

UC-NRLF



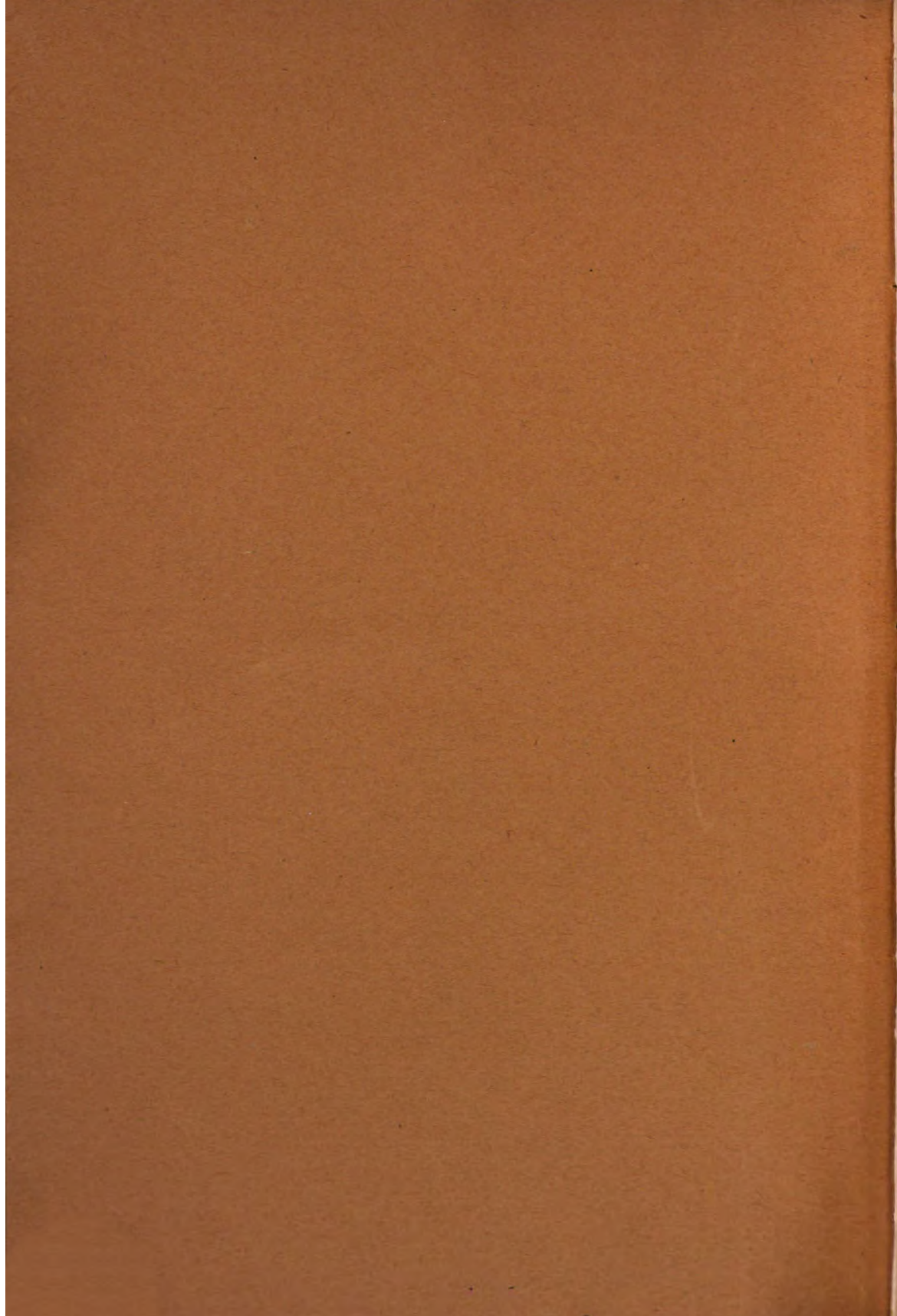
QB 650 561



EX LIBRIS

COLLEGE OF AGRICULTURE  
DAVIS, CALIFORNIA

~~PROP. OF B. MICHAELIS~~



# Biochemische Zeitschrift.

Herausgegeben von

**E. Buchner-Berlin, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., C. von Noorden-  
Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin**

unter Mitwirkung von

**L. Asher-Bern, J. Bang-Lund, P. Bergell-Berlin, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, Chr. Bohr-Kopenhagen, F. Ehrlich-Berlin, G. Embden-Frankfurt a. M., E. Freund-Wien, G. Galeotti-Neapel, H. J. Hamburger-Groningen, A. Heffter-Marburg, M. Jacoby-Heidelberg, R. Kobert-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, L. Langstein-Berlin, L. von Liebermann-Budapest, J. Loeb-Berkeley, A. Loewy-Berlin, J. A. Mandel-New-York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, L. Michaelis-Berlin, J. Morgenroth-Berlin, W. Nernst-Berlin, R. Pfaffner-Königsberg, Ch. Porcher-Lyon, F. Roehmann-Breslau, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, Zd. H. Skraup-Graz, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, E. H. Starling-London, H. v. Tappiner-München, H. Thoms-Berlin, J. Traube-Charlottenburg, A. J. J. Vandevelde-Gent, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.**

Redigiert von

**C. Neuberg-Berlin.**

Erster Band.

Mit vier Tafeln.

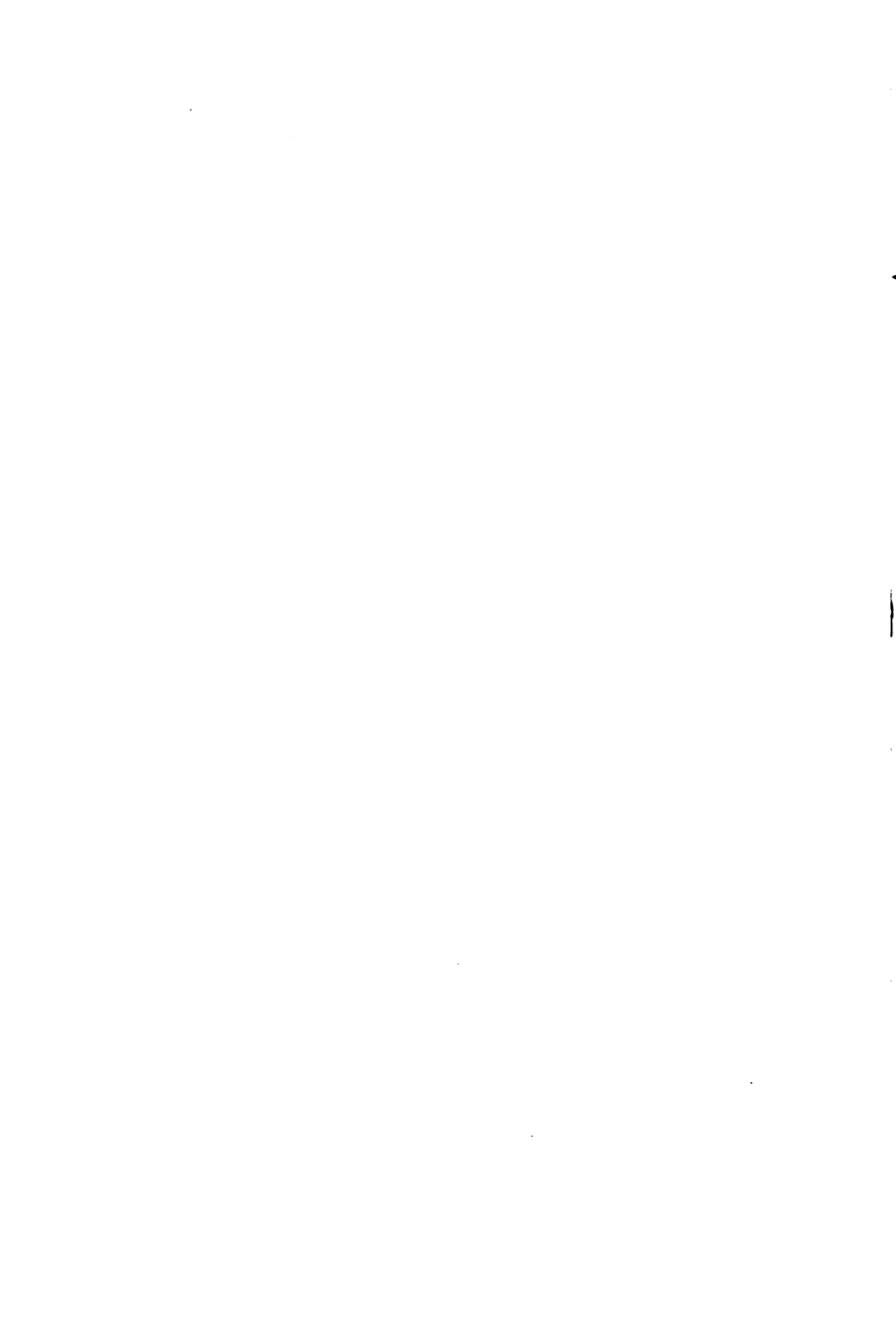


**Berlin.**

**Verlag von Julius Springer.**

1906.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA  
LIBRARY  
COLLEGE OF AGRICULTURE  
DAVIS



## Inhaltsverzeichnis.

	Seite
<b>Vandevelde, A. J. J.</b> Über die Anwendung von biologischen Methoden zur Analyse von Nahrungsstoffen . . . . .	1
<b>Ehrlich, Felix.</b> Über eine Methode zur Spaltung racemischer Aminosäuren mittels Hefe . . . . .	8
<b>Plesch, Johann.</b> Über objektive Hämoglobinometrie . . . . .	32
<b>Mayer, Paul.</b> Über die Spaltung der lipoiden Substanzen durch Lipase und über die optischen Antipoden des natürlichen Lecithins . . . . .	39
<b>Jacoby, Martin.</b> Über die Beziehungen der Verdauungswirkung und der Labwirkung . . . . .	53
<b>Bietschel, Hans und Leo Langstein.</b> Über das Vorkommen von Aminosäuren im Harn der Kinder . . . . .	75
<b>Mayer, Paul.</b> Über Lecithinzucker und Jekorin sowie über das physikalisch-chemische Verhalten des Zuckers im Blut . . . . .	81
<b>Willanen, K.</b> Über das Verhalten des Ovomukoids im Organismus . . . . .	108
— — Zur Frage über die Entstehung des Rhodans im Organismus . . . . .	129
<b>Blumenthal, Ferdinand.</b> Biochemische Untersuchungen über Vergiftung und Entgiftung bei der Lysolvergiftung . . . . .	135
<b>Bickel, Adolf.</b> Die Chemie der Superazidität und ihre pathologisch-physiologische Erklärung . . . . .	153
<b>Wohlgemuth, J.</b> Zur Chemie der Phosphorleber . . . . .	161
<b>Neuberg, Carl und Ernst Neimann.</b> Über gelatinöse anorganische Erdalkalisalze . . . . .	166
<b>Oppenheimer, Carl.</b> Über die Anteilnahme des elementaren Stickstoffes am Stoffwechsel der Tiere . . . . .	177
<b>Loeb, Jacques.</b> Versuche über den chemischen Charakter des Befruchtungsvorgangs . . . . .	183
<b>Rogozinski, Felix.</b> Über den Einfluß der Muskelarbeit auf Gewicht, Zusammensetzung und Wassergehalt der Organe des Tierkörpers . . . . .	207
<b>v. Drjewecki, Alexis.</b> Über den Einfluß der alkalischen Reaktion auf die autolytischen Vorgänge in der Leber . . . . .	229
<b>Manasse, Armand.</b> Über den Gehalt des Eidotters an Lecithin . . . . .	246

	Seite
<b>Zelmanowitz, C.</b> Über einen neuen Apparat zur Extraktion wässriger Flüssigkeiten mittels Äther, Ligroin usw. sowie anderer Lösungen mittels nicht damit mischbarer, spezifisch leichterer Solventien . . . . .	253
<b>Hamburger, H. J.</b> Eine Methode zur Bestimmung des osmotischen Druckes sehr geringer Flüssigkeitsmengen . . . . .	259
<b>Neuberg, Carl.</b> Synthese von Oxy- und Di-aminosäuren III. . . . .	282
<b>Wohlgemuth, J.</b> Berichtigung . . . . .	298
<b>Liefmann, E. und R. Stern.</b> Über Glykaemie und Glykosurie . . . . .	299
<b>Metalnikoff, S.</b> Über die Ursachen der Immunität gegen Tuberkulose bei der Bienenmotte ( <i>Galeria melonella</i> ) . . . . .	309
<b>Feigl, J. und H. Meier.</b> Biologisch-chemische Untersuchungen über das Chloroform (mit 4 Tafeln) . . . . .	317
<b>Wohlgemuth, J.</b> Über den Aminosäurenstoffwechsel des Gichtikers . . . . .	332
<b>Großmann, H.</b> Über die Bedeutung von Bleisalzen für die polarimetrische Untersuchung des Harns und der Gewebssäfte . . . . .	339
<b>Morgenroth, J. und D. Pane.</b> Über Beobachtungen reversibler Veränderungen an Toxinen . . . . .	354
<b>Scott, L.</b> Über Jodospongin . . . . .	367
<b>Neuberg, C.</b> Über die Entstehung optisch aktiver Fettsäuren in der Natur . . . . .	368
<b>Neuberg, C. und E. Ascher.</b> Über optisch-aktive $\alpha$ - $\beta$ -Diaminopropionsäure und $\beta$ -Thioglyzerinsäure . . . . .	380
<b>Sachs, Fritz.</b> Über den Wert der verschiedenen Farbenreaktionen zum Nachweis der Pentosen . . . . .	383
<b>Jonescu, D.</b> Über das Schicksal der Kresole im Organismus und ihren Einfluß auf den Stoffwechsel und die Darmfäulnis der Fleischfresser . . . . .	399
<b>Vandavelde, A. J. J.</b> Über Diffusion von Enzymen durch Cellulosemembrane . . . . .	408
<b>Pribram, Hugo.</b> Beitrag zur Kenntnis des Schicksals des Cholesterins und der Cholesterinester im tierischen Organismus . . . . .	413
<b>Busck, Gunnl.</b> Die photobiologischen Sensibilisatoren und ihre Eiweißverbindungen . . . . .	425
<b>Albu, Albert und Carl Neuberg.</b> Chemisches zur Carcinomfrage IV. Über ein Vorkommen von Indol im Mageninhalt bei Carcinom . . . . .	541
<b>v. Drjewecki, Alexis.</b> Berichtigung . . . . .	544
<b>Jonescu, D.</b> „ . . . . .	544



## **Über die Anwendung von biologischen Methoden zur Analyse von Nahrungsstoffen.**

Von

**Dir. Dr. A. J. J. Vandevelde (Gent-Belgien).**

(Mitgeteilt auf dem VI. Internat. Kongreß für angewandte Chemie,  
Rom 1906.)

*(Eingegangen am 24. April 1906.)*

Schon seit einigen Jahren habe ich die Giftigkeit von chemischen Verbindungen und von organischen Extrakten quantitativ untersucht, um die Grundprinzipien einer neuen biochemischen Dosierungsweise festzustellen. Für die Therapie scheint nämlich die Bestimmung der Gewichts-Konzentration der wirkenden Stoffe unzureichend zu sein; denn es wirken diese aktiven Stoffe nach der physiologischen Konzentration. Darum scheint es auch viel genauer, in der Nahrungsmittelchemie und in der Therapie die physiologische Konzentration zu bestimmen.

Viele chemische Methoden zur Dosierung von aktiven Verbindungen wie tierischen und pflanzlichen Extrakten, Alkaloïden, Antiseptics, Alkoholverbindungen, Essenzen u. s. w. sind schon veröffentlicht worden; die meisten dieser Methoden sind nachgeprüft worden und liefern genaue Ergebnisse. Dagegen sind andere von diesen Methoden, nämlich die zur Dosierung von Essenzen und von wässerigen und alkoholischen Extrakten vorgeschlagenen, sehr wenig zuverlässig. Außerdem genügen die Ergebnisse nicht immer zur Beurteilung der wahren Wirkungsweise der untersuchten Stoffe auf den lebenden Organismus.

Meine Untersuchungen<sup>1)</sup> über Plasmolyse und Hämolyse haben zu der Schlußfolgerung geführt, daß eine biochemische Dosierung der aktiven Stoffe möglich ist, und daß ferner die Anwendung einer großen Anzahl leicht zugänglicher lebender Individuen keine Schwierigkeit darbietet.

Drei Hauptfaktoren müssen bei solchen Bestimmungen in Betracht gezogen werden: die chemische Funktion der Stoffe, ihre Konzentration und die Variabilität der untersuchten lebenden Organismen. In den bis jetzt ausgeführten Untersuchungen scheint der letzte Faktor nicht genügend berücksichtigt zu sein, da die Zahl der untersuchten Individuen (Kaninchen usw.) gering ist; wenn man aber mit einer großen Anzahl experimentiert, dann können auch die Irrtumsursache und der dritte Faktor Variabilität ausgeschlossen werden.

Mit der Plasmolyse gelangte ich zu der Bestimmung von toxischen Koeffizienten mit zahlreichen nicht komplizierten Organismen, nämlich lebenden Pflanzenzellen<sup>2)</sup>; später wurden

<sup>1)</sup> Bepaling van de giftigheid der alcoholen (3. Vl. Natuur en Gen. Congres 1899).

Determination du pouvoir toxique (Arch. intern. pharmac. 1900).

Giftigheid der vluchtige oliën (4. Vl. Natuur en Gen. Congres 1900).

Une nouvelle méthode de détermination du pouvoir toxique (Ann. Soc. Médec. Gand 1900).

Giftigheidsgraad en plasmolyseerend vermogen (5. Vl. Natuur en Gen. Congres 1901).

Giftigheid van plantaardige en dierlyke uittreksels (ibid).

Over giftigheid van sterke dranken (Tijdschr. toegep. Scheik en Hygiene Amsterdam 1903).

Über die Bestimmung der Giftigkeit von Alkoholen und Essenzen (5. Intern. Kongreß angew. Chemie Berlin 1903).

Quelques applications des phénomènes critiques en biochimie (Bull. Soc. chim. Belgique 1903).

Giftigheid van anilinekleuren (7. Vl. Natuur en Gen. Congres 1903, und 8. ibid. 1904).

Application de la méthode plasmolytique au dosage des essences dans les spiritueux (Bull. denr. aliment. 1904).

Recherches sur les hémolysines chimiques (Bull. Soc. chim. Belgique 1905).

Über die Bestimmung der Giftigkeit chemischer Verbindungen durch die Bluthämolyse (Chemiker-Zeitung, I. und II. Mitt. 1905, III. Mitt. 1906).

<sup>2)</sup> Ber. V. intern. Kongr. angew. Chemie, Berlin 1903, Bd. III, S. 1060.

meine Untersuchungen mit Blutkörperchen fortgesetzt<sup>1)</sup>, und zwar auf solche Weise, daß nur die Funktion und die Konzentration der chemischen Verbindungen in Betracht gezogen werden brauchen.

Auf dem V. internationalen Kongreß für angewandte Chemie zu Berlin 1903<sup>2)</sup> habe ich die Resultate meiner Untersuchungen über die Giftigkeitsbestimmungen von Alkoholen und Essenzen mitgeteilt. Diese Bestimmungen habe ich nun einfacher durch die Anwendung der hämolytischen Eigenschaften der Blutkörperchen ausgeführt<sup>3)</sup>. Für jede Lösung der geprüften Verbindungen habe ich die minimalen Konzentrationen dieser giftigen Stoffe bestimmt, welche die Blutkörperchen auflösen; diese Verbindungen wirken ganz auf dieselbe Weise wie die Hämolytine<sup>4)</sup> der hämolytischen Sera, aber es sind die quantitativen Bestimmungen natürlich leichter auszuführen.

Die Lösung, in welcher die Blutkörperchen nach einer bestimmten Zeit [3 Stunden<sup>5)</sup>] nicht hämolytisch werden, wohl aber durch Zuführung der geringsten Spur der zu untersuchenden Stoffe, besitzt in dieser bestimmten Zeit keine giftigen Eigenschaften; diese Lösung habe ich, wie in meinen plasmolytischen Untersuchungen, die kritische Lösung genannt, und der Eintritt dieser Auflösung wird — wie bei den gewöhnlichen Bestimmungen mit Serum und Blutaufschwemmungen — in kleinen Probierröhren festgestellt.

Es wurden drei Lösungen bereitet: 1. eine Auflösung von 0,9 GV. % Kochsalz in Wasser; 2. eine Auflösung von 0,9 GV. % Kochsalz in Äthylalkohol (50 V. %) und 3. eine Aufschwemmung von 5 V. % defibriniertem Rinderblut in der wässrigen Kochsalzauflösung. Die alkoholische Flüssigkeit wird nicht allein zur Toxizitätsbestimmung des Äthylalkohols selbst benutzt, sondern auch zum Auflösen der zu prüfenden Verbindungen, deren Toxizität quantitativ mit der Toxizität des Äthylalkohols verglichen werden soll.

<sup>1)</sup> Chem.-Ztg. 1905, 29, Nr. 41 und 74; 1906, 30, Nr. 27.

) A. a. O.

<sup>3)</sup> A. a. O.

<sup>4)</sup> Bull. Société chim. Belgique, 1905, 19, S. 329.

<sup>5)</sup> Verschiedene Untersuchungen haben zu der Schlußfolgerung geführt, daß die nach 3 Stunden nicht hämolytisch bleibenden Flüssigkeiten gewöhnlich bis 10 Stunden diese Eigenschaften behalten.

In die Probierröhrchen wurden 1. 2,5 ccm von Mischungen wässriger und alkoholischer Kochsalzlösungen, und 2. 2,5 ccm der Blutaufschwemmungen hineingebracht; die Konzentrationen des Äthylalkohols wurden so berechnet, daß in den aufeinander folgenden Probierröhren die Alkoholmenge um je 0,5 V.‰ steigt. Die Blutaufschwemmungen wurden mit Rinderblut bereitet; jedoch gab auch Blut von anderen Tieren und Menschenblut dieselben Ergebnisse. Fötale Blut besitzt eine höhere Widerstandskraft, welche ich zahlenmäßig bestimmen konnte<sup>1)</sup>: gefunden wurde, daß menschliches fötales Blut eine Resistenz besitzt, welche mit 1 V.‰ Äthylalkohol die Resistenz normalen Menschenblutes übertrifft. Demnach könnte fötales Blut zu den Untersuchungen nicht benutzt werden.

Die Toxizitätsbestimmung für den Äthylalkohol führte zu den folgenden Ergebnissen bezüglich der Zusammensetzung der kritischen Lösung:

Blutaufschwemmung: 2,50 ccm.

Wässrige Kochsalzauflösung: 0,55 ccm.

Alkoholische (50 V.‰) Kochsalzauflösung: 1,95 ccm.

Die Berechnung für 100 ccm gibt 19,5 ccm, oder  $19,5 \times 0,7943 = 15,4888$  g absoluten Äthylalkohol.

In meinen Bestimmungen über alkoholische Auflösungen verschiedener chemischer Verbindungen wurde dieser Wert von 15,4888 g auf 100 zurückgebracht und auf diese Weise der toxische Koeffizient bestimmt, welcher ausdrückt, wie viel Gewichtsteile der untersuchten Verbindungen mit 100 Gewichtsteilen absolutem Äthylalkohol isotoxisch sind. Es wurden zum Beispiel für 1,5 GV. ‰-Lösung von Isopropylalkohol in Kochsalz-Alkohol (50 V.‰) die folgenden Resultate erhalten:

Die kritische Lösung enthielt in 5 ccm ein:

Blutaufschwemmung: 2,50 ccm,

Wässrige Kochsalzauflösung: 0,70 ccm,

Alkoholische Auflösung: 1,80 ccm,

Isopropylalkohol: 0,0270 g

und in 100 ccm:

Absoluten Äthylalkohol: 18,0 ccm oder 14,2974 g,

Isopropylalkohol: 0,5400 g.

<sup>1)</sup> Note sur un procédé de détermination de la résistance des globules du sang foetal (Ann. Soc. Médec. Gand 1905).

Da die kritische Lösung für Äthylalkohol allein 15,4888 g enthält, so sind

0,5400 g Isopropylalkohol und 15,4888 g — 14,2974 g = 1,1914 g Äthylalkohol isotoxische Werte, woraus der toxische Koeffizient  $\frac{0,5400 \times 100}{1,1914} = 45,32$  berechnet wurde. Dieses heißt: 45,32 g Isopropylalkohol besitzen die Giftigkeitskraft von 100 g absolutem Äthylalkohol.

Auf diese Weise wurden die folgenden Toxizitätskoeffizienten gefunden:

**Alkohole:**

Methyl > 100  
 Äthyl 100  
 Isopropyl 46,62  
 Isobutyl 28,79  
 Amyl 12,52  
 Heptyl 0,84  
 Octyl 0,89

**Aldehyde:**

Äthyl 13,37  
 Isobutyl 7,25  
 Heptyl 1,33

**Ketone:**

Dimethyl 23,59  
 Methyläthyl 13,37  
 Diäthyl 7,25  
 Dipropyl 2,71  
 Hexylmethyl 0,70

**Säuren:**

Ameisen 0,10  
 Essig 0,26  
 Propion 0,41  
 Butter 0,59  
 Valerian 0,30  
 Heptyl 0,26

**Ester:**

Ameisensäure-isopropyl 5,67  
 Propionsäure-methyl 5,67  
 Essigsäure-äthyl 11,31

Essigsäure-isobutyl 4,34  
 Isobuttersäure-äthyl 4,85  
 Propionsäure-isopropyl 5,19  
 Isobuttersäure-isobutyl 1,15  
 Heptylsäure-Heptyl 0,62

**Alkohole und Ester enthaltende Essenzen:**

Erdbeeröl, Himbeeröl, Johannisbeeröl, Aprikosenöl, Quittenöl, Apfelöl, Ananasöl, Birnenöl 4,78  
 Pfirsichöl 2,33  
 Kognaköl 0,22 und 0,28  
 Neroliöl 0,36  
 Terpeneoläthrol 0,42

**Aldehyde enthaltende Essenzen:**

Zimtsäurealdehyd 0,69  
 China Zimtöl 0,86  
 Ceylon Zimtöl 0,42  
 Benzaldehyd 2,33  
 Bittermandelöl 2,33  
 (Nitrobenzol 1,10)

**Ketone enthaltende Essenzen:**

Wermutöl, Carven 0,42  
 Karvol 1,10  
 Karviol 0,86.

Terpene enthaltende Es- senzen:	Phenole enthaltende Es- senzen:
Angelikawurzelöl 0,42	Anisöl, Sternanisöl 0,20
Angelikasamenöl 0,48	Anethol 0,22
Zitronenöl 0,69	Thymol 0,28
Zitronenäthrol 0,16	Weißes Thymianöl 0,36
Pfefferminzöl 0,48	Rotes Thymianöl 0,32
Menthol 0,58	Nelkenöl 0,69
Pfefferminzäthrol 0,32	Nelkenäthrol 0,36
Lavendeäthrol 0,20	Muskatöl 0,58.
Eucalyptusäthrol 0,32	

Diese Giftigkeitsbestimmungen finden in der Nahrungsmittelchemie eine praktische Anwendung, nämlich bei der biochemischen Dosierung höherer Alkohole und Essenzen. Wenn die Giftigkeit der untersuchten Stoffe annähernd dieselbe ist, wie für Anisöl und Sternanisöl, dann ist die Dosierung der totalen Essenzenmenge einfach. Die Methode<sup>1)</sup> habe ich für die Analyse von Anisette, welche gewöhnlich die zwei Essenzen Anis und Sternanis enthält, vorgeschlagen und ihr Verhältnis zu der belgischen Gesetzgebung<sup>2)</sup> klargestellt, welche in Spirituosen einen Gehalt an Essenzen und höheren Alkoholen von 3 g im Maximum zuläßt.

Auf diese Weise habe ich einen Giftigkeitskoeffizienten berechnet, welcher nicht überschritten werden darf; jedoch ist eine solche Bestimmung für jede Spirituosenart nötig, und es wäre natürlich wünschenswert, daß durch die Gesetzgebung ein einziger maximaler Koeffizient festgesetzt würde, welcher mit der biologischen Wirkung der aktiven Stoffe ganz in Einklang stände.

Auch für Anilinfarben ist, wie ich mit der Plasmolyse<sup>3)</sup> feststellen konnte, eine Giftigkeitsbestimmung möglich; die hiermit gefundenen Ergebnisse stimmen mit denen aus Prüfungen

<sup>1)</sup> Sur l'appréciation de la toxicité des spiritueux à essences par la méthode hémolytique. Bull. denr. aliment. Feb. 1906.

<sup>2)</sup> Belgique, Arrêté royal 22. Dec. 1905.

<sup>3)</sup> Handelingen VII. VI. Natuur en Geneesk. Congres Gent 1903, S. 86—95.

an höheren Tieren<sup>1)</sup> ziemlich genau überein; die Wirkung von Antiseptics und von Süßstoffen, welche zur Herstellung von Nahrungsmitteln benutzt werden, scheint mit der hämolytischen Methode leicht bestimmbar, und darüber hoffe ich in kurzem zu berichten.

Auf diese Weise kommt die Wichtigkeit der physiologischen Konzentration zum Ausdruck; analoge Untersuchungen an höheren Tieren und an Menschen, wie diese von Wiley und Bigelow<sup>2)</sup> vorgenommen sind, bilden natürlich in Hinblick auf die menschliche Hygiene wichtigere Ergebnisse, doch sind sie nicht immer anstellbar; in der Hämolyse besitzt man dagegen für solche vergleichenden Untersuchungen eine leicht und schnell ausführbare biochemische Methode, indem sich das defibrinierte sterile Blut wie ein echtes chemisches Reagens verhält.

---

<sup>1)</sup> Siehe G. W. Chlopin. Ber. V. intern. Kongreß angew. Chem. Berlin 1903, Bd. 4, S. 169.

<sup>2)</sup> Influence of food preservatives and artificial colors on digestion and health. I Boric acid and borax. U. S. departm. Agric. Bur. chim. Bull. 84, Part I, 1904, 1—477.

# Über eine Methode zur Spaltung racemischer Aminosäuren mittels Hefe.

Von  
Felix Ehrlich.

(Aus dem Institut für Zuckerindustrie in Berlin.)

(Eingegangen am 24. April 1906.)

Von den drei bekannten Pasteurschen Methoden<sup>1)</sup> zur Spaltung racemischer Verbindungen, nämlich der Auslese der kristallographisch verschiedenen Modifikationen, der Kombination der Racemkörper mit optisch aktiven Substanzen zwecks Differenzierung der Löslichkeitsverhältnisse der beiden Antipoden und schließlich der Zerstörung der einen Komponente durch die Tätigkeit niederer Lebewesen, hat die letztgenannte, die biologische Methode, relativ nur wenig praktische Anwendung erfahren. Sind auch die Möglichkeiten der Spaltung mittels dieser Methode ungleich mannigfaltiger als die des mechanischen Ausleseverfahrens, das bisher wohl überhaupt nur von Pasteur selbst am Natriumammoniumsalz der Traubensäure und von Piutti<sup>2)</sup> am Asparagin durchgeführt worden ist, so hat man allgemein doch mehr und mehr den chemischen oder eine Mittelstellung einnehmenden rein fermentativen Spaltungsverfahren den Vorzug gegeben und gerade in den letzten Jahren deren Ausbau das Hauptinteresse zugewendet.

Die Abneigung gegenüber der Anwendung der biologischen Methode bei chemisch-physiologischen Arbeiten ist vor allem

---

<sup>1)</sup> Ann. chim. [3] **28**, (1850); Ann. **88**, 213 (1853); Compt. rend. **46**, 616 (1858); **51**, 298 (1860).

<sup>2)</sup> Jahrb. f. Chem. 1886, 1343; 1887, 1660.



in ihrer Einseitigkeit begründet, die darin besteht, daß aus dem ursprünglichem Racemkörper immer nur die eine optisch aktive Komponente erhalten wird, während die andre, und zwar ausnahmslos stets die in der Natur vorkommende Modifikation, die dem physiologischen Chemiker gerade das größte Interesse bietet, der Vernichtung durch den betreffenden tierischen oder pflanzlichen Organismus anheimfällt. Außer dieser ihrem Wesen eigenen Unzulänglichkeit bietet nun die Methode bei ihrer Ausführung selbst meistens derartige Schwierigkeiten, daß man, wenn chemisch durchsichtige und gut durchgebildete Verfahren vorliegen, selten versucht sein wird statt dieser für die Zerlegung einer Racemverbindung zu der zerstörenden Tätigkeit eines Mikroorganismus seine Zuflucht zu nehmen. Ist schon die Beschaffung der geeigneten Pilz- oder Bakterienreinkultur, ihre richtige Aufbewahrung und Pflege für den in bakteriologischen Arbeiten Ungeübten eine keineswegs leichte Aufgabe, die häufig noch dadurch erschwert wird, daß die erforderlichen, meist recht kostspieligen Vorrichtungen hierfür in chemischen Laboratorien nicht immer gleich zur Hand sind, gelingt es endlich nach vielen Vorversuchen die für den Mikroben günstigsten Entwicklungsbedingungen auf einem zur Kombination mit der zu spaltenden Substanz geeigneten Nährboden ausfindig zu machen, so bietet selbst peinlich steriles Arbeiten nicht immer eine Garantie dafür, daß nach wochen-, ja monatelanger Einwirkung des Mikroorganismus die Spaltung wirklich im gewünschten Sinne verlaufen ist. Vielmehr kann sich dabei, wo für viele Beispiele aus der Literatur anzuführen wären, recht oft der Fall ereignen, daß durch Nebeninfektionen, Überwucherungen eines Pilzes durch den andern, Ausscheidung bestimmter Stoffwechselprodukte der angewandten Kleinlebewesen usw. in dem eigentlichen Spaltungsprozeß unkontrollierbare Störungen eintreten, die dadurch, daß sie die Hauptreaktion hindern oder die Spaltung nur partiell verlaufen lassen, leicht Anlaß zu irrümlichen Anschauungen über die wahre Größe des Drehungsvermögens der zu untersuchenden Substanz geben können. Schließlich ist auch die Isolierung der aktiven Verbindung aus der großen Zahl der nebenher gebildeten Umsatzstoffe des betreffenden Mikroben und der Nährlösung meist mit vielen Schwierigkeiten verbunden und dementsprechend

steht gewöhnlich die endlich erhaltene Ausbeute an reinem Produkt in keinem Verhältnis zu der aufgewandten Zeit und Mühe.

Trotz ihrer vielen Übelstände hat die biologische Spaltungsmethode, seitdem es Pasteur zum erstenmal gelang in einer mit Nährsalzen versehenen Lösung von Ammoniumracemat nach Aussaat von *Penicillium glaucum* Linksweinsäure zu erhalten, nun doch für die Kenntnis zahlreicher optisch aktiver Substanzen und ihrer physiologischen Beziehungen zu niederen und höheren Organismen unleugbar hervorragende Dienste geleistet.

Wie wichtig sind namentlich die Untersuchungen E. Fischers<sup>1)</sup> über die Einwirkung verschiedener Hefearten auf stereoisomere Zucker nicht allein für den Ausbau der Lehre vom asymmetrischen Kohlenstoffatom, sondern auch für die Praxis der physiologischen Hefeanalyse, für die Erkennung der einzelnen Spezies und Rassen<sup>2)</sup> und für die Erforschung der in ihnen tätigen Enzyme geworden!

Die von E. Fischer<sup>3)</sup> durchgeführten Vergärungen von racemischer Glukose, Mannose, Lävulose und Galaktose mittels Bierhefe, wobei stets die natürlich vorkommende d-Form angegriffen wurde, während die l-Form intakt blieb, können als die ersten typischen Beispiele einer vollkommenen biologischen Spaltung von Racemverbindungen zwecks Reindarstellung der einen aktiven Komponente angesehen werden, denen dann in späterer Zeit eine große Zahl von mehr oder minder erfolgreichen Versuchen an verschiedenartigsten Substanzen und mit mannigfachen Mikroorganismen, Hefen, Schimmel- und Spaltpilzen, Bakterien usw. unternommen folgten<sup>4)</sup>. Daß auch für höhere Organismen, Tier und Mensch, ähnliche, wenn auch bestimmt differenzierte Gesetzmäßigkeiten hinsichtlich des Spaltungsverlaufs racemischer Zuckerarten gelten müssen, zeigen die neuerdings von C. Neuberg und seinen Mitarbeitern

<sup>1)</sup> Ztschr. f. physiol. Chem. **26**, 60.

<sup>2)</sup> s. darüber Märcker-Delbrück, Handbuch der Spiritusfabrikation, 8. Aufl. 1903, S. 493 und P. Lindners „Mikroskopische Betriebskontrolle“; ferner Lindner, Wochenschr. f. Brauerei 1900, Nr. 49—51.

<sup>3)</sup> Ber. d. d. chem. Ges. **23**, 370 (1890).

<sup>4)</sup> Siehe darüber die Zusammenstellung von O. Emmerling in Lafars Handbuch der Technischen Mykologie, 2. Aufl. 1. Bd. 4. Abschn. 15. Kap.

durchgeführten Zerlegungen von inaktiver Arabinose<sup>1)</sup> und Mannose<sup>2)</sup>.

Die Mehrzahl der Spaltungen mittels Mikroorganismen, unter denen man außer der gewöhnlichen Hefe Schimmelpilze wie *Penicillium glaucum* und *Aspergillus niger* bevorzugte, wurden bei diesen Versuchen an stickstofffreien Substanzen bewirkt, von denen namentlich die den Kohlehydraten nahestehenden Verbindungen einen vorzüglichen Nährboden für die betreffenden Pilze abgaben. Von racemischen Säuren, die man durch Pilzgärung aktivieren konnte, sind außer der von Pasteur gespaltenen Traubensäure noch die Milchsäure<sup>3)</sup>, Glycerinsäure<sup>4)</sup> und Mandelsäure<sup>4)</sup> erwähnenswert. Doch sind gerade manche hierüber ausgeführte Arbeiten und viele andere biologischen Spaltungsversuche dieser Art chemisch nur von geringem Wert, da sich die betreffenden Autoren meist damit begnügten, nach einiger Zeit des Wachstums des betreffenden Pilzes eine optische Drehung der Nährlösung festgestellt zu haben, ohne die Isolierung der vermeintlich gespaltenen Substanz auch wirklich durchzuführen, wodurch naturgemäß für die Methodik des Verfahrens und die Charakterisierung der neuen aktiven Substanz nur wenig gewonnen war<sup>5)</sup>. Sehr wesentliche Förderung

<sup>1)</sup> C. Neuberg u. J. Wohlgemuth, *Ztschr. f. physiol. Chem.* **35**, 41 (1902).

<sup>2)</sup> C. Neuberg u. P. Mayer, *Ztschr. f. physiol. Chem.* **37**, 530 (1903).

<sup>3)</sup> J. Lewkowitsch, *Ber.* **16**, 2721 (1883). — Optisch aktive Glycerinsäure mit dem richtigen Drehungswert konnten durch Pilzspaltung erst späterhin Frankland u. Frew erhalten. *Chem. Soc.* **59**, 96 (1891).

<sup>4)</sup> J. Lewkowitsch, *Ber.* **15**, 1505 (1882); **16**, 1568 (1883).

