

# Studien zur Prüfung von Pepsin, Pankreatin und getrockneter Schilddrüse

---

Von der  
Eidgenössischen Technischen Hochschule  
in Zürich  
zur Erlangung der  
Würde eines Doktors der Naturwissenschaften

genehmigte  
Promotionsarbeit  
vorgelegt von  
**ANTON KÄELIN**, Apotheker  
aus **Einsiedeln**

Referent: Herr Prof. Dr. R. Eder  
Korreferent: Herr Prof. Dr. E. Winterstein

Nr. 653.



ZÜRICH 1931  
Diss.-Druckerei A.-G. Gebr. Leemann & Co.  
Stockerstr. 64.

Leer - Vide - Empty

MEINEN LIEBEN ELTERN  
IN DANKBARKEIT GEWIDMET.

Die vorliegende Arbeit wurde im pharmazeutischen Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule ausgeführt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer

Herrn Prof. Dr. R. EDER

für die mannigfaltigen Anregungen und das rege Interesse an dieser Arbeit verbindlichst zu danken.

Ebenso bin ich Herrn Prof. Dr. Ackerknecht und Herrn P. D. Dr. Andres am veterinär-anatomischen Institut der Universität Zürich und Herrn Prof. Dr. Küpfer am Institut für spezielle Zoologie an der Eidgenössischen Technischen Hochschule, für die bereitwillig erteilten Auskünfte zu Dank verpflichtet.

# Inhaltsübersicht.

	Seite
Abkürzungen . . . . .	7
Einleitung . . . . .	9

## I. Pepsin.

### Allgemeiner Teil.

A. Allgemeines über die Wirksamkeit des Pepsins bezw. der Proteasen und deren Messung . . . . .	10
B. Übersicht über die wichtigsten Wertbestimmungsmethoden . . . . .	14
I. Methoden, bei denen das Eiweiß nicht vollständig verdaut bezw. in Lösung gebracht, sondern die Verdauung in einem gewissen Punkt unterbrochen wird . . . . .	14
1. Physikalische Methoden . . . . .	14
2. Chemische Methoden . . . . .	15
a) Stickstoffbestimmung des verdauten oder unverdauten Anteils . . . . .	15
b) Gravimetrische Methoden . . . . .	16
c) Titrimetrische Methoden . . . . .	16
II. Methoden, bei denen das Eiweiß durch Pepsin praktisch vollständig verdaut bezw. in Lösung gebracht wird . . . . .	17
1. Nachweis der Abwesenheit von Unverdaulichem in der Lösung mit Fällungsmitteln oder mit Hilfe eines Farbstoffes . . . . .	17
2. Beobachtung der eingetretenen Aufhellung einer Eiweißsuspension bezw. Auflösung des Eiweißes . . . . .	17
3. Labwirkung . . . . .	19
4. Zeitmessung . . . . .	19
C. Literatur und Kritik der offiziellen Methoden . . . . .	20
D. Allgemeines über die in Betracht kommenden Substrate . . . . .	22

### Spezieller Teil.

A. Auswahl der zu prüfenden Methoden und allgemeine Faktoren . . . . .	27
Wasserstoffionenkonzentration . . . . .	27
Neutralsalze . . . . .	29
Temperatur . . . . .	29
Sistierung der Verdauung . . . . .	29
Enzym- und Substratlösungen . . . . .	29
B. Die U. S. A. X-Methode . . . . .	30
C. Versuche mit Lamellen-Eiweiß . . . . .	37
D. Die Groß'sche Methode . . . . .	42
E. Titrimetrische Methoden . . . . .	49
F. Vor- und Nachteile der behandelten Methoden mit Rücksicht auf eine Verwendung als Arzneibuch-Methoden . . . . .	63
G. Befunde bei weiteren chemischen und physikalischen Prüfungen der Pepsinpräparate . . . . .	64
Zusammenfassung . . . . .	70

<b>II. Pankreatin.</b>		Seite
A. Allgemeines . . . . .		71
B. Wertbestimmungen . . . . .		75
I. Allgemeines . . . . .		75
II. Lipasebestimmung . . . . .		76
III. Amylasebestimmung . . . . .		82
IV. Trypsinbestimmung . . . . .		96
V. Befunde über Aussehen, Geruch, Löslichkeit, Feuchtigkeitsgehalt, Fettgehalt und Aschegehalt . . . . .		100
Anhang: Prüfung der zu den Verdauungsversuchen verwendeten Casein- präparate . . . . .		101
Zusammenfassung . . . . .		103

### III. Getrocknete Schilddrüse.

(Thyreoidea siccata)

A. Einleitung . . . . .		105
B. Beschaffenheit des Drüsenmaterials und Herstellung des Pulvers . . . . .		106
C. Prüfungsmethoden . . . . .		109
I. Allgemeines . . . . .		109
II. Sinnenprüfung . . . . .		110
III. Mikroskopische Untersuchung . . . . .		110
IV. Chemische Untersuchung . . . . .		119
1. Geschichtlicher Überblick . . . . .		119
2. Die Bedeutung des Gesamtjodgehaltes . . . . .		120
3. Die Bedeutung des Thyroxingehaltes . . . . .		123
4. Die Thyroxinbestimmung und Vergleich der Jodgehaltsbestim- mung nach Kendall mit derjenigen des Deutschen Arzneibuches, 6. Ausgabe . . . . .		126
5. Gehaltsnormierungen und Beurteilungskriterien . . . . .		132
Zusammenfassung . . . . .		136

## Häufig wiederkehrende Abkürzungen.

---

Helv. IV	=	Pharmacopoea Helvetica ed. IV. 1907.
Gall.	=	Codex medicamentarius gallicus. Pharmacopée française 1908.
Gall. (Suppl. 1920)	=	Supplément au Codex medicamentarius gallicus 1920.
Gall. (Nouv. Suppl. 1926)	=	Nouveau Supplément au Codex medicamentarius gallicus 1926.
D. A. B. 5	=	Deutsches Arzneibuch, 5. Ausgabe 1910.
D. A. B. 6	=	Deutsches Arzneibuch, 6. Ausgabe 1926.
U. S. A. IX	=	Pharmacopoeia of the United States IX, 1916.
U. S. A. X	=	Pharmacopoeia of the United States X. 1926.
Brit.	=	The British Pharmacopoeia, 1914.
Nederl. IV	=	Nederlandsche Pharmacopée 4 <sup>de</sup> uitgave 1905.
Nederl. V	=	Nederlandsche Pharmacopée 5 <sup>de</sup> uitgave 1926.
Belg.	=	Pharmacopoea Belgica ed. III. 1906.
Hung.	=	Pharmacopoea Hungarica 1909.
Svenska	=	Pharmacopoea Svecica ed. X. 1925.
Ital.	=	Farmacopea Ufficiale del Regno d'Italia ed. V. 1929.
Ap.	=	Apotheker-Zeitung, herausgeg. vom Deutschen Apotheker-Verein Berlin.
Bio. Z.	=	Biochemische Zeitschrift.
H.	=	Hoppe Seyler: Zeitschrift für physiologische Chemie.
J. phrm.	=	Journal de pharmacie et de chimie, Paris.
P. C. H.	=	Pharmazeutische Zentralhalle.
Phrm. W.	=	Pharmaceutisch Weekblad voor Neederland.
Ul.	=	Ullmann: Enzyklopädie der technischen Chemie, Ausgabe 1920.
Z. N. G.	=	Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel Berlin.

---

Leer - Vide - Empty

## Einleitung.

Die Ausarbeitung einer neuen Schweizerischen Pharmakopoe gab Veranlassung, das Kapitel Pepsin einer gründlichen Revision zu unterziehen, sowie die neu aufzunehmenden Abschnitte „Pankreatin“ und „getrocknete Schilddrüse“ entsprechend dem derzeitigen Stand der wissenschaftlichen Erkenntnis zu gestalten. Auf Veranlassung von Herrn Prof. Dr. R. Eder, Vorstand des Pharmazeutischen Institutes der Eidgenössischen Technischen Hochschule, habe ich es unternommen, Untersuchungen darüber anzustellen, welches gegenwärtig für Pharmakopoezwecke die geeignetsten Methoden zur Prüfung von Pepsin, Pankreatin und getrockneter Schilddrüse seien, und welche Normen für diese Produkte zur Zeit aufgestellt werden können.

---

# I. Pepsin.

## Allgemeiner Teil.

### A. Allgemeines über die Wirksamkeit des Pepsins bezw. der Proteasen und deren Messung.

Pepsin ist eines der ersten Enzympräparate, welches im Großen hergestellt wurde. Der Technik gelingt es heute, verhältnismäßig sehr wirksame Produkte in den Handel zu bringen. Gewonnen wird es vor allem aus der Schleimhaut von Schweinemägen. Die fabrikatorischen Einzelheiten sind jedoch nicht allgemein bekannt (vgl. Pankreatin, S. 72). Man kennt daher auch nicht alle Fremdstoffe, durch welche ein Pepsin von der Darstellung her verunreinigt sein kann. Weil wir aber von einem zu arzneilichen Zwecken verwendeten Pepsin hohe Wirksamkeit fordern müssen, scheidet größere Quantitäten von mehr oder weniger inerten Beimengungen aus. Als solche kommen hauptsächlich Milchzucker, Rohrzucker, Stärke u. s. w. in Betracht, welche nach *Legend*<sup>1)</sup> Mikroorganismen enthalten und hygroskopisch sein können.

In vielen Arzneibüchern waren die Forderungen die Aktivität betreffend, niedrig<sup>2)</sup> und ein Verdünnen mit Milchzucker gestattet<sup>3)</sup>. Dieser wurde nach *Schulze*<sup>4)</sup> von *Derlin*<sup>5)</sup> und *Scheffer*<sup>6)</sup> seiner Stabilität und Nichthygroskopizität wegen empfohlen. Größere Haltbarkeit wird jedoch dadurch kaum erreicht. Dies hängt vielmehr mit den Eigenschaften der unmittelbaren Begleitstoffe zusammen. Für die Praxis ergab sich der Nachteil geringerer Wasserlöslichkeit der Präparate (*Schulze*<sup>7)</sup>).

Auch die hochkonzentrierten Handelspepsine sind, um mit *Oppenheimer*<sup>8)</sup> zu sprechen, Präparate, die alles mögliche und

<sup>1)</sup> J. phrm. 11, 58 (1930).

<sup>2)</sup> z. B. Gall. Ph. H. IV etc.

<sup>3)</sup> D. A. B. 6; U. S. A. X; Nederl. V; Svenska.

<sup>4)</sup> Ap. 42, 256 (1927).

<sup>5)</sup> Ap. 28, 547 (1913).

<sup>6)</sup> J. phrm. (1879).

<sup>7)</sup> Ap. 42, 256 (1927).

<sup>8)</sup> *Oppenheimer: Fermente und ihre Wirkungen*, Bd. 1, S. 43.

vor allem Eiweißstoffe, sowie Vorstufen und unwirksame Derivate des Fermentes (Willstätter) enthalten, kolloide Gemische, an denen kleine Mengen des wirklichen Fermentes adsorbiert sind.“

Eine weitgehende Reinigung gelang besonders der Willstätterschen Schule bei einer Anzahl von Enzymen. Deren stoffliche Einheitlichkeit mit Sicherheit festzustellen, war bisher nicht möglich.

Eine Prüfung von Enzympräparaten kann sich nicht auf die Isolierung der aktiven Stoffe stützen, sondern ist in erster Linie auf die für das Enzym spezifische Wirksamkeit angewiesen. Die Messung derselben ist bei den eiweißspaltenden Enzymen (= Proteasen) besonders schwierig. „Man begnügt sich also notgedrungen damit, zu bestimmten Zwecken immer wieder dieselbe Methode anzuwenden, unter Herstellung möglichst gleicher Bedingungen und hofft so, zu Vergleichszahlen zu gelangen. Daß auch nicht einmal das von den verschiedenen Methoden geleistet wird, zeigen die endlosen Kontroversen, die über den Wert oder besser Unwert der Verfahren die Literatur vermehren (Oppenheimer).“

Einzelne Spaltlinge lassen sich nicht leicht fassen und bestimmen und auch das unangegriffene Substrat ist nicht mit Sicherheit von den zunächst entstehenden Abbauprodukten abzutrennen. Ein wesentlicher Teil der Wirkung der Proteasen wird in der Spaltung von —NH—CO-Gruppen erblickt und die Desaggregation der Eiweißkomplexe immer mehr als Funktion dieser Spaltung aufgefaßt (vgl. dagegen Mislowitzer<sup>10</sup>). Der Zusammenhang der Veränderung der physikalischen Eigenschaften und der chemischen Vorgänge bei der Verdauung ist speziell im Falle des Pepsins äußerst unübersichtlich.

Obwohl man einzelne Aminosäuren und einfache Peptide nach der Pepsineinwirkung auf Eiweiß nicht nachweisen konnte, also nur Polypeptide entstehen, mußte man die früher so verbreitete Annahme eines stufenmäßigen Abbaues über Albumosen und eine Reihe streng unterschiedener Peptone wesentlich modifizieren (vgl. S. 24). Mislowitzer<sup>11</sup>) fand durch Messung der Amino- und Carboxyl-Gruppen im kolloiden und nichtkolloiden Anteil der unverdauten und verdauten Substrate, daß im wesentlichen von einem größeren Eiweißaggregat niedrige Spaltprodukte unter Lösung von Peptidbindungen frei werden.

Eine Gesetzmäßigkeit drückt sich aber nicht nur in der Größe der entstehenden Aggregate und Molekeln aus, sondern auch in der Spezifität der gespaltenen Peptidbindungen<sup>12</sup>). Das Studium derselben ist in der Neuzeit für die Eiweißforschung von Bedeutung geworden; es wird uns wahrscheinlich nicht nur über die Bindungsart, sondern auch über die Bindungsverhältnisse aufklären. Werden

<sup>9</sup>) Oppenheimer: Fermente und ihre Wirkungen, Bd. 2, S. 847.

<sup>10</sup>) Bio. Z. 203, 323—333 (1928).

<sup>11</sup>) Bio. Z. 203, 323 (1928).

<sup>12</sup>) Vgl. E. Waldschmidt-Leitz, H. 156, 105 (1926).

nämlich nur — NH — CO - Gruppen aufgespalten, so nimmt die Zahl der Amino- und der Carboxyl-Gruppen gleichmäßig zu. Dieses Problem steht gegenwärtig in Diskussion (E. Waldschmidt-Leitz und E. Simons<sup>13</sup>), H. Steudel, J. Ellinghaus und A. Gottschalk<sup>14</sup>), und es bestehen Anzeichen dafür, daß bei fortgeschrittener Verdauung saure Gruppen vorwiegen.

Wie weit andere normalerweise in Eiweiß vorkommende Bestandteile, z. B. P in Casein, bei solchen Säuremessungen Anteil nehmen, ist noch nicht zu sagen. Im allgemeinen wird man enzymatische Messungen nur in den ersten Stadien verfolgen, sodaß die Bestimmung der Amino-Gruppen an innerem Wert für die gebräuchlichen Substrate derjenigen der Carboxyl-Gruppen gleichgestellt werden kann.

Bis anhin bediente man sich aber fast ausschließlich anderer Methoden zur Pepsinmessung und es erscheinen immer wieder Änderungsvorschläge und Neuerungen.

Fast jede der Methoden und deren Modifikationen enthält gegenüber einer anderen einen abgeänderten Faktor, sei es Temperatur, Wasserstoffionenkonzentration, Substrat, Konzentrationsverhältnisse, Zeit u. s. w., sodaß zwangsläufig ebensoviele Maß-Systeme existieren. Wir können nicht durch Umrechnung einen bestimmten, nach einer vorliegenden Methode ermittelten Wert in anderen Einheiten ausdrücken, bevor man empirisch die Relationen aufgefunden hat. Diese sind nach Legend<sup>15</sup>) für einige Arzneibuchmethoden z. B. in amerikanischen Einheiten (U. S. A. X) ausgedrückt:

Gall.	1000	Brit.	1700
Belg.	1400	U. S. A. X	3000

Die Zahlen geben an, wieviel mal mehr an Gewicht das betreffende Enzympräparat unter bestimmten Bedingungen an koaguliertem Eiweiß aufzulösen vermag. Angaben solcher Zahlen ohne die entsprechenden Methoden sind wertlos. Ebenso darf nicht etwa die Zeit gemessen werden, um die Wertigkeit eines Pepsins zu bestimmen. Bei wenigen Methoden ist man berechtigt anzunehmen, daß ein halb so starkes Präparat die doppelte Zeit zur Erreichung eines bestimmten Effektes beanspruche. Will man trotzdem ein solches Präparat eingehender prüfen, so sucht man durch Ausprobieren diejenige Menge, welche gerade noch den Forderungen zu genügen im Stande ist und dividiert die von der Methode vorgeschriebene Gewichtsmenge durch die gefundene. Man erhält einen echten Bruch, wenn das Präparat nicht den Forderungen entspricht. Zahlen, welche höher als 1 sind, kennzeichnen ein stärkeres Präparat, z. B. 2 U. S. A. X bedeutet, daß die halbe Gewichtsmenge

<sup>13</sup>) H. 156, 114 (1926).

<sup>14</sup>) H. 154, 21 u. 188 (1926).

<sup>15</sup>) J. phrm. 10, 385 (1929).

des Präparates nach der U. S. A. X geprüft, den Anforderungen derselben in bezug auf die Wirksamkeit genügt.

Wohl sind viele Arbeiten über die Kinetik der Pepsinwirkung erschienen. Man war bestrebt, Formeln aufzustellen, welche einen Einblick in den Reaktionsverlauf geben sollten. Diese sind aber rein empirisch aus Kurven abgeleitet worden, welche das Resultat von mehreren Teilprozessen darstellen. Sie vermitteln, was für vergleichende Messungen eine große Zeitersparnis bedeutet, genau wie die entsprechenden Kurven, den rein rechnerischen Zusammenhang zweier variabler innerhalb einer festgelegten Methode. Oft gilt in gewissen Bereichen Proportionalität zwischen Enzymmenge und Zeit bzw. Umsatz, oft aber sind die Relationen komplizierter. Die Methoden ergeben nur relative Resultate, wobei auch diese nach den letzten Ergebnissen der Enzymchemie durch das Vorkommen von aktivierenden und hemmenden Stoffen einigermaßen fragwürdig werden (vgl. Pankreatin, S. 77: van Arkel<sup>16</sup>); Nierenstein und Schiff<sup>17</sup>).

Solange ein Beobachter mit dem gleichen Substrat (d. h. vom gleichen Vorrat) verschieden starke Enzyme mißt, erhält er mit vielen Methoden recht gute Resultate. Eine Arzneibuchmethode muß jedoch mit verschiedenen Beobachtern und mit einem Substrat verschiedener Herkunft rechnen, d. h. ein und dasselbe Pepsin sollte mit dem Eiklar von verschiedenen Eiern oder mit Caseinpräparaten aus verschiedenen Fabriken in den Händen verschiedener Beobachter das gleiche Resultat geben.

Die Abbauprodukte bedingen oft ein frühzeitiges Abklingen der Reaktion; die Änderung der Umsatzgröße, gemessen an der Zunahme der Spaltprodukte oder an der Abnahme des ursprünglichen Eiweißes, wird pro Zeiteinheit kleiner. Die Endpunktbestimmungen sind in diesem Gebiete bei vielen Methoden unscharf. Dem Wesen nach anders (vgl. S. 22), aber ebenso unscharf ist der Endpunkt bei der Auflösung von koaguliertem, zerkleinertem Eiklar. Hier wirken größere und kleinere, nicht in Lösung gehende bzw. nicht verdaubare Partikel der Eihäute für die Beurteilung ungünstig. So ist die Beurteilung des Endpunktes weitgehend Übungssache (Bümming<sup>18</sup>) und besonders bei der Beurteilung von Trübungen ist eine gewisse Willkür nicht ausgeschlossen, sofern nicht mit Vergleichslösungen und Nephelometern gearbeitet wird.

Gegen die Verwendung von festen Substraten wurden öfters<sup>19</sup>) Bedenken erhoben, besonders dort, wo es sich um theoretische Probleme handelt. Wie leicht einzusehen ist, wird die Verdauungsgeschwindigkeit vom Zerkleinerungsgrade bzw. der relativen Ober-

<sup>16</sup>) Phrm. W. 66, 858 (1929).

<sup>17</sup>) Arch. f. Verdauungskrankheiten, 8, 559 (1902) zit. nach Ege. Bio. Z. 145, 66 (1924).

<sup>18</sup>) Ap. 44, 964 (1929).

<sup>19</sup>) Z. B. Willstädter, Graßmann und Ambros. H. 152, 164 (1926).

fläche und deren Änderung während der Verdauung, von den Diffusionsverhältnissen (Absitzen und Suspension der Teilchen etc.) weitgehend abhängig sein. Je feiner die Verteilung des Substrates, desto geringer werden diese Fehler. Am besten eignen sich mikroheterogene und molekularisperse Systeme.

## B. Übersicht über die wichtigsten Wertbestimmungsmethoden des Pepsins.

Die wichtigsten Wertbestimmungsmethoden des Pepsins \*) kann man in folgende Gruppen einteilen:

I. Methoden, bei denen das Eiweiß nicht vollständig verdaut bzw. in Lösung gebracht, sondern die Verdauung in einem gewissen Punkte unterbrochen wird.

Die Feststellung des Wirkungsgrades des Pepsins geschieht in den verschiedenen Methoden auf verschiedenen Wegen, nämlich

### 1. auf physikalischem Wege durch

Konduktometrie<sup>20)</sup>: Als Maß dient die Zunahme der elektrischen Leitfähigkeit des Hydrolysegemisches während der Verdauung.

Viskosimetrie<sup>21)</sup>: Die Viskosität nimmt durch Proteasenwirkung ab.

Kolorimetrie<sup>22)23)</sup>: Mit Karmin oder anderen Farbstoffen gefärbtes Fibrin gibt die Farbstoffe durch den Auflösungsprozeß an die umgebende Flüssigkeit ab, deren Farbtiefe dann gegen Standard-Farblösungen verglichen werden kann.

Nephelometrie<sup>24)</sup>: In der Verdauungsflüssigkeit wird nach verschiedenen Zeiten das noch vorhandene Eiweiß mit geeigneten Fällungsmitteln niedergeschlagen; die entstandenen stabilen Trübungen werden miteinander oder gegen eine Standardtrübung verglichen.

\*) Es war natürlich nicht möglich, im Rahmen dieser Arbeit alle Methoden und ihre ungeheuer große Variationsmöglichkeit zu berücksichtigen; vgl. Oppenheimer: *Ferm. u. ihre Wirkungen*, Bd. 2, S. 860.

<sup>20)</sup> Northrop, *J. of Gen. Physiol.* 4, 227 (1921).

<sup>21)</sup> Spriggs, *H.* 35, 465 (1902). Vgl. ebenso Palitzsch und Walbum, *Bio. Z.* 47, 1 (1912).

<sup>22)</sup> Grützner, *Pflüg. Arch.* 8, 452 (1874).

<sup>23)</sup> W. Waldschmidt, *Pflüg. Arch.* 143, 189 (1911).

<sup>24)</sup> Rona u. Kleinmann: *Bio. Z.* 140, 478 (1923); 150, 444 (1924); 155, 34 (1925); 159, 146 (1925); 169, 323 (1926).

**Polarimetrie**<sup>25)</sup>: Nach Verdauung eines festen Substrates oder Ausfällen des gelösten, unangegriffenen Eiweißes, wird die durch die Abbauprodukte hervorgerufene optische Drehung im Filtrate gemessen. Ebenso kann auch durch

**Refraktometrie**<sup>26)</sup>, Messung des Lichtbrechungsvermögens, ein empirischer Zusammenhang zwischen Gehalt an Abbauprodukten und Pepsinstärke aufgesucht werden. Unter dem Namen

**Volumetrie** können wir eine in sich abgeschlossene Gruppe von Methoden zusammenfassen, welche im allgemeinen nicht auf besondere Apparaturen angewiesen sind. Sie kommen der Esbachschen Eiweißbestimmung nahe. Die mit einem Eiweißfällungsmittel (Trichloressigsäure, Kaliumferrocyanid-Essigsäure, Esbach'sches Reagens u. s. w.) behandelten Substratlösungen werden in graduierten Röhren stehen gelassen oder zentrifugiert und die Niederschläge vor und nach der Verdauung verglichen (vgl. U. S. A. X-Methode).

## 2. auf chemischem Wege.

### a) Stickstoffbestimmung im verdauten oder unverdauten Anteil.

Zahlreiche Vorschriften bedienen sich der Bestimmung des Stickstoffs im unverdauten festen Anteil oder im verdauten flüssigen Filtrat, eventuell nach vorangegangener Fällung mit Sulfosalicylsäure (G y e m a n t<sup>27)</sup>), Stannochlorid oder Gerbsäure (S ö r e n s e n<sup>28)</sup>) etc. Während v a n U r k<sup>29)</sup> in diesen Verfahren die Methode par excellence für pharmazeutische Zwecke sieht, sind wir der Meinung, daß sie hinsichtlich Einfachheit und Raschheit der Ausführung noch zu wünschen übrig läßt. Die gleichen Nachteile zeigen sich, wenn das Filtrat eingedampft, der Verdampfungsrückstand gewogen, und wenn nötig (je nach Art der Fällung), der Verbrennungsrückstand davon abgezogen wird<sup>30)</sup>. Beim Pepsin im allgemeinen noch nicht angewandt, wohl aber beim Pankreatin, ist die Methode von v a n S l y k e<sup>31)</sup>, bei welcher die Aminogruppe mit salpetriger Säure umgesetzt und der frei gewordene, gasförmige Stickstoff gemessen wird.

<sup>25)</sup> Abderhalden u. Steinbeck, H. 68, 293 (1910). Abderhalden, H. 81, 458 (1912).

<sup>26)</sup> Rostock, Münch. med. Wo. 71, 1311 (1924). Reisz u. Schorer, zit. nach Phrm. W. 60, 268 (1923). Reisz, Schweiz. med. Wo. [13] 1923 zit. nach D. med. Wo. 729 (1923). Löwe: Opt. Messungen d. Chemikers u. d. Mediziners Steinkopff, 1928.

<sup>27)</sup> Bio. Z. 105, 155 (1920).

<sup>28)</sup> Bio. Z. 21, 288 (1909).

<sup>29)</sup> Diss. Leiden, 1924 u. zwar S. 14.

<sup>30)</sup> Kremel Pharmaz. Post, 27, 1885; vgl. auch Martz, J. phrm. 7, 539 (1898).

<sup>31)</sup> Hdb. d. biol. Arbeitsmeth. Abt. I, Teil 7, S. 263.

b) Gravimetrische Methoden: Zu diesen gehört die Methode von Willstätter<sup>32)</sup>. Sehr fein verteiltes Fibrin setzt man der Pepsinwirkung aus, unterbricht die Verdauung durch Abkühlen, filtriert, trocknet und wiegt den unverdauten Anteil. Thomas und Weber<sup>33)</sup> fällten das unverdaute Casein mit Natriumsulfat und brachten es zur Wägung. In ähnlicher Weise benützte man die Fähigkeit mancher Eiweißkörper, in der Hitze zu koagulieren, z. B. von Hühnereiweiß; Frey<sup>34)</sup>, Krüger<sup>35)</sup>, Heyl und Mitarbeiter<sup>36)</sup>.

c) Titrimetrische Methoden: Als titrimetrische Bestimmung ist beim Pepsin vor allem die Volhard'sche Methode<sup>37)</sup> bedeutend geworden. Das unverdaute Casein wird nach Thomas und Weber, l. c., mit Natriumsulfat gefällt, wobei ein Teil der Mineralsäure an das Casein gebunden bleibt, während ein, den nicht gefällten Abbauprodukten entsprechender Teil in das Filtrat geht und eine Aciditätszunahme gegenüber der gleich behandelten, unverdauten Caseinlösung erzeugt, welche in üblicher Weise mit Lauge titriert werden kann.

Die Titration in Alkohol nach Willstätter und Mitarbeitern<sup>38)</sup> und die Titration nach Formolzusatz nach Sörensen<sup>39)</sup>, beruht auf einer Ausschaltung der basisch wirkenden Aminogruppen, wodurch die Carboxylgruppe alkalimetrisch gemessen werden kann.

Wie schon erwähnt, tritt bei der Proteolyse eine Spaltung von Peptidbindungen auf, die besonders bei der Trypsin-Kinase und bei den Peptidasen auf diese Art gut verfolgt werden kann.

Ege<sup>40)</sup> nützt die Erscheinung aus, daß die Menge einer Kochsalzlösung, welche zur Erreichung einer bestimmten Trübung in sauren Edestinlösungen notwendig ist, von der Konzentration des Eiweißes, nicht aber von derjenigen der Abbauprodukte abhängt. Er unterbricht die Verdauung durch Einstellen der Reagensgläser mit dem Hydrolysendgemisch in kochendes Wasser, setzt nach dem Abkühlen Gummi arabicum-Lösung als Schutzkolloid hinzu und titriert mit 20 proz. Natriumchloridlösung. Ist eine bestimmte Trübung nach einer gewissen Anzahl Kubikzentimeter Natriumchloridlösung nicht erreicht, so wird mit Ammonsulfatlösung weiter titriert.

<sup>32)</sup> H. 152, 164 (1926).

<sup>33)</sup> Zentralbl. f. Stoffw.- u. Verdauungskrankh. 2, 365 (1901).

<sup>34)</sup> Chem. Ztg. 37, 1198 (1913); Z. f. analyt. Chem. 56, 364 (1917).

<sup>35)</sup> Z. f. Biolog. 41, 378 (1901).

<sup>36)</sup> Am. J. of Pharm. 86, 542 (1914) (für Papayotin).

<sup>37)</sup> Münch. med. Wo. 2129 (1903); 403 (1907); Löhlein: Hofm. Beiträge 7, 120 (1905); Küttner: H. 52, 63 (1907).

<sup>38)</sup> H. 161, 191 (1926).

<sup>39)</sup> Bio. Z. 7, 45 (1908).

<sup>40)</sup> H. 127, 125 (1923).

II. Methoden, bei denen das Eiweiß durch Pepsin (bezw. Proteasen) praktisch vollständig verdaut bzw. in Lösung gebracht wird.

1. Nachweis der Abwesenheit von Unverdaulichem in der Lösung mit Fällungsmitteln oder mit Hilfe eines Farbstoffs: Bestimmung der kleinsten Pepsinmenge, welche gerade noch im Stande ist, ein dargebotenes Quantum Substrat bis zu einem bestimmten Grade abzubauen, wurden mit sehr verschiedenen Eiweißkörpern angestellt.

Die wichtigste von diesen Methoden ist von Groß<sup>41)</sup> angegeben worden. Eine 1 proz. salzsaure Caseinlösung wird zu je 10 ccm in Reagensgläser verteilt und mit verschiedenen Mengen Pepsinlösung versetzt. Nach der Versuchszeit gibt man zur Fällung des unverdaulichen Caseins Natriumacetatlösung hinzu und stellt so das Röhrchen fest, in dem eben keine Fällung eintritt.

Fuld und Levison<sup>42)</sup> fällten eine der Caseinlösung von Groß, l. c., analog hergestellte Edestinlösung mit Kochsalzlösung.

Gläßner<sup>43)</sup> griff zu Globin und fällte dieses mit Ammoniak-Ammonchloridlösung.

Die Erscheinung, daß einige Farbstoffe in Lösung bei Gegenwart von Proteinen durch Säurezusatz nicht verändert werden, wohl aber deren Lösung ohne Protein, findet ihre Anwendung in der Methode von Nierenstein<sup>44)</sup>. Das Congorot, welches hierzu diente<sup>45)</sup>, wurde von Rosenthal, Sanford und Douglas<sup>46)</sup> durch Rose bengale B (Tetrachlortetrajodofluoreszin) ersetzt. Als Substrat diente eine Casein- oder Hühnereiweiß-Lösung.

2. Beobachtung der eintretenden Aufhellung einer Eiweißsuspension bzw. Auflösung des Eiweißes: Vor der Pepsinzugabe wird eine Trübung hergestellt und dasjenige Röhrchen bestimmt, in dem nach festgelegter Zeit gerade noch Aufhellung eingetreten ist.

Hata<sup>47)</sup> verdünnt Hühnereiweiß fünffach, erwärmt auf 60 °; es tritt dann durch Pepsin Aufhellung ein.

Eine Eiweißsuspension erzielt man mit Rizin in verdünnter Kochsalzlösung nach Jacoby<sup>48)</sup> oder mit Sulfosalicylsäure in Menschen- oder Hammel-Serum nach Michaelis und Rothstein<sup>49)</sup>,

<sup>41)</sup> Berl. klin. Wo. 45, 643 (1908).

<sup>42)</sup> Bio. Z. 6, 473 (1907).

<sup>43)</sup> Bio. Z. 127, 313 (1922).

<sup>44)</sup> Pflüg. Arch. 72, 51 (1898).

<sup>45)</sup> Vergl. auch Kawahara: Pflüg. Arch. 206, 360 (1924); Kawahara und Peczenik: W. med. Wo. [4] (1926); Kawahara und Peczenik: Pflüg. Arch. 206, 265 (1924).

<sup>46)</sup> J. of Pharmacol. and Exp. Therap. 29, 521 (1926); vgl. auch Beer und Peczenik: Fermentforschung, 10, 88.

<sup>47)</sup> Bio. Z. 23, 179 (1910).

<sup>48)</sup> Bio. Z. 1, 53 (1906).

<sup>49)</sup> Bio. Z. 105, 60 (1920).

ferner durch Kochsalz in einer sauren Edestinlösung nach Brewster<sup>50)</sup>.

In diese Kategorie gehören auch die gebräuchlichen Arzneibuchmethoden. Zum Unterschied von den oben genannten Verfahren gehen diese Methoden im allgemeinen nicht darauf aus, den Wirkungswert des Pepsins genauer zu bestimmen, sondern begnügen sich damit, festzustellen, ob eine bestimmte minimale Wirksamkeit vorhanden ist.

Kurze Zusammenstellung der wichtigsten officinellen Methoden.

No.	I Arzneibuch	II Substrat	III Kochdauer	IV Sieb	V Verdauung
1	Helv. IV	Eiklar	5 Min.	15 M/cm	1 bis höchst. 2 Std.
2	Brit.	"	15 "	12 M/cm	6 Std.
3	Austr. VIII	"	—	fein trituriert	4 "
4	Hung.	"	5 Min.	—	—
5	Svenska	"	10 "	No. 10	2 Std.
6	D. A. B. 6	"	10 "	f. grobe Pulver	3 "
7	Ital.	"	—	—	ca. 2 "
8	Nederl. V	"	5 Min.	20 M/cm	2 1/2 "
9	U. S. A. X	"	15 "	16 M/cm	2 1/2 "
10	Nederl. IV	"	15 "	—	1 "
11	Gall.	Fibrin	—	—	6 "

No.	VI Schütteln	VII Temperatur	VIII Normierung des Endpunktes
1	öfters	40°	Aufl. bis auf einige gelblichweiße Flocken
2	alle 15 Min.	40—41°	Auflösung bis schwach opaleszent
3	öfters	40°	wenig opaleszente Lösung
4	alle 10 Min.	40°	—
5	—	40—45°	weißl. (opaleszente) Lösung
6	alle 15 Min.	45°	Aufl. bis auf einige weißlichgelbe Häutchen
7	—	38—40°	nur mit wenigen gelblichen Flöckchen; nach 10 Std. darf das Filtrat in der Hitze nicht koagulieren
8	alle 15 Min.	45°	Auflösung des Eiweißes
9	alle 15 Min.	52°	Aufl. bis 1 ccm nach 1/2-stündigem Absetzen
10	—	45°	Mischg. muß nach 1 Std. heller geworden sein
11	häufig	50°	10 ccm Filtrat mit 20 Tr. HNO <sub>3</sub> bei Zimmer-temp. → keine Trübung

Im Prinzip wird bei den oben zusammengestellten Methoden (außer Gall. und Nederl. IV) wie folgt verfahren: Das Hühnerei wird gekocht (Kolonne III); das koagulierte Eiweiß durch ein Sieb (Kolonne IV) geschlagen und eine bestimmte Gewichtsmenge davon mit verdünnter Salzsäure angerührt, auf die Versuchstemperatur (VII) gebracht, das Pepsin bzw. eine Pepsinlösung zugesetzt und unter öfterem Umschütteln (VI) während vorgeschriebener

<sup>50)</sup> J. of. Biol. Chem. (1921).

Zeit (V) bei der gleichen Temperatur gehalten. Nach Ablauf der Versuchsdauer soll, abgesehen von einigen unverdauten Häutchen, alles Eiklar aufgelöst sein (VIII). Die U. S. A. X läßt die Verdauungsflüssigkeit verdünnen (Unterbruch durch Herabsetzung der Temperatur auf ca. 36° und Erhöhung des pH) und das Unverdaute während einer halben Stunde absetzen. Es darf nicht mehr als 1 ccm davon zurück bleiben.

Die Gall. läßt feuchtes oder die entsprechende Menge trockenes Fibrin verdauen. Im Filtrate darf mit Salpetersäure kein unverdautes Eiweiß mehr nachweisbar sein.

Nederl. IV läßt Eiklar schlagen, 10fach verdünnen und koagulieren. Nach Zusatz von Salzsäure und Pepsin wird nach bestimmter Zeit der Grad der Aufhellung beobachtet.

3. Bestimmung der Labwirkung: Der Gedanke, die Labwirkung, welche die proteolytische Wirksamkeit begleitet, zur quantitativen Messung der letzteren heranzuziehen, ist öfters aufgetaucht, z. B. Blum und Fuld<sup>51)</sup>, Grützner<sup>52)</sup>, Lónard<sup>53)</sup>. Michaelis und Mendelssohn<sup>54)</sup>, Elmer, Traut und Vahlteich<sup>55)</sup> vertraten ebenfalls die Ansicht der Identität von Pepsin und Lab (= Chymosin) und damit der Proportionalität der Wirkung. Über diese Frage entbrannte ein hartnäckiger jahrelanger Kampf und ohne weiter auf dessen Einzelheiten einzugehen, verweisen wir auf die Arbeiten von Hammarsten<sup>56)</sup> und dessen Gegnern. Aus diesen können wir mit Sicherheit entnehmen, daß für Präparate unbekannter Herkunft ein solcher Maßstab unter Umständen sehr verhängnisvoll sein könnte.

4. Zeitmessung: In der Hauptsache sind diese Methoden mit den vorstehend (sub. 1 und 2) beschriebenen identisch und bildeten oft den eigentlichen Ausgangspunkt für diese. So ist beispielsweise die Methode von Brewster eine solche, bei der die Zeit bestimmt wird, innerhalb welcher eine festgelegte Verdauungsstufe bezw. vollständige Verdauung erreicht wird. Aus der Zeitdauer schließt man dann auf die Wirksamkeit des Pepsins. Die Methoden sind sehr ungenau, weil die Reaktion langsam abklingt und der Endpunkt schwer feststellbar ist. Sie sind für die Praxis der Pepsinbestimmung heute ohne Bedeutung.

<sup>51)</sup> Berl. klin. Wo. (1905).

<sup>52)</sup> Arch. f. d. ges. Physiol. 16, 105 (1878).

<sup>53)</sup> Bio. Z. 60, 43 (1914).

<sup>54)</sup> Bio. Z. 65, 1 (1914).

<sup>55)</sup> J. of the Americ. Pharmac. Assoc. 11, 686 (1922).

<sup>56)</sup> Hammarsten, H. 68, 119 (1910); 94, 104, 307 (1915); 102, 33, 105 (1918); van Dam, H. 79, 247 (1912); Rakoczy, H. 84, 329 (1913); 68, 421 (1910); Funk u. Niemann, H. 68, 263 (1910); Sawitsch, H. 68, 12 (1910).

## C. Literatur und Kritik der offizinellen Methoden.

Wir versuchten an Hand der in der Literatur ausgeübten Kritik und durch einige speziell für unsere Verhältnisse maßgebende Gesichtspunkte eine engere Auswahl zu treffen und uns durch Experimente von der Eignung der gewählten Methoden zu überzeugen.

Schon Groß<sup>57)</sup> rät von der Verwendung von Hühnereiweiß ab und empfiehlt Casein. Blum und Fuld<sup>58)</sup> finden Unterschiede in der Verdaulichkeit des Hühnereiweißes je nach Ernährung und Jahreszeit. In Bezug auf die offizinellen Methoden spricht Bachstetz<sup>59)</sup> von einer manchmal versagenden Prüfung mit koaguliertem Hühnereiweiß und empfiehlt die Groß'sche Methode (siehe S. 17), fügt aber hinzu, daß die Trübungen nicht so leicht zu beurteilen sind. Sie erfolge am besten im auffallenden Licht gegen eine dunkle Fläche. Auch sind die ersten Gläser schwach opaleszent, aber der Sprung zwischen dem 4. und 5. (entsprechend der gerade noch genügenden Menge Pepsin) ist leicht erkennbar. Vorteile sind nach Bachstetz, l. c.: Zeitersparnis (eine Viertelstunde statt zwei oder mehrere Stunden); Billigkeit und Möglichkeit der quantitativen Bestimmung.

Genau gleich urteilt Brandrup<sup>60)</sup> über die mit frischem Hühnereiweiß arbeitenden Methoden, nämlich sie seien mit großer Ungenauigkeit behaftet. Die Nichterfüllung der Forderung des D. A. B. 6 hinsichtlich Verdauungsvermögen sei nicht beweisend für eine schlechte Qualität des Pepsins<sup>61)</sup>. Dieser Autor prüfte etwa 18 Verfahren zum Teil experimentell und empfiehlt die Groß'sche Methode.

Bümming<sup>62)</sup> findet die mit Übung und Sorgfalt ausgeführte Probe des D. A. B. 6 nicht schlecht, gibt aber zu, daß nicht vollständiges Auflösen des Eiweißes noch kein Grund sei zur Beanstandung. Es seien dann mindestens zwei weitere Versuche nötig, eventuell mit einem Eiweißgemisch von verschiedenen Eiern und einem Standard-Präparat zum Vergleich. Weil die D. A. B. 6-Methode zeitraubend und für Ungeübte nicht mit Sicherheit ausführbar ist, hofft er, daß die Groß'sche Methode weiter ausgebaut wird. Mathes<sup>63)</sup> wünscht, daß für einen Nachtrag des D. A. B. 6 eine präzisere Fassung der Pepsinwertbestimmung ausgearbeitet würde.

Das Eiklar zuerst zu verdünnen und dann zu koagulieren nach Nederl. IV, wird von Oversluys<sup>64)</sup> nicht begrüßt. Er zieht die alte Methode (koaguliertes Eiklar durch das Sieb gerieben) vor

<sup>57)</sup> Berl. klin. Wo. 45, 643 (1908).

<sup>58)</sup> Z. f. klin. Med. 58.

<sup>59)</sup> P. C. H. 61, 479 (1920).

<sup>60)</sup> Ap. 43, 1472 (1928).

<sup>61)</sup> Brandrup: Ap. 44, 953 (1929).

<sup>62)</sup> Ap. 44, 964 (1929).

<sup>63)</sup> Ap. 44, 504 (1929).

<sup>64)</sup> Phrm. W. 60, 1218 (1923).

und tatsächlich ging die nächste Ausgabe der Nederl. (V) wieder auf diese Methode zurück. Auch van der Haar<sup>65)</sup> äußert Bedenken über die Methode der Nederl. IV.

Die Fibrin-Methode der Gall. gibt nach Délaunay und Bailly<sup>66)</sup> keine konstanten Resultate. Die Verfasser empfehlen als gleichmäßiges Substrat Edestin. In seinen vergleichenden Untersuchungen über die Anforderungen der verschiedenen Arzneibücher (vgl. S. 12) bedient sich Legrand<sup>67)</sup> nicht des Fibrins für die Standard-Methode, sondern des Edestins (Methode nach Fuld, vgl. S. 17). Er empfiehlt die Fibrin-Methode in einer etwas präziseren Form für officinelle Zwecke, ebenso die Verdauung von koaguliertem, zerkleinertem Hühnereiweiß und Bestimmung des Endpunktes mit Salpetersäure.

Weit schärfer sind die Bedingungen der U. S. A. X-Methode gefaßt. Sie nimmt unter den officinellen Vorschriften mit Hühnereiweiß die erste Stelle ein. Vahlteich und Glover<sup>68)</sup> betonen, daß nur die sogen. Durchschnitts-Methode gute Resultate liefert. Je eine Serie des Standardpepsins und eine solche des zu untersuchenden werden angesetzt, und das arithmetische Mittel der Rückstände jeder Serie bestimmt. Sie betrachten diese Methode als zuverlässiger als z. B. die Methode von Brewster (vgl. S. 18) und die Jacoby'sche Ricin-Methode, bei denen die Endpunkte der völligen Auflösung schwer zu beurteilen seien, aber besonders im Hinblick auf das relative Verhältnis der Pepsinstärken. In einer späteren Publikation von Elmer, Traut und Vahlteich<sup>69)</sup> wird gezeigt, daß nach dem beschriebenen Prinzip auch Lamellen-Eiweiß (natürlich mit geringen Abänderungen) als Ersatz für die frischen Eier brauchbar ist.

Hercord und Maben<sup>70)</sup> machten den Vorschlag, die verschiedenen Wertbestimmungsvorschriften der Arzneibücher für Pepsin durch eine einzige zu ersetzen und zwar durch einen in den Bedingungen normierten Typus, unter Verwendung von koaguliertem Hühnereiweiß und Auflösung desselben durch Pepsin, wie die bisherigen officinellen Methoden (D. A. B. 6, Nederl. V u. s. w.). Solange dieses Gebiet aber so im Fluß ist und die Methoden so unvollkommen, wird daran nicht zu denken sein.

Um der Schwierigkeit der Substratfrage einigermaßen auszuweichen oder um den Endpunkt genauer zu gestalten, werden die zu prüfenden Pepsine oft mit einem Standard-Pepsin, welches man durch eine größere Anzahl von Versuchen ausgewertet hat, ver-

<sup>65)</sup> Phrm. W. 60, 1258 (1923).

<sup>66)</sup> Bull. des sciences pharmacol. 22, 24 (1915).

<sup>67)</sup> J. phrm. 10, 385 (1929); 11, 58 (1930).

<sup>68)</sup> J. of the Americ. Pharmac. Assoc. 10, 595 (1921).

<sup>69)</sup> J. of the Americ. Pharmac. Assoc. 11, 686 (1922).

<sup>70)</sup> X. intern. pharmac. Kongreß, Brüssel; nach Phrm. W. 49, 165 (1912).

glichen <sup>71)</sup>. Michaelis und Rothstein <sup>72)</sup> betonen, daß die Aufhellung der mit Sulfosalicylsäure hergestellten Eiweißsuspensionen asymptotisch verläuft. Wenn man aber eine Reihe mit fallenden Mengen des zu untersuchenden Pepsins und gleichzeitig eine Probe mit dem Standard-Pepsin ansetzt, so kann leicht festgestellt werden, in welchem Röhrchen die Aufhellung mit derjenigen des Standard-Pepsins Schritt hält. Es versteht sich von selbst, daß man diesen Kunstgriff überall dort in Anwendung bringt, wo viele solche Untersuchungen gemacht werden. Dadurch kann man leicht anormale Bedingungen (schlechtes Substrat u. s. w.) aufdecken. Wir müssen für eine officinelle Methode darauf verzichten.

#### D. Allgemeines über die in Betracht kommenden Substrate.

Maßgebend für die Eignung sind:

1. Leichte Beschaffbarkeit (Unabhängigkeit von einzelnen Firmen).
2. Genügende Reinheit.
3. Enzymatische Konstanz.

Unter Berücksichtigung dieser Faktoren scheidet ein großer Teil der in der Literatur vorgeschlagenen Substrate aus. In engere Auswahl kommen heute die folgenden:

**Hühnereiweiß:** Es ist ein Gemisch, hauptsächlich von Ovalbumin, Ovoglobulin, Ovomucoïd und anorganischen Salzen. Das Eiklar enthält 12—15% <sup>73)</sup> Trockensubstanz, wovon 0,7—1% anorganisch. Durch Erhitzen in schwach essigsaurer Lösung werden Albumin und Globulin koaguliert, nicht aber das Ovomucoïd <sup>74)</sup>. Der Auflösungsprozeß des koagulierten Eiweißes durch Pepsin-Salzsäure gibt nicht etwa den Verlauf der Proteolyse an, denn aus einer filtrierten Verdauungsflüssigkeit läßt sich bei schwach saurer Reaktion durch Aufkochen wieder ein Koagulat erzeugen. Es ist überhaupt fraglich, ob bei der im Ei bestehenden Reaktion vollständige Kcagulation erreicht wird. Das nicht ausgeflockte, denaturierte Eiweiß löst sich dann in der Säure gut, eine Erscheinung, die übrigens auch besonders beim Casein stark hervortritt. (Das ausgeschiedene Eiweiß geht rasch oder langsam wieder in Lösung, je nach der Geschwindigkeit, mit der die Reaktion den isoelektrischen Punkt überschreitet.) Bemerkenswert ist ebenso die Geschwindigkeit, mit welcher bis zum Schluß die Partikel des koagu-

<sup>71)</sup> Elmer, Traut u. Vahlteich: J. of the Americ. Pharm. Assoc. 11, 686 (1922).

<sup>72)</sup> Bio. Z. 150, 60 (1920).

<sup>73)</sup> Paechtner: Oppenheimer, Hdb. d. Bio. Bd. 4, S. 684 (1925).

<sup>74)</sup> Kestner: Chemie der Eiweißkörper, Vieweg (1925), S. 410.

lierten Eiklars gelöst werden, die sicher nicht asymptotisch abnimmt.

Die U. S. A. X schreibt 5—12 Tage alte Eier vor. Eiweiß aus älteren oder jüngeren Eiern soll langsamer abgebaut werden. Nach Graber<sup>75)</sup> ist das Alter von 5—7 Tagen noch günstiger. Wie wir noch sehen werden, können ganz spontane Variationen auftreten, so daß man bei einem einzigen Versuch kein sicheres Ergebnis hat. Vahlteich und Glover<sup>76)</sup> schreiben, daß z. B. von 6 ganz gleich angesetzten Proben der Rückstand von 0,5 bis 2, sogar bis 3 ccm variieren kann. Diese Autoren scheiden dann die nicht übereinstimmenden Proben aus und berechnen aus den übrigen das arithmetische Mittel. Eigentümlich ist die von den genannten Autoren ebenfalls berichtete Tatsache, daß weder die Geschwindigkeit, noch die Vollständigkeit der Verdauung beeinflusst wird, wenn koaguliertes Eiweiß, wie es gewöhnlich geschieht, nur durch Sieb 40 (U. S. A. X) oder nachher noch durch das Sieb 80 gerieben wird. Einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Wassergehalt, Alter und Angreifbarkeit des koagulierten Eiklars konnten die beiden Autoren nicht finden.

Die enge Normierung des Alters der Eier erschwert die Anwendbarkeit der Methode wie schon Bümbling<sup>77)</sup> erwähnt hat und wir aus eigener Erfahrung bestätigen.

Das Lamelleneiweiß dürfte bei sorgfältiger Herstellung im Großen im allgemeinen wenig in seinen Eigenschaften gegenüber Enzymen schwanken, da es einen Durchschnitt darstellt. Trotzdem wir es mit einem Trockenpräparat zu tun haben, kann es mit der Zeit Veränderungen erleiden, z. B. eine fortschreitende Denaturierung, besonders leicht des Globulins. Die Lösungen enthalten oft Flocken und sind trübe (Globulin).

Pulverisiertes Trockeneiweiß ist nicht anzuraten und erfordert eine eingehende Prüfung.

Einfache volumetrische Methoden zur Bestimmung von Eiweiß in Gemischen mit seinen Abbauprodukten existieren noch nicht in der Form, daß wir sie ohne weiteres anwenden könnten (vgl. Eppenberger<sup>78)</sup>).

Casein: Casein, der Haupteiweißkörper der Milch, ist ein Phosphoprotein und im Gegensatz zu Laktalbumin und Laktoglobulin im Handel erhältlich. Als reinstes Produkt gilt das Casein nach Hammarsten hergestellt. Im Prinzip wird das Casein durch Essigsäure aus der Milch gefällt und der Niederschlag in möglichst wenig Ammoniak oder Natronlauge gelöst. Diese Operation wird mehrmals wiederholt und dabei die Hauptmenge des Fettes oben

<sup>75)</sup> J. of Ind. and Eng. Chem. Dec. (1911).

