

26. Koerner, cit. nach v. Noorden's Lehrbuch. S. 342.
27. Klemperer, Untersuchungen über Gicht und harnsaure Nierensteine. Berlin 1896. S. 1 ff.
28. Richter und Spiro, Werth intravenöser Zimmtsäureinjectionen u. s. w. Archiv für exper. Pathol. und Pharmak. Bd. 34. S. 289.

## V.

### Zur Kenntniss der Spaltungsprodukte des Caseïns bei der Pankreasverdauung.

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

Von Dr. Ugo Biffi aus Faenza.

Während die Stellung des Caseïns unter den Eiweisskörpern, namentlich nach den Untersuchungen von Hammarsten, welche den Phosphorgehalt desselben als constant erwiesen haben, jetzt feststeht und zahlreiche Untersuchungen über die Pepsinverdauung des Caseïns ausgeführt sind, die auch ihrerseits zur Aufklärung der Natur des Caseïns beigetragen haben, fehlt es an Untersuchungen über die Pankreasverdauung desselben fast ganz. Ja! über das Caseïn-Antipepton liegt sogar meines Wissens keine einzige ganz beweisende Angabe<sup>1)</sup> vor. Die Untersuchung der Einwirkung des Trypsins (Pankreasferments) auf das Caseïn, die ich auf Veranlassung von Prof. E. Salkowski unternahm, schien mir daher eine sehr lohnende Aufgabe zu sein.

Der besseren Uebersicht wegen habe ich meine Arbeit in folgende zwei Theile eingetheilt: 1) Die löslichen Verdauungsprodukte des Caseïns durch Pankreasferment; 2) Der Verdauungsrückstand — d. h. der Niederschlag, der

<sup>1)</sup> Als Antipepton in modernem Sinne können die von Charles Norris dargestellten und analysirten Präparate (siehe die Abhandlung von R. H. Chittenden: Caseosen, Caseindyspepton and Caseinpepton. Studies from the laboratory of physiological chemistry. Yale University. 3. p. 66—105. Citirt nach Maly's Jahresbericht für 1890. S. 17) nicht sicher angesehen werden. Wir werden später nochmals darauf kommen.

beim Ansäuern der Verdauungsflüssigkeit entsteht — und das Verhalten des Caseinphosphors in den Verdauungsprodukten.

Das Casein, das ich zu meinen Untersuchungen benutzte, habe ich folgender Weise dargestellt:

Darstellung des Caseins. — Die Kuhmilch (Vollmilch) wird mit ebenso viel destillirtem Wasser verdünnt, dann mit möglichst wenig Essigsäure gefällt, durch Leinwand colirt, der Niederschlag wiederholt gewaschen, mit der Hand leicht abgedrückt und in eine Reibschale gebracht. Hierauf wird er mit Alcohol absolut. übergossen und verrieben, nach etwa einer Stunde von dem Alcohol abfiltrirt. Das fettbaltige Casein wird nun in einen trockenen Kolben gebracht, mit Aether übergossen, gut durchgeschüttelt und 24 Stunden stehen gelassen; dann wird der Aether decantirt, das Casein mit frischem Aether unter Durchschütteln ersetzt und der Kolben wieder 24 Stunden stehen gelassen. Jetzt wird das Casein durch Coliren vom Aether getrennt, gut abgepresst, in einer Reibschale so lange gerieben bis es nicht mehr nach Aether riecht, in destillirtem Wasser unter Zusatz möglichst wenig NaOH gelöst, filtrirt und mit Essigsäure wieder gefällt. Das abfiltrirte Casein wird sorgfältig auf dem Filter nachgewaschen, durch Verreiben in einer Reibschale mit etwas Wasser fein vertheilt und in einer Flasche unter Chloroformwasser aufbewahrt.

Das so dargestellte Casein war nicht ganz fettfrei; doch zeigte sich seine alkalische Lösung ziemlich klar. Wenn im Laufe meiner Arbeit nichts Anderes erwähnt werden sollte, so muss man verstehen, dass ein solches Präparat angewendet wurde. Ebenso ist auch in Betreff des Pankreasfermentes, falls nichts Anderes angegeben werden sollte, zu verstehen, dass ein von mir nach Kühne in folgender Weise dargestelltes Präparat angewendet wurde.

Darstellung des Pankreasfermentes. — Rinderpankreas, wird 24 Stunden oder etwas länger nach dem Schlachten sorgfältig von allem sichtbaren Fett befreit, fein zerhackt, mit 96procentigem Alcohol übergossen und bis zum nächsten Tage stehen gelassen. Dann wird der Alcohol durch Leinwand abfiltrirt und der Rückstand gut abgepresst, worauf er wieder mit 96procentigem Alcohol gut durchgerührt und 24 Stunden stehen gelassen wird. Dann wird das Gemisch wieder colirt, der Rückstand abgepresst, in Aether gebracht und 48 Stunden unter dem Aether stehen gelassen. Jetzt wird der Aether durch Leinwand abfiltrirt, gut abgepresst, der Rückstand in eine Schale gebracht und hierin ausgebreitet, damit der anhängende Aether verdunstet. Ist der Rückstand ganz trocken, so wird er in einer Reibschale zerrieben und dann durch Drahtgaze gesiebt: nur das durchgehende Pulver wird verwendet.

Das so dargestellte Präparat zeigte sich äusserst wirksam, viel wirksamer als die käuflichen Präparate es zu sein pflegen.

# I. Die Verdauungsprodukte des Caseïns durch Pankreasferment.

Ich habe es vorgezogen mit relativ kleinen Mengen von Substanz zu arbeiten und meine Präparate, statt durch einen grösseren Verdauungsversuch, durch mehrere kleinere zu gewinnen und zwar nicht nur der Bequemlichkeit halber, sondern auch weil auf diesem Wege die Präparate aus verschiedenen Darstellungen mit einander verglichen werden konnten. Da aber der Gang der einzelnen Versuche, der Hauptsache nach, immer ein und derselbe war, so werde ich nur den ersten Versuch ausführlich beschreiben, die übrigen kurz zusammenfassen.

Es sei noch an dieser Stelle ein Vorversuch erwähnt, den ich mit Fibrin ausgeführt habe, um die von mir dargestellten Antipeptonpräparate mit denen anderer Autoren und besonders mit denen von P. Balke<sup>1)</sup> vergleichen zu können, welcher durchweg den Angaben Kühne's folgt, mit dem einzigen Unterschied, dass die Fällung mit Phosphorwolframsäure (und Isolierung des Antipeptons aus dem Niederschlag) fortgelassen, vielmehr das Antipepton direct durch Alkohol gefällt hat. Das von mir erhaltene Fibrinantipepton zeigte die von Kühne angegebenen und von Balke (a. a. O. S. 254) angeführten Eigenschaften und Reactionen, mit dem einzigen Unterschied, dass es mit Essigsäure und Ferrocyankalium eine schwache gelbliche Trübung gab, was bei dem Balke'schen Präparat nicht der Fall war. Mit diesem Antipepton wurden ferner folgende Untersuchungen ausgeführt:

1) 0,9633 g Antipepton werden in der üblichen Weise durch Schmelzen mit Soda und Salpeter u. s. w., Fälln mit Molybdänsäure u. s. w. auf Phosphor untersucht. Es wurde erhalten 0,001 g  $Mg_2P_2O_7$ , gleich 0,00014 g P. Der Phosphorgehalt ist also so minimal, dass er vernachlässigt werden kann.

2) 0,5123 Antipepton werden durch Schmelzen mit Soda und Salpeter u. s. w. auf Schwefel untersucht. Das  $BaSO_4$  wog 0,06 g gleich 0,0082 Schwefel. Also S = 1,6 pCt. vom Anti-

<sup>1)</sup> Paul Balke, Hoppe - Seyler's Zeitschr. für physiolog. Chemie. Bd. 22. S. 250.

pepton. Dieselbe Antipeptondarstellungsmethode habe ich bei den Versuchen mit Casein angewendet, deren Beschreibung ich nunmehr folgen lasse.

#### Versuch 1.

54,6 g lufttrockenes Casein werden in einer Reibschale mit etwas Chloroformwasser übergossen und, unter starkem Rühren, ganz allmählich gesättigte  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung zugetropft. Hat sich das Casein vollständig gelöst — die Lösung muss neutral oder schwach alkalisch reagiren — so wird es in eine Glasstöpselflasche gefüllt, die Reibschale mit Chloroformwasser wiederholt und sorgfältig nachgespült und das Wasser in die Flasche gegossen. Jetzt wird die Caseinlösung, die im Ganzen 1 Liter beträgt, durch 3 ccm gesättigte Sodalösung deutlich alkalisch gemacht, mit 11 g fein zerhacktem Rinderpankreas versetzt, gut durchgeschüttelt, in den Thermostaten gestellt, 48 Stunden bei  $40^\circ$  digerirt und während der Digestion wiederholt gründlich geschüttelt. Nach dieser Zeit werden, um den Gang der Digestion zu controliren, folgende Proben angestellt: 1) die Tryptophanreaction, 2) die Biuretreaction, 3) das schwache Ansäuren einer Probe durch Essigsäure. Die beiden ersten Reactionen fallen nach 48 Stunden stark positiv aus; bei der dritten Probe erhält man einen ganz minimalen, weisslichen, flockigen Niederschlag. Nun wird der Inhalt der Flasche, an dessen Oberfläche eine dünne Haut von weisser, ungelöster Substanz, vermuthlich Fett, zu sehen ist, durch Essigsäure deutlich angesäuert, in einer emailirten eisernen Schale zum Sieden erhitzt und filtrirt<sup>1)</sup>. Beim Sieden scheidet sich eine geringe, flockige, weissliche Substanz aus, die später beim Filtriren als zäher, grauweisser, geringer Rückstand (A.) auf dem Filter bleibt; das Filtrat (B.) ist wasserhell und ganz schwach gelblich gefärbt.

