lufttrockenen Rückstandes (des wässerigen Pylorusauszugs), dem auch wohl Säure während des Verdauungsversuchs zugesetzt wurde, immer doch 0,021 Grm. Eiweiss mehr als die Säure allein, in Versuch XXII sogar 0,185 Grm. (also doppelt soviel). Die Glycerinauszüge der lufttrockenen Rückstände, der Wasser-extracte, erscheinen hiernach also durchaus nicht so unwirksam, wie die Verfasser es in Nr. 1 behaupten. Da aber auch hier die unfiltrirten Glycerinauszüge benutzt wurden, so bleibt es immer denkbar, dass die freie Säure zunächst die in demselben suspendirten Albuminate mit dem ihm anhaftenden Pepsin löste und die Wirkung des letzteren sich dann noch zu der Säure summirte. Ich zweifle keinen Augenblick, dass man auch durch Wasser einem pepsinhaltigen Gewebe jenes, wenn auch nur in geringer Menge entziehen kann, um so mehr, je mehr von demselben vorhanden ist, und dass dasselbe alsdann in den lufttrockenen Rückständen enthalten, mit Glycerin extrahirt werden könne. Selbst wenn also letzteres den ganzen Rückstand löst, würden die Versuche das nicht beweisen, was die Verfasser durch sie bewiesen zu haben glauben. Sie beweisen nur, dass schwache Chlornatriumlösungen der Schleimhaut mehr Pepsin entziehen (weil sie mehr Albuminate lösen) als destillirtes Wasser, und dass verdünnte Salzsäure durch ihre Einwirkung auf die Albuminate das von ihnen festgehaltene Pepsin freimache.

(Aus dem physiologischen Institut zu Breslau.)

Ueber eine neue Methode Pepsinmengen colorimetrisch zu bestimmen.

Von

Dr. **Paul Grützner.**

Die verschiedenen Methoden, welche dazu dienen den Pepsin-gehalt verdauender Flüssigkeiten zu bestimmen, benützen bekanntlich, da das Pepsin nicht direct gemessen, sondern nur aus seinen Wirkungen erkannt werden kann, verschiedene Mittel, um ihre Aufgabe zu lösen. So nimmt die Bidder und Schmidt'sche Wägmethode als Maass die Menge des gelösten Eiweisses,

welches von einer bestimmten Pepsinlösung in einer gewissen Zeit verdaut wird, die Brücke'sche Methode als Maass die Zeit, innerhalb deren eine Fibrinflocke vollständig sich auflöst, und die Gruenhagen'sche Methode misst schliesslich die Menge der überhaupt oder der in einer bestimmten Zeit gebildeten Peptonlösungen. Alle diese Methoden geben uns somit immer nur über fertige, vollendete Resultate, über das Facit eines Vorganges Aufschluss, lassen uns dagegen über das Zustandekommen, die allmähliche Entwicklung dieses Resultates ziemlich im Unklaren, entweder weil sie uns darüber überhaupt nichts mittheilen können oder weil sie nach dieser Richtung hin nicht ausgebeutet worden sind.

So würde man beispielsweise die Wirkung des Pepsins in den verschiedenen zeitlichen Phasen seiner Thätigkeit vermittelst der Bidder und Schmidt'schen Methode dadurch demonstrieren können, dass man die innerhalb verschieden grosser Zeiten gelösten Eiweissmengen feststellte. Auf diese Weise gewänne man einen Einblick in den zeitlichen Verlauf von verschiedenen Pepsinwirkungen. Man fände dann — wie ich dies aus vielen Experimenten nicht gerade absolut genau angeben, aber sehr wohl schätzen kann — dass das Pepsin erst nach und nach seine Thätigkeit entfaltet, dann längere Zeit energisch wirkt, allmählich in seiner Arbeit erlahmt und schliesslich dieselbe ganz einstellt. Man fände weiter, dass diese Einstellung der Arbeit eher bei starken, später bei schwachen Pepsinlösungen eintritt, erstere in kurzer Zeit somit viel, letztere in langer Zeit wenig ausrichtet u. s. w.