<sup>5)</sup> Hierunter fällt auch die von Le Bel beschriebene Spaltung des *r*-Methyläthylkarbinols und seine Umwandlung in die Rechtskomponente mittels *Penicillium* (*Bull. soc. chim.* **25**, 545; **31**, 104. *Compt. rend.* **87**, 213). Bei seinen Versuchen ist nicht ausgeschlossen, daß Stoffwechselprodukte des Pilzes die gefundene Rechtsdrehung veranlaßt haben. Außerdem hat man bei der Hefegärung, wo doch ähnliche Verhältnisse obwalten, resp. in dem dabei entstehenden Fuselöl nie einen rechtsdrehenden Amylalkohol nachweisen können. Nachdem Marckwald u. v. Droste-Huelshoff (*Ber.* **33**, 560 [1899]) einen ähnlichen Irrtum Le Bels bezüglich seiner vermeintlichen Spaltung des Methyl-Äthyl-Propyl-Isobutylammoniumchlorids (*Compt. rend.* **112**, 724) aufgezeigt haben, erscheint auch die

erfuhr dagegen das biologische Spaltungsverfahren in seiner Methodik durch die Arbeiten von Ulpiani und Condelli<sup>1)</sup>, die für eine Reihe von Pilzen die Art und Weise der günstigsten Bedingung der Entwicklung und Spaltung festlegten, und schon vorher von Pfeffer<sup>2)</sup>, der zuerst nachwies, daß es auch Mikroorganismen gibt, welche die Linksweinsäure in vielen Fällen vor der Rechtsweinsäure bevorzugen und daß überhaupt in vielen Fällen nicht, wie Pasteur annahm, nur die eine Modifikation, sondern auch ihr optischer Antipode, wenn auch in bedeutend geringerem Maße, den Pilzen als Nährstoff dienen kann.

Durch ausgedehnte Untersuchungen an einer Reihe racemischer Oxyssäuren und durch genaue Nachprüfungen älterer Arbeiten konnten dann späterhin Mac Kenzie und Harden<sup>3)</sup> zeigen, daß ähnlich, wie es schon Fischers Studien<sup>4)</sup> der Enzymwirkungen voraussehen ließen, und nach analogen Gesetzen, wie sie auf chemischem Wege zuerst W. Marckwald und Mac Kenzie<sup>5)</sup> experimentell bei der Veresterung und Verseifung stereoisomerer Verbindungen aufgefunden haben, auch für die Spaltung von Racemkörpern durch niedere Lebewesen allgemein der Satz gilt, daß die Komponenten inaktiver Verbindungen verschieden angegriffen werden und daß diese Unterschiede im wesentlichen von der Reaktions- oder Angriffsgeschwindigkeit der einzelnen Komponenten abhängen.

Ist schon unter den mit stickstofffreien Substanzen vorgenommenen Versuchen die Anzahl der Fälle relativ gering, in denen wirklich eine vollständige Spaltung und die Reindarstellung des optisch aktiven Körpers gelang, so lassen sich für die stickstoffhaltigen Verbindungen überhaupt nur wenige Beispiele eines Spaltungsversuchs mittels Mikroorganismen anführen. Es kamen hier einzig und allein die Aminosäuren in Betracht, deren physiologische Wichtigkeit auch für niedere

---

erwähnte Arbeit um so mehr der Nachprüfung bedürftig, als sie sich seit Jahren durch die ganze Literatur hinzieht und selbst in die Lehrbücher übergegangen ist.

<sup>1)</sup> Gaz. chim. ital. **30**, 382 (1900).

<sup>2)</sup> Jahrb. f. wissensch. Botan. **23**, 206 (1895).

<sup>3)</sup> Proc. Chem. Soc. **19** (1903), 48.

<sup>4)</sup> Ber. **27**, 2992 (1894); Ztschr. f. physiol. Chem. **26**, 60; s. auch Ber. **32**, 3617 (1899).

<sup>5)</sup> Ber. **32**, 2130 (1899); **33**, 208 (1900); **34**, 469 (1901).

Lebewesen man früh erkannt hatte und deren großer Nährwert für eine ganze Reihe von niederen Pflanzen verschiedentlich festgestellt wurde<sup>1)</sup>.

Soweit sich aus der Literatur ersehen läßt, ist eine totale Spaltung einer racemischen Aminosäure durch Pilze bisher nur E. Schulze und seinen Mitarbeitern gelungen, die aus dem synthetischen Leucin<sup>2)</sup>, der Normalaminokapronsäure<sup>3)</sup> und der Glutaminsäure mittels *Penicillium glaucum* die entsprechenden Antipoden der natürlich vorkommenden aktiven Verbindungen mit dem vollen Drehungswerte erhalten konnten. Aber gerade aus ihren für die Kenntnis der Stereoisomerie der Aminosäuren so wichtig gewordenen Arbeiten erhellt die Schwierigkeit derartiger Spaltungsversuche, da außer der mühevollen Bereitung der Reinkultur und der Nährlösung und außer der recht diffizilen und langwierigen Sterilisierung der Proben eine Versuchsdauer von 5—12 Wochen und noch länger erforderlich war und auch nach Ablauf derselben die optisch aktive Verbindung nicht immer rein, sondern häufig mit dem Racemkörper gemengt gewonnen wurde.

Weitere Beispiele einer vollständig durchgeführten Pilzspaltung von Aminosäuren sind bisher nicht bekannt geworden. In allen übrigen Fällen, in denen es sich wohl häufig nur darum handelte das physiologische Verhalten einzelner Pilze gegen verschiedene Aminosäuren festzustellen und aus der nach kurzer Einwirkungsdauer erhaltenen Drehungsrichtung auf die bevorzugte Komponente zu schließen, verlief die Spaltung stets unvollkommen. Hierzu gehören die Beobachtungen Engels<sup>4)</sup>, daß durch Pilzvegetation racemische Asparaginsäure rechtsdrehend wird, und ähnliche Befunde von Menozzi und Appiani<sup>5)</sup> an der Glutaminsäure. E. Fischer<sup>6)</sup> konnte ferner zeigen, daß *Penicillium glaucum* oder besser *Aspergillus niger*

<sup>1)</sup> Czapek, Beitr. z. Physiol. u. Pathol. 1902, **1**, 538; **2**, 557; **3**, 47. O. Emmerling, Ber. **85**, 2289 (1902).

<sup>2)</sup> E. Schulze, Ber. **26**, 56 (1893); Schulze u. Boßhard, Ber. **18**, 388 (1885); Zeitschr. f. physiol. Chem. **10**, 134 (1886); Schulze u. Likiernik, Ber. **24**, 671 (1891).

<sup>3)</sup> Schulze u. Likiernik, Ztschr. f. physiol. Chem. **17**, 523 (1893).

<sup>4)</sup> Compt. rend. **106**, 1734 (1888).

<sup>5)</sup> Atti R. Acc. dei Lincei, 5. Ser., Bd. 1, 38 (1892).

<sup>6)</sup> Ber. **82**, 2459 (1899).

in r-Alaninlösungen wachsen, es ließen sich aber auf diese Weise nur 10% d-Alanin zum Verschwinden bringen und nicht viel bessere Resultate erzielten späterhin Mac Kenzie und Harden<sup>1)</sup> an derselben Aminosäure. Zirka 58% Racemkörper enthaltendes d-Cystin gewannen Neuberg und P. Mayer<sup>2)</sup> bei der Vergärung von r-Cystin mittels *Aspergillus niger*. Daß dagegen der höhere Organismus in der langen Kette seiner komplizierten Verdauungsprozesse wohl imstande ist von ihm dargebotenen racemischen Aminosäuren die eine natürlich vorkommende Komponente voll auszunutzen und zu verbrennen, während die andere in reiner Form wieder zur Abscheidung kommt, zeigten neuerdings in Fortführung der früheren Arbeiten C. Neubergs<sup>3)</sup> und seiner Mitarbeiter von Wohlgemuth<sup>4)</sup> angestellte Tierversuche.

Es ist klar, daß alle diese zumeist recht unvollkommen verlaufenen Spaltungen nur wenig dazu ermutigten dem biologischen Verfahren als Arbeitsmethode für die Darstellung und Erkennung optisch aktiver Aminosäuren Eingang in die Praxis der physiologischen Chemie zu verschaffen. Dem hier seit langem bestehenden Mangel haben die von E. Fischer geschaffenen Methoden gründlich abgeholfen, die auf der Zerlegung der racemischen Aminosäuren durch Kombination ihrer Benzoyl<sup>5)</sup>- oder Formyl<sup>6)</sup>-Derivate mit Alkaloiden und fraktionierte Kristallisation der erhaltenen Salzpaare beruhen. Mit ihrer Hilfe war es erst möglich die natürlich vorkommenden Aminosäuren künstlich zu bereiten, die dann weiterhin in Fischers Händen das Ausgangsmaterial zu seinen berühmten Synthesen der Polypeptide bildeten.

Wenn nach alledem ein Bedürfnis für die Einführung neuer Methoden zur Spaltung racemischer Aminosäuren, besonders soweit sie auf biologische Verfahren zurückgreifen, nicht vorliegt, so möchte ich im folgenden doch über eine

---

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

<sup>2)</sup> Ztschr. f. physiol. Chem. **44**, 508 (1905).

<sup>3)</sup> a. a. O.

<sup>4)</sup> Ber. **88**, 2064 (1905).

<sup>5)</sup> E. Fischer, Ber. **82**, 2451 (1900).

<sup>6)</sup> E. Fischer u. O. Warburg, Ber. **88**, 3997 (1905).

solche Methode berichten, die ich gelegentlich meiner Arbeiten<sup>1)</sup> über die Fuselölbildung der Hefe aufgefunden habe und die sich infolge ihrer äußerst leichten und ausgedehnten Verwendbarkeit bei Aufwand nur geringer Mittel, die zu ihrer Ausführung erforderlich sind, und durch ihren schnellen und vollständigen Verlauf für die Erkennung und Reindarstellung der einen Komponente natürlich vorkommender und auch anderer racemischer Aminosäuren bisher als sehr brauchbar erwiesen hat.

Die Methode beruht auf einer partiellen Vergärung der racemischen Aminosäuren in sehr kurzer Zeit durch viel Hefe in Gegenwart von Kohlehydraten.

Im Gegensatz zum tierischen und menschlichen Organismus vermag bekanntlich die Hefe, ähnlich wie viele andere niedere Pflanzen, natives Eiweiß nicht zu assimilieren, sondern sie bevorzugt zum Aufbau ihres Körpereißes gerade die löslichen diffusiblen Stickstoffkörper von kleinem Molekül. Daß die Hefe imstande ist, mit Ammoniak als alleiniger Stickstoffnahrung und Zucker als einzigem kohlenstoffhaltigem Material auszukommen und sich fortzuentwickeln, haben zuerst Pasteur<sup>2)</sup> und später einwandfrei Duclaux<sup>3)</sup> gezeigt und als wichtige Tatsache zur Stütze der vitalen Gärungstheorie Liebig entgegengehalten.

Während nun aber für eine ganze Reihe von Pilzen eingehende Untersuchungen hinsichtlich ihrer Assimilationsfähigkeit für organische Stickstoffkörper, insbesondere für einzelne Aminosäuren vorliegen<sup>4)</sup>, fehlen solche für die Hefen fast vollständig. Zwar weiß man, daß die in den natürlichen Maischen wohl hauptsächlich durch die Einwirkung proteolytischer Enzyme gelösten Amid- und Peptonsubstanzen ein wertvolles

---

<sup>1)</sup> F. Ehrlich, Über die Entstehung des Fuselöls, Ztschr. d. Vereins der deutschen Zuckerindustrie **55**, 539 (1905); Refer. Biochem. Zentralbl. 1905. Chem. Zentralbl. 1905 II, 156 und Vortrag auf der 77. Versammlung der Gesellschaft deutscher Naturforscher u. Ärzte 26. Sept. 1905; Refer. Chem. Ztg. 1905, 1044. An den betreffenden Stellen findet sich auch bereits eine vorläufige Mitteilung über die hier genauer veröffentlichte Methode.

<sup>2)</sup> Compt. rend. **47**, 1011 (1858).

<sup>3)</sup> Compt. rend. **58**, 1114; **58**, 450 (1864).

<sup>4)</sup> Czapek und O. Emmerling, l. c.

Aufbaumaterial für das Hefeeiweiß bilden, und unbewußt macht ja die Praxis der Preßhefefabrikation von dieser Kenntnis seit Jahren ausgiebigsten Gebrauch. Indes sind nur wenige Einzeluntersuchungen darüber veröffentlicht, welche organischen Stickstoffverbindungen die Hefe als Nährmaterial verschmährt und welche sie besonders bevorzugt. Im allgemeinen scheint man anzunehmen, daß unter den Bedingungen der technischen Gärung die Amide als Hauptstickstoffquelle für die Hefe dienen, nachdem Hayduck<sup>1)</sup> das in allen natürlichen Maischen weitverbreitete Asparagin in seiner hervorragenden Bedeutung für die Hefeernährung erkannt hat. Dagegen sind die Ansichten über den Nährwert der letzten Eiweißspaltungsprodukte, der Aminosäuren, für die Hefe bisher noch sehr wenig geklärt. Während die Beobachtung Heinzelmanns<sup>2)</sup> über die günstige Einwirkung der Diastase auf die Vermehrung des Hefepilzes nur in dem Sinne zu deuten ist, daß die stets in ihren Lösungen nebenher vorhandenen abgebauten Eiweißstoffe den Stickstoffansatz der Hefe fördern, glauben andere hervorragende Bakteriologen wie Ad. Mayer<sup>3)</sup> den Eiweißspaltungsprodukten, die zugleich Ausscheidungsstoffe der Hefe sind, wie dem Leucin, überhaupt jeden Nährwert als Stickstoffquelle für den Pilz absprechen zu müssen. Demgegenüber hat dann allerdings in neuester Zeit P. Lindner<sup>4)</sup> mittels seiner Tröpfchenkulturmethode zeigen können, daß gerade eine Reihe von stickstoffhaltigen Selbstverdauungsprodukten der Hefe, wie sie früher von Kutscher<sup>5)</sup> und Schenk<sup>6)</sup> isoliert sind, darunter besonders das Leucin, von den verschiedensten Heferasen sehr leicht assimiliert wird. Über das Verhalten der Hefe gegen racemische Aminosäuren sind schließlich bisher überhaupt keine Beobachtungen angestellt worden.

Nachdem ich bereits früher bei meinen Arbeiten über die Entstehung des Amylalkohols aus dem Leucin bei der

<sup>1)</sup> Ztschr. f. Spiritusindustrie **4**, 173 (1881).

<sup>2)</sup> Ztschr. f. Spiritusindustrie **20**, 236 (1897); **21**, 357 (1898).

<sup>3)</sup> In seinem Werke über die Gärungschemie 5. Aufl. 1902, S. 141.  
Siehe auch Märcker-Delbrück. 8. Aufl. 1903, S. 489.

<sup>4)</sup> Ztschr. f. Spiritusindustrie 1906, 459.

<sup>5)</sup> Ztschr. f. physiol. Chem. **32**, 53; **33**, 313.

<sup>6)</sup> Wochenschr. f. Brauerei 1905, 221.



Gärung<sup>1)</sup> die ungemein leichte Aufnahmefähigkeit des Stickstoffs dieser und anderer Aminosäuren durch die Hefe konstatieren konnte, lag es nahe, diesen Befund für eine Spaltung racemischer Aminosäuren zu verwerten, da anzunehmen war, daß ähnlich wie andere Pilze auch die Hefe bei der Assimilation vorzugsweise die eine Komponente angreifen würde. Diese Annahme traf auch in vollem Umfange zu. Impft man in einem Pasteurschen Kolben Hefezellen in eine Nährlösung der üblichen Zusammensetzung ein, die einen Überschuß an Kohlenhydraten und als ausschließliche Stickstoffnahrung die betreffende racemische Aminosäure z. B. *r*-Leucin enthält, so tritt zugleich mit der Vermehrung der Hefe eine Spaltung der Aminosäure ein, und man gewinnt bei richtiger Wahl der Versuchsbedingungen reines von Racemkörper freies *d*-Leucin. Wenn nun auch diese Spaltung infolge des viel intensiveren Wachstums der Hefe gegenüber manchen andern Mikroorganismen wesentlich schneller verläuft als bei den sonstigen zur Zerlegung von Racemkörpern vorgeschlagenen Pilzen, so haften diesem Verfahren doch alle Übelstände der bekannten biologischen Methode an, da es ebenfalls die Bereitung einer Nährlösung und eine umständliche Sterilisierung derselben erforderlich macht, die infolge der leichten Infektionsgefahr für die Hefe besonders peinlich durchgeführt werden muß, und da man schließlich doch nur bei Innehaltung bestimmter Vorsichtsmaßregeln und bei Anwendung geringer Substanzmengen gleichmäßige Erfolge erzielt.

Die weiteren Versuche ergaben dann, daß man wesentlich günstiger verfährt und die Spaltung viel schneller und gleichmäßiger zu Ende führen kann, wenn man nicht die Hefe sich erst während des Spaltungsprozesses bilden läßt, sondern gleich von vornherein einen Überschuß fertig gebildeter verhältnismäßig stickstoffarmer Hefe auf die betreffende racemische Aminosäure in der genügenden Menge reiner Zuckerlösung ohne jedwede sonstige Anwendung von Nährsalzen wirken läßt, wobei außer einer vollständigen Vergärung des Zuckers dadurch, daß die Hefe sich mit Stickstoff aus der Lösung sättigt, auch eine totale Vergärung der einen Komponente der Aminosäure ein-

---

<sup>1)</sup> A. a. O.

tritt, während der größte Teil der anderen nach Abfiltrieren der Hefe durch Eindampfen der Lösung gewonnen werden kann.

Um diesen Vorgang zu begreifen, muß man sich klar machen, daß die Hefe, je nachdem sie sich in Ruhe oder in Gärung befindet, je nach der Nährlösung, in der sie wächst, und je nach den äußeren Bedingungen, Sauerstoffzufuhr, Temperatur usw. in ihrer Trockensubstanz eine sehr verschiedene Zusammensetzung aufweist. Besonders labil ist ihr Stickstoffgehalt, der zwischen 5 bis 12 % N entsprechend 31 bis 75 % Eiweißgehalt der Trockensubstanz schwanken kann, da die Hefe stetig Stickstoff aus der Lösung aufnimmt und andererseits während der Gärung solchen in Form autolytischer Zersetzungsprodukte wieder abscheidet. Durch Arbeiten von Delbrück und Hayduck<sup>1)</sup> ist nun nachgewiesen, daß der Stickstoffgehalt der Hefe beträchtlich sinkt, wenn man die Hefe in einer nur wenig Stickstoffverbindungen enthaltenden Zuckerlösung bei Sauerstoffzufuhr sich vermehren läßt. Dagegen hört in einer stickstoffreichen Lösung bei geringer Lüftung die Hefevermehrung bald auf und dafür tritt eine Mästung der Hefe an Stickstoff ein, die ziemlich proportional dem Stickstoffgehalt der Nährlösung ansteigt und dann bei einer gewissen Grenze Halt macht. Aus diesen in der Praxis seit langen bekannten Tatsachen ist nun für die vorliegende Methode der Spaltung von Aminosäuren Nutzen gezogen worden, da, wie die späteren Versuche zeigen, die Anreicherung der Hefe mit dem Stickstoff der Aminosäuren auch in einer reinen Zuckerlösung ohne sonstige anorganische oder organische Nährsalze bei Luftabschluß mit großer Schnelligkeit scheinbar nach denselben Gesetzen verläuft wie in der technischen Maische.

Als Hefematerial erwies sich die im Handel jetzt leicht und billig zu erhaltende und bequem zu handhabende Preßhefe, die dank den verbesserten Reinzuchtmethoden von Hansen, Delbrück und Lindner heute in vorzüglicher Qualität gewonnen wird und verhältnismäßig stickstoffarm ist, als sehr geeignet. Speziell für die Mehrzahl der folgenden Versuche diente eine obergärrige Preßhefe der Klasse XII, die von der Berliner Hefenzuchtanstalt des Vereins der deutschen Spiritusfabrikanten

<sup>1)</sup> Ztschr. f. Spiritusindustrie 1873—1881, s. a. Märcker-Delbrück a. a. O.

in gleichmäßig äußerst reiner Form gewonnen wird und seit den letzten Jahren die Betriebshefe fast sämtlicher deutscher Kartoffelbrennereien und Preßhefefabriken bildet. Für die stets bereitwillige gütige Überlassung der Hefeproben bin ich dem Institut für Gärungsgewerbe zu größtem Dank verpflichtet. Über die Herstellung dieser Hefe<sup>1)</sup> sei hier nur soviel mitgeteilt, daß die Hefereinkultur in einem Lindnerschen Hefereinzuchtapparat in einer mit Roggen versetzten und zwecks Sterilisation zuvor mit Milchsäurebakterien gesäuerten Darrmalzwürze unter Lüftung der Vermehrung überlassen wird. Die fertige Hefe wird in Zentrifugen von der vergorenen Würze befreit, nochmals mit Wasser gewaschen, in Filterpressen völlig abgepreßt und dann in sterilen Blechdosen verpackt. Der in dieser Form in den Handel gebrachten Preßhefe haften nur äußerst minimale Spuren der sehr dünnen Würze an, aus der sie gewonnen war. Mehrfache Analysen zeigten eine ziemlich regelmäßige Zusammensetzung der Hefe. Ihr Trockensubstanzgehalt betrug durchschnittlich 25 %, die Menge der Asche 2,2 %, die des Stickstoffs im Mittel 2 %, sodaß die Trockensubstanz ca. 8 % Stickstoff aufwies. Entsprechend diesem geringen Stickstoffgehalt, der sich aus der Herstellungsweise ergibt, zeigte die Hefe für Aminosäuren aller Art ein sehr hohes Assimilationsvermögen. Nicht minder günstig für die Spaltungsversuche wirkte die von derselben Hefezuchtanstalt gewonnene, mir ebenfalls gütigst überlassene Heferasse II, nur mit dem Unterschiede, daß diese bei der Gärung mitunter eine sehr heftige Schaumbildung veranlaßte. Späterhin zeigte es sich dann, daß es durchaus nicht unbedingt nötig ist mit derartig reinsten Hefen zu arbeiten, sondern daß man auch vollkommene Spaltungen racemischer Aminosäuren mit Hilfe gewöhnlicher reiner Bäckerhefen, die ja jetzt schließlich sämtlich den beiden obenbezeichneten Mutterhefen ihr Dasein verdanken, erzielen kann. Der Zusatz von 10—15 % Stärkemehl, den dieselben zumeist enthalten, ist der Ausführung des Verfahrens in keiner Weise hinderlich<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Siehe darüber Märcker-Delbrück a. a. O. S. 570 und P. Lindner in Lafars Handbuch der Technischen Mykologie, 2. Aufl., 5. Bd., 10. Kap., § 69, S. 266.

<sup>2)</sup> Auch mit untergäriger Bierpreßhefe lassen sich racemische Aminosäuren in der gleichen Weise, wie später angegeben, leicht spalten. Doch

Was die Praxis der Methode weiterhin anbelangt, so ist der größte Wert auf die richtige Abmessung der Mengenverhältnisse der Aminosäuren, des Zuckers und der Hefe zu legen. Vor allem ist stets ein beträchtlicher Überschuß an Hefe anzuwenden, um die vollständige Aufnahme des Stickstoffs der einen Komponente der Aminosäuren zu ermöglichen und gleichzeitig den vorhandenen Zucker durch die Gärung restlos zum Verschwinden zu bringen. Andererseits darf auch die Menge des Zuckers nicht zu gering bemessen werden, da die Hefe mit dem Aufhören der Gärung auch ihre Stickstoffassimilation einstellt und die Spaltung dann event. leicht unvollständig verlaufen kann.

Was die Ausführung der Methode im übrigen anbetrifft, so hat sich allgemein folgendes Verfahren für die Reindarstellung der einen optischaktiven Form der Aminosäuren bewährt:

10 g der zu spaltenden Aminosäure werden zusammen mit 200—300 g Zucker, am besten gewöhnlicher Raffinade des Handels, in einem geräumigen Stehkolben in 2—3 Liter Leitungswasser gelöst. Bei schwerer löslichen Aminosäuren wird die Lösung durch Erwärmen beschleunigt. Ein längeres Erhitzen zum Zwecke der Sterilisation, das in den ersten Versuchen peinlich durchgeführt wurde, hat sich späterhin als vollkommen zwecklos erwiesen, da der große Überschuß der angewendeten Hefe und die während der Gärung schnell eintretende Milchsäuerung sehr bald alle nebenher eingedrungenen Keime vernichtet, so daß nach vollendeter Gärung höchstens einige Milchsäurestäbchen in der Maische mikroskopisch nachzuweisen waren. In die event. abgekühlte Lösung wurde dann die erforderliche Hefemenge eingetragen, wobei etwa im Kolbenhals anhaftende Hefeteile mit destilliertem Wasser in die Flüssigkeit hinuntergespült wurden. Als Hefe diente gewöhnlich frisch in der Hefezuchtanstalt hergestelltes, direkt von dort bezogenes Versuchsmaterial, das den Büchsen mit einem Metallspatel entnommen wurde. Später zeigte es sich, daß man auch ebensogut längere Zeit, sogar bis zu vier Wochen, an einem

---

bietet die Anwendung einer derartigen Hefe gegenüber den oben bezeichneten keine weiteren Vorteile, da Bierpreßhefe im Handel weniger leicht zugänglich und von anhaftender Würze nicht immer vollständig befreit ist.

kühlen Ort nicht zu feucht aufbewahrte Hefe verwenden kann, vorausgesetzt, daß die Schimmeldecke, die etwa währenddessen das Hefegut überzogen hat, nicht zu tief eingedrungen und vor der Entnahme der Hefe sorgfältig entfernt worden ist. Die zur totalen Spaltung von 10 g Aminosäure erforderliche Hefemenge von der eben beschriebenen Qualität betrug durchschnittlich 50—150 g. Diese Hefemenge steigt nicht durchweg proportional dem Stickstoffgehalt der Aminosäuren an, sondern scheint auch sehr wesentlich von der Konstitution der einzelnen Säuren abzuhängen, da oft Aminosäuren von gleicher Bruttoformel, aber verschiedener Struktur sehr wesentliche Differenzen in der zur totalen Zerlegung nötigen Quantität Hefe bei gleichbleibender Zuckermenge aufweisen. Ich hoffe späterhin auf diese interessanten Verhältnisse an der Hand größerer Versuchsreihen eingehen zu können. Bisher war es mir nur möglich  $\alpha$ -Aminosäuren zu untersuchen.

Nach dem Eintragen der Hefe wird der Kolben mit einem Schwefelsäuregärverschluss versehen, einige Zeit heftig geschüttelt und dann bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Einstellen in einen Brut- oder Gärschrank oder Konstanthalten der Gärtemperatur ist hierbei vollkommen unnötig, da die gewöhnlichen Temperaturschwankungen im Laboratorium keinen Einfluß auf die Gärung haben. Die meisten Gärungen verliefen innerhalb 15—25 ° C. Höhere Temperaturen sind sogar möglichst zu vermeiden, da hierbei leicht mehr Hefesubstanz infolge gesteigerter autolytischer Tätigkeit in Lösung gehen kann. Die Gärung setzt gewöhnlich 10—15 Minuten nach dem Eintragen der Hefe sehr heftig ein und verläuft am ersten Tage besonders stürmisch, wobei sich die vorgelegte konz. Schwefelsäure gelb färbt. In fast allen Fällen war die Gärung innerhalb 48 bis 36 Stunden vollkommen beendet, manchmal sogar bereits in 24 Stunden, was sich schon äußerlich durch Absetzen der Hefe und durch Aufhören der Kohlensäureentwicklung beim Schütteln des Kolbens kundgab. Eine unter Zusatz von aufgeschlämmtm Tonerdehydrat filtrierte hefefreie Probe reduzierte dann gewöhnlich Fehlingsche Lösung nicht mehr und gab auch keine Naphthol-Reaktion. Andernfalls wurde die Gärung bis zum Verschwinden der Reaktionen fortgesetzt. Von der zum größten Teil abgesetzten Hefe wurde sofort nach beendeter

Gärung die überstehende Lösung abgehebert und die zurückbleibende Hefe auf ein großes Filter gespült und mit wenig Wasser gewaschen. Die abgeheberte Lösung wurde dann zusammen mit dem trüben Filtrat nach Zusatz von Tonerdebrei oder Kieselgur noch einmal filtriert, wobei stets eine klare, blanke Lösung resultierte. Handelte es sich nur um geringere Mengen Hefe, so wurde die vergorene Lösung nach kräftigem Schütteln gleich direkt auf ein großes Filter, am besten in einem innen gerieften Trichter, gegeben, die Lösung über Nacht abtropfen gelassen und am nächsten Tage das Filter mit wenig Wasser ausgewaschen. Die filtrierte Lösung wurde dann wie oben geklärt. Die reine vergorene Flüssigkeit zeigte durchschnittlich stets einen normalen Säuregehalt, der pro 100 ccm 1—2 ccm  $\frac{1}{1}$  N.-KOH entsprach. Sie gab niemals eine Biuret-Reaktion und die Millonsche Reaktion meist nur sehr schwach. Sie wurde nunmehr in einer geräumigen Porzellanschale direkt auf freier Flamme bis zu 100—200 ccm eingedampft, dann nochmals von etwa ausgeschiedenen Trübungen oder Flöckchen event. unter Zusatz von Tierkohle filtriert und schließlich auf dem Wasserbade zum dünnen Sirup eingengt<sup>1)</sup>. Bei Aminosäuren wie Leucin erfolgte die Kristallisation bereits während des Eindampfens, bei fast allen andern während des Abkühlens des Sirups unter Reiben mit einem Glasstab. Nach eintägigem Stehen wird die Kristallmasse über Papier oder Filz auf einer Nutsche scharf abgesaugt und durch Pressen auf Ton von den letzten Resten anhängender Mutterlauge befreit. Die weitere eingedampfte Mutterlauge ergibt gewöhnlich noch eine kleine Kristallmenge. Die auf Ton getrocknete Aminosäure war nach einmaligem Umkristallisieren vollständig rein und zeigte, im Falle die Racemverbindung einer natürlich vorkommenden Aminosäure angewandt war, bei richtiger Wahl

---

<sup>1)</sup> Im Falle Gefahr vorlag, daß sich die aktive Aminosäure beim Eindampfen der vergorenen Lösung unter der Einwirkung der bei der Gärung entstandenen geringen Mengen Milchsäure wieder racemisieren konnte, wurde die Flüssigkeit zuvor mit der aus der Titration gegen Lackmus berechneten Quantität Kali- oder Natronlauge neutralisiert. Doch hat sich diese Vorsicht bisher unter einer großen Zahl von Aminosäuren nur in einem einzigen später zu beschreibenden Falle, nämlich bei der Methylaethylaminoessigsäure, als nötig erwiesen.

der ursprünglichen Menge von Hefe und Zucker die richtige Drehung des optischen Antipoden.

Ergibt die Drehung einen niedrigeren Betrag, ist also noch Racemkörper vorhanden, so läßt sich die vollständige Vergärung der einen Komponente leicht dadurch bewerkstelligen, daß man die Substanz von neuem mit Zucker und Hefe gären läßt und wie beschrieben wieder isoliert.

Parallelversuche mit reiner Hefe und reinem Zucker für sich vergoren ergaben nur braune Sirupe, aus denen keine kristallisierte Substanz, auch nicht nach langem Stehen, zu gewinnen war, so daß es ausgeschlossen erscheint, daß die gespaltenen Aminosäuren, die stets stimmende Analysenzahlen gaben, durch Substanzen aus der Hefe verunreinigt waren, zumal sich etwa anhaftender Sirup leicht durch Pressen auf Ton und Kristallisation entfernen ließ. Überdies war die Menge des aus der Hefe und dem Zucker stammenden Sirups, aus dem die Aminosäuren nach der Gärung auskristallisierten, nur sehr gering und betrug z. B. bei Anwendung von 250 g Zucker und 100 g Hefe für 10 g Leucin nur ca. 7 g. Wurde dagegen die Flüssigkeit, was sich im allgemeinen nicht empfiehlt, vor dem Abfiltrieren der Hefe erhitzt, so gingen beträchtliche Mengen Stickstoff in Lösung und es wurde viel mehr Sirup erhalten.

Im folgenden seien die bisher in der einfachsten Weise vollkommen gelungenen Spaltungen von *r*-Alanin, *r*-Leucin und *r*- $\alpha$ -Aminoisovaleriansäure des näheren beschrieben, denen später andere folgen sollen:

#### l-Alanin.

Um zu zeigen, welchen Einfluß bei gleichbleibender Zuckermenge eine wechselnde Menge Hefe auf die Spaltung ausübt, seien hier zwei Versuche mitgeteilt, von denen der erste, da die Hefemenge nicht genügend war, nur zu unvollkommener Spaltung führte.

I. 300 g Zucker (ungeblaute Handelsraffinade von 99,9° Pol.) wurden zusammen mit 10 g reinem synthetischen *r*-Alanin in 2 $\frac{1}{4}$  Liter destilliertem Wasser gelöst und die Lösung nach Verschuß des Kolbens mit einem Wattebausch durch 2-stündiges Kochen sterilisiert. Nach dem Abkühlen wurde die Flüssigkeit mit 100 g frischer Preßhefe versetzt und nach Aufsetzen eines Gärverschlusses

und Schütteln des Kolbens zur guten Verteilung der Hefe bei Zimmertemperatur von 20—22° der Gärung überlassen. Dieselbe war in 3 Tagen beendet. Die obstähnlich riechende Lösung wurde von der Hefe durch Filtration befreit und eingedampft. Aus der mit Wasser gewaschenen Kristallmasse resultierte 7,8 g braungefärbtes Rohprodukt, das beim Umkristallisieren 3,5 g reine Substanz ergab. Zur Bestimmung der Drehung wurde dieselbe in das Hydrochlorat verwandelt.

1,0246 g Salzsäures Alanin in Wasser gelöst; Gesamtgewicht der Lösung 11,0398 g. Prozentgehalt 9,08. Spezif. Gew. 1,027. Drehung im 2-dm-Rohr bei 24° und im Natriumlicht: — 1,34°.

$$[\alpha]_D^{24} = -7,18^\circ.$$

Da nach E. Fischer<sup>1)</sup> die Drehung des reinen l-Alanins  $[\alpha]_D^{20} = -9,68^\circ$  beträgt, enthält das hier dargestellte optisch aktive Alanin also noch ca. 26% Racemkörper.

Weit günstiger verlief der zweite Versuch auch hinsichtlich der Einzelheiten der Ausführung des Verfahrens.

II. In einem 4 Liter-Kolben wurden 300 g Zucker mit 10 g r-Alanin in 2½ Liter Leitungswasser zusammen gelöst und sofort in die Lösung ohne jede Sterilisation 150 g ganz frische am selben Tage bezogene Preßhefe eingetragen. Die anfangs stürmisch verlaufene Gärung ist am dritten Tage beendet. Die von der Hefe abfiltrierte Flüssigkeit, die Fehlingsche Lösung nicht reduzierte und die Naphtol-Reaktion auf Zucker nicht mehr gab, wurde auf großen Trichtern über Nacht abfiltriert und das trübe Filtrat noch einmal mit Tonerdebrei geklärt. Die eingedampfte Lösung ergab, zum dünnen Sirup eingeeengt, direkt Bildung von Kristallen, die nach zweitägigem Stehen scharf abgesaugt und auf Ton getrocknet werden. Aus der Mutterlauge wurden bei weiterem Verdampfen ähnlich behandelt noch 0,5 g Substanz gewonnen, so daß im ganzen 3,6 g fast reinweißes Rohprodukt resultierte. Durch Lösen in wenig heißem Wasser und Füllen mit Alkohol ließen sich daraus 3,2 g reines l-Alanin herstellen, das bei 110° getrocknet wurde.

0,1354 g Subst.: 17,9 ccm N (18°, 764 mm).

C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> Ber. N 15,73

Gef. „ 15,44

<sup>1)</sup> Ber. **82**, 2457 (1899).



Zur Umwandlung in das Chlorhydrat zwecks Bestimmung der Drehung wurde 1 g der reinen Substanz in wenig verdünnter Salzsäure gelöst und die Lösung auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde auf Ton gepreßt und die so erhaltene weiße Kristallmasse in wenig absolutem Alkohol gelöst und mit viel Äther gefällt. Das auf diese Weise in Form feiner weißer Nadelchen erhaltene Chlorhydrat wurde nach dem Trocknen bei 110° zur Bestimmung der Drehung benutzt.

1,0251 g Alaninchlorhydrat in Wasser gelöst. 11,4257 g Gesamtgewicht der Lösung. Prozentgehalt 8,97. Spezifisches Gewicht 1,027. Drehung im 2-dm-Rohr bei Natriumlicht: — 1,81°.  $[\alpha]_D^{20} = -9,82^\circ$ .

Da E. Fischer als spezifische Drehung für l-Alanin bei einem Prozentgehalt der Lösung von 9,2996 und einem spezifischen Gewicht von 1,0278 die Größe  $[\alpha]_D^{20} = -9,68^\circ$  fand, so stimmt die hier beobachtete Drehung fast absolut und die Spaltung des r-Alanins durch die Hefe ist als eine total verlaufene zu betrachten.

Die Ausbeute an reinem l-Alanin beträgt ca. 65% der Theorie. Da aus den Sirupen der Mutterlaugen weitere Substanzmengen bisher nicht zu erhalten waren, muß angenommen werden, daß die Hefe außer d-Alanin auch l-Alanin zum Teil vergärt.

#### d-Leucin.

250 g Raffinade wurden zusammen mit 10 g r-Leucin in 2½ Liter Leitungswasser durch schwaches Erwärmen gelöst. In die abgekühlte Lösung wurde 100 g frische Preßhefe eingetragen. Die sehr intensive bei Zimmertemperatur verlaufene Gärung war bereits nach zwei Tagen vollständig beendet. Die vergorene Flüssigkeit roch sehr stark nach Amylester. Von der Hefe abfiltriert zeigte sie eine Azidität pro 100 ccm von 1,0 ccm ½ N · KOH gegen Lackmus. Die klare Lösung wurde in einer großen Porzellanschale auf dem Wasserbad verdampft bis auf ca. 200 ccm, dann filtriert und zum dünnen Sirup eingeeengt. Schon während des Eindampfens schieden sich kristallinische Blättchen ab, beim Erkalten erstarrte der Sirup zu einer Kristallmasse, die scharf abgesaugt und auf Ton gepreßt wurde. Der Sirup lieferte bei weiterem Verdampfen nach einigen Tagen noch einen Kristallansatz. Im ganzen wurde 4,75 g grauweißes Roh-

produkt gewonnen, aus dem nach Umkristallisieren aus Alkohol unter Zusatz von Wasser und durch Klären mit Tierkohle 3,8 g völlig reines d-Leucin zu erhalten war. Schmelzpunkt im geschlossenen Rohr 293°.

0,1513 g Subst.: 13,9 ccm N (19°, 763 mm).

0,1400 g Subst.: 0,2825 g CO<sub>2</sub>, 0,1250 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub> Ber. C 54,96 H 9,92 N 10,69

Gef. „ 55,04 „ 9,99 „ 10,67

Das erhaltene Leucin drehte in wässriger Lösung rechts, in salzsaurer Lösung links.

Zur Bestimmung der Löslichkeit wurde die Substanz 24 Stunden lang in einem Ostwaldschen Thermostaten bei 20° mit einer zur Lösung ungenügenden Menge Wasser geschüttelt. In 11,4882 g der filtrierten Lösung waren enthalten 0,2389 g Substanz. Es bedurfte demnach 1 Teil d-Leucin 48 Teile Wasser von 20° zur Lösung.

