach der Abkochung nicht weiter mit der Leber in Berührung gewesen war“.

Um die Berechtigung der anderen Annahme von Abeles, dass das Leberferment nicht vernichtet, nur lahm gelegt sei und später wieder reactivirt, seine Wirkung äussern könne, zu prüfen, kochten sie Glykogenlösungen mit Speichel und Glycerinpankreas-extracten und konnten hier keine Zuckerbildung beobachten. Im Anschluss an Beobachtungen von v. Wittich<sup>2)</sup> und Lepine<sup>3)</sup>, welche in vielen thierischen Geweben eine saccharificirende Substanz gefunden hatten, und welche die beiden Autoren auch für gekochte Organe bestätigen konnten, lenkte sich ihr Verdacht auf die Eiweisskörper, welche allen von ihnen untersuchten Organen gemeinsam waren, und stellten nun Versuche an, wie reine Eiweisskörper auf Glykogenlösungen wirkten.

Sie fanden, dass sowohl chemisch-reines Serumeiweiss als auch Eialbumin und Casein die Umwandlung von Glykogen in

<sup>1)</sup> J. Seegen und Kratschmer, Beitrag zur Kenntniss der saccharificirenden Fermente. Pflüger's Archiv. XIV. S. 593.

<sup>2)</sup> v. Wittich, Ueber das Leberferment. Pflüger's Archiv. VII. S. 28.  
— Weitere Mittheilungen über Verdauungsfermente.

<sup>3)</sup> Lepine, Entstehung und Verbreitung des thierischen Zuckerfermentes. Ber. d. k. sächs. Gesellsch. d. Wissenschaften. October 1870.

Zucker bewirken könne, sofern nur minimale Spuren der Eiweisskörper in Lösung gegangen waren, während Fibrin, vollständig unlöslich in Wasser, keine saccharificirende Eigenschaften zeigte. Sie kommen zu dem Schluss, dass „alle Eiweisskörper, welche entweder ganz oder auch nur theilweise im Wasser löslich sind, die Fähigkeit besitzen, bei kürzerer oder längerer Berührung mit Glykogen eine saccharificirende Wirkung zu üben.

Durch Kochen der den Eiweisskörper enthaltenden Flüssigkeit wird die diastatische Wirkung momentan sistirt, tritt aber nach 2—3 Tagen wieder auf.“

Um diese Angaben zu controliren, stellte ich nun ebenfalls ähnliche Versuche mit coagulirtem Eialbumin an, welches ich mir zu jedem Versuche frisch coagulirte: Hühnereiweiss, in doppelter Quantität destillirten Wassers aufgenommen, wird mit einigen Tropfen HCl genau neutralisirt, die niedergefallenen Globuline werden abfiltrirt, das Filtrat dann in die mehrfache Quantität siedenden Wassers eingeschüttet, aus dem es sich dann als schneeweisser Niederschlag abfiltriren lässt.

Dass dieser keinen Zucker enthält, bedarf eigentlich nicht der Erwähnung.

Verschiedenen Glykogenlösungen wurde ein derartiges Albumin hinzugefügt, zugleich wurden sie aber auch, zwecks Sterilisirung nach Laboratoriumsgewohnheit mit einigen Tropfen Chloroform versetzt: das Resultat war trotz wochenlangen Stehens stets negativ — es hatte sich auch keine Spur von Zucker gebildet. Da Seegen und Kratschmer in ihren Versuchen keine Desinficientien zu den Lösungen gethan haben, so wurde eine weitere Glykogenlösung mit Eialbumin ebenfalls ohne Chloroformzusatz in verschlossener Flasche stehen gelassen: sehr bald konnte man deutliche Zuckerreaction erhalten, die sich nach längerem Stehen immer schöner gestaltete. In sterilen Lösungen bringt also Eialbumin keine Zuckerbildung zu Stande — es wurden deshalb Versuche angestellt, wie es sich mit der Löslichkeit des Eiweiss in chloroformhaltigem Wasser verhalte. Frisch bereitetes, coagulirtes Eialbumin wird in mit Chloroform versetztem sterilisirtem Wasser suspendirt, kräftig und wiederholt durchgeschüttelt, dann filtrirt: das Filtrat zeigte auch nach wochenlangem Stehen, weder vor noch nach Entfernung des Chloroforms

die geringste Trübung nach Kochen und Säurezusatz. Auch andere Eiweissreactionen blieben resultatlos. Dagegen konnte man, wenn man Eiweiss mit Wasser in verschlossener Flasche ohne Sterilisirung hatte stehen lassen, im Filtrat eine, wenn auch schwache Trübung wahrnehmen. Das Chloroform hat also eine, die Lösung des Eiweiss hemmende Wirkung. Ich glaube nun, dass man diese Wirkung seiner stark antibakteriellen Eigenschaft zuschreiben muss. Wurde von der Glykogen- und der Eiweisslösung, die ohne Chloroform gestanden hatten, auf Nährgelatine im Reagenzglas übergeimpft, so trat lebhaftes Wachstum von Bakterien ein, während Chloroformzusatz vollkommen sterilisirt.