Gleiche Resultate ergibt übrigens ohne Weiteres — unter günstigen Umständen — auch die Gruenhagen'sche Methode und würde sie immer ergeben, wenn man die Producte der Verdauung sofort nach ihrer Bildung messen könnte. Dies gelingt nun aber durchaus nicht bei jedem Versuch; denn oft ist schon ziemlich viel Fibrin verflüssigt und aus früher erwähnten Gründen ¹⁾ noch Nichts filtrirt.

Die Brücke'sche Methode lässt uns schliesslich über den Vorgang der Pepsinwirkung ebenfalls sehr wenig erkennen; denn mit Sicherheit anzugeben, dass beispielsweise von einer verdauen-

1) S. Ebstein u. Grützner dieses Archiv Bd. VIII, pag. 129.

den Flüssigkeit in den ersten 5 Minuten halb so viel Fibrin gelöst wird, als in den nächsten, das gelingt so ohne Weiteres durchaus nicht.

Das Problem wäre aber sofort gelöst, wenn man in verschiedenen Zeitmomenten entweder die Menge des noch nicht verdauten Fibrins oder die Menge der schon gebildeten Peptone mit Genauigkeit angeben oder schätzen könnte. Denken wir uns nun die Albuminate durch einen in Wasser löslichen Farbstoff und die saure Pepsinlösung durch einfaches Wasser substituiert, so ist es klar, dass sich die Lösung des Farbstoffes, selbst wenn sie erst wenig vorgeschritten ist, doch sehr bald deutlich documentiren, und dass jemehr Stoff in Lösung übergeht, eine um so gesättigtere Nuance der Flüssigkeit das Resultat dieses Vorganges sein wird. Nun kann man in der That die Albuminate zwar nicht direct durch Farbstoffe, wohl aber sehr leicht durch gefärbte Albuminate ersetzen, die, wenn auch nur in geringen Spuren gelöst — so dachte ich — diese ihre Lösung der umgebenden Flüssigkeit sehr bald untrüglich und leicht verrathen müssten. Ginge überdies ihre Lösung rasch und leicht von Statten, wie dies bei viel Pepsin der Fall, so müssten natürlich jene Flüssigkeiten sehr bald intensiv gefärbt sein; wäre dagegen nur wenig Pepsin in Thätigkeit, so würde jene Färbung erst viel später eintreten. Diese Betrachtungen führten mich zu der oben genannten Methode, die ihrer Einfachheit und Genauigkeit halber Erwähnung verdient.

Das zu den Versuchen von mir verwendete Albuminat war Fibrin, welches ich in erster Zeit durch Pikrocarmin ¹⁾ (das aber

1) Hierauf kam ich nämlich, als ich mikroskopische Schnitte der Magenschleimhaut in Pikrocarmin färbte und dabei folgendes nicht uninteressante Factum constatirte. Die Drüsenzellen des Pylorus nämlich nahmen stets eine andere Nuance an, als die mit ihnen völlig identischen Hauptzellen des Fundus. Erstere zeigten sich je nach der Dauer der Anwendung und Concentration der Färbeflüssigkeit rosa bis carmoisin, letztere schwach gelb bis orange. Da es nahe lag, die Ursache der verschiedenen Färbung auf eine verschiedene Reaction der sonst völlig gleichen Gebilde zu beziehen, legte ich die Schnitte des Pylorus vorher kurze Zeit in verdünnte Säuren (Essigsäure, Salzsäure) und färbte sie nachher unter übrigens ganz gleichen Bedingungen, wie die übrigen Schnitte in Pikrocarmin. Und es zeigte sich, dass die künstlich angesäuerten Hauptzellen des Pylorus eine

keine überschüssige Pikrinsäure enthalten darf) tingirte, jetzt aber durch eine gewöhnliche ammoniakalische Carminlösung färbte. Die Operation gelingt sehr leicht und unfehlbar, da das Fibrin eine grosse Affinität zu besagtem Farbstoff besitzt, ihn selbst aus schwachen Lösungen auszieht und in sich aufnimmt. 12 bis 24 Stunden genügen in der Regel, wenn nicht zu schwache Concentrationen und zu geringe Mengen färbender Flüssigkeit angewendet worden sind, Fibrinflocken durch und durch gleichmässig zu färben, so dass sie nachträglich mit Wasser abgespült und übergossen, keine Farbe mehr verlieren. Eigenthümlich ist hierbei, dass unter der grossen Masse gleichmässig gefärbter Flocken hin und wieder völlig ungefärbte gefunden werden, die selbstverständlich zu den betreffenden Versuchen nicht zu verwenden sind.