<sup>76)</sup> J. of Americ. Pharm. Assoc. 10, 595 (1921).

<sup>77)</sup> Ap. 44, 964 (1929).

<sup>78)</sup> Eppenberger: Versuche zur maßanalyt. Best. v. Eiweiß, Diss. Zürich (1928).

abgeschöpft. Schließlich wird das Casein nach dem Trocknen mit Alkohol und Äther mit letzterem gründlich extrahiert. Dieses Handelscasein ist nicht absolut fettfrei, aber man erhält mit Laugen und Säuren klare Lösungen; konzentrierte Lösungen (ca. 3—6%) sind opalescent in dickerer Schicht und oft schwach gelb.

Für enzymchemische Arbeiten wird das reine Handelscasein besonders empfohlen. Es soll physikalisch, chemisch und enzymchemisch übereinstimmend sein<sup>79)</sup>. Es fehlt nicht an Andeutungen in der Literatur, welche auf eine beträchtliche Abhängigkeit der Verdaubarkeit und anderer Eigenschaften<sup>80)</sup> von der Art der Reinigungsoperationen aufmerksam machen. Wir zitieren:

„Präparate, die nach Hammarstens Vorschriften sehr gründlich gereinigt und entfettet sind, sind bisweilen für die Verdauungsfermente auffallend schwer angreifbar. Auch deshalb empfiehlt sich von der Magermilch auszugehen, was Alkohol und Äther überflüssig macht.“<sup>81)</sup>

Was die Einheitlichkeit des Caseins anbelangt, ist zu sagen, daß es K. Linderstroem-Lang<sup>82)</sup> gelang, verschiedene Fraktionen zu erhalten.

Von den Proteasen wird es am raschesten hydrolysiert im Vergleich zu Gelatine und Albumin<sup>83)</sup>. Die Phosphorsäure bleibt dabei organisch gebunden<sup>84)</sup>. Bei der tryptischen Hydrolyse wird Tyrosin verhältnismäßig rasch und vollständig abgespalten (ebenso aus Edestin), die Glutaminsäure sehr viel langsamer. In der Lösung kann man gleichzeitig sog. Albumosen nachweisen<sup>85)</sup>. Die Caseinabbauprodukte sind zum Teil (das sog. Pseudo- oder ParaNuclein<sup>86)</sup>) ziemlich schwer löslich. Es entstehen oft Fällungen während der Verdauung von sogar weniger als 3 prozentigen Caseinlösungen.

Casein bildet mit Alkalihydroxyden Salze, welche durch Verdünnen nicht hydrolysieren. 1 gr Casein vermag nach Pauli<sup>87)</sup> 0,9 Millimol Natriumhydroxyd zu binden. In Wasser ist es schwer löslich (0,11 mgr pro Liter bei 25°<sup>88)</sup>), in geringen Mengen in verdünnten Neutralsalzlösungen („Globulineffekt“). In stark alkalischer Lösung erleidet Casein Racemisierung, wodurch es unangreifbar gegen Pepsin und Trypsin-Kinase wird<sup>89)</sup>. Erhitzen der wässerigen Suspension des Trockenpräparates oder der Lösung

<sup>79)</sup> Oppenheimer: *Ferm. u. ihre Wirkungen*, Bd. 3, S. 331.

<sup>80)</sup> Vgl. Zoller: *J. of Ind. and Eng. Chem.* **12**, 1173 (1920); zit. nach Handovsky in Oppenheimer: *Hdb. d. Bioch.*, Bd. 1, S. 571.

<sup>81)</sup> Kestner: *Chemie der Eiweißkörper*, Vieweg (1925), S. 307.

<sup>82)</sup> *H.* **176**, 76.

<sup>83)</sup> E. Waldschmidt-Leitz u. Simons: *H.* **156**, 99 (1926) u. zwar 121.

<sup>84)</sup> Plimmer u. Bayliß: *J. of Physiol.* **33**, 439 (1905).

<sup>85)</sup> Abderhalden u. Reinbold: *H.* **53**, 226 (1907); *H.* **44**, 265 (1905).

<sup>86)</sup> Vgl. Strauß u. Collier in *Hdb. d. Bioch.*, Bd. 1, S. 710.

<sup>87)</sup> *Bio. Z.* **70**, 489 (1915).

<sup>88)</sup> Cohr u. Hendry: *J. of Gener. Physiol.* [5] 521 (1923).

<sup>89)</sup> Dakin u. Dudley: *J. of Biol. Chem.* **15**, 263.

kann bei bestimmten Temperaturen (im ersten Falle schon bei 75°) Unlöslichkeit in Alkali bewirken<sup>90)</sup>.

Der isoelektrische Punkt liegt bei ph 4,62 nach Michaelis und Rothstein<sup>91)</sup>; bei 4,89 nach Cohn und Hendry<sup>92)</sup>; bei 4,7 nach Kestner<sup>93)</sup>. Zur quantitativen Bestimmung in Lösungen werden hauptsächlich folgende Methoden empfohlen:

1. Fällen mit Essigsäure, Einleiten von Kohlensäure und Wägen.
2. Fällen mit Kalialaun aus annähernd neutraler Lösung und Wägen.
3. Titration der Caseinlösung (Milch) vor und nach der Fällung des Caseins durch Essigsäure mit 0,1 n-Lauge gegen Phenolphthalein<sup>94)</sup>.
4. Fällung mit Kupfersulfat und Lauge und Bestimmung des Stickstoffs nach Kjeldahl im Niederschlag.
5. Titration von Casein mit sauren Farbstoffen bei ph 1,4 — 2,8 nach Chapman und Mitarbeiter<sup>95)</sup>.

Als Fällungsmittel aus neutraler Lösung dienen außerdem Zinksalze. Quecksilberchlorid<sup>96)</sup> und Magnesiumsulfat. Malenfant<sup>96)</sup> fällt mit 65 prozentigem Alkohol, der 1‰ Essigsäure enthält, wäscht den Niederschlag mit 50 prozentigem, dann mit 95 prozentigem Alkohol, siedendem Aceton und siedendem Äther, trocknet 7 Stunden bei 100° und wägt.

Edestin: Edestin ist als Substrat sehr geschätzt und im Handel in guter Qualität erhältlich (z. B. bei Hoffmann-La Roche; Schuchardt; Dr. Gärtner, Halle (Merck stellt es nicht mehr her). Es wird nach dem Casein am leichtesten abgebaut<sup>97)</sup>. Legrand<sup>98)</sup> erhielt mit einem selbsthergestellten und einem Handelsprodukt (Schuchardt) denselben Verdauungseffekt.

Edestin ist ein Globulin und kann in einfacher Weise aus Hanfsamen isoliert werden<sup>99)</sup>. Für Pharmakopoe-Zwecke wäre eine Herstellung aber doch zu langwierig<sup>100)</sup>. Es ist löslich in verdünnter Kochsalzlösung und verdünnter Salzsäure, woraus es durch Kochsalz gefällt wird. Aus der Kochsalzlösung kann es kristallisiert erhalten werden.

Fibrin: Durch Schlagen mit Holzstäben wird es aus Blut abgeschieden, gut gewaschen und zerkleinert und unter Glycerin oder als Trockenpräparat aufbewahrt<sup>101)</sup>. Käufliches, getrocknetes

<sup>90)</sup> Vgl. Strauß u. Collier: Hdb. d. Bioch., Bd. 1, S. 625 ff.; Hdb. d. biol. Arbeitsmeth. Abt. I, Teil 8, S. 508 ff.

<sup>91)</sup> Bio. Z. 260 (1912).

<sup>92)</sup> J. of Gener. Physiol [5], 521 (1923).

<sup>93)</sup> Chemie der Eiweißkörper, Vieweg (1925), S. 305.

<sup>94)</sup> Schloßmann u. Sindler in Hdb. d. Bioch., Bd. 4, S. 763 (1925).

<sup>95)</sup> J. of Biol. Chem. 72, 707 (1927); C. II, 706 (1927).

<sup>96)</sup> J. pharm. 6, 390 (1912).

<sup>97)</sup> Berg: Americ. J. of Physiol. 23, 420 (1909); zit. nach Oppenheimer Hdb. d. Bioch., Bd. 1, S. 875.

<sup>98)</sup> J. pharm. 10, 385 (1929).

<sup>99)</sup> Osborne: Americ. Chem. J. 14, 629 (1892).

<sup>100)</sup> Gläflner: Bio. Z. 127, 313 (1922); Legrand: J. pharm. 10, 385 (1929).

<sup>101)</sup> Vgl. Willstätter, Graßmann u. Ambros: H. 152, 164 (1926).

Fibrin (z. B. Merck, Grübler, Schuchardt) eignet sich besser als frisch dargestelltes l. c.<sup>102)</sup>. Die Trocknungs- und Aufbewahrungs-Art, ob mit oder ohne Alkohol, beeinflusst die Angreifbarkeit durch Proteasen<sup>103)</sup>. Nach Délaunay und Bailly<sup>103)</sup> ist Fibrin weniger gleichmäßig als Edestin. Fibrin ist im Wasser und Salzlösungen unlöslich, quillt aber sehr stark.

Gelatine: Gelatine ist in guter, gleichmäßiger Qualität erhältlich. Die relativ wenigen Methoden, welche sich derselben für die Pepsinbestimmung bedienen, sind von untergeordneter Bedeutung. Seine physikalischen und chemischen Eigenschaften sind meistens ungünstig (bei der Trypsinbestimmung z. B. seine leichte Spaltbarkeit durch Alkali).

Sera: Sera sind öfters verwendet worden. Sie lassen enzymchemische Gleichmäßigkeit (innerhalb einer Tierspecies) erwarten. Ob die im Handel erhältlichen sog. Normalsera sich für diesen Zweck eignen, ist nicht ohne weiteres zu bejahen, da diese konservierende Zusätze enthalten können. Erfahrungen liegen nicht vor.

Von den vielen weiteren in der Literatur angegebenen Substraten, Ricin (früher von Merck<sup>104)</sup> hergestellt), Globin, Elastin u. s. w. kommt keines für eine Pharmakopoe-Methode in Betracht.

---

<sup>102)</sup> Gesellschaft: H. 94, 205 (1915); Waldschmidt: Arch. f. ges. Physiol. 143, 189 (1911).

<sup>103)</sup> Bull. des sciences pharmacol. 22, 24 (1915).

<sup>104)</sup> Brandrup: Ap. 44, 953 (1929)).

## Spezieller Teil.

### A. Auswahl der zu prüfenden Methoden und allgemeine Faktoren.

Nach der zweckmäßigen Wahl des Substrates, nach der Einfachheit der Apparatur und Raschheit der Durchführung, der günstigen Beurteilung in der Literatur (sahen uns als Pharmakopoe-Methode eine der folgenden aussichtsreich:

Methode der U. S. A. X,  
Gravimetrische Methode unter Benützung von Hühnerweiß oder event. Casein,  
Groß'sche Methode,  
Volhard'sche Methode,  
Methoden von Willstätter und Sörensen,  
Polarimetrische Methode,  
Methode von Fuld und Levison,  
Methode von Ege,  
Methode der Gall.

Von der Überprüfung der letzten vier Methoden mußten wir aus Zeitmangel absehen.

**Wasserstoffionenkonzentration:** Durch die Arbeiten von Sörensen und Michaelis wurde der aktuellen Konzentration der Wasserstoffionen bei enzymatischen Prozessen erst gebührende Aufmerksamkeit geschenkt. Trotzdem erscheinen bis in die neueste Zeit Publikationen, welche diesen Punkt außer acht lassen und mit Normalitäten und Prozenten an Säuregehalt rechnen.

Die Enzyme wirken bei einem bestimmten, für diese nur bedingt charakteristischen  $ph$  optimal. Zu beiden Seiten dieses Bereiches fällt die Aktivitätskurve mehr oder weniger steil ab. Die Lage des Optimums selbst wird von vielen anderen Faktoren beeinflusst. Trotzdem sind die Wirkungsbereiche der Enzyme nach unten und oben durch bestimmte  $ph$ -Werte begrenzt. So wirkt Pankreasamylase etwa zwischen  $ph$  4—9; bei der Acidität der Pepsinwirkung (unter  $ph$  4) ist sie ebenso wie die Trypsinkinase unwirksam. Nach Hawk, Efron-Prescott, Mathews<sup>1)</sup>,

<sup>1)</sup> zit. nach Vahlteich u. Glover: J. of the Americ. Pharm. Assoc. 10, 595 (1921).

Lénard<sup>2)</sup> ist das Aciditätsoptimum vom Pepsintypus (ob vom Mensch, Schwein, Hund oder Kalb) abhängig und von der Art des Substrates<sup>4)</sup>. Aber auch beim gleichen ph ist ein Einfluß der speziellen Natur des Anions wiederholt festgestellt worden (Graber<sup>5)</sup>, Ringer<sup>6)</sup>). Am günstigsten wirkt die Salzsäure. Das Optimum ist für alle Säuren ungefähr gleich, nur der absolute Verdauungswert hängt vom Anion ab (Geymant<sup>7)</sup>). Es kann aber auch (durch die Versuchsdauer bedingt sein. So fand Sörensen<sup>8)</sup> für Acidalbumin bei einer halben Stunde ph 2, bei ca. zwei Stunden ph 1,6, bei ca. vier Stunden ph 1,5 als zweckmäßig. Van Arkel<sup>9)</sup> untersuchte drei Handelspepsine mit der nephelometrischen Methode von Rona und Kleinmann<sup>10)</sup> und fand für jedes unter sonst gleichbleibenden Bedingungen ein besonderes Optimum. Bemerkenswert ist, daß sich zwei Kurven schneiden, d. h. bei einer bestimmten h ist das eine Pepsin stärker wirksam, bei einer anderen h das andere. Weitere Angaben über den optimalen ph-Wert wurden von folgenden Autoren gemacht:

Sörensen, Bio. Z. <b>21</b> , 131 (1909)	} ph
Michaelis und Davidsohn, Z. f. exp. Path. u. Pharm. <b>8</b> , 1910; Bio. Z. <b>28</b> , 1, (1910)	
Michaelis, Bio. Z. <b>65</b> , 1 (1914)	1,4
Ringer, Arch. Néerl. Phys. II 571; III 349	1,9
Okada, Bio. J. <b>10</b> , 126 (1916)	1,4–2.0
Northrop, J. of Gen. Physiol. <b>1</b> , 607 (1919); <b>3</b> , 211 (1920)	2,2

Die h ändert sich während der Verdauung im Gegensatz zu derjenigen bei der tryptischen Hydrolyse<sup>11)</sup> <sup>12)</sup> nicht stark. Man kann ohne weiteres auf eine spezielle Pufferung im Falle des Pepsins verzichten.

Wir maßen die h bei Zimmertemperatur zwischen 18 und 25°, worauf sich auch die meisten Angaben in der Literatur beziehen; im sauren Gebiet und elektrolytarmen Lösungen mit der Chinhydron-, in alkalischen und ebenso in elektrolytreichen sauren Lösungen mit der Platin-Wasserstoff-Elektrode und geben diese Messungen mit zwei Dezimalen an, während approximative Bestimmungen, ermittelt mit den Indikatoren von Clark und Lubs und

<sup>2)</sup> Bio. Z. **60**, 43 (1914).

<sup>3)</sup> Vgl. auch Gesellschaft, H. **94**, 209 (1915).

<sup>4)</sup> Michaelis u. Mendelssohn: Bio. Z. **65**, 1 (1914).

<sup>5)</sup> J. of the Pharm. Assoc. **10**, 437 (1921).

<sup>6)</sup> H. **60**, 43 (1914).

<sup>7)</sup> Bio. Z. **105**, 155 (1920).

<sup>8)</sup> Bio. Z. **21**, 131 (1909).

<sup>9)</sup> Phrm. W. **66**, 858 (1929).

<sup>10)</sup> Bio. Z. **140**, 478 (1923).

<sup>11)</sup> Rohonyi: Bio. Z. **44**, 164 (1912).

<sup>12)</sup> Graber: J. of the Pharm. Assoc. **10**, 437 (1921); dieser Autor maß bei Verdauungstemperatur (50 bzw. 52°) und hielt die Vergleichselektrode bei Zimmertemperatur.

einer entsprechenden verbesserten Farbentafel\*), nur mit einer Dezimale angegeben werden.

Neutralsalze: Nach Levites<sup>13)</sup>, Ascher<sup>14)</sup> Groll<sup>15)</sup> haben Neutralsalze beim Pepsin eine hemmende Wirkung. Wir haben auf diese Tatsache, so weit es möglich war, Rücksicht genommen.

Temperatur: Danielsson<sup>16)</sup> bezeichnet die Temperatur von 53° als diejenige, bei der die Leistung maximal ist, d. h. die Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit und der Zerstörungsgeschwindigkeit halten sich die Wage. Die von der U. S. A. X geforderte Temperatur von 52° scheint uns zu hoch. Natürlich sind Reaktion, Art der Eiweißkörper, Dauer u. s. w. von Bedeutung. Ege<sup>17)</sup> ermittelt als optimale Temperatur für die Versuchsdauer von: 1 Minute 56—60°; 5 Minuten 52°; 1 Stunde 45—50°; mehrere Stunden 40—45° bei ph 1,6 am Edestin gemessen.

Als Thermostat benützten wir ein 40 Liter fassendes, mit dickem Filz allseitig isoliertes Wasserbad, das elektrisch geheizt und elektrisch reguliert wurde. Ein kräftiges Rührwerk (Propeller) in unmittelbarer Nähe des Heizkörpers sorgte für gleichmäßige Durchmischung. Die Temperaturschwankungen überstiegen bei 40° ± 0,01° nicht.

Sistierung der Verdauung: Eine häufig angewandte Methode zur Unterbrechung der Verdauung ist das Erhitzen auf höhere Temperatur, wodurch das Enzym zerstört wird. Diese Methode wurde z. B. von Ege<sup>18)</sup>, Rona und Kleinmann<sup>19)</sup> (beim Trypsin) und anderen angewandt. Es ist umso einwandfreier, je rascher der Temperaturbereich überschritten wird, bei dem das Enzym noch aktiv ist (vergl. Rona und Kleinmann l. c.). Große Fehler können entstehen, wenn man z. B. mit großen Flüssigkeitsmengen operiert und die Temperatursteigerung nicht rasch genug erfolgt (vgl. van Urk<sup>20)</sup>). Auch durch Abkühlen kann die Verdauung praktisch zum Stillstand gebracht werden. Willstätter und Mitarbeiter<sup>21)</sup> kühlen auf 0° ab. Außerordentlich scharf kann sie unterbrochen werden durch Änderung der Acidität bis außerhalb des Wirkungsbereiches des Enzyms.

Enzym- und Substrat-Lösungen: Um bakterielle, autolytisch-fermentative oder andere ungünstige und unkontrollier-

\*) Dem pharmaz. Institut von der Firma Hoffmann-La Roche, Basel freundlich zur Verfügung gestellt.

<sup>13)</sup> H. 48, 187 (1906).

<sup>14)</sup> Arch. d. Verd. 14, 629 (1908).

<sup>15)</sup> Diss. Amsterdam (1918); Arch. néerl. pharm. 2, 358 (1918).

<sup>16)</sup> Svensk. Farmac. Tidskrift No. 26 (1926); ref. Pharm. Jahresbericht (1927).

<sup>17)</sup> H. 143, 159 (1925).

<sup>18)</sup> H. 143, 159 (1925); Bio. Z. 145, 66 (1924).

<sup>19)</sup> Bio. Z. 169, 320 (1926).

<sup>20)</sup> Diss. Leiden (1924).

<sup>21)</sup> H. 152, 164 (1926).

bare Einflüsse auszuschalten, haben wir sowohl Enzymlösungen wie Substratlösungen für jeden Versuchstag immer frisch hergestellt. Nur ausnahmsweise bedienten wir uns einer Glycerin-Pepsin-Lösung oder des Zusatzes eines geeigneten Antiseptikums (Toluol).

## B. Die U. S. A. X - Methode.

Reagenzien: 1. 25 ccm n-Salzsäure werden mit 275 ccm Wasser verdünnt.

2. 0,1 gr Pepsin löst man in 150 ccm der verdünnten Salzsäure.

Methode: Man lese ein Hühnerei aus, welches nicht weniger als 5 und nicht mehr als 12 Tage alt ist und an einem kühlen Ort aufbewahrt wurde. Dieses legt man während 15 Minuten in kochendes Wasser. Sobald es genügend abgekühlt ist, um gehandhabt werden zu können, entfernt man Schale, Eihaut und Eigelb, reibt das Eiweiß sogleich durch ein sauberes Haar- oder Messingsieb No. 40, verwirft den ersten durch das Sieb gehenden Anteil und wiegt von der nachfolgenden Eiweißmenge 10 gr in ein Weithals-Glas von 100 ccm Inhalt. Unmittelbar darauf werde 20 ccm der verdünnten Salzsäure zugegeben und mit einem Glasstab, der vorne mit einem Stückchen Gummischlauch überzogen ist, die Eiweißpartikel durch gutes Umrühren von einander getrennt. Den Glasstab spült man mit weiteren 15 ccm der verdünnten Salzsäure ab und, nachdem das Gemisch auf 52° erwärmt worden ist, gibt man genau 5 ccm der sauren Pepsinlösung hinzu. Nun verschließt man (cork) die Flasche sofort gut, dreht dreimal um und stellt sie in ein auf 52° eingestelltes Wasserbad. Während 2 1/2 Stunden wird der Inhalt durch einmaliges Umdrehen alle 10 Minuten gemischt. Dann gießt man den Inhalt in ein konisches Glas, dessen unterer Durchmesser mindestens 1 cm beträgt, spült mit 50 ccm Wasser die Flasche nach, rührt um und läßt eine halbe Stunde lang absetzen. Es darf nicht mehr als 1 ccm Unverdautes zurückbleiben.

Allgemeines: Die von uns benützten konischen Gläser eichten wir selbst, indem wir verschiedene Volumina Wasser in das trockene Glas einpipettierten und am unteren Rande des Meniskus die entsprechende Marke anbrachten\*). Für die erste Versuchsreihe benützten wir Gläser mit nur einer Marke bei 1 ccm. Außerdem wurde für diese Serie die Temperatur nur auf etwa  $\pm 1^\circ$  konstant gehalten.

In allen Versuchen wurde der Verdauungsansatz durch genau ein halbstündiges Einstellen in den Thermostaten vorgewärmt und erst dann mit der Pepsinlösung versetzt.

Nach U. S. A. IX entfallen auf 1 Inch (= 2,54 cm) 40 Maschen für Sieb No. 40; also 16 Maschen auf 1 cm. Helv. IV führt als dem obigen am nächsten stehend, ein Sieb mit 15 Maschen pro cm (Sieb No. 4), welches wir somit verwendeten. Danielsson<sup>22)</sup> ver-

\*) Wir möchten aber darauf hinweisen, daß das Volumen bis zur Marke „1 ccm“ nur 0,8 ccm Sediment anzeigte, weil letzteres keinen Meniskus bildet. Weil es in unsern Untersuchungen nur auf die gegenseitigen Verhältnisse der Sedimentvolumina ankam, können wir auf eine diesbezügliche Korrektur der angegebenen Werte verzichten.

<sup>22)</sup> Svensk. Farmaz. Tidskrift (1926), No. 26, ref. in pharm. Jahresbericht (1927).

wendet ein Sieb mit 48 Fäden pro cm. Vahlteich und Glover<sup>23)</sup> benützten sowohl eines mit 16 als auch eines mit 32 Maschen pro cm (vgl. S. 23. Sie finden das erste genügend.

Die von uns benützten Eier, welche alle aus dem gleichen Hühnerhof stammten, wurden vom ersten oder zweiten Tage an im Kühlschrank aufbewahrt.

Als weithalsige Gläser verwendeten wir immer Flaschen mit eingeschliffenem Glasstopfen.

I. Serie, Methodische Variationen: In der Literatur finden sich Stellen, wo den technischen Einzelheiten dieser Methode eine nicht geringe Bedeutung zugemessen wird, so z. B. die Verwendung eines dicken, vorn breitgedrückten (flattened) Glasstabes (ohne das Gummischlauchstück) zur Verteilung des Eiweißes<sup>24)</sup> u. s. w. Die Versuche dieser Serie haben den Zweck, uns über die Größenordnung solcher Änderungen in den Versuchsbedingungen zu orientieren. Die Variationen in der Pepsinmenge und die entsprechenden Änderungen in der Menge des Rückstandes geben uns eine Vorstellung, ob die festgestellten Differenzen bei der Änderung anderer Faktoren in den späteren Versuchen von Bedeutung sind oder nicht. Nur dadurch, daß wir die Versuche paarweise oder in größerer Zahl mit dem gleichen Eiweiß bzw. Eiweißgemisch ausführen, können wir zu einigermaßen zuverlässigen Ergebnissen gelangen.

Versuch 1—7 sind Doppel-Versuche mit je einem Ei; für 8 und 9 wurde das Eiweiß von drei gleich alten Eiern in kleinere Stücke zerteilt, gemischt und diese einzeln durch das Sieb gedrückt. Dabei fiel uns auf, daß das Eiweiß sehr leicht passiert, wenn es mit der, dem Dotter zugekehrten (Innen-) Seite auf das Sieb gelegt und hindurchgedrückt wird. Mit der Außenseite auf das Sieb gelegt, wird es leicht zu einem Brei zerdrückt, weil es schlechter passiert, sodaß ein Einfluß infolge des veränderten Zerteilungszustandes zu erwarten wäre. Die Eihäute (sowohl die innere wie die äußere) wurden immer sehr sorgfältig wegpräpariert.

(Siehe Tabelle S. 32.)

Resultat: In den Versuchen 3, 4, 5, 6 und 7 ist der zweite Wert des Ungelösten etwas höher, obwohl die Enzymmengen gleich waren. Das Eiweiß der zweiten Parallelprobe bewahrten wir, während die erste verarbeitet wurde, von der Zeit des Einwägens an bis zu ihrer Aufarbeitung in der gut verschlossenen Flasche ohne Salzsäure auf, weil wir anfangs befürchteten, daß das Verweilen des Eiweißes in der Säure, wenn nicht eine geringe Lösung, so doch eine stärkere Quellung gegenüber der zuerst angesetzten Probe und somit auch ungleiche Auflösungs geschwindigkeit

<sup>23)</sup> J. of the Americ. Assoc. 10, 600 (1921).

<sup>24)</sup> J. of the Americ. Pharm. Assoc. 10, 595 (1921).

No.	Alter des Eies in Tagen	Pepsin-Lösung*) ccm	Rückstand in ccm	Bemerkungen
1	6	5	0,5	das Ei während 20—25 Minuten auf der Tischplatte abkühlen gelassen; Eiweiß mit Glasstab während 5 Min. verteilt
		4	0,75	
2	6	5	0,5	
		4	0,75	
3	5	5	schwach 0,5	
		5	0,5	
4	5	5	schwach 0,5	
		5	0,5	
5	5	5	schwach 1,0	
		5	1,0	
6	7	5	1,0	
		5	etw. mehr als 1,0	
7	Handelsei	5	schwach 0,5	
		5	0,5	
8	6	2,5	3,0	
		3,0	3,0	
		3,5	gut 1,0	
		4,0	1,0	
9	6	5,0	0,75	
		3,5	ca. 2,0 (?)	
		4,0	gut 1,0	
		3,5	schwach 1,0	
	6	4,0	gut 1,0	
		5,0	1,0	

\*) 0,2 gr Pepsin-Siegfried in 25 ccm verdünnter Salzsäure (U. S. A. X).

keit bewirken könnte. Eine stärkere Verdunstung des Wassers war bei der verschlossenen Flasche auch nicht anzunehmen. Man ist geneigt, diese geringen Zunahmen den betreffenden Bedingungen „Glasstab“ oder „Schütteln“ zuzuschreiben, was jedoch bei 3. und 4. außer Betracht fallen würde. Wie wir später feststellten, ist dies auf die Einwirkung der Luft auf das Eiweiß zurückzuführen. Vorerst hatten wir jedoch eine Zerstörung des Pepsins in der ziemlich stark sauren Lösung (ph = 1,02) vermutet, (vergl. III. Serie).

Die Änderungen der angeführten Versuchsbedingungen sind also nach obigen Ergebnissen praktisch ohne Einfluß.

II. Serie: Alter der Eier. Ei, während 15 Minuten auf der Tischplatte abgekühlt; durch Sieb IV; 5 Minuten verrührt; 35 Minuten zum Temperaturniveau ausgeglichen; 2 1/2 Stunden im elektrischen regulierten Wasserbad bei 52°; alle 10 Minuten umgedreht; Volumen des Ungelösten genau ausgemessen; Eichung wieder mit Wasser (untere Kuppe des Meniskus des Wassers); Enzymlösung: 0,2 gr im Schwefelsäure-Exsiccator getrocknetes Pepsin „Siegfried“ in 25 ccm verdünnter Salzsäure gelöst.

(Siehe Tabelle S. 33.)

Resultat: Aus vorstehenden Versuchen ergibt sich, daß die Mengen der gemessenen Rückstände des Ungelösten bei verschiedenaltrigen Eiern stark variieren, doch nicht in eindeutiger

Weise. Auffallend erscheint in obigen Versuchen, ohne daß wir es als eine allgemein gültige Regel interpretieren möchten, daß die Menge des Ungelösten bei 1 Tag alten Eiern größer ist als bei den älteren.

Alter in Tagen	Enzym-lösung in ccm	Ungelöstes in ccm	Alter in Tagen	Enzym-lösung in ccm	Ungelöstes in ccm
1	4	1,15—1,2	9	4	0,4
1	4	0,4—0,45	21	4	0,4
1	4	1,0—1,1	29	4	0,75
3	4	0,7	29	4	0,75
5	4	0,3	33	4	0,4
7	4	0,45—0,5	38	4	0,3—0,35
7	4	0,45—0,5	42	4	1,0
8	4	0,75—0,8	13	4	1,1—1,2*)
9	4	0,8	13	3	> 2 *)
9	4	0,25	26	4	2 *)

\*) Verdauung bei 45° statt bei 52°.

Sehr deutlich zeigt sich in den vorstehenden Serien I und II, daß die Schwankungen der Resultate, die durch die Variationen in der Beschaffenheit der Eier bedingt sind (wobei wohl nicht nur das Alter, sondern noch andere nicht genauer bekannte Faktoren eine Rolle spielen), erheblich größer sind, als die Schwankungen, welche durch kleine Änderungen der Versuchsbedingungen bewirkt werden. Die Ansätze wurden naturgemäß einzeln verarbeitet, sodaß stärkere Einwirkungen der Luft nicht in Frage kommen.

Auf folgende Weise suchten wir die Frage nach der Zerstörung des Pepsins in saurer Lösung zu beantworten.

III. Serie: Das koagulierte Eiweiß von 4 Eiern (6, 6, 12, 26 Tage alt), nach dem Zerkleinern gut gemischt; sehr rasch 8 Proben abgewogen; sofort ohne vorherigen Säurezusatz die Flaschen verschlossen; sonst gleich wie bei der II. Serie; Pepsin „Siegfried“ 0,4 gr auf 50 ccm n/12 HCl; Zeit zwischen erster und letzter Pepsinzugabe (ohne No. 8) 1 Stunde 50 Minuten.

No.	Zeitintervall des Ansatzes	Pepsinlösung ccm	Ungelöstes in ccm
1	10'	3,00	1,75—1,80
2	20'	3,15	1,5
3	20'	3,30	1,32
4	20'	3,45	1,25
5	20'	3,65	1,32
6	20'	3,80	1,35—1,37
7	20'	4,00	1,36
8		10,00	0,7

Resultat: 1. Die Werte ordnen sich gut in eine Kurve ein. Diese hat ein Minimum bei No. 4. Weitere Steigerung der Enzymmenge ruft keine Verminderung des Rückstandes mehr hervor.

Es muß also ein entgegengerichteter Einfluß vorliegen. Dies schien uns die vermutete Zerstörung des Pepsins zu bestätigen, umso mehr, als wir die Proben nicht nach der Reihenfolge des Wägens und Verschließens der Flaschen ansetzten.

2. Es ist auffällig, wie hoch der unverdaute Rest nach dem Zusatz der mehr als zweifachen Pepsinmenge und längeren Verdauungszeit sich stellt.

Um die Möglichkeit der Veränderung des Eiweißes zu prüfen (während des Aufbewahrens in der verschlossenen Flasche), verfahren wir wie folgt:

IV. Serie: 10 Proben eines Eiweißgemisches sofort nach dem Abwägen mit 20 ccm Wasser versetzt; wie üblich verteilt; Glasstab mit 5 ccm der verdünnten Salzsäure abgospült und verschlossen; während zwei Tagen im Kühlschrank aufbewahrt. Vor dem eigentlichen Verdauungsversuch wurden noch 10 ccm n/4 Salzsäure (3 mal so stark wie U. S. A. X sie verwendet) zugesetzt, um die gleichen Bedingungen wie früher herzustellen. Pepsinlösung wie bei Serie III; Zeit zwischen der ersten und letzten Pepsinzugabe 2 Stunden 40 Minuten (No. 10 ausgenommen).

No. = zeitliche Reihenfolge	Pepsinlösung in ccm	Ungelöstes in ccm
3	3,15	0,53
8	3,15	0,7
9	3,30	0,6
4	3,30	—
1	3,50	0,5
2	3,50	0,56
5	3,50	0,55
6	3,65	0,52
7	3,80	0,47
10	10,00	0,325

Resultat: 1. No. 3 liegt stark außerhalb der Kurve, die im übrigen nicht mehr das Ansteigen zeigt, obwohl die Versuchsdauer für die ganze Reihe um 50 Minuten verlängert war.

2. Der absolute Wert\*) und die „Total“-Verdauung sind sehr viel tiefer als bei der vorhergehenden Serie.

V. Serie: Zum gleichen Zweck wie IV. Serie; drei Proben eines Eiweißgemisches genau nach U. S. A. X angesetzt (Säure sofort nach Abwägen) mit je 30 Minuten Intervall:

No.	Pepsinlösung in ccm	Ungelöstes in ccm
1	3,5	0,75
2	3,5	0,75
3	3,7	0,65

\*) Wurde durch das lange Verweilen des Eiweißes im Wasser verursacht.

Um eine zu jeder Zeit reproduzierbare Enzymlösung herstellen zu können, griffen wir zu der von Michaelis und Rothstein<sup>25)</sup> empfohlenen Glycerin-Pepsin-Stammlösung:

Das Pepsintrockenpräparat (Pepsin Witte U. S. A. X) wurde in der 10 fachen Menge 10 proz. Kochsalzlösung gelöst, eine Woche lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen, filtriert und mit der gleichen Menge Glycerin versetzt. Um diese Lösung für den Versuch zu verdünnen, wurde sie bis etwa 5 cm oberhalb der eigentlichen Marke einer 5 ccm-Pipette, wo noch eine zweite Marke eingeritzt war, aufgesaugt, der eingetauchte äußere Teil der Pipette abgewischt, bis zur eigentlichen Marke ausfließen gelassen und die bleibenden 5 ccm mit destilliertem Wasser in einem 250 ccm fassenden Meßkolben vermischt. Durch mehrmaliges Aufsaugen der Lösung wurde die Pipette gründlich ausgewaschen und die Lösung nachher auf 250 ccm ergänzt.

VI. Serie: Das Eiweiß von 3—5 Tage alten Eiern wurde nach 40 Minuten langem Abkühlen auf der Tischplatte gut gemischt und 4 Proben abgewogen; Säurezusatz sofort; Ansätze gleichzeitig; sonst genau nach U. S. A. X.; Pepsinlösung: 5 ccm Glycerinstammlösung auf 250 ccm.

No.	Pepsinlösung in ccm	Wasser in ccm	Ungelöstes in ccm
1	3,0	4,0	1,51
2	3,75	3,25	1,21
3	4,7	2,3	0,83
4	5,85	1,15	0,64

VII. Serie: Zwei weitere Reihen gleich wie Serie VI mit dem gleichen Eiweißgemisch a) gleichzeitig angesetzt; b) nach je 10 Minuten angesetzt.

No.	Pepsinlösung- in ccm	Wasser in ccm	Ungelöstes in ccm	
			a)	b)
1	4,0	3,0	1,17	1,10
2	4,2	2,8	0,94	1,04
3	4,4	2,6	0,99	0,90
4	5,65	2,35	0,83	0,81

Resultat: 1. Die Resultate der Serien VI und VII zeigen ziemlich gute Übereinstimmung.

2. Die Kurve verläuft ziemlich geradlinig, und das Sinken der Pepsinmenge um 5% (Serie VII) dürfte als Grenze gelten, wo die Ausschläge unsicher werden (vgl. No. 2 a) und 3 a)).

VIII. Serie: Je eine Reihe a) mit der Pepsin-Stammlösung (5 ccm auf 250 ccm) und b) mit Pepsin Siegfried (0,4 gr auf 50 ccm n/12 Salzsäure); Aufarbeitung je einer Probe von a) und entsprechende von b) paarweise. (Bei den Parallelversuchen 3 und 4 versagte während der Verdauung während einer gewissen Zeit das Rührwerk des Wasserbades).

<sup>25)</sup> Bio. Z. 105, 60 (1920).

No.	a.			b.		
	Pepsinlösung in ccm	Wasser in ccm	Ungelöstes in ccm	Pepsinlösung in ccm	Wasser in ccm	Ungelöstes in ccm
1	4,0	3,0	0,98	3,2	1,8	0,95
2	4,2	2,8	0,89	3,35	1,65	0,62
3	4,4	2,6	0,56	3,55	1,45	0,59
4	4,65	2,35	0,82	3,7	1,3	0,87

Resultat: Die Parallelität ist offensichtlich. Die Richtung der Kurve ist abgesehen von No. 3 dieselbe.

Die vorstehenden Versuche zeigen, daß durch Verwendung eines Eiweißgemisches von mehreren Eiern die Schwankungen bedeutend geringer sind und daß die Methode an und für sich (ohne Betrachtung der durch das Eiweiß hervorgerufenen Schwankungen) im allgemeinen auf 10% Änderung der Enzymmenge gut anspricht. Eine wesentliche Schwächung der Enzymlösung während 1—2 Stdn. ist nicht zu befürchten, hingegen konnte die nachteilige Wirkung, welche sich durch eine Verzögerung des Aufarbeitens bezw. des Säurezusatzes geltend machte, in den letzten Versuchen ausgeschaltet werden.

Es schien uns auch sehr wahrscheinlich, daß die durch die Präparation des koagulierten Eiweißes bedingten Schwankungen des „Unverdaubaren“ sich im Resultat in einem verkleinerten Maßstab wiedergeben müssen. Von vier Eiern wurde das koagulierte Eiweiß in kleine Stücke geschnitten, gemischt, in zwei Hälften geteilt und bei der einen a) die Eihäute sorgfältig abgelöst, b) die Eihäute daran gelassen. Diese Vorbereitung bedingte notgedrungen einen längeren Kontakt des Eiweißes mit der Luft, sodaß die Werte höher und als nicht mit den früheren vergleichbar zu erwarten waren.

No.	Pepsinlösung in ccm	a)		b)	
		Ungelöstes in ccm	Ungelöstes in ccm	Ungelöstes in ccm	Ungelöstes in ccm
1	4,0	1,43	1,48	1,48	1,44
2	4,2	1,24	1,16	1,34	—
3	4,4	1,12	0,77	—	—
4	4,65	—	—	—	—
5	∞	0,49	—	—	—

Resultat: Man sieht deutlich, daß bei b) die durch das Sieb gegangenen Häute eine Erhöhung verursacht haben. In der Regel wird ein Teil der Häute (ebenso die sog. Hagelschnüre) durch das Sieb zurückgehalten.

## C. Versuche mit Lamellen-Eiweiß.

Vorversuche: Die Lösung von 0,25 gr Lamellen-Eiweiß in einem Liter Wasser, welche ca. 2,5 gr Kochsalz enthielt, gab nach dem Ansäuern mit Essigsäure (gegen Lackmus) und Kochen eine flockige Fällung. Das Filtrat reagierte noch schwach sauer und schwach positiv mit Gerbsäure nach Hedin<sup>26)</sup> (Ovomucoid), negativ mit Sulfosalicylsäure.

In 50 ccm einer 4 promill. Lösung blieben nach dem Eindampfen und Trocknen bei 103—105° 0,1775 gr; Trockenrückstand = 88,8%.

In 50 ccm der gleichen Lösung betrug der durch Hitze koagulierbare Anteil (Filtration durch Jenaer-Glasfilter 1 G 3) a) 0,1379 gr; b) 0,1383 gr, was 77,7% des Trockenrückstandes der Lösung bezw. 70% des ursprünglichen Eiweißes ausmacht.

Der Verbrennungsrückstand betrug 5% des Trockenrückstandes der Lösung.

50 ccm der 4 promill. Lösung + 100 ccm 0,25 n-HCl 4—5 Stunden bei 40° und etwa 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen; hierauf mit 300 ccm n/12 NaOH versetzt (ph = 6,5); aufgekocht und successive verdünnte Essigsäure zugegeben, bis nach wiederholtem Aufkochen flockige Fällung eingetreten war. Filtrat: ph = 5,3. Spiegler-Jolles Reagens negativ. Tannin nach Hedin schwach positiv. Gewicht des Niederschlages 0,1383 gr.

Resultat: Die Einwirkung von Säure, wie sie bei einem Verdauungsversuch vorliegt, hatte keinen merklichen Einfluß auf die Menge des koagulierbaren Anteiles.

Nun wurde durch Verdauen von koaguliertem Hühnereiweiß eine 2-proz. Peptonlösung hergestellt. Durch Aufkochen des Filtrates entstand in der schwach sauren Lösung wieder eine Fällung, welche durch erneute Filtration abgetrennt wurde. Die so erhaltene Lösung gab folgende Reaktionen: Sulfosalicylsäure positiv, Tannin nach Hedin stark positiv; mit Essigsäure allein in der Kälte, von ph 4 an abwärts, entstand eine Fällung, welche beim Aufkochen fast vollständig verschwand und in der Kälte wieder erschien.

\* \* \*

Verschiedene Mengen einer etwa 2—2,5 proz. Eiweißlösung wurden mit der obigen 2proz. Pepton-Lösung auf 50 ccm ergänzt, so daß also eine künstliche Verdauungsflüssigkeit vorlag, deren Eiweißmengen um das Doppelte anstiegen. Bei diesen Versuchen stellte sich heraus, daß die Verwendung von Glasfiltern bei Anwesenheit von Pepton sehr ungeeignet ist. Gleichzeitiges Einwägen eines Wattebausches auf die Filterplatte brachte keine Besserung.

No.	Eiweißlösung ca. 2—2,5 proz. in g	auf 50 ccm aufgefüllt mit	Gewicht des Niederschlages	Filtration	Filtrat
1	7,31 1:10*) verd.	Peptonlösung	—	unmöglich	—
2	7,31 1:10 "	Wasser	0,0187	sehr gut	klar
3	15,62 1:10 "	Peptonlösung	0,0375	schlecht	"
4	31,25 1:10 "	"	0,0715	sehr schlecht	schwach opaleszent
5	6,25 "	"	0,115	" "	opaleszent
6	12,5 "	"	0,2745	gut **) "	sehr schwach opaleszent

Ein ziemlich gutes Kriterium für die zu erwartenden Werte gibt das Aussehen des Filtrates. Ist dieses opaleszent, so erhält man zu tiefe Werte.

<sup>26)</sup> Hedin und Masay: H. 100, 263 (1917); 100 gr Gerbsäure + 50 gr Natriumchlorid + 50 gr Natriumacetat + 50 ccm Eisessig auf 1 Liter Wasser; zit. nach Rona: Prakt. d. physiol. Chem., Bd. 1, S. 223.

\*) Verdünnung mit Pepton-Lösung bezw. Wasser.

\*\*) Durch Faltenfilter filtriert, im Wägeglas getrocknet und gewogen.

Die 50 ccm des Eiweißpeptonmischung wurden in Bechergläsern auf etwa 150 ccm mit Wasser verdünnt, zum Sieden erhitzt und tropfenweise (etwa 0,5—1 ccm) 0,2 proz. Essigsäure zugegeben (bis lackmussauer) und noch mehrmals aufgekocht. Um Stoßen und Spritzen zu vermeiden, erhitzen wir in allen folgenden Versuchen unter Umrühren bis zum Sieden und ließen längere Zeit (ca. 1/2 Stunde) über kleiner Flamme auf dem Asbestdrahtnetz stehen.

Die Wiederholung der Versuche 1 und 2 (s. obige Tabelle) unter Benützung von Faltenfiltern ergab für a) mit Pepton b) ohne Pepton, folgende Gewichte an koaguliertem Eiweiß: a) 0,0180; 0,0175; b) 0,0189; 0,0187; 0,0183; Filtrate klar.

5 ccm einer Eiweißlösung a) mit Pepton b) mit Wasser verdünnt ergab nach Filtration durch Faltenfilter: a) 0,1082; b) 0,0975; Filtration sehr gut; Filtrate klar.

Kurze Zusammenstellung von verschiedenen konzentrierten Eiweißlösungen mit wechselnden Salzsäuremengen und deren ph.

1. Verdauungsflüssigkeit der nachfolgenden I. Serie bei Zimmertemp.	ph = 1,72
2. 3-proz., frisch bereitete Eiweißlösung in n/12 HCl	ph = 1,46
3. 2. über Nacht stehen gelassen	ph = 1,57
4. 3-proz. frisch bereitete Eiweißlösung in n/24 HCl	ph = 2,32
5. 3 g Eiweiß in 75 ccm n/12 HCl + 25 ccm H <sub>2</sub> O	ph = 1,76
6. 1,5 g " " 50 ccm n/12 HCl + 50 ccm H <sub>2</sub> O	ph = 1,75
7. 1,5 g " " 75 ccm n/12 HCl + 25 ccm H <sub>2</sub> O	ph = 1,46
8. 0,75 g " " 75 ccm n/12 HCl + 25 ccm H <sub>2</sub> O	ph = 1,38
9. 0,75 g " " 50 ccm n/12 HCl + 50 ccm H <sub>2</sub> O	ph = 1,56

### Hauptversuche:

I. Serie: 6 gr Lamelleneiweiß in 200 ccm n/12 HCl gelöst + 20 ccm Pepsinlösung (5 ccm Glycerinstammmlösung + 5 ccm HCl n/12 + aq. ad. 250 ccm) bei 48°; Unterbruch durch eine der Entnahme entsprechende Menge n/12 NaOH.

Verdauungszeit in Stunden	Entnahme in ccm	Gewicht des Eiweißes	auf 10 ccm Entnahme	Eiweiß verdaut	Eiweiß verdaut in % d. Gesamteiweißes
0	10	0,1948	0,195	0	—
1	20	0,2675	0,133	0,062	
1 1/2	25	0,3057	0,122	0,073	
2	25	0,2748	0,110	0,085	
2 1/4	25	0,2628	0,105	0,090	
2 1/2	25	0,2471	0,099	0,096	49,2
2 3/4	50	0,4828	0,0965	0,0985	
5 1/2	10	0,0654	0,0654	0,1296	ca. 67

II. Serie: 100 ccm 3 proz. Eiweißlösung + 10 ccm Pepsinlösung (5 ccm Glycerinstammmlösung + 5 ccm n/12 HCl in aq. ad 100 ccm); Eiweißlösung durch mehrfache Gaze filtriert; bei 48°; nach der Koagulation durch Faltenfilter filtriert.

Verdauungszeit	Entnahme in ccm	Gewicht des Eiweißes	auf 10 ccm Entnahme	Eiweiß verdaut	Eiweiß verdaut in % d. Gesamteiweißes
0	20	0,3406	0,170	0	
2 h 10 m	25	0,1421	0,0568	0,113	
2 h 30 m	25	0,1307	0,0523	0,118	69,2
2 h 41 m	25	0,1276	0,0510	0,119	
2 h 51 m	25	0,1236	0,0494	0,121	
3 h 01 m	25	0,1206	0,0482	0,122	

**Resultat:** Eine Verminderung der Pepsinmenge um 10% ruft eine Änderung um 5% hervor. Stellt man das Gewicht des verdauten Eiweißes als Funktion der Zeit graphisch dar, so sieht man, daß sich die Einzelpunkte gut einordnen. Für die erste Serie erhält man im Intervall von 1—2<sup>3</sup>/<sub>4</sub> Stunden annähernd eine Gerade, während der Anstieg sehr viel steiler erfolgt. Denselben Verlauf zeigt die nächste Serie (III) mit Ovalbumin „krist.“ Kahlbaum.

III. Serie: 100 ccm 3 proz. Lösung von Ovalbumin „krist.“ Kahlbaum in n/12 HCl + 10 ccm Pepsinlösung (5 ccm Glycerinstamm-lösung + 5 ccm n/12 HCl + aq. ad 250 ccm); durch Watte filtriert; bei 48°; nach der Koagulation durch Faltenfilter filtriert.

Verdauungszeit	Entnahme in ccm	Gewicht des koagulierten Eiweißes	auf 10 ccm Entnahme	Eiweiß verdaut	Eiweiß verdaut in % d. Gesamteiweißes
0	20	0,3519	0,176	0	
30 m	20	0,2770	0,138	0,038	
61 m	20	—	—	—	
90 m	20	0,2107	0,105	0,071	
2 h 30 m	20	0,1667	0,0833	0,093	52,8

IV. Serie: a) 3 proz. Eiweißlösung in n/12 HCl über Nacht stehen gelassen;

b) und c) 3 proz. Eiweißlösungen in n/12 HCl am Morgen frisch bereitet;

a), b) und c) durch vierfache Gaze filtriert und je zwei Proben wie folgt angesetzt;

50 ccm Eiweißlösung + 5 ccm Pepsinlösung (5 ccm Glycerinstamm-lösung + 5 ccm n/12 HCl + aq. ad 250 ccm); 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Stunden bei 48°; koaguliert und durch Faltenfilter filtriert:

Versuch	Gewicht auf 10 ccm der Entnahme bezw. vor nach Verdauung		Eiweiß verdaut	Eiweiß verdaut in % d. Gesamteiweißes	ph der Verdauungsflüssigkeit
	vor	nach			
a <sub>1</sub>	0,173	0,074	0,099	57,2	1,72
a <sub>2</sub>	0,172	0,075	0,097	56,4	
b <sub>1</sub>	0,1775	0,083	0,0945	53,2	1,69
b <sub>2</sub>	0,173	0,079	0,094	54,3	
c <sub>1</sub>	0,177	0,083	0,094	53,1	1,73
c <sub>2</sub>	0,174	0,079	0,095	54,6	

**Resultat:** Die Verdaubarkeit von a) hat sich nur wenig geändert.

Zur Prüfung der Konstanz des Substrates verwendeten wir 7 weitere aus dem Handel von verschiedenen Orten bezogene Lamellen-Eiweißpräparate, welche wir mit A, B, C etc. bezeichnen.

V. Serie: 3 proz. Lösungen von A), B) und C) in n/12 HCl durch 4-fache Gaze filtriert; Pepsinzusatz und Verdauung wie IV. Serie; nach der Koagulation durch Jenaerglasfilter 1 G 3 filtriert.

3 proz. Lösungen von E) und F) in n/12 HCl über Nacht langsam geschüttelt, dann durch doppeltes, mit Watte bedecktes Papierfilter auf der Nutsche filtriert, je 100 ccm wie üblich verdaut und nach der Koagulation durch sehr kleine, aschefreie, dichte Filter filtriert.

Eiweiß	Eiweiß auf 10 ccm der Entnahme		Eiweiß verdaut	Eiweiß verdaut in % d. Gesamteiweißes	Filtration bzw. Filtrat	Reaktion des Filtrates gegen Lackmus
	vor	nach				
A	0,1720	0,0779	0,094	54,7	schwach op. s. schlecht	schwach sauer
B	0,1742	0,0803	0,094	53,9	schwach op. s. schlecht	schwach sauer
C	0,1754	0,0793	0,096	54,9	klar gut	deutlich sauer
E	0,1882	0,0866	0,102	54,0		—
F	0,1925	0,0917	0,101	52,4		—

VI. Serie: 3 proz. Lösungen von B) und C) über Nacht stehen gelassen, nachdem sie am Abend geschüttelt wurden. Es setzte sich ein Bodensatz, der durch Filtration durch ein mit Watte bedecktes Doppelfilter abgetrennt wurde. Pepsinlösung mit Toluolzusatz ca. 24 Stunden im dunkeln aufbewahrt; 50 ccm Eiweißlösung + 5 ccm Pepsinlösung wie früher. Nach der Koagulation, Filtration durch Faltenfilter aus dichtem, aschefreiem Papier.