Seegen und Kratschmer haben in allen ihren Versuchen ohne derartige antibakterielle Cautelen operirt, woraus ihnen übrigens selbstverständlich kein Vorwurf gemacht werden kann. Es ist nun denkbar, dass die Bakterien es sind, welche die Lösung des Eiweisses bedingen, und dadurch dann die Zuckerbildung indirect veranlassen. Es ist aber auch ebenso denkbar und für mich wahrscheinlicher, dass die Bakterien direct an der Zuckerbildung theilgenommen sind. Wortmann<sup>1)</sup>, A. Pick<sup>2)</sup>, Fermi<sup>3)</sup> schreiben über diastatische Wirkungen von Bakterien; Schimmelpilze und verschiedene Spaltpilze haben ein kräftig diastatisches Ferment. Ich glaube bestimmt, dass bei der lebhaften Entwicklung der Stichculturen man die Wirksamkeit der Bakterien in den genannten Lösungen nicht von der Hand weisen kann. Für diese Auffassung spricht auch der Umstand, dass, je länger die Lösungen standen, desto stärker die Reduction eintrat, dass das Casein in den Versuchen von Seegen und Kratschmer, nachdem es einige Monate lang aufbewahrt, und wahrscheinlich dadurch nicht gerade steril geworden war, viel energischer wirkte, dass, nachdem die Eiweisslösungen gekocht waren, erst nach mehreren Tagen eine diastatische Wirkung nachzuweisen war. Dass die Löslichkeit des Eiweisses eine gewisse Rolle trotzdem spielt, möchte ich aus der Angabe von Fermi schliessen, dass

<sup>1)</sup> J. Wortmann, Untersuchungen über das diastatische Ferment der Bakterien. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 6. S. 287.

<sup>2)</sup> A. Pick, Ueber die saccharificirende Thätigkeit einiger Mikroorganismen. Wiener klin. Wochenschr. 1889. No. 5, 6, 7.

<sup>3)</sup> Fermi, Archiv f. Hygiene. 10. S. 1—54.

in eiweiss- und peptonfreien Lösungen keine diastatischen Fermente von den Spaltpilzen gebildet werden.

Da die Fermentbildung der Bakterien von 4°—50° möglich ist, so ist auch, sollten die Seegen-Kratschmer'schen Versuche bei niederen Temperaturen angestellt sein, doch eine bakterielle Wirkung nicht von der Hand zu weisen.

Ich halte also diese Versuche für durchaus nicht beweisend dafür, dass wirklich jedes Eiweiss saccharificirende Eigenschaften besitzt, so lange es nicht erwiesen ist, dass jede andere Möglichkeit der Zuckerbildung ausgeschlossen ist. In sterilen Lösungen tritt keine Zuckerbildung auf, meine Leberauszüge waren aber ebenfalls steril und trotzdem wurde sehr reichlich Zucker gebildet. Man muss also doch wieder auf die beiden Annahmen von Abeles zurückkommen. Dass die Wirksamkeit der Fermente durch die Siedehitze nur unterbrochen sei, scheint auch mir sehr unwahrscheinlich; so glaube ich auch, eine Neubildung des Leberfermentes aus den mit in Lösung gegangenen Stoffen der Leber annehmen zu müssen.

#### Versuch VIII.

Die Leber des im Versuch III benutzten Hundes wird fein zerhackt, in 3 Theile zu je 200 bzw. 180 g getheilt, und folgendermaassen behandelt:

B 200 g wie B in Versuch II.

A I 200 g wie A in Versuch II.

A II 180 g werden mit 4 ccm  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  versetzt, Reaction stark alkalisch, darauf wie I behandelt.

Nach nur 22stündiger Digestion werden A I und II einige Minuten gekocht, B nochmals gelinde erhitzt; alle Portionen werden darauf colirt, eingedampft, filtrirt. In A II scheiden sich bei weiterem Eindampfen Xanthinkörper aus, sie werden durch Zusatz von einigen Tropfen NaOH wieder vollständig in Lösung gebracht; der Gleichheit halber wird zu A I ebenfalls etwas NaOH hinzugefügt; beide werden dann auf 250 ccm aufgefüllt. B wird nur auf 200 ccm aufgefüllt.