Dieselbe Lösung wurde vorher zur Bestimmung der direkten Drehung des d-Leucins benutzt<sup>1)</sup>.

Spez. Drehung des d-Leucins in wässriger Lösung.

0,2389 g des Leucin in Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 11,4882 g. Prozentgehalt 2,08. Drehung im 2-dm-Rohr im Natriumlicht bei 20°: + 0,43°.

$$[\alpha]_D^{20} = + 10,34^\circ.$$

Spez. Drehung des d-Leucins in salzsaurer Lösung.

0,6330 g Leucin in 20%iger Salzsäure gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 17,2806 g. Prozentgehalt 3,66. Spezifisches Gewicht 1,1. Drehung im 2-dm-Rohr im Natriumlicht bei 20°: — 1,24°.

$$[\alpha]_D^{20} = - 15,40^\circ.$$

<sup>1)</sup> Hiermit ist zum ersten Mal die Drehung des optisch aktiven Leucins in wässriger Lösung festgelegt. Bisher hat nur Lewkowitsch (Ber. 17, 1439) angegeben, daß das natürlich vorkommende Leucin in Wasser gelöst links dreht, ohne daß er die Größe der Drehung bestimmte. Wie die obigen Zahlen zeigen, ist die Drehung des aus reinem r-Leucin erhaltenen d-Leucin beträchtlich größer als man bisher annehmen mußte. Man wird diese Drehungsgröße in Kombination mit der Drehung in salzsaurer Lösung auch für die Bestimmung der Reinheit von l-Leucin vorteilhaft besonders da verwenden können, wo es sich darum handelt festzustellen, ob aktives Leucin rein vorliegt oder ob es mit Racemkörper, Isoleucin oder Amino-valeriansäure verunreinigt ist.

Da die Drehung des aktiven natürlich vorkommenden Leucins bisher nicht mit Sicherheit bekannt ist, so schien es gelegentlich der Bearbeitung dieser neuen Spaltungsmethode von Interesse, eingehender zu untersuchen, ob die obige Drehung in salzsaurer Lösung dem Leucin wirklich zukommt oder ob es etwa noch mit dem Racemkörper behaftet ist. Bereits bei meinem ersten Spaltungsversuch des Leucins gelegentlich meiner vorläufigen Mitteilung<sup>1)</sup> über diese Methode hatte ich eine mit der obigen fast übereinstimmende spezifische Drehung in salzsaurer Lösung  $[\alpha]_D^{17} = -15,26^\circ$  bei einem Prozentgehalt der Lösung von 4,05 gefunden, glaubte aber damals ein nur 87 % d-Leucin enthaltendes Leucin in Händen zu haben, da man nach den seit langen Jahren als richtig geltenden Drehungsbestimmungen Mauthners<sup>2)</sup> und E. Schulzes<sup>3)</sup> und seiner Mitarbeiter annehmen mußte, daß dem natürlichen l-Leucin ein Drehungswert von  $[\alpha]_D^{20} + 17,3^\circ$  bis  $17,8^\circ$ , also ein um  $2^\circ$  bis  $2,5^\circ$  höherer Betrag zukommt. Indes habe ich schon gelegentlich der Auffindung des Isoleucins<sup>4)</sup> darauf hingewiesen, daß alle bisher aus natürlichen Eiweißstoffen hergestellten Leucin-Präparate stets mit dem viel stärker drehenden Isoleucin verunreinigt gewesen sein müssen, und nach meinen jetzigen Erfahrungen unterliegt es keinem Zweifel mehr, daß auch die Präparate Mauthners und E. Schulzes Isoleucin enthalten haben, da es auf keine Weise möglich ist, Leucin durch Kristallisation oder selbst durch eine einfache Abscheidung über das Kupfersalz Isoleucin-frei zu gewinnen. Die Variierung der vorliegenden Spaltungsmethode auf reines Isoleucin-freies synthetisches Leucin angewandt gibt nun einen neuen Beweis für die Richtigkeit dieser Ansicht.

Bei der oben beschriebenen Spaltung des Leucins war nämlich absichtlich ein großer Überschuß von Hefe angewandt, um auf alle Fälle sämtliches l-Leucin zu zerstören und reines, von Racemkörper freies d-Leucin mit dem richtigen Drehungswert zu erhalten. Die Versuche wurden dann in

<sup>1)</sup> Ztschr. d. Ver. d. Deutsch. Zuckerind. 55, 560 (1905).

<sup>2)</sup> Ztschr. f. physiol. Chem. 7, 222 (1883).

<sup>3)</sup> Schulze und Bosshard, Ztschr. f. physiol. Chem. 9, 100 (1885); Schulze und Likiernick Ber. 26, 56 (1893).

<sup>4)</sup> F. Ehrlich, Ber. 37, 1809 (1904).

verschiedenster Weise variiert, wobei sich zeigte, daß man schon bei Anwendung derselben Menge Zucker von 250 g und 10 g r-Leucin auch statt mit 100 g Hefe mit der Hälfte, also 75 g derselben Hefe, auskommt und hierbei stets dieselben Drehungswerte für d-Leucin in wässriger und salzsaurer Lösung erhält.

Damit ist auf einem neuen Wege fast genau dieselbe Größe des Drehungsvermögens für aktives Leucin in salzsaurer Lösung, nämlich  $[\alpha]_D^{20} = -15,4^\circ$  festgestellt, die E. Fischer schon vor Jahren an d- und l-Leucin, das er nach seiner Spaltungsmethode über die Benzoyl-Verbindungen gewonnen, beobachtet hat<sup>1)</sup> und die er vor kurzem zusammen mit O. Warburg<sup>2)</sup> bei Anwendung der Formyl-Methode von neuem bestätigen konnte. Er fand nämlich, daß d- und l-Leucin in 20%iger Salzsäure um durchschnittlich  $15,6^\circ$  nach links resp. rechts dreht und konnte auch bei der Verfütterung von r-Leucin an Kaninchen nach dem Verfahren von Wohlgemuth aus dem Harn ein d-Leucin von der Drehung  $[\alpha]_D^{20} = -15,5^\circ$  isolieren.

Nachdem es mir in Gemeinschaft mit Herrn A. Wendel auf recht mühevolem Wege gelungen ist, nun auch aus dem Kasein ein von Isoleucin und Aminovaleriansäure freies l-Leucin mit dem spezifischen Drehungsvermögen  $[\alpha]_D^{20} = -10,35^\circ$  in wässriger Lösung und  $[\alpha]_D^{20} = +15,7^\circ$  in 20%iger Salzsäure rein zu gewinnen<sup>3)</sup>, scheint mir in Verbindung mit den obigen Befunden die Frage nach dem wahren spezifischen Drehungswert des Leucins definitiv in dem Sinne entschieden zu sein, daß die älteren Angaben hierüber aus der Literatur zu streichen und die auf verschiedensten Wegen neu ermittelten und bestätigten Zahlen an ihre Stelle zu setzen sind.

#### l- $\alpha$ -Aminoisovaleriansäure.



Mit dieser aus dem von Kahlbaum bezogenen Isobutylaldehyd nach der Cyanhydrin-Reaktion gewonnenen Amino-

<sup>1)</sup> Ber. **33**, 2377 (1900).

<sup>2)</sup> Ber. **33**, 4003 (1905).

<sup>3)</sup> Die Arbeit wird erst späterhin veröffentlicht.

säure habe ich bisher aus vorläufigem Mangel an Material nur einen Spaltungsversuch vornehmen können, der indes bereits zu einer links drehenden Aminosäure von fast demselben Drehungswert geführt hat, wie ihn für die natürlich vorkommende rechtsdrehende  $\alpha$ -Aminoisovaleriansäure E. Schulze und Winterstein<sup>1)</sup> und E. Fischer<sup>2)</sup> festgestellt haben. Ich möchte ihn daher mit dem Vorbehalt einer Nachprüfung hier ebenfalls mitteilen.

200 g Zucker wurden zusammen mit 6 g synthetischer  $\alpha$ -Aminoisovaleriansäure in 2 Liter Leitungswasser gelöst und die Lösung durch 3stündiges Erhitzen auf dem Dampfbad sterilisiert. Auf Zusatz von 60 g frischer Preßhefe trat sehr lebhaftes Gärung ein, die nach 4 Tagen, wie der negative Ausfall der Naphthol-Reaktion im Filtrat zeigte, vollständig beendet war. Die von der Hefe abfiltrierte Lösung gab beim Eindampfen zum Sirup nach kurzer Zeit Kristalle, die nach längerem Stehen abgesaugt und auf Ton getrocknet wurden. Die Menge des ursprünglichen und aus den Mutterlaugen gewonnenen Rohprodukts betrug 2,7 g. Beim Umkristallisieren aus Alkohol unter tropfenweisem Zusatz von Wasser wurden daraus 2 g weiße glänzende Blättchen erhalten, die bei 110° getrocknet im geschlossenen Rohr schnell erhitzt bei 293° unter Schäumen schmolzen.

0,1709 g Sbst.: 17,8 ccm N (22°, 747 mm).

$C_5H_{11}NO_2$  Ber. N, 11,97

Gef. „ 11,67.

Die Aminosäure löste sich bei 20° in 18,4 Teilen Wasser. Sie drehte in wässriger Lösung schwach, in salzsaurer Lösung stark nach links.

Spez. Drehung in wässriger Lösung.

0,7417 g Substanz in Wasser gelöst; Gesamtgewicht 13,6684 g. Prozentgehalt 5,43. Drehung im Natriumlicht bei 18° im 2-dm-Rohr: — 0,62°.

$$[\alpha]_D^{18} = -5,71^\circ.$$

<sup>1)</sup> Ztschr. f. physiol. Chem. **35**, 299 (1902).

<sup>2)</sup> Ztschr. f. physiol. Chem. **33**, 165 (1901).

## Spez. Drehung in salzsaurer Lösung.

0,7233 g Subst. in 20%iger Salzsäure gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 15,8431 g. Prozentgehalt 4,56. Spez. Gewicht 1,094.

Drehung im Natriumlicht bei 20° im 2 dm-Rohr: — 2,73°.

$$[\alpha]_D^{20} = -27,36^\circ.$$

Der Wert für die Drehung der Aminosäure in salzsaurer Lösung stimmt mit dem früher von Schulze und Winterstein sowie E. Fischer an der natürlich vorkommenden Aminovaleriansäure gefundenen  $[\alpha]_D = +27,9^\circ$  resp.  $+27,95^\circ$  gut überein, so daß anzunehmen ist, daß die Hefe die d-Komponente total assimiliert hat. Eine andere Frage, die bisher nicht entschieden werden konnte, ist allerdings, ob der zur Synthese benutzte Isobutylaldehyd tatsächlich ganz frei von isomeren Verbindungen war.

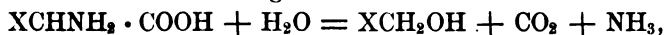
Schließlich sei hier noch darauf hingewiesen, daß bei dem Leucin und der Aminovaleriansäure ebenso wie beim Alanin außer der natürlich vorkommenden Komponente offenbar stets auch ihr optischer Antipode von der Hefe angegriffen wird, da, wie die Ausbeutezahlen zeigen, immer nur  $\frac{2}{3}$  bis  $\frac{3}{4}$  der theoretisch berechneten Menge der einen optisch aktiven Modifikation zu gewinnen war.

In ähnlicher Weise, wie es im vorstehenden für drei der bekanntesten Aminosäuren beschrieben ist, lassen sich nun nach mehrfach angestellten Vorversuchen noch eine ganze Reihe von racemischen Aminosäuren mit Hefe in kurzer Zeit partiell bis zur vollständigen Zerstörung der einen Komponente vergären. Zu diesen gehören u. a. die Asparagin-, Glutaminsäure und das Tyrosin, deren natürlich vorkommende Verbindung sehr leicht von der Hefe assimiliert wird. Auch in der Natur bisher nicht nachgewiesene synthetische Aminosäuren ließen sich mit gutem Erfolg spalten. So konnte ich gemeinsam mit Herrn Wendel die synthetisch gewonnene Methyläthylaminoessigsäure,  $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{matrix} \rangle \text{CNH}_2 \cdot \text{COOH}$ , das nächst niedere Homologe des Isoleucins, mittels Hefe in Gegenwart von Zucker in eine in wässriger und salzsaurer Lösung linksdrehende Substanz umwandeln, über die wir späterhin berichten werden. Sehr wesentliche Dienste hat mir das Verfahren auch bei der Trennung

des Gemisches aus d-Isoleucin und d-Allo-Isoleucin geleistet, wie es bei der Synthese aus d-Amylalkohol und bei der Umlagerung von dem natürlichen d-Isoleucin durch Barytwasser entsteht. Man braucht dieses Gemisch nur in der oben mehrfach angegebenen Weise vergären zu lassen, wobei das d-Allo-Isoleucin fast unangegriffen zurückbleibt und das d-Isoleucin nach Entziehung seines Stickstoffes durch die Hefe in d-Amylalkohol übergeführt wird.

Die hier beschriebene Methode, die vor den bisher bekannten biologischen Verfahren den Vorzug der Schnelligkeit und bequemen Anwendbarkeit bietet und im Prinzip der glatten Vergärung der Zucker durch Hefe ungemein ähnelt, bietet wohl vor allem den Vorzug, daß man mit ihrer Hilfe leicht und exakt ohne Gefahr der Wiederracemisierung synthetische oder bei der Eiweißhydrolyse partiell oder total racemisierte Aminosäuren auf ihren wahren Drehungswert untersuchen kann, und dürfte in dieser Hinsicht vielleicht auch einen gewissen diagnostischen Wert besitzen.

Zum Schluß sei darauf hingewiesen, daß man auch an der Hand dieser Methode das physiologische Verhalten der Hefe und Heferassen im allgemeinen und ihr Assimilationsvermögen für gewisse Aminosäuren chemisch wird einwandfrei feststellen und ein genaues Bild darüber wird erhalten können, ob die wichtige physiologische Reaktion der Alkoholbildung aus Aminosäuren nach der Gleichung:



die ich zuerst für das Leucin und Isoleucin aufzeigen und beweisen konnte, tatsächlich für alle Aminosäuren Bestand hat.

## Über objektive Hämoglobinometrie.

Von

**Dr. med. Johann Plesch, Budapest.**

(Aus dem Tierphysiologischen Institut der landwirtschaftlichen Hochschule in Berlin.)

*(Eingegangen am 28. April 1906.)*

Alle gebräuchlichen Hämoglobinometer haben den Fehler, daß die Genauigkeit der Resultate von der Farbenempfindlichkeit des Untersuchers abhängig ist. Bei den klinischen Methoden steigt die dadurch entstehende Ungenauigkeit bis zu 10% des wirklichen Hämoglobinwertes. Auch dem Spektrophotometer haftet derselbe Fehler, wenn auch in viel geringerem Grade an.

Bei einer objektiven Untersuchung soll die Konzentration einer Farbenlösung unabhängig vom Beobachter festgestellt werden. Ich gebrauchte zu diesem Zwecke das Selen.

Berzelius hat in dem Schlamm der Schwefelsäurefabrik zu Gripsholm i. J. 1746 das Selen entdeckt. Eine interessante Verwendbarkeit dieses Elements beruht bekanntlich auf der Eigenschaft, daß sich auf Belichtung seine elektrische Leitfähigkeit ändert.

Bevor ich auf die genauere Beschreibung dieser Eigenschaft eingehe, möchte ich noch die Unterschiede erwähnen, welche zwischen dem Selen und den ihm verwandten Elementen bestehen. Da das Selen dem Schwefel am nächsten steht, ist es am besten, diese zwei Elemente miteinander zu vergleichen.

Das Selen und der Schwefel kommen in drei verschiedenen Formen vor, von denen eine amorph und die zwei anderen kristallinisch sind. Das Selen ist weniger reaktionsfähig als



der Schwefel. Beide sind in Wasser und Alkohol unlöslich. In Kohlenstoffdisulfid, Chloroform, Pyridin, Benzol, Thiophen sind beide, aber das Selen schlechter als der Schwefel, löslich, wogegen die amorphen Modifikationen unlöslich sind. Lösen wir den Schwefel und das Selen in Schwefelkohlenstoff und setzen wir die Lösung der Wirkung der Sonnenstrahlen aus, so scheiden sich beide in der Form von sogenannten  $\beta$ -Kristallen aus. Schmelzen wir diese Kristalle, dann wandeln sie sich unter Wärmeabgabe (welche wahrscheinlich der absorbierten Lichtmenge äquivalent ist) in  $\alpha$ -Kristalle um und sind dann wieder in den angeführten Flüssigkeiten löslich. Das beste Lösungsmittel für S und Se ist das Schwefel- resp. Selenchlorid, aus welchen sie selbst bei intensivster Belichtung nicht ausfallen, und es ist darum wahrscheinlich, daß es sich hier nicht um eine physikalische, sondern um eine chemische Lösung handelt.

Es ist nicht ausgeschlossen, daß die bessere elektrische Leitfähigkeit auf einer bei Belichtung auftretenden Polymerisierung beruht, und es würde dies ein weiterer Beweis für die Richtigkeit des Gibsonschen Gesetzes sein, wonach das Licht fähig ist, schlechte elektrische Leiter in gute umzuwandeln. Da die Leitfähigkeitsänderung des Selens eine viel größere ist, als die des Schwefels, ist anzunehmen, daß das Selen eine größere Polymerisierungsneigung besitzt.

Die Erklärung für die Leitfähigkeitsänderung ist nicht einfach. Es bestehen zahlreiche Hypothesen, aber keine vermag diese Erscheinung nach allen Richtungen zu erklären. Unter den alten Autoren, die noch Anhänger der Newtonschen Lichttheorie waren, wollten einzelne die Erscheinung so deuten, daß das strahlende Fluidum durch die Moleküle dringt und die gesteigerte Leitfähigkeit durch das eingedrungene Fluidum bedingt werde.

Dieser Hypothese widerspricht die Tatsache, daß das Selen nach der Belichtung nicht sofort, sondern nur allmählich seinen ursprünglichen elektrischen Widerstand zurückbekommt.

Nach einer anderen Hypothese soll die Ursache der Erscheinung mit der schon erwähnten molekularen Änderung erklärt werden. Da aber bisher noch keine Verbindung bekannt ist, die sich momentan von der monomolekularen Form in

polymolekulare umwandeln und wieder momentan zurückverändern könnte, darf auch diese Hypothese nicht ohne weiteres angenommen werden.

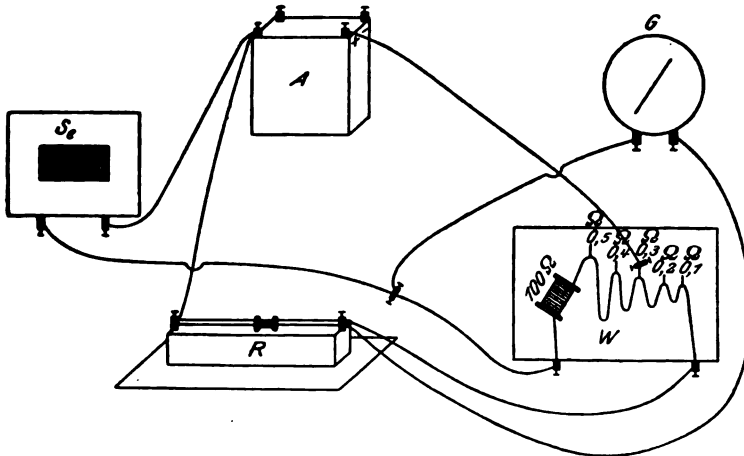
Die neuesten Autoren behaupten, daß das eigentliche lichtempfindliche Material nicht das Selen, sondern das Selenid wäre, welches bei der Herstellung der Zelle durch Schmelzen des Selens auf der Oberfläche des leitenden Metalldrahtes entsteht. Andere Autoren glauben, daß es sich um Thermostrome handelt, andere wieder fassen die Erscheinung als eine in einem Elektrolyt entstandene Lichthydrolyse auf.

Zur Entscheidung, ob es sich hier um Licht- oder Wärmewirkung handelt, ist die Lichtabsorption des Selens untersucht worden. Es stellte sich dabei heraus, daß das Absorptionsmaximum annähernd mit den *D*-Streifen des Natriums zusammenfällt, d. h. das von der Selenschicht ausgelöschte Licht enthält keine gelben Lichtstrahlen, da sie von dem Selen absorbiert werden. Wurde das längere Zeit mit gelbem Licht bestrahlte Selen untersucht, so zeigte es kaum eine Temperaturänderung, und somit wurde bewiesen, daß die gelben Strahlen nicht in Wärme umgewandelt wurden. Außer den gelben Strahlen werden die andern Strahlen ebenfalls von dem Selen im Sinne einer gewissen Kurve absorbiert, welche einer stumpfen, bei dem Natriumstreifen ihren Höhepunkt erreichenden und von da ab sich zurückbiegenden Parabel entspricht. Diese Absorptionskurve ist aber nicht exakt und allgemein gültig zu konstruieren, da sie von der Temperatur, von der Qualität und Größe der Zelle, sowie von der Reinheit des Selens abhängig ist. Bei denselben Bedingungen und bei derselben Selenzelle besteht aber das photochemische Gesetz, in dem das Absorptionsmaximum mit dem Maximum der Veränderung zusammenfällt.

Die beschriebenen Eigenschaften des Selens machen es für Bestimmungen der Hämoglobinkonzentration brauchbar. Es ist klar, daß das Lichtdurchlassungsvermögen einer Farblösung zu der Konzentration im umgekehrten und proportionalen Verhältnis steht und bei passender Einrichtung mit dem Selen zu bestimmen ist.

Die Versuchsanordnung beruht im wesentlichen darauf, daß ein Strom durch eine Selenzelle zum Galvanometer geleitet und

die Selenzelle von einer Lichtquelle beleuchtet wird, vor welcher die zu untersuchende Lösung steht.



Kompensationsschaltung der Selenzelle.

$Se$  = Selenzelle.  $A$  = Akkumulator.  $R$  = Schieber-Rheostat.  
 $W$  = Widerstandskasten.  $G$  = Galvanometer.

Die Selenzelle ist so konstruiert, daß der Gesamtwiderstand der belichteten Zelle möglichst herabgesetzt und ihre Lichtempfindlichkeit erhöht wird. Die von mir gebrauchte Zelle besteht aus einem Holzkasten, der mit einem umklappbaren Deckel lichtdicht verschließbar ist. In der Mitte des Kästchens ist eine rechteckige isolierende Platte angebracht, auf welcher ein feiner Kupferdraht aufgespult ist. Zwischen den Drahtfugen ist das Selen ausgebreitet. Am Kästchen sind zwei Anschlußklemmen, die mit dem aufgespulten Draht in Verbindung stehen. Die wirksame Fläche der Zelle ist  $30 \times 50$  mm groß und besitzt im ausgeruhten Zustande  $60000 \Omega$  Widerstand. Bei intensiver Bestrahlung mit 25kerziger Glühlampe sinkt dieser Widerstand bis  $2000 \Omega$ . Die maximale Strombelastung der Zelle ist ca. 20 Milliampere. Für unsere Zwecke genügt ein Akkumulator von 4 Volt Spannung.

Die Selenzelle wurde in einem vor Licht verschlossenen Kasten angebracht. Vor die Zelle kommt ein Diaphragma, um das seitliche Licht abzuhalten. Vor die Schaltung des Diaphragmas wird die zu untersuchende Lösung gestellt. Als Lichtquelle dient eine Lampe, die in der Achse der wirksamen

Selenfläche und Lumen des Diaphragmas aufgestellt wird. Um die Erhitzung und den Temperatureinfluß auf die Zelle zu vermeiden, muß die Lampe in einem andern Kasten untergebracht sein und event. die Lichtstrahlen durch einen Kühlapparat geleitet werden.

Die Schaltung ist, wie aus der Zeichnung ersichtlich, eine sog. Kompensationsschaltung und bei der Anordnung derselben konnte ich mich der Hilfe des Herrn W. Volkmann, Assistent am Physikalischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin, erfreuen. Wir probierten mit verschiedenen Schaltungen und versuchten auch mit dem Rheocord zu arbeiten, aber es konnte mit keiner die Empfindlichkeit erreicht werden, wie mit der angegebenen.

Sehr störend können Thermostrome sein, die aber durch Manganinleitung zu beseitigen sind. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, den richtigen Empfindlichkeitsgrad zu treffen. Es kommt dabei darauf an, das Galvanometer so einzustellen, daß der Ausschlag zwischen vollkommener Belichtung und Belichtung durch die Testlösung hindurch in dem Maße auf die Skala fällt, daß sie womöglich ganz ausgenutzt wird, denn je größer der Ausschlag ist, um so genauer wird die Ablesung und prozentische Konzentrationsbestimmung. Ist z. B. die Länge des Ausschlages 10 cm, so wird 1 mm ein Prozent der Testlösung anzeigen, ist der Ausschlag 50 cm, so entspricht 1 mm 0,2% usw.

Die Empfindlichkeit des Apparates ist durch den Widerstandskasten  $W$  (am zweckmäßigsten von 0,1 bis 100,0  $\Omega$ ), die Einstellung auf die Skala durch einen Schieberrheostaten ( $R$ ) leicht zu regulieren.

Die in der kurzen Zeit eines Versuches auftretenden geringen Schwankungen in dem Akkumulator kommen ebensowenig in Betracht wie die Lichtintensitätsschwankungen der Lichtquelle. Immerhin ist es zu empfehlen, als Lichtquelle einen Normalbrenner oder die noch konstantere Tantalbirne zu gebrauchen.

Zur Messung dient ein isoliertes Spiegelgalvanometer mit Fernrohrablesung und Skalaentfernung von ca. 1 Meter. Die Genauigkeit der Ablesung kann auch durch weitere Entfernung der Skala noch gehoben werden.

Bei einer Konzentrationsbestimmung hängt der Versuch hauptsächlich davon ab, ob wir das Galvanometer auf einen Ruhepunkt bringen können, und die ganze Schwierigkeit des Arbeitens liegt eigentlich in diesem Punkte. Die Leitfähigkeitsänderung der Selenzelle wird nämlich erst nach längerer Zeit konstant und man tut darum gut, vor dem Versuch die Zelle länger belichtet zu halten. Außer den Widerstandsänderungen des Selens beunruhigen das Galvanometer noch die bereits erwähnten Thermostrome, Temperaturschwankungen und andere äußere Ursachen, die manchmal recht schwer zu finden sind.

Um Konzentrationsbestimmungen mit dem Apparat ausführen zu können, gebrauchen wir eine Testlösung, deren Konzentration bekannt ist. Bei der Hämoglobinometrie haben sich als haltbare Testflüssigkeiten das salzsaure Hämatin nach Sahli und das Kohlenxydhämoglobin nach Hoppe-Seyler bewährt. Man kann aber auch andere Farblösungen gebrauchen, deren Lichtabsorption derjenigen einer bestimmten Blutlösung entspricht. Als solche Flüssigkeit ist die von Zetnow angegebene chromsaure Kali- und Kupfersulfatlösung zu empfehlen.

Ist das Galvanometer zur Ruhe gekommen, so stellen wir es mittels des Schieberraheostaten bei vollkommener Belichtung der Selenzelle auf den Nullpunkt der Skala ein. Es wird dann der Ausschlag bei dazwischen gestellter Testlösung bestimmt. Ist dies geschehen, so stellen wir statt der Testflüssigkeit die zu untersuchende Lösung vor die Selenzelle. Wir erhalten dann einen Ausschlag der — je nach dem Verhältnis zwischen der Flüssigkeit und der Testlösung — größer oder kleiner als bei dem Testversuch sein wird. Die Differenz in den Ausschlägen ist proportional der Konzentrationsdifferenz.

Je größer die Verdünnung, umso kleiner wird der Ausschlag sein, und umgekehrt. Die Konzentration ist somit aus der einfachen Formel leicht zu berechnen:

$$\frac{C_1}{C} = \frac{D_1}{D}, \text{ woraus } C_1 = \frac{D_1 C}{D},$$

wobei C die bekannte Konzentration der Testlösung,  $C_1$  die unbekannt Konzentration der zu untersuchenden Lösung, D den Ausschlag bei der Testlösung und  $D_1$  den Ausschlag der zu bestimmenden Lösung bedeuten soll.

Es sei noch bemerkt, daß die Untersuchung der Flüssigkeiten in genau gleichen planparallelen Glasküvetten auszuführen ist, da die Lichtabsorption von der Schichtdicke der Flüssigkeit und Qualität sowie Dicke des Glases abhängt. Runde Gefäße eignen sich zur Untersuchung darum nicht, weil sie die Selenzelle ungleichmäßig belichten.

Wie es aus dem Vorhergesagten ersichtlich, ist der Apparat nicht konstant ein für allemal einzustellen, es muß vielmehr vor jedem Versuch der Nullpunkt und der Ausschlag der Testlösung von neuem festgestellt werden.

Meine Versuche sind noch nicht beendet und ich betrachte diese Publikation nur als eine vorläufige Mitteilung, der eine Arbeit über die Genauigkeit und Resultate dieser Methode nachfolgen soll.

Zum Schluß sei mir noch gestattet, dem Herrn Geheimrat Prof. Zuntz für seine Unterstützung und sein Interesse meinen besten Dank auszusprechen.

---

**Über die Spaltung der lipoiden Substanzen  
durch Lipase und über die optischen Antipoden  
des natürlichen Lecithins.**

Von  
**Paul Mayer-Karlsbad.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts  
der Universität zu Berlin.)

*(Eingegangen am 28. April 1906.)*

Die große biologische Bedeutung der lipoiden Substanzen nach den verschiedensten Richtungen hin ist durch eine Reihe von Arbeiten aus den letzten Jahren dargetan. Unter ihnen hat ganz besondere Beachtung das Lecithin gefunden. Die Entdeckung seiner Rolle bei der Hämolyse, die im Ehrlichschen Institut P. Kyes sowie Kyes und H. Sachs<sup>1)</sup> gelang, bedeutet einen Wendepunkt in der Immunitätslehre; einmal erwies sich das Lecithin als das Komplement des Cobrahämolysins und damit als der erste chemisch definierte Bestandteil der bei den Immunisationsphänomenen wirksamen Serums-substanzen; dann glückte es den Frankfurter Forschern auch, die Verbindung des Cobratoxins mit dem Lecithin in reiner Form darzustellen und dadurch den biologischen Versuch auf den Boden des rein chemischen Experimentes zu stellen.

Die Versuche von Kyes<sup>2)</sup> haben weiter das überraschende Ergebnis gehabt, daß die Art der Lecithinbindung in den

---

<sup>1)</sup> P. Kyes, Berl. Klin. Wochenschr. **1902**, Nr. 38 u. 39; P. Kyes u. H. Sachs, ebenda **1903**, Nr. 2, 3 u. 4; vergl. J. Morgenroth, ebenda **1905**, Nr. 50.

<sup>2)</sup> Kyes, Ztschr. f. physiol. Chem. **41**, 273, 1904.

Organen verschiedener Tiere eine sehr ungleiche ist, Verhältnisse, die für die Erscheinungen der natürlichen Immunität z. B. gegen Schlangenbisse von größter Wichtigkeit sind.

Überdies hat das Lecithin in den letzten Jahren eine dauernd noch steigende medikamentöse Verwendung gefunden; indes das Urteil über die Lecithintherapie ist noch nicht abgeschlossen.

Bei dieser allgemeinen biologischen Bedeutung des Lecithins war die Klärung einer für die Beurteilung des physiologischen Verhaltens wesentlichen Frage von Wichtigkeit, die nämlich nach der Wirkung der Enzyme auf das Lecithin. Bekanntlich hat Bokay<sup>1)</sup> nachgewiesen, daß Lecithin durch Dünndarmsaft gespalten wird. Aber der Dünndarmsaft ist ein Gemisch von Fermenten, und es war daher wichtig, festzustellen, welches Enzym die Zerlegung des Lecithins bewirkt, Dünndarmsekret selbst, Trypsin, Erepsin oder Lipase. Da die den Fetten ähnliche Konstitution des Lecithins es wahrscheinlich machte, daß die Lipase das wirksame Ferment sei, habe ich zunächst das Verhalten des Lecithins zu diesem Enzym studiert und will in folgendem über das Ergebnis dieser Untersuchungen sowie über die Darstellung und das Verhalten der optischen Antipoden des natürlichen Lecithins berichten.

### I. Spaltung des Lecithins durch Lipase.

Für diese Untersuchungen benutzte ich das von der Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation in großer Reinheit aus Eigelb dargestellte Lecithin Agfa und als Lipase das beste derzeit existierende Präparat, das Steapsin von Grüber, dessen „Reinheit“ ich durch den Nachweis, daß es keinerlei proteolytische Wirkungen entfaltet, bestätigen konnte.

Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß 5 ccm einer 2% wässrigen Lecithinemulsion im Reagensglas mit Lipase versetzt und 5, 20 und 40 Stunden im Brutschrank bei 37° belassen wurden. Nach dieser Zeit wurden dann die Lösungen unter Zusatz von 99,6%-igen Alkohol quantitativ in ein Becherglas übergeführt und mittels einer  $\frac{1}{10}$ -Normallauge, unter Anwendung von in Methylalkohol gelöstem Phenolphthalein

<sup>1)</sup> A. Bokay, Ztschr. f. physiol. Chem. 1, 157.



als Indikator titriert, um so die Abspaltung der Fettsäuren quantitativ zu bestimmen. Vorher hatte ich mich überzeugt, daß Lecithin durch die Brutschranktemperatur allein nicht verändert wird.

Da sowohl die Lecithin- wie die Steapsinlösungen schwach saure Reaktion zeigten, wurde der Säuregrad beider durch vorherige Titration festgestellt. 5 ccm einer 2%-igen Lecithinlösung verbrauchen 0,3 ccm  $\frac{1}{10}$ -Lauge, und 1 ccm Lipase verbraucht 0,4 ccm  $\frac{1}{10}$ -Lauge zur Neutralisation; diese Zahlen wurden von den nach der Digestion verbrauchten ccm  $\frac{1}{10}$ -Lauge in Abrechnung gebracht.

Das Ergebnis dieser Versuche ist aus der folgenden Zusammenstellung ersichtlich.

Lecithin + Lipase	Digestionsdauer in Stunden	Verbrauch von ccm $\frac{1}{10}$ -Lauge nach Abzug der Zahlen für Lecithin und Lipase
5 ccm 2%-igen Lösung + 1 ccm Lipase	5	1,0
5 " 2 " " + 1 " "	5	0,9
5 " 2 " " + 1 " "	5	1,0
5 " 2 " " + 1 " "	20	1,5
5 " 2 " " + 1 " "	20	1,4
5 " 2 " " + 1 " "	20	1,5
5 " 2 " " + 1 " "	40	1,5
5 " 2 " " + 1 " "	40	1,5
5 " 2 " " + 1 " "	40	1,4

Aus diesen Versuchen ergibt sich die Tatsache, daß das Lecithin durch Lipase reichlich gespalten wird. Die Abspaltung der Fettsäuren ist bei fünfstündiger Digestionsdauer geringer als bei längerer Lipasewirkung, während eine über 20 Stunden ausgedehnte Spaltung die Fettsäureabscheidung nicht mehr steigert.

Die Zerlegung des Lecithins läßt sich übrigens schon deutlich aus dem Aussehen der Lecithinemulsion nach Ablauf des Versuchs erkennen, da sich die festen Fettsäuren z. T. als kristallinische Massen abscheiden.

In einer anderen Versuchsreihe wollte ich eruieren, ob der Ablauf der Hydrolyse durch die Reaktionsverhältnisse beeinflusst wird. Ich habe deshalb einige Versuche mit einer durch Soda

genau neutralisierten Steapsinlösung angestellt und in weiteren Versuchen geringe Mengen  $\frac{1}{10}$ -Normal  $H_2SO_4$  zugesetzt.

Das Ergebnis zeigt die folgende Tabelle.

2%-igen Lecithinlösung + Zusatz	Digestionsdauer in Stunden	Verbrauch von ccm $\frac{1}{10}$ -Lauge nach Abzug der Zahlen für Lecithin + Zusatz
5 ccm + 1 ccm neutr. Lipase . . . .	5	0,7
5 " + 1 " " " " . . . .	5	0,8
5 " + 1 " " " " . . . .	20	1,1
5 " + 1 " " " " . . . .	20	1,1
5 " + 1 Lipase + 0,5 ccm $\frac{1}{10}$ - $H_2SO_4$	5	1,5
5 " + 1 " + 0,5 " " " "	5	1,5
5 " + 1 " + 0,5 " " " "	20	1,5
5 " + 1 " + 0,5 " " " "	20	1,7
5 " + 0,5 ccm $\frac{1}{10}$ - $H_2SO_4$ . . . .	20	0,0

Die Spaltung tritt also auch bei neutraler Reaktion ein; sie ist aber geringer als bei der schwach sauren Reaktion des käuflichen Präparates.

Was den Einfluß des Säurezusatzes anlangt, so habe ich zunächst Kontrollversuche darüber angestellt, ob nicht die Säure schon allein eine spaltende Wirkung auf das Lecithin ausübt. Bei Anwendung der geringen Säuremengen, wie sie in der Tabelle verzeichnet sind, wird Lecithin durch die Säure allein nicht zerlegt. Dahingegen lehrten mich einige besondere — in der vorstehenden Tabelle nicht angeführte — Versuche, daß bei Zusatz größerer Säuremengen (1,5—2 ccm  $\frac{1}{10}$  Normal  $H_2SO_4$ ) eine — allerdings nur ganz geringe — Spaltung statthat. So z. B. verbrauchten in mehreren Versuchen 5 ccm einer 2%-igen Lecithinlösung, denen 1,5 ccm  $\frac{1}{10}$ - $H_2SO_4$  zugesetzt waren, nach 20 stündiger Hydrolyse (nach Abzug von 1,8 ccm  $\frac{1}{10}$ -Lauge für Lecithin + Säure) 0,2—0,3 ccm  $\frac{1}{10}$ -Lauge. Diese Spaltung ist eine so geringe, daß sie mit der Fermentwirkung in keiner Weise zu vergleichen ist.

Die Wirkung der Lipase wird nun durch Säurezusatz, wie die vorstehende Tabelle lehrt, insofern nicht beeinflußt, als eine gesteigerte Fettsäureabspaltung nicht wahrzunehmen ist. Es zeigen aber die angeführten Zahlen, daß schon bei fünf-stündiger Lipasewirkung die Abspaltung denselben Grad

erreicht, wie dies ohne Zusatz von Säure erst nach 20 Stunden der Fall ist. Die Fermentreaktion wird also nach Zusatz einer kleinen Menge von Säure beschleunigt, so daß die Verhältnisse beim Lecithin ganz ebenso liegen, wie sie Connstein<sup>1)</sup> in seinen grundlegenden Arbeiten für die fermentative Spaltung der eigentlichen Fette fand.

Von besonderer physiologischer Bedeutung erschien mir die Frage, ob das Lecithin auch durch Magensaft zerlegt wird, da ja nach verschiedenen Autoren im Magensaft ein lipolytisches Ferment vorkommen soll.

Ich habe deshalb bei genau der gleichen Versuchsanordnung Hundemagensaft, den ich dank der Liebenswürdigkeit des Herrn Dr. Bickel stets ganz frisch aus der experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts erhalten konnte, auf Lecithin einwirken lassen. Einige der angestellten Versuche führe ich hier an.