Dies gefärbte Fibrin nun, das man sich am besten in grösseren Mengen darstellt, habe ich, wie es v. Wittich für gewöhnliches Fibrin angiebt, in Glycerin aufbewahrt, bemerke jedoch gleich, dass diese Flüssigkeit nach längerer Dauer gern etwas Farbstoff auszieht, ein kleiner Uebelstand, dem durch Zusatz von etwas Essigsäure zu der Conservierungsflüssigkeit einigermassen abgeholfen werden kann.

Behufs des Versuches wird dieses Fibrin natürlich nochmals durch sorgfältiges Abspülen von seinem Glycerin befreit, dann mit der etwa 5fachen Menge Salzsäure von 0,2 pCt. übergossen und mit einer Scheere zerkleinert. Auf diese Weise erhält man nach einiger Zeit eine schön carmoisinroth gefärbte, durchscheinende, geleeartige Masse, die aus sehr kleinen, gleichmässig gequollenen Flöckchen bestehend, auch sehr leicht in kleine,

gelbe Farbe annahmen, ähnlich der, welche die Hauptzellen des Fundus schon an und für sich ohne Säurezusatz darboten. Was ist nun verführerischer als anzunehmen, dass gleiche Erfolge auch auf gleichen Ursachen beruhen und dass die Färbung der Hauptzellen im Fundus ebenfalls in Säureinfiltration ihren Grund findet? Wenn man nun aber — und diese Ansicht ist wohl jetzt ziemlich allgemein verbreitet — die Hauptzellen des Fundus als völlig gleich mit den Drüsenzellen des Pylorus betrachtet, so können erstere ihre saure Reaction lediglich ihrer Umgebung, d. i. den Belegzellen verdanken. — Indem ich nun weiter nachforschte, welche Gebilde in Pikrocarmin sich roth, welche sich gelb färbten, griff ich unter den Albuminaten das Fibrin heraus, gelangte so zu gefärbtem Fibrin, und indem ich sein Verhalten in Pepsinlösungen untersuchte, zu der oben genannten Methode.

gleich grosse Portionen — am besten auf Fliesspapier, welches die überflüssige Säure aufsaugt — zertheilt werden kann. Die Volumina dieser Portionen, welche ich für die Versuche verwende, betragen höchsten $\frac{1}{2}$ —1 Ccm. auf 15—20 Ccm. Verdauungsflüssigkeit.

Es galt nun zunächst die nur theoretisch construirte Methode practisch zu verwerthen und ihre Genauigkeit zu prüfen. Zu diesem Zwecke verwendete ich auf obige Fibrinmengen folgende aus einem Glycerinextract (Fundus, Hund) nach unserer Methode ¹⁾ bereiteten Verdauungsflüssigkeiten, welche in Probirgläschen vertheilt waren. Das Gläschen

Nr.	I	enthielt	0,1	Ccm.	Extract	+	3,1	Glycerin	+	15	Ccm.	HCl	v.	0,2	pCt.
»	II	»	0,2	»	»	+	3,0	»	+	»	»	»	»	»	»
»	III	»	0,4	»	»	+	2,8	»	+	»	»	»	»	»	»
»	IV	»	0,8	»	»	+	2,4	»	+	»	»	»	»	»	»
»	V	»	1,6	»	»	+	1,6	»	+	»	»	»	»	»	»
»	VI	»	3,2	»	»	+	0,0	»	+	»	»	»	»	»	»
»	VII	»	0,0	»	»	+	3,2	»	+	»	»	»	»	»	»

Schon nach 2 Minuten (die Verdauung geschah in Stubentemperatur) zeigten sich die Flüssigkeiten in den Gläschen, die das meiste Pepsin enthielten (V u. VI) deutlich gefärbt, und zwar in VI tiefer als in V. Nach 6—8 Minuten war Aehnliches auch an allen übrigen (mit Ausnahme von VII) zu constatiren und es bildeten die verschiedenen Flüssigkeiten eine Farbenscala, deren Anfangsglied (Nr. I) hellrosa, deren Endglied (Nr. VI) carmoisin zu nennen war. Nr. VII war nicht gefärbt; in ihm schwammen die rothen Flocken auch nach Stunden in farbloser Flüssigkeit.