Von A I und II werden je 10 ccm, von B 20 ccm nach Kjeldahl auf N untersucht; die Verbrennung ist in allen 3 Portionen äusserst stürmisch, und nur mit grösster Vorsicht ohne Verluste zu bewerkstelligen. Es wurden daher die Bestimmungen doppelt ausgeführt: die Resultate stimmten — innerhalb der unvermeidlichen Fehlergrenzen — vollkommen überein.

Die Ergebnisse waren folgende:

A I in den 10 ccm waren 0,0826 g N

II in den 10 ccm waren 0,049 g N.

B in den 20 ccm waren 0,056 g N enthalten.

Für 1000 g Leber umgerechnet ergibt dies:

A I: 10,325 g N aus 1000 g Leber

II: 6,75 - - - 1000 - -

B: 2,80 - - - 1000 - -

Der Frage, ob Alkalisirung vielleicht eine umfangreichere Spaltung oder eine andere Richtung derselben herbeiführe, sollte mit diesem Versuche näher getreten werden. Es zeigt sich nun, dass es nicht der Fall ist, im Gegentheil, es ist in der nicht alkalisirten Portion bedeutend mehr N in Lösung gegangen als in der alkalisirten. Allerdings war die Reaction nach Zusatz von 4 ccm  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  stark alkalisch, wengleich die Reaction des Blutes auch ziemlich stark alkalisch ist, und meist zu gering angeschlagen wird. Es wurde jedoch noch der folgende Versuch angestellt, um zu sehen, ob geringere Alkalescenz der Mischungen einen anderen Einfluss hat, als die starke.

#### Versuch IX.

Die Leber des im Controlversuch III (Versuch X) getödteten Kaninchens wird sofort nach dem Verbluten zerhackt. 2 Portionen zu je 40 g werden abgewogen, je mit 400 ccm Chloroformwasser übergossen, und zu einer (II) 1 ccm  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  hinzugefügt: Reaction leicht alkalisch. Nach 24stündiger Digestion werden beide Portionen gekocht, colirt, ausgepresst, eingedampft und I auf 50, II auf 60 ccm aufgefüllt.

Je 10 ccm werden wieder nach Kjeldahl auf N untersucht.

I. in 10 ccm sind 0,0266 g N,

II. in 10 ccm sind 0,021 g N enthalten.

Für 1000 g Leber berechnet:

I. 3,33 g N sind aus 1000 g Leber in Lösung gegangen.

II. 3,15 g N - - - 1000 g - - - -

Also auch hier ist in dem alkalisirten Leberauszuge weniger N enthalten gewesen als in dem neutralen. — Allerdings ist der Unterschied zwischen beiden Portionen nicht so gross: es scheint also die Alkalescenz auf das Enzym einen proportional ihrer Stärke hemmenden Einfluss auszuüben. Den Controlversuch B glaubten wir uns hierbei sparen zu können, da eine Vermehrung des N in A gegenüber B durch frühere Versuche feststeht, und der beträchtliche Unterschied zwischen A II und B im vorigen Versuch auch die Vermuthung zurückweist, es könnte die Alkalisirung einen solchen hemmenden Einfluss auf die Fermente ausüben, dass auch in A II weniger N als in B in Lösungginge.

## Versuch X.

700 g Kaninchenmuskeln, die schon etwa 1 Jahr unter 2200 ccm Chloroformwasser gestanden haben, werden mit 7000 ccm Chloroformwasser 48 Stunden bei Brüttemperatur digerirt, durch Leinwand colirt, durch Erhitzen zum Sieden vom Eiweiss befreit, filtrirt, stark eingedampft. Nach nochmaligem Filtriren beträgt die Flüssigkeit etwa 1300 ccm. Diese wurden in 2 Hälften mit Bleiessig gefällt, filtrirt, aus dem Filtrat wird das Blei mit  $H_2S$  entfernt, das gebildete  $PbS$  abfiltrirt, die beiden Filtrate vereinigt und stark eingeeengt. Die syrupöse Masse wird zum weiteren Trocknen ruhig stehen gelassen. Darauf wird sie mit Wasser angefeuchtet auf einem Thonteller a ausgebreitet, nach 24 Stunden abgenommen, in Wasser gelöst, mit Knochenkohle entfärbt, filtrirt, das Filtrat wird stehen gelassen.

Die ausgeschiedenen Krystalle werden abfiltrirt, auf dem Filter über  $H_2SO_4$  getrocknet; sie erweisen sich unter dem Mikroskop nicht als Kreatin, sondern als Tyrosin.