1. 5 ccm einer 2%-igen Lecithinlösung werden mit 1 ccm Hundemagensaft 20 Stunden im Brutschrank belassen. Zu ihrer Neutralisation sind nach Beendigung des Versuches 2,3 ccm —, d. h., da 1 ccm Magensaft 1,5 und 5 ccm Lecithin 0,3 ccm  $\frac{1}{10}$ -Lauge verbrauchen — 0,5 ccm  $\frac{1}{10}$ -Lauge nötig.
2. 5 ccm einer 2%-igen Lecithinlösung + 1 ccm Magensaft verbrauchen nach 20stündiger Hydrolyse (nach Abzug von 1,8) 0,3 ccm  $\frac{1}{10}$ -Lauge.
3. 5 ccm Lecithinlösung + 2 ccm Magensaft benötigen zur Neutralisation 3,7 — 3,3, d. h. 0,4 ccm  $\frac{1}{10}$ -Lauge.
4. 5 ccm Lecithinlösung + 2 ccm Magensaft verbrauchen 3,7 — 3,3, d. h. 0,4 ccm  $\frac{1}{10}$ -Lauge.

Diese Versuche zeigen, daß eine, wenn auch geringe Spaltung stattgefunden hat.

Will man aber diese Spaltung auf ein im Magensaft wirksames lipolytisches Enzym beziehen, so erscheint die Spaltung noch viel geringer, sobald man erwägt, daß ja schon dieselben Säuremengen, die 1 ccm Magensaft entsprechen, eine geringe Zerlegung des Lecithins bewirken, wie ich oben ausgeführt

---

<sup>1)</sup> Connstein, Hoyer u. Wartenberg, Ber. der deutsch. chem. Ges. **35**, 3988, 1902.

habe. Berücksichtigt man diese Zahlen, so würde nur ein Verbrauch von 0,1—0,2  $\frac{1}{10}$ -Lauge übrig bleiben, der auf die Wirkung des Magensaftes selbst zu beziehen wäre.

Diese Zahlen liegen aber eigentlich innerhalb der Fehlergrenzen, so daß aus diesen Ergebnissen kaum auf eine lecithinspaltende Wirkung des Hundemagensaftes geschlossen werden kann.

Ich will hier nicht die Frage nach dem Vorhandensein eines fettspaltenden Fermentes im Magensaft aufrollen.

Bekanntlich haben Volhard und seine Schüler Stade, Fromme, Zinssen<sup>1)</sup> sich in den letzten Jahren sehr energisch für die Existenz eines solchen eingesetzt, während andere Forscher das Vorhandensein desselben bezweifeln. Wenn meine Lecithinversuche zunächst nicht für das Vorkommen eines lipolytischen Fermentes im Magen zu sprechen scheinen, so ist doch andererseits zu berücksichtigen, daß im Magensaft das supponierte Ferment im Gemisch mit anderen Enzymen vorhanden ist und daher schwächer wirken dürfte als ein isoliertes Enzym, wie wir es in dem Steapsin vor uns haben.

Außerdem könnte ja auch das Magensteapsin so streng spezifisch auf die eigentlichen Nahrungsfette eingestellt sein, daß es auf Lecithin nicht wirkt.

Ohne also auf diese Fragen näher einzugehen, möchte ich lediglich die Tatsache feststellen, daß das Lecithin durch Magensaft nicht oder wenigstens nur in ganz geringem Umfange gespalten wird. Dieser Befund ist für die Frage der Lecithintherapie von Wichtigkeit, weil er zeigt, daß wir bei innerlicher Darreichung des Lecithins eine Zerlegung desselben im Magen nicht zu erwarten haben.

Außer dem Lecithin kennt man noch andere natürlich vorkommende organische Phosphorsäureverbindungen, die ebenfalls in die Gruppe der Lipoide zu zählen sind, vor allem das Jecorin und das Protargon. Die ähnliche biologische Rolle und die chemische Verwandtschaft dieser beiden Körper mit dem Lecithin legten es nahe, auch ihr Verhalten zu dem fettspaltenden Enzym zu untersuchen.

---

<sup>1)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1900, Nr. 5 u. 6; Beitr. z. chem. Physiolog. u. Pathol. 7, 31—51, 1905.

In ähnlicher Weise wie bei dem Lecithin habe ich daher Lipase auf Jecorin und Protargon wirken lassen.

Das Jecorin, das ich nach dem Drechselschen Verfahren aus Pferdeleber dargestellt hatte, wurde in 1 % wässriger Lösung verwendet, die ganz schwach saure Reaktion hatte, so daß 2 ccm durch 0,1 ccm  $\frac{1}{10}$ -Lauge neutralisiert wurden.

Protargon, das nach der Methode von Kossel und Freytag gewonnen war, wurde zunächst in wenig Methylalkohol gelöst und dann so viel Wasser zugesetzt, daß eine 1 % Lösung, bez. Emulsion resultierte. Von dieser wurden 2 ccm schon durch 2 Tropfen  $\frac{1}{10}$ -Lauge neutralisiert, so daß dieser minimale Säuregrad vernachlässigt werden konnte. Die für diese Versuche angewandte Lipase zeigte ebenfalls eine Azidität von 0,4  $\frac{1}{10}$ -Lauge, und der benutzte Magensaft eine solche von 1,6.

Weder Jecorin noch Protargon wurden durch die Brutschranktemperatur allein angegriffen, ebensowenig wirkte Zusatz von geringen Mengen Säure ohne Lipase spaltend auf die beiden Substanzen. Die Versuche ergaben ein ganz analoges Resultat wie beim Lecithin, so daß ich nur einige Versuche in der folgenden Tabelle anzuführen brauche.

Nach fünfstündiger Digestionsdauer.

- 2 ccm 1%-ige Jecorinlösung + 1 ccm Lipase verbrauchen nach Abzug von Jecorin + Lipase 1,0  $\frac{1}{10}$ -Lauge,
- 2 " 1 " Jecorinlösung + 1 ccm Lipase + 0,5 ccm  $\frac{1}{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verbrauchen nach Abzug von Jecorin + Lipase + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 1,5  $\frac{1}{10}$ -Lauge,
- 2 " 1 " Jecorin + 1 Lipase + 1 ccm Magensaft verbrauchen nach Abzug von Jecorin + Lipase + Saft: 0,1  $\frac{1}{10}$ -Lauge,
- 2 " 1 " Jecorin + 1 Lipase + 2 Magensaft verbrauchen nach Abzug von Jecorin + Lipase + Saft: 0,1  $\frac{1}{10}$ -Lauge,
- 2 " 1 " Protargonlösung + 1 ccm Lipase verbrauchen nach Abzug von Lipase 0,9  $\frac{1}{10}$ -Lauge,
- 2 " 1 " Protargonlösung + 1 Lipase + 0,5  $\frac{1}{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verbrauchen nach Abzug von Lipase + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 1,6  $\frac{1}{10}$ -Lauge,
- 2 " 1 " Protargonlösung + 1 Lipase + 1 Magensaft verbrauchen nach Abzug von Lipase und Saft: 0,0  $\frac{1}{10}$ -Lauge,
- 2 " 1 " Protargonlösung + Lipase + 2 Magensaft verbrauchen nach Abzug von Lipase + Saft: 0,1  $\frac{1}{10}$ -Lauge.

Nach 20stündiger Digestionsdauer.

- 2 ccm 1%-ige Jecorinlösung + 1 Lipase verbrauchen nach Abzug von Jecorin + Lipase: 1,4  $\frac{1}{10}$ -Lauge,

2 ccm	1%ige	Jecorinlösung	+ 1 Lipase	+ 0,5 $\frac{1}{10}$ -H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	verbrauchen nach
					Abzug von Jecorin und Lipase + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : 1,5 $\frac{1}{10}$ -Lauge,
2	"	1 "	Jecorinlösung	+ 1 Lipase	+ 1 Magensaft verbrauchen nach
					Abzug von Jecorin + Lipase + Saft: 0,0 $\frac{1}{10}$ -Lauge,
2	"	1 "	Protargonlösung	+ 1 Lipase	verbrauchen nach Abzug von
					Lipase: 1,6 $\frac{1}{10}$ -Lauge,
2	"	1 "	Protargonlösung	+ 0,5 $\frac{1}{10}$ -H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+ 1 Lipase verbrauchen nach
					Abzug von Lipase + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : 1,5 $\frac{1}{10}$ -Lauge,
2	"	1 "	Protargonlösung	+ 1 Lipase	+ 1 Magensaft verbrauchen nach
					Abzug von Lipase + Saft: 0,2 $\frac{1}{10}$ -Lauge.

Die angeführten Zahlen beweisen, daß auch Jecorin und Protargon reichlich durch Lipase gespalten werden, und daß auch hier die Fermentreaktion durch Zusatz einer kleinen Menge Säure beschleunigt wird. Noch deutlicher als beim Lecithin zeigt es sich hier, daß Magensaft keine Zerlegung bewirkt.

## II. Die optischen Antipoden des natürlichen Lecithins.

### a) Racemisches Lecithin.

Bekanntlich zeigt ein durch Extraktion bei höherer Temperatur gewonnenes Lecithin kein oder nur ein geringes Drehungsvermögen; aber das so gewonnene Präparat ist durch Spaltungsprodukte des Lecithins stark verunreinigt, und die reine optisch inaktive Verbindung ist bisher nicht beschrieben.

Zu ihrer Darstellung habe ich folgendes Verfahren eingeschlagen.

Gewöhnliches rechtsdrehendes Lecithin — ich habe auch für diese Versuche Lecithin Agfa benützt — wird mit der 10fachen Menge ganz absolutem Äthyl- oder Methylalkohol im Schießrohr 5—6 Stunden auf 90—100° erhitzt. Nach dem Erkalten verdampft man den Rohrinhalt bei möglichst niedriger Temperatur und löst den Rückstand in Äther. Die ätherische Lösung wird dann im Scheidetrichter mit ca. 0,5 % Sodalösung durchgeschüttelt, mehrfach mit Wasser gewaschen und dann verdampft. Die hinterbleibende dunkelbraune Masse wird im Vakuum getrocknet, dann in absolutem Alkohol gelöst und mit Knochenkohle in der Siedehitze entfärbt. Aus dem eingedampften Filtrat scheidet sich nach Aceton-Zusatz das inaktive Lecithin in der halbkristallinischen und halb salbenähnlichen Form ab, die dem natürlichen Lecithin eigen ist.

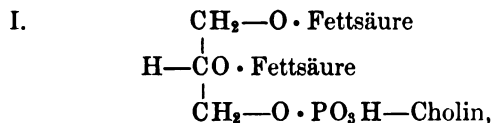
Gleich diesem löst es sich in Alkohol, Äther, Petroläther und Chloroform, schwer dagegen in Aceton; mit Wasser bildet es eine opake Lösung und ist aus alkoholischer Lösung durch alkoholische Platinchlorid- oder Chlorkadmiumlösung fällbar. Auch die Farbe gleicht völlig der von aktivem Lecithin; frisch dargestellt ist die Verbindung schwach hellgelb, um nach kurzer Zeit nachzudunkeln; im zugeschmolzenen Rohr bewahrt sie ihre lichte Farbe länger.

Im Gegensatz zu dem Ausgangsmaterial, das rechtsdrehend ist<sup>1)</sup>, zeigt die neue Verbindung in 3prozentiger Lösung kein Drehungsvermögen.

Zur Identifizierung wurde eine Bestimmung des Phosphor- und N-Gehaltes vorgenommen, welche das Vorliegen von Lecithin dartut: Gefunden: N = 1,98 %; P = 4,06 %. Berechnet<sup>2)</sup>: N = 1,75 %; P = 3,98 %.

Zur Darstellung größerer Mengen von inaktivem Lecithin kann die Operation statt im Schießrohr ebensogut im Autoklaven ausgeführt werden; bis 10 g Lecithin können auf einmal in Arbeit genommen werden. Wichtig ist es, das Lecithin zuvor in dünner Schicht im Vakuum über Phosphorpentoxyd zu trocknen; je trockner nämlich das angewandte Lecithin, und je absoluter der Alkohol ist, desto besser gelingt die Racemisierung; d. h. bei Gegenwart von Wasser tritt partielle Verseifung ein, und die sauren Spaltungsprodukte beschleunigen den weiteren Zerfall. Bei Arbeiten mit größeren Mengen läßt sich eine geringe Zersetzung nicht vermeiden.

Die Inaktivierung des Lecithins kann auf doppelte Weise zustande kommen. Nach Ulpiani<sup>3)</sup> beruht das optische Drehungsvermögen des Lecithins auf der unsymmetrischen Anordnung der Säureradikale am Glycerinrest (I).

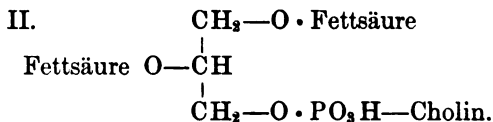


<sup>1)</sup> Das benützte Lecithin hat ein Drehungsvermögen  $[\alpha]_D^{20} = +9,84^\circ$  ( $\alpha = +0^\circ 30$ ,  $l = 2$ ,  $c = 2,54$ ); es waren 0,58 g in 20,0 ccm Alkohol von 99,8 % gelöst.

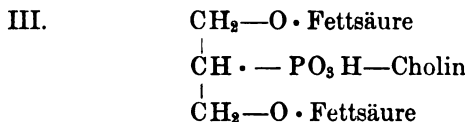
<sup>2)</sup> Im Durchschnitt für Dipalmito, = Distearo, = Dioleolecithin.

<sup>3)</sup> C. Ulpiani, Gazz. chim. Ital. **31**, II, 47, (1901).

Die Inaktivierung kann sich nun in der Weise vollziehen, daß bei dem Erhitzen unter Druck eine partielle Umlagerung dieses d-Lecithins in seinen optischen Antipoden (II), das l-Lecithin, stattfindet, eine Reaktion, die solange fortschreiten muß, bis die Hälfte des d-Lecithins umgewandelt ist, d. h. bis r-Lecithin, das Gemisch von I + II, sich gebildet hat.



Die Inaktivierung kann aber auch auf andere Weise zustande kommen, nämlich durch einen Platzwechsel der Säureradikale an den Glycerinhydroxylen, z. B. durch Bildung der Form (III).



Da bei dieser Verbindung keine Asymmetrie des mittleren Kohlenstoffatoms mehr besteht, muß sie optisch inaktiv sein.

Die Entscheidung zwischen den beiden für das inaktive Lecithin in Betracht zu ziehenden Möglichkeiten ließ sich treffen, wenn es gelang, die nicht drehende Verbindung in wieder optisch aktive Formen zu verwandeln; denn nur die Racemform (I + II), nicht aber III ist in optisch aktive Komponenten spaltbar.

Da einfache Methoden rein chemischer Natur zur Zerlegung eines komplizierten und empfindlichen Esters von der Art des Lecithins nicht bekannt sind, habe ich ein biologisches Verfahren angewandt.

Wie ich in dem ersten Teil dieser Arbeit beschrieben habe, wird Lecithin durch das fettspaltende Ferment, die gewöhnliche Lipase, zerlegt. Nach allem, was wir über die Wirkungsweise der Enzyme wissen, war es wahrscheinlich, daß auch inaktives Lecithin hydrolysiert werden würde. Dabei mußte Form III wegen des symmetrischen Baues inaktive Spaltungsprodukte, I + II hingegen wegen des bekannten halbseitigen Angriffs des Fermentes aktive Produkte ergeben. Tatsächlich hat sich nun gezeigt, daß die Wirkung der Lipase auf das nicht drehende Lecithin eine asymmetrische ist; und damit ist der Beweis



erbracht, daß in dem künstlich inaktivierten Lecithin keine Mesoform, sondern der wahre Racemkörper vorliegt.

Im folgenden soll über die Spaltung des r-Lecithins und über die optisch aktiven Spaltungsprodukte, die ich nachgewiesen habe, nämlich l-Lecithin, den optischen Antipoden des natürlichen Lecithins, und d-Glyzerinphosphorsäure berichtet werden.

#### b) l-Lecithin.

15,0 g inaktives Lecithin werden in 3 Liter Wasser von 40° unter Schütteln auf der Maschine gelöst, resp. in eine gleichmäßige Emulsion verwandelt. Die trübe Flüssigkeit wird mit 100 ccm Grüblerscher Steapsinlösung versetzt und im Brutschrank bei 38° aufbewahrt. Ohne daß eine Klärung erfolgt, gibt sich der Eintritt der Reaktion nach einigen Tagen durch Abscheidung von Fettsäure-Kristallen und Tröpfchen zu erkennen. Nach 14 Tagen wird der Versuch unterbrochen, das Gefäß mit der Lecithinlösung auf 0° abgekühlt und filtriert. Der Niederschlag besteht aus Fettsäuren, schließt aber auch Substanzen mit organisch gebundener Phosphorsäure ein; das trübe Filtrat (a) wird mehrfach mit Chloroform ausgeschüttelt, die vereinigten Chloroformauszüge schnell mit eiskaltem Barytwasser durchgeschüttelt, und die Chloroformlösung wird sofort von der wässrigen Schicht (b) abgetrennt, durch ein trockenes Filter filtriert und im Vakuum konzentriert. Es hinterbleibt eine braune, wachsartige Masse, die in absolut alkoholischer Lösung mit etwas Knochenkohle entfärbt, eingeeengt und schließlich mit Aceton gefällt wird. Von dieser Substanz, die im Aussehen vom gewöhnlichen Lecithin nicht zu unterscheiden ist, wurden 1,9 g erhalten. Das Verhalten zu Platinchlorid und Chlorkadmium sowie zu den Lösungsmitteln gleicht völlig dem vom natürlichen Lecithin; der einzige Unterschied besteht in der Richtung des Drehungsvermögens. Die Verbindung ist lävogyr: 0,4802 g Substanz gelöst in 15 ccm Alkohol von 95 %, zeigten im 2-Dezimeterrohr eine Drehung von  $-0^{\circ}33'$ ; daraus berechnet sich  $[\alpha]_D = -8,59^{\circ}$ .

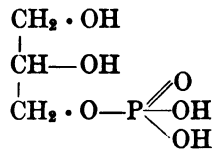
Zur analytischen Kontrolle wurde eine Phosphorbestimmung ausgeführt, die einen Gehalt von 3,73 P. ergab.

Demnach liegt in der lävogyren Verbindung unzweifelhaft im wesentlichen l-Lecithin vor. Die niedrigere Drehung, die

das Präparat im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial aufweist (+ 9,84°), deutet auf einen Gehalt an Racemkörper. Aber der Reinheitsgrad ist schwer zu beurteilen; denn das natürliche d-Lecithin ist allem Anschein nach keine einheitliche Substanz, sondern ein Gemisch verschiedener Oleo-, Palmito- und Stearo-Lecithine. Dieselben besitzen, wie man durch Fraktionierung festgestellt hat, verschiedene Löslichkeit, und es ist denkbar, daß sich das relative Verhältnis dieser Lecithine bei den verschiedenen Operationen (Racemisierung, Spaltung) und den jedesmaligen Isolierungen geändert hat. Natürlich kommt auch den verschiedenen Lecithinen ein ungleiches Drehungsvermögen zu.

Diese Verhältnisse sind z. T. auch die Ursache für die geringe Ausbeute an l-Lecithin, die nur 12,7% beträgt. Letztere kommt aber z. T. auch durch andere Faktoren zustande, namentlich durch die Unmöglichkeit, Lecithin im Gemisch mit seinen Spaltungsprodukten einigermaßen quantitativ zu isolieren. So schließt, wie erwähnt, der Fettsäureniederschlag reichlich Lecithin ein, und auch in dem oben bezeichneten Filtrat (a) bleibt nach der Ausschüttelung mit Chloroform eine erhebliche Menge von Lecithin zurück.

Aber aus dieser Portion läßt sich eine andere optisch aktive Verbindung isolieren, deren Entstehung die Theorie voraussieht, sobald die enzymatische Spaltung des Lecithins nicht bis zu den letzten Bruchstücken führt, sondern gleich der gemäßigten künstlichen Hydrolyse bei der Bildung intermediärer Produkte Halt macht. Ein solches intermediäres Produkt ist nun die Glycerinphosphorsäure



welche noch die von Ulpiani<sup>1)</sup> entdeckte assymetrische Struktur des Lecithins bewahrt und nach R. Willstätter und K. Lüdecke<sup>2)</sup> tatsächlich optisch aktiv ist, sobald die Hydrolyse durch Alkali mit der nötigen Vorsicht vorgenommen wird.

<sup>1)</sup> Ulpiani, Gazz. chim. Ital. **31**, II, 1901.

<sup>2)</sup> Willstätter und Lüdecke, Ber. d. dtsh. chem. Ges. **37**, 3753, 1904.

Es kann nicht zweifelhaft sein, daß die fermentative Spaltung ein noch schonenderer Eingriff ist als die Alkalihydrolyse. In der Tat konnte ich die d-Glyzerinphosphorsäure in Form ihres Ba-Salzes isolieren. Zur Darstellung desselben wurde die mit Chloroform ausgeschüttelte Flüssigkeit (b) bei einer 40° nicht überschreitenden Temperatur auf etwa 100 ccm eingemengt und mit Barytwasser bis zur deutlich alkalischen Reaktion versetzt. Dabei fielen in dicken Klumpen Barytseifen aus, und die nunmehr filtrierte Lösung wurde sodann mit CO<sub>2</sub> behandelt. Durch diese zweimalige Erzeugung eines Niederschlages war die zuvor dunkelgelbe Flüssigkeit wasserklar geworden und zugleich von ätherlöslichen Phosphorverbindungen befreit, die sich reichlich im Niederschlag der Barytseifen fanden.

Die klare Lösung wurde dann in ca. 1 Liter absoluten Alkohol eingetroppt, wodurch ein schleimiger, schwer filtrierbarer, weißer Niederschlag entstand; derselbe wurde abgesaugt und dann mit Wasser aufgenommen, worin er aber nur z. T. löslich war, filtriert und von neuem mit absolutem Alkohol gefällt. Nach dreimaliger Wiederholung dieser Prozedur, wobei das Material stark zusammenschmolz, resultierte schließlich das Salz in festen, weißen Flocken. Dasselbe wurde über Phosphorpentoxyd im Vakuum getrocknet; ein Teil diente zur Bestimmung des Drehungsvermögens. Es ergab sich

$$[\alpha]_D = - 1,04^\circ$$

$$(\alpha = - 42'; l = 2, c = 33,7)$$

Willstätter und Lüdecke geben (a. a. O.) als Wert für die spezifische Drehung von d-glyzerinphosphorsaurem Baryum Zahlen zwischen  $- 0,68^\circ$  und  $- 1,712^\circ$  an.

Demnach ist im vorliegenden Falle die Verbindung teilweise racemisiert, was bei dem Eindampfen der großen Flüssigkeitsmengen nicht überraschen kann. Zur Kontrolle wurde noch eine Baryumbestimmung in dem Baryumsalz ausgeführt. Gefunden wurden 44,28% Ba, während die Theorie für das optisch aktive Salz  $C_3H_7O_6P\text{Ba} + \frac{1}{2}H_2O$  43,35% Ba (nach Willstätter und Lüdecke 43,42% Ba) verlangt. Ob der etwas zu hohe Wert für Baryum mit der partiellen Racemisierung zusammenhängt, oder durch eine Beimengung zu erklären ist, entzieht sich der Entscheidung. An dem Vorliegen des Glyzero-

phosphates ist trotzdem nicht zu zweifeln; der Wert für Phosphor stimmt übrigens ziemlich genau. Berechnet: P = 9,81%. Gefunden: P = 9,44%.

Auf Grund der beobachteten Spaltungsprodukte muß man annehmen, daß der Zerfall des racemischen Lecithins durch Lipase in der Weise verläuft, daß die l-Komponente vom Enzym nicht angegriffen wird, die natürliche d-Form dagegen in Fettsäuren und d-Glyzerinphosphorsäure zerfällt.

Es bedarf zum Schluß kaum eines besonderen Hinweises, daß die Beobachtung über die asymmetrische Spaltung des Lecithins auch praktische Bedeutung besitzt. Lecithin und seine Derivate werden vielfach medikamentös benutzt. Da nun stets natürliche Produkte von sehr wechselnder Reinheit in Verwendung kommen, die namentlich in der optischen Aktivität stark differieren, d. h. mehr oder minder stark racemisiert sind, so kann es nicht wunder nehmen, daß die Resultate der Lecithintherapie sehr ungleiche sind. Denn wie durch die vorliegende Untersuchung gezeigt ist, sind d- und l-Lecithin Substanzen, auf welche die Enzyme des Organismus völlig ungleich reagieren.

---

# Über die Beziehungen der Verdauungswirkung und der Labwirkung.

Von

**Dr. Martin Jacoby**, Privatdozent in Heidelberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts  
der Universität zu Berlin.)

*(Eingegangen am 5. Mai 1906.)*

Bei seinen so fruchtbaren Studien über die Physiologie der Verdauung hat Pawlow, seinen allgemeinen Gesichtspunkten entsprechend, sich die Frage vorgelegt, welche Rolle innerhalb des Gesamtmechanismus der Nahrungsverarbeitung die labende Funktion des Magensaftes spielt. Zwei physiologische Momente waren es besonders, die ihn zu einer Revision der herrschenden Ansicht aufforderten. Zunächst würde das Vorkommen von Labfermenten an vielen Stellen des Organismus, an die zu labendes Kasein nie gelangt, ohne physiologisches Interesse sein, wenn das Labferment ein speziell für die Umwandlung des Kaseins eingerichtetes Enzym wäre. Sodann ermittelte Pawlow, daß auf Milchfütterung keineswegs eine besonders intensive Labsekretion in den Magensaft erfolgt, während doch im allgemeinen die Sekretionen nach Pawlows Ansicht ausgezeichnet auf die Qualität der Nahrung abgestimmt sind.

Vor einiger Zeit hat nun Pawlow in Gemeinschaft mit Parastschuk <sup>1)</sup> ausführliches, experimentelles Material veröffentlicht, aus dem die Autoren eine vollkommene Identität des Lab- und Pepsinmoleküls folgern; nur die Wirkung des Moleküls auf das Kasein sei eine andere wie die peptische Wirkung,

---

<sup>1)</sup> *Ztschr. f. physiolog. Chemie* **42**, 1904.

welche das Enzym im allgemeinen auf Eiweißkörper ausübt. Das Gleiche gilt nach Pawlow und Parastschuk für die Labwirkung des Pfortnersaftes, des Brunnerschen Drüsensekrets und des Trypsins. Unter bestimmten Versuchsbedingungen gelang es nachzuweisen, daß zwei Portionen von verschiedenen natürlichen Magensäften, die genau dieselbe peptische Wirkung hatten, wie durch Verdauung Mettescher Eiweißstäbchen geprüft wurde, auch Milch genau in derselben Zeit labten. Wurde der Magensaft schnell erwärmt oder längere Zeit bei Brutschranktemperatur gehalten, so nahmen beide Wirkungen durchaus parallel ab. Nun hatte aber namentlich Hammarsten aus der Magenwand Präparate dargestellt, welche nur eine Fermentwirkung besaßen. Aber Pawlow und Parastschuk zeigten, daß derartige Präparate unter geeigneten Bedingungen sowohl Lab- wie Pepsinwirkung besitzen. Man braucht nämlich Labpräparate, die zunächst anscheinend nicht peptisch wirken, nur genügend zu verdünnen und sie eventuell noch durch Dialyse zu reinigen, um eine Lösung zu erhalten, die dann so peptisch wirkt, wie es der Verdünnung entspricht. Pawlow und Parastschuk erklären das durch die auch experimentell begründete Annahme von Hemmungsstoffen<sup>1)</sup>, welche die Pepsinreaktion bei großer Konzentration stören, aber nicht die Labreaktion. Diese Annahme widerspricht nicht der Vorstellung eines einheitlichen Fermentmoleküls, da ja auch Pawlow und Parastschuk die Reaktion der Labung, auch wenn sie unter dem Einfluß desselben Moleküls zustande kommt, von der peptischen Wirkung trennen.

Leider handelt es sich auch wieder bei der Lab-Pepsinfrage um sehr komplizierte Verhältnisse. Darauf weist z. B. folgende Beobachtung hin, welche die russischen Autoren bei der kritischen Nachprüfung der Hammarstenschen Fermenttrennungsmethoden erhoben. Wie schon lange bekannt ist, schädigen Alkalien viele Fermente. Läßt man nun auf Magensaft Magnesiumkarbonat einwirken und neutralisiert nach einiger Zeit mit Salzsäure, so ist die peptische Wirkung im Vergleich zur Labwirkung nur gering, wenn man sofort die für die Verdauung notwendige Säure zusetzt. Wartet man mit dem Säurezusatz,

<sup>1)</sup> s. z. B. Blum u. Fuld, Ztschr. f. klin. Mediz. 56, Heft 5 u. 6.

so nimmt allmählich die peptische Kraft wieder zu. In dem neutralen Stadium gehen also anscheinend an dem Fermente wichtige Verwandlungen vor sich, deren genaues Studium mit Recht von Pawlow und Parastschuk noch zum Gegenstand besonderer Untersuchungen gemacht werden soll.

Es gibt nun in der Literatur mehrere Angaben, die zwar nicht Beweise für Pawlows Ansicht darstellen, aber immerhin eine gewisse Stütze für seine Behauptungen bieten. So gelang es Nencki und Pekelharing nicht, hochwirksame Pepsinpräparate darzustellen, die nicht auch Labwirkungen hatten. Vernon<sup>1)</sup> erhielt aus Pankreasextrakten durch Alkoholfällung je nach dem Vorgehen verschieden wirksame Trypsinpräparate, an denen immer ein vollkommener Parallelismus zwischen tryptischer und Labwirkung zu erkennen war. Sawjalow<sup>2)</sup> gelangt zu der Ansicht, daß die Wirkungsgesetze von Lab und Pepsin nicht verschieden sind. Schließlich haben neuerdings Reichel und Spiro<sup>3)</sup> ebenfalls in bezug auf die Gesetzmäßigkeit entsprechende aufklärende Betrachtungen angestellt.

Pawlows Lehre hat aber auch entschiedenen Widerspruch erfahren. So lehnt Bang<sup>4)</sup> Pawlows Anschauungen und Beweisführungen vollkommen ab. „Die dualistische Auffassung darf man bis auf weiteres aufrechterhalten.“ Bang betont, daß die Labfermente der verschiedenen Spezies nicht identisch sind. Das ist in der Tat durch Untersuchungen Bangs u. a. sichergestellt. Bang meint, man solle vorläufig Pawlows Befunde beim Hundelab und Hundepepsin auf die Verhältnisse bei anderen Tierklassen nicht übertragen. Das ist aber für die prinzipielle Seite der Frage auch durchaus überflüssig, da es zunächst genügt, das fundamentale Problem bei einer Tierart zu entscheiden. Bangs Einwände gegen Pawlows Versuche sind nicht zwingend. Es wird von ihm bemängelt, daß Pawlow und Parastschuk die Labprüfungen bei saurer Reaktion vornahmen. Ihre Resultate könnten durch Kombination von Kaseinkoagulation durch Lab und einfacher Säurefällung des Kaseins zustande gekommen sein. Aber auch Bang nimmt an,

<sup>1)</sup> Journ. of Physiol. **29**, 1903.

<sup>2)</sup> Ztschr. f. physiolog. Chemie **46**, Heft 4, 1905.

<sup>3)</sup> Hofmeisters Beitr. **8**, 1906.

<sup>4)</sup> Ztschr. f. physiolog. Chemie **43**, 1904.

daß das Pepsin, das vom Lab verschieden ist, eine bei saurer Reaktion zur Geltung kommende Milch koagulierende Wirkung hat. Sawjalow betont, indem er auf die Versuche von Courant hinweist, daß Kasein in neutralen Lösungen nicht gerinnt. Die Milch gerinnt nur unter dem Einfluß des Labfermentes ohne Säurezusatz, weil sie freie Wasserstoff-Ionen enthält.

Bang und Schrumpf<sup>1)</sup> haben Präparate dargestellt, welche nur Lab- oder Pepsinwirkung hatten. Nach den Erfahrungen Pawlows und Parastschuks mit Präparaten, die nach Hammarstens Vorschriften dargestellt waren, sind diese Beobachtungen für die Diskussion der Streitfrage erst verwertbar, wenn die Verdeckung der jeweils fehlenden Fermentwirkung durch Hemmungstoffe mit Sicherheit ausgeschlossen ist.

Petry<sup>2)</sup> hat neuerdings die spaltende Wirkung des Labs auf Kasein genauer untersucht und gelangt zu der Anschauung, daß es sich um eine, der peptischen nicht ganz unähnliche Art von Verdauungsspaltung handelt. Nach seiner Ansicht ist aber diese Verdauungswirkung ebenso scharf von der koagulierenden Labwirkung wie von der eigentlichen Pepsinwirkung zu trennen. Doch ist zu bemerken, daß die Koagulation zumeist nur als sekundäre Reaktion betrachtet wird. Auch kann keine strenge Scheidung daraus abgeleitet werden, daß die Spaltung des Kaseins bei schwach saurer Reaktion anders verläuft als bei stärkerer Säuerung. Petry gibt an, daß sein Ferment auch bei neutraler Reaktion das Kasein verändert. Es ist aber noch abzuwarten, ob damit nicht nur die Wirkung bei der amphoteren Reaktion der Milch gemeint ist, die ja auch eine Reaktion in Gegenwart von H-Ionen darstellt. Die interessanten Befunde Petrys, deren genauere Mitteilung gewiß noch wichtige Einzelheiten lehren wird, scheinen mir bisher nicht imstande, Pawlows Behauptungen einzuschränken oder gar zu widerlegen. Petry selbst nimmt übrigens zu Pawlow gar nicht Stellung.

Eine endgültige Entscheidung, ob es verschiedene Lab- und Pepsinmoleküle gibt, würde möglich sein, wenn eine chemische Isolierung der Fermente gelingen würde. Daran ist aber leider zurzeit noch nicht zu denken. Die Tatsache, daß man seit

<sup>1)</sup> Hofmeisters Beitr. 6, 1905.

<sup>2)</sup> Wien. klin. Wochenschr. 1906.



Hammarstens grundlegenden Versuchen häufig Fermentpräparate dargestellt hat, die nur eine der beiden Wirkungen zeigen, ist nur mit größter Vorsicht für die dualistische Auffassung verwertbar. Man kann eben nur sehr schwer die Gegenwart von Beimengungen ausschließen, welche nur die eine und nicht die andere Reaktion stören. Das Kasein, das an und für sich von den anderen Eiweißkörpern sich unterscheidet, tritt dem Ferment als Bestandteil der Milch in einem ganz anderen Milieu gegenüber wie andere Eiweißkörper bei Versuchen mit Fibrin, Metteschen Röhren, Gelatine usw.

Ganz aus der Erörterung muß meines Erachtens vorläufig die bestehende oder fehlende Übereinstimmung zwischen den Wirkungsgesetzen der Fermente ausscheiden. Es mag dahin gestellt bleiben, inwieweit insbesondere die Meßmethoden für die Wirkung des Pepsins den strengen Anforderungen hinreichend genügen, die man doch notwendig erheben muß, sobald eine mathematische Formulierung angestrebt wird. Nach den Untersuchungen von Pawlow werden die Versuchsbedingungen die Resultate viel mehr beeinflussen, als für derartige Zwecke zulässig ist. Eine Entscheidung können wir auf diesem Wege überhaupt nicht erreichen. Eine übereinstimmende Gesetzmäßigkeit braucht ja nicht vorhanden zu sein, wenn ein- und dasselbe Ferment an zwei verschiedenen Reaktionen beteiligt ist. Ferner mahnen die Ausführungen von Reichel und Spiro zur Vorsicht. Die Autoren machen darauf aufmerksam, daß die in Parallele gesetzten Lab- und Pepsingesetze gar nicht miteinander vergleichbar sind und daß vergleichbare Gesetzmäßigkeiten bei beiden auch übereinstimmen. Übereinstimmung der Gesetzmäßigkeiten hat auch Sawjalow beobachtet. Aber Sawjalow weist mit Recht darauf hin, daß derartige Gesetze sehr leicht durch gegenseitiges Sichaufheben zweier entgegengesetzt wirkender Faktoren scheinbar sich ergeben können. Endlich darf man nicht vergessen, daß die Gesetzmäßigkeit in beiden Fällen von einem sekundären Faktor gleichmäßig bedingt sein kann.

Nach alledem wird man die Frage noch als unentschieden ansehen müssen. Mir scheint sogar, daß es vorläufig wichtiger ist, möglichst viel experimentelles Material herbeizuschaffen, das unsere Kenntnis der Fermente und ihrer Beziehungen vertieft, als zu der Streitfrage präzise Stellung zu nehmen. Wie sich

aber das von Pawlow zur Erörterung gestellte Problem klären wird, ein bedeutsamer Gewinn für die Biologie scheint mir schon darin gegeben zu sein, daß es überhaupt diskutierbar geworden ist, daß zwei anscheinend so verschieden geartete Wirkungen, die sich in ganz verschiedenem Milieu entfalten, die ferner bis zu einem gewissen Grade isolierbar scheinen, doch vielleicht an die Gegenwart einer Substanz gebunden sind. Wie auch in diesem Einzelfall des Lab-Pepsins die Dinge sich entwickeln mögen, wir können uns nicht verhehlen, daß alle Vorstellungen über Spezifität revidiert werden müssen. Mehr als bisher wird man in Zukunft daran denken müssen, daß zwei scheinbar spezifische Fermente, Toxine, Antitoxine usw. identisch sein können. Es kann die Wirkung eines einheitlichen Moleküls vorliegen und die Spezifität nur dadurch bedingt sein, daß dasselbe Molekül in dem Einzelfall in einem anders gearteten chemischen Milieu seine Wirkung entfaltet. Dieses Milieu der Fermente, das außer von Bertrand bisher nur sehr wenig planmäßig studiert worden ist, muß bei Studien über Spezifität in Zukunft besonders berücksichtigt werden.

#### A. Zur Kenntnis des Pepsinnachweises.

Zunächst schien es wünschenswert, eine Methode zu besitzen, um schnell und sicher Pepsinwirkungen zu bestimmen. Es ist nicht nötig, hier eine Kritik der gebräuchlichen Verfahren zu geben. Die so vielfach angewandten Metteschen Röhren kommen für exakte Versuche nur in Betracht, wenn bei nicht zu kleiner Konzentration des Fermentes verschiedene Fermentmengen in ihrer Wirksamkeit verglichen werden sollen. Will man aber die störenden Einflüsse von Hemmungsstoffen ausschließen, so muß man eine Methode anwenden, bei der man den Grad der Verdünnung ermittelt, bis zu dem herab eine Fermentation noch mit Sicherheit nachweisbar ist. Von den bisher beschriebenen Verfahren dürften am ehesten die von Fermi sich für derartige Zwecke bewähren. Fermi hat erst vor kurzem seine neueren Beobachtungen ausführlich dargestellt<sup>1)</sup>.

Mir wurde in dieser Beziehung eine Beobachtung wertvoll, die ich vor fast 6 Jahren bei dem Studium des Ricins gemacht

<sup>1)</sup> Arch. f. Hygiene 55, 1906.

habe. Versetzt man eine Lösung von Ricin (von Merck-Darmstadt) in ca. 1 %iger Kochsalzlösung, welche infolge der nur mangelhaft löslichen, dem eigentlichen Toxin beigemengten Eiweißsubstanzen trübe und undurchsichtig ist, mit größeren Mengen Salzsäure, so klärt sich die Flüssigkeit. Bei geringen Konzentrationen Salzsäure, wie sie bei der Pepsinverdauung in Frage kommen, bleiben die Ricinlösungen dauernd durchaus trübe. Fügt man außerdem geringe Mengen Pepsins hinzu — ich benutzte das sehr wirksame, eigens für wissenschaftliche Zwecke hergestellte Pepsinum purissimum, daß mir von der Firma Witte-Rostock in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt war —, so findet bei geeigneten Dosen fast momentan und schon bei Zimmertemperatur eine vollkommene Aufhellung der Proben statt, die dann wasserklar werden.