Ganz analoge Resultate erhielt ich auch, als ich das Pepsinextract zunächst 10fach, ja 100fach verdünnte und dann dieselben Volumina, wie oben zum Versuch verwendete. Selbstverständlich treten in diesen Fällen die Farben resp. Farbenunterschiede erst viel später, $\frac{1}{2}$ —1 $\frac{1}{2}$ Stunde nach dem Einlegen der Flocken, auf. Wünscht man übrigens ein Resultat in kürzerer Zeit, so hat man die Verdauung natürlich nur in Brütwärme vor sich gehen zu lassen.

Man konnte also auf diese Weise sehr leicht die Wirkungen verschieden grosser Pepsinmengen demonstrieren und mit absoluter Sicherheit die pepsinarmen von den pepsinreichen Lösungen unterscheiden.

1) Ebstein u. Grützner dieses Archiv Bd. VIII, p. 126.

Wenn man nun aber umgekehrt verschiedene Verdauungsflüssigkeiten mit unbekanntem Pepsingehalt hat, ist man dann aus dem Auftreten der verschiedenen Farbentöne auch im Stande anzugeben, wieviel mehr Pepsin die eine Flüssigkeit enthält als die andere? Ueber diese Verhältnisse giebt natürlich so ohne Weiteres die „colorimetrische Methode“ ebenso wenig Aufschluss, wie irgend eine andere. Sehr leicht kann man sich aber darüber durch Vergleiche ein Urtheil bilden, wenn man feststellt, innerhalb welcher Zeit Lösungen von bestimmtem Pepsingehalt sowohl überhaupt erkennbar gefärbt, als auch innerhalb welcher Zeit sie gewisse, schon vorher präparirte Farbentöne annehmen. Wenn sich nun die fraglichen Lösungen mit unbekanntem Pepsingehalt diesen bekannten gleich verhalten, so ist man *ceteris paribus* berechtigt, ihnen denselben Pepsingehalt zuzuschreiben. Wenn also beispielsweise ein Salzsäureextract des Pylorus innerhalb derselben Zeit erkennbar roth wird und in gleichen Zeiten denselben Farbenwechsel zeigt, wie ein 30fach verdünntes Fundusextract, so schliesst man eben, dass diese beiden Extracte gleich viel verdauende Kraft enthalten, resp. dass das unverdünnte Fundusextract 30mal stärker ist, als das Pylorusextract.

Will man demgemäss nicht die Wirkung verschieden gewählter bekannter Pepsinmengen demonstrieren, sondern aus dem Auftreten der Farbentöne auf einen Mehr- oder Mindergehalt der verdauenden Potenz sich Schlüsse erlauben, so empfiehlt es sich 1. zu bestimmen, innerhalb welcher Zeit überhaupt die betreffende Flüssigkeit durch die gelösten Fibrinflocken erkennbar gefärbt wird, und 2. innerhalb welcher Zeit sie gewisse, schon vorher präparirte Farbentöne annimmt. Auf diese Weise gelangt man am schnellsten und sichersten zu genauen Resultaten.

Weiter sei noch erwähnt, dass wenn man lediglich sehr energisch verdauende Flüssigkeiten auf ihren Pepsingehalt untersuchen will, man gut thut, dieselben in starken Verdünnungen anzuwenden, weil dadurch die Zeiten, innerhalb deren gewisse Farbentöne auftreten, bedeutend vergrössert werden und so ein viel genaueres Urtheil möglich wird, als wenn alles Fibrin binnen der kürzesten Zeit sich löst und alle Flüssigkeiten sehr bald dunkelroth erscheinen.