Das Filtrat hiervon wird mit dem Waschwasser des Knochenkohlefiltrums vereinigt, eingedampft — unzweifelhafte Leucinausscheidung. Das Leucin wird abfiltrirt, das eingedampfte Filtrat auf einen zweiten Thonteller b getrocknet. Nach 24 Stunden wird die Masse abgenommen, mit dem Leucin auf dem Filter vereinigt und bei  $100-110^\circ$  bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Das gewonnene Tyrosin wird ebenfalls, zwischen Uhrgläschen getrocknet.

Der Thonteller a wird einige Stunden lang ausgekocht, der Extract eingedampft, auf 100 ccm aufgefüllt.

Der Thonteller b wird ebenfalls ausgekocht, der Extract eingedampft, der Rückstand wieder in Wasser gelöst, auf 50 ccm aufgefüllt.

Beide Extracte, mit Knochenkohle entfärbt, zeigen, auf Albumose und Pepton untersucht, keine positive Biuretreaction.

Folgende quantitativen Bestimmungen wurden noch ausgeführt:

1. Das Gewicht des getrockneten Leucins beträgt 2,0717 g. Zum Nachweis der Identität werden davon 0,6235 g auf N nach Kjeldahl untersucht: ergeben 0,0658 g N = 10,3 pCt. (Berechnet beträgt der N-Gehalt des Leucins 10,69 pCt.)

In 2,0717 g Leucin sind danach 0,2138 g N.

2. 10 ccm des Extractes vom Thonteller a werden nach Kjeldahl auf N untersucht; sie enthalten 0,2114 g N. In 100 ccm also 2114 g N.

3. 10 ccm des Extractes vom Thonteller b werden nach Kjeldahl untersucht; sie enthalten 0,1456 g N. In 50 ccm also 0,728 g N.

4. Das Gewicht des getrockneten Tyrosins beträgt 0,248. Die Identität mit Tyrosin wird ausser durch das Mikroskop noch durch die Hofmann-

sche Probe (mit Millon's Reagens) erwiesen. Tyrosin enthält 7,74 pCt. N. 0,248 g Tyrosin enthalten also 0,0192 g M.

Die angegebenen 4 Posten machen den ganzen bei dem Prozesse des langen Stehens und der Autodigestion in Lösung gegangenen Stickstoff aus:

- |           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 1) 0,2138 | } | im Leucin  |
| 2) 2,1140 |   |            |
| 3) 0,7280 |   |            |
| 4) 0,0192 |   | im Tyrosin |

3,0750 g N aus 700 g Muskeln,

oder 4,391 g N aus 1000 g Muskeln.

Die noch übrigen Reste von a und b (je 65 bzw. 15 ccm) werden vereinigt und mit  $\text{NH}_3$  und  $\text{AgNO}_3$  versetzt; reichliche Ausscheidung von Hypoxanthinsilber. Dasselbe wird auf gewogenem Filter gesammelt und getrocknet: 0,6325 Hypoxanthinsilber<sup>1)</sup>. Auf Hypoxanthin berechnet 0,224 g Hypoxanthin.

Auf 1000 g Muskel umgerechnet beträgt die bei der Autodigestion in Lösung gegangene Menge der Xanthinkörper: 0,6 g Hypoxanthin.

Das Filtrat vom Hypoxanthinsilber wird mit Salpetersäure gekocht — mit  $\text{NH}_3$  alkalisirt — kein Niederschlag; es sind also alle Xanthinkörper in manifester Form vorhanden gewesen.

1) Diese Resultate bestätigen also die von Salkowski gemachten Angaben über das Verhalten der Xanthinbasen in auto-digerirten Organen.

2) Interessant sind die Verhältnisse mit den in Lösung gegangenen Extractivstoffen. Von Kreatin, auf dessen Darstellung der Versuch eigentlich ausging, war auch keine Spur zu entdecken. Statt dessen traten Leucin und Tyrosin auf, welche durchaus nicht zu den regelmässigen Extractivstoffen der Muskeln gehören, sondern gewöhnlich nur bei der Trypsinverdauung, beim Sieden mit Alkalien und Säuren der Proteinstoffe, sowie bei der Fäulniss entstehen.

Weder der eine, noch der andere Grund liegt hier für die

<sup>1)</sup> Da es gleichgültig ist, welcher von den Xanthinkörpern vorhanden ist, Hypoxanthin aber quantitativ die anderen Xanthinbasen bei weitem übertrifft, so habe ich gleich die gefundene Quantität Silber auf Hypoxanthin berechnet.

Entstehung der genannten Stoffe vor, fehlt doch jede Spur von Biuretreaction, sowohl in diesen Versuchen, als auch in den beiden Autodigestionsversuchen, die Salkowski mit Muskeln angestellt.