A. Der Rückstand wird aus dem Filter in eine Reibschale gebracht, mit Wasser verrieben, wieder abfiltrirt, nachgewaschen, nochmals in die Reibschale gebracht, in Wasser durch wenig

<sup>1)</sup> Ich hatte zuerst die Flüssigkeit mit Essigsäure ganz schwach angesäuert, wie ich im Vorversuch bei der Fibrinverdauung gethan hatte; so kann man aber kein klares Filtrat bekommen: um ein solches zu erzielen, musste ich, nach der Neutralisirung, noch 3 ccm einer 30-procentigen Essigsäure hinzusetzen.

Sodalösung gelöst, filtrirt. Die Lösung filtrirt äusserst langsam; das Filtrat ist trübe und grau gefärbt. Man säuert das Filtrat ganz schwach mit Essigsäure an, wobei ein Niederschlag entsteht, der sich nicht absetzt. Man trennt den Niederschlag von der Flüssigkeit durch Filtriren ab, wäscht den Niederschlag auf dem Filter wiederholt mit Wasser nach, bringt ihn in eine Reibschale und verreibt ihn mit einer 5procentigen Kochsalzlösung. Der Rückstand löst sich in dieser Kochsalzlösung gar nicht, was daraus hervorgeht, dass die durch Filtriren getrennte Flüssigkeit keine der Eiweissreactionen giebt. Nun wird der Rückstand auf dem Filter mit Wasser gewaschen, in eine Reibschale gebracht, in Wasser durch einige Tropfen  $\text{NH}_3$  gelöst, filtrirt, und das Filtrat aufbewahrt.

B. Das Filtrat wird bis zur Consistenz eines dünnen Syrups auf freiem Feuer eingedampft und im Eisschrank drei Tage lang stehen gelassen. Nach dieser Zeit wird von dem reichlichen Tyrosinbodensatz abfiltrirt. Das Tyrosin wird auf dem Filter so lange gewaschen bis das Waschwasser ungefärbt durchgeht; dann wird das Tyrosin mit Wasser vom Filter in eine Schale gespritzt, auf ein getrocknetes gewogenes Filter übertragen, gewaschen, bei  $100^\circ$  getrocknet und gewogen. Es wog 1,268 g. Nun werden im Filtrat die Albumosen, nach den Vorschriften von Kühne<sup>1)</sup> durch abwechselndes Fällen mit Ammoniumsulfat bei neutraler, durch Ammoniumcarbonat alkalischer und durch Essigsäure saurer Reaction, von dem Antipepton<sup>2)</sup> getrennt.

Die Albumosen der drei Ausscheidungen, die relativ sehr wenig sind und an den Filtern haften, werden alle sammt dem Filter und dem Ammoniumsulfat in eine Schale zusammengebracht, die Filter mit dem Glasstab in kleine Stücke zerrissen und der Brei mit wenig Wasser übergossen, so dass etwas Ammoniumsulfat ungelöst bleibt. Der so von dem grössten

<sup>1)</sup> Zeitschr. für Biologie. Bd. 29. S. 2.

<sup>2)</sup> Die Bezeichnungen „Antipepton“, „Albumose“ u. s. w. habe ich den Kühne'schen Arbeiten entliehen und gebrauche sie der Kürze wegen. Ich beabsichtige damit diejenigen aus Casein erhaltenen Produkte zu bezeichnen, welche denen von Kühne aus Fibrin und anderen Eiweissstoffen dargestellten entsprechen, ohne natürlich irgend eine Ansicht über ihre Zusammensetzung im Voraus damit aussprechen zu wollen.

Theil des Ammoniumsulfats befreite Rückstand wird sammt dem Filter in eine Schale gebracht, mit dem Glasstab zu Brei durchgerührt, mit Wasser übergossen und weiter gerührt bis alle Albumose sich gelöst hat, dann filtrirt und mit Wasser wiederholt nachgewaschen. Das Filtrat wird unter Zusatz von Chloroform aufbewahrt, um mit den entsprechenden der anderen Versuche vereinigt und verarbeitet zu werden.

Die von der letzten Albumoseausscheidung abfiltrirte Flüssigkeit wird etwas eingedampft und nach dem Erkalten von dem in grosser Menge ausgeschiedenen Ammoniumsulfat abfiltrirt. Man verdünnt dann das Filtrat bis auf etwa 300 ccm und kocht es mit  $\text{BaCO}_3$ , unter Ersatz des Verdampfenden durch heisses Wasser, so lange bis kein Ammoniak mehr entweicht und eine filtrirte Probe mit  $\text{BaCl}_2$  keine Trübung mehr giebt; filtrirt vom  $\text{BaCO}_3$  und  $\text{BaSO}_4$  ab, versetzt das Filtrat mit  $\text{NH}_3$  und Ammoniumcarbonat so lange noch ein Niederschlag entsteht, erwärmt und filtrirt von dem entstandenen  $\text{BaCO}_3$  nach 24stündigem Stehen, ab. Das barytfreie Filtrat wird nun auf dem Wasserbad bis zum dünnen Syrup eingedampft, wobei sich eine dünne Haut bildet; der dünne Syrup wird nun erkalten gelassen und mit absolutem Alkohol versetzt bis eine stets entstehende Trübung beim Umrühren nicht mehr verschwindet<sup>1)</sup>. Nun filtrirt man den Niederschlag ab und lässt die Flüssigkeit unter gutem Umrühren tropfenweise in 10—12mal so viel Alcohol absolut. fliessen, worauf das Antipepton in weissen Flocken ausfällt. Man filtrirt den Alkohol ab, wäscht mit Alcohol absolut. nach, bringt schnell den Niederschlag in eine Reibschale und zerreibt ihn mit absolutem Alkohol, bringt das Gemisch in ein Stöpselgefäss, giesst frischen Alcohol absolut. hinzu und lässt 24 Stunden stehen. Dann wird das Antipepton vom Alkohol abfiltrirt, mit Aether gewaschen und in das Stöpselgefäss mit Aether gebracht und unter dem Aether wieder 24 Stunden stehen gelassen. Nun filtrirt man es ab, bringt es möglichst schnell (ohne den anhängenden Aether verdunsten zu lassen) auf einer Schale in den Exsiccator über Schwefelsäure; aus dem Exsiccator saugt man sogleich die Luft ab.

Das so erhaltene Caseinantepton besitzt, der Hauptsache

<sup>1)</sup> P. Balke, a. a. O. S. 250.

nach, die bekannten Eigenschaften des Fibrinantipeptons. Es stellt ein weissliches Pulver dar, das äusserst leicht löslich und ungemein hygroskopisch ist. Seine wässerigen Lösungen sind klar, gelblich gefärbt und besitzen einen eigenthümlichen faden Geruch. Sie reagiren auf Lakmuspapier schwach alkalisch, auf Rosolsäure und Phenolphthalein deutlich sauer. Beim Trocknen bei  $100^{\circ}$  C. verändern sich die Eigenschaften und Reactionen des Caseinantipeptons gar nicht. Von diesen seien hier die hauptsächlichsten erwähnt. Sie wurden zuerst mit einer 1 procentigen Lösung ausgeführt.

1. Sublimat giebt eine gelblich-weisse Trübung und beim Stehen einen flockigen Niederschlag.

2. Bleiessig giebt keinen Niederschlag.

3. Essigsäure und Ferrocyankalium geben eine schwache gelbliche Trübung, dann geringen, flockigen Niederschlag.

4. Pikrinsäure (gesättigte Lösung) giebt keine Trübung.

5. Tannin erzeugt Fällung.

6. Phosphorwolframsäure bewirkt in der mit Salzsäure angesäuerten Lösung starke Fällung.

7. Die Biuretprobe fällt stark positiv aus.

8. Millon's Reagens giebt zuerst Niederschlag: beim Erhitzen wird die Farbe des Niederschlages schmutzig gelb. Nach einigem Stehen färbt sich die Flüssigkeit rosa bis roth: nach einigen Stunden wird der Niederschlag ebenfalls röthlich.

Eine 5procentige Lösung zeigt ganz genau dieselben Reactionen mit dem Unterschied, dass die Niederschläge, wo sie vorkommen, natürlich reichlicher sind.