Für die meisten Versuche diente mir eine Lösung von 1 g Ricin (Merck) und 1,5 g Kochsalz in 100 ccm Wasser, die hinreichend trübe ist. Stets wird einer Kontrollprobe nur Salzsäure zugefügt, um die Pepsinproben mit ihr vergleichen zu können. Entweder wurde, wenn das bei der betreffenden Versuchsanordnung zugänglich war, das Pepsin in der entsprechenden Salzsäure gelöst, oder es wurde, wenn es sich um eine Lösung von Pepsin in Wasser handelte, der Kontrollprobe die gleiche Wassermenge oder gekochte Pepsinlösung, die unwirksam ist, zugefügt und die einzelnen Portionen erst zum Schluß mit der gleichen Säuremenge versetzt. Man fügt immer die Salzsäure dem Gemisch, und nicht die Ricinflüssigkeit der sauren Lösung zu, da sonst die einzelnen Ricinteile mit zu starken Säurekonzentrationen in Berührung kommen und durch die Säure etwas Aufhellung verschuldet werden kann. Da die Reaktion empfindlich ist, kann man das Pepsin in starker Verdünnung benutzen (1 ccm = 1 mg und weniger). Größere Konzentrationen sind schwer zu beurteilen, da starke Pepsinlösungen — wenigstens Lösungen des von mir benutzten Witte-Präparates — selbst trübe sind und diese Trübung anscheinend auch nicht durch die Verdauung aufgehellt wird.

Die Reaktion ist sehr fein, selbst  $\frac{1}{100}$  mg ist durch allmähliche Aufhellung sicher nachweisbar.

Ein Versuchsprotokoll möge das erläutern:

Ricin 1% in 1 $\frac{1}{2}$ %iger Kochsalzl.	HCl 0,56%	Wasser	Pepsin	Aufklärung nach:
3 ccm	1 ccm	1 ccm	1 mg	sofort
3 ccm	1 ccm	1 ccm	0,1 "	ca. 15 Minuten
3 ccm	1 ccm	1 ccm	0,05 "	ca. 30 Minuten
3 ccm	1 ccm	1 ccm	0,01 "	4–6 Stunden
3 ccm	1 ccm	1 ccm	0,001 "	36–48 Stunden
3 ccm	1 ccm	1 ccm	0	bleibt auch im Brut- schrank trübe

Kocht man die Pepsinlösungen vor dem Mischen mit dem Ricin auf, so tritt die Aufhellung nicht ein, ebenso nicht ohne Säurezusatz. In diesem Falle werden die Eiweißkörper der Ricinlösung ausgeflockt. Ob die Ausflockung eine vollständige ist, wurde nicht untersucht.

Es ist möglich, daß diese Methode mannigfach anwendbar ist, z. B. für die Untersuchung von Magensaft, für gewisse quantitative Zwecke, aber wohl auch zum Studium der Verbreitung peptischer Fermente. Ich bin noch damit beschäftigt, zu prüfen, ob das kostbare Ricin nicht durch andere trübe Eiweißlösungen ersetzt werden kann. Für die Zwecke dieser Arbeit habe ich das Verfahren jedenfalls mit Vorteil benutzen können.

#### B. Über den Nachweis der Pepsinwirkung in hochwirksamen Labpräparaten.

Das Wittesche Lab pulv. purissim. solubile gibt, wenn man ihm wie einem Pepsinpräparat Säure zusetzt, die Aufhellungsreaktion genau ebenso. Es ließ sich noch mit  $\frac{1}{20}$  mg die Pepsinwirkung deutlich nachweisen. Es ist nicht zu bezweifeln, daß man durch Reinigung die peptische Wirkung des Präparates noch deutlich erhöhen kann. Gekochtes Lab ist unwirksam, Lab ohne Säurezusatz flockt wie Pepsin ohne Säure das Ricin nur aus.

Das Witte-Lab ist auch sehr wirksam, wenn man es nach dem Ausfall der Lab-Reaktion beurteilt. 0,01 mg labten noch 5 ccm Milch prompt und vollständig. Für die Zwecke dieser Arbeit schien es mir am einfachsten und zugleich am exaktesten,

die Wirksamkeit des Labs zu prüfen, indem der Grad der möglichen Verdünnung ermittelt wurde. Meistens wurden nach Morgenroth die gelabten Milchportionen erst längere Zeit in der Kälte gehalten und kamen erst dann in den Brutschrank. In bezug auf die Vorbereitung der Milch und andere Einzelheiten wurden die sehr zweckmäßigen Angaben von Korschun<sup>1)</sup> verwertet.

### C. Über die Aufhebung der labenden und peptischen Wirkung der Labpräparate durch Erhitzen.

Pawlow und Parastschuk haben untersucht, bei welcher Temperatur die Fermentwirkungen des sauren Magensaftes aufgehoben werden. Sie fanden vollkommene Übereinstimmung für Lab und Pepsin. Da ich früher diese Versuche übersehen hatte und erst bei der Niederschrift dieser Arbeit auf sie aufmerksam werde, habe ich selbst Versuche hierüber angestellt. Ich teile meine Beobachtungen mit, weil sie unter anderen Bedingungen gemacht wurden. Die Resultate bestätigen übrigens durchaus die Angaben der Autoren.

Es wurden gegen Lackmus neutrale Lösungen von Witte-Lab auf verschiedene Temperaturen im Wasserbade erhitzt und dabei ausnahmslos festgestellt, daß beide Fermentwirkungen vollkommen parallel beeinflußt wurden. Um einigermaßen zu verhindern, daß von Glas abgegebenes Alkali auf die Fermente einwirkt, wurde die Erhitzung in einem Kolben aus Jenenser Glas vorgenommen.

Versuche: Frische Lablösung (1 ccm = 1 mg) wird 10 Minuten bei einer Temperatur von 42—44° gehalten. Sowohl die Wirkungen auf Milch wie auf Ricin sind etwas abgeschwächt, indem sie verzögert eintreten.

Eine entsprechende Lablösung wird 10 Minuten auf 50 bis 51° erhitzt, beide Wirkungen ganz verschwunden.

In anderen Versuchen waren die Wirkungen noch bei etwas höherer Temperatur vorhanden. Es ist bekannt, daß die Zerstörungstemperatur nach der Konzentration der Lösung und wohl auch je nach dem Verhalten anderer Faktoren schwankt. Immer aber war ein durchaus paralleles Verhalten beider Wirkungen vorhanden.

<sup>1)</sup> Ztschr. f. physiolog. Chemie 86, 1902.

#### D. Membrandialyse und Diffusion des Labs und Pepsins.

v. Calcar<sup>1)</sup> hat vor einiger Zeit mitgeteilt, daß es ihm durch eine besondere Methode der Membrandialyse gelungen sei, verschiedene giftige Stoffwechselprodukte des Diphtheriebazillus, die von Ehrlich aus mehreren Gründen hypothetisch erschlossenen, sogenannten Toxine und Toxone, voneinander zu trennen und außerdem die indifferenten Eiweißkörper, welche die Giftstoffe begleiten, in eine besondere Fraktion zu bringen, Sein Verfahren gestaltet sich folgendermaßen; Die Lösung, welche in verschiedene Fraktionen zerlegt werden soll, wird zunächst von den leicht dialysablen Stoffen befreit, indem die Flüssigkeit in einen gewöhnlichen Pergamentdialysator gebracht wird. Dann wird mit Benutzung eines besonderen, von v. Calcar konstruierten Apparates die Dialyse durch eine eigens präparierte, tierische Membran vorgenommen. Als solche dient Amnion vom Menschen. v. Calcar fand, daß bei wechselnder Spannung Anteile der Gifflösung mit verschiedenen Eigenschaften die Membran passierten, nämlich entweder Toxine oder Toxone oder indifferente Eiweißkörper. Derartige Befunde sprechen dafür, daß in den einzelnen Fraktionen verschiedene chemische Individuen oder Gruppen von Individuen vorhanden sind.

Es war also die analytische Möglichkeit gegeben, vielleicht durch das Verfahren Lab und Pepsin voneinander zu trennen, falls sie verschiedene chemische Substanzen sind. Umgekehrt kann man freilich daraus, daß die Wirkungen durchaus parallel jenseits der Membran erscheinen, nicht folgern, daß dieselbe Atomgruppierung die Grundlage für beide Wirkungen ist. Denn auch wenn es sich um verschiedene Gruppen handelt, die nur direkt oder durch eine indifferente Brücke mit einander verkuppelt sind, würde die Trennung durch Dialyse irgend welcher Art nicht zu erwarten sein — ganz abgesehen davon, daß Übereinstimmung zweier getrennter Moleküle in bestimmten Anordnungen, Größe usw. auch einen vollkommenen Parallelismus bei der Dialyse bedingen kann.

Ich habe das Verfahren zunächst ohne Spannung der Membran benutzt, weil auch so nach einiger Zeit die Ferment-

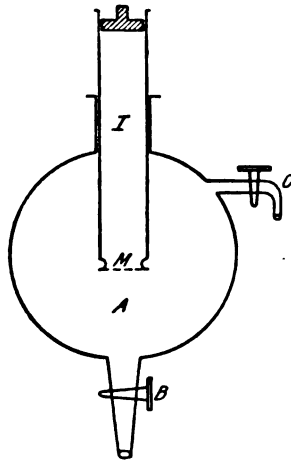
<sup>1)</sup> Berlin. Klin. Wochenschr. 1905.

wirkungen jenseits der Membran nachweisbar waren. Es sei gleich bemerkt, daß durchaus gleichsinnig diesseits der Membran beide Fermentwirkungen abnahmen und jenseits auftraten. Dabei konnte gleichzeitig auch ermittelt werden, daß auch durch Untersuchung der freien Diffusion der Enzymmoleküle innerhalb der Außenflüssigkeit keine Verschiedenheit zwischen einer Lab- und einer Pepsinsubstanz nachweisbar wurde, während Arrhenius und Madsen<sup>1)</sup> für die sicher voneinander verschiedenen Toxine und Antitoxine Differenzen gefunden hatten.

#### Anordnung der Dialyseversuche nach v. Calcar.

Calcarsche Dialyseversuche sind ohne Kenntnis des Apparates und ohne Angabe der Präparationsmethode der Amnionmembranen nicht leicht zu verstehen, noch weniger zu beurteilen oder nachzuprüfen. Ich schildere daher zunächst den Apparat und die Membranen, wie ich sie mir nach v. Calcars Angaben in der Berliner klinischen Wochenschr. 1905 S. 1369 habe anfertigen lassen resp. präpariert habe. Die Einrichtungen des Apparats, die nur der Spannung der Membran dienen, werde ich hier weder schildern noch abbilden, da wir sie in dieser Arbeit nicht verwenden.

Ein Glasgefäß von Kugelform (*A*) geht nach oben in einen Zylinder über. In diesen Zylinder ist durch einen langen Schliff ein anderes Gefäß (*I*) von Zylinderform eingelassen, das oben durch einen eingeschliffenen Glasstöpsel verschlossen wird. Nach unten ragt der Zylinder (*I*) offen in die Kugel hinein und endet mit einem überstehenden, durch eine Verjüngung abgesetzten Rand, der die bequeme Befestigung einer Membran gestattet. Das Kugelgefäß faßt mehr als ein Liter Flüssigkeit, es besitzt an den aus der Abbildung kenntlichen Punkten die eingeschliffenen Hähne *B* und *C*. In das Innengefäß kommt die mit Chloroform



<sup>1)</sup> Festschr. zur Eröffnung des Serum-Instituts, Kopenhagen 1902.

gesättigte Fermentlösung, in das Außengefäß ein Liter mit Chloroform gesättigtes Wasser. Durch den Hahn *B* werden die zu untersuchenden Proben entnommen, durch *C* kann Luft in das Außengefäß gelassen werden.

Die zur Herstellung der Dialysiermembranen notwendigen Eihäute verdanke ich dem freundlichen Entgegenkommen des Herrn Dr. Liepmann, Assistent der Frauenklinik der Charité. Die Amnia habe ich nach v. Calcars Angaben präpariert und kann bestätigen, daß man sehr brauchbare Membranen auf diesem Wege erhält. Ich gebe hier die Vorschriften v. Calcars wörtlich wieder:

„Bei der Ankunft auf dem Laboratorium werden die Häute eine Minute mit einer verdünnten Sublimatlösung (1 : 5000) tüchtig abgespült und sodann während 12 Stunden bei Körpertemperatur in den Brutofen in einer physiologischen Kochsalzlösung gestellt. Darauf sieht man, daß die bedeckende Epithelschicht geschwollen ist und an einigen Stellen sich schon einigermaßen von der Unterschicht abzulösen anfängt. Jetzt wird die Haut mit einer verdünnten Pankreatinlösung übergossen, ein paar Stunden in den Brutofen gelegt, um darauf wieder während einiger Stunden in eine erwärmte Salzlösung überzugehen. Übergießt man jetzt die Häute noch einige Augenblicke mit stark abgekühlter Salzlösung, so läßt sich die oberflächliche stark geschwollene Epithelschicht leicht entfernen und hat man eine an den meisten Stellen so glashelle Haut, daß man, wenn man schwarze Buchstaben darunter legt, fast nicht sehen kann, welche Buchstaben von der Haut bedeckt sind und welche nicht.“

Es stellte sich heraus, daß schon nach kurzer Zeit durch ungespannte Membranen die Fermente in kleiner Menge durchtreten. Das ließ sich in den ersten Tagen immer nur so nachweisen, daß die ganze Außenflüssigkeit abgelassen und durchgemischt wurde. Wurde dagegen nur eine kleine Probe entnommen (20—50 ccm), so daß nur die untersten Teile der Außenflüssigkeit zur Untersuchung gelangten, so wurde die Lab- wie die Pepsinwirkung vermißt. Wartete man aber längere Zeit (6—7 Tage), so wurden die Enzymmoleküle bis nach unten diffundiert und es konnten unten beide Fermentwirkungen festgestellt werden.



Versuche:

1. In das Innengefäß werden 36 ccm einer 1%igen Lösung von Lab und Pepsin in Wasser getan, die Mischung ist trübe und hat einen Bodensatz, dazu etwas Chloroform. — In das Außengefäß 1 Liter Chloroformwasser.

Nach zwei Stunden wird die Innenflüssigkeit entleert, 43 ccm werden erhalten. Die Außenflüssigkeit wird abgelassen und durchgeschüttelt.

Innenflüssigkeit: 0,001 ccm laben noch prompt und klären Ricin auf.

Außenflüssigkeit: 2 ccm sind für beide Reaktionen negativ.

2. Innengefäß 20 ccm einer entsprechenden Lösung, außen wie oben.

Nach 23 Stunden werden zunächst unten ca. 25 ccm abgelassen, dann sofort der Rest, der durchgemischt wird.

Innenflüssigkeit (24 ccm):

0,001 ccm Grenze der kompletten Labung,

0,0002 „ keine Labung,

0,0002 „ Grenze der kompletten Ricinaufklärung.

Außenflüssigkeit:

unterste Portion: 2 ccm für beide Reaktionen negativ, durchgemischte Außenflüssigkeit:

0,1 ccm Grenze der kompletten Labung,

0,02 „ Labung negativ,

0,1 „ komplette Ricinaufhellung,

0,02 „ ganz geringe Klärung der Ricinlösung.

3. Innengefäß 40 ccm, außen wie immer.

Ganz unten, Entnahme nach 24, 48, 60 Stunden: 2 ccm beide Reaktionen negativ, nach 140 Stunden 2 ccm komplette Labung, 1 ccm geringe Labung, 2 ccm keine Ricinaufklärung.

Innenflüssigkeit nach 140 Stunden beträgt 45 ccm.

0,1 ccm beide Reaktionen komplett,

0,01 „ beide Reaktionen negativ.

4. Innengefäß 40 ccm, außen wie immer.

Ganz unten nach 7 Tagen: 1 ccm beide Reaktionen komplett,

0,1 „ keine Labung,

0,1 „ geringste Spur Aufhellung,

nach 8 Tagen: 0,1 „ beide Reaktionen komplett.

Es ist danach wohl sicher nachgewiesen, daß weder bei der Dialyse durch die Amnionmembran noch bei der eigentlichen Diffusion sich irgendwie Unterschiede in der Geschwindigkeit für die beiden Wirkungen ergeben, die die Grenze der Versuchsbedingungen überschreiten<sup>1)</sup>. Wenn dieses Resultat auch feststeht, so bietet doch dieser Punkt noch manche interessante Frage. Ich bin daher noch mit Untersuchungen hierüber beschäftigt, über die ich vielleicht später berichten werde.

#### E. Versuche über die Bindung des Labs und Pepsins an Kasein.

In einer besonderen Versuchsreihe wurde untersucht, ob durch Schütteln einer Fermentlösung mit gepulvertem Kasein eine der Wirkungen besonders intensiv aus der Flüssigkeit verschwindet. Besteht ein besonderes Labferment, so ist es denkbar, daß es eine ausgesprochenere Affinität zum Kasein hat. Das war möglich, obwohl ich, wie ich früher ausgeführt habe, durchaus nicht davon überzeugt bin, daß hier Beziehungen vorliegen, wie man sie im allgemeinen zwischen Rezeptoren und Toxinen vermutet.

Versuche:

50 ccm einer 0,2 %igen Lösung von Lab und Pepsin (Witte) werden im Apparat 5 Stunden mit 2 g Kasein geschüttelt, filtriert, das klare Filtrat auf 50 aufgefüllt.

1 ccm würde also, wenn kein Ferment verschwunden, = 2 mg Lab + 2 mg Pepsin darstellen.

0,1 ccm labt und klärt Ricin schnell und komplett auf,

0,01 „ labt nicht und hat nur spurweise Wirkung auf Ricin.

60 ccm einer 0,5 %-Lösung werden ebenso behandelt.

1 ccm = 5 mg Lab + 5 mg Pepsin,

0,01 ccm beide Reaktionen komplett,

0,001 „ beide Reaktionen negativ.

---

<sup>1)</sup> Absolute Übereinstimmung der Grenzwerte ist nicht zu verlangen. In den mitgeteilten und in anderen entsprechenden Versuchen schwanken die Resultate immer ein wenig so, daß mal noch die Labreaktion, mal die Pepsinreaktion ein wenig weiter nachweisbar. — Die Ausgangslösungen ergaben bei der Prüfung übrigens gute Übereinstimmung in der Verdünnungsmöglichkeit für beide Wirkungen, was natürlich nicht unbedingt zu verlangen war, da ja die Empfindlichkeit der Reaktionen Schwankungen unterliegt.

Es konnte also auch hier kein Unterschied zwischen beiden Wirkungen ermittelt werden.

#### F. Versuche mit Antikörpern.

Für die Frage der Spezifität von Lab und Pepsin sind die Antifermente noch nicht experimentell verwertet worden. Im normalen Serum sind ziemlich bedeutende Antilabwirkungen aufgefunden worden, die man immunisatorisch unter Umständen erheblich steigern konnte. Auch ein Antipepsin, allerdings ein nicht sehr wirksames, hat Sachs<sup>1)</sup> bei der Gans immunisatorisch herstellen können. Eine Notiz von Hahn<sup>2)</sup> deutet, wenn auch unsicher, darauf hin, daß Normalserum antipeptisch wirkt: „Wenn man Pepsinlösung und Serum mischt, die Mischung 24 Stunden bei 37° digeriert und alsdann die nötige Salzsäuremenge zufügt, so tritt keine nennenswerte Wirkung mehr ein, während die gleichfalls digerierte Kontrollprobe des Pepsins ohne Serum fast das ganze Serumeiweiß verdaut.“ Schnappauf, In.-Dissert, Rostock 1888 zit. nach Maly 1889 S. 200 hat bereits angegeben, daß Blutserum Pepsin zerstört. E. Zunz (Bull. de l'Académie Roy. de Médecine de Belgique 1905) fand Serum auch nur wenig hemmend für die Pepsinwirkung.

Auch antitryptische Serumwirkungen sind bekannt; ob auch gegen die Labwirkungen der Pankreasextrakte ein Antikörper im Serum besteht, ist meines Wissens bisher nicht bekannt.

Meine Versuche habe ich zunächst, da die Herstellung von Immunserum ziemlich lange Zeit in Anspruch nimmt, mit dem sehr wirksamen normalen Pferdeserum gemacht. — Über Versuche mit Immunserum werde ich vielleicht später berichten. — Das Normalserum wurde nach den sehr brauchbaren Angaben von Korschun zunächst durch mehrtägige Dialyse von den diffusiblen Hemmungssubstanzen befreit, seine Antikörperwirkung gegenüber dem Witteschen Lab nach der Korschunschen Anordnung in Reihenversuchen geprüft.

Man kann sich leicht überzeugen, daß ein hochwirksames Antilabserum keine wesentliche — wenigstens keine ohne

---

<sup>1)</sup> Fortschritte der Medizin 1902.

<sup>2)</sup> Berliner klinische Wochenschr. 1897.

weiteres nachweisbare — Antipepsinwirkung hat. Als ich gerade beginnen wollte, diese Verhältnisse zu analysieren, erschien die hochinteressante Arbeit von Morgenroth<sup>1)</sup> über die Trennung von Schlangentoxin - Antitoxinverbindungen durch Säureeinwirkungen. Es lag nahe, daran zu denken, daß der Antikörper vielleicht nur bei bestimmten Alkaleszenz- oder Säuregraden auf das Ferment wirken könne. Sehr schnell konnte ich feststellen, daß schon ein sehr minimaler Säuregrad die Wirkung des Antilabs auf das Lab behindert und daß bei nachträglicher Zufügung von Säure zu einem unwirksamen Lab-Antilabgemisch wieder die Labwirkung hervortritt. Es wird nun besonders wichtig werden, das von Sachs immunsatorisch erhaltene Antipepsin auf die neue Fragestellung hin wieder zu studieren, womit ich zurzeit beschäftigt bin. Sieht man von der Sachsschen Beobachtung ab, so würde der Mangel eines Antipepsins im Normalserum nicht wunderbar sein, wenn seine Wirkung ebenso wie die des Antilabs durch Säure verhindert wird<sup>2)</sup>.

#### Versuche:

In 4 Röhrchen kommt 0,1 mg = 0,1 ccm Witte-Lab, dazu überall 1 ccm Pferdeserum, das durch 48stündige Dialyse auf das dreifache verdünnt ist, also  $\frac{1}{3}$  ccm Ausgangsserum entspricht. Diese Serummengende ist ein mehrfaches der zur Neutralisation des Labs notwendigen Quantität, dazu 0 — 0,1 — 0,2 — 0,3 ccm  $\frac{1}{10}$  Normal-Salzsäure  
0,3 — 0,2 — 0,1 — 0 ccm Wasser.

Zuerst wird Wasser, dann die Säure, dann das Serum und zuletzt das Lab in die Gläser getan. — Das Röhrchen ohne Säure ist nach der Mischung trübe, die übrigen ganz klar.

<sup>1)</sup> Berliner klinische Wochenschr. 1905.

<sup>2)</sup> Nicht direkt hierher gehört, soll aber doch erwähnt werden, daß Weinlands „Antipepsin“ aus der Magenschleimhaut unwirksam wird bei reichlichem Zusatz von Salzsäure zu dem Ferment-Antifermentgemisch. (Ztschr. f. Biologie 44, 1902). Inwieweit bei Weinlands Versuchen durch das Antiferment nur die für die Verdauung nötige Säure abgestumpft war, scheint noch nicht hinreichend geklärt. Es ist wahrscheinlich so auch zu erklären, daß R. O. Herzog (Ztschr. f. physiolog. Chemie 89, 1903) Askarispreßsaft antipeptisch fand, ohne eine Antilabwirkung zu erhalten.

Nach 15 Minuten wird überall 5 ccm mit Chloroform versetzte Milch zugefügt. Der Versuch ist doppelt angesetzt:

a) In der ersten Versuchsabteilung bleiben die 4 Röhren nach dem Milchezusatz nur 15 Minuten bei Zimmertemperatur und kommen dann in den Brutschrank.

Es werden die Röhren mit 0,2 und 0,3 ccm ( $\frac{1}{10}$ ) Normalsäure sofort nach Erreichen der Brutschranktemperatur gelabt, die beiden anderen auch in mehreren Tagen nicht.

b) In der zweiten Reihe kommen alle Röhren erst für 20 Stunden in die Kälte, dann in den Brutschrank. Wiederum werden die Röhren mit 0,2 und 0,3 ccm ( $\frac{1}{10}$ ) N.-Säure sofort gelabt, die beiden andern überhaupt nicht verändert.

Da sich immer in derartigen Versuchen eine scharfe Grenze für die Säure herausstellte, so war es möglich, daß die Milch eine bestimmte Säuremenge unwirksam machte. Es wurde deshalb ein Versuch angestellt, bei dem alles gleich gehalten wurde, überall nur 0,1 ( $\frac{1}{10}$ ) Säure, aber wechselnde Milchmengen gewählt wurden (1, 3, 5 ccm). Aber auch bei nur 1 ccm Milch trat die Labung nicht ein, während die Labmenge ohne Antilab und ohne Säure prompt 1 ccm Milch labte, übrigens auch das Gemisch Lab-Antilab ohne Säure 1 ccm Milch in keiner Weise labte.

Bei diesen Versuchen habe ich noch einige, nicht direkt hierher gehörige Beobachtungen gemacht, die hier registriert sein mögen, da sie noch weitere Untersuchung ermöglichen. Fügt man zu einer leicht getrüben Lösung von Witte-Lab dialysiertes, mit Toluol konserviertes Pferdeserum, das selbst trübe ist, so bildet sich ein Niederschlag. Man könnte vermuten, daß mit dieser Niederschlagsbildung die Wirkung des Serums auf das Lab zusammenhängt. Direkt ist das jedenfalls nicht der Fall. Entfernt man nämlich durch Zentrifugieren und Filtrieren den Niederschlag, so daß man eine klare Lösung zurückbehält, so kann man in der Flüssigkeit noch die Ferment-Antifermentverbindung nachweisen. Oder wenn wir dasselbe ausdrücken, indem wir es noch als hypothetisch ansehen, daß eine Verbindung entsteht, so läßt sich das durch das Antiferment larvierte Ferment wieder in der klaren Lösung manifest machen. Setzt man nämlich zu der klaren Lösung die Säuremenge, welche

nötig ist, um entweder die Antifermentwirkung am Zustandekommen zu hindern oder die eingetretene aufzuheben, so enthält die geklärte Lösung die Labwirkung wieder. Mit Versuchen, aus dieser Lösung die Ferment-Antifermentverbindung zu isolieren usw., bin ich noch beschäftigt.

Die Antifermentreaktion ist also keine direkt makroskopisch sichtbare. Damit stimmt auch eine andere bei dieser Gelegenheit gemachte Beobachtung überein. Fügt man nämlich zu dem Ferment-Serumgemisch, das nicht filtriert wurde, steigende Säuremengen, um die Antifermentwirkung aufzuheben, so klärt sich die Flüssigkeit vollständig, aber schon bei einem Säurezusatz, der geringer ist als der für die Aufhebung der Antifermentwirkung notwendige. Also ist es unwahrscheinlich, daß Entstehen und Verschwinden der Antifermentwirkung mit der Bildung und Auflösung des sichtbaren Niederschlags unmittelbar zusammenhängt.

#### G. Über die Labwirkung der Pankreaspräparate und die Einwirkung der Antikörper.

Bei Versuchen mit einem von Grübler bezogenen, vorzüglichem Trypsinpräparat habe ich nach einigen Vorversuchen Befunde erhalten, die in bezug auf die Beziehungen der Labwirkung und Verdauungswirkung von Interesse sind. Namentlich Pawlow und Parastschuk haben neuerdings darauf aufmerksam gemacht, daß es nicht oder kaum gelingt, bei alkalischer Reaktion, bei der die Verdauungswirkung des Trypsins deutlich hervortritt, die Labwirkung der Pankreaspräparate zu beobachten. Sie nehmen an, daß bei alkalischer Reaktion das Kasein so schnell weitgehend aufgespalten wird, daß die Labung leicht übersehen werden kann. In der Tat gelingt es am leichtesten, starke Labung mit Trypsinpräparaten zu erzielen, wenn man die Milch mit Säure — ich habe stets Salzsäure benutzt — versetzt. Jedoch ist nur sehr wenig Salzsäure dazu nötig. Stets habe ich ausgezeichnete Labung frischer, ungekochter Kuhmilch mit Trypsin erhalten, wenn ich zu 100 ccm Milch 2 ccm einer  $\frac{1}{10}$  Normal-Salzsäure fügte. Da zu jedem Versuche nur 5 ccm Milch genommen wurden, so ist der absolute Salzsäuregehalt, der das Zustandekommen der Labung sicherstellt, ein sehr kleiner. Der relative ist sehr gering, da zu den 5 ccm Milch ja noch

das Trypsin in 1 oder 2 ccm Wasser gelöst, hinzukam. Bei Milch, die einige Zeit unter Chloroformzusatz in der Kälte aufbewahrt war, erwies sich in mehreren verschiedenen Proben der Säurezusatz nicht als notwendig, obwohl wenigstens gegenüber Lackmus eine Änderung der Reaktion sich nicht nachweisen ließ. Jedoch schien es mir zuverlässiger, alle im folgenden in Betracht kommenden Versuche mit frischer Milch unter entsprechendem Säurezusatz anzustellen.

Mir lag daran, zu untersuchen, ob sich neben der bekannten Antifermentwirkung im Pferdeserum, die gegen die Verdauungswirkung des Trypsins gerichtet ist, auch eine entsprechende gegen die Labwirkung desselben Präparates nachweisen läßt. Das gelingt in der Tat, wenn man die Versuchsbedingungen richtig wählt. Benutzt man Milch, die in der oben geschilderten Art — 2 ccm  $\frac{1}{10}$  Normal-Salzsäure auf 100 ccm Milch — angesäuert ist, so zeigt sich, daß das dialysierte Pferdeserum ebenso wie gegen das Magenlab auch gegen das Pankreaslab wirksam ist. Dabei ließ sich ein entschiedener Parallelismus zwischen der Hemmung der Verdauung und der Labung nicht verkennen. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß eine absolute Identität besteht. Das wird sich aber kaum sicherstellen lassen, da die Prüfung an ganz verschiedenen Substraten und bei verschiedener Reaktion erfolgen muß.

Bei 0,1 ccm Salzsäure ( $\frac{1}{10}$  Normal) auf 5 ccm Milch tritt also sichere und ausgesprochene Trypsinlabung ein und diese Wirkung wird durch Zusatz von dialysiertem Pferdeserum in bestimmbarer Quantität aufgehoben. Aber schon bei 0,3 ccm ( $\frac{1}{10}$ ) Normalsäure auf 5 ccm Milch gelang es mir nicht, eine Antifermentwirkung des Serums nachzuweisen. Die Säure verstärkt auf der einen Seite die Labwirkung und verhindert die Antilabwirkung.

Zur Prüfung der Verdauungswirkung benutzte ich die Fermische Gelatinemethode in der von Sachs bei seinen Antipepsinversuchen verwandten sehr brauchbaren Anordnung. Die Ricinmethode habe ich hier nicht benutzt, obwohl das Trypsin auch die Ricinlösungen aufhellt, weil die dialysierten Sera sehr trübe sind und daher das Fehlen der Aufhellung bei Serumzusatz nicht leicht zu beurteilen und zu beobachten ist. Ob die Gelatineauflösung oder das Verschwinden der Erstarrungs-

fähigkeit der Gelatine unter dem Einfluß eines einheitlichen Trypsins stattfindet oder ob es sich um eine besondere Glutinasewirkung handelt, darüber habe ich keine eigenen Untersuchungen angestellt. Wer sich Pollack<sup>1)</sup> anschließt, wird also meine Resultate dahin formulieren müssen, daß ich einen ausgesprochenen Parallelismus zwischen den Antifermentwirkungen des Serums gegenüber der Glutinasewirkung und dem Lab des unter der Bezeichnung Trypsin von Grübler vertriebenen Pankreaspräparates gefunden habe. Man darf aber wohl danach auch einen Parallelismus zwischen der Antifermentwirkung gegen Lab und eigentliche Trypsinwirkung ohne Gefahr annehmen.

#### Versuche:

1. In eine Reihe von Röhren kommt je 0,3 ccm einer Trypsinlösung, dazu überall 0,1 ccm Salzsäure ( $\frac{1}{10}$  normal), dann 0—0,1—0,2— usw. bis 1,0 dialysiertes Pferdeserum (durch Dialyse auf  $\frac{1}{2}$  verdünnt) oder entsprechende Wassermengen, so daß die Verdünnung überall gleich ist, natürlich ebenso in allen anderen Reihen.

Nach 15 Minuten wird zu den Gemischen je 5 ccm Milch getan. Dann kommen die Röhren in den Brutschrank.

Bei Serumgehalt 0 bis 0,5 tritt sofort Labung (d. h. bis in einer  $\frac{1}{2}$  Stunde) ein, 0,6—0,8 in 3—4 Stunden, 0,9 und 1,0 werden überhaupt nicht gelabt.

Bei einer gleichzeitig angestellten Reihe, in der alles ebenso war, nur überall 0,3 ccm HCl ( $\frac{1}{10}$  normal) zugefügt wurde, trat überall in einer halben Stunde im Brutschrank Labung ein.

In einer weiteren Reihe wurde wieder je 0,3 ccm der Trypsinlösung überall angewandt, anstatt der Säure immer 0,3 ccm Soda (1 %) zugetan, dieselben Serummengen und schließlich 3 ccm einer 7 %igen Chloroformgelatine in flüssigem Zustand. Die Gemische kommen über Nacht in den Brutschrank, dann in die Kälte.

Die Proben mit Serum: 0 —0,5 bleiben flüssig,  
 0,6—0,7 „ fast ganz flüssig,  
 0,8 werden halb fest,  
 0,9—1,0 „ ganz fest.

<sup>1)</sup> Hofmeisters Beitr. 6, 1904; s. auch Ehrenreich und Pollack, Arch. f. Verdauungskrankh. 11, 1905.



2. Diesmal überall 0,2 ccm = 2 mg Trypsin, 0,1 Salzsäure ( $\frac{1}{10}$  normal), ein durch Dialyse auf  $\frac{1}{2}$  verdünntes Pferdeserum: 0—0,2—0,4—0,6—0,8—1,0. 5 Milch.

Die Proben kommen über Nacht in die Kälte, dann in den Brutschrank.

Bei 0 Serum sofort Labung, die übrigen bleiben unverändert.

0,2 Trypsin, 0,5 Soda (1%), Serum wie oben, 3 ccm Gelatine.

Die Proben mit 0 und 0,2 Serum bleiben flüssig, die übrigen erstarren, nachdem sie aus dem Brutschrank in die Kälte gebracht sind.

3. 0,2 ccm Trypsinlösung, 0,1 ( $\frac{1}{10}$ ) Säure, 0—0,6—0,7—0,8—0,9—1,0 eines dialysierten Serums.

0 und 0,6 sofort Labung, die übrigen negativ.

0,2 ccm Trypsin, 0,3 Soda (1%), 3 ccm Gelatine, Serum wie oben.

0 bleibt flüssig, 0,6 halbflüssig, 0,7—1,0 erstarrt.

#### Schluß.

Überblickt man das experimentelle Material, das in der Literatur niedergelegt ist, und die Ergänzungen, welche diese Arbeit bringt, so scheint folgendes sichergestellt:

Man kann Präparate darstellen, welche wenigstens in bestimmten Konzentrationen nur die eine Fermentwirkung entfalten. Damit ist ohne Zweifel erwiesen, daß es sich nicht um die einheitliche Reaktion eines Enzymmoleküls handelt, die in beiden Fällen in einem für die Fermentreaktion identischen Milieu vor sich geht. Auf der anderen Seite bestehen aber doch so viele Übereinstimmungen zwischen beiden Reaktionen, daß es Sache der Überlegung sein muß, sich klar zu machen, worin das Gemeinsame bestehen kann. Also nochmals, das für ihre Wirkung notwendige Milieu der Fermente nehmen wir ohne weiteres als verschieden an. Es fragt sich nur, ob und welche Gründe wir haben, Verschiedenheiten am eigentlichen Enzymmolekül anzunehmen. Es sind zwei verschiedene Reaktionen. Aber Schwefelsäure als Katalysator beeinflusst auch ganz verschiedene Reaktionen. Und schon seit Hammarsten ist man geneigt, die Labwirkung als eine Spaltung aufzufassen.

so daß also der Unterschied zu der Pepsinwirkung in dieser Beziehung nicht erheblich ist.

Die Antikörper hätten auf eine Differenz hinweisen können. Das ist aber nicht der Fall. Zurzeit wenigstens bestehen nach den Befunden dieser Arbeit keine Gründe, welche eine Spezifität der Antikörper gegen Lab und Pepsin sicherstellen und von dieser Seite aus eine Trennung notwendig machen. Sollten sich bei weiteren Untersuchungen durchschlagende Differenzen ergeben, so leuchtet wohl ohne weiteres ein, daß damit nur eng umschriebene Modifikationen der Vorstellungen bedingt sein würden.

Jedenfalls kann wohl nicht mehr bezweifelt werden, daß nach dem nunmehr vorliegenden Material die Zusammengehörigkeit der Atomgruppierungen, durch welche die beiden Wirkungen zustande kommen, zu einem einheitlichen Molekül das wahrscheinlichste ist. Es ist ja denkbar, daß innerhalb des Moleküls eine verschiedene Gruppierung für die Einzelwirkung maßgebend ist. Das wird aber erst dann als erwiesen gelten können, wenn wirklich ein Enzym dargestellt worden ist, welches nur Lab- oder Pepsinwirkung besitzt und wenn gleichzeitig die Unterdrückung der fehlenden Enzymwirkung durch Hemmungsstoffe, die das Enzym begleiten, mit Sicherheit ausgeschlossen ist.

---

# Über das Vorkommen von Aminosäuren im Harn der Kinder.

Von

**Hans Rietschel und Leo Langstein,**

Assistenten der Klinik.

(Aus dem Laboratorium der Kgl. Universitäts-Kinder-Klinik in Berlin.  
Direktor Geh. Rat Heubner.)

*(Eingegangen am 5. Mai 1906.)*

Die Beantwortung der Frage, ob im Harn von Säuglingen und älteren Kindern unter physiologischen resp. pathologischen Verhältnissen Aminosäuren zur Ausscheidung gelangen, beansprucht ein gewisses Interesse. Denn Pfaundler<sup>1)</sup> hat auf Grund umfassender Untersuchungen über die Stickstoffverteilung im Harn der Säuglinge seinerzeit die Anschauung vertreten, daß speziell im ersten Lebenshalbjahr sich im Harn eine Gruppe stickstoffhaltiger Körper findet, zu welcher Oxysäuren, Aminosäuren und vielleicht auch noch andere unbekannt Substanzen gehören. Er fand für den sogenannten Aminosäuren-Stickstoff durchschnittlich einen Wert von 12,01 % des Gesamtstickstoffs, eine Zahl, welche die von den Untersuchungen des Harns Erwachsener her bekannte um mehr als das Doppelte übersteigt. Ein besonderes Relief erhalten diese Zahlen dadurch, daß Pfaundler in einigen Fällen außerordentlich niedrige Werte für den Harnstoffstickstoff fand. Einmal betrug dieser sogar nur 17,2 % des Gesamtstickstoffs. Camerer<sup>2)</sup> und Keller<sup>3)</sup> kamen allerdings

<sup>1)</sup> Pfaundler, Über Stoffwechselstörungen bei magendarmkranken Säuglingen. Jahrbuch f. Kinderheilmethoden 54, 247.