Eiweiß	Eiweiß auf 10 ccm der Entnahme		Eiweiß verdaut	Eiweiß verdaut in % d. Gesamteiweißes
	vor	nach		
B	0,1851	0,0874	0,098	52,8
C	0,1880	0,1007	0,101	53,6

VII. Serie: 3 proz. Lösungen von D) und G) wurden frisch hergestellt und wie Serie VI angesetzt; jedoch methodisch abgeändert, sodaß die Resultate nur unter sich vergleichbar sind.

Eiweiß	Eiweiß auf 10 ccm der Entnahme		Eiweiß verdaut	Eiweiß verdaut in % d. Gesamteiweißes
	vor	nach		
D	0,1965	0,0829	0,114	57,8
G	0,1937	0,0866	0,107	55,3

Die Verdauungsgröße ist von der Substratkonzentration abhängig. Wir haben es vorgezogen, für den Vergleich der Resultate das Verhältnis des verdauten Eiweißes zum ursprünglich vorhandenen in Prozenten anzugeben, wohl wissend, daß beide Größen nicht linear voneinander abhängen. Der Fehler dürfte jedoch für diese geringen Konzentrationsänderungen in unseren Versuchen nicht ins Gewicht fallen.

Nur in der I. Serie weicht die prozentische Verdauung erheblich von den übrigen Werten ab, welche im wesentlichen unter denselben Bedingungen erhalten wurden (Serie VII ausgenommen).

Der Nullwert der II. Serie schließt sich eng an denjenigen der übrigen Bestimmungen an, so daß wir durch Vergleich dieser Serie mit den folgenden ziemlich sichere Schlüsse auf die Empfindlichkeit der Methode ziehen können. Eine Verminderung der Pepsinmenge um 60% bewirkt eine Verminderung der prozentischen Verdauungsgröße von ca. 15 Einheiten bei einer Verdauung zwischen 70 und 55%. Der mittlere Fehler beträgt bei einer Verdauung von ca. 55% = 0,76%, berechnet aus den Abweichungen der Resultate vom Mittelwert jeder vergleichbaren Gruppe von Bestimmungen, nach der Formel:

$$fm = \sqrt{\frac{\sum (f^2)}{n-1}} = \sqrt{\frac{8,1013}{14}} = 0,76.$$

(Der abweichende Wert für die Verdauung während 2½ Stunden der I. Serie wurde nicht einbezogen.)

Eine Pepsinverminderung um 10% ruft eine Änderung der prozentischen Verdauung um ca. 2,5 Einheiten hervor (s. oben). Diese Änderung dürfte bei geeignetem Ausbau der Methode etwa der Fehlergrenze nahe kommen, welche durch Substrat und Methode zusammen bedingt wird.

Im Zusammenhang mit obiger Methode ersetzen wir das Hühnereiweiß durch Casein und fällen dieses mit Sulfosalicylsäure. Vorversuche erwiesen, daß Sulfosalicylsäure Caseinabbauprodukte nicht oder nur in geringer Menge fällt. Die Fällung wird durch Alkoholzusatz nicht merklich verstärkt. Deshalb gedachten wir, die auf dem Filter (Jenaerglasfilter) gesammelten Niederschläge gleich mit sulfosalicylsäurehaltigem Alkohol, dann mit Alkohol und Äther nachzuwaschen. Beim Auswaschen des Niederschlages mit sulfosalicylsäurehaltigem Alkohol konstatieren wir, daß dieser stark lösend wirkt. Gab man zum alkoholischen Filtrat Wasser, so trat Trübung der Mischung ein.

Unter bestimmten Kautelen kommt man durch Auswaschen mit sulfosalicylsäurehaltigem Wasser und Wasser zu konstanten Werten. Die Methode hat jedoch keinerlei Vorteile gegenüber derjenigen mit Hühnereiweiß und wurde daher nicht weiter ausgearbeitet.

## D. Groß'sche Methode.<sup>27)</sup>

Allgemeines: Die Methode ist als Reihenversuch gedacht und mißt die geringste Menge Pepsin, welche gerade noch genügt, um ein dargebotenes Quantum Casein so weit zu verändern, daß es mit Natriumacetat nicht mehr ausfällt. Natriumacetat ändert die Reaktion des Verdauungsgemisches gegen den isoelektrischen Punkt des Caseins. Im wesentlichen ist die Methode durch Verbesserungsvorschläge nicht verändert worden. Sie läßt sich ebenso gut bei der Trypsinkinase-Bestimmung verwerten. Die Zeit-Umsatz-Kurven, welche man mit der nephelometrischen Methode von R o n a und K l e i n m a n n<sup>28)</sup> erhielt, zeigen einen asymptotischen Verlauf der Caseinhydrolyse durch Pepsin, was eine starke Beeinträchtigung der Empfindlichkeit der Methode erwarten läßt. Viele Autoren heben diesen Nachteil hervor (z. B. G l ä ß n e r<sup>29)</sup>).

Vorschrift: 1 gr Casein nach Hammarsten wird in 16 ccm 25 proz. Salzsäure (spez. Gewicht 1,124) in 1 Liter-Meßkolben unter vorsichtigem Erwärmen auf dem Wasserbad gelöst. Nun ergänzt man mit Wasser auf 1 Liter.

Je 10 ccm der Caseinlösung werden in Reagensgläsern mit fallenden Mengen einer Pepsinlösung versetzt und während 15 Minuten auf einer Temperatur von 38—40° gehalten. Nach Ablauf dieser Zeit wird mit 20 Tropfen 20 proz. Natriumacetatlösung die Verdauung unterbrochen. Es darf durch diesen Zusatz keine Fällung mehr eintreten.

Nach B a c h s t e z<sup>30)</sup> soll die Auflösung des Caseins in Salzsäure nur etwa drei Minuten dauern und die Lösung höchstens rot, nicht aber violett gefärbt sein. B ü m m i n g<sup>31)</sup> berichtet, daß es ihm nicht gelang, eine Auflösung in dieser Zeit zu erreichen. Die Lösung war violett und der beim Verdünnen mit Wasser entstandene Niederschlag löste sich erst nach 20 minutenlangem Erwärmen auf dem Wasserbad. Er fand, daß längeres Erwärmen (50 Min.) des Gemisches die Angreifbarkeit durch Pepsin beeinflusst.

Was die Herstellung der Caseinlösung anbelangt, muß man nach unsern Erfahrungen vor allem darauf bedacht sein, daß sich keine Casein-Knoten bilden. Man benützt einen gut trockenen Meßkolben, verteilt das Casein auf dessen Boden, gibt die Säure hinzu und mischt durch kräftiges Umschwenken (Hin- und Herbewegen). Hierauf erwärmt man auf dem Wasserbade bis zur vollständigen Lösung und verdünnt möglichst rasch mit einer großen Menge warmen Wassers von ca. 60—70°. Der sich bildende Niederschlag geht rasch wieder in Lösung. Besser als das Lösen im Meßkolben bewährte sich das Anreiben des Caseins mit der Salzsäure in einer geräumigen Porzellanschale unter zeitweiligem Erwärmen auf dem

<sup>27)</sup> Berl. klin. Wo. 45, 643 (1908).

<sup>28)</sup> Bio. Z. 140, 478 (1923).

<sup>29)</sup> Bio. Z. 127, 312 (1922).

<sup>30)</sup> P. C. H. 61, 479 (1920).

<sup>31)</sup> Ap. 44, 964 (1929).

Wasserbad. Die Casein-Salzsäure-Lösung bleibt gewöhnlich unverändert oder sie wird höchstens schwach rot. Verdünnt man nun auf einmal mit etwa  $\frac{2}{3}$  der erforderlichen Wassermenge von ca. 60—70°, so entsteht sofort eine klare Caseinlösung, welche quantitativ in den Liter-Meßkolben gespült wird.

Die meisten Autoren, welche sich der Groß'schen Methode bedienen, arbeiteten mit einer um 50% fallenden Pepsinreihe: Man erhält dabei nach dem Acetatzusatz schematisch folgendes Bild. Reagensglas 1 (größte Pepsinmenge) ist sehr schwach, Reagensglas 2 ist deutlich opaleszent, Reagensglas 3 weist eine starke Trübung auf. Brandrup<sup>32)</sup> spricht von einer beginnenden Trübung und einer starken Trübung. Läßt man das angewandte Pepsin fiktiv kontinuierlich schwächer werden, so nehmen die Trübungen in allen drei Reagensgläsern zu. Man wird so in ein Gebiet kommen, wo man nach dieser Festlegung des Endpunktes unentschlossen sein wird, zwischen welchen zwei Reagensgläsern man die Grenze zu ziehen hat. Die Breite dieses Bereiches wird ein Maß für die Empfindlichkeit dieser Methode darstellen. Man kann sich aber noch auf andere Weise hierüber orientieren, indem man Reihen mit immer kleineren relativen Unterschieden der Pepsinmengen ansetzt. Man wird zu Reihen kommen, bei denen eine festgelegte Definition (sei es nun mit oder ohne Vergleichstrübung) versagt. Für den vorliegenden Fall ist dann die Empfindlichkeitsgrenze erreicht, und die betreffende in Prozenten oder durch den Faktor der Reihe ausgedrückte Zahl ergibt dann deren Maß. Die Übung ist hier von großer Wichtigkeit. In der Nähe der Empfindlichkeitsgrenze wird man also mit sehr stark subjektiven Beurteilungen rechnen müssen.

### Experimentelles:

I. Versuch: Caseinlösung: nach der obigen Vorschrift hergestellt, zeigte den ph 1,09 bei 20°;

Pepsinlösung: 5 ccm Glycerinstammlösung auf 250 ccm verdünnt. Reihe um 50% fallend.

Reagensglas	a	b	c	d	e
Enzymlösung in ccm	0,63	3,15*	1,55*	0,77*	0,38*
aq. ad 5 ccm					
Caseinlösung 10 ccm.					

\*) 1 : 10 verdünnte Pepsinlösung.

Nach dem Acetatzusatz wurden die Trübungen nephelometrisch verglichen und sie verhielten sich wie folgt:

$$\begin{array}{l}
 e : d = 2 : 1 \qquad c : b = 2 : 1 \\
 d : c = 3,1 : 1 \qquad b : a = 1,7 : 1 \\
 d : b = 4,9 : 1.
 \end{array}$$

Die Werte sind Näherungswerte, da Schwankungen der h nach der Natriumacetatzugabe und Stabilität der Trübungen von Einfluß auf das Ergebnis sein können.

<sup>32)</sup> Ap. 43, 1472 (1928).

II. Versuch: Wir prüften nun nach, ob die violette Verfärbung der Auflösung von Casein in 25 proz. Salzsäure, wie sie ohne absichtliches Zutun entsteht, von Einfluß auf die Verdauungsergebnisse sein kann.

Zwei Reihen wie im I. Versuch angesetzt, und die Trübungen der sich entprechenden Röhrcchen verglichen:

1. Caseinsalzsäurelösung nicht violett;
2. Caseinsalzsäurelösung violett.

	Reagensglas	a	b	c	d	e
1.	Nephelometer-Skalenteile	—	10	10	10	10
2.	" "	—	11,6	9,9	8,5	10,3

Innerhalb jeder Reihe ergaben sich folgende Verhältnisse in Nephelometer-Skalenteilen:

- |                      |                      |
|----------------------|----------------------|
| 1. e : d = 10 : 18,8 | 2. d : c = 10 : 23,5 |
| c : b = 10 : 18,2    | c : b = 10 : 21,1    |
|                      | b : a = 10 : 17,0.   |

Resultat: Eine wesentliche Veränderung des Caseins scheint durch das Auftreten der Violettfärbung nicht eingetreten zu sein. Die Trübungen verhalten sich ebenso wie im ersten Versuch etwa wie 1 : 2, also umgekehrt, wie die zugegebenen Pepsinmengen.

III. Versuch: Um eine Vorstellung zu bekommen über die Empfindlichkeit der Methode, verminderten wir den Faktor der Reihe allmählich und beobachteten, wo die Beurteilung der Trübungsunterschiede unsicher wurde. Arbeitet man ohne Vergleichslösung, so ist es notwendig, für das sog. kritische Röhrcchen eine Definition zu geben, weil die Trübungen nicht plötzlich aufhören. Auffällig ist, daß diese bei stärkeren Trübungen deutlich schwächer werden, während bei schwachen Trübungen bezw. Opalescenzen die Unterschiede verhältnismäßig gering sind. Zur Beurteilung wählten wir folgendes Kriterium:

Die Röhrcchen links (der untenstehenden Reihen) vom kritischen, d. h. demjenigen, welches wir noch als genügend weit verdaut betrachten, unterscheiden sich von diesem kaum mehr, das Röhrcchen rechts soll deutlicher, das zweite nach rechts soll sehr deutlich stärker trüb sein. Die Betrachtung erfolgte schief von oben im auffallenden Licht bei senkrecht gehaltenen Reagensgläsern gegen einen dunklen Hintergrund.

Pepsinlösung: 5 ccm Glycerinstamm-*l*ösung auf 200 ccm verdünnt; wechselnde Mengen hiervon bezw. von einer Verdünnung 1 : 10 \*) + Wasser ad 5 ccm + 10 ccm 1 promill. Caseinlösung.

Pepsinmenge abnehmend um	a	b	c	d	e	f	g	h	i
50 % (Faktor = 2,0)			0,63	<b>3,15*</b>	1,55*	0,77*			
33 % ( " = 1,5)		0,58	3,9*	<b>2,6*</b>	1,73*	1,15*	0,77		
28 % ( " = 1,4)		0,58	4,15*	2,95*	<b>2,1*</b>	1,5*	1,07*	0,77*	
23 % ( " = 1,3)	0,63	4,85*	3,7*	2,85*	<b>2,2*</b>	1,7*	1,3*	1,00*	0,77*

(fettgedruckt = kritisches Röhrcchen)

Die Herstellung von sauren Caseinlösungen von mehr als 1 %<sub>00</sub> Gehalt bietet einige Schwierigkeit. Durch direkte Auflösung nach der beschriebenen Art in einer Porzellanschale kamen wir nicht über eine Konzentration von 3 %<sub>00</sub> hinaus. Es gelingt jedoch leicht nach folgender Methode eine 5 promill. Lösung zu erhalten: 1 gr Casein wird mit 1 ccm 25 proz. Salzsäure und Äther zu einem

Die Trübungen der Röhren g bis d der letzten Reihe verhielten sich wie folgt:

$$\begin{aligned}g : f &= 1,5 : 1 \\f : e &= 1,4 : 1 \\e : d &= 1,2 : 1\end{aligned}$$

Resultat: Man sieht, daß in diesem Gebiet annähernd die gleiche Relation zwischen den Trübungen besteht, wie zwischen den zugegebenen Pepsinmengen und daß, soweit die nephelometrischen Ergebnisse überhaupt interpretiert werden dürfen, bei geringen Trübungen die geforderte Abnahme eher geringer wird.

In der letzten Reihe ist also die Empfindlichkeitsgrenze schon überschritten, nicht so sehr, weil die einzelnen Trübungsunterschiede nicht mehr wahrgenommen werden könnten, sondern eher infolge der unzulänglichen Definition des kritischen Röhrens. Stellt man nämlich eine geeignete Silberchlorid-Suspension her, so läßt sie sich von Auge noch mit ziemlicher Sicherheit einreihen.

Wir versuchten nun durch Variation des Eiweiß-Fällungsmittels, der Substratkonzentration (siehe Fußnote S. 44) und der Verdauungszeit eine Verbesserung der Methode zu erreichen, aber ohne Erfolg. Die nephelometrischen Versuche mit Sulfosalicylsäurefällungen zeigten, wie Rona und Kleinmann<sup>33)</sup> angeben, starke Tendenz zur Ausflockung und sind in dieser Hinsicht unbrauchbar. Proben, welche durch Natriumacetatzusatz keine Opaleszenz mehr erkennen ließen, gaben noch Trübungen mit Kaliumferrocyanid-Essigsäure und Sulfosalicylsäure. Bei der Natriumacetatzugabe ist die Geschwindigkeit des Zusatzes von Bedeutung. Gleiche Mengen geben verschieden starke Trübungen je nachdem das Acetat langsam in kleinen Portionen oder alles auf einmal zugegeben wird.

Eine 14 Tage alte, sorgfältig hergestellte 1 promill. Caseinlösung zeigte gegenüber einer frisch bereiteten Lösung kaum veränderte Verdaubarkeit.

Andere Caseinsorten von geringerem Reinheitsgrad, z. B. Qualität „purum“ oder „technicum“, sind unbrauchbar, weil sie sich zum Teil schlecht und nicht klar lösen.

\* \* \*

dünnen Brei angerieben und möglichst rasch mit heißem Wasser verdünnt; schließlich auf 200 ccm ergänzt. Die Salzsäuremenge ist gegenüber den früheren Versuchen vermindert. Fügt man den fehlenden Teil vor dem Auffüllen der Lösung auf 200 ccm hinzu, so entsteht eine Fällung, welche sich aber ziemlich leicht durch Erwärmen auf dem Wasserbad wieder löst.

Die Caseinlösungen zeigten folgende ph-Werte:

1 ‰	ph = 1,12 bei 17°
3 ‰	ph = 1,16
5 ‰	ph = 1,17

<sup>33)</sup> Bio. Z. 155, 34 (1925).

Nun versuchten wir die Methode zur Trypsinbestimmung nach U. S. A. X, mit welcher wir, wie in Kapitel Pankreatin beschrieben, gute Resultate erzielt hatten, auf das Pepsin zu übertragen. Der Unterschied der Methoden liegt im wesentlichen nur in der Herstellung der Caseinlösung und in der Reaktion der Verdauungsflüssigkeit.

Die Originalmethode von Groß kann zwar nicht hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit, wohl aber ihre Methodik betreffend, verbessert und eindeutiger gestaltet werden. Der ph der Verdauungsflüssigkeit ist sehr niedrig (zwischen 1,0 und 1,2 je nach der Flüssigkeitsmenge, welche zu den 10 ccm Caseinlösung gegeben wird) und die Auflösung des Caseins könnte event. Schwierigkeiten bereiten. Die Ausführungsart der U. S. A. X scheint uns gerade in dieser Hinsicht sehr viel günstiger zu sein. Um einige Unklarheiten noch zu beseitigen und um die Natriumacetatzugabe genauer zu limitieren, stellten wir untenstehende Versuche an. Gerade bei saurer Reaktion, welche man durch Natriumacetat gegen das Alkalische verschiebt, ist es sehr wichtig, den isoelektrischen Punkt des Caseins (ph = 4,6—4,9) nicht zu überschreiten, weil jenseits desselben sehr leicht wieder Lösung eintritt. Z. B.:

10 ccm einer verdünnten Caseinlösung + a) 1 ccm Natriumacetat ca. 2 n;  
b) 1,25 ccm Natriumacetat ca. 2 n.

Nephelometer-Skalenteile

a) = 20	b) = 21,8
ph = 4,88	ph = 5,04

Wir suchten nun zu ermitteln, ob die Behandlung des Caseins mit 25 prozentiger Salzsäure bei der Groß'schen Methode im Vergleich zum Vorgehen der U. S. A. X für die Verdaubarkeit von Bedeutung ist. Folgende Caseinlösungen wurden hergestellt:

- I) 0,2 gr Casein + 2 ccm 0,1 n-NaOH + 12,5 ccm n-HCl + aq. ad 100 ccm: ph = 0,96.
- II) 0,2 gr Casein + 1,6 ccm 25 proz. HCl + aq. ad 100 ccm (Salzsäure-Caseinlösung nicht violett); ph = 0,94.
- III) 0,2 gr Casein + 1,6 ccm 25 proz. HCl + aq. ad 100 ccm (Salzsäure-Caseinlösung violett); ph = 0,94.

Die Verdünnungen dieser drei Lösungen (10 ccm Caseinlösung + 11,1 ccm n-HCl + aq. ad 100 ccm; hiervon 5 ccm + 5 ccm Wasser + a) 0,75 ccm bzw. b) 1 ccm Natriumacetat ca. 2 n) entsprechen in ihrer Zusammensetzung den Verdauungsansätzen. Sie zeigten folgende Eigenschaften in Bezug auf ihre Trübungen, angegeben in Nephelometer-Skalenteilen (Skt.):

a) I = 20 Skt.	II = 21,1 Skt.	III = 23,7 Skt.
b) I = 20 „	II = 21,2 „	III = 25,1 „

Verdauungsversuch: 5 ccm Caseinlösung + x ccm Pepsinlösung + 5 — x ccm Wasser; 1 Stunde bei 40° + 0,75 ccm ca. 2 n-Acetate; Pepsinlösung: 0,1 gr Pepsin „Witte“ U. S. A. X auf 10 ccm 0,05 n-HCl gestreut, freiwillige Lösung abgewartet, + aq. ad 1000 ccm.

Die Röhren mit gleichem Pepsinzusatz wurden miteinander nephelometrisch verglichen:

Röhrchen	Caseinlösung I*)	Caseinlösung II*)
No. 1	—	—
No. 2	20	27,2
No. 3	20	27,2
No. 4	20	28,6

\*) Caseinlösungen 24 Stunden alt.

Nach 48-stündigem Stehen der Caseinlösungen ergab eine Wiederholung des obigen Versuches folgende Werte (Nephelometer-Skalenteile):

Röhrchen	Caseinlösung I	Caseinlösung II	Caseinlösung III
No. 1	20	24,6	69 (extrapoliert)
No. 2	20	25,0	zu schwach

Resultat: Man sieht, daß die Behandlung mit 25 prozentiger Salzsäure nicht ohne großen Einfluß sein kann auf die Verdaubarkeit. Dieser Befund scheint einem früher erhaltenen Ergebnis zu widersprechen. Sehr wahrscheinlich ist der Eingriff bei der Herstellung einer 2 promilligen Lösung mit der gleichen (an und für sich zu geringen) Menge 25 prozentiger Salzsäure unvergleichlich viel stärker und die Violettfärbung der Casein-Salzsäure-Lösung kein unbedingtes Maß für die leichtere Verdaubarkeit. Wir konnten nicht näher auf diese Frage eintreten und begnügen uns mit der Tatsache, daß eine Zersetzung eintreten kann.

Ein Einfluß, der bei der Neutralisation einer alkalischen Caseinlösung entstanden, geringen Natriumchloridmenge ist nicht zu erwarten und auch nicht nachweisbar.

Caseinlösung:

a) ohne Natriumchloridzusatz; b) Zusatz der doppelten, normalerweise entstehenden Natriumchloridmenge (Angabe der Nephelometer-Skalenteile).

Röhrchen	a)	b)
No. 1	20	20,2
No. 2	20	19,7
No. 3	20	20,0

Uns interessierte ferner, in welchem Sinne sich die Umsatzgröße verschiebt, wenn man von  $ph = 1,25-1,3$  auf  $ph = 1,6-1,7$  im definitiven Verdauungsgemisch geht. Die Natriumacetatzugaben wurden so gewählt, daß in beiden Fällen ein  $ph$  von 4,70 entstand.

Röhrchen	bei $ph$ 1,6—1,7 verdaut	↑ Pepsinmenge abnehmend	bei $ph$ 1,25—1,3 verdaut
No. 1	20		27,1
No. 2	20		26,7
No. 3	20		24,4

wiederholt mit frisch bereiteten Lösungen:

Röhrchen	bei $ph$ 1,6—1,7 verdaut	↑ Pepsinmenge abnehmend	bei $ph$ 1,25—1,3 verdaut
No. 1	20		26,1
No. 2	20		25,1
No. 3	20		23,3

Resultat: Entgegen unserer Erwartung wird bei niedrigerem  $ph$  stärker verdaut, obwohl wir mit der Volhard'schen Methode (s. S. 61) ein Optimum der Verdauung bei etwa  $ph$  1,6 fanden

In drei Serien, zu denen die Lösungen jedesmal frisch hergestellt wurden, verglichen wir drei Caseinsorten „nach Hammersten“ hergestellt:

Serie	„Kahlbaum“	„Merck“	„Grübler“	Merck-Lösung 8 Tage alt
I	20	18,6	20,4	19,0
II	20	19,7	21,5	—
III	20	19,6	21,1	—

Resultat: Die maximalen Abweichungen von 1,8 Nephelometerskalenteilen innerhalb einer Serie, also ungefähr 10% der Trübung, machen kaum die Hälfte der Empfindlichkeit der Methode aus. Sie liegen noch innerhalb der Grenze der Sichtbarkeit von bloßem Auge.

Es erhebt sich nun die Frage nach dem Trübungsstandard, der für die Brauchbarkeit der Methode als Arzneibuchmethode unerlässlich ist.

Diesen etwas stärker zu wählen als bei der entsprechenden Methode beim Pankreatin (s. S. 99) erwies sich als vorteilhaft. Die Acetatmenge ist ziemlich knapp bemessen (für  $\text{ph} = 4,65\text{—}4,70$ ), weil eventuell nicht genau genug hergestellte Lösungen von Natriumacetat weniger schaden können, wenn dieser Zusatz eine Erhöhung des  $\text{ph}$  über den beabsichtigten Wert bewirkt. Nach oben hin ist die Wahl der Vergleichstrübung dadurch begrenzt, daß mit dem Stärkerwerden derselben Flockung leichter eintritt und daher falsche Werte vorgetäuscht werden.

Zusammenfassend sei die folgende Arbeitsweise zur Prüfung des Pepsins vorgeschlagen:

Caseinlösung: 0,2 gr Casein nach Hammarsten werden in ein trockenes Meßkölbchen von 100 ccm Inhalt gegeben und durch Anschütteln mit wenig Wasser suspendiert. Die Suspension wird mit 50 ccm Wasser verdünnt und unter Umschwenken mit 2 ccm 0,1 n-Natronlauge versetzt. Durch Umschwenken (unter Vermeidung von Schütteln) und Erwärmen auf  $40^\circ$  bringt man das Casein in Lösung (was nicht länger als eine halbe Stunde erfordern soll). Hierauf verdünnt man nochmals mit etwa 30 ccm Wasser, läßt ohne umzuschwenken 5,2 ccm n-Salzsäure in das Kölbchen fließen, schwenkt dann rasch um, bis sich das ausgefallene Casein wieder gelöst hat und ergänzt nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur mit Wasser auf 100 ccm.

Vergleichstrübung: 4 ccm der obigen Caseinlösung werden mit 50 ccm Wasser verdünnt, 2,3 ccm n-Salzsäure hinzugegeben und mit Wasser auf 100 ccm ergänzt. Nach vollendeter Verdauung versetzt man gleichzeitig wie die Verdauungsprobe 10 ccm dieser Verdünnung in einem gleichen Reagensglas mit 0,3 ccm 2 n-Natriumacetatlösung.

Verdauungsansatz: In einem dickwandigen Reagensglas von ca. 13 mm innerer Weite, mit eingeschliffenem Glasstopfen, mischt man 5 ccm der Caseinlösung mit  $5 - x$  ccm Wasser und  $x$  ccm der zu untersuchenden Pepsinlösung, stellt sogleich in ein konstantes Wasserbad von  $40^\circ$  und beläßt es dort während einer Stunde. Nach dieser Zeit wird die Verdauung mit 0,3 ccm ca. 2 n-Natriumacetatlösung unterbrochen, das Reagensglas etwa 4 Minuten lang in Wasser von Zimmertemperatur gestellt und hernach die Trübung mit der Vergleichstrübung verglichen. Die Beurteilung muß binnen drei Minuten erfolgen.

Nach dieser Methode prüften wir sieben Pepsinpräparate des Handels:

0,1 gr Pepsin wurden auf 10 ccm einer Mischung von 5 ccm 0,1 n-Salzsäure und 5 ccm Wasser gegeben und nach freiwilliger Lösung desselben auf 1 Liter mit Wasser verdünnt.

Wir geben nun die Anzahl ccm dieser Pepsinlösung an, welche unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen das Casein bis zu einer geringeren, bis höchstens gleich starken Trübung, wie diejenige der Vergleichstrübung abbauen:

„Witte“ U. S. A. X 1 : 3000	1,0 genügt gerade
„Siegfried“ 1 : 4000	2,0 genügt eben noch
„Parke Davis“ U. S. A. X 1 : 3000	1,0 genügt
„Merck“ Brit. 1 : 2500	1,0 genügt (gut)
„Armour“ (alt. Präparat)	2,0 genügt
„Armour“ Testpepsin 1 : 5000	1,0 genügt (gut)
„Parke Davis“ in lamellis	1,0 genügt (gut)

Die Versuche wurden mit 5 dieser Präparate wiederholt:

Pepsinzugabe in ccm der Lösung 0,1 : 1000	0,9	1,3	1,8
„Witte“ U. S. A. X 1 : 3000	+*)	—	—
„Parke Davis“ U. S. A. X 1 : 3000	+	—	—
„Merck“ Brit. 1 : 2500	+	—	—
„Armour“ Testpepsin 1 : 5000	<u>+</u>	—	—
„Parke Davis“ in lamellis U. S. A. X 1 : 3000	—	—	—

\*) + stärker; — schwächer getrübt als die Vergleichstrübung.

Wir versuchten ferner weiters, die Verdauung zu unterbrechen, nachdem ca. 50% des Caseins seine Fällbarkeit verloren hatte und diese Flüssigkeit so zu verdünnen, daß gut vergleichbare Trübungen entstanden. Es war bei dieser Art der Ausführung den früheren gegenüber jedoch kein Vorteil festzustellen hinsichtlich der Empfindlichkeit.

Vorversuche ließen erkennen, daß die früher skizzierte (vgl. S. 17) von Beer und Peczenik<sup>34)</sup> empfohlene Methode mit Rose bengale B und Casein als Substrat keine größere Empfindlichkeit aufweist, indem sich die Rotfärbung nur allmählich aufhellt und offenbar an Stelle der Trübungen der obigen Methoden hier in ähnlichem Verhältnis die Farbintensität abnimmt.

## E. Titrimetrische Methoden.

Die Methoden, welche zur direkten Ermittlung der durch die Verdauung freigewordenen Carboxylgruppen bzw. Aminogruppen dienen, werden im allgemeinen zur Wertbestimmung des Pepsins nicht angewandt. Wir zitieren eine diesbezügliche Äußerung aus „Die Methodik der Fermente“ von Oppenheimer, wo Graßmann (S. 970) schreibt:

<sup>34)</sup> Fermentforschung, 10, 88.

„Bei der Erfassung des ersten Abbauvorganges an hochmolekularen Proteinen, wie sie der Pepsinwirkung zu Grunde liegen, kommen sie den auf physikalischen Grundlagen beruhenden Verfahren an Empfindlichkeit vielfach nicht gleich, weil hier die Zahl der zur Hydrolyse kommenden Amidverbindungen verhältnismäßig gering ist. Doch können auch in diesem Fall bei richtiger Wahl des Substrates recht erhebliche Ausschläge in kurzer Zeit erhalten werden.“

Sørensen selbst<sup>35)</sup>, ebenso Ringer<sup>36)</sup>, finden die Formoltitration zur Messung der Pepsinverdauung nicht zweckdienlich. E. Waldschmidt-Leitz<sup>37)</sup> bedient sich der Alkoholtitration bei den Proteasen-Eiweißstudien, wo er allerdings die durch das Pepsin maximal spaltbaren Peptidbindungen mißt. Für die eigentliche Pepsinbestimmung findet er die Methode noch ausbaubedürftig<sup>38)</sup>. Legrand<sup>39)</sup> und Brandrup<sup>40)</sup> unterzogen diese Frage einer erneuten Prüfung mit negativem Ergebnis.

Wir stellten zur besseren Orientierung selbst einige Versuche an, welche wir im folgenden kurz beschreiben wollen:

CaseinstammLösung: 30 gr Casein mit Wasser angerieben, mit 24 ccm n-NaOH versetzt, ohne Erwärmen gelöst und auf 500 ccm aufgefüllt; Filtration durch Faltenfilter;

25 ccm der Lösung + 12 ccm 0,5 n-HCl + aq. ad 55 ccm	ph = 1,32.
10,8 ccm 0,5 n-HCl	ph = 1,34.
8 ccm 0,5 n-HCl	ph = 1,64.

Wir fanden es auch hier am besten, die Salzsäure ruhig (ohne zu mischen) zur Caseinlösung fließen zu lassen und erst dann durch plötzliches rasches Umschwenken zu mischen. Das Casein löst sich dann in einigen Sekunden wieder vollständig.

Titrierlaugen: Sowohl die wäßrige wie die alkoholische Lauge sind im gleichen Milieu mit Thymolphthalein gegen 0,1 n-HCl eingestellt worden.

Verdauungsansatz: 100 ccm der obigen CaseinstammLösung + 32 ccm 0,5 n-HCl + H<sub>2</sub>O ad 200 ccm; hiervon 100 ccm + 10 ccm Pepsinlösung (0,5 gr Pepsin „Witte“ U. S. A. X in 50 ccm Wasser); 6 Stunden bei 48°.

Titration: Nach Verlauf von 5 Stunden wurden 2 Proben à 10 ccm entnommen:

a) 10 ccm Verdauungsflüssigkeit + 10 ccm Wasser + 0,5 ccm 0,5 proz. alkoholische Thymolphthaleinlösung; titriert bis zum schwachblauen Farbton + 3 Tropfen 0,1 n-NaOH sehr deutlich blau; Verbrauch: 9,23 ccm 0,1 n-NaOH. Nun wurden 20 ccm einer Formalinlösung zugesetzt, welche mit 0,1 n-NaOH und Thymolphthalein auf schwach blau eingestellt worden war. Dieser Zusatz bewirkte Entfärbung und es wurden nochmals 0,63 ccm 0,1 n-NaOH bis zum Umschlag verbraucht. Dieser Laugenzusatz entspricht also den in 10 ccm enthaltenen freien Carboxylgruppen. Gesamtverbrauch an 0,1 n-NaOH I 9,86 ccm; II 9,91 ccm.

b) 10 ccm Verdauungsflüssigkeit + 10 ccm absoluter Alkohol + 2 ccm Indikator. Gesamtverbrauch an 0,1 n-NaOH I 9,85 ccm; II 9,91 ccm.

Die Übereinstimmung der Alkohol- und Formoltitration war im allgemeinen recht befriedigend. In ähnlichen weiteren Versuchen,

<sup>35)</sup> Bio. Z. 21, 191 (1909).

<sup>36)</sup> H. 95, 240 (1915).

<sup>37)</sup> H. 156, 114 (1926).

<sup>38)</sup> E. Waldschmidt-Leitz in „Meth. d. Ferm.“ von Oppenheimer, S. 1033.

<sup>39)</sup> J. pharm. 11, 58 (1930).

<sup>40)</sup> Ap. 44, 953 (1929).

bei denen wir aber weder Alkohol noch Formol vor der Zugabe neutralisierten, wohl aber zur verdauten als auch zu der entsprechenden unverdauten Caseinlösung vom gleichen Formalin- und Alkoholvorrat gleichviel zusetzten, erhielten wir eine Differenz bis rund 2 ccm 0,1 n-Natronlauge pro 10 ccm Verdauungsflüssigkeit mit ursprünglich 3% Casein.

In den Verdauungsflüssigkeiten bildete sich beim ruhigen Stehen ein voluminöser Niederschlag; die überstehende Flüssigkeit war klar. Ein analoger Versuch mit verdünnter Caseinlösung (1,2%) zeigte aber eine viel geringere Umsatzgröße, gemessen an der Differenz zwischen den Titrationsergebnissen der verdauten und unverdauten Caseinlösung nach Zusatz von Formol bezw. Alkohol.

Verdauungsansatz: 100 ccm 6 proz. Caseinlösung + 20 ccm n-HCl + aq. ad 500 ccm; hiervon 200 ccm + 20 ccm Pepsinlösung; ph bei Zimmertemperatur = 1,83; Verdauung bei 48°.

Titration: Wir entnahmen Proben zu verschiedenen Zeiten und titrierten sie nach Formolzusatz auf gleiche Farbtiefe, wie eine von Sørensen<sup>41)</sup> beschriebene Vergleichslösung.

Dauer der Verdauung in Min.	Mehrverbrauch gegenüber dem Anfangswert in ccm 0,2 n-Lauge pro 20 ccm Verdauungsflüssigkeit
1,5	0,0
2,5	0,27 (?)
25	0,22
56	0,25
81	0,3
113	0,35
150	0,35
∞	0,43

Der letzte Wert ergab sich aus mehreren Bestimmungen mit der unverdauten und praktisch vollständig verdauten Caseinlösung durch Alkoholtitration. Das Casein war weitgehend abgebaut, denn beim Laugenzusatz fiel nur noch wenig aus.

Die Fehler bei der obigen azidimetrischen Bestimmung sind im Verhältnis zum Umsatz bei der obigen Methode sehr groß, wenigstens für Umsatzzeiten von 1—2 Stunden. Die kleine Differenz des Alkaliverbrauches der unverdauten und verdauten Lösung kann nach dem Prinzip der Volhard'schen Methode durch Ausfällung des unverdauten Caseins mit Natriumsulfat wesentlich vergrößert werden.

Von der obigen verdauten Lösung (a) werden 30 ccm mit 10 ccm einer gesättigten Natriumsulfatlösung versetzt, 5 Minuten kräftig geschüttelt und filtriert. In gleicher Weise wird die unverdaute Lösung (b) verarbeitet. 10 ccm des Filtrates + 10 ccm absoluter Alkohol + 5 Tr. 0,5 proz. Thymolphthalein; mit 0,1 n-NaOH titriert.

Verbrauch an 0,1 n-NaOH: a) 3,21; 3,205; b) 1,90; 1,87.

<sup>41)</sup> Bio. Z. 25, 1 (1910); zusammengefaßt in Rona: Prakt. d. physiol. Chem., Bd. 1, S. 244.

Differenz = 1,327 ccm entsprechend 7,5 ccm Verdauungsflüssigkeit. Für 10 ccm Verdauungsflüssigkeit ergeben sich demnach 1,77 ccm 0,1 n-NaOH gegenüber 0,43 ccm 0,1 n-NaOH mit der Formol- bzw. Alkoholtitration ohne Ausfällen des Caseins.

Diese Vergrößerung des Alkaliverbrauches bedeutet sicher einen Vorteil für die Praxis der Ausführung der Bestimmung. Doch ist zu berücksichtigen, daß der Sinn der Titration durch diese Ausführungsform wesentlich geändert wird, indem der Verbrauch an Alkali nicht nur den entstandenen freien Carboxylgruppen, sondern auch noch dem ursprünglichen Säurebindungsvermögen des verdauten Caseins entspricht.

Volhard'sche Methode<sup>42)</sup>: Diese Methode wurde bald nach ihrer Veröffentlichung Gegenstand zahlreicher Diskussionen. Ihre Vorzüge, verhältnismäßig große Ausschläge und daher entsprechend genaue Titrierbarkeit, waren vielversprechend. Einige später vorgeschlagene Modifikationen<sup>43)</sup> änderten an der Originalmethode nichts wesentliches und bezogen sich hauptsächlich auf die Technik ihrer Ausführung.

Ausführung<sup>44)</sup>: 100 gr Casein werden in 1 Liter Wasser unter Schütteln eingeweicht, sodann 80 ccm n-NaOH zugefügt und mit Wasser auf 2000 ccm aufgefüllt; man wärmt langsam an bis zur vollkommenen Lösung und erhitzt dann rasch auf 85–90°, um eventuelle Spuren proteolytischer Enzyme unwirksam zu machen; nach dem Abkühlen setzt man einige Tropfen Toluol zu. Diese Caseinlösung ist lange haltbar.

Als Digestionsgefäße dienen langhalsige Flaschen, welche mit Marken von 300 und 400 ccm versehen sind. Man mißt aus einer Bürette genau 11 ccm n-HCl in die Flasche, füllt mit Wasser auf etwa 150 ccm auf, gibt dann unter Schütteln 100 ccm der beschriebenen Natriumcaseinlösung, am besten aus einer durch T-Rohr mit der Vorratsflasche verbundenen, umgekehrt eingespannten 100 ccm Pipette zu. Dann wird eine beliebige, aber genau zu bestimmende Menge des zu untersuchenden Magensaftes (oder einer anderen pepsinhaltigen Lösung) zugefügt, am besten, nachdem die Mischung schon vorher im Wasserbad von 40° erwärmt wurde, und mit Wasser auf 300 ccm aufgefüllt. Die Mischung wird beliebige, aber genau zu bestimmende Zeit z. B. 1 Stunde lang, im Wasserbad von 40° gehalten, dann wird mit 100 ccm 20 proz. Natriumsulfat auf 400 ccm aufgefüllt. Diese Lösung unterbricht die Pepsinwirkung sofort und fällt das bis dahin unverändert gebliebene Casein in Flocken aus, während die entstandenen salzsauren Peptone bei der nun folgenden Filtration ins Filtrat gehen. Die Acidität von 100 oder 200 ccm des Filtrates wird durch Titration mit 0,1 n-NaOH bestimmt. Von der Gesamtacidität des Filtrates wird die ein für allemal bestimmte, auf ihre Konstanz von Zeit zu Zeit zu prüfende Acidität der Stammlösung subtrahiert; von der Restsumme ist der Säurewert des zugesetzten Magensaftes noch abzuziehen. Als Indicator dient Phenolphthalein.

Urteile aus der Literatur: Bogdandy<sup>45)</sup> hebt als Nachteile der Methode hervor: 1. Das Auflösen des Caseins dauert zu lange, 2. die zur Lösung gebrauchte Natronlauge bildet schon allein aus

<sup>42)</sup> Münch. med. Wo. No. 49, 2129 (1903); 157 (1904); No. 9 (1907).

<sup>43)</sup> Löhlein: Hofmeister's Beitr. 7, 120 (1906). Faubel: Hofmeister's Beitr. 10, 32 (1907). Küttner: H. 52, 63 (1907).

<sup>44)</sup> Nach Rona: Prakt. d. physiol. Chem., Bd. 1, S. 216 (1926).

<sup>45)</sup> H. 84, 18 (1913).

Casein durch Natriumsulfat nicht fällbare Spaltprodukte. Fuld und Levison<sup>46)</sup> empfinden die großen Flüssigkeitsmengen als einen Nachteil, ebenso das Filtrieren. Regenbogen und Schoorl<sup>47)</sup> betrachten die Bereitung der Caseinlösung und die Bestimmung selbst als umständlich; ihnen schließt sich Gesellschaft<sup>48)</sup> an. Vahlteich und Glover<sup>49)</sup> eliminieren aus ihrer Betrachtung im vornherein Methoden, welche mehr Zeit erfordern als diejenige der U. S. A. X., darunter auch die Volhard'sche.

Vorversuche zeigten uns, daß die Einwände betreffs Herstellung der Caseinlösung und der großen Flüssigkeitsmengen berechtigt sind. Die Lösung nach Küttner<sup>50)</sup> hergestellt, ist stark opaleszent, von beinahe gallertigem Aussehen und die direkte Auflösung des Caseins erfordert sehr lange Zeit. Löhlein<sup>51)</sup> erwähnt, daß sauer hergestellte Caseinlösungen beim Überschreiten von 70° nicht selten gelatinieren.

Ursprünglich versuchten wir bei den Verdauungsversuchen mit Meßkolben auszukommen, welche bei 300 ccm eine Einschnürung mit einer Marke und bei 400 ccm am Halse wieder mit einer Marke versehen waren. Das, besonders beim Blindversuch sich ausscheidende Casein bildet auch bei vorsichtigem Zusatz der Natriumsulfatlösung Klumpen und eine gute Durchmischung ist fast unmöglich.

Die Abänderungen, welche wir daher in den folgenden Versuchen vornahmen, beziehen sich nur auf die Art der Ausführung.

Vorerst wollen wir noch kurz auf den Mechanismus der Reaktion eingehen. Die Arbeiten von J. Loeb<sup>52)</sup> und anderer machen es wahrscheinlich, daß wir es mit einer annähernd stöchiometrisch verlaufenden Reaktion zu tun haben. Loeb schreibt: „So steht es außer allem Zweifel, daß die Proteine sich mit Säuren oder Basen den stöchiometrischen Regeln der allgemeinen Chemie entsprechend verbinden.“ Leider verfolgte dieser Forscher das Säurebindungsvermögen des Caseins nur bis wenig unter  $\text{ph} = 2$  und findet, daß unter  $\text{ph} = 2$  dieses maximal ist. Die Kurve, welche die Beziehungen zwischen  $\text{ph}$  und Menge der gebundenen Säure wiedergibt, verläuft in diesem Gebiet sehr flach, steigt aber trotzdem langsam an. Wenn man umgekehrt bedenkt, daß Casein in 25 prozentiger Salzsäure klar löslich ist und daß sich aus dieser Lösung beim Verdünnen mit Wasser ein Caseinhydrochlorid ausscheidet, das bei wesentlich geringerer  $\text{h}$ , ja sogar in gewöhnlichem Wasser sich wieder gut löst, so muß man eine Hydrolyse des maximal mit

<sup>46)</sup> Bio. Z. 6, 473 (1907).

<sup>47)</sup> Phrm. W. 49, 1018 (1912).

<sup>48)</sup> H. 94, 209 (1915).

<sup>49)</sup> J. of the Americ. Pharm. Assoc. 10, 595 (1921).

<sup>50)</sup> H. 52, 63 (1907).

<sup>51)</sup> Hofmeister's Beitr. 7, 120 (1906).

<sup>52)</sup> Die Eiweißkörper, Springer (1924).

Salzsäure gesättigten Caseins annehmen und somit würde bei einem  $\text{ph}$  zwischen 2 und 1 ein ziemlich gut definiertes Salz des Caseins vorliegen. Gerade der flache Verlauf der oben erwähnten Kurve macht eine volumetrische Bestimmung vom Typus der Volhard'schen möglich und bei geeigneter Wahl des Anions dürfte sich auch das Casein als solches volumetrisch ermitteln lassen.

Durch Zusatz eines löslichen Sulfates zur Caseinhydrochloridlösung scheidet sich das Caseinsulfat als schwer lösliche Verbindung ab. Ob bei dieser Fällung nur das Massenwirkungsgesetz gilt oder ob noch andere Faktoren eine Rolle spielen, ist uns unbekannt. Daß es sich bei dieser Ausscheidung um eine Schwefelsäure-Verbindung des Caseins handelt und nicht einfach um einen Aussalzungsprozeß, beweist uns die Konstanz der Chloridmenge und die Änderung der Titrationsacidität im Filtrat der verdauten und unverdauten Caseinlösung.

I. Versuch: 25 ccm Filtrat + 25 ccm 0,1 n-AgNO<sub>3</sub> + 40 ccm 65 proz. HNO<sub>3</sub>; 10 Minuten gekocht + 30 ccm Wasser und mit 0,1 n-NH<sub>4</sub>CNS zurücktitriert.

	nicht verdaut	verdaut
Verbrauch an 0,1 n AgNO <sub>3</sub>	18,88	18,85
	18,93	18,78
	19,05	19,10
	19,03	19,04

II. Versuch:

a) 25 ccm Filtrat + 20 ccm 0,1 n-AgNO<sub>3</sub> + 40 ccm 65 proz. HNO<sub>3</sub>; 10 Minuten gekocht + 40 ccm Wasser.

b) Mit 0,1 n-NaOH und Phenolphthalein titriert ( $\text{ph}$  der urspr. Caseinlösung 1,91).

	nicht verdaut	verdaut
a) Verbrauch an 0,1 n AgNO <sub>3</sub>	5,1	5,07; 5,06
b) Verbrauch an 0,1 n NaOH	2,74; 2,74	6,85; 6,65

III. Versuch: a) und b) wie beim II. Versuch (ursprünglich Caseinlösung  $\text{ph} = 1,08$ ).

	nicht verdaut	verdaut
a) Verbrauch an 0,1 n AgNO <sub>3</sub>	16,46; 16,46	16,52; 16,52
b) Verbrauch an 0,1 n NaOH	14,06; 13,96; 13,92	17,71; 17,77

Wir haben auch keine Kenntnis, wie sich die verschiedenen Abbauprodukte verhalten. Jedenfalls werden sie nicht vollständig mitgefällt, denn je tiefer die Hydrolyse fortgeschritten ist, desto geringer ist der Niederschlag mit Natriumsulfat. In dieser Hinsicht sind wohl die größten Störungen zu erwarten, denn diese Abbauprodukte sind zum Teil an und für sich schwer löslich bei einer Reaktion von ca.  $\text{ph} = 2$  (vgl. S. 51).

Nachdem also das Casein und die diesem entsprechende Schwefelsäure durch Filtration abgetrennt sind, enthält das Filtrat Na<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> und Abbauprodukte. Bei einer Titration mit Lauge und den üblichen Indikatoren werden stets sowohl Mineralsäuren als auch die Peptone erfaßt. Die Pufferwirkung, welche

letztere als ein Gemisch von verschiedenen aminosäureartigen Produkten ausüben, erstreckt sich ähnlich wie bei der Gerbsäure über den ganzen Bereich der üblichen Indikatoren. Von etwa ph 5—9 ist nach der durch elektrometrische Titration mit Platin-Wasserstoff erhaltenen Kurve  $\frac{\Delta ph}{\Delta B} = \text{konstant}$  ( $B = \text{ccm } 0,1 \text{ n-NaOH}$ ) und betrug in unserem Falle  $\frac{2,25}{2} = 1,12$ . Unter ph = 5 und über ph = 9 nimmt der Quotient ab.

Für eine acidimetrische Titration liegen die Verhältnisse ziemlich ungünstig. Wir behielten Phenolphthalein wegen seiner Empfindlichkeit und besonders wegen des Umschlages nach rot bei, der in den bläulich-opaleszenten bis stark trüben Flüssigkeiten sehr gut sichtbar ist und titrierten bis zur ersten deutlich erkennbaren Farbänderung nach Rot. Wir verzichteten vorläufig noch darauf, bis zum theoretisch einwandfreieren Umschlag gegen Thymolphthalein in alkohol- oder formolhaltiger Lösung zu titrieren, setzten aber nach jeder Titration gegen Phenolphthalein noch Formol zu, um die Änderungen dieses Mehrbetrages, der deutlich mit dem Fortschreiten der Verdauung zunimmt, nebenbei zu beobachten, wie uns der erste Versuch zeigt. Bei den vergleichenden Versuchen hielten wir selbstverständlich die Indikatorkonzentration konstant.

Zur raschen Herstellung der Caseinlösungen eignete sich folgendes Verfahren:

Das Casein nach Hammarsten „Merck“ wurde direkt in eine Schale eingewogen, nachher mit Hilfe eines Pistills mit Wasser sorgfältig zu einem feinen Brei angerührt (auf 10 gr Casein 30—35 ccm Wasser), dieser mit mehr Wasser verdünnt und durch einen weiten Trichter in den Meßkolben gespült. Am besten wischt man mit einem Glasstab, der vorn ein Stück Gummischlauch trägt und mit Wasser, Schale und Pistill rein und bringt so das Casein quantitativ in den Kolben (Das Anreiben des Caseins in der Schale hat den Vorteil, daß dieses sehr fein verteilt wird, ohne daß dabei lästiger Schaum entsteht). Nun läßt man die Lauge zufließen und erwärmt unter Umschwenken auf dem Wasserbade. Das Casein löst sich rasch. Nun verdünnt man mit Wasser bis etwa  $\frac{2}{3}$  des Volumens des Meßkolbens und läßt die Salzsäure, ohne den Kolben zu bewegen, dem Kolbenhals entlang hinunter fließen. Dann wird die Salzsäure mit der Caseinlösung plötzlich durch sehr energisches Umschwenken gemischt. In einigen Sekunden bis einigen Minuten tritt vollständige Lösung des ausgeschiedenen Caseins ein. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wird mit Wasser aufgefüllt.

Das Pepsin wurde mit wenig Wasser ganz leicht in einem Reibschälchen angerieben und mit Wasser in den Meßkolben gespült. Gewöhnlich machten wir diese Lösung schwach salzsauer.

Nachfolgende erste Serie sollte uns über den zeitlichen Verlauf der Säurezunahme orientieren, damit wir bei möglichst großem Umsatz mit der Unterbrechung der Verdauung doch nicht allzusehr in ein Gebiet kommen, wo die Reaktion träge verläuft.

I. Serie: Caseinlösung: 10 gr Casein + 50 ccm 0,1 n-NaOH + 22,0 ccm n-HCl + aq. ad 500 ccm.

Pepsinlösung: 0,1 gr Pepsin „Witte“ U. S. A. X + 5 ccm 0,1 n-HCl + aq. ad 100 ccm.