Mit dem übrigbleibenden Antipepton werden nachstehende quantitativen Bestimmungen ausgeführt:

Phosphorbestimmung — 0,4785 g Antipepton werden dazu verwendet. Hieraus wird erhalten 0,002  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ . Hieraus würde sich  $0,00056 \text{ P} = 0,12 \text{ pCt.}$  berechnen, indessen ist die Quantität des erhaltenen Magnesiumpyrophosphat so gering, dass eine quantitative Berechnung kaum zulässig ist und man eigentlich nur sagen kann, dass der Phosphorgehalt minimal war<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Alle meine Phosphorbestimmungen sind durch Schmelzen der Substanz mit 30 facher Menge Salpeterminschung (Gemisch aus 3 Theilen  $\text{KNO}_3$

Schwefelbestimmung — 0,331 g Antipepton werden auf Schwefel untersucht. Das  $\text{BaSO}_4$  wog 0,041 g. Somit betrug der Schwefelgehalt 1,69 pCt.

#### Versuch 2.

53 g feuchtes Casein werden mit 2 g Pankreaspulver (aus der Sammlung des Laboratoriums) digerirt. Der Versuch wird ganz genau wie der erste angestellt und ausgeführt.

Das Tyrosin wog 1,795 g.

Die Albumosen wurden wie im ersten Versuch behandelt und ihre ammoniumsulfathaltige Lösung aufbewahrt.

Der Verdauungsrückstand wurde, nachdem er durch Verreiben in einer Reibschale mit Wasser gewaschen worden war und von dem Wasser durch Filtriren abgetrennt, direct in Wasser durch wenig  $\text{NH}_3$  gelöst, filtrirt und das Filtrat mit dem des ersten Versuchs vereinigt.

Das Antipepton zeigte die schon beschriebenen Eigenschaften und Reactionen; es wurde aber nicht zu quantitativen Bestimmungen verwendet, weil es durch Spuren von Schwefelsäure verunreinigt war.

#### Versuch 3.

80 g feuchtes Casein (3,545 g davon hinterliessen beim Trocknen 1,18 g, somit waren 26,63 g Trockensubstanz angewendet) werden in 2 Liter Chloroformwasser, wie bei den anderen Versuchen; durch Sodalösung gelöst und alkalisirt und 4 Tage mit 3 g Pankreaspulver digerirt. Das Tyrosin wog 1,028 g, d. i. 3,86 pCt. des Gewichts des Caseins.

Der Verdauungsrückstand wird durch  $\text{NH}_3$  in Wasser gelöst, filtrirt und mit denen aus den anderen Versuchen vereinigt.

Die vom Tyrosin abfiltrirte Verdauungslösung wurde zu Untersuchungen über den Phosphor verwendet, von denen später die Rede sein wird.

#### Versuch 4.

80 g feuchtes Casein (1,380 g davon hinterliessen beim Trocknen 0,449 g, somit waren 25,66 g Trockensubstanz angewendet) werden genau wie beim vorigen Versuch digerirt.

Das Tyrosin wog 1,078 g, d. i. 4,20 pCt. vom Gewicht des Caseins.

Der Verdauungsrückstand wird wie die vorigen behandelt und mit ihnen vereinigt. Die Albumosen desgl.

Das Antipepton zeigte die schon angeführten Eigenschaften und Reactionen. Mit diesem Präparat wurden die folgenden quantitativen Analysen ausgeführt:

a) 0,442 g desselben = 0,3965 aschefreie Substanz wurden auf Schwefel untersucht. Hieraus wird erhalten 0,05075 g  $\text{BaSO}_4$  = 0,0069 g Schwefel,

und 1 Theil  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Ueberführung der Lösung in einen Kolben, Ansäuern mit  $\text{HNO}_3$  u. s. w. in der üblichen Weise ausgeführt worden.



d. i. 1,635 pCt. des Gewichts des aschehaltigen oder 1,74 pCt. des aschefreien Antipteptons.

b) 0,326 g = 0,2911 aschefreie Substanz werden auf Schwefel untersucht. Hieraus wird erhalten 0,0377 g  $\text{BaSO}_4$  = 0,00513 Schwefel. Somit S = 1,57 pCt. des aschehaltigen, 1,76 des aschefreien Antipteptons.

c) 0,5746 g Substanz gaben 0,0615 Asche.

d) 0,226 g = 0,2018 g aschefreie Substanz werden nach Kjeldahl auf N untersucht. Sie erforderten 9,4 ccm  $\frac{1}{4}$  Normalschwefelsäure; somit war der Stickstoff 0,0329 g, d. i. 16,30 pCt. vom aschefreien Gewicht des Antipteptons.

e) 0,194 g = 0,1932 g aschefreie Substanz werden nach Kjeldahl auf Stickstoff untersucht. Sie erforderten 8,1 ccm  $\frac{1}{4}$  Normalsäure: somit war N = 0,0283, d. i. 16,38 pCt. vom aschefreien Antiptepton.

f) Stickstoffbestimmung nach Dumas. 0,2238 g = 0,1998 g aschefreie Substanz liefern 29,2 ccm Stickstoff. Barometerstand = 763; Temperatur = 25°. Hieraus berechnet sich N = 0,0326 g = 16,36 pCt.

g) C- und H-Bestimmung. — 0,2660 g = 0,2018 g aschefreie Substanz gab im Sauerstoffstrom mit Kupferoxyd und vorgelegtem metallischen Kupfer verbrannt 0,3655  $\text{CO}_2$  und 0,1296  $\text{H}_2\text{O}$ . Hieraus ergibt sich C = 49,38 pCt.; H = 7,135 pCt.

h) 0,2616 g = 0,234 g aschefreie Substanz gab 0,4299 g  $\text{CO}_2$  und 0,1540 g  $\text{H}_2\text{O}$ . Hieraus ergibt sich C = 49,98 pCt.; H = 7,31 pCt.

Die ausserordentlich hygroskopische Beschaffenheit des Antipteptons bereitete der Analyse nicht unerhebliche Schwierigkeiten. Um das Anziehen von Wasser während der Beschickung des Verbrennungsrohrs so viel wie möglich zu verhindern, wurde die Substanz in einem Röhrchen (bei abgenommenem Stöpsel) bei 110° getrocknet, während des Abkühlens im evacuirten Schwefelsäureexsiccator aufbewahrt und sobald Gewichtsconstanz erreicht war, die Substanz aus dem Röhrchen direct in das Verbrennungsrohr geschüttet. Dennoch mögen die Zahlen für den Wasserstoff etwas zu hoch ausgefallen sein.

#### Versuch 5.

100 g feuchtes Casein (1,9085 g davon hinterliessen beim Trocknen 0,551 g, somit waren 28,88 g angewendet) werden 4 Tage hindurch mit 3 g Pankreaspulver und 2 Liter alkalisirtem Chloroformwasser, wie gewöhnlich, bei 40° C. digerirt.

Das Tyrosin wog 1,028 g = 3,824 pCt. vom Gewicht des Caseins.

Der Verdauungsrückstand und die Albumosen werden wie bei den vorigen Versuchen verarbeitet und aufbewahrt.

Das Antiptepton zeigte die bekannten Eigenschaften und Reactionen; es wurden damit nachstehende quantitativen Bestimmungen ausgeführt.

a) 0,9566 g Substanz wurden auf Schwefel untersucht. Das  $\text{BaSO}_4$  wog 0,0576 g = 0,0079 g Schwefel = 0,825 pCt.

b) 0,4751 g Substanz geben 0,0294  $\text{BaSO}_4$  = 0,00405 Schwefel = 0,853 pCt.

Die Verdauungsprodukte, die bis jetzt in den eben angeführten Versuchen berücksichtigt worden sind, sind fast ausschliesslich das Tyrosin und das Antipepton. Was die Albumosen betrifft, so war ich, in Anbetracht ihrer relativ geringen Menge und des grossen Verlustes, mit dem man bei ihrer Darstellung arbeiten muss, genöthigt, sie zu vereinigen und zusammen darzustellen.

Aus demselben Grunde wurden die ammoniakalischen Lösungen der Verdauungsrückstände vereinigt.

Bevor ich aber zur Beschreibung der letztgenannten Verdauungsprodukte übergehe, will ich die für das Tyrosin und das Antipepton erhaltenen Werthe zusammenstellen und einige Bemerkungen hinzufügen.

#### a. Das Tyrosin.

In 3 Versuchen wurde die Quantität des erhaltenen Tyrosins bestimmt. Berechnet auf das Trockengewicht des Caseïns wurde an Tyrosin erhalten:

In Versuch III	3,86 pCt.
- - IV	4,20 -
- - V	3,82 -

im Mittel 3,96 pCt. oder rund 4 pCt.

Angaben über die Quantität des aus anderen Eiweisskörpern durch Trypsinverdauung erhaltenen Tyrosins scheinen nicht vorhanden zu sein, ich habe solche wenigstens nicht finden können. Ebenso liegt meines Wissens nur eine Angabe über die Quantität des auf anderem Wege aus dem Caseïn erhaltbaren Tyrosins vor. Dieselbe stammt von Rudolf Cohn<sup>1)</sup>. Derselbe erhielt bei der Zersetzung des Caseïns durch siedende rauchende Salzsäure 3,5 pCt. des angewendeten Caseïns an Tyrosin, wobei zu bemerken ist, dass eine gewisse Quantität Tyrosin noch in den Mutterlaugen blieb. Die von uns erhaltene Zahl stimmt ziemlich damit überein, eher ist sie noch etwas höher. Von seiner Zahl

<sup>1)</sup> Zeitschr. für physiol. Chemie. XXII. S. 165.

bemerkt Cohn, dass es erheblich mehr sei, als man sonst aus Eiweiss erhält (etwa 2pCt.). Dabei ist augenscheinlich die Zersetzung mit Salzsäure oder Schwefelsäure gemeint. Jedenfalls geht daraus hervor, dass das Casein eher mehr von der aromatischen Oxygruppe enthält, wie die anderen Eiweisskörper, als weniger.