Es muss also ein besonderes Ferment sein, welches sehr langsam eine Eiweiss zersetzende Wirkung ausübt: hier bei dem langen Stehen der Muskeln ist seine Wirkung nachweisbar, während bei den kurzen Autodigestionsversuchen die Zeit nicht genügt hat, das Enzym zur Wirkung kommen zu lassen.

Um nun die Lösungsverhältnisse der Extractivstoffe des Muskels beim Digeriren und Kochen vergleichen zu können, wurden noch folgende Versuche mit Kaninchenmuskeln angestellt:

#### I. Controlversuch.

510 g frische Kaninchenmuskeln (vom Kaninchen im Versuch VI) werden fein zerhackt, mit 1,5 Liter Wasser bei 50—60°  $\frac{3}{4}$  Stunden lang digerirt ohne zu filtriren; aufgekocht, colirt; der Rückstand wird ausgepresst, nochmals aufgekocht, wieder colirt und ausgepresst.

Die vereinigten Colaturen werden eingedampft, vom geronnenen Fett abfiltrirt, das Filtrat weiter eingedampft, auf 250 ccm aufgefüllt und nochmals filtrirt. 10 ccm hiervon wurden nach Kjeldahl untersucht:

In 10 ccm sind 0,1008 g N enthalten. Auf 1000 g Muskel umgerechnet 4,901 g N.

#### II. Controlversuch.

Die Muskeln eines soeben durch Verbluten getödteten Kaninchens (vom Versuch VII) werden fein zerhackt, (450 g) mit 1000 g Wasser bei 50—60° etwa 1 Stunde lang digerirt, colirt, die Colatur enteieisst, filtrirt, eingedampft, auf 250 ccm aufgefüllt, nochmals filtrirt. 10 ccm hiervon werden nach Kjeldahl auf N untersucht.

In 10 ccm sind 0,063 g N enthalten. Auf 1000 g Muskel umgerechnet: 3,5 g N.

#### III. Controlversuch.

300 g Muskelfleisch eines frisch geschlachteten Kaninchens (vom Versuch IX) wurden fein zerhackt, und mit 2000 ccm Wasser etwa  $\frac{3}{4}$  Stunden lang gekocht. Darauf colirt, ausgepresst, eingedampft, filtrirt, auf 300 ccm aufgefüllt. 20 ccm hiervon werden nach Kjeldahl auf N untersucht:

In 20 ccm sind 0,0574 g N enthalten. Auf 1000 g Muskel umgerechnet: 2,87 g N.

N-Gehalt, auf 1000 g Kaninchenmuskel berechnet:

1. Nach langem Stehen unter  $\text{CHCl}_3$ , Autodigestion,  
Coliren, dann erst enteieisst . . . . . 4,391
2. nach  $\frac{3}{4}$ stündiger Digestion, Kochen, Coliren . . . 4,901
3. nach  $\frac{3}{4}$ stündiger Digestion, Coliren, Kochen . . . 3,5
4. nach blosser  $\frac{3}{4}$ stündigen Kochen, Coliren . . . 2,87.



Nimmt man einen Durchschnittsgehalt des Fleisches an N von 3,4 g, so ist in den 700 g 12,9 pCt. N in Lösung gegangen, während im I. Controlversuch, wo das Fleisch digerirt und gekocht wurde 14,41 pCt. N enthalten sind. In dem Auszuge aus nur digerirtem Fleisch fanden sich 10,4 pCt., in dem aus nur gekochtem Fleische 8,3 pCt. N, also 2 pCt. weniger, eine That-  
sache, welche bei Bereitung des englischen beef-tea praktische Verwerthung findet.

#### Versuch XI.

In der Einleitung habe ich schon gesagt, dass die Oxydationen im thierischen Organismus nicht in den Säften, Blut und Lymphe verlaufen, wie früher angenommen wurde, sondern dass sie an die Zelle gebunden seien.

Experimentell haben namentlich Ludwig und Schmidt<sup>1)</sup>, ferner Bunge und Schmiedeberg<sup>2)</sup> die oxydirende Fähigkeit der Gewebe bei Gegenwart von Blut festgestellt, während Blut allein im Allgemeinen keine oxydirenden Eigenschaften besitzt. Unter besonderen Bedingungen bei gleichzeitiger Steigerung aller die Oxydation begünstigenden Bedingungen entfaltet jedoch auch das Blut seine oxydirende Wirkung, wie Salkowski<sup>3)</sup> im Jahre 1882 bewiesen hat. Durch Verstäuben des Blutes, wodurch Gelegenheit für eine möglichste Vergrößerung der Oberfläche des Blutes und eine fortwährende Erneuerung des Sauerstoffes gegeben wird, gelang es, Salicylaldehyd etwa 2 ccm dem Blute zugesetzt, zu oxydiren, und die dabei erhaltenen Quantitäten Salicylsäure waren durchaus nicht gering, z. B. in einem Versuch 0,167 g Salicylsäure. Controlversuche zeigten, dass das Blut bei dieser Oxydation nicht entbehrt werden könne und Salkowski schliesst daraus, dass die Blutkörperchen bezw. das Hämoglobin, also das zellige Material des Blutes, eine Rolle bei der Oxydation spiele. Dass die Zellen, um Oxydationen