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung: 50 gr Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>krist + 2,5 ccm ca. 2 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + aq. ad 250 gr.

Blindversuch: 50 ccm Caseinlösung + 20 ccm Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung + 5 ccm Pepsinlösung; sofort nach dem Mischen filtriert und titriert.

Verdauungsansatz: 50 ccm Caseinlösung + 5 ccm Pepsinlösung; eine bestimmte Zeit bei 40°; mit 20 ccm Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung unterbrochen.

Titration: Es wurden 25 ccm des Filtrates titriert und zwar unter Vergleich gegen eine zweite nicht titrierte Probe. Auf diese Weise ist der Umschlag bei hellem Licht recht gut sichtbar.

No.	Verdauungszeit in Stdn.	Titration von 25 ccm Filtrat; ccm 0,1 n-NaOH	Mehrverbrauch an NaOH nach Zusatz von 10 ccm Formol	Zuwachs ohne Formol	Zuwachs mit Formol
1	0 *)	4,55	1,895		
2	0 *)	4,37	1,875		
3	1/2	6,10; 6,105	2,6; 2,6	1,64	2,36
4	1	6,76; 6,74	2,875	2,29	3,29
5	1 1/2	7,20; 7,24	2,925	2,76	3,81
	2	7,35; 7,44	3,075	2,94	4,14

\*) No. 1 und 2 sind Blindversuche; No. 1 bei Zimmertemperatur stehen gelassen und erst dann gefällt; No. 2 während 2 Stunden bei 40°; dann gefällt.

Resultat: Die Kurve zeigt, daß nach 1 Stunde die Unterbrechung der Versuche günstig ist. Die Blindversuche 1 und 2 stimmen schlecht überein. Diese Differenz kann nicht auf einem Fehler bei der Titration beruhen.

II. Serie: Drei weitere Ansätze derselben Art ergaben:

No.	Verdauungszeit in Stund.	Titration von 25 ccm Filtrat; ccm 0,1 n-NaOH	Mehrverbrauch an NaOH nach Zusatz von 10 ccm Formol	Zuwachs ohne Formol	Zuwachs mit Formol
1	0	4,625; 4,625	1,975; 1,85	= 0	= 0
2	1	6,86; 6,86	2,75	2,24	3,07
3	1	6,89	2,77	2,27	3,12

Resultat: Der Laugenverbrauch bei der direkten Titration ist in der zweiten Versuchsreihe durchwegs um ca. 0,1—0,2 ccm höher, obwohl wir außer dem Formaldehyd die gleichen Lösungen benützten wie zur vorhergehenden Reihe und die Versuche nacheinander am gleichen Tage ausführten. Den Grund glaubten wir in einem Fermentgehalt der Caseinlösung gefunden zu haben, und erhitzen in der III. Serie die Caseinlösung vor dem Ansäuern rasch auf 87° entsprechend der ursprünglichen Volhard'schen Vorschrift.

Nun suchten wir die Frage, ob der Natriumsulfatzusatz genüge, um die Verdauung zu unterbrechen, zu beantworten.

III. Serie: Außer dem Erwärmen der Caseinlösung gleich wie II. Serie; Verdauungszeit 1 Stunde bei 40°.

No.	Pepsinlösung in ccm	a)		Pepsinlösung in ccm	b)	
		Titration sofort nach Verdauung und Filtration	Mehrverbr. nach Formolzusatz		Titration nach 4stünd. Stehen der ausgefallten Lösg.	Mehrverbr. nach Formolzusatz
1	blind	4,2; 4,205	1,845; 1,82	blind	4,725; 4,8	2,25
2	5 ccm	6,78; 6,75	2,815; 2,88	5	6,81; 6,79	2,90
3	4; +1 ccm nach Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,44; 6,49	2,71	4; +1 ccm nach Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,645; 6,625	2,76; 2,80
wiederholt:						
1	blind	4,27; 4,30	1,91			
2	5	6,75; 6,79	2,79			
3	4; +1 ccm nach Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,53	—			

Resultat: Aus 2 a) und 2 b), bei denen vor und nach der Filtration kein weiterer Eingriff gemacht wurde, darf geschlossen werden, daß durch Zusatz von Natriumsulfat zu einer teilweise hydrolysierten Caseinlösung die Verdauung praktisch vollständig unterbrochen wird. Bei 1 und 3 gaben wir zur Vervollständigung des Volumens auf 75 ccm nach erfolgter Fällung Pepsinlösung hinzu. Es unterliegt keinem Zweifel, daß hier das Pepsin weiter wirkt, was sich außerdem im Mehrverbrauch nach Formolzusatz ausdrückt.

Wir stellten nochmals einen Versuch an, mit der gleichen Fragestellung.

IV. Serie: Lösungen wie bei der III. Serie; Verdauungszeit 1 Stunde bei 40°.

No.	Versuchsbedingungen	Titration v. 25 ccm Filtrat;		Mehrverbrauch an NaOH nach Zusatz von 10 ccm Formol
		ccm 0,1 n-NaOH		
1	Blindversuch: statt 5 ccm Pepsinlösung e. ihr entsprechende HCl-Verdünnung, sofort aufgearbeitet	4,16;	4,155	1,795
2	Blindversuch: wie 1, aber erst nach 4stünd. Stehen filtriert und titriert	4,14;	4,145	1,80
3	Blindversuch: ca. 1 Stunde im Wasserbad, dann $\frac{1}{4}$ Stunde mit abgetöteter (aufgekochter) Pepsinlösung	4,16;	—	1,82
4	Blindversuch: nachdem Probe $\frac{3}{4}$ Stunden bei 40°, Enzymlösung unmittelbar vor der Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Zugabe; rasch abgekühlt und bei Zimmertemp. 4 Stunden stehen gelassen	4,89;	—	2,165
5	Blindversuch: wie 4; Pepsinlösung nach der Natriumsulfatzugabe	4,80;	4,80	2,15
6	Verdauungsversuch: sofort nach der Entnahme aus dem Wasserbad abgekühlt, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> zugegeben, filtriert u. sofort titriert	6,765;	6,785	2,805
7	Verdauungsversuch: wie 6, 1 Stunde nach der Filtration titriert	6,81;	6,805	2,805
8	Verdauungsversuch: wie 6, $3\frac{1}{2}$ —4 Stunden stehen gelassen, während dieser Zeit 2 mal geschüttelt, filtriert und titriert	6,88;	6,86	2,905

Eine analoge Serie mit weniger Pepsin \*) sollte uns zeigen, ob die gefundenen Resultate bezüglich der Unterbrechung prinzipieller oder gradueller Natur sind. Zugleich suchten wir nach der Beantwortung der Frage, ob der Schwefelsäurezusatz zur Natriumsulfatlösung, den wir aus theoretischen Erwägungen heraus angenommen hatten, die Ergebnisse wesentlich beeinflußt oder nicht.

V. Serie:

No.		Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Versuchsbedingungen	Titration v. 25 ccm Filtrat; ccm 0,1 n-NaOH	Mehrverbrauch an NaOH nach Zusatz von 10 ccm Formol
1	blind	mit H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3 Stunden bei 40°; gefällt; 5 ccm abgetötete Pepsinlösung; sofort aufgearbeitet	4,45; 4,45	1,87
2	verdaut	" "	sofort filtriert; a) $\frac{3}{4}$ Stunden bezw. b) $3\frac{1}{2}$ Stunden nach Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Zugabe titriert	a) 6,34 b) 6,41	2,575 —
3	"	" "	nach der Fällung 5 Stunden ruhig stehen gelassen	6,33; 6,31	2,565
4	blind	ohne "	sofort aufgearbeitet; mit abgetöteter Pepsinlösung	3,25; 3,185	1,86; 1,835
5	verdaut	" "	sofort aufgearbeitet; a) 1 Stunde bezw. b) 3 Stunden nach Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Zugabe titriert	a) 5,13 b) 5,10	2,45 2,575
6	"	" "	wie 3	5,015; 5,00	2,575
7	"	mit "	wie 1, nach Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Zusatz in kochendes Wasser gestellt; $3\frac{1}{2}$ Stunden nach Filtration titriert	6,405; 6,41	2,615

Resultat: Natriumsulfat unterbricht nur die fortgeschrittene Verdauung. Vergleicht man die Differenz zwischen Blindversuch und Verdauungsversuch bei den Ansätzen mit und ohne Schwefelsäure, so erhält man 1,87 bezw. 1,91 ccm 0,1 n-NaOH und ebenso nach Addition des Formaldehydmehrverbrauches zu den zugehörigen Titrationsergebnissen 2,57 bezw. 2,51 0,1 n-NaOH. Sie sind also innerhalb der Fehlergrenze gleich. Haben wir im Ansatz 7 durch Erhitzen der gefällten Lösung gegenüber 2 und 3 keinen Unterschied bekommen, so zeigt uns die nächste Serie, daß in den Anfangsstadien auch das Erhitzen nicht genügend scharf unterbricht. Dies ist umso weniger zu erwarten bei Verdauungsansätzen, welche noch keinen Natriumsulfatzusatz erhalten haben (VI. Serie).

Die bis dahin erhaltenen Resultate lassen auf die Empfindlichkeit der Methode schließen. Unter vergleichbaren Bedingungen erhielten wir für einen Zusatz von 5 ccm Pepsinlösung 0,1 : 100 Aciditätszunahmen von 2,56; 2,49; 2,49 ccm 0,1 n-NaOH auf 25 ccm Filtrat; die Hälfte der Pepsinmenge ergab unter gleichen Bedin-

\*) 5 ccm einer Lösung von 0,1 gr Pepsin „Witte“ U. S. A. X in 10 ccm 0,1 n-HCl + aq. ad 200 ccm.

VI. Serie:

No.		Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> mit	Versuchsbedingungen	Titration v. 25 ccm Filtrat; ccm 0,1 n-NaOH	Mehrverbrauch an NaOH nach Zusatz von 10 ccm Formol
1	blind	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	mit abgetötetem Pepsin . . . . .	4,325; 4,3; 4,3; 4,3	1,81
2	"	"	mit abgetöt. Pepsin nach Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Zugabe 3—4 Min. in kochend. H <sub>2</sub> O; abgekühlt .	4,325; 4,33	1,79
3	"	"	unmittelbar vor Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Zugabe aktives Pepsin, dann sofort in kochendes Wasser gestellt . . . . .	5,05; 5,1	2,12

gungen 1,87; 191 ccm 0,1 n-NaOH. Unter Annahme linearer Abhängigkeit der dazwischen liegenden Pepsinkonzentrationen und des Umsatzes erhält man für 10% Pepsinverminderung etwa 0,12 ccm weniger an Aciditätszunahme, was etwa mit der Fehlergrenze (0,08—0,1 ccm) zusammenfällt. Die Methode schien uns recht brauchbar und daher setzten wir das Studium der einzelnen uns wichtig erscheinenden Faktoren fort. Vorerst interessierte uns, ob das Schütteln der eben gefällten Caseinlösung von Einfluß auf die Acidität ist. Es wäre nämlich denkbar, daß schwerlösliche oder auch peptonartige Körper adsorptiv mit der Fällung niedergerissen oder von dieser eingeschlossen würden.

VII. Serie: Caseinlösung: 10 gr Casein „Merck“ + 50 ccm 0,1 n-NaOH; auf 86° erwärmt + 25 ccm n-HCl + aq. ad 500 ccm.

Natriumsulfatlösung: 20,0 gr Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O in Wasser zu 100 gr gelöst.

Blindversuch: 50 ccm Caseinlösung + 5 ccm 0,02 n-HCl + 20 ccm Natriumsulfatlösung.

Ansätze: a) ohne Ferment (1—4); b) mit 5 ccm einer Lösung von 0,15 gr „Witte“ U. S. A. X + 25 ccm 0,1 n-HCl + aq. ad 200 ccm.

No.	Versuchsbedingungen	Titration v. 25 ccm Filtrat; ccm 0,1 n-NaOH
a)		
1	aus Bürette tropfenweise Zusatz von Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> unter Umschwenken, dann stark geschüttelt*) . . . . .	4,10; 4,10
2	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> aus Pipette; 1 Min. geschüttelt . . . . .	4,09; 4,13
3	" " " 5 " " . . . . .	4,08; 4,11
4	" " " 10 " " . . . . .	4,10; 4,11
b)		
5	aus Bürette wie 1 . . . . .	6,55; 6,59
6	" Pipette 1 Min. geschüttelt . . . . .	6,51; 6,55
7	" " 5 " " . . . . .	6,51; 6,51
8	" " 10 " " . . . . .	6,56; 6,50

\*) Wie bei den früheren Versuchen.

Resultat: Ein Einfluß des Schüttelns ist nicht festzustellen.

Unter Berücksichtigung der etwas höheren Salzsäurekonzentration, der zur Blindprobe benützten Salzsäureverdünnung errechnet sich eine Aciditätszunahme von 2,56 ccm 0,1 n-Natronlauge gegenüber 2,1—2,2 wie zu erwarten war. Es mußte also die Änderung der Sulfatkonzentration (doppelt so groß) oder die geringe Abnahme des ph dafür schuld sein.

Aus der Differenz der zugesetzten Salzsäuremenge und der nach Ausfällung titrierten Säure, läßt sich der ph der Caseinlösung berechnen und umgekehrt zu dem gewünschten ph die notwendige Säuremenge. Die Werte wurden immer elektrometrisch kontrolliert; so zeigten die Caseinlösungen folgende ph-Werte:

I	ph ber. 1,73 gef. 1,74	II	ph ber. 1,70 gef. 1,72	III	ph ber. 1,61 gef. 1,62; 1,63
IV	ph ber. 1,61 gef. 1,61; 1,62	V	ph ber. 1,50 gef. 1,52	VI	ph ber. 1,40 gef. 1,45; 1,43

Bei VI fängt der gefundene Wert an, dem berechneten nachzuhinken, was ziemlich sicher auf das erhöhte Säurebindungsvermögen in Gebieten höherer Acidität zurückzuführen ist.

Ein Verdauungsansatz zeigte bei einem Aciditätszuwachs des Filtrates von 1,93 ccm 0,1 n-NaOH pro 25 ccm gleich nach dem Ablauf der Verdauungszeit und nach dem raschen Abkühlen auf Zimmertemperatur einen ph von 1,69; vor der Verdauung wurde 1,61 gemessen.

VIII. Serie: Verdauung bei ph = 1,7.

Caseinlösung: 10 gr Casein + 50 ccm 0,1 n-NaOH + 22,68 ccm n-HCl + aq. ad 500 ccm (nicht über 50° erwärmt).

Pepsinlösung: 0,15 gr Pepsin „Witte U. S. A. X in 200 ccm einer HCl-Verdünnung gelöst, welche 50 ccm 0,1 n-HCl in 250 ccm enthielt (ph = 1,71).

Titration: 25 ccm Filtrat + 5 Tr. Phenolphthalein (1,0 gr in 100 ccm Alkohol).

No.	HCl von ph 1,7	Pepsinlösung von ph 1,7	Titration von 25 ccm Filtrat; ccm 0,1 n-NaOH	Differenz gegen Blindversuch
1	5	0	3,49; 3,47	—
2	3,0	2,0	4,67; 4,705	1,21
3	1,5	3,5	5,40; 5,42	1,93
4	0	5,0	5,82; 5,775	2,30

IX. Serie: Verdauung bei ph = 1,6.

Caseinlösung: gleich wie Serie VIII mit 25,2 ccm n-HCl.

Pepsinlösung: gleich wie Serie VIII, die verd. Säure enthielt 62,8 ccm 0,1 n-HCl auf 250 ccm (ph = 1,61).

No.	HCl von ph 1,6	Pepsinlösung von ph 1,6	Titration von 25 ccm Filtrat; ccm 0,1 n-NaOH	Differenz gegen Blindversuch
1	5,0	0	4,32; 4,31	—
2	3,0	2,0	5,635; 5,635	1,32
3	1,5	3,5	6,305; 6,295	1,99
4	0	5,0	6,70; 6,68	2,38

X. Serie: Verdauung bei  $ph = 1,5$ .

Caseinlösung: gleich wie Serie VIII mit 28,5 ccm n-HCl.

Pepsinlösung: gleich wie Serie VIII, die verd. Säure enthielt 79 ccm 0,1 n-HCl auf 250 ccm ( $ph = 1,51$ ).

No.	HCl von ph 1,5	Pepsinlösung von ph 1,5	Titration von 25 ccm Filtrat; ccm 0,1 n-NaOH	Differenz gegen Blindversuch
1	5,0	0	a) 5,56; 5,55 b) 5,50; 5,55	—
2	3,0	2,0	6,875; 6,80	1,25
3	1,5	3,5	7,50; 7,55	1,97
4	0	5,0	8,00; 7,935	2,39

XI. Serie: Verdauung bei  $ph = 1,44$ .

Caseinlösung: gleich wie Serie VIII mit 32,6 ccm n-HCl.

Pepsinlösung: gleich wie Serie VIII, die verd. Säure enthielt 100 ccm 0,1 n-HCl auf 250 ccm ( $ph = 1,41$ ).

No.	HCl von ph 1,4	Pepsinlösung von ph 1,43	Titration von 25 ccm Filtrat; ccm 0,1 n-NaOH	Differenz gegen Blindversuch
1	5,0	0	a) 7,050; 7,135 b) 7,135; 7,085	—
2	3,0	2,0	8,33; 8,375	1,25
3	1,5	3,5	9,015; 9,00	1,90
4	0	5,0	9,375; 9,40	2,29

Resultat: Der Einfluß der  $h$  ist verhältnismäßig gering; bei  $ph$  1,5 und 1,6 sind die Werte am höchsten; bei  $ph$  1,7 und 1,44 sind sie deutlich tiefer.

In einer der IX. Serie nachgebildeten Bestimmung untersuchten wir den Einfluß des Erhitzens der alkalischen Caseinlösung, das den Zweck hat, eventuell im Casein enthaltene Fermente abzutöten.

XII. Serie: a) Die alkal. Caseinlösung auf höchstens  $40^{\circ}$  erwärmt, b) Die alkal. Caseinlösung auf  $85^{\circ}$  erhitzt.

No.	HCl von ph 1,6	Pepsinlösung von ph 1,6	Titration von 25 ccm Filtrat; ccm 0,1 n-NaOH	Differenz gegen Blindversuch
1	5,0	0	a) 4,40; 4,42	—
2	1,5	3,5	6,405; 6,37	1,98
3	0	5,0	6,775; 6,775	2,365
1	5,0	0	b) 4,43; 4,425	—
2	1,5	3,5	6,375; 6,375	1,95
3	0	5,0	— 6,79	2,365

Resultat: Das Erhitzen hat keinen Einfluß.

Die bisherigen Versuche waren alle ausgeführt worden mit dem gleichen Casein nach Hammarsten („Merck“). In den folgenden Versuchsreihen wurden vergleichende Bestimmungen vorgenommen mit anderen Caseinsorten des Handels (Casein „Grübler“ und „Kahlbaum“).

XIII. Serie: gleich ausgeführt wie XII. Serie.

No.	HCl von ph 1,6	Pepsinlösung von ph 1,6	Titration von 25 ccm Filtrat; ccm 0,1 n-NaOH	Differenz gegen Blindversuch
			Casein „Grübler“	
1	5,0	0	4,63; 4,615	—
2	1,5	3,5	6,41; 6,405	1,785
3	0	5,0	6,91; 6,905	2,29
			Casein „Kahlbaum“	
1	5,0	0	4,495; 4,505	—
2	1,5	3,5	6,21; 6,225	1,72
3	0	5,0	6,545; 6,65	2,1

XIV. Serie: gleich ausgeführt wie XII. Serie.

	Casein „Merck“ frische Lösung	Casein „Kahlbaum“ frische Lösung	Casein „Kahlbaum“ Lösung 1 Tag alt
blind	4,5; 4,5	4,515; 4,49	4,495; 4,455
verdaut mit 5 ccm			
Pepsinlösung	6,95; 6,975	6,81; 6,775	6,655; 6,65
Differenz	2,46	2,29	2,18

XV. Serie\*): gleich ausgeführt wie XII. Serie.

	Casein „Merck“ Lösung 1 Tag alt	Casein „Kahlbaum“ Lösung 1 Tag alt	Casein „Kahlbaum“ Lösung 2 Tage alt
blind	4,42; 4,385	4,49; 4,43	4,48; —
verdaut mit 5 ccm			
Pepsinlösung	7,165; 7,09	6,88; 6,86	6,815; 6,87
Differenz	2,73	2,41	2,37

XVI. Serie\*): gleich ausgeführt wie XII. Serie.

No.	HCl von ph 1,6	Pepsinlösung von ph 1,6	Titration von 25 ccm Filtrat; ccm 0,1 n-NaOH	Differenz gegen Blindversuch
			Casein „Merck“	
			Lösung 2 Tage alt	
1	5,0	0	4,40; 4,485	—
2	1,5	3,5	6,74; 6,705	2,22
3	0	5,0	7,105; 7,15	2,64
			Casein „Kahlbaum“	
			Lösung 1 Tag alt	
1	5,0	0	4,525; 4,525	—
2	1,5	3,5	6,45; 6,425	1,90
3	0	5,0	6,95(?); 6,885	2,36

\*) Die folgenden Daten sind nur innerhalb der Serie vergleichbar, weil die Versuche länger als 1 Stunde, aber alle gleich lang dauerten.

Resultate der Versuche XIII—XVI: Die Einzelversuche jeder Serie waren parallel und unter genau gleichen Bedingungen ausgeführt worden. Trotzdem ist zu konstatieren, daß die mit verschiedenen Caseinpräparaten des Handels gewonnenen Resultate nicht unerheblich differieren. Die Differenzen sind dabei größer als die Fehlergrenzen der Methode, die man nach den beschriebenen Versuchsreihen I—XII innerhalb einer Versuchsreihe auf etwa  $\pm 0,05$  ccm 0,1 n-NaOH bewerten könnte. Die gefundenen Werte waren für Casein „Merck“ am höchsten; für Casein „Grübler“ etwas tiefer und für Casein „Kahlbaum“ noch tiefer. Die Differenzen zwischen dem erst- und letztgenannten Präparat betragen in den verschiedenen Versuchsreihen ziemlich konstant ca. 0,28 ccm 0,1 n-NaOH.

Prüfungen der ph-Werte der Caseinlösungen zeigten, daß die Differenzen in den Aciditätszunahmen bei Verwendung verschiedener Caseinpräparate nicht auf diesen Faktor zurückgeführt werden können (wir fanden beispielsweise bei der Lösung von Casein „Grübler“ 1 Tag alt  $\text{ph} = 1,61$ ; Casein „Kahlbaum“ 1 Tag alt  $\text{ph} = 1,63$ ; Casein „Merck“ 2 Tage alt  $\text{ph} = 1,64$ ).

Auch das Alter der Caseinlösungen spielt bei den betrachteten Zeiträumen keine wesentliche Rolle.

Für die Differenzen der Aciditätszunahmen bei demselben Caseinpräparat (Casein „Kahlbaum“) in den Versuchen XIII und XIV ist vielleicht eine Veränderung der Pepsinlösung verantwortlich; es war in beiden Serien mit der gleichen Pepsinlösung gearbeitet worden, doch wurden die Versuche der Serie XIV einige Stunden später angesetzt.

Die Differenzen der Aciditätszunahmen in den Versuchen mit gleichem Pepsin, aber mit verschiedenen Caseinpräparaten des Handels müssen auf Eigentümlichkeiten dieser Präparate beruhen, die noch nicht genauer definiert werden können. Dieser Umstand läßt die Methode als Arzneibuchmethode als ungeeignet erscheinen (vergleiche S. 24).

## **F. Vor- und Nachteile der behandelten Methoden mit Rücksicht auf eine Verwendung als Arzneibuchmethoden.**

**Genauigkeit bzw. Empfindlichkeit:** Man kann hier grosso modo zwischen empfindlichen, bedingt empfindlichen und unempfindlichen Methoden unterscheiden. Eine Methode ist dann bedingt empfindlich zu nennen, wenn sie mit dem Substrat aus ein- und demselben Vorrat ausgeführt, auf kleine

relative Schwankungen der Enzymmenge anspricht, und wenn das Substrat an und für sich aber nicht in enzymchemisch konstanter Art erhältlich ist. Als enzymchemisch ziemlich konstant betrachten wir das Lamelleneiweiß, ferner eine Mischung des koagulierten Eiweißes von mindestens drei Eiern vorgeschriebenen Alters und geeigneter Aufbewahrung, nicht aber das Casein des Handels.

Demnach gehören in die erste Kategorie: Die gravimetrische Methode mit Lamelleneiweiß; in die zweite Kategorie: die Volhard'sche Methode in der Form, wie wir sie ausführten, die U. S. A. X-Methode; in die dritte Kategorie: die Groß'sche Methode.

Wie auf Seite 36 ausgeführt, kann die U. S. A. X-Methode bei Verwendung eines Eiweißgemisches in die erste Kategorie eingereiht werden.

**Methodische Vor- und Nachteile:** Die U. S. A. X-Methode erfordert für jeden Versuch ein Ei von vorgeschriebenem Alter, und die Beschaffung eines solchen ist oft umständlich. Casein- und Eiweißlösungen können jederzeit leicht hergestellt werden. Nach Zusatz von Toluol sind diese an einem kühlen Ort längere Zeit haltbar.

Die U. S. A. X-Methode erfordert während 2½ Stunden die Aufmerksamkeit des Untersuchers, weil er alle 10 Minuten 1 mal mischen muß. Die übrigen Methoden weisen diesen Nachteil nicht auf.

Die Gesamtdauer der Bestimmung ist bei der Groß'schen am geringsten, dann folgen die Volhard'sche, die U. S. A. X- und die gravimetrische Methode.

## **G. Befunde bei weiteren chemischen und physikalischen Prüfungen der Pepsinpräparate.**

Funk und Möller<sup>53)</sup> haben eingehend eine Anzahl Pepsinpräparate untersucht und schlagen vor, außer der Wirksamkeit noch folgende Prüfungen vorzunehmen:

1. Aschegehalt,
2. Löslichkeit in Wasser,
3. Löslichkeit in 0,2proz. Salzsäure,
4. Löslichkeit in 40proz. Alkohol,
5. Durchsichtigkeit,
6. Kochsalzgehalt,
7. Säuregehalt.

<sup>53)</sup> P. C. H. 60, 517 (1919).

Wir finden eine Kochsalzbestimmung überflüssig.

1. weil wir im Aschegehalt dessen Menge limitieren,
2. weil dieses ohnehin normalerweise schon einen beträchtlichen Teil der Asche ausmacht und
3. weil es schließlich im Vergleich zu anderen Verunreinigungen (z. B. anderen anorganischen Bestandteilen, Schwermetallen u. s. w.) als unschädlich betrachtet werden kann.

Was den sogenannten Säuregehalt anbelangt, finden wir, wie Funk und Möller<sup>54)</sup> sehr große Unterschiede bei den einzelnen Pepsinsorten. Die von uns gemessenen Titrationsaciditäten von 1 gr der Präparate mit 0,1 n-Natronlauge und Phenolphthalein als Indikator entsprechen zahlenmäßig den Werten von Funk und Möller. Diese Autoren titrierten aber mit 0,01 n-Natronlauge. Der Unterschied um das 10fache beruht wahrscheinlich darauf, daß Funk und Möller mit den weniger wirksamen, d. h. stärker verdünnten Präparaten des D. A. B. 5 arbeiteten.

Nach Dinges und Housinger<sup>55)</sup> liegt es nahe, die Hygroskopizität mit dem Säuregehalt der Präparate in Beziehung zu bringen. Von 2 Pepsinen, welche die Autoren untersuchten, enthielt das eine mehr als doppelt so viel Säure wie das andere und erwies sich nach einem Jahr zusammengebacken, zum Teil etwas zerflossen, stark riechend und weniger wirksam als dasjenige mit dem geringen Säuregehalt.

Im Gegensatz zu der Auffassung von Dinges und Housinger, l. c., kann es sich auf Grund unserer Versuche nicht oder wenigstens nicht ausschließlich um den Gehalt an einer gebundenen starken Säure handeln.

Es ist nämlich sehr auffallend, daß gerade diejenigen Präparate, welche bei der Titration mit 0,1 n-Natronlauge gegen Phenolphthalein die größte Acidität aufweisen, ebenfalls den größten Widerstand bei einer Änderung der Reaktion mit Salzsäure zeigen (s. Tabelle). Dies bedeutet, daß diese Präparate die größte Pufferkapazität besitzen. Die Lösungen aller untersuchten Präparate geben mit Methylorange Gelbfärbung. Gibt man zu bestimmten Mengen dieser Lösungen je eine bestimmte Menge Salzsäure, so reagieren sie, je nachdem die Titrationsacidität hoch oder niedrig war, gegen Methylorange orange bzw. stark rot (s. Tabelle). Wir müssen annehmen, daß dieses Verhalten entweder von einer größeren Menge von Peptonen, von Phosphaten oder ähnlichen, als Puffer wirkenden Stoffen verursacht wird. Anorganische Puffer werden durch den Aschegehalt erfaßt, soweit es nicht flüchtige Ammonsalze sind. Da organische, puffernde Stoffe sehr wahrscheinlich viel hygroskopischer sind, als der als Verdünnungs-

<sup>54)</sup> P. C. H. 60, 517 (1919).

<sup>55)</sup> J. of the Americ. Pharm. Assoc. 15, 866 (1926).

mittel verwendete Milchzucker, dürften wir sie von diesem Standpunkte aus als schädlich betrachten und dasjenige Präparat als das reinere bezeichnen, das bei gleichbleibender Wirkung weniger dieser puffernden Begleitstoffe enthält.

Wir untersuchten, ob in dieser Hinsicht die Menge der hitze-koagulierbaren Stoffe etwas Näheres aussagt. Eine Paralleilität ist wohl angedeutet (Ausnahme No. 3, s. Tabelle S. 68). Es fragt sich nun, wie man die diesbezügliche Vorschrift der Ital. V auszuführen hat, welche die Lösung 1:100 mit Salzsäure schwach ansäuern und daraufhin erhitzen läßt. Unsere Lösungen reagierten alle schon sauer. P e k e l h a r i n g<sup>56)</sup> schließt auf die Eiweißnatur des Pepsins und hebt hervor, daß die Lösung von Pepsin in 0,05 n-Salzsäure beim schnellen Erhitzen einen Niederschlag bildet, beim langsamen Erhitzen hingegen nicht.

Andere Fällungs- und Farbreaktionen als Kriterien heranzuziehen, scheint nicht ratsam zu sein, da solche bei den sorgfältig hergestellten P e k e l h a r i n g'schen Pepsinen<sup>57)</sup> nicht negativ ausfielen und es sich also nur um schwer normierbare graduelle Unterschiede handeln könnte.

Außer den Forderungen, welche sich aus obigen Erwägungen ergeben, sind von besonderer Wichtigkeit diejenigen, welche die pharmazeutische Praxis an gute Präparate zu stellen hat, nämlich Aussehen, Geruch, Geschmack, Löslichkeit in verschiedenen Solventien. Die Eigenschaften in dieser Hinsicht haben wir für die sieben untersuchten Proben in nachstehender Tabelle zusammengestellt. Es erübrigt sich hier, auf die Einzelheiten einzutreten. Nur in bezug auf den Trübungsgrad möchten wir bemerken, daß die Angabe einer Vergleichstrübung hier ziemlich schwierig ist. Es scheint uns nicht unwichtig, diese nicht nur qualitativ festzulegen, wie es in vielen Arzneibüchern geschehen ist, sondern auch durch die Durchsichtigkeitsprobe schärfer zu umschreiben. Wir haben den Anregungen von F u n k und M ö l l e r<sup>58)</sup> folgend, die Probe wie folgt ausgeführt: die 2 prozentige Pepsinlösung wird in ein hohes Bechergläschen gegeben und dieses direkt auf ein Blatt des Arzneibuches (Ph. H. V) gestellt. Es wird beobachtet, ob die Schrift des Textes (mit Ausnahme der Überschriften und des Kleindruckes) durch eine vorgeschriebene Schichthöhe hindurch gelesen werden kann. Diese Probe ist verhältnismäßig scharf und hat den Vorteil, daß Trübungen von sehr feinem Dispersitätsgrad, die nephelometrisch sehr aktiv sind, gegenüber solchen von größerem Dispersitätsgrad günstiger beurteilt werden.

<sup>56)</sup> Zit. nach Ringer, H. 95, 201 (1915).

<sup>57)</sup> Hammarsten, H. 94 291 (1915).

<sup>58)</sup> P. C. H. 60, 517 (1919).

Auf Beimengungen von Stoffen, welche nach der Literatur bei der Herstellung mit den Pepsinpräparaten in Berührung kommen, zu prüfen, ist ziemlich aussichtslos, da ihrer zu viele in Betracht gezogen werden müßten.

Wohl aber besteht die Möglichkeit, andere Verdünnungsmittel als Milchzucker, z. B. Calciumcarbonat, Stärke, Dextrin, Rohrzucker<sup>59)</sup>, Gummi arabicum<sup>60)</sup> u. s. w. auf verhältnismäßig einfache Weise nachzuweisen. Ein Teil der obigen und noch viele andere Zusätze schließen sich durch die Erhöhung des Aschegehaltes, durch ihre Unlöslichkeit u. s. w. aus.

Von den in der Tabelle zusammengestellten Prüfungen empfehlen wir für ein Arzneibuch folgende:

**Aussehen:** Pepsin stellt ein weißliches bis blaßgelbes Pulver oder gelbe durchscheinende Lamellen dar.

**Geruch:** Pepsin riecht schwach und charakteristisch, nicht unangenehm (faulig).

**Geschmack:** Pepsin schmeckt schwach süßlich bis salzig, nicht bitter, zuweilen etwas an Käse erinnernd.

**Löslichkeit:** Die Lösung (1 + 50) in Wasser darf höchstens so stark getrübt sein, daß der Text des Arzneibuches (Ph. H. V) durch eine 5 cm hohe Schicht derselben noch lesbar ist; die Lösung darf nur schwach gelb gefärbt sein und weder einen unlöslichen Rückstand, noch nach 1 stündigem Stehen einen Bodensatz zeigen.

5 ccm der Lösung 1 + 50 darf nach Zusatz von 4 ccm 95 prozentigem Alkohol in kleinen Anteilen und Schütteln keine Fällung aufweisen.

**Titrationssacidität:** Nach Zusatz von 2,5 ccm 0,1 n-Natronlauge und 10 Tropfen Phenolphthalein (1 proz.) zu 25 ccm der Pepsinlösung 1 + 50 soll Rotfärbung auftreten.

**Reaktion:** Die Pepsinlösung 1 + 50 reagiere auf Methylrot rot und auf Bromphenolblau violett (ph ca. 4—5).

**Feuchtigkeit:** Nach 5stündigem Trocknen höchstens 5%.

**Asche:** Höchstens 3,5%.

**Aufbewahrung:** Unter Lichtschutz<sup>61)</sup> in gut verschlossenem Gefäße.

<sup>59)</sup> P. C. H. 60, 517 (1919).

<sup>60)</sup> Hugouneq; Bull. des sciences pharmacol. 34, 8 (1927).

<sup>61)</sup> Groenhoff; Phrm. W. 66, 986 (1929).

	I Witte U. S. A. X 1:3000	II Parke-Davis U. S. A. X 1 3000
Aussehen . . . . .	Pulver bläßgelb	Pulver gelblich-weiß
Geruch . . . . .	schwach charakteristisch	schwach charakteristisch
Geschmack . . . . .	im Mund zu- sammenklebend, fleischbrüheartig	nicht zusammen- klebend, süßlich-salzig
Feuchtigkeitsgehalt % 3—4 Stdn. . . . .	12,6*)	1,8
15 Stdn. bei 103—105° . . . . .	12,8	2,6
Aschegehalt [lufttrocken] % . . . . .	2,9	1,2
Lösung 1+50 in Wasser . . . . .		
Farbe: . . . . .	sehr schwach gelb	sehr schwach gelb
Durchsichtigkeit: Zahlen = Schichthöhe der Lö- sung, durch welche der Text des Arzneibuches [Ph. H. V] noch lesbar ist; in cm . . . . .	6,0	praktisch klar
Unlösliches: Bodensatz (+) nach 14-stünd. Stehen	—	—
Titrationacidität: 50 cm mit 0,1 n-NaOH und 10 Tr. Phenolphth. titriert; ccm . . . . .	5,0	4,2
Reaktion: 5 ccm + 3 Tr. Bromphenolblau**) . . . . .	violett	do.
5 ccm + 3 Tr. Methylrot . . . . .	rot	do.
5 ccm + 3 Tr. Methylorange . . . . .	gelb	do.
5 ccm + 0,1 ccm n-HCl + 3 Tr. Methylorange	rot	rot
Kochprobe: 5 ccm rasch aufgeköcht [röm. Ziffern = Trübungsgrade] . . . . .	III starke Trübung	III volumin. Flocken
5 ccm + 10 Tr. 0,2 proz. Essigsäure; rasch aufgekö.	stark getrübt	do.
Salzsäure: 5 ccm + 0,5 ccm n-HCl. Trübung wenig stärker +; schwächer - . . . . .	+	+
Alkohol: 5 ccm + 4 ccm 95 proz. Alkohol in kleinen Anteilen unter Schütteln . . . . .	opalescent ++	trübe
Glycerin: 5 ccm + 5 ccm Glycerin [spez. Gew. 1.26]	klar	klar
0,1 gr. Pepsin + 5 ccm Glycerin [spez. Gewicht 1.23] + 2 ccm H <sub>2</sub> O: nach 2 Tagen beobachtet . . . . .	klar	klar

\*) Es ist zu bemerken, daß die Feuchtigkeitsbestimmung beim Pepsin „Witte“ erst ausgeführt wurde, nachdem die Vorratsflasche während 1 1/2 Jahren sehr oft geöffnet worden war. Die Präparate II, III und IV wurden vor der Bestimmung nur wenige Male geöffnet.

\*\*) Bromphenolblau: 0,04 gr. Tetrabromphenolsulfonphthalein in 20 ccm Spiritus gelöst + aq. ad 100 ccm. — Methylrot: 0,05 gr. p-Dimethylaminoazobenzol-o-carbonsäure in 75 ccm Spiritus gelöst + aq ad 100 ccm. — Methylorange: 0,02 gr des Na-salzes der p-Dimethylaminoazobenzol-p-sulfosäure in 100 ccm Wasser.

III Parke-Davis U. S. A. X 1:3000	IV Merck Brit. 1:2500	V Siegfried 1:4000	VI Armour altes Präparat	VII Armour altes Präparat 1:5000
Körnchen gelb (etwa wie Lamelleneiweiß)	Pulver gelblich-weiß	Pulver gelblich-weiß	Pulver blaßgelb, etwas feucht aussehend	Pulver dunkelgelb, Stich ins Olivengrün
beinahe geruchlos	schwach charakteristisch	schwach charakteristisch	charakteristisch, etwas stärker, nicht unangenehm	etwa wie VI
nicht zusammen- klebend, an Käse erinnernd	wie II	wie III, schwach an Käse erinnernd	zusammenklebend, salzig-bitterer Nachgeschmack	zusammen- klebend, stark salzig und bitter
3,9	2,6	9,9	8,7	9,9
4,5	4,1	10,4	9,0	10,0
3,5	1,0	2,7	1,5	4,8
sehr schwach gelb	sehr schwach gelb	sehr schwach gelb	gelb	bräunlich-gelb
praktisch klar	opalescent	3,2—3,4	unter 2,2	unter 2,2
—	—	+; wenig; über- stehende Flüssig- keit trüb	+; wenig; über- stehende Flüssig- keit trüb	+; überstehend Flüssigkeit fast klar
10,0—10,5	3,5—3,8	4,2—4,5	9,0—9,5	12,5—13,0
do.	do.	do.	do.	do.
do.	do.	do.	do.	do.
orange	rot	rot	orangerot	orange
II Flocken	I geringe Koagulation	0 prakt. unverändert	III starke Koagulation	IV stark getrübt
do.	do.	fast unverändert	stark getrübt	do.
+	=	+	+ bis =	=
trübe	opalescent +	opalescent +	opalescent +	opalescent ++
klar	klar	schwach opalescent	stark opalescent etwa der Verdünnung 1:1 entspr.	
klar	prakt. klar	opalescent	trübe	trübe

## Zusammenfassung des Kapitels: „Pepsin“.

1. Einleitend wurden die Pepsinbestimmungsmethoden nach dem heutigen Stande unseres Wissens betrachtet, und nach einer kurzen Übersicht des Bestehenden, die, die offizinellen Methoden betreffenden Verhältnisse näher untersucht.

2. Nach einer kurzen Besprechung der allgemeinen Faktoren, Wasserstoffionenkonzentration der Verdauungsflüssigkeit, Verdauungstemperatur, Einfluß von Neutralsalzen auf die Hydrolyse durch Pepsin, Möglichkeiten zur Unterbrechung des Verdauungsvorganges, wurden einige für Arzneibuchzwecke aussichtsreiche Methoden (U. S. A. X-Methode, gravimetrische Methode, Groß'sche Methode und Volhard'sche Methode) experimentell geprüft und

3. die Vor- und Nachteile der behandelten Methoden mit Rücksicht auf eine Verwendung als Arzneibuchmethode zusammengestellt.

4. Die Befunde über weitere Prüfungen von Handels-Pepsinen (Sinnenprüfung, Löslichkeit, Feuchtigkeitsgehalt u. s. w.) wurden tabellarisch zusammengestellt, die wesentlichen Punkte derselben erörtert und eine Zusammenstellung derjenigen Prüfungen gegeben, welche für ein Arzneibuch empfohlen werden können.

## II. Pankreatin.

### A. Allgemeines.

Pankreatin ist zur Aufnahme in die neue Auflage des Schweiz. Arzneibuches vorgeschlagen worden. Im Apothekerlaboratorium wird dieses Präparat im allgemeinen nicht hergestellt, sondern seine Fabrikation liegt ausschließlich in den Händen einiger Spezialfirmen, welche auch noch Pepsin und andere Enzympräparate in den Handel bringen. Die, bei der Herstellung solcher Produkte im großen gemachten Erfahrungen, dringen nur spärlich in die Öffentlichkeit, so daß man hier unter den nur unzulänglich bekannten Herstellungsverfahren keine Auswahl treffen kann, welche als Standard angesehen zu werden verdient.

In neuerer Zeit sind von R. Willstätter und dessen Mitarbeitern Darstellungs- und Trennungsmethoden von Enzymen ausgearbeitet worden, welche in ihren einzelnen Etappen durch zuverlässige Wertigkeitsbestimmungen der Kontrolle unterlagen. Wie weit diese neuen Richtlinien in der Technik zurzeit berücksichtigt werden, ist uns unbekannt. Wir werden an anderer Stelle noch kurz auf diesen Punkt zurückkommen.

Obige Unsicherheiten drücken sich notgedrungen in den Definitionen des Präparates „Pankreatin“ in den, diesen Artikel führenden Arzneibüchern aus, welche wir hier folgen lassen:

Gall: „La pancréatine est une sorte d'extrait aqueux de pancréas préparé à froid; elle renferme plusieurs ferments solubles parmi lesquels les plus importants sont la trypsine...“

Gall. (Nouv. Suppl. 1926) S. 52: „Au lieu de: La pancréatine est une sorte d'extrait de pancréas préparé à froid, ...“

Lisez: La pancréatine est de l'extrait de pancréas préparé à froid et desséché, ...“

Brit. X: „Liquor Pancreatis“. Pancreatic solution contains the digestive principles of the fresh pancreas of the pig.

Mix two hundred and fifty millilitres of alcohol (90 per cent) with two hundred millilitres of glycerin and sufficient distilled water to produce thousand

millilitres. In this mixture macerate for seven days two hundred and fifty grammes of the pancreas, freed from fat and external membrane, and finely divided by trituration with washed sand or powdered pumice stone; filter“.

U. S. A. X: „Pancreatin is a substance containing enzymes, principally amylopsin, trypsin and steapsin, obtained from the fresh pancreas of the hog. . .“

Svenska: „Aus den Bauchspeicheldrüsen warmblütiger Tiere hergestelltes Präparat, welches proteolytische, amylytische, auch lipolytische Enzyme enthält. Pankreatin wird gewöhnlich aus frischen Drüsen des Schweines hergestellt“.

D. A. B. 6, Nederl. V und Ital. V führen das Pankreatin nicht.

In den angegebenen Definitionen macht die Brit. eine Ausnahme, indem sie eine Vorschrift für die Herstellung eines Extraktes gibt. Für die Trockenpräparate fehlt jede präzise Fassung, und es ist daher auch nicht verwunderlich, wenn die Handelsprodukte in ihren Eigenschaften erheblich differieren.

Die bekannten Handbücher auf diesem Gebiete können uns einigermaßen über das Prinzip der technischen Herstellungsverfahren aufklären.

Hager, II, S. 384, 1927: 1. Gereinigte, gehackte Bauchspeicheldrüsen von Rindern oder Schweinen werden mit der doppelten Gewichtsmenge chloroformgesättigten Wassers angerührt, nach 12 Stunden abgepreßt, filtriert und bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur eingetrocknet, oder

2. der wässrige Auszug mit Alkohol versetzt, wodurch die Enzyme gefällt werden. Der Niederschlag wird abgesogen, mit Alkohol gewaschen und mit Dextrin oder Milchzucker gemischt.

Ullmann: Enzyklop. d. techn. Chemie, 1920, Bd. 8: „Schweine- und Rinder-Pankreas finden Verwendung. Die officinellen Präparate aber werden nur aus Schweinepankreasdrüsen gewonnen, da Rinderdrüsen weniger wirksam sind. Die zerhackten Drüsen werden mit Chloroformwasser angeteigt und ausgepreßt. Der Preßsaft wird mit Alkohol oder Aceton gefällt, der Niederschlag abzentrifugiert, gepreßt, mit Alkohol, Aceton und Äther gewaschen und rasch im Luftstrom oder im Vakuum bei 40° getrocknet.“

Merck's wissenschaftl. Abhandlungen, No. 39, S. 5 ff.: Eine Reihe von Verfahren werden beschrieben, die hauptsächlich im Hinblick auf die proteolytische Wirksamkeit ausgearbeitet wurden. Das eigentliche Pankreatin (Merck, l. c. S. 79) wird nach den gleichen Methoden wie sie Hager l. c. und Ul. l. c. angeben, hergestellt.

Oppenheimer: Die Ferm. u. ihre Wirkungen, II, S. 894: „Wenn man Pankreasextrakt mit Alkohol fällt, entsteht ein trypsinhaltiger Niederschlag, den man Pankreatin nennt.“

Diese Äußerungen deuten eigentlich auf eine recht einfache Gewinnungsart hin, die entweder nach 1. oder 2. der bei Hager, l. c., angegebenen Verfahren vor sich geht. Ob die beiden im experimentellen Teil (S. 101) gefundenen zwei Typen von Pankreaspräparaten diesen beiden Verfahren entsprechen, ist nicht sicher, sehr wohl aber möglich. Eine Bemerkung von P. Bergell und H. Carls<sup>1)</sup>, welche sich mit der Technologie der Fermentpräparate eingehend befaßten, mahnt zur Vorsicht und beleuchtet den relativen Wert der Hager'schen und ähnlicher Angaben: „Der Versuch,

<sup>1)</sup> Oppenheimer: Die Fermente und ihre Wirkungen, IV, 2, Halbband, S. 144.

Produktion und Provenienz der Handelswaren zu klären, mußte bald aufgegeben werden.“

Daß die Möglichkeiten der Herstellungsverfahren nicht auf obige, eher schematische Angaben beschränkt sind, sondern auch Adsorptionen, Dialysen, verschiedenartige Lösungs- und Fällungsmittel, Antiseptika u. s. w. eine wichtige Rolle spielen können, zeigt die Patentliteratur.

Ein weiterer Umstand läßt die Aufnahme einer Herstellungsvorschrift in ein amtliches Arzneibuch noch nicht wünschenswert erscheinen, nämlich seine therapeutische Verwendung. Gewöhnliches Pankreatin, d. h. das Präparat der Arzneibücher, büßt bei der Einnahme per os im Magen stark an Wirksamkeit ein<sup>2)</sup>. Das Problem, diese unerwünschte Einwirkung des Magensaftes nicht nur durch physikalischen Schutz (Kapseln etc.), sondern auch auf chemischem Wege zu erreichen, ist neuerdings ziemlich aktuell geworden. Auszüge oder Preßsaft werden mit Tannin<sup>3)</sup> oder Salicylsäure<sup>4)</sup> gefällt. Was in dieser Hinsicht erreicht wurde, ist bis heute durch vergleichende Untersuchungen noch nicht klar gestellt. Die experimentelle Beantwortung dieser Frage ist von Rojahn und seinen Mitarbeitern<sup>5)</sup> aufgegriffen worden; die Resultate stehen aber zur Zeit noch aus. Wenn wir einerseits über den therapeutischen Wert verschiedener Produkte noch wenig unterrichtet sind, so können wir uns doch anhand von zuverlässigen Arbeiten Rechenschaft über die enzymatische Wirkungsgröße *in vitro* geben. E. Waldschmidt-Leitz<sup>6)</sup> schreibt: „Die tryptische Aktivität dieser gereinigten Enzympräparate der Technik war verhältnismäßig gering und sie erreichte nicht einmal die der nach unserem Verfahren dargestellten frisch getrockneten Drüsenpulver.“ Rojahn und Müller<sup>7)</sup> stellten nach der von R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz<sup>8)</sup> empfohlenen Methode Drüsentrockenpulver her und verglichen damit eine Reihe von Pankreas-Spezialitäten. Diese sind mit wenigen Ausnahmen (Pankreontabletten der Kali-Chemie A. G., Abt. Rhonania-Kuhnheim, Berlin N. W. 7) außerordentlich viel weniger wirksam, auch wenn man die Verdünnung durch ein für die Tablettierung notwendiges Bindemittel in Betracht zieht. Es gilt dies für alle drei Enzymsysteme: Proteasen, Amylase und Lipase. Bezüglich der Forderung der Gall. und der U. S. A. äußert sich Kral<sup>9)</sup>

<sup>2)</sup> E. Ohlsson und T. Swaetichin: *Bull. soc. chim. biol.* 11, 333—86 (1929), C. (1930), I, 2905.

<sup>3)</sup> Oppenheimer, IV: *Bergell u. Carls*, 2. Halbband, S. 244.

<sup>4)</sup> Nach *Ul.*, Bd. 8, Art. Pankreatin.

<sup>5)</sup> Rojahn *Ap.* 45, 1070 (1930) und zwar S. 1071.

<sup>6)</sup> *H.* 132, 181 (1924) und zwar S. 220.

<sup>7)</sup> *Ap.* 45, 1044, 1055, 1070 (1930).

<sup>8)</sup> *H.* 125, 132 (1923) und zwar S. 147—150.

<sup>9)</sup> *In Ul.* (1920), Bd. 8, Art. Pankreatin.

wie folgt: „Den Anforderungen der französischen und amerikanischen Pharmakopöe entsprechen die Handelsprodukte fast niemals, wenigstens was den Grad der tryptischen Wirkung anbelangt.“

Hinsichtlich der Wirksamkeit dürfte, abgesehen von der experimentell noch ungelösten Frage der Resistenz gegen den Magensaft, als zweckmäßigste Verwendungsform zur Zeit das Drüsen-trockenpulver angesehen werden. Aus vielen analogen Fällen in der Enzymchemie ist man berechtigt, mit einer hohen Schutzwirkung der begleitenden Drüsenstoffe zu rechnen. Die Forderung, dasselbe nach der von R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz, l. c., angegebenen Methode herzustellen, schließt für die Technik nur die Schwierigkeit der möglichst raschen Aufarbeitung der Drüsen vom Tier weg ein. Als Lieferanten des Rohmaterials kommen nur die Schlachthöfe großer Städte in Frage. Transport und Zuwarten bis genügend Material sich angehäuft hat, können die Qualität des Produktes verändern.