#### b. Das Caseinantipepton.

Die physikalischen Eigenschaften und die Reactionen des Caseinantipeptons sind, wie aus dem Vorhergehenden hervorgeht, im Wesentlichen denjenigen des Fibrinantipeptons gleich. Was aber die Zusammensetzung des Caseinantipeptons anbelangt, so ergaben die Analysen:

C 49,38 bis 49,98pCt.; H 7,13 bis 7,31pCt.; N 16,30 bis 16,38pCt.; S 0,82 bis 1,69pCt.

Im Mittel ergibt sich als Zusammensetzung:

C 49,7, H 7,2, N 16,3, (S 1,3?) O 25,2. Es würde somit das Antipepton aus Casein sich von dem von Kühne und später von Balke aus Fibrin dargestellten Präparate wesentlich dadurch unterscheiden, dass es an Kohlenstoff reicher wäre, denn die Kühne'schen<sup>1)</sup> Präparate hatten durchschnittlich einen Kohlenstoffgehalt von 47pCt., die von Balke<sup>2)</sup> einen solchen von 46,5pCt. Noch mehr entfernt sich die Zusammensetzung des Caseinpeptons von der der Fleischsäure, welche Balke in der schon öfter citirten Abhandlung, den Untersuchungen und Ansichten Siegfried's folgend, für identisch mit Antipepton hält. Meine Werthe stimmen dagegen mit denen von Charles Norris<sup>3)</sup> ziemlich gut überein. Er fand nemlich für Caseinantipepton C 49,52 bis 51,38, H 6,47 bis 6,60, N 15,57 bis 16,30, S 0,68. Doch dürfen die Präparate von Norris nicht als reines Antipepton angesehen werden, sie enthielten sicher Albumose beige-mischt, weil seine Verdauungslösungen nur einmal mit Ammonsulfat gesättigt waren, während nach Kühne die Sättigung bei neutraler, alkalischer und saurer Reaction unbedingt nöthig ist.

Mit der Frage, ob das Antipepton mit der schwefelfreien

<sup>1)</sup> Zeitschr. für Biologie. Bd. XXII. S. 452.

<sup>2)</sup> a. a. O. S. 252.

<sup>3)</sup> Maly's Jahresber. für 1890. S. 20.

Fleischsäure identisch sei oder nicht, ist natürlich diejenige verknüpft, ob das Antipepton schwefelhaltig sei oder nicht. Die Kühne'schen Präparate, sowie die von Balke und anderen Autoren dargestellten, waren immer schwefelhaltig. Meine Präparate von Casein-Antipepton enthielten noch mehr Schwefel, variirten ausserdem aber sehr stark in ihrem Schwefelgehalt, so dass ich daran denken musste, ob ein Theil des Schwefels nicht von dem bei der Darstellung angewendeten Ammoniumsulfat herrühren könne. Doch gaben die Lösungen der verschiedenen Präparate, mit Ausnahme des zweiten, das übrigens zu quantitativen Bestimmungen nicht verwendet wurde, mit Baryumchlorid absolut keinen Niederschlag. Balke<sup>1)</sup> fasst den Schwefelgehalt entschieden als Verunreinigung auf, indem er sich hauptsächlich auf theoretische Betrachtungen über das vermuthliche Moleculargewicht des Antipeptons stützt und kürzlich giebt S. Fränkel<sup>2)</sup> an, eine Methode gefunden zu haben, um das Antipepton, sowie das Amphopepton schwefelfrei darzustellen. Fränkel stellt nemlich die Behauptung auf, das Pepton sei eine schwefelfreie Substanz und die Löslichkeit desselben in Alcohol absolut. sei das Mittel, um es von den anderen schwefelhaltigen Stoffen (Albumosen u. s. w.) zu trennen und rein darzustellen. Ich will an dieser Stelle einen Versuch erwähnen, den ich nach dieser Richtung mit meinem Caseinantipepton ausgeführt habe. Den Alcohol absolut., der zum Entwässern meiner Antipeptonpräparate gedient hatte und der also vermuthlich schwefelfreies Antipepton enthalten sollte, habe ich gesammelt und in folgender Weise untersucht. Ich habe ihn zur Trockne auf dem Wasserbad eingedampft, den Rückstand mit Alcohol absolut. ausgezogen, filtrirt, das Filtrat einen Tag im Eisschrank stehen gelassen, von der entstandenen Trübung abfiltrirt und in Aether tropfenweise gegossen. Es entstand ein schneeweisser flockiger Niederschlag, der abfiltrirt, mit Aether nachgewaschen und über Schwefelsäure getrocknet wurde. Diese Substanz enthielt grosse Mengen von Leucin (mikroskopische Untersuchung), gab eine prachtvolle Biuretreaction und eine deutliche Millon'sche

<sup>1)</sup> a. a. O. S. 253.

<sup>2)</sup> Zur Kenntniss der Zerfallsprodukte des Eiweisses bei peptischer und tryptischer Verdauung. Wiener med. Blätter. 1896. No. 45, 46.

Reaction<sup>1)</sup>. 1,457 g davon, auf Schwefel untersucht, lieferten 0,068 g BaSO<sub>4</sub>. Die Substanz enthielt somit 0,62 pCt. Schwefel, trotz hohen Gehalts an einem schwefelfreien Stoff, dem Leucin.

Die Frage, ob das Caseīnantipepton schwefelhaltig sei, vermag ich somit nicht zu beantworten. Das constante Vorhandensein relativ grosser Menge Schwefel scheint mir dafür zu sprechen, dass das Caseīnantipepton schwefelhaltig ist; in Anbetracht der wechselnden Grösse des Schwefelgehaltes in den einzelnen Präparaten muss man jedoch, wie mir scheint, an die Möglichkeit denken, dass gleichzeitig eine andere schwefelhaltige Substanz mit dem Antipepton vorhanden ist, deren Menge aus noch unbekannten Gründen in den verschiedenen Darstellungen variiert.

#### c. Die Caseīnalbumosen.

Die Albumosen aus den fünf Verdauungsversuchen sind als wässrige, noch ammoniumsulfathaltige Lösung (siehe oben) aufbewahrt worden.

Ein Theil der aus dem ersten Versuch abstammenden Albumosen war schon in trockenem Zustande dargestellt worden, um eine Phosphorbestimmung der sämtlichen Albumosen auszuführen. Sie stellten ein gelbliches Pulver dar, das in Wasser sehr leicht löslich war. Die wässrige Lösung hatte fleisch-extractartigen Geruch und enthielt Spuren von Schwefelsäure; sie gab die allgemeinen Reactionen der Albumosen.

0,7985 g dieser Substanz werden auf P untersucht. Hieraus wird erhalten 0,0005 g Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> = 0,0018 P. Die Quantität des Phosphors in den Albumosen beträgt somit 0,023 pCt.

Wie man sieht, ist der Phosphorgehalt der Caseīnalbumosen so niedrig, dass er absolut als Verunreinigung aufgefasst werden muss.

Die ammoniumsulfathaltige Lösung der Albumosen wurde nun noch durch Kochen mit Baryumcarbonat u. s. w. vom Ammonsulfat befreit, dann die erhaltene grünfluorescirende Lösung auf etwa 300 ccm eingedampft, genau neutralisirt und mit Kochsalz durch Verreiben in der Reibschale gesättigt, und

<sup>1)</sup> Diese rührt sehr wahrscheinlich von Spuren von Tyrosin her, die sammt dem Leucin von dem Alkohol gelöst werden. Siehe auch Balke a. a. O. S. 252.

24. Stunden stehen gelassen. Die Flüssigkeit wird nun von den in Klumpen ausgeschiedenen Albumosen (A.) durch Decantiren getrennt, filtrirt und mit Essigsäure, welche vorher mit NaCl gesättigt worden war, versetzt bis keine Fällung mehr erfolgt. Jetzt trennt man wieder die Flüssigkeit von den in Klumpen ausgeschiedenen Albumosen (B.) durch Abgiessen ab, filtrirt sie und sättigt mit Ammoniumsulfat, wobei eine dritte Albumosenausscheidung (C.) stattfindet. Die von dieser letzten Albumosenausscheidung durch Decantiren abgetrennte und filtrirte Flüssigkeit ist nur noch schwach gelblich gefärbt und giebt die Biuretreaction, was wahrscheinlich von Spuren von Pepton herührt; sie wird nicht weiter untersucht. Die drei Albumosenausscheidungen werden nun getrennt verarbeitet.

A. Der Niederschlag der ersten Ausscheidung wird mit einer gesättigten Kochsalzlösung gewaschen und dann mit etwa 100 ccm destillirtem Wasser in einer Reibschale verrieben: er löst sich dabei bis auf minimale Reste (Dysalbumose Kühne's) auf: die Lösung wird filtrirt und so lange gegen destillirtes Wasser dialysirt, bis eine Probe von diesem, angesäuert und mit einer Silbernitratlösung versetzt, noch nur eine ganz minimale Trübung giebt. Es findet während der Dialyse kein Niederschlag in der Albumoselösung statt. Ist diese vollständig dialysirt, so wird sie bis zu dünnen Syrup eingedampft und in der üblichen Weise mit Alcohol absolut. gefällt. Die erhaltene Quantität war gering und reichte nur eben aus, um die wichtigsten Reactionen anzustellen. Die Lösung gab Niederschlag mit verdünnter Kupfersulfatlösung, mit Essigsäure + Ferrocyankalium, beim Erwärmen verschwindende Trübung mit Salpetersäure.