<sup>1)</sup> Ludwig und Schmidt, Arbeiten aus der physiolog. Anstalt zu Leipzig. 1868. I.

<sup>2)</sup> Bunge und Schmiedeberg, Arch. f. experiment. Pathol. u. Pharm. VI. S. 233.

<sup>3)</sup> E. Salkowski, Kleinere Mittheilungen II: Ueber Oxydationen im Blut. Zeitschr. f. physiol. Chem. VII. S. 115.

hervorrufen zu können, lebend sein müssten, wurde als selbstverständlich angenommen.

In jüngster Zeit hat nun Jacquet<sup>1)</sup> in Strassburg gezeigt, dass nicht nur lebendes Gewebe diese Eigenschaft zeigt, sondern dass auch nach dem Absterben durch Carbol, Alkohol, Erfrieren dem Gewebe diese Eigenschaft bleibt. Ja, nicht nur bei Gegenwart der Zellen kommen Oxydationen zu Stande, sondern sogar der von den festen Bestandtheilen befreite Auszug der Gewebe hatte dieselbe Wirkung; selbst die aus erhärteten Geweben gewonnenen und von Gewebsbestandtheilen befreiten Auszüge zeigten dieselbe oxydirende Eigenschaft. Da aber nach Erhitzen zum Sieden derartigen Auszügen diese Eigenschaft verloren geht, so schliesst Jacquet mit vollem Rechte, „dass die Oxydation im Thierkörper unter dem Einflusse eines Fermentes oder Enzymes zu Stande kommt“. Er schreibt diesem Fermente die gleiche Bedeutung zu, welche die Wärme bei Oxydirungsvorgängen ausserhalb des Körpers habe, wie ich schon oben ja auch die Wirksamkeit der hydrolytischen Fermente mit der der Wärme oder anderer chemischer Agentien, welche ausserhalb des Körpers derartige Spaltungen vermitteln, verglichen habe. „So besteht,“ sagt Jacquet, „ein Gegensatz zwischen der Wirkung dieses oxydirenden Fermentes und der übrigen sogenannten katalytischen Fermente nicht, denn es handelt sich, wie Schmiedeberg<sup>2)</sup> nachgewiesen hat, auch bei der Oxydation um eine Lockerung von H-Atomen, um ein Abreissen derselben von den C-Atomen, an denen sie haften.“

Diese Ergebnisse der Jacquet'schen Untersuchungen sind jedenfalls überraschend und fordern zu weiteren Versuchen dringend auf. Nachfolgende 3 Versuche wurden nach derselben Anordnung ausgeführt, wie sie Jacquet angewandt hat.

1. Die Lungen des Hundes vom Versuch III werden in kleine Stücke geschnitten, 14 Tage lang mit 96procentigem Alkohol stehen gelassen, dann colirt, ausgepresst, fein zerhackt, der noch vorhandene Alkohol durch Liegenlassen verdunstet; darauf mit etwa  $\frac{1}{2}$  Liter 1procentiger NaCl-Lösung extrahirt nach 12 Stunden.

<sup>1)</sup> A. Jacquet, Ueber die Bedingungen der Oxydationsvorgänge in den Geweben. Arch. f. experiment. Pathol. und Pharm. Bd. 29. S. 386.

<sup>2)</sup> Schmiedeberg, Arch. f. experiment. Pathol. u. Pharm. XIV. S. 296.

Colirt, ausgepresst, filtrirt (sehr langsam), mit 1 g Salicylaldehyd versetzt, und nun  $4\frac{1}{2}$  Stunden lang 3mal an der Wand einer etwa 2 m langen Glasröhre tropfenweise hinablaufen gelassen. Darauf eingedampft, filtrirt, mit Alkohol gefällt, der Alkohol verdampft, der Rückstand in Wasser gelöst, mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  angesäuert, mit Aether ausgeschüttelt, destillirt, der Rückstand in Aether aufgenommen, dieser an der Luft verdunstet. Der Rückstand in Wasser unter Zusatz von etwas  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  gelöst, filtrirt, eingengt, mit  $\text{HCl}$  angesäuert, — 24 Stunden stehen gelassen. Der entstandene Niederschlag zeigt unter dem Mikroskop nicht das Aussehen von Salicylsäure. Daher nochmals in etwas Aether geschüttelt, der Aether verdunstet, der Rückstand in Wasser gelöst, und hiermit die sehr empfindliche  $\text{Fe}_2\text{Cl}_6$ -Reaction angestellt: negativ.