Die Zubereitung nach R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz ist sehr einfach: Die gereinigten und feingehackten Drüsen werden nacheinander mit Aceton (nicht mit Alkohol, da Zerstörung), Aceton-Äther und Äther behandelt, an der Luft in dünner Schicht getrocknet, nochmals fein pulverisiert und durch ein feines Sieb gerieben. Dieses Pulver, dessen Eiweißbestandteile durch die Behandlung mit Aceton zum Teil fixiert, d. h. mehr oder weniger schwer löslich gemacht wurde, dient nun seinerseits erst als Ausgangsmaterial zur Herstellung von klaren Enzymlösungen und zur weiteren Konzentration und Trennung der Enzyme. Als Lösungsmittel eignet sich besonders gut das von Wittich<sup>10)</sup> zuerst empfohlene Glycerin (R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz verwendeten die 16 fache Menge 87%igen Glycerins), das die Amylase praktisch vollständig, das Trypsin etwa zur Hälfte, die Lipase zu 70—80% aus dem Trockenpulver herauslöst<sup>11)</sup>. Während die Enzyme, welche ebenfalls leicht in Wasser übergehen, darin mit größerer Geschwindigkeit der Zerstörung anheimfallen, sind Glycerinlösungen sehr beständig, bakterienfest und relativ eiweißarm. Durch Verdünnen mit Wasser entsteht ein Niederschlag, der aber im Gegensatz zu demjenigen, welcher unter den gleichen Umständen aus Glycerinauszügen frischer Drüsen mit Wasser erzeugt wird, viel weniger Enzyme mitreißt. Die Verluste an Enzymen durch Extraktion der frischen Drüsen sind bedeutend größer als bei Verwendung der oben beschriebenen Trockenpräparate (vgl. Brit.). Für Fälle, wo ein lösliches Präparat nicht unumgänglich notwendig ist, wird man es also vorteilhaft durch das Drüsenpulver ersetzen, ganz besonders, wenn man die unvoll-

<sup>10)</sup> Pflüg. Arch. 2, 196.

<sup>11)</sup> R. Willstätter u. E. Waldschmidt-Leitz: H. 125, 132 (1923) und zwar S. 153 u. S. 158.

ständige, bisweilen ziemlich schlechte Löslichkeit der Handelsprodukte sich vergegenwärtigt, welche vielleicht noch weniger zu vermeiden ist, wenn die Notwendigkeit der Kombination der Enzyme mit anderen Stoffen, z. B. Tannin, sichere Form annehmen sollte.

Außerdem ist mit einiger Sicherheit vorauszusehen, daß, solange keine prinzipiell neuartige Gewinnungsmethodik gefunden wird, früher oder später alle die mannigfaltigen Vorschläge, welche von der frischen Drüse ausgehen<sup>12)</sup>, zugunsten des Willstätter'schen Verfahrens an Bedeutung verlieren, d. h. die ersten Stadien der Drüsenverarbeitung werden im Prinzip den gleichen oder mindestens ähnlichen Weg gehen.

Als Tierarten, deren Bauchspeicheldrüsen verwendet werden sollen, figurieren in den Arzneibuchforderungen nur das Schwein, bzw. Schwein und Rind. R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz<sup>13)</sup> geben im Gegensatz zu E. Baur<sup>14)</sup> dem Schweinepankreas den Vorzug, besonders wegen des bedeutend höheren Lipasegehaltes. Nach Krall<sup>15)</sup> wird das Schweinepankreas auch in der Technik dem Rinderpankreas vorgezogen, weil man bei der Fabrikation der officinellen Pankreatine sonst die verlangte Wirksamkeit kaum erreicht.

Falls man auf die Lipase-Wertbestimmung in der Neuauflage des Arzneibuches verzichtet, ist es zweckmäßig, die beiden Tierarten Schwein und Rind gelten zu lassen, denn es kommt offenbar mehr auf die Gewinnungsmethode an, als auf das erwähnte Ausgangsmaterial.

Ob die Zulassung von Schafs- und Kalbs-Bauchspeicheldrüsen lohnend ist, können wir nicht beurteilen; auch sind uns Angaben über deren Enzymgehalt aus der neueren Zeit unbekannt.

---

## B. Wertbestimmungen.

I. Allgemeines: Prinzipiell müssen wir beim Pankreatin genau die gleichen Gesichtspunkte, wie beim Pepsin berücksichtigen. Allgemeine Faktoren, wie Sinnenprüfung (Aussehen, Geruch und Geschmack), Löslichkeit, Fettgehalt, Feuchtigkeitsgehalt und Aschengehalt treten naturgemäß gegenüber der Wirksamkeitsbestimmung

---

<sup>12)</sup> Vgl. Oppenheimer: I, 466 (Lipasen); I, 669 (Amylasen); II, 859 (Trypsasen); III, 894 (Zusammenfassung); ebenso L. Michaelis in Hdb. d. biol. Arbeitsmeth. v. Abderhalden, III, 1.

<sup>13)</sup> H. 125, 132 (1923).

<sup>14)</sup> Z. angew. Chem. 22, 97 (1909) und zwar S. 98.

<sup>15)</sup> In Ul., Bd. 8, Art. Pankreatin.

in den Hintergrund, ohne jedoch bedeutungslos zu sein. Zum Teil hängen sie direkt mit der Herstellung eng zusammen und können für eine Qualitätsbeurteilung herangezogen werden.

Für die Auswahl der Methoden zur Bestimmung der Wirksamkeit gelten die gleichen Postulate wie beim Pepsin:

1. Möglichst einfache Apparatur,
2. Leicht zu beschaffendes, gleichmäßiges Substrat,
3. Einfachheit in der Ausführung (Sparsamkeit an Material und Zeit),
4. Eindeutigkeit der Resultate.

Wegen ihrer untergeordneten Bedeutung in bezug auf Menge bzw. Wirksamkeit, fallen zwei Enzyme im vornherein außerhalb unsere Betrachtung, nämlich die Laktase und das Pankreaslabferment. Ferner unterschiebt sich die Wirkung der Peptidase derjenigen der Trypsin-Enterokinase und was wir mit vielen Methoden messen, ist die gesamte proteolytische Leistung. Entscheidend für eine Prüfung sind nur Trypsin-Kinase bzw. das Trypsin, die Amylase und die Lipase.

Das Mengenverhältnis dieser Enzyme wird durch eine Anzahl von unübersehbaren Faktoren (Alter, Ernährungszustand der Tiere, Herstellung, Aufbewahrung) beeinflusst und kann daher in der Handelsware beträchtlichen Schwankungen unterliegen. Neben Minimalgrenzen Maximalwerte aufzustellen, wird angesichts der einleitend erwähnten Verhältnisse nicht notwendig, ja sogar eher nachteilig sein, denn sie würden eine Einstellung auf eine bestimmte Aktivität sehr erschweren. Ein Präparat, das fünfmal die mindest geforderte proteolytische Kraft besitzt und nur knapp die amylytische müßte entweder beanstandet oder eventuell mit einem anders zusammengesetzten Pankreatin entsprechend vermischt werden oder dann wäre das Wirksamkeitsintervall für das eiweißabbauende Vermögen sehr weit zu fassen.

Außerdem können die Produkte verschieden gut haltbar sein, ohne daß meßbare Einflüsse wie Feuchtigkeitsgehalt und Reaktion als dafür verantwortlich erkannt werden. Wie wir weiter unten noch sehen, schwanken diese stark. Die diesbezüglichen Forderungen sind willkürlich, weil zu wenig Tatsachenmaterial vorliegt, das deren Anteil an der Inaktivierung aufklärt.

II. Lipasebestimmung: Um die Möglichkeit bzw. Notwendigkeit einer Lipasebestimmung für Pharmakopözwecke zu beurteilen, sind wir fast vollständig auf die Arbeiten R. Wilstätter's und dessen Mitarbeiter angewiesen.

Von allen drei Enzymen ist die Lipase das labilste. Bei den früher üblichen wissenschaftlichen Isolierungsmethoden und allem

Anchein nach immer noch bei vielen technischen Verfahren, wird sie weitgehend zerstört. So wirken Wasser, Alkohol und andere Lösungsmittel intensiv schädigend<sup>16)</sup>.

Bei Ullmann<sup>17)</sup> stoßen wir auf einen Hinweis, der dieses Verhalten betrifft: „Handelsprodukte enthalten selten Steapsin = Lipase) und darauf wird auch kaum geprüft.

In der Tat findet man in keinem der Pharmakopöeartikel eine Lipasebestimmung. Kürzlich erschien eine Untersuchung von Rojahn und Müller<sup>18)</sup>, welche eine Reihe wertvollen Zahlenmaterials zutage fördert und die Behauptung in Ullmann, l. c., voll- auf bestätigt. Von 21 untersuchten Präparaten sind 12 lipatisch unwirksam. Den höchsten Wert, dies sei hier gleich vorweggenommen, für alle drei Enzyme, weist das von den Autoren nach R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz<sup>19)</sup> zur Kontrolle hergestellte Drüsenpulver auf. Die zweithöchsten Werte sind für die Pankreotabletten angegeben, welche als: Pankreastrockensubstanz 85,0; Tannin 3,8; anorganische Salze (zur Stabilisierung) 11,2 deklariert sind. Ein gewisser Lipasewert kann geradezu als Garantie für eine sorgfältige Aufarbeitung betrachtet werden. Nach diesem Prinzip stellt die Krause-Medico-Gesellschaft m. b. H. in München<sup>20)</sup> ihr Pankreas-Dispert ein, indem sie nach R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und F. Memmen<sup>21)</sup> die unter bestimmten Umständen aus Olivenöl abgespaltenen Fettsäuren titriert\*). Wie wir später noch sehen werden, müssen wir die Proteasenbestimmung als Arzneibuchmethode fallen lassen und an ihre Stelle eine Lipasebestimmung setzen, sobald man ein Drüsenpulver von der erwähnten Darstellungsart nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz, l. c., verlangt. Bleibt man aber bei den handelsüblichen Pankreatinen, so kommt eine Lipasebestimmung, wie leicht einzusehen ist, nicht in Frage.

In Kürze soll nun das Wesentliche bei der Lipasemessung wiedergegeben werden. Es erübrigt sich, die oft schlecht fundierten älteren Anschauungen und Methoden einzeln anzuführen.

Als eines der wichtigsten Ergebnisse, das im letzten Dezennium aus der Willstätter'schen Schule hervorgegangen ist, dürfen wir den Nachweis und die Betonung der enormen Bedeutung

<sup>16)</sup> R. Willstätter u. E. Waldschmidt-Leitz: H. 125, 132 (1923) u. zwar S. 152.

<sup>17)</sup> Ul., Bd. 8, Art. Pankreatin.

<sup>18)</sup> Ap. 45, 1044, 1055, 1070 (1930).

<sup>19)</sup> H. 125, 132 (1923).

<sup>20)</sup> Selbstbericht der Firma in Oppenheimer: Fermente u. ihre Wirkungen, IV, 2. Halbband, 243.

<sup>21)</sup> H. 125, 115 (1923).

\*) Nach einer Privatmitteilung von Friedr. Witte, Rostock, stellt diese Firma neuerdings auch Pankreatine her, die ca. 15—40 Lipase-Einheiten nach Willstätter pro Gramm enthalten.

der Begleitstoffe bei enzymatischen Vorgängen ansehen. Diese Untersuchungen zeigten, wie Eigenschaften, die früher als ziemlich charakteristisch für das Enzym als Stoff galten (z. B. das Reaktionsoptimum), ihrerseits wieder Funktionen von anderen Faktoren sind. So wirken Begleitstoffe auf die Adsorbierbarkeit, Aktivierung, Hemmung, Reaktionsoptimum, Stabilität etc. Diese Verhältnisse treten ganz besonders bei den Lipasen in den Vordergrund und bedingen die vielen Widersprüche und Debatten in der Fachliteratur.

Als Substrate für die Lipasenbestimmung, an denen entweder physikalische oder chemische Änderungen gemessen werden, dienen:

1. natürlich vorkommende Fette, vor allem Olivenöl;
2. synthetische Ester: Tributyrin, Monobutyryn, Triacetin, Methylbutyrat, Propylpropionat und viele andere.

Die bekannteste physikalische Methode ist die stalagmometrische von Rona und Michaelis<sup>22)</sup>. Sie beruht darauf, daß ein Ester die Oberflächenspannung des Wassers vermindert, während dessen Spaltprodukte keinen oder nur untergeordneten Einfluß auf dieselbe ausüben. Zu dieser Bestimmung eignen sich nur Ester, welche von dem zu messenden Enzym leicht gespalten werden und sich in Wasser klar lösen. Rona und Michaelis, l. c., verwendeten eine gesättigte Mono- oder Tributyrin-Lösung und ermittelten für diese und deren zu Eichzwecken hergestellten Verdünnungen die aus einer Tropfpipette ausfließende Tropfenzahl. Im Hauptversuch ist es mit Hilfe derselben und der nach obigem Prinzip hergestellten Eichkurve möglich, auf den jeweiligen Gehalt der Verdauungsflüssigkeit an ungespaltenem Ester zu schließen.

In der Praxis müssen noch eine Reihe wichtiger Faktoren berücksichtigt werden, welche auch die rein chemischen Methoden betreffen.

Als Optimaltemperatur wird öfters 40° angegeben<sup>23)</sup>. Merklie Zerstörung ist aber bei dieser Temperatur nicht ausgeschlossen und gerade wegen der großen Labilität und den komplizierten Verhältnissen der Schutz- und Aktivierungs-Einflüsse durch das Milieu ist es vorsichtiger, die Temperatur tiefer zu halten. R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und F. Memmen<sup>24)</sup> stellen ihre Versuche bei 30° an; Knafl-Lenz<sup>25)</sup> bei 37°.

<sup>22)</sup> Bio. Z. 31, 345 (1911) u. Rona in Hdb. Biol. Arbeitsmeth. v. Abderhalden, Abt. IV, 2. Teil.

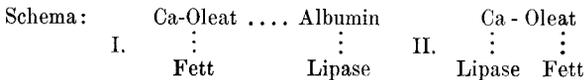
<sup>23)</sup> Oppenheimer: Ferm. u. ihre Wirkungen, I, 471.

<sup>24)</sup> H. 125, 93 (1923).

<sup>25)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 97, 242 (1923).

Wie schon erwähnt, spielen die zufälligen Begleitstoffe, aber auch die Verteilung eine hervorragende Rolle, sodaß es ursprünglich den Anschein hatte, als ob die stoffliche Menge des Enzyms nicht direkt mit dessen Wirksamkeit zusammenhängen würde. Will man nun verschiedene Präparate miteinander vergleichen, so muß in erster Linie die Variabilität des Reaktionsmilieus ausgeschaltet werden. Willstätter geht von dem Gedanken aus, das Enzym durch absichtlichen Zusatz ganz bestimmter Stoffe zur stark erhöhten Leistung zu bringen, sodaß die verschiedenen zufälligen Begleiter keine oder nur unbedeutende Wirkungserhöhung bedingen. Die gleichen Stoffe, die im alkalischen Gebiet aktivieren, sind im sauren indifferent oder hemmend. Als wichtigste Aktivatoren haben sich für die Ölsplaltung im alkalischen Gebiet gallensaure Salze, Kalkseifen und Albumin erwiesen. Albumin kann unter besonderen Bedingungen, z. B. bei Tributyrinsplaltung, auch bei alkalischer Reaktion hemmen; mit Natriumoleat zusammen wieder fördernd wirken. Wenn in vielen Arbeiten vom ph-Optimum des lipatischen Prozesses (meist zwischen  $ph = 8,0$  und  $9,0$ ) die Rede ist, so können wir auf Grund der neueren Anschauungen diesem nicht mehr den gleichen Sinn, wie es früher geschah, beimessen. Man hat es mit einem scheinbaren Optimum zu tun, das in nicht übersehbarer Weise von den besprochenen Faktoren abhängt. Für die von Terroine<sup>26)</sup> beschriebene Aktivierung durch größere Glycerinzusätze mit Albumin nimmt dieser Autor an, daß sie der erhöhten Viskosität und der dadurch stabiler gewordenen Suspension des Ölwassersystems, welche eine größere Angriffsfläche dem Enzym gegenüber aufweist, zugeschrieben werden könne.

Die von R. Willstätter vertretene Anschauung über die Aktivierung durch Calciumoleat-Albumin, glykocholsaures Natrium-Albumin u. s. w., beruht auf der Annahme eines Adsorptionssystems, das als gekoppeltes Adsorbat (I) bezeichnet wird, nach dem Schema:



oder als komplexes Adsorbat (II), wenn nur Ca-Oleat zugegen ist.

Durch die Einbeziehung solcher Kolloidteilchen in das System, welche gleichzeitig Substrat und Enzym adsorbieren, wird die Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat erleichtert. Auch Glycerin soll durch die Fähigkeit, Lipase und Seife zu lösen und die damit verbundene Adsorption des Öles an die Seife ähnlich wirken. Durch das Prinzip der ausgleichenden Aktivierung oder Hemmung ist es tatsächlich gelungen, sehr verschieden reine Präparate zu

<sup>26)</sup> Eio. Z. 23, 404 (1910).

messen und die sukzessive Enzym-Anreicherung bei präparativen Arbeiten scharf zu verfolgen.

Die chemischen Lipase-Bestimmungsmethoden, bei denen die abgespaltenen Fettsäuren mit Alkali titriert werden, sind schon sehr alt. Eine Methode, bei welcher der ph durch Laugenzugabe während der Verdauung konstant gehalten wird<sup>27)</sup>, stellt zu große Ansprüche teils an die Apparatur, teils an die Technik der Ausführung und wir lassen es mit deren Erwähnung bewenden.

Den sorgfältigsten und gründlichsten Ausbau erfuhr die chemische Lipase-Bestimmungsmethodik in Willstätters Laboratorium. Drei Modifikationen haben sich bewährt:

1. die Bestimmung bei wechselndem ph vom alkalischen zum sauren mit Calciumchlorid und Albumin als Aktivatoren.
2. im konstant alkalischen Medium (ph = 8,9) und Aktivierung mit Calciumchlorid und Albumin,
3. im sauren Milieu unter Hemmung mit Albumin.

Die Auswahl eines der drei obigen Bestimmungsverfahren wird durch das Urteil der Autoren erleichtert. Sie heben die guten Erfahrungen mit der sub. 1. skizzierten Art der Ausführung hervor, weshalb wir hier deren Einzelheiten<sup>28)</sup> und daran anschließend die von R o j a h n und M ü l l e r<sup>29)</sup> ausgeführte Berechnung der Lipaseeinheit bei Verwendung eines Olivenöls mit unbekannter Verseifungszahl folgen lassen. Das Untersuchungsmaterial, mit Glycerin angerieben, beläßt man zweckmäßig 1—4 Stunden bei 30° oder stellt mit einer etwas größeren Probe Glycerinlösungen her.

Methode<sup>30)</sup>: Man bringt das Enzymmaterial mit Wasser auf 10 ccm in eine weithalsige Flasche von 30 ccm Inhalt. Dann gibt man 2,5 g Olivenöl (Verseifungszahl 185,5) und 2 ccm Pufferlösung (n-NH<sub>3</sub>NH<sub>4</sub>Cl im Verhältnis 1 : 2 also 0,66 ccm n-N<sub>3</sub>H + 1,34 ccm n-NH<sub>4</sub>Cl, ph = 8,9 bei 30°) und 0,5 ccm 2proz. Calciumchloridlösung und nach kurzem Durchschütteln 0,5 ccm 3proz. Albuminlösung hinzu. Die Mischung wird regelmäßig und kräftig 3 Minuten mit der Hand geschüttelt. Danach kommt die Emulsion bei 30° in den Thermostaten (wobei zu bemerken ist, daß die Emulsionsform selbst nicht etwa das Bedingende für die Spaltung ist und überhaupt die Emulsion nur von geringer Bedeutung für die lipolytische Wirkung ist). Die Bestimmung soll so eingerichtet werden, daß die Hydrolyse zwischen 10 und 24% fällt. Überschreitet die Spaltung 24%, so soll sie mit der halben Enzymmenge wiederholt werden. Die Reaktion durchschreitet nach 8,5% Spaltung den Neutralpunkt. Bei 24% Spaltung, dem Endpunkt der Spaltung, ist ph = 5,5.

Zur Titration der entstandenen Säure wird der Flascheninhalt mit 96 proz. Alkohol in einen Erlenmeyerkolben gespült, sodaß das Volumen der alkoholischen Flüssigkeit 125 ccm beträgt. Die Öltropfen, die noch an der Oberfläche schwimmen,

<sup>27)</sup> Knaffl-Lenz, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **97**, 242 (1923).

<sup>28)</sup> Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Memmen: H. **125**, 93 (1923) u. zwar S. 103.

<sup>29)</sup> Ap. **45**, 1055 (1930).

<sup>30)</sup> Nach Prakt. d. physiol. Chem. v. Rona, Bd. 1, S. 101 (1926).

löst man auf, indem man noch 20 ccm Äther zusetzt. Die Wirkung der Lipase wird hierdurch sistiert. (In nur alkoholischem Medium schreitet die Fermentwirkung noch langsam fort.) Als Indicator dienen 12 Tropfen 1 proz. alkoholischer Lösung von Thymolphthalein, es wird mit 0,1-1 n alkoholischer Kalilauge bis zu einem deutlich blauen Farbton titriert. Dabei werden außer der gebildeten Fettsäure auch die Salzsäure des Ammonchlorids und die amphotere Substanz der Proteingruppe aus der Drüsensubstanz mittitriert. Der hierfür abzuziehende Alkaliverbrauch wird in einer entsprechenden Kontrolle ermittelt.

Als Lipaseeinheit (L. E.) wird die Menge Lipase bezeichnet, die unter den oben charakterisierten Bedingungen (im Volumen von 13 ccm, enthaltend 2 ccm  $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ -Puffer von  $\text{pH} = 8,9$  unter Aktivierung mit 10 mg  $\text{CaCl}_2$  und 15 mg Albumin) bei  $30^\circ$  in 1 Std. 24% von 2,5 g Olivenöl (mit einer Verseifungszahl von 185,5) spaltet. Das Maß für die Konzentration der Lipase ist der Lipasewert (L. W.), d. h. die Anzahl der Lipaseeinheiten in einem Zentigramm der Substanz.

Die Angabe des prozentischen Spaltungsgrades könnte leicht Verwirrung hervorrufen, auch dann, wenn die Verseifungszahl (V. Z.) des verwendeten Öles (die auf keinen Fall fehlen dürfte), mit erwähnt würde. Fehler bis zu mehreren Prozenten lägen im Bereiche der Möglichkeit (V. Z. des Olivenöls nach Ph. H. V = 185—196).

Es ist durchaus empfehlenswert, sich an diese Festlegung der Einheiten zu halten. Eine einzige Zahl genügt (die Einhaltung der angegebenen Versuchsbedingungen vorausgesetzt), um die verseifende Wirkung eines Präparates eindeutig zu kennzeichnen. Weiter gestattet sie, die Resultate von verschiedenen Forschern direkt zu vergleichen, was z. B. bei den meisten Pepsinbestimmungsmethoden absolut unmöglich ist. Die Annahme einer Abhängigkeit der Verseifungsgeschwindigkeit von der Verseifungszahl ist nicht ausgeschlossen und experimentell nicht untersucht. Die Größenordnung der Änderung ist wahrscheinlich sehr gering und geht vielleicht nicht über die Versuchsfehler hinaus.

Dementsprechend nehmen Rojahn und Müller<sup>31)</sup> stillschweigend an, als Voraussetzung der Berechnung der Formeln:

$$1. \quad x = \frac{1,209 \cdot c - 5,46}{18,55}$$

$$2. \quad x = 0,0217 \cdot c$$

$x$  = Anzahl der Lipaseeinheiten

$c$  = Anzahl ccm 0,1 n-KOH durch die Fettsäuren verbraucht,

daß aus der gleichen Gewichtsmenge Olivenöl mit einer von 185,5 verschiedenen V. Z. eine äquivalente Säuremenge in Freiheit gesetzt wird, wie aus dem der Einheit zugrunde gelegten Öl mit V. Z. 185,5.

Die Formeln werden von Rojahn und Müller<sup>32)</sup> aus den von Willstätter und Mitarbeitern<sup>33)</sup> zusammengestellten Daten berechnet. Die entsprechende Kurve (Lipaseeinheiten = Abszisse

<sup>31)</sup> Ap. 45, 1055 (1930).

<sup>32)</sup> idem.

<sup>33)</sup> H. 125, 93 (1923).

als Funktion des Spaltungsgrades in % = Ordinate) verläuft zunächst sehr steil (bis ca. 7,4%), setzt sich weniger steil als Gerade fort und biegt bei 24% Spaltung nochmals um (Hemmung im sauren Gebiet). Werte, die auf den Anfang der Kurve bis etwa 8% Spaltung fallen, sind mit relativ großen Fehlern behaftet und es ist besser den Versuch mit einer größeren Lipasemenge zu wiederholen. Die Gleichung 2., welche für diesen Anfangsbereich bestimmt ist, kann man unseres Erachtens entbehren.

Sofern man die Gleichung 1. aus der empirisch erhaltenen Kurve ableitet, findet man für die Konstanten a und b in  $x = \frac{y - b}{a}$  ein mögliches Intervall von 19,3 bis 18 bzw. 4,7 bis 6,0; als wahrscheinlich etwa 18,7 bzw. 5,3. Die erste Stelle nach dem Komma ist jedenfalls unsicher.

Bei einem Laugenverbrauch zwischen 8 ccm und 20 ccm 0,1 n-KOH sind also die in der Einwage des Untersuchungsmaterialies enthaltenen Lipaseeinheiten nach der Formel  $x = \frac{1,21 \cdot c - 5,3}{18,7}$

zu berechnen und gilt für die Bedingungen der obigen Methode für neutrales Olivenöl im allgemeinen. Weil der Fehler, der den Konstanten anhaftet, sich größtenteils kompensiert, kann die Lipaseeinheit, wie es Willstätter getan hat, mit zwei Dezimalen angegeben werden.

Über Lipasebestimmungen haben wir selbst keine Versuche angestellt, weil die Willstätter'sche Methode die unzweifelhaft größte Bedeutung erlangt hat und sich Änderungen nicht aufdrängen.

Eine Pufferlösung, welche leicht ex tempore hergestellt werden kann, wäre zu wünschen. Eine solche könnte etwa folgendermaßen bereitet werden:

In einem Meßkolben von 200 ccm Inhalt titriert man 134 ccm n-HCl mit einer etwa 5,5—6%igen  $\text{NH}_3$ -Lösung und Phenolphthalein \*) als Indikator. Nach erreichtem Umschlag gibt man noch a mal \*\*) soviel der gleichen  $\text{NH}_3$ -Lösung dazu. Hierauf wird auf 200 ccm mit Wasser ergänzt.

III. Amylasebestimmung: Die Amylasebestimmungen nehmen in den bisherigen Pharmakopoe-Artikeln über Pankreatin einen breiten Raum ein. Die bedeutend übersichtlichere Reaktionsweise der Amylase und eine Anzahl verhältnismäßig gut ausgebauter, chemischer Methoden geben uns ein unentbehrliches Kriterium in die Hand, welches nicht, wie bei der Lipase, durch leichte Zerstör-

\*) Sollte die Anwesenheit des Phenolphthaleins bzw. dessen rote Farbe unerwünscht sein, so kann man in einem entsprechenden Vorversuch mit geringeren Quantitäten die Ammoniakmenge ermitteln; der Faktor (a) bleibt gleich.

\*\*) a = Faktor; richtet sich etwas nach der zugesetzten Indikatormenge; ist aber im wesentlichen vom ph abhängig, den man zu erreichen wünscht. Für den vorliegenden Fall (ph = 8,9 bei 30°) beträgt er 0,4—0,42 (berechnet).

barkeit und beim Trypsin, durch die für uns sehr ungünstigen Aktivierungsverhältnisse beeinträchtigt wird.

Die präparative Konzentrierung und Reinigung der Amylase geht auch wieder am besten vom Drüsenpulver aus (R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und Hesse<sup>34</sup>). Die Handels-Pankreatine stellen sich in Bezug auf den Amylasegehalt besser als auf den Lipasegehalt, sind aber (auch wieder bedeutend schwächer als die Willstätter'schen Trockenpräparate<sup>35</sup>).

Die Amylase baut Stärke über das sog. Dextrin zu Maltose ab. In Wirklichkeit ist dieser Abbau weit verwickelter, denn wir haben in der Stärke zwei Komponenten, die Amylose und das Amylopektin, welche gleichzeitig ihrem Einfluß unterliegen.

Unterwirft man einen Stärkekleister der enzymatischen Spaltung, so beobachtet man eine Verflüssigung desselben. Es entsteht eine klare Lösung, die mit Fehling gekocht, reichlich Kupferoxydul ausscheidet und mit Jod in den ersten Stadien der Einwirkung blau, später violett und weinrot wird und schließlich gar nicht mehr reagiert. Diese Erscheinungen bilden die Grundlage für die noch zu besprechenden Bestimmungsmethoden der Amylase (physikalisch bezw. physikalisch-chemisch: die Änderung des Dispersitätsgrades und somit der Viskosität und der Jodreaktion; chemisch: die frei gewordenen reduzierenden Gruppen).

Obwohl sich die Amylase in einer Reihe von Eigenschaften, wie Unempfindlichkeit gegen oberflächenaktive Stoffe etc. von der Lipase unterscheidet, begegnen wir auch bei ihr einer großen Beeinflussbarkeit durch das Milieu, besonders durch anorganische Salze.

Für uns die wichtigste Frage ist aber diejenige nach dem Substrat. Solange man in der Enzymchemie Puffer nicht bewußt anwandte und auch die Aktivierung gar nicht oder nur unzulänglich bekannt war, schob man die vielen Mißerfolge und Widersprüche auf das Substrat hinaus. Es entstanden eine Reihe von Arbeiten, welche sich ausschließlich mit der Reinigung der Stärke für enzymatische Untersuchungen befaßten. Nur so können die Resultate von R. Fabre und H. Péneau<sup>36</sup> gedeutet werden. Diese Forscher erhielten mit filtriertem Seine-Wasser höhere und gleichmäßigere Resultate als mit destilliertem Wasser.

Weil Stärkekleister schlecht oder nicht filtrierbar ist, auch beim Pipettieren Fehler bedingt, hat man sich in der Hauptsache der löslichen Stärke bedient. Wir wissen aber nach Veröffentlichungen von Euler und Josephson<sup>37</sup> und von Lüers und Wasmund<sup>38</sup>, daß die, nach verschiedenen Methoden hergestellten lös-

<sup>34</sup>) H. 126, 143 (1923) und zwar S. 159.

<sup>35</sup>) Rojahn u. Müller: Ap. 45, 1071 (1930).

<sup>36</sup>) J. phrm. 28, 289 (1923).

<sup>37</sup>) Ber. chem. Ges. 56, 1749 (1923).

<sup>38</sup>) Fermentforschung, 5, 169 (1921/22).

lichen Stärken mit ungleicher Geschwindigkeit gespalten werden; aber durchwegs rascher als Kleister (l. c. <sup>38</sup>). Die Herstellung solcher löslicher Stärken hat zahlreiche Änderungen und Verbesserungen erfahren, aber keiner der vielen Vorschläge könnte für uns in Betracht kommen; sie sind zu umständlich <sup>39)</sup> <sup>40)</sup>. Das im Handel erhältliche Präparat wird laut Pringsheim (l. c. <sup>39</sup>) meist nach Lintner <sup>41)</sup> hergestellt. Trotzdem man deren Reduktionsvermögen in einem Blindversuch messen kann, bleibt eine gewisse Unsicherheit bestehen. Nachteilig wäre dieses Verhalten insbesondere für eine Schwellenwert-Methode.

U. S. A. X und Gall. wählten für die Bereitung des Kleisters Kartoffelstärke; sie lassen diese mit Wasser waschen bei 50° bezw. 38° trocknen und in einer Probe den Feuchtigkeitsgehalt bestimmen, durch allmähliches Steigern der Temperatur auf 120° und vierstündiges Trocknen bei dieser Temperatur.

Mit der Reinigung der käuflichen Stärke haben sich mehrere Autoren befaßt und durchwegs gefunden, daß es ziemlich schwierig ist, anhaftende saure oder alkalische Bestandteile abzutrennen und zu wirklich neutraler Stärke zu gelangen. Kendall und Sherman <sup>42)</sup> reinigten sie durch 65 maliges Aufschlemmen in Wasser und Dekantieren während drei Wochen. S. John Ford <sup>43)</sup> konnte Stärken verschiedener Herkunft mit Alkali, Säuren und Wasser soweit reinigen, daß das Reduktionsvermögen und die Reaktion ihrer Lösungen praktisch gleich waren. Durch das kurze Waschen nach den Vorschriften der U. S. A. X oder der Gall. ist dies unmöglich.

Der glückliche Umstand, daß eine Stärkesorte gewöhnlich eine gleichgerichtete Reaktion zeigt (Kartoffelstärke sauer, Reisstärke alkalisch <sup>44)</sup>), kann zum größten Teil für befriedigende Resultate verantwortlich gemacht werden. Wir haben uns für die Marantastärke entschlossen, die als reinste Handelsstärke gilt, l. c. <sup>44)</sup> und können, wie dies die Versuche zeigen, von einem Nachwaschen absehen.

Weil die Abhängigkeit der Amylasewirkung von der *h* viel ausgeprägter ist, als bei vielen anderen Enzymen, kann man auch aus diesem Grunde nicht mehr gut ohne Puffer auskommen (Reaktion des destillierten Wassers, Alkalinität des Glases etc.).

Als höchste, das Enzym noch schonende Temperatur wählten wir 40°. Natriumchlorid übt auf die Pankreasamylase eine deutliche Schutzwirkung aus <sup>45)</sup>, ohne welche diese bei 40° schon merk-

<sup>39)</sup> Zusammenstellung siehe Pringsheim in Oppenheimers Hdb. d. Biochemie, Bd. 1, S. 970.

<sup>40)</sup> W. Ziese in Oppenheimers Methodik der Fermente, S. 274.

<sup>41)</sup> J. f. prakt. Chemie, 34, 378 (1886).

<sup>42)</sup> J. of the American Chem. Soc. 32, 1087 (1910).

<sup>43)</sup> J. of Soc. of Chem. Ind. 23, 414 (1904).

<sup>44)</sup> Tschirch: Hdb. d. Pharmakognosie, Bd. 2, 1. Teil, S. 152.

<sup>45)</sup> Kendall u. Schlesinger: J. of the Americ. Chem. Soc. 37, 1305 (1915).

lich zerstört wird; das gleiche gilt für die Anwesenheit von Stärke. Kendall und Sherman<sup>46)</sup> arbeiteten bei 40°, Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse bei 37°<sup>47)</sup>.

Als optimaler pH finden Kendall und Mitarbeiter<sup>48)</sup> und Willstätter (l. c.<sup>47)</sup>, übereinstimmend 6,8 bei Zimmertemperatur gemessen (Kendall<sup>49)</sup> etwa 24°) unter Aktivierung mit Natriumchlorid. Andere Elektrolyte bedingen andere Optima, sodaß man auch hier, wenn auch bei weitem nicht so stark betont, ähnliche Verhältnisse wie bei der Lipase anzutreffen scheint (vgl. Seite 77).

Die Aktivierung erfolgt am stärksten durch Chloridionen. Brom- und Jod-Ionen und viele andere sind ebenfalls wirksam, aber schwächer. Der Natriumchloridzusatz verbreitert etwas das pH-Optimum<sup>48)</sup>; C. Böhne<sup>50)</sup>. Die Aktivierbarkeit, das pH-Optimum und ein bestimmtes, von R. Kuhn weitgehend erforschtes stereochemisches Verhalten unterscheidet die Pankreas- und ebenso die Speichel-Amylase von der Malzamyrase scharf.

Sowohl für den Abbau von Amylopektin als für Amylose fand R. Kuhn<sup>51)</sup> die gleichen pH-Kurven (Verzuckerung gemessen). Trotzdem hat man es mit zwei ganz verschiedenen Stärkekomponenten zu tun. Die Amylose wird etwa 1½ mal so schnell wie Amylopektin in Maltose übergeführt<sup>52)</sup> <sup>53)</sup>, während der Amylopektinabbau bei dem sog. Grenzdextrin, einem Trisaccharid, halt macht. Diese Erscheinung war schon lange bei der Stärkespaltung bekannt. Nachdem diese ungefähr 78% (die Angaben schwanken etwas) erreicht hat, kommt die Reaktion rasch zum Stillstand. Durch Zugabe eines Komplementes<sup>54)</sup>, das in der Hefe vorkommt, setzt die sog. Nachverzuckerung ein, die, wenn auch sehr viel langsamer<sup>55)</sup> das Trihexosan ebenfalls quantitativ in Maltose überführt.

Die Stärkelösung als solche ist kein einheitliches kolloides System<sup>56)</sup>, wie wir aus den oben geschilderten Verhältnissen entnehmen können. Die Abhängigkeit der physikalischen Eigenschaften von den chemischen Änderungen im Laufe der Verdauung ist keine einfache und die verschiedenen Methoden sind in ihren gegenseitigen Beziehungen nicht konstant<sup>57)</sup> <sup>58)</sup>.

<sup>46)</sup> J. of the Americ. Chem. Soc. 32, 1087 (1910).

<sup>47)</sup> H. 126, 143 (1923) u. zwar S. 155.

<sup>48)</sup> J. of the Americ. Chem. Soc. 41, 231 (1918).

<sup>49)</sup> idem.

<sup>50)</sup> Fermentforschung, 6, 200 (1922).

<sup>51)</sup> Ber. d. chem. Gesellschaft, 57, 1965 (1924).

<sup>52)</sup> H. C. Sherman u. J. C. Baker: J. of the Americ. Chem. Soc. 38, 1885 (1916).

<sup>53)</sup> Vgl. Knut Sjöberg: Fermentforschung, 9, 329 (1928).

<sup>54)</sup> Pringsheim Ber. chem. Ges. 56, 1762; Bio. Z. 142, 107 (1923).

<sup>55)</sup> Euler: H. 112, 191 u. zwar S. 207.

<sup>56)</sup> Samed: Pflanzenkolloide, Kolloid-chem. Beihefte III—VIII (1915—1920).

<sup>57)</sup> Lang: Z. f. exp. Path. 8, 279 (1910).

<sup>58)</sup> Grimbert: J. phrm. 13, 5 (1916).

Viele Tatsachen sprechen dafür, daß die stärkeverflüssigende Wirkung und die Freilegung von reduzierenden Gruppen von zwei verschiedenen Enzymen bewerkstelligt wird. So läßt sich die eine Komponente gegenüber der anderen durch starkes Verdünnen, Erwärmen auf 70—80°<sup>59)</sup> oder Säuren herabdücken. (Es könnte sich aber auch um Änderungen der Affinität des Enzyms zum Substrat in Bezug auf dasselbe Enzym handeln). Andererseits verschob sich bei den Reinigungsoperationen nach Sherman und Schlesinger<sup>60)</sup> und Willstätter<sup>61)</sup> das Verhältnis beider Wirkungen nicht. Die Frage ist noch nicht endgültig entschieden. Wenn auch die chemischen Methoden den Vorgang von einer klareren, wahrscheinlich der primären Seite erfassen, so haben wir in den anderen Bestimmungsarten oft ein sehr bequemes Mittel, annähernd den Amylasegehalt zu messen.

U. Olssen<sup>62)</sup> bestimmt die Aufsteigezeit von Glaskugeln in, mit Kleister gefüllten Röhren.

Lintner-Sollied<sup>63)</sup> (Verbesserungsvorschläge durch Farbstoffzusätze etc.<sup>64)</sup> stellt in Reagensgläsern Kleister her und beobachtet, in welchen Röhren nach einer gewissen Zeit nach dem Abkühlen eine Klärung und Verflüssigung eingetreten ist.

Eine große Zahl von Wertbestimmungen stützt sich auf die Jodreaktion. Es lassen sich zwei Typen unterscheiden: Der eine betrachtet als Endpunkt das Verschwinden der blauen Jodstärke-reaktion<sup>65)</sup>, der andere bestimmt den sog. achromischen Punkt, d. h. ermittelt dasjenige Reagensglas, welches mit Jod überhaupt keine Färbung mehr gibt<sup>66)</sup> (siehe U. S. A. X).

Nach Sherman, Kendall und Clark<sup>67)</sup> gestaltet sich die Bestimmung des Endpunktes speziell beim Pankreatin sehr schlecht, da die Rotfärbung für längere Zeit andauert und unmerklich langsam verschwindet. Dies gilt insbesondere für die Johnson'sche<sup>68)</sup> Modifikation, welche die Zeit mißt (vergl. auch Samoc<sup>69)</sup>). Es liegt in der Natur des allmählichen Überganges von einer Färbung in die andere, daß der Endpunkt nicht leicht festzulegen ist und die Übung eine große Rolle spielt. Den subjektiven Anteil suchte man

<sup>59)</sup> Pottevin Ann. Inst. Pasteur, 13, 665 (1899); Thèse de Paris, von vielen anderen Autoren bestätigt.

<sup>60)</sup> J. of the Americ. Chem. Soc. 33, 1195 (1911); 34, 1104 (1912).

<sup>61)</sup> Zit. nach Oppenheimer, Ferm. u. ihre Wirkungen, Bd. I, S. 677.

<sup>62)</sup> H. 119, 1 (1922).

<sup>63)</sup> Z. f. ges. Brauwesen, 26, 329 (1903).

<sup>64)</sup> Vgl. Lüers: Phytoamylasen in Oppenheimers Ferm. u. ihre Wirkung, Bd. 3, S. 877.

<sup>65)</sup> Wohlgemuth: Bio. Z. 9, 1 (1908); E. Starkenstein: Bio. Z. 24, 191 (1910); Michaelis u. Pechstein: Bio. Z. 59, 77 (1914).

<sup>66)</sup> Evans: J. of Physiol. 44, 191 (1912) u. zwar S. 220.

<sup>67)</sup> J. of the Americ. Chem. Soc. 32, 1073 (1910).

<sup>68)</sup> J. of the Americ. Chem. Soc. 30, 798 (1908).

<sup>69)</sup> Kolloidchem. Beihefte, 10, 289 (1919).

z. B. einzuschränken durch Vergleich mit einem Standard-Pankreaspräparat (Takamine<sup>70)</sup>).

Wir wandten uns im vornherein den Zuckerbestimmungsmethoden zu, von diesen objektivere Resultate erwartend.

**Experimentelles:** Um die Eignung einer Stärkesorte zu beurteilen, war es unbedingt notwendig, sich einer Methode zu bedienen, welche kontinuierlich mißt (also nicht auf Reihen-Versuchen beruht) und welche zuverlässig ausgebaut ist. Als am geeignetsten erschien uns die jodometrische Methode von Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse<sup>71</sup>).

Methode<sup>72</sup>): Die Hydrolyse von 0,25 g löslicher Stärke durch Pankreasamylase in 37 ccm bei 37° wird im Bereich der ersten 40% verfolgt. Die gebildeten Aldehydgruppen werden mit der Hypojodit-Titration gemessen. Die Amylaseeinheit (Am.-E.) berechnet sich aus der Gleichung

$$K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x},$$

in der  $t$  die Zeit,  $a$  die Anfangskonzentration und  $a-x$  die dem Jodverbrauch entsprechende Menge Maltose ist. Für  $a$  wird nicht der Wert der effektiven Einwage (0,25 g), sondern die praktische Verzuckerungsgrenze von 75% unter normalen Bedingungen, also  $a=0,1875$  g genommen. Für die Bestimmung der Amylase werden am besten die Enzymmengen so gewählt, daß die Reaktionskonstante zwischen 0,001 und 0,03 liegt; dann erfolgt in 7–30 Minuten die Hydrolyse von 10–30% der Stärke.

**Ausführung:** In einer zylindrischen Standflasche mit eingeschliffenem Stopfen von 50 ccm Inhalt werden 25 ccm frisch bereitete 1 proz. Lösung von Kahlbaumscher löslicher Stärke, 10 ccm 0,2-n-Phosphatpuffer, bestehend aus 5,1 ccm 0,2-n-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 4,9 ccm 0,2-n-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2H<sub>2</sub>O (ph = 6,8), sowie 1 ccm 0,2-n-NaCl vermischt und im Thermostaten auf 37° gebracht. Das Enzym fügt man unter Umschütteln hinzu, in Form des trockenen Präparates aus dem Wäageglas oder einer Enzymlösung, z. B. 1,00 ccm aus der Meßpipette. Nach Ablauf von gewöhnlich 10 Minuten wird die Reaktion durch Zusatz von 2 ccm n-Salzsäure unterbrochen. Man spült das Reaktionsgemisch mit wenig Wasser in einen Erlenmeyerkolben und versetzt es mit Jod, und zwar für je 1 mg erwarteter Maltose mit 0,6 ccm 0,1-n-Lösung, sodann tropfenweise unter Umschütteln mit 0,1-n-Natronlauge deren Menge so zu bemessen ist, daß nach Neutralisation der zugefügten Salzsäure und Umwandlung des sauren Puffer-Phosphats in sekundäres (wozu zusammen 30 ccm erforderlich sind) noch das 1½ fache vom Volumen der Jodlösung angewandt wird. Nach 15 Minuten langem Stehen wird mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und das überschüssige Jod mit 0,1-n-Thiosulfatlösung zurücktitriert. Nach Abzug des Leerverbrauchs wird die gefundene Jodmenge nach dem Verhältnis 17,15 mg C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> : 1 ccm 0,1-n-Jod als Maltose berechnet.

Vier beliebige dem Handel entnommene Stärkeproben (I und II aus Apotheken, III und IV von Grossisten) und eine solche (No. V) aus der hiesigen pharmakognostischen Sammlung, wurden nach dem Artikel: Amylum Marantae der Ph. H. V auf Identität, Reinheit, Reaktion und Aschegehalt untersucht. Sie entsprachen den Anforderungen.

<sup>70</sup>) J. of the Soc. Chem. Ind. 17, 118, 437 (1898).

<sup>71</sup>) H. 126, 143 (1923).

<sup>72</sup>) Nach Rona: Prakt. d. physiol. Chem., Bd. 1, S. 174.

Aschegehalt:	I	a. 0,13%	b. 0,14%
	II	0,11	0,14
	III	0,09	0,11
	IV	0,11	0,13
	V	0,09	—

a) Ohne Verwendung von Seesand und Asbestkarton.

b) Mit Verwendung von Seesand und Asbestkarton.

(Siehe Ph. H. V.: Allgemeine Bestimmungen, S. 28.)

Feuchtigkeitsgehalt: 2 gr (genau gewogen) wurden in 5 cm weiten Wäggläsern in einen ca. 60° warmen Trockenschrank gestellt, die Temperatur innerhalb einer halben Stunde auf 115° gesteigert, 4 Stunden bei 118—120° gelassen und im Schwefelsäure-Exsiccator abgekühlt.

I	13,98%	noch weitere 1½ Stunden	14,17
II	14,66	bei ca. 120°	14,89
III	16,06		16,26
IV	15,88		16,01
V	12,57		12,76

Stärkelösung: 2,5 g Marantastärke (auf 2 Dezimalen genau gewogen) wurden in einem Meßkolben von 250 ccm Inhalt mit etwa 10—20 ccm Wasser aufgeschwemmt und unter lebhaftem Schwenken ca. 150 ccm kochendes Wasser zugegeben. Es tritt meistens sofort Verkleisterung ein. Hierauf ließen wir noch 5 Minuten lang unter fortwährendem Umschwenken kochen (auf dem Asbestdrahtnetz) und ergänzten mit Wasser nach dem Abkühlen auf 250 ccm.

Im allgemeinen ist es zur Vermeidung von Knollen und des Festbackens auf dem Kolbenboden vorteilhafter, die Stärkesuspension in kochendes Wasser einzutragen. Bedingung für das Gelingen nach obiger Vorschrift ist gründliches Aufschlemmen der Stärke unmittelbar vor und während der Zugabe des heißen Wassers.

Fermentlösung: 0,1 g (auf drei Dezimalen genau gewogen) Pancreatinum absolutum Merck U. S. A. X in 100 ccm Wasser gelöst. Die Lösung war opalescent mit deutlich sichtbaren suspendierten Teilchen.

Vorversuche ergaben, daß für 0,8 ccm der Fermentlösung die Reaktionskonstante etwa 0,01 beträgt.

Beispiel: Blindversuch: 1. (siehe Vorschrift) 5 ccm 0,1-n-Jod; 37,5 ccm 0,1-n-NaOH; verbraucht: 0,145 ccm 0,1-n-Jod.

2. 3 ccm 0,1-n-Jod; 34,5 ccm 0,1-n-NaOH; verbraucht: 0,135 ccm 0,1-n-Jod.

Für die Bestimmung des Blindwertes ist die Verwendung des Stärkekleisters (anstatt lösliche Stärke) sehr ungünstig, denn die suspendierten blaugefärbten Teilchen beeinträchtigen die Schärfe des Umschlages.

Hauptversuch: Erwartet werden 50 mg Maltose; dementsprechend Ansatz mit 30 ccm 0,1-n-Jod und 75 ccm 0,1-n-NaOH;

verbraucht:  $\frac{2,59}{0,14}$  0,1-n-Jod ccm für Blindversuch  
es bleiben  $\frac{2,45}{0,1875}$  ccm 0,1-n-Jod entspr. 42,0 mg Maltose

$$K = \frac{1}{10} \log \frac{0,1875}{0,1875 - 0,042} = 0,011$$

Die mit den fünf Stärkesorten ausgeführten Blindversuche ergaben einen 0,1-n-Jod-Verbrauch von:

I	0,12
II	0,12
III	0,16
IV	0,11
V	0,13; 0,12

(3,0 ccm 0,1 n Jod; 34,5 0,1 n NaOH; 0,8 ccm Enzymlösung 0,1:100).

Der gleiche Verdauungsversuch viermal wiederholt (gleiche Stärkelösung, gleiche Enzymlösung etc.) ergab:

a. 2,31      b. 2,32      c. 2,50 (?)      d. 2,29

Folgende Versuche wurden mit den verschiedenen Stärkeproben (römische Ziffern) angestellt:

1. I	a. 2,15	b. 2,09	3. I	a. 1,97	b. —
2. II	a. 2,12	b. —	4. III	a. 1,93	b. 1,93
		5. I	2,09	10. I	2,18
		6. II	2,13	11. II	2,41 (?)
		7. III	2,15	12. III	2,29
		8. IV	2,22	13. IV	2,23
		9. V	2,22	14. V	2,28

Die Versuche 5—14 wurden in der Reihenfolge der Nummerierung innerhalb 7 Stunden ausgeführt. Wir benützten für diese Serie eine filtrierte Enzymlösung. Wenn man von No. 11 absieht, erkennt man deutlich ein Anwachsen der Werte, dessen Grund uns nicht sicher bekannt ist. Weil es hier nicht auf die absoluten, sondern auf die relativen Werte ankommt, kann man nach sorgfältigem Vergleich dieser Zahlen die Frage bezüglich der Brauchbarkeit der Maranta-Stärke im positiven Sinne beantworten. Schließlich ist noch hervorzuheben, daß der große Unterschied im Feuchtigkeitsgehalt von Stärke III und V (16,26 bzw. 12,76% keinen über die Versuchsfehler hinausreichenden, eindeutigen Einfluß ausübte. Auch der Eigenverbrauch (+ Enzym) an Jod ist sehr gleichmäßig und niedrig (vgl. Willstätter<sup>73)</sup>). Bei so großen angewandten Flüssigkeitsmengen und so geringem Umsatz kann das Nachfließen der Titrierlösungen in den von uns verwendeten 25 ccm fassenden Halbmikrobüretten eine der größten Fehlerquellen dargestellt haben. Selbstverständlich wurden für die einzelnen Operationen immer die gleichen Meßgeräte benützt.

Weiter versuchten wir nach dem Prinzip Lintner's<sup>74)</sup>: „In einer Stärkelösung soll nach einer bestimmten Zeit soviel Maltose entstehen, daß ein gewisses Quantum einer Fehling'schen-Lösung reduziert wird“, eine geeignete Schwellenwert-Methode zu finden und zugleich einige notwendige Änderungen vorzunehmen.

Viele Autoren, z. B. Pollak<sup>75)</sup>, titrierten die reduzierenden

<sup>73)</sup> R. Willstätter, Waldschmidt-Leitz u. Hesse: H. 126, 143 (1923).

<sup>74)</sup> Lintner u. Wirth, Z. d. ges. Brauw. 31, 421 (1908); Lintner: J. f. prakt. Chem. 34, 383 (1886); Grimbert: J. phrm. 7, 105 (1913); 13, 5 (1916); Ebenfalls von d. Gall. übernommen.

<sup>75)</sup> Z. N. G. 6, 729 (1903); Wo. f. Brauerei, 20, (1903).