B. Der zweite Albumose - Niederschlag wird ebenso behandelt, er zeigte in der 1procentigen, etwas gelblichen Lösung folgendes Verhalten zu Reagentien:

1) Zusatz von verdünntem Kupfersulfat: ganz schwache Trübung.

2) Bas. Bleiacetat: die Lösung bleibt klar.

3) Essigsäure + Ferrocyankalium: ganz schwache Trübung.

4) Salpetersäure: die Lösung bleibt klar, färbt sich beim Stehen ganz schwach gelb, stärker beim Erhitzen.

5) Metaphosphorsäure: die Lösung bleibt klar.

- 6) Trichloressigsäure: Trübung, allmählich Niederschlag.
- 7) Sulfosalicylsäure: schwache Trübung.
- 8) Pikrinsäure, starke Fällung: beim Erhitzen zum grössten Theil verschwindend, beim Erkalten wiederkehrend.
- 9) Gerbsäure: ebenso.
- 10) Mit Millon's Reagens intensive Rothfärbung.
- 11) und 12) Die Reaction von Adamkiewicz und die Biuret-Reaction fallen positiv aus.
- 13) Kochen mit alkalischer Bleilösung bewirkt keine Schwärzung, kaum eine etwas stärkere Gelbfärbung.

Nach diesen Reactionen handelt es sich, wie zu erwarten war, um eine Deuteroalbumose.

C. Die dritte Albumoseausscheidung war zu gering, um sie der Dialyse unterwerfen zu können: sie wurde zuerst mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung gut gewaschen, dann in sehr wenig Wasser gelöst und mit Alcohol absolut. versetzt, bis ein weisser krystallinischer Niederschlag entstand. Die von dem Niederschlag abfiltrirte, in dieser Weise von einem Theile der Salze befreite, Albumoselösung wird nunmehr tropfenweise in Alcohol absolut. unter starkem Umrühren gegossen, worauf ein weisser, flockiger Niederschlag entsteht. Es konnte von demselben constatirt werden, dass die Lösung mit Essigsäure + Ferrocyankalium, sowie mit verdünnter Kupfersulfatlösung klar blieb.

Die bei der Verdauung des Caseïns durch Trypsin neben dem Pepton gebildeten Albumosen bestehen somit, wie zu erwarten war, fast ausschliesslich aus secundären, neben sehr geringer Menge primärer Albumosen. Die aus den anderen Versuchen erhaltenen Albumosen konnte ich aus äusseren Gründen nicht weiter verarbeiten.

## II. Der Verdauungsrückstand und das Verhalten des Caseïnphosphors in den Verdauungsprodukten.

Während früher allgemein angenommen wurde, dass bei der Pepsinverdauung des Caseïns der gesammte Phosphorgehalt des Caseïns sich in Form des unverdaulichen Paranucléïns (Pseudonucléïn Hammarsten's) abspalte, wies E. Salkowski<sup>1)</sup> nach, dass dieses, auch wenn man den Verdauungsversuch unter Ein-

<sup>1)</sup> Centraltbl. für die med. Wissensch. No. 23, 28.

haltung der gewöhnlichen üblichen Mischungsverhältnisse anstellt, nicht der Fall ist, dass vielmehr die Hauptmenge des Phosphors in Lösung geht, ein kleinerer Theil sich unlöslich im Paranuclein ausscheidet. Hierauf hindeutende Beobachtungen hatte schon etwas früher Szontagh<sup>1)</sup> veröffentlicht, und zu demselben Resultat gelangten auch v. Moraczewski<sup>2)</sup> und Sebelien<sup>3)</sup>. In einer Arbeit von E. Salkowski und M. Hahn<sup>4)</sup> wurde dann die Abhängigkeit der Vertheilung des Phosphors in den löslichen und unlöslichen Antheil von den speciellen Bedingungen der Verdauungsmischungen gezeigt, dieses in einer weiteren Arbeit von E. Salkowski<sup>5)</sup> näher ausgeführt und nachgewiesen, dass es unter besonders günstigen Bedingungen gelingt, das Casein ohne jeden Rest zur Auflösung zu bringen.

Mit der Trypsinverdauung des Caseins hat sich bisher, so viel mir bekannt, nur Sebelien<sup>6)</sup> beschäftigt. Er constatirte, dass bei der tryptischen Verdauung des Caseins, nur ein geringer Verdauungsrückstand (so nenne ich, in Analogie mit dem bei peptischer Verdauung zurückbleibenden Bestandtheil des Caseins, den Niederschlag, der durch Ansäuern der Trypsinverdauungsflüssigkeit zu erzielen ist) zurückbleibt: er untersuchte ferner, wie viel dieser Rückstand von dem angewendeten Casein ausmache, und wie viel von dem Phosphor des Caseins demselben zukäme: er liess aber die Natur dieses Rückstandes, so wie das Verhalten und die Form des Phosphors in den löslichen Verdauungsprodukten unberücksichtigt. Gegen seine Versuche, durch welche er die Vertheilung des Phosphors in der Lösung und im Rückstand festzustellen suchte, ist ausserdem einzuwenden, dass seine Zahlen für das Magnesiumpyrophosphat, bezw. den Phosphor wegen der zu geringen Menge des Ausgangsmaterials vielfach viel zu klein sind, um sichere Berechnungen zu ermöglichen. So findet sich in Versuchsreihe I 0,0007 und

<sup>1)</sup> Maly's Jahreshb. für 1892. S. 168.

<sup>2)</sup> Zeitschr. für physiol. Chemie. Bd. 20. S. 28.

<sup>3)</sup> Ebendasselbst. S. 443.

<sup>4)</sup> Pflüger's Archiv. Bd. 59. S. 225.

<sup>5)</sup> Ebendasselbst.

<sup>6)</sup> a. a. O. S. 449. In neuester Zeit auch Röhmann. Ber. der deutschen chem. Gesellsch. 1897.



0,0005 Phosphor (die Zahlen für Magnesiumpyrophosphat sind nicht angeführt), in Versuchsreihe V gar:

$$\begin{array}{rcl} 0,0007 \text{ Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 & = & 0,00019 \text{ Phosphor} \\ 0,0005 & - & = 0,00014 \quad - \\ 0,0004 & - & = 0,00011 \quad - \end{array}$$

Dass aus solchen Zahlen keine Schlussfolgerungen gezogen werden können, liegt auf der Hand.

Ich werde zunächst einige orientirende Untersuchungen anführen, die ich schon mit dem Material aus den im Eingang der Arbeit angegebenen Verdauungsversuchen ausgeführt hatte.

Was den Verdauungsrückstand betrifft, so sahen wir schon bei dem ersten Versuch, dass er in einer 5procentigen Kochsalzlösung vollständig unlöslich war, was die Möglichkeit ausschliesst, dass es sich um Globulin handeln könne. Er theilt dagegen in seinen Löslichkeitsbedingungen die Eigenschaften des Caseïns vollständig. Die aufbewahrte ammoniakalische Lösung der Verdauungsrückstände aus allen fünf Versuchen (siehe diese), wird jetzt mit Essigsäure gefällt, filtrirt, der Niederschlag gut gewaschen und durch Behandlung mit Alkohol-Aether in trockenem Zustande dargestellt. Durch diese Behandlung löste sich der schon geringe Niederschlag theilweise auf, und der übrige Theil stellte ein schwärzliches Pulver dar, das im Ganzen 0,21 g wog, phosphorhaltig war, auf dem Platinblech sehr schwer verbrannte und relativ viele Asche hinterliess.

Bezüglich des Caseïnphosphors geht aus den quantitativen Phosphorbestimmungen des Caseïnantipeptons und der Caseïnalbumose hervor, dass diese Produkte als phosphorfrei betrachtet werden müssen, denn der procentige Phosphorgehalt derselben (0,11 pCt. für das Antipepton und 0,02 pCt. für die Albumosen) kann nur als Verunreinigung aufgefasst werden. Andererseits erwies sich die vom Verdauungsrückstand abfiltrirte Verdauungsflüssigkeit, so wie auch die in derselben durch Sättigen mit Ammoniumsulfat, durch Alcohol absolut., Tannin, Phosphorwolframsäure erzielten Niederschläge, äusserst reich an Phosphor. Eine Erklärung dieser scheinbar im Widerspruch stehenden Thatsachen geben folgende Versuche, welche mit der aus dem dritten Versuch (siehe diesen) herstammenden, von

dem Verdauungsrückstand und vom Tyrosin abfiltrirten Verdauungsflüssigkeit durchgeführt wurden.