<sup>2)</sup> Camerer, Stoffwechsel des Kindes, Tübingen, Ztschr. f. Biologie 35, 218; 38, 276; 43, 13; 45, 1.

<sup>3)</sup> Keller, Die Malzsuppe; Verlag von Gustav Fischer 1898.

zu anderen Resultaten. Sie fanden, daß auch vom Säugling 60—84 % des Gesamtstickstoffs in Form von Harnstoff zur Ausscheidung gelangen, und Langstein und Steinitz<sup>1)</sup> konnten in zahlreichen Untersuchungen diese Anschauung bestätigen. Immerhin blieb die Frage, ob nicht doch im Harn der Säuglinge abnorme Stoffwechselprodukte zur Ausscheidung gelangen, eine unbeantwortete, denn es fehlte bis vor kurzer Zeit an einer direkten Methode, um die Ausscheidung von Aminosäuren im Harn zu beweisen. Die indirekte Methode, der sich Pfaundler<sup>2)</sup> wie auch späterhin Krüger und Schmidt<sup>3)</sup> bedienten, sagt, wie Ignatowski<sup>4)</sup> in einer Arbeit aus der Klinik Friedrich Müllers ausführte, über das Vorhandensein von Aminosäuren in Harn nichts aus. Denn diese Methode berücksichtigt nicht nur die Ausscheidung von Aminosäuren, sondern auch die der Hippursäure, des Kreatins, des Indoxyls, des Allantoins, und vielleicht auch die der Oxyprotsäure: Substanzen, über deren Ausscheidungsverhältnisse im Kindesalter wir noch kaum unterrichtet sind. Dazu gesellt sich noch der von Ignatowski betonte Umstand, daß die Methode selbst in geübten Händen oftmals beträchtliche Fehler gibt. Von diesen Erwägungen geleitet, haben wir versucht, über die Ausscheidungsverhältnisse von Aminosäuren im Harn der Säuglinge und älteren Kinder zur Klarheit zu gelangen mit Hilfe der Methode, um die Emil Fischer und Bergell<sup>5)</sup> die wissenschaftliche Forschung bereichert haben. Sie beruht darauf, daß die Aminosäuren enthaltende Flüssigkeit mit Naphthalinsulfochlorid bei schwach alkalischer Reaktion geschüttelt wird, wobei sich die Naphthalinsulfoverbindungen der Aminosäuren bilden. Bei schwach saurer Reaktion werden diese ausgefällt und identifiziert. Wir können es uns hier versagen, ausführlich auf die Methode einzugehen. Sie findet ihre eingehende Schilderung

<sup>1)</sup> Langstein u. Steinitz, Die Kohlenstoff- und Stickstoffausscheidung durch den Harn beim Säugling und älteren Kinde. Jahrbuch f. Kinderheilk. 61, 94.

<sup>2)</sup> Pfaundler, Ztschr. f. physiol. Chem. XVII.

<sup>3)</sup> Krüger u. Schmidt, Ztschr. f. physiol. Chem. XXXI, 556.

<sup>4)</sup> Ignatowski, Über das Vorkommen von Aminosäuren im Harn, vorzugsweise b. Gicht. Ztschr. f. physiol. Chem. 92, 388, 1904.

<sup>5)</sup> Emil Fischer u. P. Bergell, Über  $\beta$  Naphthalinsulfoderivate der Aminosäuren. Berichte der deutschen chem. Ges. XXXV, 3779, 1902.

in den Arbeiten von Emil Fischer und Bergell, und die Modifikation, deren wir uns bedienten, hat Ignatowski ausführlich bekannt gegeben. Gehen wir nun zur Mitteilung der Resultate über.

Zunächst wurde der Harn natürlich ernährter Säuglinge untersucht. Aus 180 ccm konnte keine kristallinische Verbindung isoliert werden. Ebensowenig gelang dies mit einer Menge von  $4\frac{1}{2}$  Liter eines Mischharns, die auf dem Wasserbade eingeeengt worden war und streng nach den Vorschriften von Ignatowski verarbeitet wurde. In 560 ccm des Harns eines mit Buttermilch ernährten Säuglings bildete sich nach der Ansäuerung ein geringer amorpher Niederschlag, aus dem sich Kristalle nicht gewinnen ließen.

Ferner wurde der Harn von Kindern untersucht, die eine an Eiweißspaltungsprodukten relativ reiche Ernährung erhielten, die Malzsuppe. Es wurden je 450 resp. 725 ccm untersucht. In letzterem Falle wurde allerdings ein etwas reichlicheres braunes amorphes Pulver gewonnen, dessen Einheitlichkeit jedoch nicht feststand, weswegen auf eine genaue Analyse verzichtet wurde. Auf Grund dieser Resultate müssen wir zu der Anschauung gelangen, daß sich unter normalen Verhältnissen im Harn natürlich und künstlich genährter Säuglinge Aminosäuren in einer irgendwie in Betracht kommenden Menge im freien Zustande nicht finden; denn die von uns angewandte Methode ließ sich dadurch als einwandfrei erweisen, daß wir mit ihrer Hilfe dem Harn in geringer Menge zugesetzte Aminosäuren im kristallinischen Zustande isolieren konnten. Aus der Anwesenheit amorpher Niederschläge hingegen die Gegenwart von Aminosäuren zu erschließen, halten wir ebenso, wie Abderhalden und Schittenhelm<sup>1)</sup> und auch Samuely<sup>2)</sup> für unstatthaft.

Ehe wir an einen Vergleich unserer Resultate mit denen der bei Erwachsenen angestellten Untersuchungen herangehen, wollen wir noch kurz mitteilen, wie sich die Ausscheidung der Aminosäuren beim älteren Kinde bei pathologischen Zuständen ver-

<sup>1)</sup> Abderhalden u. Schittenhelm, Über den Gehalt des normalen Menschenharns an Aminosäuren. Ztschr. f. physiol. Chem. 47, 4–6, 339.

<sup>2)</sup> Samuely, F., Zur Frage der Aminosäuren im normalen u. patholog. Harn; Ztsch. f. physiol. Chem. 47, 4–6, 376.

hält. Bei einem Kind ließ sich während der Lösung einer krupösen Pneumonie aus dem Harn 0,32 g Leucin isolieren. Die Identifikation geschah nach der alten Methode der Ausfällung wie Kristallisation und der Reinigung über das Kupfersalz. 0,334 Kupfersalz hatte einen Gehalt an CuO von 24,81 % (Berechnet CuO = 24,75 %). Die Menge des vorhandenen Leucins war sicherlich eine größere. Leider gelangte in dieser zwei Jahre zurückliegenden Untersuchung noch nicht die von Emil Fischer angegebene Methode zur Anwendung, sodaß sich über die wahre Menge des Leucins wie auch die eventuelle Anwesenheit anderer Aminosäuren nichts aussagen läßt.

Die Untersuchungen des Harns bei Pertussis, dem insbesondere russische Autoren eine abnorme Zusammensetzung zuschreiben, ergab zwar die Anwesenheit größerer Mengen amorpher Niederschläge, jedoch ließ sich ein einheitliches Produkt nicht isolieren.

Die Untersuchung des Harns in einem Falle von infantilem Myxödem durch Hougardy und Langstein<sup>1)</sup> ergab sowohl in der unbehandelten als auch in der Thyreoidinperiode, in der es zu einer Einschmelzung von Körpergewebe kam, ein absolut negatives Resultat. Dasselbe gilt von den von uns untersuchten Fällen von Diabetes<sup>2)</sup> sowohl während der vorkomatösen Zeit als auch während des Komas, währenddessen Abderhalden in einem von ihm untersuchten Falle Tyrosin nachgewiesen hat, ein Befund, den er auf die herabgesetzte Oxydationsfähigkeit des Organismus bezieht.

Auf Grund unserer Untersuchungen können wir ferner mitteilen, daß wir in einem Falle von Morbus coeruleus eine beträchtliche Ausscheidung von mit Naphthalinsulfochlorid, wie auch mit dem Neubergschen<sup>3)</sup> Reagens, dem  $\alpha$ -Naphthylcyanat, reagierende Substanzen erhielten, mit deren Aufarbeitung wir gegenwärtig noch beschäftigt sind. Auf diese Verhältnisse wird anläßlich unserer noch nicht abgeschlossenen Unter-

<sup>1)</sup> Hougardy u. Langstein, Stoffwechselfersuch an einem Fall von infantilem Myxödem; *Jahrb. f. Kinderheilkunde* 61, 4.

<sup>2)</sup> L. Langstein, Beiträge zur Kenntnis des Diabetes mellitus im Kindesalter; *Deutsche medizin. Wochenschr.* 12, 1905.

<sup>3)</sup> C. Neuberg u. A. Manasse, *Berichte d. deutschen chem. Ges.* 38, 2359 (1905).

suchungen über den Stoffwechsel bei Morbus coeruleus zurückzukommen sein.

Vergleichen wir nun die kurz mitgeteilten Resultate mit den bisher vorliegenden an Erwachsenen, so stehen sie mit diesen zum Teil in guter Übereinstimmung. Allerdings haben Embden und Reese<sup>1)</sup>, nachdem die Untersuchungen von Ignatowski erschienen waren, der das Vorkommen von Glykokoll im Harn einiger Fälle von Gicht mitteilte, betont, daß sich in jedem normalen Harn Glykokoll nachweisen lasse, wenn man die von Emil Fischer und Bergell angegebene Methode dahin modifiziere, daß man anstatt bei schwach alkalischer Reaktion bei stark alkalischer mit Naphthalinsulfochlorid schüttele. Bis zu einem gewissen Grade wurden diese Untersuchungen auch bestätigt und Forßner<sup>2)</sup> betont auf Grund neuerlicher Untersuchungen an der Klinik Friedrich Müllers, daß es sehr wohl möglich sei, daß freies Glykokoll im normalen Harn oft vorkomme, daß die Glykokollausscheidung jedoch keineswegs regelmäßig sei. Zu demselben Resultat waren gleichzeitig Wohlgemuth und Neuberg<sup>3)</sup> gelangt, die sich des Naphthylcyanats bei ihren Untersuchungen bedienten und eine Ausscheidung von in Betracht kommenden Mengen Glykokolls nicht nachweisen konnten. Abderhalden und Schittenhelm erhielten, wenn sie nach der Vorschrift von Emil Fischer und Bergell arbeiteten, in zahlreichen Versuchen am normalen Menschenharn keine  $\beta$ -Naphthalinsulfoderivate. Sie betonen, wie früher schon Neuberg und Wohlgemuth, daß das Glykokoll, wenn es vorhanden, kaum im freien Zustande, sondern sicher nur als Verbindung vorhanden sei, aus der es durch die Methodik von Embden und Reese abgespalten werde. Welcher Art diese Verbindung sei, lassen sie dahingestellt und erwähnen nur kurz die Möglichkeit, daß diese Abspaltung entweder aus der von Embden und Reese supponierten labilen Ureidosäure oder dem von Bondzyński entdeckten und von Abderhalden

<sup>1)</sup> Embden u. Reese, Hofmeisters Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 7, 411 (1905).

<sup>2)</sup> Forßner, s. Über das Vorkommen von freien Aminosäuren im Harn und deren Nachweis; Ztschr. f. physiol. Chemie 47, 15, 1906.

<sup>3)</sup> Wohlgemuth u. Neuberg, Zur Frage des Vorkommens von Aminosäuren im normalen Harn; Medizin. klinische Wochenschr. 9, 1906.

und Pregl<sup>1)</sup> untersuchten schwer dialysierbaren Eiweißabkömmling herrühre.

In einem gewissen Gegensatz zu den genannten Untersuchungen, wie auch zu der unserigen, stehen die Resultate der Arbeit von Samuely, der im normalen Harn Erwachsener wie auch Neugeborener Glykokoll immer nachweisen konnte und die stark alkalische Reaktion für keine *conditio sine qua non* für den qualitativen Nachweis hielt. Samuely hat in 600 ccm des Harns von Neugeborenen immerhin quantitativ bestimmbare Mengen von Glykokoll erhalten. Die von Samuely verarbeitete Harnmenge (600 ccm) ist zu groß, als daß sie die Tagesmenge eines Individuums repräsentieren könnte. Somit ist die Verallgemeinerung des von Samuely erhobenen Befundes vorläufig nicht statthaft, und unsere Untersuchungen sprechen sogar direkt dagegen, daß freie Aminosäuren ein regelmäßiger Bestandteil des Harns an der Brust ernährter Säuglinge sind. Damit soll natürlich keineswegs bestritten werden, daß sich dieser stickstoffhaltige Körper unter Umständen im Säuglingsharn finden kann, für dessen Entstehung im kindlichen Organismus nicht nur der intermediäre Stoffwechsel, sondern nach den Untersuchungen von Abderhalden und Hunter<sup>2)</sup> auch gewisse Milcheiweißkörper die Quelle abgeben können.

Inwieweit und unter welchen Verhältnissen stomachal einverleibte Aminosäuren beim Säugling zur Ausscheidung gelangen, darüber wird demnächst der eine von uns gemeinsam mit L. F. Meyer berichten.

---

<sup>1)</sup> Über einen im normalen menschlichen Harn vorkommenden schwer dialysierbaren Eiweißabkömmling; *Ztschr. f. physiol. Chemie* 46, 19, 1905.

<sup>2)</sup> Abderhalden u. Hunter, Vorläufige Mitteilung über den Gehalt der Eiweißkörper der Milch an Glykokoll; *Ztschr. f. physiol. Chemie* 47, 704, 1906.



# Über Lecithinzucker und Jekorin sowie über das physikalisch-chemische Verhalten des Zuckers im Blut.

Von

**Paul Mayer-Karlsbad.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts  
der Universität zu Berlin.)

*(Eingegangen am 7. Mai 1906.)*

Seit der Entdeckung des Jekorins durch Drechsel<sup>1)</sup> ist diese Substanz nur selten Gegenstand physiologisch-chemischer Untersuchungen gewesen. Drechsel selbst hatte bereits festgestellt, daß der von ihm aus dem Alkohol-Ätherextrakt der Pferdeleber dargestellte Körper eine reduzierende, den Lecithinen nahestehende Na- und S-haltige Substanz ist, und hatte die wichtigsten chemischen Eigenschaften und Reaktionen derselben mitgeteilt.

Später sind auch aus anderen Organen — Milz, Gehirn, Blut (Baldi<sup>2)</sup>) und Nebennieren (Manasse<sup>3)</sup>) — nach dem Drechselschen Verfahren Substanzen isoliert worden, die sich im wesentlichen wie das Drechselsche Jekorin verhielten, jedoch in ihrem Reduktionsvermögen und in den erhaltenen Analysenzahlen nicht unerheblich voneinander abwichen. Die wichtigsten Aufschlüsse über die chemische Konstitution des Jekorins sind in Hoppe-Seylers Laboratorium von Manasse erbracht worden. Dieser wies in dem aus Pferdeleber dargestellten Jekorin die Spaltungsprodukte des Lecithins nach, indem er

<sup>1)</sup> Drechsel, Journal f. prakt. Chemie **33**, 425. 1886.

<sup>2)</sup> Baldi, Archiv f. Physiologie Suppl. **1887**, Suppl. S. 100.

<sup>3)</sup> Manasse, Ztschr. f. physiol. Chem. **20**, 478. 1895.

durch Kochen mit Barytwasser Cholin, Glycerinphosphorsäure und Fettsäuren isolierte. Manasse bestimmte weiterhin die reduzierende Substanz des Jekorins näher, indem er das Osazon desselben darstellte, das einen Schmelzpunkt von  $204^{\circ}$  hatte und deshalb als Glukosazon von ihm angesprochen wurde. Die nächsten Autoren, welche sich mit dem Jekorin beschäftigten, haben ihr Interesse vorwiegend der von Baldi festgestellten Tatsache zugewendet, daß Jekorin auch im Blute vorkommt.

Nachdem schon lange vermutet worden war, daß außer dem Traubenzucker noch andere reduzierende Substanzen im Blute vorhanden sind, hat Otto<sup>1)</sup> durch genaue quantitative Bestimmungen nachgewiesen, daß neben der gärungsfähigen Dextrose noch gärungsunfähige reduzierende Substanzen im Blute vorkommen, über deren chemische Natur der Autor nichts Sicheres aussagen konnte. Gestützt auf die Tatsache, daß das Jekorin in den Ätherauszug des Blutes übergeht und nach der Angabe Baldis Kupferoxyd reduziert, hat zuerst Jacobsen<sup>2)</sup> die gärungsunfähige Substanz des Blutes für Jekorin erklärt, und die weiteren Forschungen dieses Autors gehen sämtlich von der Voraussetzung aus, daß alle ätherlöslichen reduzierenden Substanzen des Blutes Jekorin sein müssen. Weder Jacobsen, der nur das Leberjekorin genauer untersucht hat, noch der nächste Untersucher, Henriques<sup>3)</sup>, haben Jekorin aus dem Blute dargestellt; sie haben also weder die chemischen Eigenschaften des Blutjekorins näher studiert, noch haben sie, was doch vor allem notwendig gewesen wäre, sich über die Natur der reduzierenden Substanz des Blutjekorins unterrichtet. Und ohne mit der Möglichkeit zu rechnen, daß im Blute noch andere reduzierende Substanzen vorhanden sein können, die gleichfalls in Äther löslich, aber nicht mit dem Jekorin identisch sind, haben die genannten Autoren, nachdem sie festgestellt hatten, daß in vielen Fällen der in Äther lösliche Teil der reduzierenden Substanz der überwiegende ist, die Behauptung aufgestellt, daß der größte Teil des Blutzuckers nicht als solcher, sondern an Lecithin gebunden, als Jekorin im

<sup>1)</sup> Otto, Pflügers Archiv **85**, 1885.

<sup>2)</sup> Jacobsen, Zentralbl. f. Physiol. 1892 u. Skandin. Archiv für Physiol. **6**, 262. 1895.

<sup>3)</sup> Henriques, Ztschr. f. physiol. Chem. **23**, 244. 1897.

Blute kreist. Nachdem dann Bing<sup>1)</sup>, der die sorgfältigsten Untersuchungen nach dieser Richtung ausgeführt, aber leider gleichfalls die Voraussetzung Jacobsens als feststehende Tatsache hingenommen hat, gezeigt hatte, daß durch Zusammenbringen von Lecithin und Glukose Lecithinzucker entsteht, galt es um so mehr als ausgemacht, daß das Jekorin nichts anderes als eine Verbindung von Lecithin und Traubenzucker ist, und der Zucker de norma nicht frei, sondern gebunden im Blute kreist.

Kolisch<sup>2)</sup>, der ebenfalls lebhaft für diese Anschauung eingetreten ist, hat allerdings selbst zugegeben, daß die von ihm gemeinschaftlich mit Steyskal ausgeführten Versuche nicht stichhaltig sind, weil, wie die Autoren sich nachträglich überzeugten, bei der von ihnen angewendeten Jacobsen-Henriqueschen Methode auch Traubenzucker in den Ätherauszug des Blutes übergehen kann.

Später hat sich Kolisch<sup>3)</sup> auf Grund von klinischen Tatsachen und Beobachtungen für die Anschauung von der Bindung des Traubenzuckers im Blut ausgesprochen.

Ich habe bereits vor fünf Jahren gelegentlich meiner Untersuchungen über das Vorkommen der Glukuronsäure im Blut darauf hingewiesen, daß jedenfalls ein Teil der von den Autoren als Jekorin angesprochenen Substanz gepaarte Glukuronsäure ist, da ja die Glukuronsäureverbindung des Blutes ebenfalls in den Ätherextrakt übergeht<sup>4)</sup>. Seither haben Lépine und Boulud<sup>5)</sup> in zahlreichen Arbeiten den Nachweis geführt, daß in vielen Fällen gerade der Glukuronsäuregehalt des Blutes nicht unerheblich gesteigert ist, so daß eine Vermehrung der ätherlöslichen reduzierenden Substanz oft auf die Glukuronsäure zu beziehen ist. Um daher zu zeigen, ob der Jekoringehalt des Blutes erhöht ist, ist es nicht angängig, einfach die Menge der ätherlöslichen reduzierenden Substanz zu bestimmen, wie dies

<sup>1)</sup> Bing, Skandin, Archiv f. Physiol. 9, 336. 1896.

<sup>2)</sup> Kolisch und Steyskal, Wiener klin. Wochenschr. 1897, 1101—1103; 1898, 135.

<sup>3)</sup> Kolisch, Diätetische Therapie 1900.

<sup>4)</sup> P. Mayer, Ztschr. f. physiol. Chem. 32, 518. 1901.

<sup>5)</sup> Lépine et Boulud, Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences 1903—1905.

Jacobsen, Henriques, Bing, Kolisch und Steyskal getan haben.

Zweifellos ist die Frage, ob der Zucker in freiem Zustande oder gebunden im Blute zirkuliert, für unsere ganzen Vorstellungen vom Zuckerumsatz im Tierkörper von größter Wichtigkeit; aber so verlockend die Hypothese von der Bindung des Zuckers auch erscheinen mag — und es ist nicht zu leugnen, daß sie mit manchen unserer modernen Vorstellungen gut im Einklang steht — so muß doch gerade bei der Bedeutung dieser Frage betont werden, daß ein Beweis für die Richtigkeit dieser Anschauung bisher nicht erbracht ist.

Der Wunsch, zur Klärung dieser Verhältnisse beizutragen, war es, der mich veranlaßte, mich mit dem Jekorin näher zu beschäftigen, und so habe ich bei den im folgenden mitzuteilenden Untersuchungen diese Frage in erster Linie ins Auge gefaßt. Da das Jekorin von verschiedenen Autoren im wesentlichen als eine Verbindung von Lecithin und Traubenzucker aufgefaßt wird, erschien es mir notwendig, zunächst die künstliche Lecithinglukose näher zu studieren, um sie mit dem natürlich vorkommenden Jekorin vergleichen zu können, und dann das Jekorin selbst eingehender zu untersuchen.

Meine Versuche sind allerdings noch nicht zum Abschluß gelangt — aber da ich dieselben erst im nächsten Winter wieder aufnehmen kann, wollte ich die Mitteilung meiner bisherigen Ergebnisse nicht verzögern.

### I. Lecithinglukose.

Über diese hat Bing<sup>1)</sup> bereits berichtet. Er hat in alkoholischen Lecithinlösungen verschiedene Mengen von Glukose aufgelöst und den Alkohol im Vakuum bei 42° abgedampft. Wenn im Verhältnis zur Glukosemenge viel Lecithin vorhanden war, so löste sich der Abdampfungsrückstand vollständig klar in wasserhaltigem Äther; wenn jedoch viel Glukose zugegen war, so blieb ein weißer Niederschlag zurück, von dem der Äther abfiltriert wurde. Der Abdampfungsrückstand desselben wurde mit 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gespalten und gab nach Neutralisation eine Zuckerreaktion bei Behandlung mit Fehlingscher Lösung.

---

<sup>1)</sup> Bing, a. a. O.

Es war also Glukose in die Ätherlösung übergegangen. Durch Zusatz von Alkohol zu der ätherischen Lösung entstand eine Fällung, die durch Überschuß ganz oder teilweise wieder aufgelöst wurde. Umgekehrt fand Bing, daß der Lecithinzucker aus einer Alkohollösung durch Äther gefällt wird. Auf Grund dieser Reaktionen glaubt Bing, daß die Lecithinglukose eine echte chemische Verbindung ist und spricht sich gegen die Annahme aus, daß der Zucker durch die Anwesenheit des Lecithins, ohne sich mit demselben zu verbinden, ätherlöslich wird. Die rein dargestellte Substanz selbst hat Bing nicht untersucht. Da nun das Jekorin ganz ähnliche Löslichkeitsverhältnisse Alkohol und Äther gegenüber zeigt, so kommt Bing zu dem Schluß, daß Jekorin und Lecithinglukose identische oder wenigstens einander sehr nahestehende Verbindungen seien. Schwefel und Natrium, die stets im Jekorin zu finden sind, rühren seiner Ansicht nach lediglich von Verunreinigungen der Präparate her.

Für meine Versuche habe ich das schon für andere Zwecke von mir verwendete Lecithin der hiesigen Anilinfabrik mit der Handelsmarke „Agfa“ und reinsten, kristallisierten Traubenzucker benützt. Das Lecithin wird unter Schütteln in Alkohol gelöst; der Traubenzucker wird zunächst in einer Spur Wasser gelöst und dann mit absolutem Alkohol versetzt. Beide Lösungen werden filtriert, und die so resultierende völlig klare alkoholische Lösung in einer Schale auf dem Wasserbad bis zur Sirupkonsistenz eingeeengt. Es ist nicht nötig, nach dem Vorgang von Bing die Einengung im Vakuum vorzunehmen, da, wie ich mich überzeugte, die Lecithinglukose bei Einengung auf dem Wasserbad ganz in der gleichen Weise entsteht. — Der Abdampfungsrückstand wird nun in Äther aufgenommen. Dabei zeigt es sich, daß je nach den angewandten Mengen der Rückstand in Äther entweder völlig löslich ist, oder daß ein Teil des Traubenzuckers ungelöst zurückbleibt. Im letzteren Falle machte ich dieselbe Erfahrung wie Bing, daß nämlich der ungelöste Traubenzucker in feinsten Emulsion im Äther suspendiert ist, so daß eine Trennung desselben vom Äther äußerst schwierig und nicht einmal nach Absetzenlassen der Flüssigkeit im Scheidetrichter durch wiederholtes Filtrieren und selbst Zentrifugieren der Lösung stets zu erzielen ist.

Da hierbei die rasche Verdunstung des Äthers eine weitere Störung ist, habe ich mich bemüht, das Verhältnis zwischen dem Lecithin und der Glukose so zu wählen, daß der alkoholische Abdampfungsrückstand sich völlig klar löste. Durch eine Reihe von Versuchen stellte es sich heraus, daß dies meist der Fall ist, wenn man Lecithin und Traubenzucker im Verhältnis von 5 : 2 zusammenbringt. Ich habe dieses Verhältnis bei den meisten Versuchen innegehalten. Einige Male aber beobachtete ich, daß trotz Einhaltens desselben Mengenverhältnisses der Rückstand sich sehr schwer im Äther löste. Ich habe dann bisweilen noch im letzten Moment, nachdem schon fast alles gelöst war, ganz plötzlich eine Trübung eintreten sehen. An anderer Stelle werde ich auf diese Beobachtung noch zu sprechen kommen und will hier nur betonen, daß möglicherweise auch der Wassergehalt des Äthers hierbei mitspielt. Am zweckmäßigsten erwies es sich mir, einen Äther, der etwa 10 % Wasser enthielt, zu benutzen.

Diese Störungen traten nun seltener ein, wenn ich anstatt des Äthers ein anderes Lösungsmittel benutzte — nämlich Benzol, in dem der alkoholische Abdampfungsrückstand sich zu einer vollständig klaren Flüssigkeit löst. Die Anwendung von Benzol anstatt des Äthers hat noch den gewichtigen Vorteil, daß in den Fällen, wo ein Überschuß von Glukose genommen war, der ungelöst zurückbleibende Traubenzucker sich vom Benzol viel leichter als vom Äther trennen läßt. Aus diesen Gründen habe ich mich meistens des Benzols und nicht des Äthers bedient. Die Lösungen werden nun zunächst ca. 8 Stunden stehen gelassen, und dann von dem spontan abgeschiedenen Traubenzucker<sup>1)</sup> abfiltriert. Versetzt man die filtrierte, vollständig klare Äther- oder Benzollösung vorsichtig mit absolutem Alkohol, so fällt die Lecithinglukose in gelblich-weißen Flocken aus, die im Überschuß des Fällungsmittels sich zum Teil wieder lösen. Daß der entstehende Niederschlag nicht freies Lecithin und ebensowenig freie Glukose sein kann, ist von vornherein klar. Es kann sich nur um eine in irgend welcher Weise zustande gekommene Verbindung beider Substanzen handeln, da jede für sich durch die geschilderte Prozedur nicht gefällt

---

<sup>1)</sup> Dieser Punkt wird an anderer Stelle noch besprochen werden.

werden konnte, und da andererseits der Niederschlag sowohl Lecithin wie Glukose enthält. Der Ausdruck „Verbindung“ soll aber keineswegs präjudizieren, daß es sich hier wirklich um eine echte chemische Verbindung handelt, sondern soll nur andeuten, daß Lecithin und Traubenzucker irgendwie miteinander in Relation getreten sind. Die Frage, ob die Lecithin-glukose als wirkliche Verbindung zu betrachten ist, wird später noch erörtert werden.

Die Lecithinglukose setzt sich nach Fällung derselben aus der Benzollösung sehr gut ab, so daß die darüber stehende Flüssigkeit sich bequem abgießen läßt. Der Niederschlag wird nun zunächst, ohne ihn aus dem Becherglas zu entfernen, nochmals in Benzol gelöst, filtriert und wiederum mit absolutem Alkohol gefällt. Schließlich wird der Lecithinzucker, der un-gemein hygroskopisch ist, mit den letzten Resten der anhaftenden Flüssigkeit im Becherglas mehrere Tage im Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxyd getrocknet. Auf diese Weise erhält man ein fast farbloses Pulver, das sehr schnell bei Berührung mit Luft Wasser anzieht, sich bräunt und schließlich verschmiert. Wenn man aber die Substanz rasch, möglichst unter der Exsikkatorglocke in ein gut verschließbares Gefäß bringt, läßt sie sich unverändert als trockenes Pulver aufheben. Die nach dem geschilderten Verfahren dargestellte Substanz löst sich leicht in Wasser zu einer opaken Flüssigkeit, ist im Gegensatz zu ihrem Verhalten, solange sie noch feucht ist, unlöslich in Äther und kann auch in Benzol jetzt nur noch unvollständig gelöst werden. —

Die wässrige Lösung wird durch konzentrierte Chlornatrium- oder Chlorbaryumlösung gefällt, ebenso durch Silbernitrat. Die silberhaltige Lösung wird nach Zusatz von  $\text{NH}_3$  klar und färbt sich beim Erhitzen rot: Reaktionen, die in derselben Weise vom Jekorin gegeben werden. Der Nachweis von Phosphor gelingt leicht, indem in der gewöhnlichen Weise die Substanz mit Salpetermischung geschmolzen, die Schmelze in verdünnter  $\text{HNO}_3$  gelöst usw., und dann mit molybdänsaurem Ammon versetzt wird. Die Lecithinglukose reduziert stark Kupferoxyd in alkalischer Lösung, zeigt starke Gärung und gibt bei Behandlung mit essigsäurem Phenylhydrazin ein Osazon, das bei  $205^\circ$  schmilzt.

Den Gehalt an Traubenzucker habe ich quantitativ durch eine Reduktionsbestimmung und zwar durch Wägung des ausgeschiedenen Kupferoxyduls festgestellt. Es ergaben sich für 0,1 g Lecithinglukose 0,0845 g Glukose. Die Lecithinglukose enthält demnach 84,5% Traubenzucker. Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem durch eine quantitative Gärungsbestimmung erhaltenen überein. Ich fand mittels des Lohnsteinschen Apparates<sup>1)</sup> 85% Glukose. —

Die Elementaranalyse der Lecithinglukose sowie des von mir benutzten Lecithins (Agfa) ergab folgendes Resultat. Des Vergleiches halber stelle ich die Zahlen für Traubenzucker daneben:

Lecithinglukose	Lecithin	Glukose
C = 38,7%	65%	40%
H = 9,29%	10,8%	6,7%
N = 1,09%	1,8%	—
P = 0,66%	3,9%	—
O = 50,26%	18,5%	53,3%

Auffallend in der elementaren Zusammensetzung der Lecithinglukose ist der niedrige Phosphorgehalt und der außerordentlich hohe Gehalt an Traubenzucker.

Die Analysen<sup>2)</sup> würden darauf hindeuten, daß ein phosphorhaltiger Komplex bei der Vereinigung von Traubenzucker und Lecithin aus letzterem ausgetreten wäre. Doch die Entscheidung dieser Frage muß einer größeren Reihe von Analysen vorbehalten bleiben, die ich mit Produkten verschiedener Darstellungen noch vornehmen möchte.

Was nun die Frage anlangt, ob wir in der Lecithinglukose eine echte Verbindung zu erblicken haben, so sei zunächst darauf hingewiesen, daß, wenn es sich um eine solche handelt, wir

<sup>1)</sup> Quantitative Gärungsbestimmungen durch „Ablesung“ sind bei wissenschaftlichen Untersuchungen mangels einer einwandfreien Methode bisher kaum ausgeführt worden. Ich kann den Lohnsteinschen Apparat, der sich in der Praxis bereits bewährt hat, auch für wissenschaftliche Versuche warm empfehlen. Wie ich mich durch zahlreiche Kontrollversuche überzeugt habe, arbeitet er sehr exakt und liefert mindestens so genaue Resultate wie die verschiedenen Reduktionsmethoden.

<sup>2)</sup> Dieselben sind wegen der enormen Hygroskopizität besonders schwierig auszuführen.



über die Art der Bindung vor der Hand gar nichts aussagen können. Es ist a priori möglich, daß es verschiedene solcher Verbindungen gibt, je nach den Mengen Lecithin und Traubenzucker, die man aufeinander einwirken läßt; es ist also denkbar, daß, wenn man die beiden Substanzen in einem anderen Mengenverhältnis zusammenbringt, als ich es gewählt hatte, sie auch in einem anderen molekularen Verhältnis zueinander in Relation treten, so daß die von mir mitgeteilten Analysenzahlen zunächst nur für die unter den geschilderten Bedingungen von mir dargestellte Lecithinglukose in Betracht kommen.

Um diese Möglichkeit experimentell zu prüfen, muß man verschiedene Lecithin- und Zuckermengen aufeinander einwirken lassen und die elementare Zusammensetzung aller erhaltenen „Lecithinglukosen“ feststellen. Bisher habe ich diese Versuche noch nicht ausführen können. Sehr erschwert werden alle diese Untersuchungen durch die leichte Spaltbarkeit der Lecithinglukose. Wenn man die trockene Substanz in wasserhaltigem Äther löst, so scheidet sich beim Stehen der Lösung ganz allmählich — innerhalb 1—2 Tagen — ein Teil des Traubenzuckers ab, der leicht als solcher identifiziert werden kann. Lecithin läßt sich in dem Niederschlag nicht nachweisen. Läßt man diese ätherische Lösung auf dem Wasserbade verdunsten, so kann die Spaltung eine vollständige werden, indem der Rückstand dann eine fast völlige Trennung von Lecithin und Glukose zeigt. Nimmt man jetzt den Rückstand in Benzol auf, so gehen nur noch Spuren oder gar kein Zucker mehr ins Benzol über, so daß die Benzollösung nur noch schwach oder gar nicht reduziert, und durch Zusatz von absolutem Alkohol eine sehr geringe oder keine Fällung mehr entsteht.

Wenn man diese Versuche nicht mit der isolierten Lecithinglukose, sondern, wie es Bing ausschließlich getan hat, mit dem Ätherauszug des ursprünglichen alkoholischen Abdampfungsrückstandes oder mit dem Benzolauszug anstellt, so fällt ebenfalls ein Teil des Traubenzuckers aus. Die Abscheidung der Glukose beginnt aber viel rascher, als dies bei der Äther- oder Benzollösung der reinen Lecithinglukose der Fall ist. Schon nach 1—2 Stunden, oft — je nach den angewandten Mengen — noch früher kann man eine Ausscheidung von Traubenzucker wahrnehmen; ja bisweilen beginnt dieselbe, wie oben beschrieben,

schon, bevor noch der ganze alkoholische Abdampfungsrückstand völlig gelöst ist. — Nach einigen Stunden scheint zunächst die Abscheidung beendet zu sein; nach Ablauf von 1—2 Tagen jedoch hat die Menge des Niederschlages deutlich zugenommen. Diese Beobachtung macht es wahrscheinlich, daß ein Teil des im Benzol oder Äther übergegangenen Traubenzuckers mit dem Lecithin gar nicht in feste Verbindung tritt, und daher sehr bald wieder ausfällt, während der an das Lecithin herantretende Anteil sich später durch Spaltung der Lecithinglukose zum Teil auch wieder abscheidet. Jedenfalls darf man quantitative Bestimmungen über die Glukosemenge, die im Lecithinzucker vorhanden ist, nicht, wie dies Bing bei seinen Versuchen getan hat, in dem Ätherextrakt des alkoholischen Abdampfungsrückstandes ausführen, ohne diesen Verhältnissen Rechnung zu tragen; und wenn Bing<sup>1)</sup> zu dem Schluß kommt, daß es mehrere Verbindungen zwischen Lecithin und Zucker gibt, daß bald mehr, bald weniger Moleküle Zucker an jedes Molekül Lecithin gebunden sind, so mag dies zutreffen; seine Versuche jedoch können zur Entscheidung dieser Frage nicht herangezogen werden. Es ist unbedingt erforderlich, alle Untersuchungen mit der isolierten, rein dargestellten Lecithinglukose selbst auszuführen. Die leichte Spaltbarkeit der Lecithinglukose zeigt sich auch darin, daß bereits mehrfaches Waschen der Substanz mit Alkohol genügt, um eine Spaltung herbeizuführen. —

Ich habe nun auch versucht, die geschilderten Verhältnisse quantitativ zu verfolgen, und führe einen solchen Versuch hier an: 5 g Lecithin und 2 g Glukose werden in der beschriebenen Weise in Alkohol gelöst, die alkoholische Lösung abgedampft, und der Rückstand in 100 ccm Benzol, die sukzessive zugesetzt werden, gelöst. Diese Benzollösung zeigte bei der polarimetrischen Untersuchung eine Rechtsdrehung von 2,2% auf Traubenzucker berechnet. Da das angewandte Lecithin selbst rechtsdrehend ist und zwar in 5% Lösung = 0,7% (auf Glukose berechnet) rechts dreht, so lassen sich aus dieser Zahl gar keine Schlüsse ziehen, zumal wir ja nichts über die spezifische Drehung der Lecithinglukose wissen. Nach 12 Stunden wird der innerhalb dieser Zeit spontan ausgefallene Traubenzucker auf ein gewogenes

---

<sup>1)</sup> Bing, a. a. O.

Filter gebracht. Seine Menge beträgt 0,38 g. Darnach würden also von den angewandten 2 g nur 1,62 g Glukose in nähere Relation mit dem Lecithin getreten sein. Das Filtrat wird nun mit absolutem Alkohol vorsichtig gefällt, und die gewonnene Lecithinglukose nach dem Trocknen über Phosphorpentoxyd gewogen. Es wurden nur 0,8 g Lecithinglukose isoliert. Die Fällung konnte indes keine vollständige sein, da das Filtrat derselben noch immer stark reduzierte und sich als phosphorhaltig erwies. Erneuter Zusatz von Alkohol gibt keine Fällung mehr, und bei Einengung der Lösung tritt wiederum eine partielle Spaltung ein, so daß eine weitere quantitative Durchführung des Versuches nicht möglich ist. Eine Reihe anderer Versuche führte zu einem ähnlichen Resultat; — es gelingt also nicht, auf diesem Wege Aufschlüsse darüber zu erlangen, in welchem Verhältnis Lecithin und Traubenzucker sich miteinander verbinden. Die gemachten Beobachtungen zeigen, daß, wenn die ursprüngliche Benzollösung sogleich mit absolutem Alkohol gefällt wird, die erhaltene Lecithinglukose rein mechanisch beigemengten Traubenzucker enthalten kann. Es ist aber andererseits schwierig, gerade den Zeitpunkt zu treffen, wo der im Überschuß gelöste Zucker bereits ausgeschieden, und doch noch keine Spaltung der eigentlichen Lecithinglukose eingetreten ist.