Zucker direkt mit Fehling (Endpunkt mittels Kfeoc). Weitaus die häufigste Art der Bestimmung mit Fehling erfolgte mit einem Überschuß des Reagens. Das ausgeschiedene Kupfer-Oxydul wurde auf einem Asbestfilterchen (Allihn'sches Röhrchen) gesammelt und entweder zu Kupfer im Wasserstoffstrom reduziert oder direkt gewogen<sup>76)</sup>. Neben der Hypojodit-Methode Willstätter's erlangte die Zuckerbestimmung nach G. Bertrand und Thomas<sup>77)</sup> die größte Bedeutung. Das aus einem Überschuß an Fehling ausgefällte Kupfer-Oxydul wird in schwefelsaurer Ferrisulfat-Lösung gelöst und das entstandene Ferrosulfat mit Permanganat titriert. Aus einer empirisch aufgestellten Tabelle läßt sich der Maltosegehalt ablesen.

Es ist nun von großer Wichtigkeit, den Stärkeabbau durch Amylase früh genug zu unterbrechen (vgl. Grimbert<sup>78)</sup>). Um uns über die Umsatzgröße unter den neuen Bedingungen (gegenüber der Hypojoditmethode siehe oben) zu orientieren, maßen wir die höchst erreichbare Maltosequantität und diejenige, welche von einer bestimmten Enzymmenge produziert wurde und übertrugen dann genau die gleichen Verhältnisse auf den beabsichtigten Reihenversuch.

Zwischen 2 und 4% Stärkegehalt ist die Verdauungsgröße gegenüber verdünnteren Lösungen viel weniger von der Substratkonzentration abhängig; ebenso scheiden Wägfehler und Differenzen im Feuchtigkeitsgehalt praktisch aus. Bei Verwendung löslicher Stärke ist das Abmessen von so konzentrierten Lösungen mit der Pipette sehr wohl möglich, nicht aber bei den von uns verwendeten Kleistern. Sherman, Kendall und Clark<sup>79)</sup> kochten ihren Stärkekleister während zwei Stunden am Rückflußkühler, wodurch er weniger viskos, homogener, durchsichtig und fermentativ leichter angreifbar wird. Wir benutzten im folgenden eine 1 prozentige Lösung, die sich nach eigenen Versuchen praktisch ohne Fehler mit Pipetten abmessen läßt.

Folgende Tabelle veranschaulicht die Konzentrationsverhältnisse in Bezug auf Stärke, Puffer und Natriumchlorid in den Versuchen einiger Autoren, die wir nach ihren Daten auf die Gesamtflüssigkeitsmenge ihrer Versuchsansätze (Verdauungsgemische) umrechneten:

<sup>76)</sup> Kjeldahl: Dingers Polytech. J. 235, 379, 452 (1880); Chittenden: Am. Chem. J. 3, 307 (1881—82); Brown u. Glendinning: J. Chem. Soc. 81, 388 (1902); Ford: J. Chem. Ind. 23, 414 (1904); Weitere Lit über Zuckerbest.: v. Fellenberg, Mitteil. aus d. Geb. d. Lebensm. unters. u. Hyg. 11, 129 (1920); Arbenz: Mitteil. aus d. Geb. Lebensm. unters. u. Hyg. 11, 33 (1920); Kolthoff, Maßanalyse II, 411 (1928); Schoorl: Z. f. Unters. d. Lebensmittel, 57, 566 (1929); Braun u. Bleyer: Z. f. analyt. Chem. 76, 1 (1929).

<sup>77)</sup> Guide pour les manipulations de chim. biol. Dunod et Pinat, Paris (1910).

<sup>78)</sup> J. pharm. 13, 5 (1916).

<sup>79)</sup> J. of the Americ. Chem. Soc. 32, 1073 (1910).

Autoren	Gesamtvol. d. Verdauungsflüssigkeit	Puffer-Konz.	NaCl-Konz.	Stärke-Konz.	Bemerkungen
Michaelis <sup>80)</sup>	60 ccm	mol/36	n/23,4	0,42%	für Speichelamylase bei Zimmertemp.
Rona und van Eweyk <sup>81)</sup>	100 ccm	mol/300	n/1000	0,4 %	für Speichelamylase bei 37° mit Glykogen
Willstätter u. Mitarbeiter <sup>82)</sup>	37 ccm	mol/55,5	n/185	0,68%	Pankreasamylase Optimal-NaCl-Konz. n/370 bis n/185 bei 37°
Euler u. Svanberg <sup>83)</sup>	36 ccm	mol/12,4	—	meist 1,39%	Malzamylyase
Sherman und Mitarbeiter <sup>84)</sup>	—	mol/1000	n/20	—	Pankreasamylase bei 49°
Myrbäck <sup>85)</sup>	50 ccm	mol/150(?)	n/50	1,4 %	Pankreasamylase bei 37°

Zur Herstellung der Pufferlösung fanden wir es für Pharmakopoe-Zwecke gut, das sehr rein erhältliche wasserfreie, sekundäre Natriumphosphat zu verwenden, an Stelle der Sörensen'schen Phosphatlösungen <sup>86)</sup>, und mit Salzsäure auf den  $ph = 6,8$  (bei Zimmertemperatur) zu bringen. Auf diese Weise läßt sich zugleich die zur Aktivierung optimale Natriumchloridkonzentration erreichen. Nach dem von Clark und Lubs <sup>87)</sup> angegebenen Mischungsverhältnis von 23,65 ccm 0,1 n-NaOH + 50 ccm 0,1 n-Bi-phosphat für  $ph 6,8$  (18°), berechnet sich für eine ca. 0,1 n-Natriumchlorid- und 0,2 mol-Phosphat-Konzentration: 5,6 gr  $Na_2HPO_4$  ( $H_2O$ -frei) + 20,73 n-HCl in 200 ccm Wasser. Von dieser Lösung werden 25 ccm bei der Stärkekleister-Bereitung auf 250 ccm verdünnt, so daß wir eine endgültige Konzentration von ca. 0,01 n Natriumchlorid und ca. 0,02 mol. Phosphat haben\*). Der nach obigem Mischungsverhältnis erhaltene Puffer war im Komparator von der gleichen Farbe wie der Sörensen'sche Phosphatpuffer

<sup>80)</sup> Michaelis: Prakt. d. physiol. Chem., S. 137 (1926); in Anlehnung an Ringer: H. 67, 332 (1910) u. Michaelis u. Pechstein: Bio. Z. 59, 77 (1914).

<sup>81)</sup> Rona u. van Eweyk: Bio. Z. 149, 174 (1924).

<sup>82)</sup> Willstätter u. Mitarbeiter: H. 126, 143 (1923).

<sup>83)</sup> Euler u. Svanberg: H. 112, 193 (1920/21).

<sup>84)</sup> Sherman u. Mitarbeiter: J. of the Americ. Chem. Soc. 41, 231 (1919).

<sup>85)</sup> Myrbäck, zit. nach Oppenheimer: Die Ferm. u. ihre Wirkungen, Bd. 3, S. 891.

<sup>86)</sup> Bio. Z. 21, 131 (1909); 22, 352 (1909).

<sup>87)</sup> Nach Kolthoff, Der Gebrauch von Farbenindikatoren, 118 (1923).

\*) Das verwendete Phosphat entsprach den Anforderungen der Ph. H. V, war also mindestens 99%; das ausgekochte destillierte Wasser zeigte bei 20% den  $ph$  von 7,1 (colorim).

(5,1 ccm 0,2n  $\text{KH}_2\text{PO}_4 + 4,9$  0,2n  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) und entsprach auf 0,02 mol. verdünnt, einem elektrometrisch gemessenen ph von 6,83 bei 19°; die definitive Stärkelösung bei 21° einem ph von 6,81.

Zusammenfassend seien die Einzelheiten der Herstellung der Stärke-Puffermischung wiedergegeben:

Etwa 6 gr Natrium phosphoricum Ph. H. V werden in einem tarierten weiten Wägegglas einige Stunden bei etwa 103–105° getrocknet und im Exsiccator erkalten gelassen; hierauf werden 5,6 gr mit Hilfe von Glanzpapier und Pinsel in ein 200 ccm-Kölbchen gebracht (nicht auf den Trichter), in ausgekochtem, noch warmem Wasser gelöst, mit 20,73 ccm n-Salzsäure versetzt und nach dem Erkalten auf 200 ccm mit ausgekochtem Wasser aufgefüllt.

2,5 gr knötchenfreie Marantastärke Ph. H. V schwemmt man in einem 250 ccm Kölbchen mit etwa 10–15 ccm Wasser gut auf und gibt soviel kochendes Wasser dazu, bis gerade Verkleisterung eintritt. Nun hält man durch sorgsames Umschwenken die Flüssigkeit während 5 Minuten im Sieden, kühlt ab, versetzt mit 25 ccm der Pufferlösung und ergänzt auf 250 ccm mit Wasser.

Zur Berechnung der Umsatzgröße bei den neuen Bedingungen (Konzentration der Stärke, Temperatur u. s. w.) stehen zwei Möglichkeiten offen. Entweder ermittelt man experimentell die aus der Stärkemenge abspaltbare Maltose oder man bestimmt an Hand einer Kurve durch Extrapolation (Umsatz als Funktion der Zeit) den Wert.

Die Fehling'sche Lösung der Ph. H. V entspricht in ihrer Zusammensetzung derjenigen des Schweiz. Lebensmittelbuches 1917, wo zugleich die Beziehungen zwischen Kupfer, Kupferoxydul, Maltose und anderer Zucker tabellarisch zusammengestellt sind. Die Versuchsbedingungen sind für Rohmaltose im Artikel „Bier“ des Lebensmittelbuches nach E. Wein, Seite 317, angegeben: 50 ccm Fehling'sche Mischung werden kalt mit 25 ccm der nicht mehr als 1% enthaltenden Maltoselösung gemischt, aufgeköcht und vier Minuten im Kochen gehalten. Nach Th. von Fellenberg<sup>88)</sup> und anderen Autoren kommt es sehr auf die relativen Konzentrationen und eine Reihe zum Teil geringfügig erscheinender Faktoren an. Durch absichtliche, teilweise Variation der Versuchsbedingungen erhielten wir ziemliche Schwankungen der Maltosewerte, deren Mittelwert aber für unsere Zwecke vollständig ausreicht. Wir benutzten feinporige (1 G 4) Jenaer-Glasfilter anstelle der Allihn'schen Röhrchen. Die Maltosewerte wurden immer der aus 50 ccm Fehling erzeugten Kupferoxydulmenge entsprechend abgelesen und erst dann auf die ganze Verdauungsflüssigkeit umgerechnet.

Die vollständige Verdauung der nach obigen Ausführungen hergestellten Stärkelösung ergab: 50 ccm-Stärke-(No. V)-Lösung + Enzymlösung

- |    |                  |                 |            |           |
|----|------------------|-----------------|------------|-----------|
| a. | 10 ccm 0,1 : 100 | ca. 15 stündige | Einwirkung |           |
| b. | 2 ccm 0,1 : 50   | ca. 22          | „          | „         |
| c. | 1 ccm 0,1 : 50   | ca. 22          | „          | „ bei 40° |

<sup>88)</sup> Mitteil. des Schweiz. Gesundheitsamtes IV, 239 (1913).

in 100 ccm-Meßkolben; nach der Verdauung aq. ad 100 ccm.

a. (338,0; 347,5; 343,2)	Mittel	343 mg	Maltose
b. (333,6; 332,4; 338,4)	„	335 mg	„
c. (330,4; 349,6; —)	„	340 mg	„
		<u>339 mg</u>	

0,5 gr lufttrockene Stärke (V) entspricht 0,436 gr Trockensubstanz (12,76% Feuchtigkeit). 339 mg Maltose machen demnach 77,7% aus oder die Maltose mit 0,9473 multipliziert in Stärke umgerechnet<sup>89)</sup> = 73,65%.

Verdauungsversuche: 50 ccm Stärke-(No. V)-Lösung + Enzymlösung a) und b) 2 ccm 0,1 : 500; c) 1,5 ccm 0,1 : 500; 1 Stunde bei 40°, unterbrochen mit 3 ccm Natriumkarbonat ca. 2 n, wodurch ph auf 9,3 kommt + aq. ad 100 ccm.

a. Maltosemengen:	122,0; 109,0; 113,0;	Mittel = 115 mg	33,04%
b. „	112,0; 110,0; 106,0;	„ = 109 mg	
c. „	81,0; 87,0; — ;	„ = 84 mg	24,78%

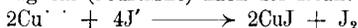
der möglichen Maltosemengen.

Für das Zeitintervall von 7—60 Minuten und eine Spaltung von 10—30% gilt in bezug auf Enzymmenge nach Willstätter<sup>90)</sup> genaue Proportionalität. Wir dürfen, die noch nicht wesentlich veränderten Bedingungen mit hineinbezogen, mit ihr rechnen, was im obigen Beispiel genau zutrifft. Nun galt es im Reihenversuch festzustellen, wieviel Fehling'sche Lösung diesem Spaltungsgrad entsprach.

Durch Vorversuche ergab sich, daß 3 ccm der Fehling'schen Mischung vollständig und 3,5 ccm aber nicht vollständig reduziert wurden und zwar nach folgendem Ansatz:

In 6 Jenaer-Reagensgläser mit eingeschliffenen Glasstopfen kamen je 10 ccm der Stärkelösung. Nach dem Ausgleich der Temperatur im Wasserbad von 40° wurde zu jedem Reagensglas mit 1 Minute Intervall 0,4 ccm einer Enzymlösung 0,1 : 500 (Pankreatin in kleinem Mörser angerieben und quantitativ in den Meßkolben gespült) aus einer in Hundertstel-Kubikzentimeter geteilten, oben mit einem Wattebäuschchen verschlossenen Pipette zugegeben. Nach Verlauf einer Stunde unterbrachen wir in der gleichen Reihenfolge die Verdauung mit je 1 ccm Natriumkarbonat ca. 2 n. Sodann wurde jedes mit einer Messerspitze analysenreinem Kaliumjodid versetzt und aus einer Mikrobürette ein bestimmtes Quantum einer frisch bereiteten Fehling'schen Mischung (50 ccm Fehling I in ein 100 ccm Meßkölbchen einpipettiert und mit Fehling II aufgefüllt) zufließen gelassen, gut durchmischt, den Stopfen entfernt und gewaschen und die Röhrchen während 10 Minuten in ein hohes, zylindrisches Gefäß (Emailmensur) mit kochendem Wasser gestellt. Danach kühlte man sie mit aufgesetzten Glasstopfen in fließendem Wasser ab und mischte deren Inhalt je mit 6 ccm Schwefelsäure ca. 2 n, welche man in einem anderen Reagensglas bereit hielt, durch vorsichtiges Hin- und Zurückgießen (etwa 4—6 mal), bis das Gemisch eine einheitliche Farbe angenommen hat.

War alles Cu<sup>++</sup> reduziert, so trat eine weiße bis schmutzig hellgelbe Trübung ein (Kaliumbitartrat und Cuprojodid), die der ganzen Flüssigkeit einen milchigen Anblick verleiht. War noch eine, wenn auch äußerlich nicht erkennbare Menge Cuprionen vorhanden, so trat bei der von uns innegehaltenen Spaltungsgröße eine intensive Blaufärbung ein (Jodstärke) nach der Reaktion:



Es ist nicht absolut notwendig, beim Ansäuern ein Rhodanid zuzugeben, wie man es bei der verbesserten Cupri-Titration nach de Haën<sup>91)</sup> tut, um infolge der

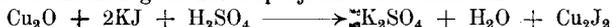
<sup>89)</sup> Nach Grimbert: J. pharm. 13, 5 (1916).

<sup>90)</sup> R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und Hesse: H. 126, 143 (1923).

<sup>91)</sup> Annalen der Chem. u. Pharm. 91, 237 (1854); A. H. Low: Technical Methods of Ore Analysis (1905), S. 77; zit. Treadwell: Lehrb., Bd. 2, S. 580, 9. Aufl.

geringeren Löslichkeit des Cupro-Rhodanids Kaliumjodid zu regenerieren, das sonst in viel höherer Konzentration zugegen sein müßte.

Ist ein größerer Teil des Kupfers nicht reduziert, so erkennt man es ohne weiteres an der Farbe des Gemisches und es ist gleichgültig, ob die Reaktion quantitativ verläuft oder nicht; Blaufärbung tritt beim Ansäuern jedenfalls ein. Je näher man dem Endpunkt kommt, d. h. je mehr die Konzentration der Cuprionen abnimmt, desto weniger Jodionen werden zur direkten Reduktion verbraucht. Im Moment, wo nur noch Kupferoxydul vorhanden ist, wird auf ein Cu-Atom ein KJ benötigt zur Überführung in das Cuprojodid beim Ansäuern:



Pro 3,5 ccm Fehling (in unserem Falle meist 3,25 ccm) entfallen 0,08 gr auf diese Reaktion. Kaliumjodid ist also bei einem Zusatz von durchschnittlich 0,5—1,0 gr in etwa 10 fachem Überschuß und vermindert die Löslichkeit des Cuprojodides, was von großer Wichtigkeit ist, da Cuproionen leicht durch den Luftsauerstoff oxydiert werden. Dieser Kaliumjodid-Überschuß ist allerdings gering, wenn man die Zahlen von Gooch und Heath<sup>92)</sup> damit vergleicht, welche mindestens das 40—60 fache des theoretischen Verbrauches fordern; nach Moser<sup>93)</sup> wenigstens das Vierfache.

In unseren Versuchen zeigte es sich, daß die milchige Trübung praktisch gar nicht nachbläut. Nach etwa 12 stündigem Stehen hatte sich jeweils ein kompakter Niederschlag abgesetzt, der nur in seinen obersten Schichten blau angelaufen war. Dadurch, daß man das Kaliumjodid vor dem Erhitzen zugibt, vermeidet man eine stärkere Berührung des Oxyduls mit der Luft beim Mischen. Eine Störung findet unseres Wissens nicht statt. Als ein günstiger Umstand gesellt sich beim Ansäuern die Kohlensäure-Entwicklung hinzu.

Bei Benützung der Jodreaktion in der oben angegebenen Weise ist ein Zweifel, ob die Stärkelösung eines Versuchsansatzes als genügend oder ungenügend weit abgebaut zu betrachten ist, bei der sehr großen Empfindlichkeit der Jodstärkereaktion sozusagen ausgeschlossen.

Mit einiger Übung ist es möglich auch ohne Ausnützung der Jod-Kupferreaktion den Endpunkt verhältnismäßig genau nach der Farbe der mit Fehling erhitzten Lösung zu erkennen. Bei einem um 5% fallenden Enzymzusatz kann man sich höchstens um ein Röhrchen täuschen. Die Farbe nimmt von blau ab, geht über hellblau, grünlich-hellgelb, nach einem dunkleren Gelb.

Der Eigenverbrauch der Stärke (+ Enzym) an Fehling'scher Lösung bei einem Umsatz von 30% beträgt nach dem Jodverbrauch bei der Hypojodit-Methode berechnet rund 4% des Gesamtzusatzes. Dieser immerhin nicht unbeträchtliche Fehler ist immer gleich gerichtet und die Schwankungen sind bei einer normalen Maranta-Stärke kaum je größer als die Versuchsfehler. Das Enzym zu 100% als Milchzucker gedacht, würde nur etwa 0,4—0,5% ausmachen.

Folgender Reihenversuch diente zur Ermittlung der Menge der Fehling'schen Mischung, welche für eine ca. 30%ige Spaltung ausreicht.

<sup>92)</sup> Z. f. anorg. Chem. 55, 119 (1907) } zit. nach Kolthoff, Maßanalyse,  
<sup>93)</sup> Z. f. anal. Chem. 45, 597 (1907) } Bd. 2, S. 412.

1. Versuch: 10 ccm Stärke-(No. V)-Lösung + 0,4 ccm Enzymlösung (0,1 : 500); 1 Stunde bei 40° + 1,0 ccm Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ca. 2 n + x ccm Fehling + KJ; 10 Minuten erhitzt + 6 ccm H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ca. 2 n.

x = ccm Fehling:	3,5	3,32	3,24	3,16	wiederholt	3,32	3,24
(Reihe um 5% fallend)							
Resultat:	blau		weiß			blau	weiß

Der nächste Versuch zeigt, daß eine Verminderung der Maltosemenge um 3,5% den Endpunkt um 2 Röhrchen verschiebt. Um event. Fehler auszuschalten, welche durch die Inhomogenität der Enzymlösung\*) bedingt sein könnten, wurde ein größerer Verdauungsansatz angesetzt, der genau den Mengenverhältnissen des 1. Versuches entspricht.

2. Versuch: 50 ccm Stärkelösung + 2 ccm Enzymlösung (0,1 : 500); 1 Stunde bei 40° + 5 ccm Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ca. 2 n; hiervon a) 4 Reagensgläser mit je 11 ccm und b) eines mit 11,4 ccm beschickt.

Fehling: a.	3,5	3,32	3,24	3,16;	b.	3,24
	alle blau					weiß

Jetzt hielten wir die Fehling'sche Lösung konstant und zwar auf 3,25 ccm entsprechend ca. 32 procentigem Abbau, und variierten die Menge der Enzymlösung.

3. Versuch: Gleich wie erster Versuch; Fehling 3,25 ccm (konstant)

Enzymlösung 0,1 : 500:	0,451	0,429	0,407	0,387	0,367	0,349
Zusätze um 5% fallend	weiß			blau		

Der Wert 0,387 muß trotz der intensiven Blaufärbung scharf an der Grenze sein, denn mit frisch angerührter Enzymlösung trat in mehreren Versuchen keine Blaufärbung ein, wohl aber nach 4—5 stündigem Stehen der Enzymlösung. Es können hier noch andere Versuchsfehler von Bedeutung sein. Bei vielen späteren Versuchen mit anderen Pankreatinpräparaten trat nie mehr ein ähnlicher Zufall ein. Ebenso war bei einer Wiederholung mit dem oben verwendeten Pankreatin (andere Puffer etc.) das Röhrchen 0,387 weiß.

Stärke III (größter Feuchtigkeitsgehalt) gab dieselben Resultate wie Stärke V.

Die gerade noch genügenden Enzymmengen (0,1 : 500) für fünf Handelspräparate betragen:

		Reziproker Wert als Maß der stärkeabbauenden Wirksamkeit; IV = 1 gesetzt	
I	„Parke Davis“ U. S. A. X	0,253 ccm	4,0
II	„Witte“ U. S. A. X	0,35 „	2,9
III	„Merck“ U. S. A. X	0,39 „	2,6
IV	„Merck“ in lamellis	1,00 „	1,0
V	„Armour“ altes Präparat	0,72 „	1,4

\*) Die Enzymlösung zeigt auch nach Anreiben des Präparates mit Wasser feine suspendierte Teilchen, denen aber sehr wohl eine verdauende Wirkung zukommen kann und die daher nicht abfiltriert wurden.

Die Bestimmungen erfolgten meist mit um 5% fallenden Enzymzusätzen. Der maximale Fehler der Bestimmung (nicht der Methode) beträgt also  $\pm 2,5\%$ .

Die beschriebene Methode zur Ermittlung der stärkeabbauenden Wirksamkeit von Handels-Pankreatinen kann wegen ihrer Einfachheit und Eindeutigkeit unseres Erachtens als Arzneibuch-Methode empfohlen werden.

IV. Trypsinbestimmung: In den Pankreatin-Präparaten kommen als Peptidbindungen lösende Enzyme die Trypsin-Kinase, Trypsin und Pankreaserepsin vor. Enterokinase ist der spezifische Aktivator des Trypsins, der selbst nicht enzymatischer Natur ist und präparativ aus der Darmschleimhaut gewonnen werden kann. Das nicht aktivierte Trypsin weist bestimmten Peptonen und Protaminen gegenüber ein hydrolysierendes Vermögen auf, nicht aber höheren Eiweißkörpern gegenüber (Gelatine, Casein etc.). Trypsin-Kinase baut besonders die genannten höheren Eiweißsubstanzen weitgehend ab. Native Proteine sind fast oder vollständig resistent.

Die meisten Methoden (insofern sich das betreffende Substrat durch seine Angreifbarkeit eignet), welche zur Messung der Pepsinwirkung in Frage kommen, lassen sich auf die Trypsin-Kinase übertragen. Im wesentlichen ist nur eine Änderung der Wasserstoffionen-Konzentration vorzunehmen.

Überläßt man die Drüsen und Drüsenauszüge einige Zeit der Selbstverdauung, so entsteht ein wie Enterokinase wirkender Stoff (der wahrscheinlich mit dieser identisch ist) und aktiviert das ursprünglich inaktive Trypsin. Diese Autolyse ist bei vielen Herstellungsverfahren von Pankreaspräparaten von großer Wichtigkeit. Nach einer bestimmten Zeit erreicht die Wirksamkeit des Materiales ein Maximum. Dieses ist der Schnittpunkt von zwei entgegengesetzt gerichteten Vorgängen, der Zerstörung des Trypsins und der Anreicherung an Aktivator bzw. der diesem proportional verlaufenden Aktivierung<sup>94)</sup>. Das Trypsin der Handels-Pankreatine ist auf diesem Wege weitgehend aktiviert worden. Eigentümlicherweise ist es in den Trockenpräparaten gewöhnlich nicht 100 prozentig kinasiert. Was wir aber ohne Enterokinase-Zusatz messen, ist die aktuell aktivierte Trypsinmenge; also ein, wenn auch zumeist großer Teil der wirklichen Leistungsfähigkeit. Die öfters erwähnten Drüsenpulver (nach Willstätter) enthalten das Trypsin nur zu einem geringen Teil aktiviert (vgl. auch die Pankreon-Tabletten, Seite 77). Sie würden effektiv bei einer Prüfung ohne absichtliche Aktivierung sehr schlecht wegkommen.

Die Verwendung von Enterokinase-Präparaten bedeutet für eine Arzneibuch-Methode eine gewaltige Komplikation (Beschaffung

<sup>94)</sup> E. Waldschmidt-Leitz: H. 132, 181 (1923/24).

und Zuverlässigkeit derselben). Für diese Art von Präparaten würde eine Lipasebestimmung die Trypsinbestimmung ersetzen müssen und auch genügend Gewähr leisten, für einen befriedigenden Trypsin-gehalt (vgl. Seite 77) ebenso <sup>95)</sup>. Bei den jetzigen Handelsprodukten ist aus dargelegten Gründen (Seite 77) auf die Lipasebewertung zu verzichten und wir können angesichts der ziemlich weitgehenden autolytischen Aktivierung \*) wohl an eine approximative Bestimmung denken. Hier größtmögliche Genauigkeit zu erstreben wäre sinnlos und wir sehen unsere Aufgabe darin, eine einfache Methode auf ihre Eindeutigkeit auszubauen und darnach zu trachten, daß ihre Fehlergrenzen wenigstens innerhalb diejenigen zu liegen kommen, welche durch obige Verhältnisse bedingt sind. Das eigentliche Maß der Proteolyse ist, wie beim Pepsin ausführlicher besprochen wurde, die Anzahl der gelösten Peptidbindungen. Sie können ganz allgemein nach Sørensen durch Formoltitration <sup>96)</sup>, nach der gasvolumetrischen Methode von van Slyke <sup>97)</sup>, nach der Alkohol-Titration von Willstätter, Waldschmidt-Leitz, Duñaiturria und Künstler <sup>98)</sup> und nach der Aceton-Titration von Linderström-Lang und Steenberg <sup>99)</sup> bestimmt werden.

Durch die Wahl bestimmter Peptone wäre die peptolytische Wirksamkeit einer Auswertung zugänglich. Hier sind die Verhältnisse insofern verwickelter, als man mit einem schwankenden Anteil an kinasefreiem Trypsin zu rechnen hat, und das Problem des Substrates erhebliche Schwierigkeiten einschließt. Betreffs Methoden und Substrate (vgl. Seite 14 und 22).

Wir wandten uns der Methode der U. S. A. X zu. Es ist im Prinzip die Groß'sche Vorschrift (vgl. Seite 42):

In ein 50 ccm-Meßkölbchen gibt man 0,1 gr feines Caseinpulver und 80 ccm Wasser. Nachdem durch Schütteln eine Suspension entstanden ist, fügt man genau 1 ccm 0,1-n-Natronlauge hinzu, stellt in ein Wasserbad von 40° und schwenkt möglichst oft kräftig um (nicht schütteln!). Nach der vollständigen Auflösung des Caseins, die nicht mehr als eine halbe Stunde beanspruchen soll, wird abgekühlt und auf 50 ccm aufgefüllt.

5 ccm der Caseinlösung vermischt man mit 2 ccm der gut geschüttelten Pankreatinlösung 0,1:500 und 3 ccm Wasser in einem Jenaer-Reagensglas mit Glasstopfen und stellt dieses sogleich in ein Wasserbad von 40°. Nach Ablauf einer Stunde soll die Verdauungsflüssigkeit mit 3 Tropfen alkoholischer Essigsäure nach U. S. A. X \*) keinen Niederschlag geben“ (No precipitate is produced).

<sup>95)</sup> E. Waldschmidt-Leitz, H. 132, 181 (1923/24) und zwar S. 214 u. 215; gleichmäßige tryptische Wirkung der Drüsenpulver.

\*) Die drei von E. Waldschmidt-Leitz (L. c. 95 und zwar S. 221) untersuchten Handelspräparate waren zu 93, 72, 95% aktiviert.

<sup>96)</sup> Bio. Z. 7, 45 (1908).

<sup>97)</sup> Ber. d. deutschen chem. Ges. 43, 3170; J. of Biol. chem. 9, 185 (1911); Handbuch d. biol. Arb. Meth. I, 7, 263.

<sup>98)</sup> H. 161, 191 (1926).

<sup>99)</sup> Compt. rend. Lab. Carlsberg, 17, No. 16, 1—32 (1929); C., I, 2423 (1930).

\*) 1 ccm Eisessig + 9 ccm Wasser + 10 ccm Alkohol.

Als optimaler ph werden angegeben:

Palitzsch und Walbum <sup>100)</sup>	Gelatine 9,7
Ringer <sup>101)</sup>	Fibrin ca. 9,5
Waldschmidt-Leitz <sup>102)</sup>	Gelatine 8,2 — 8,7 (opt. Ber. 7,7 — 9,1)
Northrop <sup>103)</sup>	Casein 8,6
Willson <sup>104)</sup>	Casein ca. 7,5
Willstätter und Mitarbeiter <sup>105)</sup>	Casein 8,6 bei 20° gemessen 8,9 bei 30°

Über die Temperatureinflüsse fehlen zuverlässige Befunde. Man begegnet diesbezüglich auf Schritt und Tritt Widersprüchen. Allgemein gilt die Trypsin-Kinase als sehr temperaturempfindlich im alkalischen, als relativ resistent im sauren Gebiet. Willson l. c. <sup>104)</sup> wählte 55° als Versuchstemperatur, welche Palitzsch <sup>106)</sup> für ph = 8,0 geeignet findet. Willstätter und Mitarbeiter, l. c. <sup>105)</sup>, erwärmten auf 30° (Casein) bzw. 37° (Gelatine). Die U. S. A. X schreibt 40° vor.

Diese Temperatur schien uns auch aus dem Grunde geeignet, weil wir sie auch für die Pepsin- und Amylase-Bestimmung gewählt haben.

Die nach der Vorschrift hergestellte Lösung mit Casein nach Hammarsten „Merck“ zeigte folgende Eigenschaften in Bezug auf Reaktion:

ohne Pankreatinzusatz	ph (18°)	mit Pankreatin	
mit H <sub>2</sub> O <sub>aa</sub> verdünnt	sofort 9,35	sofort	9,39
	nach 1 Std. 9,35	nach 2 Std. bei 18°	8,75
	nach 1½ Std. 9,35	1 Std. bei 40° sofort	8,11
		1 Std. bei 40°; über Nacht stehen gelassen	7,71

Der optimale Bereich ist nach E. Waldschmidt-Leitz, l. c. <sup>102)</sup>, 7,7—9,1; unter den betrachteten Verhältnissen liegt ein Intervall von ca. 9,35 bis 8,1 vor. Da die Anfangsgeschwindigkeit verhältnismäßig groß ist, wird die Reaktion schon während des Anwärmens oder kurz nachher in diese Optimalzone verschoben.

Wie beim Pepsin setzten wir Reihen an und verringerten sukzessive deren Faktor. Was wir dabei beobachten, unterscheidet sich wesentlich von den Pepsinreihen. Die Trübung nimmt bei einer um 10% fallenden z. B. 5 gliedrigen Reihe über drei derselben gar nicht oder nur wenig zu, zeigt aber bei den folgenden Gliedern deutliche Zunahme:

1. Versuch: Enzymlösung 0,1 : 500				
„Merck“ U. S. A. X ccm:	5,0	4,5	4,05	<u>3,6</u> <u>3,26</u>
	etwa gleich schwach opalescent			ansteigend

<sup>100)</sup> Bio. Z. 47, zit. nach Oppenheimer, Ferm. u. ihre Wirkungen, Bd. 1, S. 68.

<sup>101)</sup> H. 124, zit. nach Oppenheimer, Ferm. u. ihre Wirkungen, Br. 1, S. 68.

<sup>102)</sup> H. 132, 181, u. zwar S. 198.

<sup>103)</sup> J. of Gen. Physiol. 5, 263 (1922).

<sup>104)</sup> J. of the Americ. Pharmac. Assoc. 19, 128 (1930).

<sup>105)</sup> H. 161, 191 (1926).

<sup>106)</sup> Zit. nach Oppenheimer, Ferm. u. ihre Wirkungen, Bd. 1, S. 907.

Hier tritt die Schwierigkeit der Auslegung von „No precipitate is produced“ sehr deutlich hervor. Das mit 2 ccm Enzymlösung versetzte Röhrchen trübte sich stark, ohne daß man von einem Niederschlag im eigentlichen Sinn des Wortes sprechen könnte. Nach bestimmten Zeiten wiesen schließlich alle Ansätze, inklusive diejenigen mit ursprünglich sehr schwacher Opaleszenz einen weißen, flockigen Niederschlag auf. Legt man dem Worte „precipitate“ den Sinn von Trübung bzw. Opaleszenz bei, so erstreckt sich die Möglichkeit der Wahl des Endpunktes über ein weites Gebiet. Aus diesem Grunde kam diese Methode in weiten Kreisen in Mißkredit (vgl. Willson<sup>107</sup>).

Die Methode kann nur dann ihre Aufgabe erfüllen, wenn der Grad der Trübung festgelegt wird. Die Willkür dieses Vorgehens wird vermindert durch die Berücksichtigung jenes Röhrchens, von welchem an sich die Trübungen sehr deutlich verstärken.

Wir versuchten mit Silbernitrat und einer Kochsalz-Testlösung einen Trübungsstandard einzuführen. Jedoch machte sich der Einfluß des Lichtes auf das Silberchlorid geltend und ebenso nachteilig war die Verschiedenheit des Dispersitätsgrades bzw. dessen zeitliche Änderung bei Test- und Versuchsobjekt. Nur eine verdünnte Caseinlösung kann mehr oder weniger die Abhängigkeit der Trübung von der Fällungsgeschwindigkeit und andere Eigenschaften mit der Verdauungsflüssigkeit gemeinsam haben. In einer Reihe mit um 5% fallenden Enzymmengen,

## 2. Versuch:

4,28	4,06	3,86	3,67	3,48	3,3
gleich		ansteigend			

wurde der Standard dem Röhrchen 3,86 gleichgesetzt und dessen Verdauungsgrad als untere Grenze betrachtet:

Vergleichslösung: Von der frisch hergestellten Caseinlösung verdünnt man einen Teil in einem Meßkölbchen auf das 10fache. Gegen Ende des Hauptversuches mischt man in einem gleichen Jenaer-Reagensglas 2,5 ccm der Caseinverdünnung mit 2,5 ccm Wasser und 5 ccm einer NaOH-Verdünnung, welche 1 ccm 0,1-n-NaOH auf 50 ccm enthält.

Der isoelektrische Punkt des Caseins liegt bei ph 4,7<sup>108</sup>. Um eine in jedem Falle genügend vollständige Fällung zu erreichen, ist es zweckmäßig, soviel Essigsäure zuzugeben, daß der ph etwas mehr im sauren Gebiet liegt, weil das Casein, wenn einmal ausgeflockt, ziemlich schwer in Lösung geht und ein genaues Einstellen auf ph 4,7 in unserem Falle nicht immer leicht ist.

Die Trübungen, nephelometrisch gemessen, verhalten sich wie folgt:

I. 3,86 ccm Enzymlösung + 1,14 ccm H<sub>2</sub>O + 5 ccm Caseinlösung; a) mit 2 Tropfen, b) mit 3 Tropfen Essigsäure-Gemisch.

<sup>107</sup>) J. of the Americ. Pharmac. Assoc. 19, 128 (1930).

<sup>108</sup>) Kestner: Chemie der Eiweißkörper, Vieweg, S. 305 (1925).

II. Vergleichslösung wie oben, a) mit 2 Tropfen, b) mit 3 Tropfen Essigsäure-Gemisch.

II a. Nephelometer-Skalenteile	= 20	= 100 %	gesetzt
II b. „ „	= 21,65	= 92,4%	
I a. „ „	= 23,42	= 85,4% *)	
I b. „ „	= 19,84	= 100,8%	

Noch mehrere ähnliche Versuche, welche wir meistens mit 4, 5 oder 6 Tropfen einer 1:1 mit Wasser verdünnten Essigsäuremischung vornahmen, wodurch die Trübung stabiler wurde, und bei denen die durch die geringere Alkoholkonzentration hervorgerufene Änderung der Oberflächenspannung in Rechnung kam, zeigten, daß drei Tropfen des Essigsäuregemisches nach U. S. A. X reproduzierbare Trübungen ergeben und auch einen genügenden Spielraum betreffs Tropfengröße lassen.

Mit Hilfe der oben festgelegten Trübung wurden ebenfalls fünf Handelsprodukte gemessen, mit der Absicht zu beobachten, wie sich das Röhrchen mit 2 ccm Enzymlösung \*\*) (nach U. S. A. X) gegenüber unserem willkürlich angenommenen Endpunkt verhält:

			Proteol. Wirksamkeit nach U. S. A. X unter Benützung der Vergleichstrübung
Pankreatin „Parke-Davis“ U.S.A X	2 ccm 0,1 :	500 schwach opalescent schwächer als Test	> 1
„ „Witte“ „	2 ccm 0,1 :	500 völlig klar	
	2 ccm 0,1 :	2500 gleich Test	5
„ „Merck“ „	2 ccm 0,1 :	500 stärker als Test	< 1
„ „Merck“ in lamellis	2 ccm 0,1 :	500 sehr wenig schwächer als Test	> 1
„ „Armour“, altes Präp.	2 ccm 0,1 :	500 klar	
	0,5 ccm 0,1 :	500 wenig stärker als Test	< 4

Drei gleiche Reihen mit drei verschiedenen Caseinen Grüber, Kahlbaum und Merck nach Hammarsten ergaben sehr gute Übereinstimmung. Ebenso verhält sich eine frischbereitete und eine fünf Stunden alte Caseinlösung. Ältere Caseinlösungen wurden nicht untersucht, dürften aber bei der relativ großen Stabilität des Caseins durch Zusatz eines Antiseptikums z. B. Toluol längere Zeit haltbar sein.

V. Befunde über Aussehen, Geruch, Löslichkeit, Feuchtigkeitsgehalt, Fettgehalt und Aschegehalt: Die allgemeinen chemischen und physikalischen Eigenschaften, deren Kontrolle für einen Pharmakopoe-Artikel in Frage kommt, sind keineswegs die Eigenschaften des Enzyms selbst, sondern fast ausschließlich der Begleitstoffe (vgl. Pepsin). Ein in dieser Hinsicht tadelloses Präparat kann in Bezug auf seine Wirksamkeit versagen; aber wir stoßen auch auf gegenteilige Fälle.

\*) Bei der nephelometrischen Prüfung dieser Lösung war wahrscheinlich bereits eine gewisse Flockung eingetreten.

\*\*) Das Pankreatinpulver wurde sorgfältig in einem kleinen Mörser mit etwas Wasser angerieben und quantitativ in den Meßkolben gespült.

Die von uns untersuchten Präparate zeigten folgende Eigenschaften:

**Aussehen:** Die Produkte von Merck und Parke-Davis sind sehr feine, weiße Pulver, diejenigen von Witte und Armour sind bräunlich-gelb und krümelig; letzteres etwas feucht aussehend und leicht zusammenbackend.

**Geruch:** „Parke-Davis“ sehr schwach; brotartig.  
 „Witte“ schwach nach Fleischextrakt.  
 „Merck“ schwach; etwas an Käse erinnernd.  
 „Merck“ in lamellis schwach; fleischbrüheartig, etwas an Ziege-  
 käse erinnernd.  
 „Armour“ fleischbrüheartig.

**Löslichkeit:** Die U. S. A. VIII enthielt noch die Forderung, daß nicht mehr als 10% unlöslich sein darf. Diese wurde in der U. S. A. X nur noch qualitativ wieder gegeben: „Pankreatin ist langsam und unvollständig in Wasser löslich“.

Diesem Verhalten nach, kommen sich je zwei von vier untersuchten Produkten nahe:

„Merck“: (mit Wasser angerieben, Konz. 0,1:500) Lösung nur schwach opaleszent.  
 „Parke-Davis“: etwas stärkere, aber immer noch homogene Opaleszenz.  
 „Witte“ und „Armour“: mit Flocken und stark trüb.

**Feuchtigkeitsgehalt:** 2,0 gr in Wägegglas von 5 cm Durchmesser während 5 Stunden bezw. ∞ Stunden bei 103–105° getrocknet:

„Parke-Davis“	2,1% (5 Std.)	2,3% (∞ Std.)
„Witte“	7,1%	7,7
„Merck“	1,5	1,6
„Merck“ in lam. pulverisiert	6,4	6,6
„Armour“	9,3	10,3

**Fettgehalt:** Nach U. S. A. X bestimmt; 2 gr dürfen nicht mehr als 0,06 gr Fett enthalten.

„Parke-Davis“	0,044 gr.	—
„Witte“	0,132	0,127
„Merck“	0,011	—
„Merck“ in lam. pulverisiert	0,006	—
„Armour“	0,141	—

**Aschegehalt:** Die Veraschung war bei den Produkten von Witte und Armour ziemlich schwierig; Parke-Davis und Merck verhielten sich ähnlich; Merck hinterließ eine Schmelze.

„Parke-Davis“	2,1%	2,2%	„Armour“	5,9	—
„Merck“	6,8	7,1	„Merck“ in lam.	3,7	—
„Witte“	5,2	5,1			

## Anhang: Prüfung der zu den Verdauungsversuchen verwendeten Casein-Präparate.

Um Anhaltspunkte über die Reinheit der drei für die Verdauungsversuche benützten Casein-Präparate (nach Hammarsten hergestellt) zu haben, wurden sie im wesentlichen nach U. S. A. X Seite 474 untersucht.

Die Prüfungsvorschrift lautet folgendermaßen:

Casein ist ein weißes oder leicht gelbes, geruchloses, körniges (granular) Pulver. Es ist unlöslich in Wasser und anderen neutralen Lösungsmitteln, leicht

löslich in Ammoniak und in Alkalihydroxyden; diese Lösungen sind leicht opaleszent (forming a cloudy solution). Asche höchstens 1%; Feuchtigkeitsgehalt höchstens 10%.

Man schüttele 1 gr Casein mit 20 ccm Wasser während 10 Minuten und filtriere: Das Filtrat reagiere nicht alkalisch gegen Lackmuspapier und nach dem Eindampfen und Trocknen betrage das Gewicht des Rückstandes höchstens 0,1% (lösliche Stoffe).

1 gr Casein in einer Mischung von 10 ccm Wasser und 5 ccm alkoholischem Ammoniak (10% NH<sub>3</sub>) gelöst, zweimal mit je 20 ccm Petroläther ausgeschüttelt, der Petroläther-Rückstand bei 70° getrocknet, betrage nicht mehr als 0,5%.

Stickstoffgehalt des wasserfreien Caseins: 15,2—16%.

Die Veraschung kann unter Umständen Schwierigkeiten bereiten. Höpfner und Burrmeister<sup>109)</sup> lassen die Kohle mit Wasser auslaugen, befeuchten dann mit Ammonnitrat, trocknen, glühen, fügen den wäßrigen Auszug wieder hinzu, dampfen ein, trocknen bei 100° und wägen. Wir veraschten wie gewöhnlich, gaben etwas Wasser bzw. Ammonnitratlösung hinzu, erwärmten und lösten mit einem starken Platindraht unter den nötigen Kautelen den schwarzen glasigen Belag in Form von Plättchen ab, dampften ein und glühten nochmals, worauf die Asche weiß war.

Die Titration des Filtrates der Ausschüttelung des Caseins mit Wasser gegen Phenolphthalein mit Natronlauge nach Lunge-Berl<sup>110)</sup> erfäßt wohl geringe Beimengungen von löslichen Caseinaten, nicht aber andere lösliche Stoffe, z. B. Milchzucker, Dextrin u. s. w. Das Eindampfen des Auszuges und Wägen des Rückstandes ist also unerlässlich.

Bei der Fettbestimmung durch Ausschütteln mit Petroläther mögen folgende Einzelheiten beachtet werden, weil die Dauer der Prüfung dadurch sehr abgekürzt wird:

In einen Scheidetrichter, der 5 ccm Wasser und 5 ccm 95% Alkohol enthält, gibt man 1 gr Casein, suspendiert dieses durch Schütteln möglichst gut und fügt 10 ccm Ammoniak ca. 2 n hinzu. Nach Auflösung des Caseins, wobei eine schmutzige gelbe opaleszente Flüssigkeit entstanden ist, wird zweimal mit Petroläther ausgeschüttelt. Sollten sich die beiden Lösungen nicht rasch wieder entmischen, was leicht eintritt, so fügt man, ohne erneut zu schütteln, etwas Alkohol hinzu (ca. 1 ccm). Der Petrolätherauszug soll zur Vorsicht durch ein Papierfilterchen filtriert werden.

Casein n. Hammarsten	Feuchtigkeit*		Asche** %	Fettgehalt %	Wasserlösliches	
	5 Std.	14 Std.			auf das Casein bezogen %	auf das Filtrat bezogen %
„Merck“	10,7	10,8	1,67	0,06	3,8; 3,7	0,19; 0,19
„Kahlbaum“	9,4	9,4	1,53	0,04	2,5	0,12
„Grübler“	9,1	9,2	1,05	0,04	1,9	0,095

<sup>109)</sup> Chem. Ztg. 36, 1053 (1912); zit. nach Lunge-Berl: Chem. Präp., S. 1096.

<sup>110)</sup> Lunge-Berl: Chem. Präp., S. 1096.

\*) Das Casein darf dabei seine Farbe nicht geändert haben.

\*\*\*) Auf das lufttrockene Casein bezogen.

Das Filtrat bei der Bestimmung des Wasserlöslichen zeigte folgendes Verhalten:

Casein nach Hammarsten	Filtrat + 0,2 proz. Essigsäure	Chloridgehalt vgl. Ph.H.V.	Reaktion des Filtrates
„Merck“	Starke Trübung, nach einiger Zeit Flockung	Geringe Menge	Methylrot auf Zwischenfarbe
„Grübler“	starke Trübung, später feine Fällung; schwächer als bei „Merck“	Chloridfrei	

Der Aschegehalt und der Gehalt an Wasserlöslichem sind bei zwei der untersuchten Präparate zu hoch. Das Grübler'sche Casein entspricht gerade noch den Anforderungen. Die im Filtrate auftretenden starken Trübungen nach Zusatz von Essigsäure und andere Reaktionen beweisen, daß es sich um ein lösliches Caseinat handelt. Diese Verunreinigung kann allerdings in größeren Mengen sehr unerwünscht sein, weil sie die Reaktion der Lösungen beeinflusst, hauptsächlich dann, wenn die Kontrolle der pH-Werte nicht vorgenommen wird. Für unsere Versuche ist dieser Gehalt an Caseinat belanglos.

### Zusammenfassung des Kapitels: „Pankreatin“.

1. Anhand der Literatur wurde die Beschaffenheit der Handelsprodukte eingehend diskutiert und die Verwendung des Drüsenpulvers für therapeutische Zwecke angeregt, anstelle der weniger wirksamen Handelspräparate.

2. Es wurden auf Grund neuerer Forschungen Richtlinien gegeben, nach welchen die Handelsprodukte einerseits und das Drüsenpulver andererseits im Rahmen einer Arzneibuchvorschrift untersucht werden können.

3. Es ließ sich zeigen, daß unter Berücksichtigung von Aktivierung und Pufferung eine besondere Reinigung der Stärke bei der Amylasebestimmung sich erübrigt.

4. Eine Amylasebestimmung, die sich als Schwellenwertmethode für ein Arzneibuch gut eignen dürfte, wurde ausgearbeitet und mit dieser die amylytische Wirksamkeit einiger Handelsprodukte untereinander verglichen.

5. Nachdem auf den beschränkten Wert der Bestimmung der tryptischen Wirksamkeit ohne Verwendung von Enterokinase bei den Pankreatinpräparaten des heutigen Handels aufmerksam gemacht worden war, ergab sich als zweckmäßig, die Methode der

U. S. A. X nachzuprüfen und durch die Wahl einer Vergleichstrü-  
bung eindeutig zu gestalten. Einige Handelsprodukte wurden dann  
nach dieser Methode untersucht.

6. Weitere Prüfungen (Löslichkeit, Feuchtigkeitsgehalt, Asche-  
gehalt u. s. w.) von Handelspräparaten wurden vorgenommen.

7. Im Anhang sind die Prüfungsbefunde über die bei unseren  
Verdauungsversuchen mit Pepsin und Pankreatin verwendeten drei  
reinen Caseinsorten niedergelegt. Die Caseine wurden nach der  
Vorschrift der U. S. A. X. geprüft.

---

# III. Getrocknete Schilddrüse.

(Thyreoidea siccata)

## A. Einleitung.

Trotz der großen Bedeutung, welche die Organtherapie in den letzten Dezennien erreichte, findet man Heilmittel dieser Gruppe verhältnismäßig spärlich in den bestehenden Arzneibüchern. Dies hängt in erster Linie damit zusammen, daß dieses Gebiet in der Neuzeit in eine Phase intensiver Bearbeitung und rascher Entwicklung getreten ist und daß die chemischen Prüfungsmethoden meistens noch sehr unzulänglich sind. In den Pharmakopöen am ehesten noch vertreten ist die getrocknete pulverisierte Schilddrüse.

Außer dieser hatte die U. S. A. IX (1916) auch die getrocknete Nebenniere (*Suprarenalum siccum*) beschrieben. Mit dem Fortschritt in der Erkenntnis des Nebennierenhormons und der Konstitutionsaufklärung und Synthese des Adrenalins war auch eine rationellere Applikationsmöglichkeit gegeben. Die Lösungen des reinen Adrenalins erlauben eine bequemere Dosierung und die parenterale Einverleibung. Dies zu erreichen ist eines der Ziele der heutigen Hormonforschung. Dementsprechend wurde auch der Artikel *Suprarenalum siccum* in der Neuausgabe der U. S. A. X fallen gelassen und an dessen Stelle das Adrenalin (*Epinephrina*) und die 1‰ige Lösung seines Hydrochlorids (*Liquor Epinephrinae hydrochloridi*) aufgenommen.

Ein ähnliches Bestreben zeigt sich auch bei den Hypophysen-Präparaten. Hier ist die Verwendung von injizierbaren Auszügen der chemischen Erschließung des oder der wirksamen Bestandteile vorausgeleitet. Auch hier haben die U. S. A. IX und X die ersten Schritte zur Aufstellung von offiziellen Prüfungs- und Standardisierungsmethoden getan<sup>1)</sup>.

Versuche, Schilddrüsenpräparate zu injizieren, fielen zunächst nicht befriedigend aus<sup>2)</sup>. Am besten bewährte sich die Verab-

<sup>1)</sup> Siehe U. S. A. X: Art. *Liquor Pituitarii* u. *Pituitarium*.