1. 3 ccm der Flüssigkeit wurden auf etwa 20 ccm mit Wasser verdünnt und mit  $\text{NH}_3$  alkalisirt: es entstand eine minimale Trübung, aber kein Niederschlag. Die von der Trübung abfiltrirte Flüssigkeit wurde mit Magnesiamischung versetzt: es entstand ein Niederschlag von phosphorsaurer Ammonmagnesia, der nach 24stündigem Stehen durch ein aschefreies Filter filtrirt und gut nachgewaschen wurde, der Rückstand wurde getrocknet, geglüht und als Magnesiumpyrophosphat gewogen. Sein Gewicht betrug 0,0069 g. Im Filtrat von Ammonmagnesiumphosphat wurde der Phosphor durch Schmelzen mit Soda + Salpeter u. s. w. bestimmt. Es wurde erhalten 0,0185 Magnesiumpyrophosphat. Somit waren in dem Filtrat 27 pCt. des Phosphors als Orthophosphorsäure, 73 pCt. in organisch gebundener Form vorhanden.

2. 3 ccm derselben Flüssigkeit werden verdünnt, 2 Stunden mit  $\text{BaCO}_3$  gekocht, filtrirt, in dem Filtrat durch Schmelzen mit Soda + Salpeter u. s. w. der Phosphor bestimmt. Es wurden erhalten 0,013 Magnesiumpyrophosphat, somit enthielt das Filtrat nur 55,8 pCt. des gesammten Phosphors der Verdauungslösung.

3. 3 ccm derselben Flüssigkeit werden auf etwa 20 ccm verdünnt, mit  $\text{NH}_3$  schwach alkalisirt und mit Magnesiamischung gefällt, nach 24 Stunden filtrirt, das Filtrat verdünnt, mit  $\text{BaCO}_3$  2 Stunden lang gekocht, filtrirt. Der auf dem Filter bleibende Rückstand durch Reiben in einer Reibschale mit heissem Wasser gewaschen, von dem Waschwasser abfiltrirt, auf dem Filter erst mit heissem, dann mit kaltem Wasser wiederholt gewaschen und schliesslich in  $\text{HNO}_3$  gelöst und mit Ammoniummolybdat versetzt. Es entstand ein reichlicher, gelber, charakteristischer Niederschlag, ein Theil des Baryumcarbonats war somit beim Kochen mit der Verdauungslösung in Baryumphosphat übergegangen.

4. 3 ccm derselben Flüssigkeit werden auf 20 ccm verdünnt, mit  $\text{NH}_3$  schwach alkalisirt und mit Magnesiamischung gefällt; nach 24 Stunden filtrirt: das Filtrat mit verdünnter Natronlauge  $\frac{1}{2}$  Stunde, unter Ersatz des beim Kochen ver-

dampfenden mit heissem Wasser, gekocht. Eine Probe davon mit  $\text{HNO}_3$  angesäuert, gab mit Ammoniummolybdat einen reichlichen, gelben, charakteristischen Niederschlag.

Es folgt aus den vorliegenden Versuchen, dass der Caseinphosphor sich in der vom Verdauungsrückstand abgetrennten Verdauungslösung in zwei Formen, die chemisch von einander scharf zu unterscheiden sind, vorfindet: in einer anorganischen Form, d. h. als Orthophosphorsäure und in einer organischen, oder, vorsichtiger ausgedrückt, einer solchen, die durch Magnesiamischung nicht fällbar ist. Das Verhältniss zwischen den beiden Theilen kann unter verschiedenen Umständen, wie z. B. das Kochen der Flüssigkeit mit  $\text{BaCO}_3$  oder mit verdünnter Natronlauge insofern variiren, als die organische Form auf Kosten der anderen abnimmt, indem aus dem organisch gebundenen Antheil mehr und mehr Phosphorsäure abgespalten wird. Der Grund, warum die Albumosen und das Antipepton phosphorfrei sind, liegt somit darin, dass bei der Darstellung der Albumosen, welche langdauerndes Kochen mit Baryumcarbonat erfordert, sowohl der anorganische als der organische Antheil von dem Baryumcarbonat zurückgehalten wird, der zweite, nachdem er durch Kochen mit  $\text{BaCO}_3$  in die anorganische Form übergeführt worden ist. Dieses geht sehr klar, besonders aus dem dritten Versuch und aus einem Vergleich der Zahlen des ersten Versuchs mit denen des zweiten hervor. Die Spuren von Phosphor, die wir in den Albumose- und in den Antipeptonpräparaten gefunden haben, stellen, aller Wahrscheinlichkeit nach, den kleinen Bruchtheil dar, den das Baryumcarbonat noch nicht umgewandelt und folglich auch nicht als Baryumphosphat zurückgehalten hat. Das Verhältniss ist also bezüglich des Verhaltens der Albumosen ganz dasselbe, wie es für die Pepsinverdauung E. Salkowski nachgewiesen hat. Derselbe sagt Centralbl. für die med. Wissensch. 1893, S. 386:

„Untersucht man die Albumose, nachdem sie durch Ammoniumsulfat ausgefällt und durch Wiederlösen in Wasser und nochmaliges Fälln mit Ammoniumsulfat gereinigt ist, vor der Behandlung mit Baryumcarbonat, so erweist sie sich stark phosphorhaltig, kocht man aber die Lösung derselben zur Entfernung des Ammoniumsulfats anhaltend mit Baryumcarbonat,

so verschwindet, wie gesagt, der Phosphorgehalt. Dasselbe gilt für das Pepton. Das Baryumcarbonat bindet also den Phosphor u. s. w.“

Ein wesentlicher Unterschied gegenüber der Pepsinverdauung besteht jedoch darin, dass bei der Trypsinverdauung ein mehr oder weniger grossen Antheil des Caseïnphosphors als Orthophosphorsäure abgespalten wird, bei der Pepsinverdauung dagegen nicht, die Albumosenlösung bei der Trypsinverdauung also von vornherein phosphorsäurehaltig ist, bei der Pepsinverdauung dagegen nicht. Es fragt sich nun aber, ob die Abspaltung von Phosphor als Phosphorsäure aus dem Caseïnmolekül eine spezifische Wirkung des Pankreasfermentes sei, oder von dem Alkaligehalt der Verdauungsmischung abhängt. Diese letzte Annahme lag, nach unseren Erfahrungen über die Wirkung der verdünnten Natronlauge auf die organische Form des Phosphors in der Verdauungslösung, und nach dem, was Salkowski und Hahn über die Wirkung der Alkalien auf die löslichen Verdauungsprodukte des Caseïns bei der Magenverdauung berichtet haben<sup>1)</sup>, sehr nahe. Um nun über diese Frage, sowie auch über die Menge und den Phosphorgehalt des Verdauungsrückstandes bessere Aufklärung zu erhalten, habe ich nachstehende Versuche ausgeführt:

#### 1. Versuchsreihe.

Diese Versuchsreihe wurde in der Absicht angestellt, um festzustellen, welchen Einfluss etwa die Zeitdauer der Digestion bei Gleichbleiben aller anderen Versuchsbedingungen auf die Menge des Verdauungsrückstandes und die Vertheilung des Phosphors in den Verdauungsprodukten ausübt.

##### Versuch 1.

1 g Pankreaspulver wird 12 Stunden mit 100 ccm Chloroformwasser und 1 ccm gesättigte Sodalösung bei 40° stehen gelassen, dann filtrirt: eine Probe dieser Fermentlösung gab beim Ansäuern mit HCl einen deutlichen, grau- weissen, flockigen Niederschlag. — Von lufttrockenem, über Schwefelsäure aufbewahrtem, zwei Mal durch das ganze im Eingang der Arbeit

<sup>1)</sup> a. a. O. S. 242.

angegebene Verfahren gereinigtem Casein werden zu gleicher Zeit 10,334 g und 0,776 g abgewogen.

Die 0,776 g lieferten beim Trocknen 0,4835 g Trockenrückstand, von dem eine P-Bestimmung gab 0,013 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ . Somit enthielt das angewendete Casein 62,3 pCt. Trockenrückstand mit 0,75 pCt. Phosphor.

Die 10,334 g (6,434 g Trockencasein entsprechend) werden ohne Verlust in 300 ccm Chloroformwasser durch 2 ccm gesättigter Sodalösung gelöst; dann wird die Fermentlösung hinzugefügt, das Ganze auf 500 ccm mit Chloroformwasser aufgefüllt und drei Tage lang bei 40° digerirt. Nach dieser Zeit sieht die Flüssigkeit noch schwach opalisirend aus: es ist aber kein Niederschlag zu bemerken. Die Verdauungslösung wird nun in zwei genau gleiche Theile eingetheilt; der eine (A) sogleich verarbeitet, der zweite (B) wieder in den Thermostaten gestellt.

A. Dieser Theil wird mit HCl schwach angesäuert und erhitzt, worauf ein geringer, flockiger, grauweißer Niederschlag entsteht, der durch gewogenes Filter abfiltrirt und bis zum Verschwinden der Chlorreaction gewaschen wird. Der Niederschlag wiegt in trockenem Zustande 0,075, d. i. 2,33 pCt. vom Caseingewichte. Auf P untersucht<sup>1)</sup>, gab er 0,0015  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,00042\text{P}$ , d. i. 0,56 pCt. vom Gewichte des Rückstands selbst und 1,73 pCt. des gesammten Phosphors des Caseins. Die abfiltrirte Verdauungsflüssigkeit wird mit Magnesiamischung versetzt, zwei Tage stehen gelassen<sup>2)</sup>, der entstandene Niederschlag durch gewogenes

<sup>1)</sup> Die Phosphorbestimmung dieser am Filter immer fest haftenden, kleinen Verdauungsrückstände geschieht so, dass man das Filter sammt dem Niederschlag in kleine Stücke über der Platinschale zerschneidet und die kleinen Stücke in der Platinschale mit Salpetermischung überschüttet und durchrührt, worauf das Schmelzen in der üblichen Weise stattfindet.