2. Die beiden Nieren genau ebenso behandelt ergeben am Schluss auf  $\text{Fe}_2\text{Cl}_6$ -Zusatz eine minimale Violettfärbung. Spuren von Salicylsäure sind also hier gebildet.

3. Etwa 300 g Musculatur, fein zerhackt, ergeben, ebenso behandelt, ein negatives Resultat: keine Salicylsäurereaction.

Die von Jacquet's Ergebnissen ziemlich abweichenden Resultate finden ihre leichte Erklärung in der nicht ganz mit ihm übereinstimmenden Behandlungsweise beim Erhärten der Organe.

Während Jacquet die zu den entsprechenden Versuchen (Versuch 23—25) benutzten Pferdenieren nur zwei Stunden mit 80procentigem Alkohol behandelt, ausgepresst und mit absolutem Alkohol ausgewaschen hat, haben in meinen Versuchen die Organe etwa 14 Tage mit 96procentigem Alkohol gestanden. Eine derartige starke Behandlung scheint das Enzym nicht vertragen zu können, wie Lunge und Muskeln zeigen. Dass trotzdem in den Nieren, wenn auch nur Spuren von Salicylsäure nachgewiesen werden können, spricht aber mit Entschiedenheit für die Wirkung eines Fermentes, welches in den Nieren wohl in grösserer Concentration vorhanden sein mag als in den übrigen Körpertheilen, so dass noch ein Theil desselben der bei längerer Dauer deletären Wirkung des 96procentigen Alkohols entgangen ist. Uebrigens bin ich autorisirt, hier kurz mitzuthellen, dass in weiteren Versuchen in demselben Laboratorium, die später

publicirt werden sollen, sich die Angaben von Jacquet im Wesentlichen bestätigt haben. —

Schon früher sind Angaben gemacht über intracelluläre Verdauungsvorgänge, ähnlich, wie sie in Salkowski's und meinen Versuchen zu Tage treten. Schützenberger<sup>1)</sup> hat grosse Quantitäten gewaschener Bierhefe nach 24stündiger Digestion in der Wärme einer sorgfältigen Analyse unterworfen. Es gelang ihm, eine ganze Reihe von krystallinischen, in der frischen Hefe nicht vorhandenen Körpern, nemlich Tyrosin, Leucin, Xanthin, Hypoxanthin, Guanin und Carnin nachzuweisen und darzustellen. Ausdrücklich wird betont, dass der ganze Prozess ohne jeden üblen Geruch verläuft und daher mit der Fäulniss nichts zu thun haben kann.

Einige Jahre später gelang es Schmiedeberg<sup>2)</sup> in der Niere und dem Blute von Schweinen, sowie namentlich aus der Hundeleber ein Enzym zu extrahiren, welches er als Histozytm bezeichnete. Dieses ungeformte Ferment besitzt die Fähigkeit, Fette und andere ätherartige Verbindungen unter Hydratation zu spalten. Namentlich zerlegt es mit Leichtigkeit Hippursäure in Benzoessäure und Glykokoll, während diese beiden Paarlinge mit Blut durch eine überlebende Schweineniere geleitet, sich wieder zu Hippursäure vereinigten. Er schloss daraus, dass Bildung sowohl als Spaltung der Hippursäure gleichzeitig und unabhängig von einander in den Geweben vor sich gehen könne.

Neumeister wendet sich nun in seinem jüngst erschienenen Lehrbuch der physiologischen Chemie (Jena, G. Fischer, 1893) gegen die Annahme, dass in Schmiedeberg's und Salkowski's Untersuchungen besondere, in dem Protoplasma der Zellen präformirte Enzyme thätig seien, die nach der Abtödtung desselben durch das Chloroform zur Wirkung gelangen. Er erklärt das Histozytm Schmiedeberg's für nichts Anderes als das fettspaltende Enzym des Pankreassaftes, das sogenannte Steapsin; in Salkowski's Versuchen glaubt er das diastatische Ferment,

<sup>1)</sup> Schützenberger, Recherches sur la levûre de bière. Bull. de la soc. chem. de Paris. 1874. T. 21.