<sup>2)</sup> Orthner: *Chem. Katal. Vorgänge im Lebensprozeß* ... Enke, S. 56 (1928). Oppenheimer: *Hdb. d. Bioch.*, Bd. 9, S. 235.

reichung per os, welchem Umstand das Organpulver seine Bedeutung verdankt. So äußert sich z. B. „Merck“<sup>3)</sup>:

„Die verschiedenen Ansichten und Untersuchungsergebnisse der genannten Autoren lassen kaum mehr einen Zweifel aufkommen, daß die einzig zuverlässige Thyreoidmedication im Gebrauche der ganzen getrockneten Drüse zu finden ist, da sie sicher den wirksamen Stoff enthält, gleichviel welcher Art und Zusammensetzung er auch sei.“

Dabei sei speziell hervorgehoben, daß die biologische Wirksamkeit der getrockneten Drüse außer Zweifel steht und keinerlei Nachteile gegenüber der Verabreichung frischer Drüsen zu befürchten sind (Orthner, l. c.<sup>2)</sup>, S. 56). Es liegen unzählige Befunde und Versuchsprotokolle vor, die sich teils auf frische Drüsen, teils auf Trockenpräparate bzw. Tabletten beziehen, ohne daß auf Mängel, diese letzteren betreffend, aufmerksam gemacht worden wäre. Man ist berechtigt, eine erhebliche Resistenz der aktiven Stoffe gegenüber äußeren Einflüssen anzunehmen, wie es sich bei der Herstellung des Jodothyrens und des Thyroxins zeigt (vgl. jedoch S. 125). Außerdem sind sie gegen Kochtemperatur und Verdauungssäfte beständig<sup>4)</sup>. Nach Veil und Sturm<sup>5)</sup> tritt bei der Verdauung eine teilweise Abspaltung des Jods in anorganischer Form ein.

Erst in neuester Zeit sind eingehendere Versuche über die Wirksamkeit von Thyroxin, dessen optisch aktive Komponenten und dessen Peptide unternommen worden<sup>6)</sup>.

Folgende Zusammenstellung gibt Aufschluß in welchen der wichtigsten Arzneibücher „Getrocknete Schilddrüsen“ vertreten ist.

U.S.A. VIII	1905	(Schaf)	U.S.A. X	1926	(Haustiere)
Brit.	1914	(Schaf)	D.A.B. 6	1926	(Rind und Schaf)
U.S.A. IX	1916	(Haustiere)	Nederl. V	1926	(Schaf)
			Ital. V	1929	(Rind, Schaf, Schwein)

## B. Beschaffenheit des Drüsenmaterials und Herstellung des Pulvers.

Literaturstudien über Art, Alter, Gesundheitszustand, Herkunft der Tiere, deren Schilddrüsen für therapeutische Zwecke verarbeitet werden, über die jahreszeitlichen Schwankungen des Jod- bzw. Thyroxin-Gehaltes und über die Zweckmäßigkeit des Entfettens des getrockneten Drüsenpulvers führten uns zu folgenden Ergebnissen:

a) Hinsichtlich der Wirksamkeit der Schilddrüsenpräparate bestehen zur Zeit keine zwingenden Gründe, von den drei Tierarten

<sup>3)</sup> Merck's wissenschaft. Abhandl. No. 3, S. 82.

<sup>4)</sup> Poulsson: Lehrbuch d. Pharmakol., 6. Aufl., S. 430.

<sup>5)</sup> Veil u. Sturm: D. Arch. f. klin. Med. 147, 166 (1925).

<sup>6)</sup> Harington u. Salter: Bioch. J. 24, 456 (1930); C. II, 1388 (1930).

Schaf, Schwein und Rind die eine oder andere als Drüsenlieferantin auszuschließen. Der Ausschluß der Rinderdrüsen könnte unseres Erachtens immerhin gerechtfertigt werden, wegen des hohen Gehaltes an interstitiellem Gewebe, das die mikroskopische Beurteilung der Präparate beeinträchtigt (s. S. 118). Die Handelspräparate sollen nach Guggenheim hauptsächlich aus Hammel- und Rinderdrüsen, nach Ullmann und Orthner hingegen zum größten Teil aus Schweinedrüsen bestehen und nach Ullmann, l. c., auch die wirksamen Prinzipien der Epithelkörperchen (Gland. parathyreoideae) enthalten. Sollte es sich in Zukunft als vorteilhaft erweisen, an Epithelkörperchen arme Schilddrüsenpräparate\*) zu verwenden, so würde nur das Schweinedrüsenpulver in Frage kommen, weil bei den Schweinedrüsen nach Ellenberger und Baum die inneren Epithelkörperchen meistens fehlen und die äußeren durch sorgfältige Präparation entfernt werden können (vgl. ebenso Arndt).

b) Normen aufzustellen über Alter und Herkunft der drüsenliefernden Tiere ist zur Zeit nicht möglich, teils aus praktischen Gründen, teils auch, weil die Bedeutung dieser Faktoren (speziell das Alter) nicht genügend abgeklärt sind.

c) Die Forderung, die Schilddrüsen nur in den Sommer- und Herbstmonaten zu sammeln, ist insofern gerechtfertigt, als der Jodgehalt bezw. der Thyroxingehalt dann am höchsten ist. Die Drüsen von im Winter und Frühjahr geschlachteten Tieren können eventuell zum Verdünnen von solchen Präparaten dienen, welche einen höheren als den geforderten Thyroxingehalt aufweisen.

d) Die Verarbeitung von abnorm vergrößerten oder krankhaften Drüsen ist unbedingt zu vermeiden und die fleischschauenden Tierärzte der Schlachthöfe sollten eine spezielle Kontrolle des für die industrielle Verarbeitung vorgesehenen Drüsenmaterials vornehmen.

---

\*) Es werden zu therapeutischen Zwecken auch Trockenpräparate aus den Epithelkörperchen hergestellt (s. z. B. Merck's wissensch. Abhandl. No. 3, 4. Aufl., S. 36), denen spezifische, mit den Schilddrüsenpräparaten nicht identische Wirkungen zukommen.

ad. a. Guggenheim: Privatmitteilung an Herrn Prof. Dr. Eder. — L. Krall in Ul., Bd. 8, S. 593. — Orthner: Chem. katal. Vorgänge. . . Enke, S. 48 (1928). — Ellenberger u. Baum: Hdb. d. vergl. Anatomie d. Haustiere, S. 594 ff., 15. Aufl. — Arndt: Z. f. Anatomie u. Entwicklungsgesch., **81**, 191 (1926); ferner: Baumann: H. **21**, 319; **22**, 1. — Seidell u. Fenger: J. of Biol. Chem. **13**, 518 (1913).

ad. b) Münch: Phrm. W. **64**, 255 (1927). — Scharrer: Chem. u. Bioch. d. Jods Enke, S. 67 (1928).

ad. c) Seidell u. Fenger: J. of Biol. Chem. **13**, 517 (1913); Endocrinol. **2**, 98 (1918). — Bice Neppi: Giorn. chim. ind. appl. **10**, 67; C. I., 2511 (1928). — Kendall: J. of Biol. Chem. **39**, 125 (1919). — Kendall u. Simonsen: J. of Biol. Chem. **80**, 357 (1928).

ad. d) Kitt: Lehrb. d. pathol. Anatomie d. Haustiere, Bd. 2, S. 483 (1911). — De Quervain: Ergeb. d. Physiol. **24**, 701 (1925). — Klose, Lampe u. Liesegang: Beitr. z. klin. Chir. **77** (1912). — Literatur über d. Vorkommen v. Kröpfen b. Tieren; Scharrer: Chem. u. Bioch. d. Jods, Enke, S. 114 (1928). — Roos: H. **21**, 34.

e) Es sollten die Fragen der normalen und pathologischen Veränderungen speziell in bezug auf Größe und Gewicht der Drüsen noch weiterhin eingehend studiert und diesbezügliche Normen aufgestellt werden. Die Nederl. V normiert die Schafschilddrüsen in Bezug auf ihre Größe.

f) Der hohe Gehalt an ätherlöslichen Substanzen, deren Unwirksamkeit und leichte Veränderlichkeit (Ranzigwerden) lassen ein Entfetten des Drüsenpulvers als zweckmäßig erscheinen.

\* \* \*

Die Schilddrüse ist ein blutreiches Organ, welches nahe dem Kehlkopf, der Luftröhre von vorne und zu beiden Seiten aufliegt und durch Bindegewebe in seiner Lage festgehalten wird. Bei vielen Tieren, z. B. Schaf, Rind, Pferd, Katze u. s. w. findet man seitlich zwei Lappen, welche durch einen schmalen, oft kaum erkennbaren mittleren Teil miteinander verbunden sind. Bei Mensch und Schwein ist dieses mittlere Stück (Isthmus) so breit, daß diese drei Teile ein einheitliches Organ darstellen, bei dem die Lappen oft nur noch angedeutet sind.

Es kommen auch sogenannte Beischilddrüsen vor, kleinere Gewebepartien, welche nicht direkt mit der Schilddrüse zusammenhängen, aber histologisch zu dieser gehören und bis in die Gegend der Thymusdrüse vorgelagert sein können.

Die Nebenschilddrüsen (Gl. parathyreoideae) auch Epithelkörperchen genannt, sind oft schwer erkennbare 0,5—1 cm große Drüsen, welche bei den Schlachttieren zum Teil ganz in der Nähe (kranio-dorsal) der beiden Seitenlappen (äußere Epithelkörperchen), zum Teil direkt auf und im Schilddrüsenparenchym (innere Epithelkörperchen) lokalisiert sind. Sie unterscheiden sich von der eigentlichen Schilddrüse sowohl durch eine wesentlich andere Funktion, als auch histologisch. Bei der Gewinnung des Rohmaterials begleiten sie zu einem großen Teil die Schilddrüsen und werden auch durch eine sorgfältige Reinigung nicht abgetrennt<sup>7)</sup>.

Die Herstellung des Pulvers bietet keine besonderen Schwierigkeiten. Die Drüsen sollten vor der Verarbeitung, besonders in den technischen Betrieben (nachdem sie von den unerwünschten Geweben (Bindegewebe und Muskeln) befreit worden sind, gewaschen werden. Nach dem Zerkleinern mit Hilfe einer Fleischhackmaschine

ad. e) v. Fellenberg u. Pacher: Bio. Z. **188**, 338 (1927). — Ellenberger u. Baum: Hdb. d. vergl. Anatomie d. Haustiere, S. 594 ff., 15. Aufl. — Seidell u. Fenger: J. of Biol. Chem. **13**, 518 (1913).

ad. f) Temmink Groll u. Keulemans: Phrm. W. **51**, 267 (1914). — Romeis: Z. f. exp. Med. **6**, 101 (1917); Pflüg. Arch. **173**, 422 (1918); Serono u. Guerci: Rassegna Clin. terap. e Science aff. **20**, 190 (1921); zit. nach Guggenheim in Hdb. d. inneren Sekretion, Bd. 2, S. 36. — Orthner: Chem. katal. Vorgänge... Enke (1928), S. 21.

<sup>7)</sup> Vgl. Ellenberger u. Baum: Hdb. d. vergl. Anatomie d. Haustiere, S. 594 ff., 15. Aufl. — Privatmitteilung v. Herrn Prof. Dr. Küpfer.

wird der Brei in dünnen Schichten unter häufigem Durchrühren und Vermischen bei gelinder Temperatur getrocknet. Vorteilhaft ist es, die Trocknung bei niedriger Temperatur im Vacuum oder mittels eines warmen Luftstromes vorzunehmen. Nach einer ersten Zerkleinerung des Trockengutes wird mit Äther oder Petroläther entfettet, nochmals zerkleinert und schließlich durch Sieb 4 Ph. H. IV (15 Maschen pro cm) geschlagen.

Bei der Bereitung von kleineren Quantitäten, wie wir sie für unsere Versuche als Testmaterial benutzten, ist es nach unseren Erfahrungen am vorteilhaftesten, die Drüsen mit einer Schere in dünne Streifen zu schneiden und zwar bei den Schweinedrüsen in einer Spirale von der Peripherie zum Zentrum. Die kürzeren Streifen, wie sie beispielsweise bei den Schafschildrüsen zum Teil entstehen, trockneten wir auf Glasplatten bei ca. 40—50°. Die längeren wurden über einen aus dünnen Glasstäben bestehenden Rost gelegt. Es ist wichtig, so oft wie möglich die Streifen zu drehen, daß die dem Glas zugekehrte Seite jeweils dem warmen Luftstrom ausgesetzt wird. Bei Schaf- und Schweinedrüsen werden die Streifen spröde und können leicht zerbrochen werden und nach nochmaligem Trocknen lassen sie sich im Mörser pulverisieren. Die Rinderdrüsen sind stark von Bindegewebe durchsetzt. Sie trocknen weniger leicht und die Gefahr, daß Fäulnis eintritt, ist hier besonders groß. Man zerkleinert sie, weil sie nicht brüchig werden, mit der Schere und läßt sie dann nach weiterem Trocknen eine geeignete Maschine passieren.

Bei der Behandlung der zerkleinerten frischen Drüsen mit Aceton nach Nederl. V tritt teilweise Denaturierung der Eiweißkörper ein, so daß sich das daraus hergestellte Pulver zum Teil ähnlich verhalten wird, wie dasjenige aus Drüsen, welche bei höherer Temperatur getrocknet wurden. Es soll nach der Nederl. V im wäßrigen Auszug mit Kaliumferrocyanid und Essigsäure ein reichlicher Niederschlag auftreten.

Wir haben unsere Präparate im Soxhlet mit Äther entfettet. Um eine Verunreinigung mit Fasern der Filterhülsen auszuschalten, kamen die Pulver in feinste Seidengaze und erst dann in die Hülsen.

---

## C. Prüfungsmethoden.

---

I. Allgemeines: Zur Charakterisierung der Schilddrüsenpräparate kommen vor allem in Betracht: Sinnenprüfung (Aussehen, Geruch, event. Geschmack), mikroskopische Untersuchung, chemische Untersuchung (Jod-, Thyroxin-, Fett-, Feuchtigkeits- und Aschegehalt) und biologische Prüfung.

Die biologischen Wertbestimmungen werden von einigen Autoren als unumgänglich und ausschlaggebend betrachtet für die Beurteilung von Schilddrüsenpräparaten. Die in Frage kommenden Methoden sind aber zum Teil umstritten. Wir werden uns im Nachstehenden mit diesen Methoden nicht näher befassen. Eine kurze Zusammenstellung der wichtigsten Methoden ist z. B. von Kreitmair<sup>8)</sup> veröffentlicht worden.

II. Sinnenprüfung: Nachfolgende Tabelle enthält eine Zusammenstellung der wichtigsten Eigenschaften der von uns selbst hergestellten Präparate und eines Merck'schen Schilddrüsenpulvers.

Präparat	Trocknungs-Temperatur	Ent-fettung	Aussehen	Geruch
1. „Merck“	—	+ (?)	bräunlich, Stich ins Rötliche	schwach; ziemlich unangenehm nach Fett
2. Schaf	103–105°	+	bräunlich	schwach fleischbrüheartig
3. „	45–49°	+	bräunlichgrau	schwach fleischbrüheartig, nicht unangenehm
4. „	Vakuum	+	rosafleischfarbig	fleischbrüheartig
5. Schwein	37°	+	bräunlichgrau	wie 3
6. „	45°	—	rötlichbraun	wie 3
7. „	Vakuum	—	braun	wie 3
8. Rind	37°	+	graugelb	wie 3
9. „	45°	—	bräunlichgelb	wie 3

Die nicht entfetteten Pulver fallen durch ihre dunklere Farbe auf.

III. Mikroskopische Untersuchung: Bei der mikroskopischen Untersuchung von Schilddrüsenpräparaten handelt es sich nicht um einen Ersatz der biologischen oder chemischen Wertbestimmungen, sondern um einen vor allem den Identitäts- und Reinheitsnachweis unterstützenden Faktor.

Unseres Wissens ist das Schrifttum über diesen Gegenstand für tierische Organpulver noch recht spärlich. Das D. A. B. 6 läßt das Schilddrüsenpulver in Wasser und in Lauge (ein Teil Kalilauge 15 prozentig + zwei Teile Wasser) unter dem Mikroskop betrachten. Neumayer<sup>9)</sup> findet diese Methode ungenügend und fordert die Überführung des Materiales in einen dem ursprünglichen möglichst ähnlichen Zustand; erachtet auch die Anfertigung von Mikrotomschnitten und deren Färbung als notwendig und gibt dementsprechend ein Verfahren an, das sich eng an die übliche histologische Technik anschließt. Weil wir im Zusammenhang mit der von Neumayer vorgeschlagenen Methodik eine prinzipielle Frage zu entwickeln und zu lösen haben, möge seine Vorschrift kurz wiedergegeben werden. Neumayer läßt das Drüsenpulver während 12–24 Stunden in destilliertem Wasser quellen, gießt ab und ersetzt durch eine Mischung von zwei Teilen 80 prozentigem Alkohol

<sup>8)</sup> Ergebnisse d. Physiologie, 30, 215 (1930).

<sup>9)</sup> Arch. d. Pharmaz. 267, 27 (1929).

und ein Teil 40 prozentigem Formol (= Schaffer's Fixationslösung). Das so behandelte Pulver kommt dann der Reihe nach 24 Stunden in 96 prozentigen Alkohol, 24 Stunden in Alkohol-Äther  $\overline{aa}$ , 48 Stunden in dünnes Celloidin, dann in dickes Celloidin. Die daraus hergestellten Schnitte werden am besten mit Haematoxylin nach Weigert oder Haematoxylin nach Delafield (Kernfärbung) und Eosin oder Säurefuchsin mit Pikrinsäure nach van Gieson (Plasmafärbung) gefärbt.

Die Methode ist sehr umständlich. Ferner ist bei ihr die Gefahr vorhanden, daß durch das Aufschlemmen und Abgießen feine Pulverbestandteile sich der Untersuchung entziehen und das Verhältnis von Zusätzen oder zufälligen Verunreinigungen sich verschiebt.

Um für alle späteren Untersuchungen Vergleichsmaterial zu haben, versuchten wir zunächst nach Neumayer<sup>10)</sup> Präparate herzustellen mit folgenden drei Pulvern:

- A. Schafschilddrüse im Vakuum getrocknet.
- B. Schafschilddrüse von Merck D. A. B. 6.
- C. Schafschilddrüse bei 103–105° getrocknet.

Sie wurden in Wäggläschen mit destilliertem Wasser angerührt und in einigen ccm Wasser suspendiert. Diese Aufschwemmung zeigte noch deutlicher die im Abschnitt Sinnenprüfung angegebenen Farbenunterschiede. Die überstehende Flüssigkeit war bei A rötlichbraun, bei B und C gelbweiß und trübe. Durch Schütteln entstand bei A ein beständiger, bei C ein rasch zusammenfallender und bei B praktisch kein Schaum. C setzt sich am raschesten und kompaktesten ab. Die Schaffer'sche Fixationslösung erzeugte in A eine voluminöse, gelbweisse Fällung.

Dieses Verhalten von A zeigte uns sofort den Unterschied zwischen einem Organtrockenpulver und einem Organstück, wie es in der Histologie zur Fixierung gelangt. Wir können nicht ohne weiteres die dort übliche Technik übernehmen wie es Neumayer tut.

Aus A geht sehr viel Eiweiß in Lösung im Gegensatz zu B und C. Aus der Menge der Fällung muß angenommen werden, daß es sich vorwiegend um das „Kolloid“ handelt, was sich auch später mit Sicherheit feststellen ließ. Umgekehrt ergibt sich, daß dieses in B und C in unlöslicher Form vorliegt, also mit anderen Worten schon fixiert ist. Dies bezieht sich mit großer Wahrscheinlichkeit auch auf das Eiweiß der Epithelzellen.

Im wässerigen Auszug soll nach D. A. B. 6 durch Aufkochen mit Essigsäurezusatz ein flockiger, nach Nederl. V durch Kaliumferrozyanid-Essigsäure ein reichlicher Niederschlag auftreten.

Der wäßrige Auszug des Schilddrüsenpulvers „Merck“ nach D. A. B. 6, gibt bei der Kochprobe einen geringen flockigen Niederschlag und mit Kaliumferrocyanid-Essigsäure nur eine Trübung.

<sup>10)</sup> Arch. d. Pharmaz. 267, 27 (1929).

Eine Fixierung im eigentlichen Sinne des Wortes ist für solche Pulver wie B und C bei der von Neumayer vorgeschlagenen Arbeitsweise überflüssig und für A unzweckmässig\*).

Wir versuchten nun zuerst mit den fixierten Pulvern B und C eine einfache Untersuchungsmethode auszuarbeiten. Am nächsten liegt wohl der Gedanke, analog vorzugehen wie bei der Untersuchung pflanzlicher Drogenpulver, wie es auch das D. A. B. 6 tut. Man reibt das Pulver in einer geeigneten Flüssigkeit auf dem Objektträger an und deckt die Aufschwemmung mit dem Deckglas. Aber diese Art, tierische Gewebe zu untersuchen, ist bekanntlich sehr schwierig, im Gegensatz zu den pflanzlichen, besonders wenn sie von solchen anderer Organe tierischer Herkunft unterschieden werden sollen.

Eine Färbung der Gewebelemente erleichtert ihre Unterscheidung außerordentlich, wie das auch Neumayer hervorhebt. In den in der Folge angeführten Versuchen wurden fast ausschließlich die für die Färbung der Schilddrüsenschnitte empfohlenen Haematoxylinlösung nach Hansen und Pikrofuchsinlösung nach van Gieson verwendet\*\*).

Wollte man die vom D. A. B. 6 angegebene Art der mikroskopischen Untersuchung beibehalten, so müßte das Pulver vorher z. B. in einem Mikroglasfilter gefärbt und dementsprechend aber die Art und Konzentration der Farblösungen gewählt werden, um eine Überfärbung zu vermeiden.

\*) Eine Publikation von Stasiak<sup>1)</sup> macht es wahrscheinlich, daß in vielen Präparaten des Handels (Tabletten) das Eiweiß in unlöslicher, d. h. denaturierter Form vorliegt: Stasiak fand nämlich in wässrigen Auszügen Jod nur in Spuren; auch waren diese physiologisch unwirksam. Auch Harington und Randall<sup>2)</sup> nehmen an, daß das Eiweiß der Handelspräparate durch das Trocknen denaturiert worden sei.

<sup>1)</sup> Ber. ungar. Pharmaz. Ges. 4, 385 (1928); C. 1846, I (1929).

<sup>2)</sup> Quart. J. of Pharm. 2, 501 (1929).

\*\* ) Haematoxylinlösung nach Hansen :

a) 1 gr krist. Haematoxylin in 10 ccm absol. Alkohol gelöst; in geschlossener Flasche aufbewahrt.

b) 20 gr Kalialaun in 200 ccm destill. Wasser warm gelöst, nach dem Erkalten filtriert.

c) 1 gr Kaliumpermanganat wird in 16 ccm destill. Wasser bei Zimmer-temperatur gelöst.

Am nächsten Tag werden die Lösungen a) und b) in eine Porzellanschale zusammengegossen, mit 3 ccm der Lösung c) vermischt und unter ständigem Umrühren bis zum Sieden erhitzt (man lasse ca. 1 Minute lang sieden). Dann kühle man die Porzellanschale rasch ab, indem man die Porzellanschale auf kaltem Wasser schwimmen läßt, und filtriert.

Haemalaunlösung nach Mayer: 1 gr Haematein in 50 ccm Alkohol (95%) unter Erwärmen gelöst und in eine Alaunlösung eingetragen, welche 50 gr im Liter enthält.

Pikrofuchsin nach van Gieson: 10 ccm einer Lösung, welche 1 gr Säurefuchsin in 100 ccm Wasser enthält, werden mit 100 ccm gesättigter, wässriger Pikrinsäurelösung vermischt.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß man zwei bis drei Tropfen der Aufschwemmung des Materials auf einem Objektträger ausstreicht und eintrocknen läßt, also genau wie in der Bakteriologie, ein Ausstrichpräparat herstellt. Bei den besagten fixierten Pulvern (B. C.), sowie einer Reihe weiterer Organpulver (Thymus, Milz etc.), kann man ohne weiteres so verfahren. Das Pulver haftet genügend auch bei C, wo dies nicht a priori zu erwarten war. Vorteilhaft wird das Pulver mit Wasser zu einem Brei angerührt, dieser einige Zeit, z. B. eine Stunde, stehen gelassen und etwas davon in zwei Tropfen Wasser auf einem Objektträger ausgestrichen. Nachdem der Ausstrich an der Luft gut eingetrocknet ist, gibt man einige Tropfen Haematoxylin nach Hansen bzw. Haemalaun nach Mayer darauf und läßt während 5—10 Minuten bzw. 20—30 Minuten einwirken. Nun spült man die Farblösung durch vorsichtiges Schwenken in einem Glas Leitungswasser ab. Letzteres ist ein- bis zweimal zu erneuern. Bei Verwendung von Haemalaun läßt man den gefärbten Ausstrich noch etwa fünf Minuten im Wasser, wodurch die Farbtiefe zunimmt. Alsdann werden die unbestrichenen Stellen des Objektträgers mit einem Lappen oder mit Fließpapier getrocknet und der Ausstrich in gleicher Weise mit Pikrofuchsin nachgefärbt und zwar nur 10 Sekunden lang. Statt mit Wasser soll jetzt die Farblösung mit 96 prozentigem Alkohol behutsam abgeschwemmt und nach kurzer Einwirkungszeit und Abgießen desselben sofort ca. drei Tropfen konzentriertes Glycerin und das Deckglas darauf gegeben werden. Statt in Glycerin kann die Betrachtung nach weiterem Entwässern mit absolutem Alkohol auch in Ricinus- oder Cedern-Öl erfolgen. Helle Dauerpräparate erzielt man durch Behandlung mit Karbolxylo (1 Teil kristallisiertes Phenol + drei Teile Xylo), Xylo und Kanadabalsam.

Wir versuchten mannigfaltige Modifikationen um bessere Präparate zu erzielen, besonders um eine Quellung des Epithels, nicht aber des Kolloids zu erreichen, die dem natürlichen Zustand möglichst nahe kommt, so z. B. durch Einlegen des lufttrockenen Ausstriches in warmes Wasser oder in Lauge und Auswaschen derselben.

Als Ergebnis sei erwähnt, daß Wasser nur eine geringe quellende Wirkung hat, ebenfalls 0,01 n-Lauge. Stärkere Laugen wirken bedeutend besser, beeinflussen aber die Färbbarkeit des Kolloids sowie der Zellen nachteilig, indem bei der Färbung mit Haematoxylin und Nachfärbung mit Pikrofuchsin eine intensive rote Überfärbung eintritt und Zellkerne oft kaum oder gar nicht sichtbar sind. Es lohnt sich also nicht, weil einerseits der Effekt gering ist oder andererseits die Färbbarkeit ungünstig beeinflusst wird.

Bei der mikroskopischen Betrachtung eines auf die beschriebene Art hergestellten Präparates kann man folgende Elemente un-

terscheiden, welche wir im Zusammenhang mit einer kurzen histologischen Beschreibung der Drüse wiedergeben wollen:

Die Hauptmasse der Drüse wird aus den sogenannten Follikeln gebildet. Es sind dies kugelige oder eiförmige, seltener schlauchförmige oder ausgebuchtete Bläschen, zwischen welchen zartes, fettfreies, nerven- und gefäßhaltiges Zwischengewebe liegt. Die Bläschen sind mit nur einer Schicht von kubischen oder zylindrischen Zellen ausgekleidet. Im Pulver färben sich besonders die Kerne sehr deutlich blau, graublau bis schwarz, während die Membranen im allgemeinen nicht gut oder gar nicht sichtbar sind. Dieses Follikel-epithel erscheint bei der direkten Färbung braunrot, wodurch auch die Farbe der größeren Partikel gegeben ist. Der Inhalt der Follikeln, das sogenannte Kolloid, zeigt sich als eine homogene gelbe Masse. Als besonders charakteristisch können scharfkantige Bruchstücke des Kolloids mit anhaftenden Zellen oder mehr oder weniger ausgedehnten Flächen des einschichtigen Epithels betrachtet werden.

Die bindegewebige Kapsel, welche die Schilddrüse umgibt und welche bei sorgfältiger Aufarbeitung größtenteils entfernt wird, entsendet in das Innere des Organs Scheidewände, die besonders beim Rind reichlich vorhanden sind. Diese finden sich im Pulver als schön rosarot gefärbte, oft größere Faserkomplexe.

Das D. A. B. 6 stellt an den Anfang des Artikels *Glandulae Thyreoideae* als Definition des Präparates: „Die zerkleinerte, bei gelinder Wärme getrocknete und gepulverte Schilddrüse von Rindern und Schafen“. Diese Art des Trocknens ist zweifelsohne vorgeschrieben, um einer weitgehenden Veränderung der Drüsensubstanz vorzubeugen, d. h. also, je tiefer die Temperatur, bei welcher die Trocknung vorgenommen wird, desto besser. Besonders empfehlenswert wäre demnach das Trocknen im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur. Der Kommentar des D. A. B. 6 (Bd. 1, S. 736) empfiehlt 50° nicht zu überschreiten und wenn möglich das Trocknen im Vakuum vorzunehmen.

Bei unseren ersten Versuchen zeigte sich ein gänzlich anderes Verhalten der, bei tiefer Temperatur getrockneten Produkte, zufolge der Löslichkeit der darin enthaltenen Eiweißkörper.

Das mikroskopische Bild eines solchen, nach dem oben beschriebenen Verfahren gefärbten Pulvers, verrät, daß sich das Kolloid im Wasser löst. Man findet Zellen, einschichtige Zellverbände und oft eine diffuse Gelbfärbung am gleichen Orte wie die letzteren. Es ist leicht einzusehen, daß hier niemals eine Behandlung mit Wasser zwecks Quellung der eigentlichen Fixierung vorausgehen darf (vgl. Neumayer<sup>11)</sup>), und daß die Methode des D. A. B. 6 besonders bei Verwendung von Lauge hier völlig versagen muß. Die mikroskopische Prüfungsvorschrift steht also im Widerspruch mit

<sup>11)</sup> Arch. d. Pharmaz. 267, 27 (1929).

dem im gleichen Artikel aufgestellten Postulat, die Schilddrüsen bei gelinder Wärme zu trocknen. Das gleiche Verhalten wie Präparat A (im Vakuum getrocknet), zeigen nämlich auch die bei etwa 40—50° getrockneten drei Präparate von Schaf, Schwein und Rind.

Umgekehrt könnte sehr wohl die Unlöslichkeit des Kolloids in Wasser als Grundlage für den mikroskopischen Nachweis höher erhitzter Drüsen dienen. Dieses Verfahren scheint uns vorteilhafter als das Vorgehen des D. A. B. 6, welches zu hohe Trocknungstemperatur nachzuweisen sucht durch Kochen des filtrierten, kalt bereiteten, wäßrigen Auszuges, wobei nach Essigsäurezusatz Eiweiß ausfallen soll. Diese Probe ist bei negativem Ausfall wohl eindeutig. Beim positiven Ausfall läßt sie, sofern sie nicht annähernd quantitativ gestaltet wird, die Möglichkeit offen, daß nur ein kleiner Teil des Drüsenpulvers bei niederer Temperatur hergestellt wurde. Hierbei lassen wir aber die Frage, ob und nach welcher Zeit das Kolloid beim Aufbewahren wasserunlöslich wird, vorläufig noch offen.

Ohne Fixierung ist eine sichere mikroskopische Beurteilung unmöglich. Es wurden folgende Fixierungsmethoden von uns ausprobiert.

6stündiges Verweilen des Pulvers in absolutem Alkohol bei Zimmertemperatur hat keine Wirkung. Eisessig fixiert ebenfalls zu langsam. 70prozentigen Alkohol oder Aceton von derselben Konzentration wirken sehr gut, rufen aber die noch bei anderen Agenzien leicht eintretende rote Überfärbung hervor, welche beispielsweise ebenfalls nach Behandlung mit 5prozentiger Alaunlösung eintritt. Auf einfache Art, z. B. durch gründliches Auswaschen des fixierten Ausstriches mit Wasser ist es uns nicht gelungen, diese schlechte Differenzierung auszuschalten. Geringere Alkoholkonzentrationen fixieren nicht mehr genügend schnell, höhere verhalten sich ähnlich wie 70prozentiger Weingeist. Die Schaffer'sche Fixationslösung liefert in dieser Hinsicht etwas bessere Resultate, dafür konnten wir wiederholt schlechte Kernfärbung oder völliges Ausbleiben derselben beobachten, was Neumayer<sup>12)</sup> ebenfalls hervorhebt: „Bei dieser (Färbung!) zeigte sich, daß gewisse Unterschiede zwischen den mikroskopischen Bildern von frischen und getrockneten tierischen Organen bestehen, besonders was die Färbbarkeit der Zellkerne in den Schnitten von Trockenpräparaten betrifft. Während die Plasmafärbung mit Eosin oder mit Säurefuchsin und Pikrinsäure nach van Gieson befriedigende Resultate ergab, ließ die Kernfärbung mit Eisenhaematoxylin nach Weigert viel zu wünschen übrig, da die Zellkerne nur eine schwache oder gar keine Färbung annahmen“. Erwärmen des Pulvers auf dem Wasserbad mit den genannten Flüssigkeiten zeitigt keine wesentliche Verbesserung mit Ausnahme des absoluten Al-

<sup>12)</sup> Arch. d. Pharmaz. 267, 27 (1929).

kohols. Dampft man in einem Schälchen eine Suspension des Pulvers in reichlich absolutem Alkohol auf dem Wasserbade zur Trockne ein, rührt mit Wasser zu einem Brei an und stellt damit einen Ausstrich her, so sieht man, daß die Kolloidfragmente und Zellen wohl sehr stark gequollen, erstere aber nicht aufgelöst sind. Ähnlich wirkt reines Aceton. Wie schön auch das Charakteristische in diesen Bildern, zum Ausdruck kommt, so wäre es doch eine Selbsttäuschung, Produkte unbekannter Herkunft und Zusammensetzung mit dieser Methodik untersuchen zu wollen, denn wir haben eine zu große quantitative Verschiebung zugunsten des Kolloids. Es kann nicht unsere Absicht sein (im Gegensatz zu Neumayer) einen möglichst natürlichen Quellungsgrad zu erreichen. (Ein 50 prozentiger Zusatz von nichtquellenden Fremdkörpern würde auf ca. 20 Prozent heruntergedrückt oder eine absichtliche geringere Fälschung auf eine zufällige Beimengung, besonders wenn es sich um sehr fein gemahlene, schwer feststellbare Organpulver handelt).

Nach 4 stündigem Erhitzen des trockenen Pulvers auf 105—120° war keine nennenswerte Änderung im Sinne einer Fixierung eingetreten.

Besser bewährte sich die Fixierung mit Sublimat oder Sublimat-Pikrinsäure, mit nachträglicher Behandlung mit Jod-Alkohol. Letzterer soll die in den Geweben entstandenen Sublimatniederschläge herauslösen<sup>13)</sup>. Bei seinem Weglassen konnten wir Sublimatniederschläge nicht wahrnehmen, wohl aber blieb die Kernfärbung aus.

Auch diese Reagenzien lassen die Gesamtfärbung nicht unbeeinflusst. Sie wird jedoch eher verbessert, weil das Gewebe und die größeren Partikel mehr gegen Braun gehen, das interstitielle Gewebe aber rosarot gefärbt bleibt.

Bei allen Versuchen wurde ein besonderes Augenmerk auf die Festigkeit gerichtet mit der das Pulver am Objektträger haftet. Bei der Verwendung von Sublimat bzw. Sublimat-Pikrinsäure, kann dies durch die Art, wie man das Pulver anrührt, befriedigend erreicht werden. Befeuchtet man nämlich das Pulver zuerst mit der Fixierungsflüssigkeit, so erhält man einen stark klebenden Brei, der in zwei weiteren auf dem Objektträger befindlichen Tropfen ausgestrichen, ein sehr gut haftendes Präparat liefert. In diesem einen Extremfall sind die kleinen Bestandteile (Kolloidbruchstücke) zusammen geflossen, wodurch das Präparat stark an Qualität einbüßt. Der andere Extremfall, keine Verklebung, also momentane Fixierung aber auch kein Haften, ergibt sich, wenn von Anfang an mit einem Überschuß des Fixierungsmittels angerührt wird. Es ist Übungssache die Flüssigkeitsmenge so zu treffen, daß ein

---

<sup>13)</sup> Ellenberger-Trautmann: Histologie der Haussäugetiere, Parey, Berlin (1921), S. 348.

brauchbarer Ausstrich resultiert, was in einer Vorschrift schwerlich wiederzugeben wäre und daher irgendwie umgangen werden muß. Eine 0,25 prozentige filtrierte Lösung von Agar-Agar eignet sich sehr gut, da Agar-Agar weder gefällt noch gefärbt wird, im Gegensatz zu Eiweißkörpern, z. B. Gelatine. Die Konzentration ist so gewählt, daß die Lösung nach gutem Durchschütteln gerade noch tropfbar bleibt. Durch Zusatz von etwas Phenol oder gesättigter Sublimatlösung wird sie sehr lange haltbar.

Zusammenfassend kann folgende Arbeitsweise für die mikroskopische Untersuchung empfohlen werden: Eine Messerspitze voll des zu untersuchenden Pulvers wird mit soviel Sublimat-Pikrinsäure\*) versetzt, daß beim Anrühren eine dünne Suspension entsteht. Mit Hilfe eines Glasstäbchens bringt man etwas davon in ein bis zwei auf dem Objektträger befindliche Tropfen von 0,25 prozentiger Agar-Lösung, verstreicht gleichmäßig und läßt gut trocknen. Nun bedeckt man den Ausstrich mit Jod-Alkohol\*\*), den man innert ca. 10 Minuten zwei- bis dreimal erneuert, reinigt mit 70 oder 90 prozentigem Alkohol und läßt auch diesen einige Minuten darauf verweilen. Dann wird der Objektträger in Wasser geschwenkt, an den unbestrichenen Stellen abgetrocknet und mit Haemalaun nach Mayer und Pikrofuchsin nach van Gieson nach Seite 113 gefärbt.

Wir geben der Haemalaunlösung den Vorzug, weil eine Überfärbung weniger leicht eintritt und weil sie ex tempore hergestellt werden kann und nicht erst durch mehrtägiges bis wochenlanges Stehenlassen an der Luft, wie die Ehrlich'sche, die Delafield'sche und die Heidenhain'sche Haematoxylin-Lösung brauchbar wird. In dieser Beziehung ist auch die Haematoxylin-Lösung nach Hansen besser, bei der, durch Oxydation mit Permanganat, innert kurzer Zeit eine hohe Färbekraft erzielt wird.

Was nun die Forderungen anbelangt, die man an ein Schilddrüsenpulver stellen kann, so drängt sich in erster Linie die Frage nach der Trocknungstemperatur auf. Wie später noch ausgeführt werden soll, halten wir es für vorsichtiger, die Schilddrüsen bei niedriger Temperatur zu trocknen (siehe S. 124). Als Nachteil der niedrigen Trocknungstemperatur ist allerdings zu vermerken, daß bei unsorgfältig durchgeführter Trocknung sehr leicht bakterielle Zersetzungen eintreten können.

Geringe Mengen von Bindegewebe, Gefäßen u. s. w. (das interfollikuläre Gewebe) begleiten normalerweise das Schilddrüsenpulver. Der Gehalt an solchem schwankt jedoch nach der Tierart. Rinderdrüsen enthalten auch bei sorgfältigster Präparation beträchtlich mehr, wie uns folgende Zahlen ungefähr demonstrieren.

\*) 1 Teil gesättigte Sublimatlösung + 1 Teil gesättigte Pikrinsäurelösung.

\*\*) 70 Proz. Alkohol mit Jodtinktur bis zur Cognac-Farbe versetzt.

Bei der manuellen Zerkleinerung des getrockneten Gutes im Mörser widersteht ein Teil desselben hartnäckig \*). Wir erhielten bei wiederholtem Zerreiben und Sieben durch Sieb IV Ph. H. IV (15 Maschen pro cm) folgende Rückstände:

	abgesiebt	Rückstand
Schafschildrüsen	23,1 gr.	0,4 gr.
Schweineschildrüsen	26,0 „	0,5 „
Rinderschildrüsen	19,5 „	4,3 „

Der Rückstand besteht vorwiegend aus dem interfollikulären Gewebe, was man leicht durch Herstellung eines Zupfpräparates und Färben desselben mikroskopisch feststellen kann. Selbstverständlich enthält die abgesiebte Fraktion bei den Rinderschildrüsen auch noch mehr interfollikuläres Gewebe als bei den anderen Drüsenpulvern, was bei der mikroskopischen Untersuchung auffällt.

Unter dem Gesichtspunkte der mikroskopischen Prüfung und Beurteilung der Schilddrüsenpulver auf Reinheit und sorgfältige Präparation ergeben sich für Arzneibuchzwecke folgende Möglichkeiten:

Wenn das Pulver viel rotgefärbte Faserbestandteile erkennen läßt, so kann es sich handeln entweder um ein Rinderdrüsen (interfollikuläres Gewebe) enthaltendes Pulver oder um ein unsorgfältig präpariertes Schweine- oder Schaf-Drüsenpulver (interfollikuläres und periglanduläres Gewebe).

Will man letzteres vermeiden, so müßte gefordert werden, daß eine Beimengung von Rinderdrüsenpulver zum Schweine- und Schafdrüsenpulver nicht statthaft sei, sondern daß ersteres Pulver unvermischt und deklariert auf den Markt gebracht würde.

Sofern die Arzneibücher dazu übergehen sollten, entsprechend dem Vorschlage von H a r i n g t o n (siehe S. 133) ein, wenn nötig durch Verdünnen mit Milchzucker, auf einen bestimmten Thyroxin-gehalt eingestelltes Schilddrüsenpulver vorzuschreiben, so müßte natürlich die Forderung des D. A. B. 6, daß nach Behandlung mit Jodbenzin im Paraffinölpräparat keine farblosen Bestandteile nachweisbar sein dürfen, fallen gelassen werden.

Bei der mikroskopischen Untersuchung eines Schilddrüsenpulvers im gefärbten Präparat dürfen grobfaserige, quergestreifte Muskelzellen (meist als lange, zylindrische, an den Enden gewöhnlich abgebrochene, schmutzig braunviolett gefärbte Gebilde), traubenähnliche, tiefblaue bis violette Zellagglomerate (Thymus), blaue bis violette Zellagglomerate begleitet von Bündeln von glatten Muskelfasern (Milz) \*\*) oder größere Mengen von rosarotem bis

\*) Wie sehr solche Faserbestandteile einer Zerkleinerung hindernd im Wege stehen, zeigt sich z. B. bei der Verarbeitung des Pankreas: H. 125, 132 (1923) u. zwar S. 150.

\*\*) Die angeführten Gewebelemente sind für die betreffenden Beimengungen in Pulverform besonders auffällig. Ihr Vorkommen beweist nicht-vorschriftsgemäße Beschaffenheit des Schilddrüsenpulvers. Kommen aber noch weitere Bestandteile fremder Organe vor, so kann nur eine sorgfältige Analyse unter Einbeziehung weiterer Kriterien als die erwähnten (z. B. die H a s s a l'schen Körperchen bei Thymus) und unter eventueller Benützung von pulverförmigen Vergleichspräparaten Aufschluß geben über die Art der Beimengung.

In den angeführten Forderungen wurden Milz und Thymus nicht nur wegen

rotem interfollikulärem bzw. periglandulärem Gewebe oder andere fremde Bestandteile nicht nachweisbar sein.

IV. Chemische Untersuchung: 1. Geschichtlicher Überblick: Um die Richtlinien, nach welchem das Schilddrüsenpulver untersucht werden kann, zu gewinnen, ferner um gewisse Einschränkungen zu verstehen, ist es notwendig, die Geschichte ihrer chemischen Untersuchung und die erhaltenen Resultate kurz ins Auge zu fassen.

In der Mitte des 19. Jahrhunderts machte der Physiologe Schiff auf die Folgen der Thyreoidektomie beim Tier aufmerksam. Seine Versuche blieben aber lange Zeit unbeachtet. Dem Italiener Vassale gelang es 1891 durch Eingabe von Schilddrüsenpreßsaft, die bei Schilddrüsenexstirpationen eingetretenen Ausfallserscheinungen zu beheben. Mit diesem Zeitpunkt begann das Suchen nach den wirksamen Bestandteilen, von denen hauptsächlich die beiden von Notkin 1895 dargestellten Stoffe zu erwähnen sind, das Thyreoprotein, ein giftiges Stoffwechselprodukt und das Thyreoidin. Kocher und Töpfer vermuteten auf Grund der guten Erfolge, die bei der Eingabe von jodhaltigen Naturprodukten (z. B. gebrannten Schwämmen) beobachtet wurden, daß Jod ein wichtiger Bestandteil der Schilddrüse sein müsse.

Aber erst E. Baumann, 1895, gelang es, dasselbe einwandfrei nachzuweisen und er erkannte auch zusammen mit Ross dessen Bedeutung für die Wirksamkeit. Durch 20—30 stündiges Kochen mit 10 prozentiger Schwefelsäure und nachheriger Extraktion mit Alkohol, erhielt er einen jodhaltigen Stoff, der unter den Namen Thyrojodin, Thyraden, später Jodothyrin bekannt wurde.

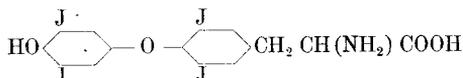
In der Folgezeit entspann sich ein lebhafter Kampf über die physiologische Bedeutung der einzelnen Produkte, die aus der Schilddrüse gewonnen wurden. In chemischer Hinsicht suchte man einen oder mehrere wirksame Bestandteile in reiner Form zu isolieren. Blum, 1898, betrachtet das Jodothyrin, das übrigens in seinem Jodgehalt erhebliche Schwankungen aufwies, als Spaltprodukt einer Albuminverbindung, des Thyrogens C, welches er durch Erhitzen eines wäßrigen Auszuges der Drüse erhielt. Das Coagulum soll alles Jod an Eiweiß gebunden enthalten. Hutchinson, 1896, erhielt zwei jodhaltige Eiweißkörper, von denen der eine, das Thyreokolloid, gegen den Magensaft weniger resistent, wohl aber ziemlich wirksam gewesen sein soll. Oswald<sup>14)</sup> isolierte ein Thyreoglobulin mit 1,5—1,75% Jod und einen jodfreien Körper, das Thyreonucleoprotein. Bei allen diesen und noch vielen anderen Körpern

---

der zum Teil ähnlichen Beschaffenheit ihrer Pulver, sondern auch in Anbetracht der Wohlfelheit des Rohmaterials bzw. der Bedeutung als benachbartes Organ der Schilddrüse besonders berücksichtigt.

<sup>14)</sup> H. 27, 14 (1899); 32, 121 (1901).

wurden Reingungsversuche zwecks Konstitutionsaufklärung vorgenommen, jedoch erfolglos. Kendall<sup>15)</sup> erst gelang es, im Jahre 1919 aus 3000 kg frischer Drüsen durch alkalische Hydrolyse 33 gr einer in Wasser und neutralen Lösungsmitteln unlöslichen, kristallinen Substanz, das Thyroxin zu isolieren. Er hielt es für eine 4, 5, 6-Trihydro-4, 5, 6-trijodoxy-n-indolpropionsäure. Später konnte H a r i n g t o n<sup>16)</sup> nicht nur die Gewinnungsmethode des Thyroxins bedeutend verbessern, sondern auch die Konstitution richtig stellen. Er spricht es als Tetrajod-p-oxyphenyläther des Tyrosins



an. Die Synthese mit B a r g e r<sup>17)</sup> zusammen, erhärtete diese Formel\*).

2. Die Bedeutung des Gesamtjodgehaltes: Bei der Bearbeitung der Arzneibücher, welche im Artikel „Schilddrüsen“ den Jodgehalt bestimmen lassen, wurde sicherlich auch die Frage nach dem Zusammenhang zwischen diesem und der Wirksamkeit erwogen. Das Wichtigste bei der Ausarbeitung einer Prüfungsvorschrift ist natürlich der Beweis, daß die durch eine solche Vorschrift festgelegten Forderungen überhaupt einen Sinn haben. Wir betrachteten es als unsere Aufgabe, den ganzen Fragenkomplex eingehend zu studieren und versuchen, durch folgenden Überblick ein Bild von den diesbezüglichen bekannten Tatsachen, Widersprüchen, Unsicherheiten und den daraus sich ergebenden Folgerungen zu entwerfen. Das Problem geht besonders durch die Arbeiten H a r i n g t o n s zusehends einer Klärung entgegen, ohne daß es zur Zeit als abgeschlossen gelten kann, denn die Bestätigungen stehen noch aus.

Der Entdeckung und Isolierung von Jodverbindungen aus der Schilddrüse wurde große Aufmerksamkeit geschenkt, weil viele der auf diese oder jene Weise aus den Drüsen hergestellten, jodhaltigen Produkte, z. B. das B a u m a n n ' s c h e Jodothyrin, eine erhebliche Wirksamkeit aufwiesen. Auffallend jedoch war, daß diese Produkte jeweils nur einen verhältnismäßig geringen Bruchteil (bis zu ca. 16%) des Gesamtjodes enthielten, eine Tatsache, die auch nach der Isolierung des Thyroxins bestehen blieb. Daraus ergab sich die Möglichkeit der Existenz weiterer wirksamer Jodkörper.

<sup>15)</sup> J. of Biol. Chem. **39**, 125; **40**, 265 (1919); **43**, 148 (1920); **59**, 39 (1924); **63**, 11 (1925); **72**, 213 (1927); **80**, 357 (1928).

<sup>16)</sup> Bio. J. **20**, 293 (1926).

<sup>17)</sup> Bio. J. **21**, 169, 181 (1927).

\*) Einzelheiten u. Lit. in Merck's wissenschaftl. Abhandl. No. 3, S. 78. Oppenheimer: Hdb. d. Biochemie, Bd. 9, S. 234 ff. Laquer: Hormone u. innere Sekretion, Steinkopff (1928), S. 34. Scharer: Chem. u. Bioch. des Jods, Enke (1928). Orthner: Chemisch-katalytische Vorgänge... Enke (1928), S. 51.

Orthner<sup>18)</sup> erklärt als sicher, daß sich der Wirkungsgrad der Schilddrüse ganz nach deren Jodgehalt richte. Auch Reid Hunt<sup>19)</sup> legt seine Versuche in diesem Sinne aus. Reid Hunt<sup>20)</sup> betont nicht nur den Parallelismus, sondern unterscheidet auch zwischen aktivem und inaktivem Jod. Das inaktive gelangt durch Jodkali- oder Jodoform-Verfütterung in die Drüse und erhöht im Tierversuch die Resistenz gegen Acetonitril nicht, im Gegensatz zum aktiven Jod. Nach den Arbeiten dieses Autors zusammen mit Seidell<sup>21)</sup> soll die aktive Form 1000 mal wirksamer sein als Jod in Kaliumjodid.

Nach Oswald<sup>22)</sup>, Kocher<sup>23)</sup>, Aeschbacher und Branovacký<sup>24)</sup> und anderen Autoren besteht fast immer Parallelismus zwischen Jodgehalt und Kolloidgehalt. Ferner haben wir genügend Tatsachenmaterial, das für einen Zusammenhang zwischen Kolloidmengen, Funktion der betreffenden Drüse und Wirksamkeit der Drüsensubstanz spricht.

De Quervain<sup>25)</sup> schreibt diesbezüglich: „Der durchschnittliche prozentuale Jodgehalt kolloidreicher Kretinenstrumen ist nach den Untersuchungen von Branovacký 4 mal geringer als derjenige von Kolloidkröpfen von Euthyreoten und 6 mal geringer als derjenige von mäßig kolloidhaltigen Basedowkröpfen. Parallel zu den klinischen Abstufungen geht die Abstufung der biologischen Aktivität, sowohl der Kropfsubstanz als des Schilddrüsen- und Armvenen-Blutes.“

De Quervain, l. c., erachtet nicht nur die Quantität, sondern auch die Qualität des Kolloids für dessen Wirksamkeit als maßgebend. An obige Äußerung schließt er noch eine wichtige Einschränkung an:

„Der Jodgehalt der Drüse geht dabei nur zum Teil parallel mit dem Aktivitätsgrad derselben. Das Studium der Einzelfälle zeigt in der Tat eine Anzahl von Abweichungen, die zum Teil darauf beruhen, daß unsere Schätzung der Kolloidmenge eine etwas summarische ist, zum Teil aber hauptsächlich darauf, daß das Jod nicht der einzige, ja nicht einmal der hauptsächlichste Faktor für die Einschätzung der Drüsenfunktion ist,“... auch jodarme Basedow-Schilddrüsen (es gibt solche) wirken im Rattenversuch intensiv.“

Dieser Beobachtung stimmt Roméis<sup>26)</sup> bei, indem er schreibt, daß er aus frischer Schilddrüse auch eine hie und da jodfreie, nicht vom Indol abzuleitende Substanz gewonnen habe, die im Kaulquappenversuch sehr stark wirksam war.