<sup>2)</sup> Dies ist unbedingt nothwendig, weil dieser Niederschlag sich langsam bildet und noch langsamer absetzt. Eine sehr umständliche Operation ist ferner das Filtriren dieser Niederschläge, weil sie sehr häufig durch das Filter gehen. Um ein klares Filtrat zu bekommen, war ich fast immer genöthigt, den Niederschlag durch ein gehärtetes Doppelfilter zu filtriren. Dann wurde der Niederschlag in verdünnter Salzsäure, unter peinlicher Vermeidung von Verlusten, d. h. durch wiederholtes

Filter abfiltrirt, sorgfältig nachgewaschen und geglüht. Hieraus wurde erhalten 0,02 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0056 \text{ g P}$ , d. i. 23,25 pCt. vom gesammten Caseïnphosphor.

B. 4 Tage später, d. h. 7 Tage nach dem Anfang des Versuchs, wird die andere Hälfte der Verdauungslösung, ganz in derselben Weise, wie die erste Hälfte verarbeitet. Der durch Ansäuern mit  $\text{HCl}$  entstandenen Niederschlag wog 0,034 g, d. i. 1,505 pCt. vom Gewicht des Caseïns. Die Phosphorbestimmung desselben gab 0,0015 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,00042 \text{ P}$ , d. i. 1,23 pCt. vom Gewichte des Rückstandes selbst und 1,73 pCt. vom gesammten Caseïnphosphor. Der durch Magnesiamischung in der Verdauungslösung erzielte Niederschlag lieferte 0,047 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,013 \text{ g P}$ , d. h. 54,6 pCt. vom gesammten Caseïnphosphor.

#### Versuch 2.

Dieser Versuch wurde ganz genau wie der erste durchgeführt, deswegen werde ich ihn kurz zusammenfassen: 12,126 g und 0,890 g eines lufttrockenen, über Schwefelsäure aufbewahrten Caseïnpräparates werden zu gleicher Zeit abgewogen.

Die 0,89 g gaben beim Trocknen 0,6645 g Trockenrückstand. Dieser auf P untersucht lieferte 0,019 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0053 \text{ P}$ : Somit enthielt das angewendete Caseïn 74,66 pCt. Trockensubstanz mit 0,79 pCt. Phosphor.

Die 12,226 g wurden mit der Fermentlösung versetzt, die erste Hälfte (A) nach drei, die zweite (B) nach sieben Tagen verarbeitet.

A. Der durch Ansäuern der Verdauungsflüssigkeit mit  $\text{HCl}$  erhaltene Verdauungsrückstand wog 0,0615 g, d. i. 1,36 pCt. vom Caseïngewichte. Die Phosphorbestimmung desselben gab 0,0013 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,00036 \text{ g P}$ , d. i. 0,58 pCt. vom Gewicht des Rückstands selbst und 1,01 pCt. vom gesammten Caseïnphosphor. Der durch Magnesiamischung in der Verdauungsflüssigkeit erzielte Niederschlag lieferte 0,0205 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0057 \text{ g Phosphor}$ , d. i. 16 pCt. vom gesammten Phosphor des Caseïns.

Auslaugen des Filters mit der Säure, sorgfältiges Nachwaschen u. s. w. gelöst, die Lösung mit  $\text{NH}_3$  schwach alkalisirt und wieder mit Magnesiummischung gefällt, worauf ein normaler Niederschlag stattfand, der zur Bestimmung diente.

B. Der Verdauungsrückstand wog 0,061 g, d. i. 1,35 pCt. vom Gewichte des Caseïns. Die Phosphorbestimmung desselben gab 0,0015 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,00042$  g P, d. i. 0,69 pCt. des Gewichts des Rückstandes und 1,17 pCt. vom gesammten Phosphor des Caseïns. Der durch Magnesiamischung in der Verdauungsflüssigkeit erzielte Niederschlag lieferte 0,032 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,009$  g P, d. i. 25 pCt. vom gesammten Caseïnphosphor.

Folgende Tabelle stellt die Resultate dieser Versuchsreihe zusammen:

Nummer und Eintheilung des Versuchs	I.		II.	
	A.	B.	A.	B.
Dauer der Verdauung . . .	3 Tage	7 Tage	3 Tage	7 Tage
Der Verdauungsrückstand beträgt Procente des Caseïns .	2,33 pCt.	1,505 pCt.	1,36 pCt.	1,35 pCt.
Phosphorgehalt des Verdauungsrückstandes . . . . .	0,56 -	1,23 -	0,58 -	0,69 -
Der Phosphorgehalt des Verdauungsrückstandes beträgt vom Phosphorgehalt des Caseïns .	1,73 -	1,73 -	1,007 -	1,17 -
Der in der Verdauungslösung als Phosphorsäure enthaltene Phosphor beträgt von dem Phosphor des Caseïns . . .	23,25 -	54,60 -	16 -	25,17 -

## 2. Versuchsreihe.

Folgende Versuche wurden vorgenommen in der Absicht zu ergründen, welchen Einfluss die Menge des Fermentes, bei einem Constantbleiben der übrigen Verdauungsbedingungen, auf den Verdauungsrückstand, bezw. die Vertheilung des Phosphors in den Digestionsprodukten etwa ausüben könnte.

Von einer durch Soda schwach alkalischen, klaren Caseïnlösung wird der Gehalt an Caseïn in folgender Weise bestimmt:

Mit 10 ccm der Lösung wird eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ausgeführt: diese Quantität erforderte 20,4 ccm  $\frac{1}{4}$  Normalschwefelsäure. Somit enthielten 10 ccm der Lösung 0,0714 g Stickstoff, d. i., auf Caseïn mit 15,67 pCt. Stickstoff umgerechnet, 0,455 g Caseïn.

Da in diesen Versuchen dasselbe Caseïn angewendet wurde, wie in Versuch 2 der Versuchsreihe I, so wurde diesmal die Phosphorbestimmung nicht gemacht und die schon gefundene Zahl — 0,79 pCt. P — benutzt.

Die Fermentlösung wird durch 12stündiges Digeriren von 2 g Pankreaspulver mit 200 ccm Chloroformwasser und 2 ccm gesättigter Sodalösung und nachfolgendes Filtriren hergestellt.

In 4 Flaschen werden je 50 ccm der Caseinlösung, entsprechend 2,75 Casein gegossen, jedoch verschiedene Mengen von Fermentlösung, so dass

die 1. Flasche enthielt 50 ccm Caseinlös. und 10 ccm Fermentlös.

- 2.	-	-	-	-	-	30	-	-
- 3.	-	-	-	-	-	50	-	-
- 4.	-	-	-	-	-	70	-	-

Dann wurde die Flüssigkeit in den drei ersten Flaschen durch Chloroformwasser, das in je 100 ccm 1 ccm gesättigter Sodalösung enthielt, auf ein Volumen von 120 ccm gebracht, d. h. dasselbe Volumen, welches die Mischung No. 4 schon an sich besass. Die Verdauungslösungen werden nun 3 Tage hindurch bei 40° C. stehen gelassen und dann in der üblichen Weise (siehe erste Versuchsreihe) verarbeitet.

Der Verdauungsrückstand der 1. Probe wog 0,0745 g, d. i. 3,29pCt. vom Caseingewichte.

Der Verdauungsrückstand der 2. Probe wog 0,042 g, d. i. 1,84pCt. vom Caseingewichte.

Derjenige der 3. Probe wog 0,043 g, d. i. 1,89pCt. vom Caseingewichte.

Derjenige der 4. Probe wog 0,051 g, d. i. 2,24pCt. vom Caseingewichte.

Die Verdauungsrückstände werden quantitativ auf Phosphor untersucht.

Der 1. liefert 0,0005 g  $Mg_2P_2O_7 = 0,00014$  g P, d. i. 0,2pCt. des Gewichts des Rückstand selbst und 0,78pCt. vom Caseinphosphor.

Der 2. liefert 0,0002 g  $Mg_2P_2O_7 = 0,000056$  g P, d. i. 0,13pCt. vom Gewichte des Rückstands selbst und 0,31pCt. vom P des Caseins.

Der 3. giebt 0,001 g  $Mg_2P_2O_7 = 0,00028$  g P, d. i. 2,32 pCt. des Rückstands selbst und 1,56 pCt. vom Caseinphosphor.

Der 4. liefert 0,0013 g  $Mg_2P_2O_7 = 0,00036$  g P, d. i. 2,55pCt. des Rückstands selbst und 2,06pCt. vom Caseinphosphor.