So sehen wir denn, wie kompliziert die Verhältnisse liegen, und wie schwierig es ist, zu richtigen Vorstellungen über die Vorgänge, welche sich bei der Bildung der Lecithinglukose abspielen, und über diese selbst zu gelangen. Am wahrscheinlichsten erscheint es mir, daß beim Eindampfen alkoholischer Lecithin-Traubenzuckerlösungen die beiden Substanzen sich in ihren Löslichkeitsverhältnissen derart beeinflussen, daß die Glukose äther- und benzollöslich wird, aber nicht die Gesamtmenge derselben in engere Relation zum Lecithin tritt.

Daß aber die Lecithinglukose eine echte chemische Verbindung ist, halte ich nach allen ihren Eigenschaften für sehr zweifelhaft. Vielmehr scheint es mir viel plausibler anzunehmen, daß hier nur eine sogenannte feste Lösung vorliegt.

Es kann sich aber auch um sogenannte Molekularverbindungen handeln, wie sie bei zahlreichen organischen Substanzen von heterogenstem Charakter bekannt sind; es sei an die Pikrinsäureverbindungen der Kohlenwasserstoffe, an die

„Kristall-Pyridin- und Nitrobenzolverbindungen“ erinnert, bei denen alle Übergänge von lockeren Additionsprodukten bis zu ausgesprochen stöchiometrischen Verbindungswerten bekannt sind.

Schließlich muß auch an die Möglichkeit einer einfachen Adsorptionerscheinung gedacht werden, wie sie bei Kolloiden nicht selten sind; denn die hochmolekularen Lipoide, wie das Lecithin, stehen den wahren Kolloiden außerordentlich nahe.

## II. Jekorin.

Das Jekorin stellte ich im wesentlichen nach der Drechsel'schen Methode aus Pferdeleber dar. Es wurden stets 6 Pfund Leber, die mittels einer Hackmaschine in einen gleichmäßigen Brei verwandelt wurden, auf 3 Portionen verteilt, und jede Portion mit 1 Liter Alkohol auf der Schüttelmaschine 5—8 Stunden geschüttelt. Mit dem Rückstand wurde diese Prozedur stets noch 3 mal wiederholt, und die vereinigten Alkoholauszüge wurden successive im Vakuumapparat bei einer Temperatur zwischen 35 und 40° abdestilliert.

Der Abdampfungsrückstand wurde zur Entfernung von Lecithin und Fett mehrere Male mit absolutem Alkohol behandelt, bis derselbe sich nicht mehr färbte, und dann in wasserhaltigem Äther (1 Teil Wasser, 3 Teile Äther) aufgenommen. Nach 24 Stunden — nicht früher, damit der Äther sich vollkommen klar absetzt — wird filtriert, und die völlig klare Ätherlösung vorsichtig mit absolutem Alkohol versetzt. Das Jekorin fällt als weißlich-gelber Niederschlag aus, der sich schnell absetzt, so daß die darüber stehende Flüssigkeit sich leicht abgießen läßt. Die Substanz wird dann sofort wieder in Äther gelöst und nach dem Filtrieren mit absolutem Alkohol gefällt. Nachdem diese Prozedur noch 4—6 mal wiederholt worden ist, wird das Jekorin mehrere Male mit absolutem Alkohol gewaschen und dekantiert und schließlich im Becherglas mit den letzten Resten der anhaftenden Flüssigkeit in einen gut vakuumhaltenden Exsikkator gebracht und tagelang über Phosphorpentoxyd getrocknet.

Wenn man besonders darauf achtet, daß die Ätherlösungen vor dem Zusatz des absoluten Alkohols völlig klar sind, erhält man ein fast weißes Präparat, das in einem möglichst gut schließenden Gefäß sich nur ganz wenig gelb färbt.

Eine Extraktion der Leber mit Aceton vor der Alkohol-extraktion, die Meinertz<sup>1)</sup> empfiehlt, dürfte sicherlich recht vorteilhaft sein; ich konnte sie nicht mehr anwenden, da mein Material längst dargestellt war, als die Arbeit von Meinertz erschien.

Das auf die geschilderte Weise gewonnene Jekorin zeigt alle für dasselbe charakteristische Reaktionen, reduziert sehr stark und gibt sehr schön die Reaktion mit ammoniakalischer Silberlösung. Die wässrige Lösung ist fast klar; sie zeigt nur eine ganz minimale Opaleszenz, die durch Zusatz von Salzsäure kaum zunimmt.

Hervorheben möchte ich die leichte und völlige Löslichkeit meines Jekorins in Benzol, die im Widerspruch steht zu der Angabe von Siegfried und Mark<sup>2)</sup>, daß das Jekorin in Benzol unlöslich ist. Einer freundlichen privaten Mitteilung des Herrn Professor Siegfried zufolge wäre diese Differenz dadurch zu erklären, daß das von mir dargestellte Jekorin noch beigemengtes Lecithin enthält. Da ich jedoch meine Substanz sehr sorgfältig durch wiederholtes Umfällen und reichliches Waschen mit absolutem Alkohol gereinigt habe, und da ich in wässrigen Lösungen keinen sicheren Niederschlag durch Platinchlorid zu erzielen vermochte, so können dem Jekorin höchstens minimale Spuren von Lecithin anhaften. Daß diese geringen Spuren die Ursache der leichten und vollständigen Löslichkeit des Jekorins in Benzol sein könnten, wäre immerhin auffallend und bemerkenswert.

Die Elementaranalyse meines Jekorins ergab folgende Zahlen.

C	=	55,79	%
H	=	4,44	„
N	=	2,59	„
S	=	1,17	„
P	=	1,37	„
Na	=	3,54	„

Zum Vergleich führe ich die Zahlen von Drechsel und Siegfried und Mark an.

---

<sup>1)</sup> Meinertz, Ztschr. f. physiol. Chemie **46**, 1905.

<sup>2)</sup> Siegfried und Mark, Ztschr. f. physiol. Chemie **46**, 492. 1906.

Drechsel.	Siegfried u. Mark.
C = 51,5 %	39,7 %
H = 8,2 "	6,4 "
N = 2,9 "	5,2 "
S = 1,45 "	2,2 "
P = 3,5 "	1,9 "
Na = 2,72 "	5,9 "

Man sieht, daß die Zahlen nicht nur für die absoluten Werte, sondern auch für das prozentuale Verhältnis recht wesentlich voneinander abweichen. Bisher zeigen alle von den verschiedenen Autoren dargestellten Jekorine so erhebliche Differenzen in ihrer elementaren Zusammensetzung, daß schon diese Tatsache dafür spricht, daß das Jekorin keine einheitliche Substanz sein kann. Das ist aber a priori auch nicht zu erwarten. Gemeinsam ist allen Jekorinen, daß sie neben S und Na einen Lecithinkomplex enthalten. Wenn man das Jekorin deshalb als eine immerhin charakterisierte Substanz ansprechen will, so kann dagegen nichts eingewendet werden. Aber ein chemisch einheitlicher Körper kann es schon aus dem Grunde nicht sein, weil das Lecithin keine einheitliche Substanz ist. Da es je nach der Art und der Anordnung der Fettsäureradikale verschiedene Lecithine gibt, müssen wir auch die Existenz verschiedener Jekorine annehmen. Aber selbst wenn wir von dieser Tatsache, die allein nicht imstande wäre, die sehr erheblichen Differenzen in den erhaltenen Analysenzahlen zu erklären, absehen, kann das Jekorin als ein einheitliches Produkt nicht aufgefaßt werden, wie dies die Versuche von Meinertz und Siegfried und Mark<sup>1)</sup> einwandfrei beweisen. Und wenn Waldvogel und Tintemann in ihrer neuesten Arbeit<sup>2)</sup> das Jekorin als ein recht gut charakterisiertes chemisches Individuum, aber nicht als einen reinen Körper bezeichnen, so ist dies eine *contradictio in adversum*; denn ein nicht reiner Körper ist kein chemisches Individuum. Überhaupt läßt sich das Jekorin von Waldvogel und Tintemann mit dem aller übrigen Autoren nicht ohne weiteres vergleichen, weil es nicht aus normalen

<sup>1)</sup> Meinertz, a. a. O. Siegfried u. Mark, a. a. O.

<sup>2)</sup> Waldvogel u. Tintemann, Ztschr. f. physiol. Chemie 1906, 47, Heft 2 u. 3.

frischen Organen, sondern aus phosphorvergifteten, fettig degenerierten, zum allergrößten Teil aber aus autolysierten Lebern und anderen Organen (Dauer der Autolyse 128—552 Tage!) gewonnen und in anderer Weise dargestellt worden ist (Fällung des Jekorins aus wässrigen oder alkoholischen Lösungen durch Aceton). So wertvoll auch der Befund der genannten Forscher an sich wäre, daß aus autolysierten Lebern mehr Jekorin isoliert werden könne als aus normalen Organen, so muß doch andererseits betont werden, daß bei einer Substanz, wie dem Jekorin, dessen genaue chemische Konstitution erst aufgeklärt werden soll, die verschiedene Herkunft und Darstellung der Präparate nicht ohne weiteres einen Vergleich mit dem in der üblichen Weise gewonnenen Jekorin zuläßt. Deshalb dürfen auch die Schlußfolgerungen von Waldvogel und Tintemann nur mit größter Vorsicht verallgemeinert werden, und die Anschauung der Autoren, daß das Jekorin als Sintersubstanz des Protoplasmas anzusehen ist, dürfte vor der Hand wohl sicher nicht allgemein akzeptiert werden.

Zur Feststellung der elementaren Zusammensetzung des Jekorins gehört auch die quantitative Bestimmung des in ihm enthaltenen Kohlehydrates. Daß dieses Traubenzucker ist, war auf Grund des Schmelzpunktes des Phenylosazons angenommen worden. Da mir die Schmelzpunktsbestimmung des Osazons allein nicht ausreichend erschien, um die reduzierende Substanz als Glukose zu identifizieren, habe ich auch eine Elementaranalyse des Osazons, die bisher nicht gemacht worden war, ausgeführt. Die Phenylhydazinverbindung entsteht übrigens mit großer Leichtigkeit, ohne daß es nötig ist, die reduzierende Substanz durch Säure abzuspalten.

Die Elementaranalyse zeigte nun in der Tat, daß Glukosazon vorliegt.

Substanz 0,2058 g  $\text{CO}_2$  = 0,4593;  $\text{H}_2\text{O}$  = 0,1086 g.

„ 0,1500 g N = 20,3 ccm ( $18^\circ$ , 756 mm).

Berechnet: C 60,34, H 6,15, N 15,64.

$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4$  Gefunden: C 60,87, H 6,44, N 15,54.

Den Gehalt an Traubenzucker habe ich durch quantitative Reduktionsbestimmungen (und zwar durch Wägung des Kupferoxyduls) ermittelt. Wenn man die Substanz direkt mit

Fehlingscher Lösung behandelt, so ist die Reduktion erheblich geringer als nach vorheriger Spaltung mit Säure<sup>1)</sup>.

Ich fand in 0,1 g Jekorin 0,01 g (das Mittel von drei gut übereinstimmenden Versuchen) Glukose. Nach vorausgegangener Abspaltung des Zuckers durch Kochen mit 5%  $H_2SO_4$  am Rückflußkühler erhöht sich dieser Wert fast auf das Doppelte, nämlich auf 0,0182 g. Das von mir dargestellte Leber-Jekorin enthält also 18,2% Traubenzucker.

Von besonderer Wichtigkeit erschien es mir, die Gärfähigkeit des Jekorins zu prüfen, zumal die Angaben hierüber verschieden lauten. Jacobsen<sup>2)</sup>, der zuerst die Gärfähigkeit des Leber-Jekorins untersucht hat, sagt, daß das Jekorin wohl gären kann, wenngleich nicht so gut, als wenn die Jekorinlösung vorher mit Säure invertiert und hierauf neutralisiert worden ist. Meinertz<sup>3)</sup> hingegen gibt an, daß es ihm niemals gelang in der wässrigen Jekorinlösung durch Hefe eine Gärung zu erzielen. Bei beiden Autoren vermißt man die Angabe, welche Konzentration die zu den Gärungsversuchen benutzten Jekorinlösungen hatten. Denn es ist einleuchtend, da ja das Jekorin nur kleine Mengen Traubenzucker enthält, daß bei einer zu geringen Konzentration ein positiver Ausfall der Gärungsprobe überhaupt nicht zu erwarten ist, ein negatives Resultat also nicht gegen die Gärfähigkeit des Jekorins sprechen würde. In 1 g Jekorin beispielsweise lassen sich, wie aus meinen obigen Mitteilungen hervorgeht, vor der Spaltung mit Säure nur 0,1 g Zucker durch die Reduktionsbestimmung nachweisen. Eine 1% ige Jekorinlösung würde also für den Gärungsversuch einer 0,1% igen Glukoselösung entsprechen. Dies ist etwa gerade die kleinste Menge, welche durch die Gärung noch nachgewiesen werden kann. Ein absolut eindeutiges Resultat wird man aber mit einer 0,1% igen Zuckerlösung bei der gewöhn-

---

<sup>1)</sup> Wenn trotzdem das Osazon ohne vorhergehende Hydrolyse sehr reichlich entsteht, so handelt es sich entweder um eine Spaltung durch die bei der Osazondarstellung angewandte Essigsäure, oder um eine Verdrängung eines anderen Restes durch Phenylhydrazin; derartige Verdrängungen sind öfter beobachtet, vergl. C. Neuberg, Ber. d. dtsh. chem. Ges. **32**, 2397. 1899 und Physiologie der Pentosen u. d. Glukuronsäure Ergebnisse der Physiologie **3**, 409. 1904.

<sup>2)</sup> Jacobsen, Skandin. Archiv. f. Physiol. **6**, 1896.

<sup>3)</sup> Meinertz, a. a. O.



lichen Anstellung der Gärungsprobe kaum erhalten, da nur zu leicht die Hefe für sich kleine Mengen von Gas entwickelt. — Hier ist die Anwendung des Lohnsteinschen Apparates, der auch geringere Mengen recht exakt anzeigt, bei gleichzeitiger Anstellung der entsprechenden Kontrollversuche, sehr zu empfehlen. Ich fand nun, daß eine 1%ige Jekorinlösung im gewöhnlichen Gärungsröhrchen niemals eine sichere Gärung zeigte. Im Lohnsteinschen Apparat jedoch erhielt ich stets eine geringe Gärung, die 0,04—0,06% Zucker anzeigte. —

Mit einer 2%igen Jekorinlösung konnte ich auch bei der gewöhnlichen Anstellung der Probe regelmäßig deutliche CO<sub>2</sub>-Entwicklung konstatieren. Die Versuche wurden mit allen Kautelen ausgeführt, um Bakterienwirkung sicher auszuschließen, ebenso habe ich stets die nötigen Kontrollversuche gemacht und das gebildete Gas sicher als CO<sub>2</sub> identifiziert. Bei noch höheren Konzentrationen, bei 3 bis 4 bis 5%igen Jekorinlösungen ist die Gärung so ausgesprochen, daß ein Zweifel an der Gärfähigkeit des Jekorins nicht bestehen kann.

Es könnte allerdings der Einwand erhoben werden, daß die Gärung nicht durch das Jekorin selbst, sondern nur durch beigemengten Traubenzucker hervorgerufen ist, eine Anschauung, die von Waldvogel und Tintemann<sup>1)</sup> vertreten wird. Diese Forscher betonen, daß es ihnen nicht gelang das Jekorin zu vergären, ohne indes über die bei ihren Gärungsversuchen angewandten Mengen irgend welche Angaben zu machen. — Nach ihren eigenen Mitteilungen haben sie jedoch sehr häufig positive Gärungsproben mit dem Jekorin erhalten. Als Beweis, daß diese Gärung aber nicht auf Jekorin, sondern lediglich auf Verunreinigungen mit Traubenzucker zu beziehen sei, führen sie mehrere Punkte an.

Erstens fanden sie diese „Verunreinigungen mit Traubenzucker“ dann, wenn sie zur Fällung des Jekorins nicht die 3—4fache Menge Aceton — wie gewöhnlich — sondern die 7—8fache Menge verwandten. — Diese Angabe ist auffallend; denn es ist zwar denkbar, müßte aber erst bewiesen werden, wieso der Traubenzucker aus einer wässerigen oder alkoholischen Lösung durch Zusatz einer 3—4fachen Menge Aceton nicht

---

<sup>1)</sup> Waldvogel u. Tintemann, a. a. O.

gefällt werden soll, während dies bei der 7—8fachen Menge Aceton der Fall ist.

Zweitens betonen Waldvogel und Tintemann, daß sie solche mit Traubenzucker verunreinigten Jekorine daran erkannten, daß sie, mit Hefe vergoren, eine starke  $\text{CO}_2$ -Entwicklung lieferten. Es fehlt aber der Beweis, daß diese  $\text{CO}_2$ -Entwicklung nicht durch das Jekorin hervorgerufen ist! Wenn man feststellen will, ob eine Substanz gärt, kann man doch nicht von vornherein einen positiven Ausfall der Gärungsprobe als einen Beweis dafür ansehen, daß die Substanz mit Traubenzucker verunreinigt ist! — Weiterhin wird noch als Erkennungszeichen der mit Glukose verunreinigten Jekorine angegeben, daß sie nicht wie das reine Jekorin in schönen weißen, sich schnell absetzenden Flocken ausfielen, sondern daß am Boden sich ein braunschwarzer Sirup absetzte. — Diese Beobachtung kann man auch mitunter bei der gewöhnlichen Darstellung des Jekorins machen, man überzeugt sich aber stets, daß nach Lösung dieses Sirups und erneuter Fällung das Jekorin in der normalen Weise ausfällt. Wodurch diese Verhältnisse bedingt sind, läßt sich schwer mit Sicherheit sagen, ebensowenig wie wir die so oft beobachtete Tatsache einwandfrei erklären können, daß für gewöhnlich kristallinisch ausfallende Substanzen bisweilen amorph oder selbst als Schmierer gefällt werden. Wahrscheinlich sind es rein physikalische Momente, wie die Konzentrationsverhältnisse der Lösung, die die Hauptrolle dabei spielen. — Jedenfalls kann dieser Befund von W. u. T. nicht als Beweis für eine Verunreinigung des Jekorins mit Traubenzucker angesprochen werden.

Endlich schließen die Autoren auf eine Beimengung von Glukose daraus, daß sie bisweilen bei der quantitativen Reduktionsbestimmung der Jekorine größere Werte erhielten, als dies meist der Fall war. — Auch dieses Glied der Beweisführung scheint mir nicht stichhaltig zu sein. — Wir wissen ja, daß die verschiedenen Jekorine sich hinsichtlich ihres Reduktionsvermögens sehr ungleich verhalten; gibt es doch sogar Jekorine, die überhaupt keine reduzierende Substanz enthalten (z. B. das Jekorin aus Nebennieren). Nun haben aber gerade Waldvogel und Tintemann nicht ein bestimmtes Jekorin — wie die anderen Autoren und ich selbst (das Jekorin aus der Pferde-

leber), — sondern Jekorine von verschiedener Herkunft (Hundeleber, Hundemilz, Menschenleber, Menschenherz) untersucht, die noch dazu nicht aus frischen, sondern aus degenerierten oder lange autolysierten Organen gewonnen waren. — Daß bei diesen verschiedenen jekorinähnlichen Substanzen auch einmal besonders hohe Reduktionswerte gefunden werden, kann nicht verwundern, und spricht noch nicht dafür, daß dieselben durch beigemengten Traubenzucker veranlaßt sind.

Damit soll aber durchaus nicht gesagt sein, daß die von den genannten Autoren dargestellten Jekorine nicht wirklich durch beigemengten Zucker verunreinigt waren. Ihre von der gewöhnlichen abweichende Darstellungsmethode (Fällung des Jekorins aus wässriger Lösung durch Aceton) läßt solche Verunreinigung wohl möglich erscheinen. Aber die Kennzeichen, an denen W. und T. solche Beimengungen erkannt haben wollen, können nicht als solche angesprochen werden, und ihre Untersuchungen beweisen also keineswegs, daß eine Gärung des Jekorins auf Verunreinigung mit Glukose zu beziehen ist.

Daß das von mir dargestellte Jekorin, das wiederholt umgefällt und reichlich mit Alkohol gewaschen wurde, mechanisch beigemengten Traubenzucker enthält, erscheint in hohem Maße unwahrscheinlich. Ich glaube daher, daß die Gärung, welche man mit Jekorinlösungen von nicht zu geringer Konzentration erhält, durch das Jekorin selbst veranlaßt wird. — Dagegen spricht keineswegs der Umstand, daß es niemals gelingt, die ganze reduzierende Substanz zu vergären. Es ist vielleicht die Bindung des Traubenzuckers im Jekorin eine derartige, daß erst eine Spaltung stattfinden muß, die ihrerseits aber nicht zu Ende geht, analog dem Verhalten mancher Glukoside (z. B. des Koniferins), die durch Enzyme (z. B. Emulsin) nur langsam und unvollständig zerlegt werden.

Stärkere chemische Eingriffe, wie z. B. eine Säurehydrolyse, machen aber die Kohlehydratgruppe des Jekorins der Zymase in erhöhtem Grade zugänglich, denn nach Spaltung des Jekorins mittels 5%  $H_2SO_4$  und Neutralisation der Lösung ist die Gärung eine weit stärkere.

Die mitgeteilten Untersuchungen über das Leberjekorin sind bei weitem nicht ausreichend, um uns über die Konstitution des Jekorins genügende Aufschlüsse zu geben. Es wird bei weiteren

Forschungen vor allem notwendig sein, den bisher recht wenig berücksichtigten S- und Na-Gehalt des Jekorins näher zu studieren. Zweifellos sind Schwefel und Natrium integrierende Bestandteile des Jekorins; ihre Menge ist viel zu erheblich, wie die verschiedenen angeführten Analysen zeigen, um als Verunreinigungen betrachtet zu werden. Versuche, die ich über die Natur des im Jekorin enthaltenen Schwefel bereits begonnen habe, haben zu einem einheitlichen Resultat bisher nicht geführt. Die Versuche sollen später von mir fortgesetzt werden.

Schon der konstante Gehalt des Jekorins an S und Na beweist m. E., daß das Jekorin nicht einfach als Lecithinzucker angesehen werden kann.

Dieser unterscheidet sich weiterhin ganz wesentlich von dem Jekorin dadurch, daß die Glukose sich nur in ganz lockerer Bindung befindet, so daß die Lecithinglukose, wie ich früher ausgeführt habe, wahrscheinlich gar keine chemische Verbindung darstellt, Lecithin und Traubenzucker vielmehr sich nur in lockerer Bindung, resp. in Form einer festen Lösung befinden. Demgegenüber sind zweifellos im Jekorin Glukose und Lecithin in festerer Bindung, wenn wir auch über die Art dieser Bindung bisher nichts Sicheres aussagen können. — Während der Lecithinzucker ungemein leicht gespalten wird, ja die Abspaltung des Zuckers schon beim Waschen mit Alkohol, sogar schon beim Stehen der Lösungen erfolgt, ist der Traubenzucker im Jekorin so fest verankert, daß er nur in geringem Umfange vergärt, und daß es, wie auch Meinertz<sup>1)</sup> festgestellt hat, nicht gelingt, durch wiederholtes Umfällen mit Alkohol eine Abspaltung desselben zu erzielen.

### III. Zur Frage des physikalischen Verhaltens des Zuckers im Blute.

Wie ich früher ausgeführt habe, ist von einigen Forschern die Anschauung entwickelt, daß der Zucker nicht frei, sondern größtenteils an Lecithin gebunden, als Jekorin, im Blute kreist.

Ich glaube im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt zu haben, daß die Versuche, welche die genannten Autoren für diese Anschauung beigebracht haben, nichts zugunsten derselben

---

<sup>1)</sup> Meinertz, a. a. O.

beweisen können, da sie sich lediglich auf quantitative Bestimmungen der in den Ätherextrakt des Blutes übergehenden reduzierenden Substanz stützen.

Wenngleich Jekorin und Lecithinzucker mancherlei Ähnlichkeiten in ihren Reaktionen aufweisen, die sich einfach dadurch erklären lassen, daß beide Lecithin und Traubenzucker enthalten, so kann doch, wie ich bereits betont habe, von einer Identität beider schon deshalb keine Rede sein, weil die Bindungsverhältnisse zwischen Lecithin und Zucker total verschieden sind.

Immerhin ist die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, daß im Organismus zwischen Lecithin und Zucker eine festere Bindung zustande kommt, als wir sie außerhalb des Körpers synthetisch herstellen können, indem dann aber gleichzeitig Schwefel und Natrium sich mit dem Lecithin verbinden. Nun haben aber alle bisher ausgeführten Dialysiersversuche — ich denke vor allem an die Experimente von Schenk<sup>1)</sup> aus dem Jahre 1890 — gezeigt, daß der Zucker aus dem Blut bis zum Gleichgewicht zwischen Innen- und Außenflüssigkeit diffundiert, und man hat infolge dieser Ergebnisse den Schluß gezogen, daß der Zucker im Blute frei gelöst ist, und nicht in gebundenem Zustand vorhanden sein kann. In neuester Zeit hat L. Asher<sup>2)</sup> diese Dialysiersversuche wieder aufgenommen. Seine Versuche unterscheiden sich von den früheren im wesentlichen dadurch, daß er nicht gegen Wasser, sondern gegen Blut, das durch Vergärung zuckerfrei gemacht war, dialysierte. Auch Asher hat durch seine mit allen Kautelen ausgeführten Versuche feststellen können, daß der Blutzucker aus dem Blut durch Diffusion verschwindet, und zwar auch dann, wenn die Außenflüssigkeit selbst wieder Blut gleicher Zusammensetzung, abgesehen vom Zuckergehalt, ist. Er kommt daher ebenfalls zu dem Schluß, daß physikalisch-chemisch der Zucker sich in freigelöstem Zustand im Blute befindet.

Gegen die Ashersche Schlußfolgerung läßt sich nun aber ein gewichtiger Einwand erheben. Wenn nämlich der Zucker im Blute gebunden ist, so muß man sich natürlich vorstellen,

---

<sup>1)</sup> Schenk, Pflügers Archiv 47, 1890.

<sup>2)</sup> L. Asher, Zentralbl. f. Physiol. 1905, No. 14.

daß er je nach Bedarf aus seiner Bindung abgespalten werden kann. Nach allen unseren Vorstellungen müssen wir dann annehmen, daß im Blute ein Ferment vorhanden ist, das den Zucker aus dem Jekorin abspaltet. Es könnte nun sehr wohl möglich sein, daß dieses zuckerabspaltende Ferment während des Dialysierprozesses dauernd wirksam ist, so daß schließlich der Zucker, trotzdem er ursprünglich gebunden ist, aus dem Blute durch Diffusion verschwinden kann.

Ich glaube daher, die Schlußfolgerung, daß der Zucker frei gelöst im Blute zirkuliert, erst dann als bewiesen ansehen zu dürfen, wenn der Nachweis geführt ist, daß ein zuckerabspaltendes Ferment im Blute nicht existiert.

Da für die Annahme einer Bindung des Zuckers in erster Linie die Bindung an Lecithin, also das Jekorin, in Betracht kommt, war vor allem festzustellen, ob durch die Einwirkung von Blut das Jekorin seinen Zucker abspaltet.

Ich habe deshalb eine Reihe von Versuchen angestellt, die diese Frage entscheiden sollten. Bei allen Untersuchungen über das Vorkommen eines bestimmten Fermentes im Blute hat man von vornherein mit zwei Schwierigkeiten zu rechnen, die sich nicht völlig umgehen lassen. Will man das Blut als solches, und nicht seine Komponenten, Blutserum und Blutkörperchen, untersuchen, so muß man darauf bedacht sein, die Gerinnung des Blutes zu verhindern. Dies geschieht am zweckmäßigsten durch Zusatz von gerinnungshemmenden Substanzen. Von diesen kann man aber nicht mit Sicherheit wissen, ob sie nicht gerade auf das gesuchte Enzym schädigend einwirken, beziehungsweise seine Wirkung ganz aufheben.

Benutzt man andererseits Blutserum, so ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß das betreffende Ferment bei der Gerinnung des Blutes durch die Blutkörperchen mitgerissen wird.

Was den ersten Punkt betrifft, so besitzen wir in dem Fluornatrium ein Mittel, das schon in sehr geringer Menge die Blutgerinnung aufhebt und gleichzeitig das Manifestwerden des glykolytischen Fermentes verhindert. Es ist also nicht ausgeschlossen, daß auch das supponierte zuckerabspaltende Ferment durch Fluornatrium unwirksam gemacht wird. Trotzdem durfte mir a priori in meinen Versuchen ein negativer Ausfall derselben beweisend für die Abwesenheit eines jekorinspaltenden Fermentes

erscheinen. Asher hat nämlich bei seinen besprochenen Dialysier-Versuchen das zu dialysierende Blut mit Fluornatrium versetzt. Da nun der Zucker dieses Fluornatriumblutes bei der Dialyse aus dem Blut verschwindet, so muß er entweder frei gelöst sein, oder es kann, wenn der Zucker gebunden ist, das in diesem letzteren Falle notwendig vorhandene zuckerabspaltende Ferment durch das Fluornatrium in seiner Wirkung nicht beeinträchtigt werden.

Was den zweiten Punkt betrifft, so dürfte es von vornherein als ziemlich sicher angesehen werden, daß man das supponierte Ferment im Blutserum finden müsse; und die angedeutete Möglichkeit, daß es bei der Gerinnung des Blutes von den Blutkörperchen mitgerissen würde, war nach allen Erfahrungen als sehr gering zu veranschlagen. Ich habe nun bei meinen Versuchen beide Verfahren benützt. — Die Versuche wurden unter den größten Kautelen ausgeführt; sämtliche mit dem Blut und dem Jekorin in Berührung kommenden Gefäße und Instrumente wurden sorgfältigst sterilisiert, um jede Bakterienwirkung sicher ausschließen zu können. Ich benützte für die Versuche Hundeblood, das ich direkt aus einer Arterie des Tieres (ohne Narkose operiert) in das vorbereitete sterile Gefäß hineinfließen ließ.

Ich möchte nicht verfehlen, Herrn Dr. Bickel, dem Vorsteher der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Institutes, der so liebenswürdig war, die Operation jedesmal persönlich vorzunehmen, für seine bereitwillige Hilfe auch an dieser Stelle meinen wärmsten Dank auszusprechen.

Es wurde eine bestimmte Menge Blut dem in physiologischer Kochsalzlösung gelösten Jekorin oder dem Jekorin in Substanz zugesetzt, und die Lösungen 24 Stunden bei einer Temperatur von 35° im Brutschrank belassen.

Zur Kontrolle wurden stets dieselbe Quantität Blut ohne Jekorin und dieselbe Menge Jekorin ohne Blut lediglich mit dem nötigen Zusatz von physiol. ClNa-Lösung, um die gleichen Mengenverhältnisse zu erhalten, gleichzeitig in den Brutschrank gebracht und ebenfalls nach 24 Stunden herausgenommen. Die Zuckermenge habe ich nicht durch Reduktionsbestimmungen, sondern durch quantitative Gärungsbestimmungen im Lohnstein-schen Apparat bestimmt, nachdem ich ja schon vorher fest-

gestellt hatte, daß das Jekorin als solches nur ganz schwach gärt, nach Spaltung mit Säure indes erheblich stärkere Gärung zeigt. Zu bemerken habe ich noch, daß in denjenigen Versuchen, in denen ich Fluornatriumblut verwendete, dem mit Blut zu beschickenden, gut verschließbaren Gefäß vorher so viel Fluornatrium in Substanz zugesetzt wurde, daß eine 0,2 %ige Lösung entstand. Von diesem Fluornatriumblut wurden dann mittels sterilisierter Pipetten 10—20 ccm dem vorbereiteten Jekorin zugesetzt, so daß die einzelnen Proben nur sehr kleine Mengen Fluornatrium enthielten. Bevor die Flaschen in den Brutschrank gestellt wurden, wurde zu jeder 1 Tropfen Toluol zugesetzt, nachdem ich mich vorher durch quantitative mit reinen Traubenzuckerlösungen ausgeführte Versuche überzeugt hatte, daß dieser geringe Toluolzusatz die Gärung nicht im geringsten beeinflußt.

## Versuch I.

	Zuckergehalt nach 24stünd. Brutschrank- Digestion.
Lösung von 1 g Jekorin in 20 ccm physiol. ClNa- Lösung + 20 ccm Blut . . . . .	0,18 %
Lösung von 1 g Jekorin in 20 ccm ClNa-Lösung + 20 ccm ClNa-Lösung . . . . .	0,12 „
20 ccm Blut + 20 ccm ClNa-Lösung . . . . .	0,08 „

## Versuch II.

Lösung von 0,5 g Jekorin in 10 ccm phys. ClNa- Lösung + 10 ccm Blut . . . . .	0,15 „
Lösung von 0,5 g Jekorin in 10 ccm ClNa-Lösung + 10 ccm ClNa-Lösung . . . . .	0,1 „
10 ccm Blut + 10 ccm ClNa-Lösung . . . . .	0,1 „

## Versuch III.

0,1 g Jekorin direkt gelöst in 10 ccm Blut . . . . .	0,19 „
0,1 g Jekorin gelöst in 10 ccm ClNa-Lösung . . . . .	0,05 „
10 ccm Blut . . . . .	0,18 „

## Versuch IV.

0,3 g Jekorin gelöst in 20 ccm Blut . . . . .	0,22 „
0,3 g Jekorin gelöst in 20 ccm ClNa-Lösung . . . . .	0,08 „
20 ccm Blut . . . . .	0,13 „



## Versuch V.

	Zuckergehalt nach 24stünd. Brutschrank- Digestion.
Lösung von 0,2 g Jekorin in 10 ccm ClNa-Lösung	
+ 10 ccm Blutserum . . . . .	0,08 ‰
Lösung von 0,2 g Jekorin in 10 ccm ClNa-Lösung	
+ 10 ccm ClNa-Lösung . . . . .	0,04 „
10 ccm Blutserum + 10 ccm ClNa-Lösung . . .	0,08 „

## Versuch VI.

0,5 g Jekorin in 10 ccm Blutserum . . . . .	0,4 „
0,5 g Jekorin gelöst in 10 ccm ClNa-Lösung . . .	0,3 „
10 ccm Blutserum . . . . .	0,15 „

Unter Berücksichtigung der vorhergehenden Ausführungen zeigen die vorstehenden Zahlen in aller Eindeutigkeit, daß durch die Einwirkung von Blut kein Zucker aus dem Jekorin abgespalten wird. Es muß also die Existenz eines aus dem Jekorin zuckerabspaltenden Fermentes im Blute in Abrede gestellt werden. Mithin würden meine Versuche gegen die Annahme sprechen, daß der Zucker im Blute in gebundenem Zustande, als Jekorin, vorhanden ist.

Ich gebe allerdings zu, daß die Versuche vielleicht nicht völlig beweisend sind. Man könnte nämlich einwenden, daß ich das Blut nicht auf Blutjekorin, sondern auf Leberjekorin habe einwirken lassen; denn es ist nicht undenkbar, daß das Blutjekorin sich anders als das Leberjekorin verhält. Auch der Einwand könnte erhoben werden, daß ich nicht Jekorin und Blut von derselben Tierspezies angewendet habe, da ich ja aus Pferdeleber gewonnenes Jekorin und Hundeblood benützt habe. — Ob diese Einwände berechtigt sind, kann nur durch das Experiment entschieden werden.

Vor allem erscheint es notwendig, die Untersuchungen über das Jekorin nicht nur auf das Leberjekorin zu beschränken, sondern auch die aus andern Organen stammenden Jekorine genauer zu studieren, als dies bisher geschehen ist, und besonders das Blutjekorin, das seit Baldi überhaupt nicht mehr dargestellt worden ist, eingehender zu untersuchen. Baldi hatte festgestellt, daß das aus Pferdeblut gewonnene Jekorin ebenso wie das Leberjekorin stark reduziert. Eigene Untersuchungen, die ich mit dem Blutjekorin bereits in Angriff genommen habe

und später fortzusetzen beabsichtige, haben bereits ein bemerkenswertes Faktum ergeben. Es hat sich nämlich gezeigt, daß Jekorin, welches ich aus Rinderblut dargestellt habe, keine reduzierende Eigenschaft besitzt. Es ist einleuchtend, daß dieser Befund gerade für die Frage, ob der Zucker als Jekorin im Blute kreist, von großer Bedeutung ist. Weitere Forschungen müssen zeigen, ob wirklich das Blutjekorin verschiedener Tierespezies, wie es den Anschein hat, sich hinsichtlich seiner Zuckergruppe ganz verschieden verhält, oder ob vielleicht der Kohlenhydratkomplex des Jekorins eine vollkommen inkonstante Größe ist. — Es könnte ja sein, daß der Gehalt an Traubenzucker von verschiedenen Momenten, z. B. von den Ernährungsverhältnissen abhängig ist. Man müßte also den Kohlenhydratgehalt des Jekorins unter den verschiedensten Ernährungsbedingungen quantitativ bestimmen, man müßte das Jekorin von Hungertieren, von phloridzin-diabetischen und von pankreasdiabetischen Tieren untersuchen und wird auf diese Weise vielleicht manche wichtigen Aufschlüsse erlangen.

Auch das Verhalten des Jekorins zu den Fermenten ist für die hier aufgerollten Fragen von Bedeutung, und von speziellem Interesse dürfte es sein festzustellen, ob durch bestimmte Fermente der Zucker aus dem Jekorin abgespalten werden kann. Untersuchungen, die ich nach dieser Richtung begonnen habe, haben für das Emulsin gezeigt, daß dieses Ferment keinen Zucker aus dem Jekorin abspaltet.

So ergeben sich denn aus den mitgeteilten Untersuchungen eine Reihe von neuen Fragestellungen, durch deren Bearbeitung auch die Frage, ob der Zucker in freiem Zustande oder gebunden im Blute vorhanden ist, von neuen Gesichtspunkten aus beleuchtet werden kann. —

#### Anhang.

Da Kyes<sup>1)</sup> festgestellt hat, daß das Lecithin sich nach Art eines Komplementes mit dem Kobragift verbindet, war es naheliegend, auch die Beziehungen des Jekorins und der von mir dargestellten Lecithinglukose zu dem Kobragift zu studieren. Ich habe diese Untersuchungen gemeinschaftlich mit Herrn

---

<sup>1)</sup> Kyes, Berl. klin. Wochenschr. 1902, 38 u. 39.

Professor Morgenroth ausgeführt. Es stellte sich heraus, daß eine Lösung von Jekorin in physiologischer Kochsalzlösung Kobragift genau so aktiviert wie Lecithin selbst, ohne daß zwischen dem Verlauf der Kobragifthämolyse mit Lecithin und mit Jekorin ein Unterschied wahrzunehmen war.