Wenn ich nun schliesslich noch als selbstverständlich hinzu-

füge, dass dieses Verwischen der Farbenunterschiede bei allen Lösungen (auch bei den schwachen, wenn sie ihr Fibrin vollständig gelöst haben) nach einer bestimmten Zeit immer eintritt, so ergiebt sich aus all' den mitgetheilten Thatsachen über den Werth dieser colorimetrischen Methode etwa Folgendes:

1. Die Methode ist zunächst sehr einfach. Die Färbung des Fibrins bereitet durchaus keine Schwierigkeiten, und da auch weiterhin die Theilung desselben in gleiche Portionen — wenn es gleichmässig gequollen und gut zerkleinert ist — leicht von Statten geht, so macht sich die weitere Ausführung der Methode so zu sagen von selbst; man hat nämlich nur nöthig alle Gläschen in gewissen Zeitintervallen umzuschütteln und die Farbe des gelösten Fibrins in der Flüssigkeit gleichmässig zu vertheilen.

2. Die Methode giebt binnen der kürzesten Zeit Aufschluss über den Pepsingehalt von Flüssigkeiten. Wenn sie an Einfachheit vielleicht mit der Brücke'schen auf einer Stufe steht, so hat sie vor dieser doch die Schnelligkeit voraus, mit welcher sie uns — wenn die Pepsinmengen nicht gerade minimal sind — zu sichern Resultaten führt. Schon nach wenigen Minuten urtheilt hier das Auge mit absoluter Sicherheit über den Mehr- oder Mindergehalt von Pepsin, während bei der Brücke'schen Methode endgültige Urtheile über gleiche Verdauungsflüssigkeiten erst nach Stunden zu fällen sind. Aehnliches gilt natürlich in noch viel höherem Grade von der Gruenhagen'schen und namentlich von der Bidder und Schmidt'schen Methode.

3. Sie liefert sehr genaue Resultate, ja nach meinen Erfahrungen genauere, als jede der übrigen Methoden. Stellt man sich nämlich mehrere Pepsinlösungen her derart, dass ihre Pepsinmengen eine geometrische Reihe mit dem Exponenten 4 bilden, dass also jede nachfolgende Lösung immer 4mal mehr Pepsin enthält, als die vorhergehende, und bestimmt zunächst mittelst der Bidder und Schmidt'schen Methode die von ihnen verdauten Eiweissmengen, so wird man — ganz abgesehen von der Mühseligkeit des Verfahrens — deren Unterschiede sehr gering finden ¹⁾; prüft man ferner dieselben Verdauungsflüssig-

1) S. Ebstein und Grützner dieses Archiv Bd. VI, p. 11.

keiten vermittelt der Gruenhagen'schen Methode, so entspricht ganz gewiss nicht jedesmal — selbst bei sorgfältigster Vermeidung aller Fehlerquellen — einer grösseren Pepsinmenge auch eine grössere Menge von filtrirter Flüssigkeit und erforscht man schliesslich die Genauigkeit der Brücke'schen Methode mit denselben Prüfsteinen, so wird auch sie nicht ausnahmslos für die stärksten Lösungen die kürzesten Verdauungszeiten angeben, abgesehen natürlich von den schon durch Brücke bestimmten Grenzwerten, über welche hinaus überhaupt jene Beziehungen zwischen verdauender und verdauter Substanz nicht mehr gelten.

Derlei Unregelmässigkeiten sind mir nun bei meiner Methode, selbst wenn ich die Pepsinmengen nicht um das Vierfache, sondern immer bloss um das Doppelte anwachsen liess und selbstverständlich sorgfältig operirte, niemals vorgekommen, ja die colorimetrische Methode zeigte mir Unterschiede von Pepsinmengen an, die ich wenigstens durch keine der übrigen Methoden nachzuweisen im Stande war.

4. Meine Methode ist schliesslich, indem sie sehr leicht und sehr rasch zu genauen Resultaten führt, auch sehr demonstrativ und für Vorlesungsversuche ungemein geeignet.