<sup>18)</sup> Chem. katal. Vorgänge... Enke (1928), S. 53.

<sup>19)</sup> J. of American Med. Assoc. 57, 1032 (1911).

<sup>20)</sup> Amer. J. of Physiol. 63, 257 (1923); zit. nach Hdb. d. Bioch., Bd. 9, S. 233.

<sup>21)</sup> Klin. therap. Wo. 363 (1910); zit. nach Merck's wissenschaft. Abhandl. No. 3, S. 80.

<sup>22)</sup> Hab. schrift, Straßburg (1900); zit. nach Hdb. d. Bioch., Bd. 9, S. 230.

<sup>23)</sup> Mitt. Grenzgeb. 19, 359; zit. nach Hdb. d. Bioch., Bd. 9, S. 243.

<sup>24)</sup> Zit. nach Bürgi in Hdb. d. exp. Pharmakol., Bd. 3, 1. Teil, S. 328.

<sup>25)</sup> Ergeb. d. Physiol. 24, 701 (1925).

<sup>26)</sup> Z. f. d. ges. exp. Med. 4, 379; 5, 99; 6, 101; Pflüg. Arch. 173, 422; Arch. f. Entw. Mech. d. Organism. 50, 410; zit. nach Bürgi in Heffter-Heubner, Hdb. d. exp. Pharmakol., Bd. 3, 1. Teil, S. 334.

Demgegenüber wird von sehr vielen Forschern hervorgehoben, daß jodfreie Stoffe, seien sie aus der Schilddrüse oder nicht, ferner jodfreie ganze Schilddrüsen äußerst wenig oder gar nicht wirksam sind (Kreitmair<sup>27)</sup> u. a.). Eine Angabe von Abelin und Ascher<sup>28)</sup> gleichlautend mit der von Romeis<sup>29)</sup> wurde von Mark<sup>30)</sup> widerlegt. Im eiweiß-, lipid- und fast jodfreien wäßrigen Auszug wies Ascher<sup>31)</sup> Stoffe nach, welche an thyreoidektomierten Hunden eine Steigerung des Stoffwechsels herbeiführten. Herzfeld und Klinger<sup>32)</sup> gingen sogar so weit, daß sie das Jod für einen unwesentlichen Bestandteil hielten.

In neuerer Zeit fehlte es auch nicht an Versuchen, die Parallelität zwischen Jodgehalt und Wirksamkeit an Handelspräparaten zu verfolgen. Die Resultate der Untersuchungen von Fukui<sup>33)</sup>, Rainer<sup>34)</sup>, Lenk und Liebesny<sup>35)</sup>, Solé<sup>36)</sup>, Kreitmair<sup>37)</sup>, Morch<sup>38)</sup>, Harrington und Randall<sup>39)</sup> stimmen ziemlich überein und kurz zusammengefaßt, zeigte es sich, daß Jod für die Wirkung unbedingt notwendig ist, eine Parallelität aber nicht besteht. Oft sind Präparate mit geringerem Jodgehalt sehr viel stärker wirksam als solche mit höherem Jodgehalt. Guggenheim<sup>40)</sup> beurteilt die Jodfrage folgendermaßen:

„Wenn schon manche Fragen, die mit dem spezifischen Hormon der Thyreoidea zusammenhängen, noch der Lösung harren, so geht doch aus der Gesamtheit der biochemischen, physiologischen und therapeutischen Versuche mit Sicherheit hervor, daß das Jod bei der Funktion und der Sekretion der Schilddrüse eine fundamentale Rolle spielt, nicht bloß als Bestandteil des spezifischen Sekretionsproduktes, sondern auch als dynamischer Faktor für die mannigfaltigen Leistungen, welche diesem obliegen.“

Es steht somit fest, daß bei der Beurteilung der Schilddrüsenpräparate eine Bestimmung des Gesamtjodgehaltes nur den Wert hat, einen Mindestjodgehalt zu garantieren, da nach den angeführten Arbeiten sehr jodarme Drüsen unwirksam sind. Kreitmair, l. c., gibt an, daß, wenn der Jodgehalt die Minimalgrenze von 0,05% übersteigt, dieser für die Wirkung nicht mehr maßgebend sei. Es ist demnach unnütz, ein Präparat auf einen bestimmten

<sup>27)</sup> Z. f. ges. exp. Med. 61, 202 (1928).

<sup>28)</sup> Bio. Z. 80, 259 (1917).

<sup>29)</sup> Zit. nach Bürgi in Heffter-Heubner, Hdb. d. exp. Pharm., Bd. 3, 1. Teil, S. 334 ff.

<sup>30)</sup> Pflüg. Arch. 209, 437 (1925); 211, 523 (1926).

<sup>31)</sup> Bio. Z. 145, 154 (1924); zit. nach Guggenheim in Hdb. d. innern Sekretion, Bd. 2, S. 36 ff.

<sup>32)</sup> Münch. med. Wo. 647 (1918).

<sup>33)</sup> Arch. d. Physiol. 210, 420 (1925).

<sup>34)</sup> Klin. Wo. 5. Jahrg. 2306.

<sup>35)</sup> Wiener Klin. Wo. 782 (1926).

<sup>36)</sup> Z. f. exp. Med. 59, 45 (1928).

<sup>37)</sup> Z. f. exp. Med. 61, 202 (1928).

<sup>38)</sup> Dansk. Tidsskrift for Farmaz. 281 (1928); nach Z. anal. Chem. 81, 317 (1930).

<sup>39)</sup> Quart. J. of Pharm. 2, 501 (1929).

<sup>40)</sup> In Hdb. d. inn. Sekretion, Bd. 2, S. 36 ff.

Jodgehalt einzustellen, wie es beispielsweise die Nederl. V und die U. S. A. X tun.

Der Jodgehalt wurde gelegentlich auch zur Beurteilung der Sorgfalt, mit welcher die Drüsen von den umliegenden Geweben befreit wurden, herangezogen. So macht z. B. Van den Berg<sup>41)</sup> in diesem Sinne darauf aufmerksam, daß selbsthergestellte Drüsenpräparate bedeutend höhere Jodgehalte aufwiesen als Handelspräparate. Diesbezügliche Schlüsse können oft zutreffend sein, dürfen aber keinesfalls als sicher angenommen werden, wenn man bedenkt daß Herkunft, Fütterung, Jahreszeit u. s. w. von großem Einfluß auf den Jodgehalt sind (vgl. den Jodgehalt unserer Präparate Seite 132).

3. Die Bedeutung des Thyroxingehaltes: Das Thyroxin ist das weitaus aktivste Prinzip, das bis heute aus den Schilddrüsen isoliert werden konnte (Plummer<sup>42)</sup>, Löhr und Freydank<sup>43)</sup>, Abderhalden und Wertheimer<sup>44)</sup>). Viele Forscher setzen seine Wirkung im großen und ganzen qualitativ der Drüse gleich<sup>45)</sup>. Es weist aber eine Anzahl von Eigentümlichkeiten auf, die bis heute nicht restlos aufgeklärt sind.

Per os eingenommen wirkt es, auf gleichen Jodgehalt bezogen, nach vielen Autoren überhaupt nicht oder bedeutend weniger als das Schilddrüsenpulver. Parenteral soll es rasch und sicher wirken.

Kreitmair<sup>46)</sup> mißt die Abnahme des Körpergewichtes von gleichgehaltenen Meerschweinchen und gibt die Wirksamkeit der Präparate in Meerschweinchen-Einheiten an. Seine Versuche ergaben:

Rinder-Drüsenpulver vom Autor selbst hergestellt	200 ME
Schweine-Drüsenpulver " " "	133 ME
ein wasserlösliches Präparat mit 0,36% J vom Autor selbst hergestellt	2000 ME
Thyroxin vom Autor selbst hergestellt	100 ME
im Großbetrieb hergestellte Drüsenpulver von verschiedenen Firmen	47) 10-20 ME
Thyroxin Hoffmann-La Roche	1000 ME
" Schering	1333 ME
" Squibb	1000 ME

Auf den ersten Blick ist man geneigt, dem Thyroxin eine starke Wirksamkeit zuzumessen. Rechnet man aber die Resultate auf gleiche Thyroxinmengen um<sup>48)</sup>, so ergibt sich, daß das in den

<sup>41)</sup> Bull. de la Féd. internat. de Pharm. No. 3 (1927).

<sup>42)</sup> J. of the Americ. Med. Assoc. 27, 243.

<sup>43)</sup> Z. f. d. ges. exp. Med. 46, 429.

<sup>44)</sup> Pflüg. Arch. 219, 588.

<sup>45)</sup> Camero u. Carmichael: J. of Biol. Chem. 46, 35 (1921); Romeis: Klin. Wo. 1, 1262 (1922), Hildebrandt: Arch. f. exp. Pathol. 96, 292 (1923); Coronedi: Bollet. soc. ital. biol. exp. 3, 657; C. I., 103 (1931).

<sup>46)</sup> Z. f. exp. Med. 61, 202 (1928).

<sup>47)</sup> Ergeb. d. Physiol. 30, 215 (1930).

<sup>48)</sup> Nach Harington u. Randall: Quart. J. of Pharm. 2, 501 (1929), das Schilddrüsenpulver mit rund 0,1% Thyroxinjod angenommen.

Drüsenpulvern, welche aus dem Großbetrieb stammen, enthaltene Thyroxin mindestens 6 mal und das Thyroxin der vom Autor hergestellten Pulver mindestens 60 mal so wirksam ist wie die reine Verbindung. *Kreitmair* zerkleinerte die Drüsen im Fleischwolf, trocknete das Gut im *Faust-Heim'schen* Apparat<sup>\*)</sup>, entfettete und pulverisierte und erhielt auf diese Weise viel wirksamere Präparate, als sie die Handelsprodukte im allgemeinen darstellen. Nach einer Bemerkung von *Kendall*<sup>49)</sup>, nach welcher Metalle außer Nickel, Gold, Silber und Platin reduzierend auf Thyroxin in alkalischer Lösung wirken, ist es möglich, daß vielleicht der Kontakt mit Metallen bei der technischen Aufarbeitung der Drüsen die aktiven Stoffe schädigt.

Bei den obigen Zahlen von *Kreitmair* fällt ferner die verschiedene Wirksamkeit der Thyroxinpräparate auf, welche von demselben Verfasser auch im Axolotl-Versuch konstatiert wurde. Ebenso merkwürdig erscheint die hohe Wirksamkeit des wasserlöslichen Präparates.

*Bice Neppi*<sup>50)</sup> berichtet, daß das Thyroxin im Vergleich zur ganzen Drüse nicht so wirksam sei und der Wirkung auf das sympathische Nervensystem entbehre. Er führt dies auf die Möglichkeit zweier optischen Isomeren zurück. Tatsächlich fand *Harrington*<sup>51)</sup>, daß l-Thyroxin wirksamer ist.

*Abelin*<sup>52)</sup> zieht aus der verschiedenen Anpassungsfähigkeit des Organismus an Thyroxin und an Schilddrüsensubstanz den Schluß, daß das Thyroxin eher als ein Hormonbruchstück aufzufassen sei. Die Auffassung von *Kendall* und *Simonsen*<sup>53)</sup> ist derjenigen von *Abelin* sehr ähnlich, indem sie annehmen, daß in der Drüse ein besonderes „aktives“ Thyroxin vorkommen muß, das mit dem isolierten Thyroxin in Beziehung steht. *Weir*<sup>54)</sup> konnte keinen Zusammenhang zwischen Thyroxingehalt und dem klinischen Befund der Drüsen seiner Patienten feststellen, was an und für sich (Drüse als Produktions- und Reserve-Organ aufgefaßt) nicht viel bedeutet, wohl aber mit den *de Quervain'schen* Befunden (s. S. 121 verglichen, darauf hinweist, daß das Thyroxin möglicherweise nicht der einzige aktive Körper ist. In scheinbarem Gegensatz hierzu fielen die vergleichenden Versuche zwischen Thyreoglobulin und Thyroxin von *Schulhof*<sup>55)</sup> nach Injektion der Präparate in Dosen mit gleichem Jodgehalt in dem Sinne aus, daß beide Präparate etwa gleich wirksam waren. Wir interpretieren die Versuche aber

\*) Apparat zum Trocknen im erwärmten, bewegten Luftstrom.

49) J. of Biol. Chem. **39**, 125 (1919).

50) Giorn. chim. ind. appl. **10**, 67; C. I, 2511 (1928).

51) Bio. J. **22**, 1429 (1928); C. I, 1217 (1929).

52) Bio. Z. **228**, 233 (1930).

53) J. of Biol. Chem. **80**, 357 (1928).

54) Americ. J. of Med. Sciences, **169**, 860 (1925).

55) Americ. J. of Physiol. **93**, 170 (1930); C. II, 1716 (1930).

so, daß trotzdem das Thyroxin des Thyreoglobulins stärker wirksam sein kann, weil dessen Jod nur zu einem kleineren Teil (ca.  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ ) als Thyroxinjod gebunden ist.

In einer neueren Arbeit von H a r i n g t o n und S a l t e r<sup>56)</sup> wird gezeigt, daß subcutan injiziertes l-Thyroxin-tri- bzw. tetrapeptid (das mit Hilfe proteolytischer Enzyme gewonnen wurde) nahezu die gleiche Wirksamkeit entfaltet, wie die äquivalente Menge des synthetischen l-Thyroxins. Während die Thyroxinpeptide per os wirksam waren, erwies sich das synthetische l-Thyroxin als unwirksam.

Aus der vorliegenden Literatur lassen sich zusammenfassend folgende Schlußfolgerungen ziehen:

1. Die Zubereitungsart des Drüsenpulvers ist von Einfluß auf seine Wirksamkeit per os.

2. Die Applikationsart der Präparate ist von Bedeutung (ob per os oder injiziert). A b e l i n<sup>57)</sup> stellte eine starke Wirkungssteigerung fest bei gleichzeitiger Verabfolgung von Phosphaten; Calciumsalze hingegen wirken erniedrigend.

3. Das Thyroxin ist unzweifelhaft ein sehr wichtiger Bestandteil und als leicht resorbierbare Eiweiß- bzw. Peptid-Verbindung in der Drüse vorhanden.

Nicht nur die Resorbierbarkeit, sondern möglicherweise auch die Wirksamkeit ist auf akzessorische Beeinflussung seitens anderer Molekülgruppen und Bindungen zurückzuführen („aktive Form“). Mag auch die Wirksamkeit des Thyroxins durch verschiedene Faktoren geschwächt werden, so ist man doch berechtigt, aus dessen Gehalt in einem sorgfältig präparierten Drüsenpulver auf die Quantität des unveränderten Thyroxinkomplexes zu schließen.

Für eine chemische Beurteilung der Schilddrüsenpräparate im allgemeinen ergeben sich zur Zeit folgende Möglichkeiten:

1. Man fordert ein gewisses Minimum an Gesamtjod (vgl. S. 122) als Kriterium dafür, daß das vorliegende Präparat überhaupt wirksam ist.

2. Man fordert einen gewissen Thyroxingehalt, als Kriterium dafür, daß eine bestimmte Wirksamkeit, nämlich diejenige des Thyroxinkomplexes vorhanden ist.

Die Bestimmung des Thyroxingehaltes geht im wesentlichen den gleichen Weg, der bei der Isolierung des Thyroxins von H a r i n g t o n und dessen Mitarbeitern beschritten wurde, also alkalische Hydrolyse und Fällung der Thyroxinfraktion mit Säuren. Die Art der Säure ist nicht sehr wesentlich und kann höchstens die Geschwindigkeit des Fällungsprozesses beeinflussen (W e i r<sup>58)</sup>.

Diese erste Fällung besteht noch nicht aus reinem Thyroxin. K e n d a l l und S i m o n s e n<sup>59)</sup> nehmen mit Entschiedenheit aus ver-

<sup>56)</sup> Eio. J. 24, 456; C. II, 1388 (1930).

<sup>57)</sup> Eio. Z. 199, 72 (1928).

<sup>58)</sup> Americ. J. of Med. Sciences, 169, 860 (1925).

<sup>59)</sup> J. of Biol. Chem. 80, 357 (1928).

schiedenen Gründen an, daß das in dieser Fraktion enthaltene Jod nicht ausschließlich dem Thyroxin angehöre. Im Gegensatz hierzu schreiben H a r i n g t o n und R a n d a l l<sup>60)</sup> in später erschienenen Publikationen den Jodgehalt nur dem Thyroxin zu.

In zwei wichtigen Punkten stimmen die genannten Autoren überein, nämlich darin, daß praktisch nur der Niederschlag, nicht aber das Filtrat physiologisch aktiv, ferner, daß das Thyroxin für sich, als auch mit Eiweißstoffen gemischt, gegen Alkali weitgehend resistent sei.

Beim Kochen des Drüsenmaterials mit Lauge nimmt der durch Säure fällbare Anteil des Gesamtjodes fortwährend ab, bis zu einem bestimmten Punkt und bleibt dann annähernd konstant (Weir<sup>61)</sup>).

4. Die Thyroxinjodbestimmung und Vergleich der Jodgehaltsbestimmung nach Kendall mit derjenigen des Deutschen Arzneibuches, 6. Ausgabe: Wir beschränkten uns hinsichtlich der Thyroxinbestimmung darauf, die Anwendbarkeit der zur Zeit wohl besten Methode, nämlich derjenigen von H a r i n g t o n und R a n d a l l<sup>62)</sup> für Arzneibuchzwecke zu überprüfen, ohne auf die strittigen Punkte der Methode einzutreten, die nur durch eine Kombination umfangreicher chemischer und physiologischer Untersuchungen zur Abklärung gebracht werden können.

Wir betrachteten es nicht als unsere Aufgabe, systematisch die große Zahl der sauren und alkalischen Aufschlußverfahren und der vielen maßanalytischen, gravimetrischen und kolorimetrischen Jodbestimmungsmethoden experimentell zu studieren, sondern beschränkten uns auf die Methode von K e n d a l l und diejenige des D. A. B. 6.

Die Thyroxinbestimmung in Schilddrüsenpräparaten wird nach H a r i n g t o n und R a n d a l l, l. c., wie folgt ausgeführt:

Eine genügende Menge des Materials (gewöhnlich 25 Tabletten, „jede 5 grains frischer Drüse entsprechend“) wird pulverisiert, in 10 Teilen n-Natronlauge suspendiert und am Rückflußkühler während 4 Stunden gekocht. Die heiße Lösung wird quantitativ von Spuren anorganischen Materials abfiltriert. In einem aliquoten Teil des Filtrates wird der Jodgehalt bestimmt nach der Methode von K e n d a l l<sup>63)</sup> und daraus der Gesamtjodgehalt des Präparates berechnet. Der Rest des Filtrates wird auf ph 5,0 gebracht durch Hinzufügen von 50 proz. Schwefelsäure und über Nacht stehen gelassen. Eine zweite quantitative Filtration wird ausgeführt und im Filtrat abermals das Jod bestimmt. Die Differenz zwischen der ersten und zweiten Jodbestimmung ergibt das Säureunlösliche- oder Thyroxin-Jod.

Wir müssen annehmen, daß der ph = 5,0 zur Ausscheidung des Säureunlöslichen von den genannten Autoren in besonderen Versuchen ausprobiert wurde. H a r i n g t o n<sup>64)</sup> benützte ursprünglich Congorot und setzte bis zur kaum (barely) sauren Reaktion

<sup>60)</sup> Bio. J. 23, 372 (1929); Quart. J. of Pharm. 2, 501 (1929).

<sup>61)</sup> Americ. J. of Med. Sciences, 169, 860 (1925).

<sup>62)</sup> Quart. J. of Pharm. 2, 501 (1929).

<sup>63)</sup> J. of Biol. Chem. 39, 125 (1919).

<sup>64)</sup> Bio. J. 20, 293 (1926).

gegen diesen Indikator Salzsäure hinzu. Wir führten einen solchen Versuch mit Congopapier aus und das Filtrat zeigte bei kaum wahrnehmbarem Umschlag den  $\text{ph} = 3,73$  bei  $21^\circ$ . H a r i n g t o n und R a n d a l l<sup>65)</sup> säuerten später bis  $\text{ph} = 5,0$  an.

Es handelt sich zunächst darum, das Hydrolysat auf den  $\text{ph} = 5,0$  einzustellen ohne eine Kontrolle, die in diesen Flüssigkeiten kaum anders als elektrometrisch erfolgen kann, vorzusehen. Zur Verfügung stehen folgende Hilfsmittel:

1. Man setzt eine einmal empirisch ermittelte Menge Säure zu. Dieses Verfahren ist für unseren Zweck unsicher und wurde zum vornherein ausgeschaltet.

2. Man neutralisiert annähernd z. B. gegen Lackmus und gibt einen Puffer hinzu. Diese Methode ist ziemlich umständlich, weil z. B. Zitrat- und Azetat-Puffer erst hergestellt werden müssen. (Primäres Phosphat könnte sich voraussichtlich wohl eignen. Der  $\text{ph}$  seiner Lösung ist etwa 4,5; hingegen ist deren Pufferkapazität in diesem Gebiete gering.)

3. Man wählt einen Indikator, dessen Titrierexponent beim gewünschten  $\text{ph}$  liegt. Dies ist der einfachste und sicherste Weg, den wir somit wählten.

Ein geeigneter Indikator schien uns Methylrot zu sein. Es zeigte sich aber, daß durch den Fällungsvorgang die rote Farbe (der Lösung ziemlich rasch zurückgeht. Lösungen, welche gleichviel des Indikatoren enthalten, können a) rot, b) gelb, c) orange sein. Ihre  $\text{ph}$ -Werte betragen a) 4,22, b) 3,29, c) 4,88. Am besten ist es in der Nähe des Umschlagspunktes selbst noch etwas Indikatorlösung hinzuzusetzen. Kurz vor dem Umschlag beginnt die Fällung, die aber wegen der schon bestehenden Trübung des Hydrolysates ziemlich schwer zu erkennen ist.

Der Umschlag des Methylrots liegt etwa bei  $\text{ph} = 5,2$ . In den meisten unserer Versuche gaben wir noch eine geringe Menge Schwefelsäure hinzu, nachdem der Umschlag erreicht worden war. Bei jedem Versuch wurde der  $\text{ph}$  elektrometrisch kontrolliert.

Weil H a r i n g t o n und R a n d a l l<sup>66)</sup> in Bezug auf die Flüssigkeitsmengen sich nicht äußern, wollten wir uns vergewissern, ob etwa die Löslichkeit des Niederschlages innert bestimmter Grenzen des Flüssigkeitsvolumens, woraus er abgeschieden wird, von Einfluß auf das Ergebnis sei.

Ohne auf jeden einzelnen Versuch einzugehen, wollen wir die Arbeitsweise, welche wir für eine Arzneibuchmethode empfehlen können, wiedergeben:

1,500 gr des Schilddrüsenpulvers werden mit 50 ccm n-Natronlauge während 4 Stunden am Rückflußkühler gekocht und heiß, durch ein glattes Filter in einen tarierten Erlenmeyer filtriert. Das Filter wird mit heißem Wasser nachgewaschen und das Gewicht der Flüssigkeit auf 100 gr gebracht. 50 gr (entsprechend 0,75 gr Drüse) der erkalteten, gut gemischten, trüben Flüssigkeit werden in einem tarierten Kölbchen mit 5 Tropfen Methylrot\*) versetzt, mit ca. 25 proz. Schwefelsäure bis zur deutlichen Änderung der Farbe gegen rot (verglichen mit den nicht titrierten 50 gr des Filtrates) titriert. Vor dem Umschlag, nachdem etwa 3,9—4

<sup>65)</sup> Bio. J. 23, 372 (1929) und zwar S. 374 u. 379.

<sup>66)</sup> Quart. J. of Pharm. 2, 501 (1929).

\*) Methylrot: 0,05 gr p-Dimethylaminoazobenzol-o-carbonsäure in 75 ccm Spiritus gelöst + aq. ad 100 ccm.

ccm Schwefelsäure zugesetzt wurden, fügt man nochmals 5 Tropfen Methylrot hinzu. Ist der Umschlag erreicht, so gibt man noch 10 Tropfen Essigsäure ca. 2 n hinzu. Die Flüssigkeit soll dann stark rot gefärbt sein. Sie wird mit Wasser auf 60 gr gebracht, über Nacht stehen gelassen, dann filtriert und in 20 gr (entsprechend 0,25 gr Drüse) oder 40 gr (entsprechend 0,5 gr Drüse) des Filtrates der Jodgehalt bestimmt. Ebenso bestimmt man in einem aliquoten Teil der zurückgebliebenen, nicht angesäuerten Flüssigkeit den Jodgehalt und rechnet auf 100 gr Drüse um. Die Differenz der erhaltenen Zahlen ergibt das Thyroxinjod in Prozenten.

Bevor wir auf die Jodbestimmung als solche eintreten, führen wir die mit der obigen Arbeitsweise mit dem Merck'schen Schildrüsenpulver erhaltenen Resultate an. Bei diesen Versuchen wurde ihm wesentlichen nur die Natronlaugenmenge und die Konzentration des Hydrolysegemisches variiert.

Ver-such	n-NaOH ccm	Gewicht, auf welches das Hydrolysat gebracht wurde, entsprechend 1,5 gr Drüse	Gewicht, auf welches ein aliquoter Teil des Hydroly-sates *) gebracht wurde, auf 1,5 gr Drüse bezogen	Totaljod ausge-drückt in Proz. der Drüsensub-stanz	Restjod %	Thyroxin-jod %
1.	50	100 gr	120 gr	0,49	0,37	0,12
2.	50	100	120	0,49	0,37	0,12
3.	50	120	135	0,48	0,35	0,13
4.	20	70	79	0,46	0,34	0,12
5.	35	75	84,4	0,475	0,355	0,12
6.	20	70	79	0,48	0,35	0,13
7	50	100	120	0,48	0,36	0,12

\*) Woraus das Säureunlösliche gefällt wurde.

Wie die obenstehenden Zahlen zeigen, ist ein bedeutsamer Einfluß der variierten Faktoren also nicht festzustellen und die Übereinstimmung ist befriedigend.

Der Versuch, bei dem gegen Kongopapier eingestellt wurde, ergab: Totaljod 0,49%; Restjod 0,33%; Thyroxinjod 0,16%.

Aufgefallen ist uns, daß in den klaren Filtraten nach der Abscheidung des Säureunlöslichen, durch weiteren Schwefelsäurezusatz bis ph 3—2 noch eine Trübung auftrat. Nach längerem Stehen war ein deutlicher Niederschlag festzustellen, während die Kontrollproben ohne erneuten Säurezusatz, praktisch klar blieben.

Nachtrag: Herr Dr. C. R. Harington hat uns brieflich bestätigt, daß ph 5,0 für die Fällung des Säureunlöslichen etwas zu alkalisch sein dürfte, daß hingegen ph 2,0 für die Fällung eine zu große Acidität darstelle.

Nach unseren Erfahrungen sind wir der Meinung, daß ph ca. 3 eine günstigere Fällungs-Acidität darstellt.

Auf diese h könnte ungefähr eingestellt werden, indem in der oben angegebenen Arbeitsvorschrift statt mit Methylrot bis zur schwach sauren Reaktion gegen Kongopapier oder auf Methylorange titriert wird, unter Weglassung des nachträglichen Zusatzes von Essigsäure.

Die Flüssigkeitsmengen der obigen Vorschrift gestatten, je zwei Bestimmungen des Total- und des Rest-Jodes auszuführen. Es ist besonders zu erwähnen, daß diese Parallelbestimmungen je- weilen sehr gut übereinstimmende Resultate lieferten, welche bei 8 Werte-Paaren nur einmal 0,002 Einheiten überstieg.

Trotzdem fanden wir es nicht überflüssig, die Jodbestimmungsmethode als solche näher zu studieren und mit einer, in wesentlichen Punkten abweichenden Methode zu vergleichen.

Um eine unnötige Wiederholung zu vermeiden, geben wir die Methode von Kendall<sup>67)</sup> in der Weise wieder, wie wir sie für eine Arzneibuchvorschrift als günstig erachten, unter Benützung der Reagenzien der Ph. H. V.:

Etwa 20 bis 30 gr des Schilddrüsenhydrolysates wiegt man in einen Nickel- tiegel mit einem oberen Durchmesser von 6 cm, stellt diesen in einen Eisen- oder Nickeltiegel von 8,5 bis 9 cm oberem Durchmesser, dessen Boden mit einer etwa 0,5 cm hohen Schicht von feinem Seesand bedeckt ist. Das Ganze wird von einem passenden Tonröhrendreieck oder noch besser von einem Dreifuß mit dreieckigem Querstück festgehalten. Man dampft nun die Flüssigkeit über kleiner Flamme auf etwa 5 bis 10 ccm ein. Vorsichtshalber gibt man beim Eindampfen des zweiten, schwachsauren Hydrolysates gleich von Anfang an einige Körnchen Natrium- hydroxyd hinzu.

Man entfernt nun den Brenner kurze Zeit und fügt 5 bis 8 gr Natrium- hydroxyd in kleinen Stücken oder in Plätzchenform zur Lösung. Unter leichtem Sieden löst sich das Natriumhydroxyd auf. Unterbleibt dieses Sieden, so muß durch leichtes Umschwenken für gute Durchmischung gesorgt werden. Es ist vorteilhaft, die Wände des Tiegels möglichst wenig mit der Flüssigkeit zu benetzen. Nun wird das Eindampfen unter leichtem Sieden oder nur über kleiner Flamme fortgesetzt. Es entsteht bald eine Karbonathaut, welche die Dämpfe sehr gut durchläßt, aber Spritzen verhindert. Sie soll daher nicht durch Umschwenken zerstört werden.

Nachdem sich eine weiße, trockene Masse gebildet hat, steigert man langsam die Temperatur. Es tritt Verflüssigung ein und bald beginnt ein lebhaftes Schäumen, indem Ammoniak und Amine ausgetrieben werden. Der Schaum steigt aber nur bis etwa  $\frac{1}{3}$  bis  $\frac{1}{2}$  der Tiegelhöhe und sinkt dann wieder zurück. Durch leichtes Schwenken bringt man die oben an den Wänden haftenden Anteile hinunter. Steigen nur noch wenige feine Bläschen auf, so gibt man in sehr kleinen An- teilen Kaliumnitrat auf die Schmelze, wobei sich die Gasentwicklung verstärkt. Man fährt mit diesen kleinen Zusätzen fort, bis die Schmelze nicht mehr mit dem Kaliumnitrat reagiert. Unterdessen haben sich auf der Oberfläche kleine schwarz bis gelbbraune Tröpfchen gebildet, welche zu größeren Tropfen zusammen fließen. Nun schwenkt man den inneren Tiegel leicht um, ohne ihn aus dem äußeren zu heben, wodurch diese öligen Tropfen (Paraffine) sich fein verteilen und zusehends verdampfen. Es wird nochmals kontrolliert, ob die glatte Schmelze noch mit Kaliumnitrat reagiert. Wenn nicht, so gießt man sie in den Tiegeldeckel, wenn möglich in einzelnen Tropfen oder in länglicher Form, sodaß die erstarrten Stücke den Hals eines 500 ccm Erlenmeyerkolbens passieren. Den erkalteten Tiegel stellt man in ein weites, dickwandiges Jenaer-Becherglas und löst durch leichtes Schwenken in etwas Wasser, spült quantitativ in den 500 ccm Erlenmeyerkolben mit Hilfe von insgesamt 200 ccm Wasser. Nun setzt man nacheinander 2 ccm Natriummetabisulfitlösung (0,5 gr in 10 ccm), 10 Tropfen Methylorange und unter

<sup>67)</sup> J. of Biol. Chem. 39, 125 (1919).

Umschwenken soviel sirupöse Phosphorsäure hinzu, bis die Lösung schwach rot geworden ist. Hierauf wird unter Umschwenken Bromwasser zugegeben, bis die Flüssigkeit stark gelb bleibt, worauf man nach Zugabe von einer Prise Talk erhitzt und während 10 Minuten in lebhaftem Sieden erhält, um das überschüssige Brom zu vertreiben. Die letzten Reste des Broms werden durch ein bis zwei ccm Karbolwasser (2%) gebunden. Nach dem Abkühlen und nach Zusatz von 5 ccm sirupöser Phosphorsäure und 0,5 gr Kaliumjodid wird mit 0,005 n frisch bereiteter Natriumthiosulfatlösung und Stärke als Indikator titriert.

1 ccm 0,005 n-Thiosulfat entspricht 0,106 mgr Jod.

Wir haben die Zerstörung des organischen Materials nach der Kendall'schen Methode absichtlich so ausführlich beschrieben, weil man die geschilderten Phasen des Vorganges regelmäßig wahrnimmt und ein zu früher Unterbruch ganz falsche Werte ergibt.

Die 0,005 n Thiosulfatlösung, welche man aus der 0,1 normalen durch Verdünnen mit ausgekochtem Wasser, dem man noch 0,2 Prozent Natriumkarbonat zugesetzt hat, herstellt, hält sich während acht Tagen fast unverändert, so lange das überstehende Luftvolumen nicht mehr als etwa die Hälfte beträgt. Wir kontrollierten ihren Wirkungsgrad gegen eine 0,005 n Kaliumbiodat-Lösung, von der beispielsweise 20 ccm mit Wasser auf 200 ccm verdünnt wurden. Dieses Wasser wurde mit etwas Brom ausgekocht und nachher Phenol zugesetzt. Der etwas undeutliche Umschlag bei diesem Kontrollversuch kann durch Zusatz von reinstem Kochsalz (5—10 gr) verschärft werden.

\* \* \*

Schulek und Stasiak<sup>68)</sup> halten Brom nur dann für brauchbar als Oxydationsmittel, wenn kein Nitrit vorhanden ist. Sie empfehlen die bei der Zerstörung mit Kaliumhydroxyd entstehenden Spuren von Nitrit durch Zusatz von Traubenzucker zur erstarrten Schmelze und nochmaligem Schmelzen unter Umschwenken zu zerstören. Schwaibold<sup>69)</sup> findet die Ergebnisse nach Oxydation mit Brom bei der Bestimmung kleiner Jodmengen unzuverlässig.

In der Literatur werden hauptsächlich Chlor oder Permanganat als sehr geeignet erwähnt. In der U. S. A. X wird mit Natriumhypochlorit-Lösung gearbeitet. Diese muß aus Chlorkalk und Soda frisch bereitet werden. Nach Münch<sup>70)</sup> darf sie höchstens vier Wochen alt sein.

Um diese Verhältnisse zu beurteilen, stellten wir mit der Methode des D. A. B. 6 und derjenigen von Kendall vergleichende Versuche an. Die Methoden der U. S. A. X<sup>71)</sup> und des D. A. B. 6 haben die Schmelze mit einer Mischung von Natrium-, Kalium-Karbonat und Kaliumnitrat gemeinsam. Als Oxydationsmittel schreibt das

<sup>68)</sup> P. C. H. 69, 513 (1928).

<sup>69)</sup> Z. f. anal. Chem. 78, 161 (1929).

<sup>70)</sup> Phrm. W. 64, 255 (1927).

<sup>71)</sup> = Methode von Hunter: J. of Biol. Chem. 7, 321 (1910).

D. A. B. 6 aber Kaliumpermanganat vor. Nach van den Berg <sup>72)</sup> stimmen beide Methoden in ihren Resultaten überein.

1. Versuch: Von den Hydrolysaten I und II wurden je zwei Proben nach Kendall zerstört und a) mit Permanganat nach D. A. B. 6 und b) mit Brom oxydiert.

I	a. 0,472 % Jod	II	a. 0,474 % Jod
	b. 0,478		b. 0,475

2. Versuch: Sechs Portionen des gleichen Hydrolysates wurden wie folgt analysiert:

a. nach Kendall	0,472; 0,465 % J
b. nach D. A. B. 6; Schmelze in 100 ccm fassenden Nickeltiegeln	0,403; 0,409
c. nach D. A. B. 6; Schmelze in den vorgeschriebenen Porzellantiegeln	0,433; 0,439

3. Versuch: Sechs Portionen des gleichen Hydrolysates wurden wie folgt analysiert:

a. nach Kendall	0,477
b. Schmelze nach Kendall; Oxydation nach D. A. B. 6	0,470
c. nach D. A. B. 6	0,439
d. nach D. A. B. 6	0,434
e. nach D. A. B. 6 (Tiegel gesprungen)	0,429
f. nach D. A. B. 6	—

In den Versuchen nach D. A. B. 6 wurde noch bevor die Flüssigkeit vollständig eingedampft war, etwas Karbonat-Nitratgemisch zugegeben, weiter eingedampft und den Rest des vorgeschriebenen Karbonat-Nitratgemisches hinzu gefügt. Die Gefahr des Spritzens nach dem Trocknen auf dem Wasserbade und vorsichtigem Anheizen über der Flamme ist sehr groß. Ferner erfordert die Aufarbeitung der Schmelze einen bedeutend größeren Aufwand an Arbeit und an Zeit. Die Tiegel kann man oft nur ein- bis zweimal benutzen, weil sie beim Abkühlen sehr leicht springen\*).

Wir halten es für möglich, die offensichtlichen Jodverluste bei der Schmelze nach D. A. B. 6 einzuschränken, wenn man unter besonderen Kautelen arbeitet, wie sie Münch <sup>73)</sup> für die Methode der Nederl. V vorschlägt.

4. Versuch: 5 gr NaOH „Merck puriss.“ in 200 ccm Wasser gelöst + Phosphorsäure q. s. + a) 0,2 gr Natriumnitrit; b) ohne Nitrit; + Bromwasser; während 10 Minuten gekocht; + 5 ccm Phosphorsäure + 0,5 gr KJ + Stärke.

Beobachtungszeit

nach	a	b.
1 Min.	farblos	farblos
2 "	undeutlich schwach blau	farblos
3 "	deutlich schwach blau	farblos
6 "	—	deutlich schwach blau
10–12 "	4 Tr. = 0,17 ccm	2 Tr. = 0,08 ccm
	0,005 n Thiosulfat entfärben	entfärben

<sup>72)</sup> Bull. de la Féd. intern. Pharm. No. 3 (1927).

<sup>77)</sup> Yvon und Michel: Manuel d'analyse des urines; Doin 8. Aufl., S. 240: empfehlen bei der Nitrat-Karbonat-Schmelze nur die Natriumsalze, da Kaliumnitratzusatz beim Abkühlen der Tiegel leicht Springen derselben verursache.

<sup>73)</sup> Phrm. W. 64, 255 (1927).

Die Dauer der Titration bei tropfenweisem Zufließenlassen der Thiosulfatlösung beträgt durchschnittlich 5 bis 7 Minuten bei einem Verbrauch von rund 10 ccm Titerflüssigkeit. Der Fehler erreicht etwa 2 Prozent.

Nitrit wird nach diesem Versuch durch Brom jedenfalls weitgehend oxydiert. Fügt man zur Lösung eine Spur Natriumnitrit, so wird sie sofort blau. Es könnte sich möglicherweise um einen ganz anderen Vorgang handeln (event. Katalyse).

Es sei noch erwähnt, daß ein Nachbläuen bei der Kendall'schen Methode nur äußerst langsam eintritt. Gewöhnlich wurden die Blindproben, wenn man sie in gleicher Weise am Licht stehen ließ, rascher blau. Fehler wegen Nitritgehalt der Schmelze, kommen also kaum in Betracht.

Wir schließen aus unseren Versuchen, daß sich die Methode von Kendall für ein Arzneibuch sehr gut eignet.

Nun wurde noch in einigen anderen Schilddrüsenpräparaten nach der Kendall-Harrington-Methode der Thyroxinjod-Gehalt bestimmt. Die Resultate waren folgende:

Präparat	Gesamtjod in %	Thyroxinjod in %
1. „Merck'sches“ Schilddrüsenpulver	0,48	0,125
2. Präparat von Herrn Prof. Golaz, hergestellt aus nicht entfetteten Hammel- oder Schweine-Drüsen; verdünnt mit etwa $\frac{4}{5}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ;		
a. Hydrolyse	a. 0,042	0,012
von 5 gr des Präparates mit 50 ccm n-NaOH;		
b. Hydrolyse	b. 0,040	0,011
von 5 gr des Präparates mit 50 ccm n-NaOH + 1 gr NaOH fest		
3. Schafdrüsenpulver; selbst hergestellt; im März gewonnen	0,28; 0,28	0,075; 0,074
4. Schweinedrüsenpulver; selbst hergestellt; im März gewonnen	0,39	0,10
5. Rinderdrüsenpulver; selbst hergestellt; im März gewonnen	0,134	0,03

5. Gehaltsnormierungen und Beurteilungskriterien: Nach Kendall und Simonsen<sup>74)</sup>, Weir<sup>75)</sup>, Harrington und Randall<sup>76)</sup> können beträchtliche Schwankungen des Thyroxinjod-Gehaltes im Verhältnis zum Gesamtjodgehalt vorkommen. Nach Kendall<sup>77)</sup> sind es annähernd 25%, nach Harrington und Randall, l. c., durchschnittlich etwa 50% (von 27

<sup>74)</sup> J. of Biol. Chem. **80**, 357 (1928).

<sup>75)</sup> Americ. J. of Med. Sciences, **169**, 860 (1925).

<sup>76)</sup> Quart. J. of Pharmac. **2**, 501 (1929).

<sup>77)</sup> J. of Biol. Chem. **39**, 125 (1919).

bis 60%), ebenso nach Weir, l. c., durchschnittlich etwa 50% (von 15 bis 66%)\*). Harington und Randall<sup>78)</sup> schlagen vor, die getrockneten Schilddrüsenpräparate auf  $0,09 \pm 0,01\%$  Thyroxinjod einzustellen. Wir möchten die Forderung noch dadurch ergänzen, daß der Totaljodgehalt, der ja gewöhnlich vor dem Thyroxinjod bestimmt wird, mindestens 0,15% betragen soll. Ist dieser Wert nicht erreicht, so ist nicht zu erwarten, daß der geforderte Mindestgehalt von Thyroxinjod vorhanden sei und die Fortsetzung der Analyse würde sich erübrigen.

Die Frage, ob im Schilddrüsenpulver normalerweise anorganisch gebundenes Jod nachgewiesen werden kann, wird teils bejaht (Harington und Randall, l. c.), teils verneint (Kendall und Simonsen<sup>79)</sup>). Man ist berechtigt, als obere Grenze des anorganisch gebundenen Jodes 5% des Gesamtjodgehaltes anzunehmen (Harington und Randall, l. c.; Weir<sup>80)</sup>). Ist derselbe höher, so kann man noch nicht ohne weiteres auf nachträglichen Zusatz schließen, denn Jodkali-Verfütterung kann eine Erhöhung bewirken.

Es ist darauf zu achten, daß bei der Extraktion mit Wasser, Eindampfen des filtrierte Auszuges und Zerstören des Verdampfungsrückstandes unbedingt eine Denaturierung der Eiweißstoffe z. B. durch Aufkochen vorangehen muß, weil sonst ein Teil des jodhaltigen Eiweißes in den Auszug gehen kann.

Anorganisch gebundenes Jod kann auch mit 4 Volumen Aceton<sup>81)</sup> herausgelöst werden, wobei das Eiweiß ungelöst bleibt. Jodhaltige Fettkörper müßten also auch in das Filtrat gehen. Sie spielen normalerweise bei der Schilddrüse quantitativ keine Rolle.

Weir, l. c., dampft das Hydrolysat auf weniger als 10 ccm ein, gibt salpetrige Säure und Stärke dazu und vergleicht die Blaufärbung mit derjenigen, welche aus einer entsprechend verdünnten Kaliumjodid-Lösung bekannten Gehaltes erzeugt wurde.

Schulek und Stasiak<sup>82)</sup> geben folgende Vorschrift:

„1 gr des Präparates wird mit 5 ccm Wasser gut geschüttelt und rasch filtriert. Nach Zusatz von 1 ccm Schwefelsäure (10%) und 2 bis 3 Tropfen 1 promill. Natriumnitritlösung wird mit 0,5 ccm Tetrachlorkohlenstoff ausgeschüttelt. Dieser darf höchstens blaßrosa gefärbt sein. Die Farbe soll durch Zusatz von einem Tropfen 0,01-n-Natriumthiosulfat verschwinden.“

Ähnlich bestimmt die Nederl. V das anorganisch gebundene Jod und fügt noch Schwefelwasserstoff hinzu zur Reduktion von event. vorhandenem Jodat.

\*) Die Zahlen von Weir beziehen sich auf menschliche Schilddrüsen.

<sup>78)</sup> Quart. J. of Pharmac. 2, 501 (1929).

<sup>79)</sup> J. of Biol. Chem. 80, 363 (1928).

<sup>80)</sup> J. of Americ. Med. Sciences, 169, 860 (1925).

<sup>81)</sup> Zit. nach Guggenheim in Hdb. d. inneren Sekretion, Bd. 2, S. 36.

<sup>82)</sup> P. C. H. 69, 113 (1928).

Am gründlichsten prüft das D. A. B. 6 auf fremde Jodkörper und schließt alle wasserlöslichen (nach Denaturierung des Drüsen-eiweißes), alkohollöslichen und ätherlöslichen Jodverbindungen aus d. h. es gestattet für alle drei Auszüge zusammen einen Jodgehalt von höchstens 10% des mindest geforderten Gesamtjodgehaltes.

Dadurch, daß wir bei der chemischen Untersuchung der Schilddrüsenpräparate in erster Linie auf den Thyroxinjodgehalt abstellen, werden sehr viele Zusätze auf das Resultat praktisch wirkungslos. Eine Täuschung könnte nur durch solche Zusätze erfolgen, welche mit dem Säureunlöslichen zusammen ausfallen und deren Jod während der Hydrolyse nicht abgespalten wird. Wahrscheinlich werden kohlenstoff-jodierte fremde Eiweißkörper und jodierte Fettsäuren im allgemeinen durch die alkalische Hydrolyse soweit abgebaut, daß beim Ansäuern keine jodierten Körper mehr ausfallen.

Als weitere Kriterien für die Qualität eines Schilddrüsenpräparates kommen Fettgehalt, Feuchtigkeitsgehalt und Aschegehalt in Betracht.

Den Fettgehalt bestimmten wir in der Weise, daß wir 2 gr Drüsenpulver mit 20 ccm Äther während 3 bis 4 Stunden unter öfterem Umschwenken stehen liessen, den Auszug in ein tariertes Gefäß (Becherglas oder Tiegel) filtrierten und noch dreimal mit je 10 ccm Äther Rückstand und Filter nachwuschen. Nach dem freiwilligen Verdunsten des Äthers wurde bei 103—105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Der Feuchtigkeitsgehalt wurde durch Trocknen während 4—5 bzw. 15 Stunden bei 103—105° bestimmt.

Präparat	Ent-fettung	Fettgehalt in %	Feuchtigkeitsgehalt in %		Asche- gehalt lufttr.
			4—5 Std.	15 Std.	
„Merck“		2,95	8,5 8,6	8,8 8,85	2,2
v. Schaf; selbst hergestellt	+	0,45	8,0	8,3	—
v. Schwein; selbst hergestellt	+	1,00	8,0	8,2	3,0
v. Rind; selbst hergestellt	+	0,25	8,5	8,7	4,3
v. Prof. Golaz hergestellt *)	—	3,49	—	—	—
v. Rind; selbst hergestellt **)	—	22,35	—	—	—
v. Rind; selbst hergestellt	—	14,12	—	—	—
v. Schwein; selbst hergestellt	—	15,21	—	—	—

\*) Etwa 80 % sek. Natriumphosphat enthaltend.

\*\*\*) Nicht sorgfältig präpariert.

\* \* \*

Es können aus unseren Untersuchungen folgende Folgerungen abgeleitet werden:

1. Es sollen nur gesunde Schilddrüsen von Schaf und Schwein vom Tiere weg verarbeitet werden.

2. Das Trocknen muß möglichst rasch, bei einer 45° nicht übersteigenden Temperatur geschehen und ein längerer Kontakt mit Metallen vermieden werden.

3. Das getrocknete Gut ist mit Äther oder Petroläther zu entfetten, sodaß der Fettgehalt (wie oben bestimmt) des lufttrockenen Pulvers nicht mehr als 2% beträgt. Nach dem Entfetten wird nochmals unter den gleichen, milden Bedingungen getrocknet und pulverisiert (Feinheit: Sieb IV; 15 Maschen auf 1 cm).

4. Das Pulver soll graugelb bis rötlichgraugelb sein und schwach fleischbrüheartig, weder ranzig noch sonst irgendwie unangenehm riechen.

5. Es wird zunächst der Gesamtjodgehalt ermittelt; derselbe soll mindestens 0,15% betragen. Sodann ermittelt man den Thyroxinjodgehalt. Ist derselbe höher als 0,08 bis 0,10%, so wird das Präparat durch Verdünnen mit Milchzucker auf diesen Gehalt eingestellt.

6. Wenn Wert darauf gelegt wird ein Kriterium dafür zu haben, daß das Präparat nicht bei zu hoher Temperatur getrocknet worden ist, so könnte diese Konstatierung unseres Erachtens besser als nach dem Verfahren des D. A. B. 6 (Nachweis von Eiweißstoffen im filtrierten wässerigen Auszug durch Aufkochen) durch mikroskopische Untersuchung erfolgen. Bei derselben dürfen scharfkantige Kolloidbruchstücke nicht erkennbar sein. Beide Konstatierungsmethoden sind insofern nicht eindeutig, als Aceton- oder Alkohol-Behandlung bei der Aufarbeitung der Schilddrüsen ebenfalls denaturierend wirken, ohne daß höhere Temperatur zur Anwendung gekommen sein muß. Ferner muß noch die Möglichkeit offen gelassen werden, daß die Eiweißstoffe eines bei niederer Temperatur getrockneten Schilddrüsenpräparates bei längerem Lagern allmählich denaturiert werden können.

7. Der Feuchtigkeitsgehalt darf 8,5% (nach 5 stündigem Trocknen bei 103—105°), der Aschegehalt 5% nicht übersteigen.

U. S. A. X; D. A. B. 6; Ital. V gestatten höchstens 6% Feuchtigkeit; U. S. A. X; D. A. B. 6; Nederl. V gestatten höchstens 5% Asche.

## Zusammenfassung des Kapitels: „Getrocknete Schilddrüsen“.

(Thyreoidea siccata)

1. Es wurden die Notwendigkeit und die Möglichkeit erwogen, ob betreffs Alter der Tiere, Tierart, Zeit der Gewinnung der Drüsen, Größen- und Gewichts-Verhältnisse derselben und Entfetten der getrockneten Drüsen bei der Herstellung von Schilddrüsenpräparaten Forderungen aufgestellt werden sollen bzw. können.

2. Es wurde eine einfache mikroskopische Untersuchungsmethode der Drüsenpulver angegeben, durch welche auch der Unterschied zwischen bei hoher und niedriger Temperatur getrockneten Drüsenpulvern feststellbar ist.

3. Literaturstudien über den Jod- und Thyroxin-Gehalt ergaben den Wert der chemischen Untersuchung. Es wurden nach der Methode von H a r i n g t o n und R a n d a l l verschiedene Schilddrüsenpulver auf ihren Thyroxinjodgehalt untersucht. Ferner wurde die Jodbestimmungsmethode von K e n d a l l mit derjenigen des D. A. B. 6 verglichen und erstere für ein Arzneibuch empfohlen.

4. Es wurden für Arzneibuchzwecke Vorschläge gemacht für Beurteilungskriterien und Gehaltsnormierungen von getrockneter Schilddrüse.

## **Lebens- und Bildungsgang.**

---

Ich, Kälin Anton, von Einsiedeln, wurde am 25. April 1906 in Weinfeldern (Thurgau) geboren. Im Jahre 1909 siedelten meine Eltern nach Rapperswil am Zürichsee über. Nachdem ich dort Primar- und Sekundarschule absolviert hatte, verbrachte ich ein Jahr in einem Handelsinternat in Cressier (Neuenburg) und ging dann 1922 an die Privatschule „Minerva“ nach Zürich. Im Frühjahr 1924 bestand ich die Eidgenössische Maturitätsprüfung. Nun widmete ich mich dem Studium der Pharmazie und blieb, mit Ausnahme des ersten propädeutischen und des ersten fachwissenschaftlichen Semesters (in Basel bzw. in Bern) in Zürich an der pharmazeutischen Abteilung der Eidgenössischen Technischen Hochschule, wo ich im Herbst 1928 die Fachprüfung ablegte. Vom darauffolgenden Winter bis zum Frühjahr 1931 beschäftigte ich mich mit der vorliegenden Arbeit unter der Leitung meines verehrten Lehrers, Herrn Prof. Dr. R. Eder.

---