Die durch Magnesiamischung in den, von den Verdauungsrückständen abfiltrirten, Verdauungslösungen erzielten Niederschläge liefern beim Glühen:

	Mg <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	P	vom Caseinphosphor
Der 1.	0,0083 g	= 0,00232 g,	d. i. 12,91 pCt.
- 2.	0,0093 -	= 0,0026 - -	14,47 -
- 3.	0,0093 -	= 0,0026 - -	14,47 -
- 4.	0,0181 -	= 0,0033 - -	18,36 -

Folgende Tabelle stellt die Resultate dieser Versuchsreihe zusammen:

Nummer des Versuchs	I.	II.	III.	IV.
Menge des Fermentes . . . .	= 1	= 3	= 5	= 7
Der Verdauungsrückstand beträgt				
Procente des Caseins . . . .	3,29 pCt.	1,84 pCt.	1,89 pCt.	2,24 pCt.
Phosphorgehalt des Verdauungsrückstandes . . . . .	0,2 -	0,13 -	2,32 -	2,55 -
Die Menge des Phosphors in dem Verdauungsrückstand beträgt				
Procente des Phosphorgehalts des Caseins . . . . .	0,78 -	0,31 -	1,56 -	2,06 -
Der in der Verdauungslösung als Phosphorsäure vorhandene Phosphor beträgt von dem Phosphor des Caseins . . .	12,91 -	14,47 -	14,47 -	18,36 -

Aus einer Gegenüberstellung der beiden vorhergehenden Versuchsreihen scheint mir hervorzugehen, dass die Menge des als Phosphorsäure in der Verdauungsflüssigkeit vorhandenen Phosphors sowohl von der Fermentwirkung, als auch, und mehr noch, von der Dauer der Einwirkung der alkalischen Flüssigkeit auf die Verdauungsprodukte des Caseins abhängig ist; was übrigens nach der Constatirung der Thatsache, dass der durch Magnesiamischung nicht fällbare Theil des Phosphors sich durch Kochen mit Baryumcarbonat oder mit verdünnter Natronlauge als Phosphorsäure abspalten lässt, zu vermuthen war. Was den Verdauungsrückstand betrifft, so hat Sebelien gefunden, dass er im Durchschnitt 2,3pCt. vom Caseingewicht ausmacht und der darin enthaltene Phosphor 3,6pCt. vom Caseinphosphor. Sebelien wirft schon die Frage auf, ob der im Verdauungsrückstand enthaltene Phosphor überhaupt vom Casein stammt und nicht vielmehr von der zur Verdauung angewendeten Trypsinlösung und führt Versuche an, welche dieses wahrscheinlich machen,

indem nemlich mit steigender Quantität der Fermentlösung die Quantität des Phosphors in den Verdauungsrückstand nicht, wie man erwarten sollte, abnimmt, sondern zunimmt.

In meinen Versuchen ist nun die Quantität des Verdauungsrückstandes noch geringer — durchschnittlich 1,9 pCt. des angewendeten Caseins, sie nimmt ferner nicht zu mit der Menge des angewendeten Caseins, der Phosphorgehalt des Verdauungsrückstandes steigt mit der Menge des Ferments, endlich geben meine Fermentlösungen beim Ansäuern stets einen Niederschlag, welcher sich phosphorhaltig erweist. Alle diese Umstände sprechen sehr dafür, dass das Casein selbst vollständig verdaut wird, der phosphorhaltige Verdauungsrückstand von der Fermentlösung abhängt, wie auch Sebelien als wahrscheinlich annimmt.

Freilich können, bei weniger günstigen Verdauungsbedingungen, noch Reste von Casein unverändert bleiben: dies war höchst wahrscheinlich bei der ersten Probe meiner letzten Versuchsreihe, wegen der geringen Fermentmenge, der Fall und dies muss bei Sebelien auch sehr häufig vorgekommen sein, wie aus den von ihm erhaltenen Verdauungsrückständen hervorgeht, welche im Durchschnitt grösser waren als die meinigen, obwohl er sich fast immer einer Fermentlösung bedient hat, die beim Ansäuern, wie er sagt, keinen Niederschlag gab, was bei mir durchaus nie der Fall war.

Diese Frage, ob wirklich der Verdauungsrückstand bei günstigen Verdauungsbedingungen von der Fermentlösung herrühre, lässt sich durch einen directen Versuch nicht bestimmt entscheiden. Man könnte daran denken, diese Entscheidung in folgender Weise herbeizuführen.

Eine Fermentlösung wird in 2 gleiche Theile getheilt, die eine Hälfte mit Casein versetzt, die andere nicht, beide werden digerirt, dann der „Verdauungsrückstand“ bestimmt, denn dass bei der „Autodigestion“ der Fermentlösung Veränderungen in dieser vorgehen, ist unzweifelhaft.

Die von mir angewendeten Fermentlösungen schäumten stark beim Schütteln und gaben beim Ansäuern einen relativ reichlichen, flockigen Niederschlag: liess ich nun einen Theil einer solchen Fermentlösung ungefähr 3 Tage bei 40° C. stehen, so

schäumte sie beim Schütteln nicht mehr und gab beim Ansäuern einen unverhältnissmässig geringeren Niederschlag. Wir wissen aber nicht, ob und inwieweit die gleichzeitige Gegenwart von Casein modificirend auf diese Autodigestion der Fermentlösung einwirkt und können aus diesem Grunde die eben aufgeworfene Frage nicht durch directe Versuche bestimmt entscheiden.

Uebrigens muss ich, um nicht in denselben Fehler zu verfallen, wie Sebelien, bemerken, dass ich auf die Zahlen für den Phosphorgehalt des „Verdauungsrückstandes“ und in Folge dessen auch auf die Zahl, welche angiebt, wie viel Procent dieser Phosphor vom Phosphor des Caseins ausmacht, keinen Werth lege. Dazu sind die absoluten Grössen viel zu klein, namentlich in einzelnen Versuchen. Diese Zahlen sollen nur zeigen, dass der in diesem Rückstand steckende Phosphor fast gleich Null ist und dieses um so mehr, als sich in directen Versuchen gezeigt hat, dass auch die Fermentlösungen selbst nach der Digestion beim Ansäuern Niederschläge geben, in welchen sich durch Schmelzen mit Soda+Salpeter u. s. w. Phosphor nachweisen lässt. Dieses Resultat steht mit dem Schlussresultat von Sebelien a. a. O. S. 453 vollständig im Einklang.

Ueberblicken wir noch einmal das Ganze, so können wir die Ergebnisse unserer Untersuchungen etwa in folgender Weise formuliren:

Das Casein wird, bei günstigen Verdauungsbedingungen, vollständig verdaut. — Ungefähr 4pCt. des Gewichts des Caseins wird dabei als Tyrosin abgespaltet. — Das letzte Produkt der Zersetzung, d. h. das Caseinantipepton, besitzt die Zusammensetzung C 49,7, H 7,2, N 16,3, (S 1,3), O 25,2: sonst die Eigenschaften und Reactionen des Fibrinantipeptons. — Die Caseinalbumosen lassen sich in primäre und secundäre trennen und stimmen in ihren Reactionen mit denen des Fibrins überein.

Der Caseinphosphor findet sich in den Verdauungsprodukten immer in zwei Formen: als Phosphorsäure, mit Magnesiamischung fällbar und in einer anderen mit Magnesiamischung nicht fällbaren Form. Der als  $H_3PO_4$  abgespaltene Theil des Phosphors nimmt mit der Dauer der Verdauung und mit der Menge des Fermentes auf Kosten des anderen Theils zu: dieser, d. h. der

organische Theil, kann ferner ebenso wie der Phosphor der durch Pepsinsalzsäure gebildeten Casein-Verdaunungsprodukte durch Einwirkung verdünnter Alkalilösungen und durch Kochen mit  $\text{BaCO}_3$  in die anorganische Form überführt werden.

Zum Schluss drängt es mich, Herrn Prof. Salkowski für die Anregung zu dieser Arbeit und seine freundliche Unterstützung während derselben meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

## VI.

### Zur Frage der knorpeligen Callusbildung.

Von Dr. Georg Kapsammer,

Assistenten an der Lehrkanzel für allgemeine und experimentelle Pathologie in Wien.

(Mit 3 Textabbildungen.)

Gegenstand der Behandlung ist das Auftreten von Knorpel bei der Callusbildung.

Nahezu allgemein wird bei Heilung von Fracturen eine Knorpelbildung als regelmässiger Vorläufer der knöchernen Callusmasse angesehen. In diesem Sinne sprechen sich du Hamel<sup>1)</sup>, H. Maas<sup>2)</sup>, Flourens<sup>3) 4)</sup>, J. Hofmohl<sup>5)</sup>, ferner auch Dupuytren, Cruveilhier, Rindfleisch aus. Von anderer Seite wird die knorpelige Callusbildung wieder nur als Eigenthümlichkeit gewisser Säuger aufgefasst. So findet sich

<sup>1)</sup> M. du Hamel, Observation sur la réunion des fractures des os. Histoire de l'académie royale des sciences. 1741.

<sup>2)</sup> H. Maas, Ueber das Wachsthum und die Regeneration der Röhrenknochen mit besonderer Berücksichtigung der Callusbildung. Archiv für klin. Chir. Bd. XX. 1849.

<sup>3)</sup> P. Flourens, Théorie expérimentale de la formation des os. Paris, Baillière, 1847.

<sup>4)</sup> P. Flourens, Nouvelles expériences sur la formation du cal. Comptes rendus de l'académie des sciences. 1860.

<sup>5)</sup> J. Hofmohl, Ueber Callusbildung. Med. Jahrbücher. 1874.