<sup>2)</sup> Schmiedeberg, Ueber Spaltungen und Synthesen im Thierkörper. Arch. f. exper. Pathol. und Pharm. XIV. S. 379.

welches die Umwandlung des Leberglykogens bewirkte, als aus dem Pankreas oder aus den Speicheldrüsen abstammend ansehen zu können, das in Form seines Zymogens zur Resorption gelangt und dann bei der Behandlung mit Chloroformwasser in das Enzym übergegangen sei.

Wenn man auch von vornherein die Ansicht nicht von der Hand weisen kann, es seien die Pankreasfermente in die benachbarte Leber gelangt und dort zur Wirkung gekommen, so möchte ich doch aus verschiedenen Gründen mich gegen diese Auslegung aussprechen. In den gekochten Lebern hat sich, wie oben ausführlicher erörtert wurde, ein diastatisches Ferment wieder neu gebildet — es ist nun sehr unwahrscheinlich, dass das diastatische Ferment des Pankreas von der Leber resorbiert und durch Erhitzen zum Sieden gekocht, sich von Neuem bilden sollte, zumal ein einmal gekochter Pankreasauszug nie wieder diastatische Wirkung ausübt, wie Seegen und Kratschmer (a. a. O.) bewiesen. Viel eher denkbar ist es, dass in dem Leberauszuge, welcher die gelösten Bestandtheile der Leber und auch wohl trotz Coagulirens immer noch Spuren von Eiweiss enthält, sich ein neues Ferment durch Umlagerung der Molecüle bilden könne. Dass nun zuerst vor dem Kochen ein Pankreasferment wirksam sei, später nach dem Kochen aber ein spezifisches Leberferment, ist nicht wahrscheinlich, viel wahrscheinlicher, dass in der Leber von vornherein ein diastatisches Ferment vorhanden sei. Neumeister glaubt ferner, dass in einzelnen Versuchen Spuren von Trypsin vorhanden sei. In den Leberversuchen Salkowski's ist in den Hauptversuchen nie eine Peptonreaction aufgetreten, dagegen Leucin und Tyrosin zur Ausscheidung gekommen. Ausbleiben der Peptonreaction ist auch bei den Muskeln zu constatiren gewesen, wo aber Leucin und Tyrosin fehlen. Ich glaube nun, dass bei Anwesenheit eines Trypsinfermentes sicher Peptonreaction nachzuweisen gewesen wäre. Dass das sämmtliche Pepton durch Trypsin in weitere Spaltungsprodukte umgewandelt sei, ist nicht nur nicht wahrscheinlich, sondern sogar sicher von der Hand zu weisen, da nach Kühne<sup>1)</sup> und

<sup>1)</sup> Kühne, Weitere Mittheilungen über Verdauungsenzyme und die Verdauung der Albumine. Verh. der nat.-hist. Ver. Heidelberg. 1876. I. Heft 4.

Schützenberger<sup>1)</sup> gerade durch Trypsin rasch und leicht das sogenannte Antipepton entsteht, welches weiterer Enzymeinwirkung widersteht, während nur das Hemipepton eine weitere Zersetzung erfährt. Würde also Trypsin vorhanden gewesen sein, so müsste man wohl mit Sicherheit Peptone haben nachweisen können. Auch in meinem Versuche X ist nur Leucin und Tyrosin und keine Spur von Peptonen vorhanden. Auch dass Alkalisiren der Auszüge die Spaltung des Eiweiss nicht nur nicht verstärkt, sondern sogar herabsetzt, spricht wohl gegen die Anwesenheit des bei alkalischer Reaction besonders wirk-samen Trypsins. Bezüglich der Fettspaltung hat schon Salkowski auf die fettspaltende Wirkung der Gewebe (Nencki und Luedy)<sup>2)</sup> aufmerksam gemacht. Nach alledem halte ich es für sehr unwahrscheinlich, dass es resorbierte Pankreasfermente seien, welche die Spaltung in den Geweben hervorgerufen haben. Dazu kommen noch die Analogien in den Heferversuchen sowohl Schützenberger's als auch Salkowski's, wo doch sicher durch intracelluläre Verdauung, Selbstverdauung von Salomon (a. a. O.) oder Autodigestion von Salkowski ganz dieselben Prozesse verlaufen sind, wie in den thierischen Geweben.

---

Herrn Prof. Dr. E. Salkowski für die Anregung zu dieser Arbeit und die so überaus liebenswürdige Unterstützung bei der Ausführung der Untersuchungen auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank auszusprechen, ist mir eine angenehme Pflicht.

<sup>1)</sup> Schützenberger, Recherches sur l'albumine et les matières albuminoides. Bull. de la Soc. chem. de Paris. 23 et 24.

<sup>2)</sup> Luedy, Ueber die Spaltungen des Fettes in den Geweben. Inaug.-Dissert. Bern 1888.

---