Auch die klare, neutral reagierende Lösung von Lecithinzucker in physiologischer Kochsalzlösung aktiviert Kobragift. Während aber die Hämolyse von Kaninchenblut durch frische Gemische von Kobragift und Lecithin auch bei erheblichem Lecithinüberschuß nur langsam eintritt, erfolgt sie durch ein frisch bereitetes Gemisch von Kobragift und entsprechenden größeren Mengen der Lecithinglukose bei Zimmertemperatur in wenigen Minuten — eine Beschleunigung, die nicht etwa auch durch Zusatz von Traubenzucker zur Lecithinlösung zu erzielen ist. Es besteht also zwischen dem Verlauf der Kobragifthämolyse mit Lecithin und mit Traubenzuckerlecithid ein charakteristischer Unterschied, so wie ihn Kyes<sup>1)</sup> beim Vergleich der Hämolyse durch Kobragift-Lecithingemische einerseits und durch das von ihm dargestellte Kobralecithid andererseits beobachtet hat. Kyes bezieht diese Differenz auf die zur Bildung des eigentlichen toxischen Agens, des Lecithids, notwendige Zeit. Wir müssen demnach der Lecithinglukose eine dem Lecithin gegenüber erhöhte Reaktionsfähigkeit mit dem Kobrahämolsin zuschreiben, an der vielleicht deren bessere Löslichkeit beteiligt ist. Bemerkenswert ist auch, daß die Toxizität der Lecithinglukose an und für sich Kaninchenblut gegenüber eine erheblichere ist als die der käuflichen Lecithinpräparate. Die Hämolyse erfolgt rascher und durch Mengen von (berechnet) geringerem Lecithingehalt.

Wir beabsichtigen, die Beziehungen der Substanz zum Kobragift noch genauer zu untersuchen.

---

<sup>1)</sup> Kyes, Berl. klin. Wochenschr. 1903, 42—43.

## Über das Verhalten des Ovomukoids im Organismus.

Von

**Dr. K. Willanen aus Petersburg.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts  
der Universität zu Berlin.)

*(Eingegangen am 12. Mai 1906.)*

Ovomukoid, das fast gleichzeitig von Neumeister<sup>1)</sup>, E. Salkowski<sup>2)</sup> und C. Th. Mörner<sup>3)</sup> entdeckt und beschrieben worden ist, stellt einen wichtigen Bestandteil des Eierklars dar.

Seit seiner Entdeckung ist es schon Gegenstand einiger Untersuchungen gewesen, in denen man seine chemische Konstitution aufzuklären versuchte.

Bekanntlich kann man diese Substanz auf verschiedenem Wege darstellen.

Neumeister bereitete sein „Pseudopepton“ durch Sättigung des Filtrats von auskoagulierter wässriger Eierklarlösung mit Ammoniumsulfat, Behandlung des Niederschlages mit Alkohol und Ausziehen desselben mit Wasser; E. Salkowski durch Eindampfen des Filtrats der auskoagulierten Eierklarlösung zur Trockne als bräunlich gefärbten Rückstand, andererseits durch Fällung des eingeeigneten Filtrats mit Alkohol und Waschung mit Äther „als äußerst zartes weißes Pulver, welches sich reichlich in Wasser löst“; er bezeichnete sein Präparat „als eigentümliche Albumose, die ihre physikalischen Eigenschaften

---

<sup>1)</sup> Neumeister, Zeitschr. f. Biol. 27; 1890, S. 369.

<sup>2)</sup> E. Salkowski, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1893, S. 513 u. 706.

<sup>3)</sup> C. Th. Mörner, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1893, S. 705 und Zeitschr. f. physiol. Chemie, 18, S. 525 (1894).

verändern kann“. C. Mörner stellte sein Ovomukoid, unabhängig von E. Salkowski, gleichfalls durch Ausfällen des oben erwähnten Filtrates mit absolutem Alkohol, Nachwaschen mit Äther und Trocknen dar.

Die Ausfällung mit Alkohol und Behandlung mit Äther wird jetzt gewöhnlich zur Darstellung in größeren Mengen des Ovomukoids angewendet. Unter diesen Produkten, die auf verschiedene Art und Weise aus Eierklar entstehen, versteht man ein und dieselbe Substanz, von ihren chemischen Eigenschaften aus betrachtet. Was die physikalischen Gesichtspunkte anbetrifft, so gibt es Unterschiede je nach der verschiedenartigen Bearbeitung und Darstellung des Ovomukoids. Während das durch Eindampfen gewonnene Ovomukoid in Wasser fast unlöslich ist, und nur zu einer geleeartigen Masse anschwillt, ist das durch Alkoholfällung erhaltene leicht löslich. Wie schon die oben erwähnten Autoren bemerkten, konnte auch ich mich davon überzeugen, daß nach längerer Bearbeitung des gewöhnlich leicht löslichen Ovomukoidpulvers mit Alkohol dieses letztere seine Fähigkeit, sich in Wasser leicht zu lösen, verliert. Es hatte eine in Wasser schwerer lösliche Form angenommen.

Ich habe auch bemerkt, daß sich dieses Pulver besser und in größeren Mengen auflöst, wenn man es allmählich in Wasser bringt und nicht gleich größere Mengen hineinwirft. Besonders bei heißem oder kochendem Wasser bleibt ein großer Teil ungelöst, der als Klumpen bildende, gelatinöse Masse umher schwimmt.

Über die chemischen Eigenschaften des Ovomukoids herrscht bei allen Autoren dieselbe Meinung.

Die Ovomukoidlösung gibt positive Biuret- und Millonsche Reaktion; betreffs der Adamkiewitzschen Reaktion sind die Ansichten geteilt. Mörner und andere haben ein negatives Ergebnis erhalten, während Langstein<sup>1)</sup> immer eine positive Reaktion gefunden hat. Er sagt: „vielleicht ist der negative Befund in manchen Fällen darauf zurückzuführen, daß der angewandte Eisessig keine Glyoxylsäure enthält.“ Nach meinen eigenen Beobachtungen ist die Reaktion positiv, wenn der Eisessig etwas Glyoxylsäure enthält; aber diese positive Reaktion

<sup>1)</sup> L. Langstein, Hofmeisters Beiträge, III, Heft II, S. 510.

war immer sehr schwach, so daß ich nur etwas violettertliche Farbe bekam. Eisessig ohne Glyoxylsäure gab immer ein negatives Resultat.

Das Ovomukoid fällt aus der Lösung beim Kochen und durch Einwirkung von vielen eiweißfällenden Körpern nicht aus. Es wird durch Mineral-, organische Säuren, Metallsalze, Chlor-natrium, schwefelsaures Natrium und Magnesium nicht gefällt; nur durch Sättigung mit schwefelsaurem Ammonium, Ansfällen durch Alkohol, Tannin, Phosphorwolframsäure und Bleiacetat bei Anwesenheit von Ammoniak kann man Ovomukoid aus seinen Lösungen erhalten.

Durch seine Fähigkeit mit Ammoniumsulfat ausgesalzen zu werden, unterscheidet sich das Ovomukoid von Peptonen, mit denen es einige Ähnlichkeiten hat (deswegen hat Neumeister es „Pseudopepton“ genannt). Infolge seiner chemischen Eigenschaften verhält sich das Ovomukoid wie ein albumosenähnlicher Körper, seines reichlichen Gehaltes an reduzierenden Gruppen und seiner konstitutionellen Merkmale wie ein Glykoprotein bzw. ein Chondroprotein (Langstein).

Schon Mörner hat im Ovomukoid 12,68% Stickstoff, 2,2% Schwefel und 1,60—2,48% Asche gefunden. In Übereinstimmung mit diesen Zahlen stehen auch die Elementaranalysen von Zanetti<sup>1)</sup> und Langstein:

	C	H	N	S	P
Zanettis Zahlen:	48,75%	6,9%	12,46%	2,22%	—
	48,94 „	6,94 „	—	—	—
Langsteins „	48,79 „	6,96 „	12,51 „	2,23 „	Spuren

In der folgenden Zeit hat Milesi<sup>2)</sup> dieselbe Substanz durch direktes Versetzen des Hühnereiweißes mit einem großem Überschusse von 99% Alkohol gewonnen; der gebildete Niederschlag wurde im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet und pulverisiert; mit einer geringen Menge kalten Wassers wurde dieses Pulver extrahiert und danach aus dieser Extraktionsflüssigkeit wieder mit Alkohol ausgefällt. So hat er auch ein weißes Pulver dargestellt, das nach Analysen von Langstein 48,82% C, 6,9% H, 12,41% N, 2,19% S und Spuren von P ergab, also mit gewöhnlichem Ovomukoid identisch war.

<sup>1)</sup> Zanetti, *Annali di Chimica e di Farmacologia*, XXVI, 12, 529.

<sup>2)</sup> C. Milesi, *Bollettino della società medico-chirurgica di Pavia* 1898.

Diese Angabe beweist, daß Ovomukoid schon im Hühner-eiweiß präformiert ist.

Die Werte der Elementaranalyse des Ovomukoids scheinen jetzt endgültig festgesetzt zu sein, nur über den Prozentgehalt des Phosphors und die Form des Schwefels ist man sich noch nicht im klaren. Milesi hat in einem Präparat 1,65 % Phosphor gefunden, Langstein in demselben nur Spuren.

Über die Form des Schwefels im Ovomukoid herrschen verschiedene Meinungen. Mörner meint den Schwefel als lose gebunden annehmen zu müssen. Zanetti dagegen bemerkt, daß bei der Behandlung des Ovomukoids mit Salzsäure ein Teil des Schwefels als Schwefelsäure abgespalten wird. „Die kalte wässrige Lösung des Mukoids gibt, mit einigen Tropfen Salzsäure versetzt, keinen Niederschlag bei Behandlung mit Chlorbaryum; kocht man aber die Flüssigkeit eine Zeitlang auf, so färbt sie sich bräunlich, und es scheidet sich schwefelsaures Baryum ab. Kocht man so eine Mukoids substanz mit 5 %-iger Salzsäure 18 Stunden lang, so wird etwa  $\frac{1}{3}$  des Gesamtschwefels abgespalten.“ Langstein konnte das nicht konstatieren, im Gegenteil, „erst nach dreimal zwölfstündigem Kochen werden Spuren von Schwefelsäure in Freiheit gesetzt, ein Prozeß, der wohl einer sekundär-oxydativen Wirkung des Kochens mit Salzsäure zuzuschreiben ist.“ Er hatte ferner nach der Methode von F. N. Schulz feststellen können, „daß von 2,22 % Schwefel 1,39 bis 1,43 % leicht abspaltbar sind, also nicht viel weniger als  $\frac{3}{4}$  des Gesamtschwefels.“

Weil meine Versuche in diesem Sinne nicht bis zum Ende durchgeführt werden konnten, muß ich mich über diese Frage vorläufig mit oben Gesagtem begnügen.

In der letzten Zeit hat E. Abderhalden<sup>1)</sup> eine Hydrolyse des Ovomukoids nach der bekannten Methode von E. Fischer ausgeführt und fand in den einzelnen Fraktionen: Leucin,  $\alpha$ -Pyrrolidin-Karbonsäure, Phenylalanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure.

Als ein Glykoproteid enthält das Ovomukoid eine Kohlehydratgruppe. Diese durch Kochen mit Mineralsäuren abspaltbare Gruppe ist nach ihrer Konstitution, wie es von

<sup>1)</sup> E. Abderhalden, Zeitschr. f. Phys. Chem., XLIV, S. 44.

Zanetti und Seemann jetzt festgestellt ist, Glukosamin oder Chitosamin. Seemann<sup>1)</sup> hat die Zuckersubstanz im Ovomukoid auch quantitativ bestimmt und fand berechnet auf Traubenzucker 34,9 %.

Das ist alles, was wir bis jetzt über Ovomukoid und seine Eigenschaften wissen.

Wie bereits erwähnt, interessierten sich alle Autoren nur für die chemischen Eigenschaften dieses Körpers.

Über seine physiologische Bedeutung gibt es bisher noch keine Versuche. Der außerordentlich große Gehalt des Ovomukoids im Hühnereiweiß — etwa 12 % — kann nicht ohne physiologische Bedeutung sein, und es schien die Möglichkeit vorhanden, daß diese Substanz auch zu den Nährstoffen des Albumens gehören könne. Deswegen war es von hohem Interesse, sein Verhalten im Organismus zu prüfen.

Auf Anregung von Herrn Prof. E. Salkowski möchte ich einige wichtige Punkte in dieser Frage zu klären versuchen. Bevor ich aber zu meinen Untersuchungen übergehe, sei es hier erwähnt, daß Ovomukoid erklärlicherweise auch in hartgekochten Eiern vorhanden ist. Ich habe aus solchen Eiern ganz reines Ovomukoid mit allen seinen chemischen Eigenschaften gewonnen.

Die Methode der Darstellung war folgende: Hartes Eiweiß wurde zerhackt, mit etwas Wasser in einer Reibschale verrieben und unter Zusatz von einer kleinen Menge einer Essigsäurelösung in einem großen Volumen Wasser gekocht. Der Zusatz von Essigsäure erschien mir notwendig, um ein ganz klares Filtrat zu bekommen. Aus diesem wurde durch Verarbeitung mit Alkohol und Äther das Ovomukoidpulver erhalten.

Nach beschriebener Methode gelang es mir, aus 3 Eiern 0,84 g des Ovomukoids darzustellen, eine Menge, welche fast genau dem Gehalt von 10 % dieser Substanz im Hühnereiweiß entspricht. Es ist erklärlich, daß eine vollständige Extraktion aus dem hartgekochten Ei nicht erreicht wurde. In bezug auf die Größe der Kohlehydratgruppe war das so erhaltene Ovomukoid dem gewöhnlichen identisch. Dieser Versuch zeigt uns, daß wir beim Genusse von gekochten Eiern auch unverändertes Ovomukoid in uns einführen.

<sup>1)</sup> J. Seemann, Inaug.-Diss. Marburg 1898.



Weitere Untersuchungen von mir wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Verfahren zum Nachweis des Ovomukoids im Harn.
2. Übergang in den Harn bei Einspritzung in die Venen, subkutan und Fütterung mit Ovomukoid.
3. Verdauung mit Pepsinsalzsäure. Ob die Kohlehydratgruppe abgespalten wird?
4. Verdauung mit Pankreaspulver. Dieselbe Frage wie vorher.
5. Abspaltung der Kohlehydratgruppe bei der Autolyse mit Milz.
6. Abspaltung dieser Gruppe bei der Fäulnis.

Zur Beantwortung aller dieser Fragen war es sehr wichtig, zuerst den Gehalt der Zuckersubstanz im Ovomukoid festzustellen.

Wie oben erwähnt, hat nur Seemann quantitative Bestimmungen der reduzierenden Substanz im Ovomukoid gemacht.

Für diese wie für alle weiter beschriebenen Versuche habe ich das Ovomukoid in der üblichen Weise dargestellt.

Hühnereiweiß wurde mit dem 4fachen Volumen Wasser gut durchgeschüttelt, kolliert, in das  $1\frac{1}{2}$ fache Volumen siedenden Wassers eingegossen, unter Zusatz von Essigsäure bis zur schwach sauren Reaktion unter gutem Umrühren auf freiem Feuer, zuletzt bis zum starken Sieden erhitzt und abfiltriert; das Filtrat, das keine Fällung mit Quecksilberchlorid und Salpetersäure gab, wurde anfangs auf freiem Feuer, dann auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen eingedampft, abfiltriert und in die 5fache Menge absoluten Alkohols gegossen.

Der erhaltene Niederschlag wurde mehrmals in Wasser gelöst und wieder mit absolutem Alkohol gefällt, filtriert, mit Äther nachgewaschen und so entwässert.

Diese Reinigung des Körpers dauerte so lange fort, bis es in Wasser gelöst keine Spuren von Reduktion in Fehlingscher Lösung mehr gab.

Die Zuckerbestimmung in diesem Ovomukoidpulver ging nach der Wägungsmethode vor sich, und bestand in folgenden:

30 ccm Fehlingscher Lösung wurden mit 50 ccm Wasser verdünnt, in einem Erlenmeyerschen Kölbchen (von 200 ccm Volumen) zum Sieden erhitzt, 10—20 ccm der mit Salzsäure

erhitzten Ovomukoidlösung bestimmter Konzentration hinzugesetzt, 5 Minuten in gelindem Sieden erhalten und dann mit etwa 100 ccm gekochtem Wasser versetzt. Nach einigen Stunden wurde durch ein doppeltes, vorher gewogenes Filter (Schleicher und Schüll Nr. 590) abfiltriert, reichlich mit heißem Wasser ausgewaschen (bis eine Probe des Waschwassers durch Salzsäure + Chlorbaryum nicht mehr getrübt wird) dann mit Alkohol und Äther nachgewaschen, und bei 110—115° C. bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Differenz zwischen dem Gewichte des Filters und Filters + Niederschlages gab die Menge des Kupferoxyduls an. Zur Berechnung des Zuckergehaltes aus dem Kupferoxydul multipliziert man mit 0,5042.

Bekanntlich kann die reduzierende Substanz des Ovomukoids nur durch Kochen mit Salzsäure (Mineralsäure) nachgewiesen werden. Den Angaben von Fr. Müller und Seemann folgend, habe ich auch vielfach geprüft, um Optimumbestimmungen zu finden. In Übereinstimmung mit diesen Autoren habe ich auch mehrere Bedingungen gefunden, die auf die Vollkommenheit der Spaltung und der Bestimmung der Zuckersubstanz Einfluß haben können. Wenn man nach dem Kochen mit Salzsäure die Flüssigkeit längere Zeit stehen läßt, ohne sie zu neutralisieren, so verliert man einen bedeutenden Teil der reduzierenden Substanz. Auch bei neutralisierter, besonders aber bei alkalischer Reaktion konnte die Flüssigkeit nicht lange Zeit stehen bleiben, ohne daß die Menge der reduzierenden Substanz sich verminderte. Optimum der Zersetzung für Ovomukoid war bei 1—3 stündigem Kochen mit 5—10% Salzsäure (bezogen auf HCl = 20—40% Salzsäure von 1,124 D) auf freiem Feuer mit Durchleiten von Wasserdampf. Um alle schädlichen Einflüsse fern zu halten, habe ich bei meinen Versuchen möglichst schnell gearbeitet. Nach 1—3 stündigem Kochen des Ovomukoids mit 5—10% Salzsäurelösung auf dem Sandbade unter Durchleiten von Wasserdampf wurde die Flüssigkeit unter der Wasserleitung zum Erkalten gebracht und gleich bis zur neutralen oder schwach alkalischen Reaktion mit Natronlauge und mit Natriumkarbonat versetzt, wiederum abgekühlt und mit destilliertem Wasser bis zu einer bestimmten Menge der Lösung aufgefüllt. Eine genau abgemessene Menge wurde mit der Pipette sofort in schwach kochende Fehlingsche Lösung gegossen.

Um gut fällbares und abfiltrierbares Kupferoxydul zu bekommen, hielt ich es für vorteilhaft, der Fehlingschen Lösung noch etwas Natronlauge zuzusetzen. Mit dieser einfachen Methode konnte ich, wie meine Kontrollanalysen bewiesen, ziemlich genau arbeiten. Meine Versuche führten zu folgenden Resultaten:

Analyse 1. 0,5 g Ovomukoid nach 3 stünd. Kochen mit 50 ccm 3% HCl, neutralisiert auf 104 ccm aufgefüllt.

Gefunden: in 20 ccm 0,045 und 0,038 Cu<sub>2</sub>O, oder in 100 g Ovomukoid — 41,6 Cu<sub>2</sub>O = 20,97% der Zuckersubstanz.

Analyse 2. 0,5 g Ovomukoid nach 1 stünd. Kochen mit 50 ccm 5% HCl, neutralisiert auf 40 ccm aufgefüllt.

Gefunden: in 10 ccm 0,028, 0,039, 0,032 g Cu<sub>2</sub>O, oder 19,9% Zuckersubstanz in Ovomukoid.

Analyse 3. 0,5 g Ovomukoid nach 3 stünd. Kochen mit 50 ccm 5% HCl, neutralisiert bis 60 ccm.

Gefunden: in 10 ccm 0,032 und 0,036 g Cu<sub>2</sub>O, oder 19,46% der Zuckersubstanz im Ovomukoid.

Analyse 4. 0,5 g Ovomukoid nach 1 stünd. Kochen mit 50 ccm 5% HCl, neutralisiert bis 100 ccm.

Gefunden: in 10 ccm — 0,024, 0,020 und 0,022 g Cu<sub>2</sub>O, oder 22,18% der Zuckersubstanz im Ovomukoid.

Analyse 5. 0,5 g Ovomukoid nach 3 stünd. Kochen mit 50 ccm 5% HCl neutralisiert bis 100 ccm.

Gefunden: in 10 ccm 0,021, 0,022 und 0,021 g Cu<sub>2</sub>O, oder 21,17% Zucker im Ovomukoid.

Analyse 6. 0,5 g Ovomukoid nach 1 stünd. Kochen mit 50 ccm 10% HCl, neutralisiert bis 100 ccm.

Gefunden: in 10 ccm 0,0215, 0,0205 und 0,0205 Cu<sub>2</sub>O, oder 21,17% Zucker im Ovomukoid.

Analyse 7. 0,5 g Ovomukoid nach 3 stünd. Kochen mit 10% HCl, neutralisiert bis 100 ccm.

Gefunden: in 10 ccm 0,023, 0,0215 und 0,022 Cu<sub>2</sub>O, oder 22,33% des Zuckers im Ovomukoid.

Wie man aus diesen Analysen ersehen kann, schwankt der Gehalt an Zuckersubstanz im Ovomukoid zwischen 19,46% und 22,30%, Zahlen, die im Einklang mit den von Pavy<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Pavy, The Lancet 1. Juli 1905. Nr. I of Vol. II 1905 p. 4.

in seiner kürzlich erschienenen Arbeit gegebenen Zahlen (18,6 bis 26,5 %) stehen.

Nach diesen Angaben konnte ich für meine weiteren Versuche als Grundzahl 22 % des Zuckergehalts im Ovomukoid annehmen, ein Prozentgehalt, der bei weitem geringer ist, als der, den Seemann gefunden hat. Worin die Ursache dieser Differenz liegt, vermag ich nicht zu sagen.

### 1. Verfahren zum Nachweis des Ovomukoids im Harn.

Zum Nachweis und zur Bestimmung des Ovomukoids im Harn konnte ich nur die Ausfällungsmethode wählen und im Niederschlag das ausgeschiedene Ovomukoid nach dem Gehalte an Zuckersubstanz bestimmen.

Es erschienen mir, entsprechend den chemischen Eigenschaften des Ovomukoids, zwei Methoden als brauchbar:

- a) Ausfällen mit Phosphorwolframsäure und
- b) Fällen mit Alkohol, nachdem der Harn auf ein kleineres Volumen eingedampft war.

Aber schon die Versuche mit einer Lösung von reiner Ovomukoids substanz zeigten, daß bei weiterer Verarbeitung des durch Phosphorwolframsäure entstandenen Niederschlages mit Barytwasser und Kohlensäure (um die Phosphorwolframsäure zu entfernen) der größte Teil der reduzierenden Substanz verloren ging.

Deswegen erwies sich nur die Alkoholfällungsmethode, die nach einigen Vorprüfungen sich als sehr brauchbar zeigte, als geeignet.

Für diese Versuche nahm ich zwei gleiche Portionen des Harns, und setzte zu einer von diesen eine abgewogene Menge des Ovomukoids, das sich sehr leicht im Urin löste. Der so erhaltene ovomukoidhaltige Harn wurde dann in gleicher Weise wie reiner Harn verarbeitet. Die Differenz zwischen der Menge der reduzierenden Substanz des Harns mit Ovomukoid und des reinen Harns (normaler Kaninchenharn enthält beträchtliche Mengen einer alkoholfällbaren, nach der Hydrolyse reduzierenden Substanz) wurde auf Ovomukoid berechnet. Für die Analysen habe ich immer 100 ccm Harn genommen, auf dem Wasserbade auf 20—30 ccm eingedampft, in 150 ccm Alkohol absol. gegossen

und weiter nach oben beschriebener Methode des Ovomukoids verarbeitet.

Das so erhaltene weiße Pulver (alkoholfällbare Substanzen des Harns und solche + Ovomukoid) wurde dann aus dem Filter mit 10% Salzsäure im Erlenmeyerschen Kölbchen ausgewaschen, die Menge der salzsauren Lösung in diesen auf 50 ccm aufgefüllt und als der ganze Niederschlag sich gelöst hatte, wurde diese Flüssigkeit zwei Stunden auf dem Sandbade unter Durchleiten von Wasserdampf gekocht. Die sauer reagierende, dunkelbraune Flüssigkeit wurde unter der Wasserleitung abgekühlt, neutralisiert und mit kochender Fehling'scher Lösung in bekannter Weise weiter verarbeitet. Nachdem die Flüssigkeit einige Stunden sich selbst überlassen war, wurde der Niederschlag abfiltriert, mit Wasser, absolutem Alkohol und Äther nachgewaschen und getrocknet. Da dieser Niederschlag nicht nur Kupferoxydul enthielt, sondern auch andere Substanzen aus dem Harn, so konnte ich nicht die einfache Wägungsmethode benutzen. Ich löste den Rückstand auf dem Filter mit heißer Salpetersäure, dampfte die Lösung in einer Porzellanschale bis zur Trockne unter Zusatz von Schwefelsäure ein, um sie von der überschüssigen Salpetersäure zu befreien. Dann wurde der Rückstand wieder in ziemlich viel Wasser gelöst, in einem Becherglase zum Sieden erhitzt und mit einer Lösung von 10% Natriumthiosulfat so lange versetzt, als noch ein Niederschlag entstand. (Das Ausfällen des Kupfersulfür vollzieht sich quantitativer, wenn man einige Tropfen verdünnter Schwefelsäure hinzusetzt.) Sobald sich der schwarz gewordene Niederschlag abgesetzt hatte und die überstehende Flüssigkeit nur noch suspendierten Schwefel enthielt, war alles Kupfer gefällt. Der Niederschlag bestand aus Kupfersulfür und ließ sich leicht auswaschen, ohne daß er sich oxydierte. Derselbe wurde abfiltriert, mit heißem Wasser ausgewaschen (bis das Waschwasser nicht mehr sauer reagierte), getrocknet, verascht und wieder mit Salpetersäure gelöst. Nach dem Eindampfen (um die überschüssige Salpetersäure zu entfernen) und Aufnehmen mit Wasser wurde diese Lösung bis zum Sieden in einer Porzellanschale erhitzt und mit reiner, sehr verdünnter Natronlauge versetzt, so lange noch ein Niederschlag entstand. (Die Flüssigkeit darf nicht zu stark alkalisch werden, weil ein

Überschuß von Natronlauge einen Teil des Kupfers leicht wieder lösen kann.) Nachdem man die Lösung einige Minuten im Kochen erhalten hat, läßt man den Niederschlag absetzen und filtriert die Flüssigkeit ab, ohne den Niederschlag auf das Filter zu bringen. Der Niederschlag wird mit Wasser übergossen, wieder zum Sieden gebracht, nach dem Absetzen filtriert und überhaupt weiter nach den Regeln der quantitativen Analyse behandelt (Fresenius, Quant. Analyse, 6. Aufl., I, S. 329).

Folgende Zahlen zeigen den Unterschied zwischen ovomukoidhaltigem und reinem Harn:

Versuch 1:

- A. 100 ccm Harn ohne Ovomukoid ergab:  
0,0375 und 0,036 g CuO.
- B. 100 ccm Harn + 0,1 g Ovomukoid ergab:  
0,0930 und 0,087 g CuO.
- B — A = 0,0555 und 0,0510 g CuO, oder 0,0251 und 0,0231 g Zucker aus 0,1 g Ovomukoid.

Versuch 2:

- A. — 0,0369 und 0,366 g CuO.
- B. — 0,0823 und 0,0826 g CuO.
- B — A = 0,0454 und 0,0460 g CuO = 0,026 und 0,0208 g der Zuckersubstanz aus 0,1 g Ovomukoid.

Versuch 3:

- A. 0,0378 und 0,0374 g CuO.
- B. 0,0838 und 0,0814 g CuO.
- B — A = 0,046 und 0,044 g CuO, oder 0,0208 und 0,0199 g CuO aus 0,1 Ovomukoid.

Die Analysen zeigten, daß ich immer die zugesetzte Menge des Ovomukoids im Urin wiederfinden konnte, was aus der Zunahme der reduzierenden Substanz hervorging.

Auch nach 24stündigem Stehen des ovomukoidhaltigen Urins in der Kälte oder bei Zimmertemperatur unter Zusatz von etwas Chloroform habe ich keine Verminderung der Zuckersubstanz gefunden. Nach diesen Versuchen konnte ich zu den

## 2. Tierversuchen übergehen.

Ich suchte die Frage aufzuklären, von welchem Werte das Ovomukoid im tierischen Organismus ist.

Als Versuchstiere wurden Kaninchen gewählt.

Das Behandeln der Tiere und Sammeln des Harns war gleich so eingerichtet, wie es gewöhnlich bei Stoffwechselversuchen üblich ist.

Die Tiere haben die abgemessene Menge des Ovomukoids in 10 % Wasserlösung auf verschiedenen Wegen (in den Magen, subkutan und in die Ohrvene eingespritzt) bekommen; ich habe nicht mehr als 1 g pro Kilo des Körpergewichts gegeben, weil eine größere Menge des Präparats, in die Venen eingeführt, von den Tieren nicht vertragen werden konnte.

Die gefundenen Resultate sind in folgenden Tabellen angegeben:

**a) Einführung in den Magen.**

Versuch 1: Kaninchen von 1850 g Körpergewicht.

Normaler Urin.

Menge des Urin in 24 Stunden	Gramm Cu O in 100 ccm	Reduzierende Substanz berechnet als Zucker	
		in 100 ccm	im Tages-Urin
400 ccm	0,045	0,0205	0,0830
420 „	0,0323	0,0146	0,0604
500 „	0,0573	0,0250	0,1250
			Summa 0,2674 g

Nach Einführung von 1,85 g Ovomukoid.

220 ccm	0,0560	0,0259	0,0559
600 „	0,0366	0,0166	0,0996
400 „	0,0371	0,0168	0,0672
			Summa 0,2227 g

Versuch 2: Kaninchen von 1550 g Körpergewicht.

Normaler Urin.

Menge des Urin in 24 Stunden	Gramm Cu O in 100 ccm	Reduzierende Substanz berechnet als Zucker	
		in 100 ccm	im Tages-Urin
260 ccm	0,0528	0,0239	0,0620
240 „	0,0630	0,0286	0,0680
280 „	0,0580	0,0265	0,0740
			Summa 0,2040 g

Nach Einführung von 1,55 g Ovomukoid.

280 ccm	0,0510	0,0231	0,0646
340 „	0,0467	0,0211	0,0717
370 „	0,0431	0,0210	0,0700
			Summa 0,2053 g

In diesen Fällen wurde so keine Vermehrung der reduzierenden Substanz im Harn nachgewiesen.

**b) Subkutane Einspritzung der Ovomukoidlösung.**

**Versuch 1:**

Kaninchen von 1850 g Körpergewicht.

Normaler Harn.

Menge des Urin in 24 Stunden	Gramm CuO in 100 ccm	Reduzierende Substanz berechnet als Zucker	
		in 100 ccm	im Tages-Urin
480 ccm	0,0420	0,0190	0,0912
430 "	0,0510	0,0232	0,0999
465 "	0,0460	0,0210	0,0978
			Summa 0,2889 g

Nach Einspritzung von 1,85 g Ovomukoid.

500 ccm	0,0569	0,0258	0,1290
410 "	0,0296	0,0134	0,0549
550 "	0,0501	0,0227	0,1248
			Summa 0,3087 g

Differenz = 0,0198 g, berechnet auf das eingeführte Ovomukoid = 0,09 g = 4,8 %.

**Versuch 2.**

Kaninchen von 1550 g Körpergewicht.

Normaler Urin.

Menge des Urin in 24 Stunden	Gramm CuO in 100 ccm	Reduzierende Substanz berechnet als Zucker	
		in 100 ccm	im Tages-Urin
310 ccm	0,0512	0,0232	0,0719
340 "	0,0499	0,0226	0,0768
280 "	0,0576	0,0261	0,0731
			Summa 0,2218 g

Nach der Einspritzung von 1,55 g.

150 ccm	0,0750	0,0340	0,0510
420 "	0,0645	0,0292	0,1224
180 "	0,0693	0,0314	0,0565
			Summa 0,2299 g

Die Differenz beträgt 0,0081 g, eine so geringe Menge, die keine Bedeutung haben kann.



c) Einspritzungen in die Ohrvene.

Versuch 1:

Kaninchen von 1850 g Körpergewicht.

Normaler Harn.

Menge des Urin in 24 Stunden	Gramm CuO in 100 ccm	Reduzierende Substanz in 100 ccm	berechnet als Zucker im Tages-Urin
420 ccm	0,0435	0,0197	0,0827
485 "	0,0482	0,0218	0,1057
505 "	0,0420	0,0190	0,0959
			Summa 0,2843 g

Nach dem Einspritzen von 1,85 g Ovomukoid.

325 ccm	0,1300	0,0590	0,1918
425 "	0,0502	0,0227	0,0965
425 "	0,0388	0,0176	0,0748
			Summa 0,3631 g

Differenz: 0,0788 g, berechnet auf eingeführtes Ovomukoid  
= 0,358 g = 13,9 %.

Versuch 2:

Dasselbe Kaninchen nach einigen Wochen.

Normaler Harn.

Menge des Urin in 24 Stunden	Gramm CuO in 100 ccm	Reduzierende Substanz in 100 ccm	berechnet als Zucker im Tages-Urin
450 ccm	0,042	0,019	0,0855
520 "	0,034	0,0154	0,0800
420 "	0,052	0,0235	0,0987
			Summa 0,2642 g

Nach Einspritzung von 0,8 g Ovomukoid.

480 ccm	0,054	0,0249	0,1195
520 "	0,041	0,0185	0,0943
530 "	0,038	0,0172	0,0911
			Summa 0,3049 g

Differenz = 0,0407 g, berechnet auf eingeführtes Ovomukoid  
= 0,13 g = 16,2 %.

## Versuch 3:

Kaninchen von 2600 g Körpergewicht.

Normaler Urin.

Menge des Urin in 24 Stunden	Gramm CuO in 100 ccm	Reduzierende Substanz als Zucker in 100 ccm	berechnet im Tages-Urin
405 ccm	0,0452	0,0204	0,0826
580 „	0,0388	0,0176	0,1020
460 „	0,0396	0,0179	0,0823
			Summa 0,2669 g
Nach der Einspritzung von 2,0 g Ovomukoid.			
250 ccm	0,145	0,066	0,1625
440 „	0,0720	0,0326	0,1434
340 „	0,054	0,0244	0,0829
			Summa 0,3915 g

Differenz = 0,1246 g, berechnet auf eingeführtes Ovomukoid  
= 0,54 g = 28 %.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das Ovomukoid bei Einführung in den Magen oder in das Unterhautbindegewebe vollständig oder fast vollständig oxydiert wird, ebenso wie die Eiweißkörper. Nach Einführung in das Venensystem werden 13,9—28 % unverändert ausgeschieden. Auch in dieser Beziehung steht es in Übereinstimmung mit den Eiweißkörpern, von denen nach J. Munk und Lewandowski<sup>1)</sup> zwischen 46 % und 2 %, je nach der Natur der Eiweißkörper im Harn wieder erscheint.

### 3. Abspaltung der Kohlehydratgruppe bei der Verdauung mit Pepsinsalzsäure.

#### Vorbereitung der Pepsinsalzsäure.

2 g käufliches, in Wasser unlösliches Pepsin (Pepsin pulv. pur. „Finzelberg“) wurde in einer Schale mit etwas Wasser verrieben, filtriert und mit Wasser solange nachgewaschen, bis das Waschwasser keine Milchzuckerreaktion mehr gab; der Rückstand wurde mit 100 ccm Verdauungssalzsäure (10 ccm officinelle Salzsäure von 1,124 spez. Gewicht auf 1 Liter verdünnt = 0,281 % HCl) in einen Kolben gebracht, nach 24stündigem

<sup>1)</sup> J. Munk u. Lewandowski, Arch. f. Anat. u. Phys. v. His-Engelmann 1890, Suppl.-Bd. 63—86.

Stehen unter öfterem Schütteln bei Zimmertemperatur abfiltriert und mit Verdauungssalzsäure auf 500 ccm aufgefüllt.

Die Verdauungsversuche selbst waren folgenderweise eingerichtet:

1 g des Ovomukoids werden mit 100 ccm Pepsinsalzsäure 24—48 Stunden bei 38 °C im Brutschrank digeriert. Nach dieser Zeit wurde die ganz klar gebliebene Flüssigkeit mit Natriumkarbonatlösung neutralisiert und ihr Reduktionsvermögen in bekannter Weise mit Fehlingscher Lösung geprüft. Als Kontrollproben wurden auch Verdauungssalzsäure + Ovomukoid (ohne Pepsin), reine Pepsinsalzsäure, einfach wässrige Ovomukoidlösung (1 : 100), gekochte Pepsinsalzsäure + Ovomukoid wie die Hauptprobe verarbeitet.

Da ich für diese Untersuchungen eine neue Menge des Ovomukoids darstellen mußte, bestimmte ich auch in dieser den Kohlehydratgehalt und zwar, wie bei allen weiteren Versuchen, nach dem oben beschriebenen Verfahren, welches in Wägung des Kupferoxyds ausläuft.

1. Hydrolyse (1stündiges Kochen mit 10% HCl).  
Gefunden in 0,2 g Ovomukoid — 0,0894 und 0,0904 g CuO = ungefähr 20,2 % der Zuckersubstanz, Zahlen, die nochmals die früher gefundenen bestätigen.
2. Verdauungsversuche: 100 ccm Verdauungsflüssigkeit + 1 g Ovomukoid. Neutralisierung mit Natriumkarbonatlösung und Zusatz von Wasser bis 110 ccm. Für Analysen wurden je 22 ccm genommen = 0,2 g des Ovomukoids.

Gefunden: a) Pepsinsalzsäure + Ovomukoid

Nach 24 Stunden.

0,0466 und 0,0430 CuO }  
0,0440 und 0,0388 CuO } in 0,2 g Ovomukoid.

Nach 48 Stunden.

0,0296 und 0,0304 CuO }  
0,0270 und 0,0282 CuO } in 0,2 g Ovomukoid.

b) Verdauungssalzsäure ohne Pepsin + Ovomukoid.

Nach 24 Stunden.

0,020 und 0,0188 g CuO }  
Nach 48 Stunden. } in 0,2 g Ovomukoid.  
0,022 und 0,0232 g CuO }

## c) Gekochte Salzsäure + Ovomukoid.

Nach 24 Stunden.

0,0182 und 0,0179 g CuO

Nach 48 Stunden.

0,0171 und 0,0169 g CuO

} in 0,2 g Ovomukoid.

Kontrollproben mit reiner Pepsinsalzsäure und wässriger Ovomukoidlösung gaben keine Reduktion mit Fehlingscher Lösung.

Diese Versuche zeigen, daß schon die Verdauungssalzsäure bei längerer Einwirkung in gelinder Wärme einen Teil der Kohlehydratgruppe aus Ovomukoid abspalten kann, doch kommt diese Möglichkeit bei Pepsinsalzsäureeinwirkung viel mehr zur Geltung.

Während die Salzsäure nur 0,020—0,0188 g CuO nach 24stündigem Digerieren gegeben hat, gab in derselben Zeit Pepsinsalzsäure 0,0466—0,388 CuO aus 0,2 g Ovomukoid.

Auch E. Salkowski hat schon das Auftreten einer reduzierenden Substanz nach der Einwirkung der Pepsinsalzsäure beobachtet. Er sagt darüber in seiner zweiten Mitteilung a. a. O. 707: „Die Vermutung, daß die reduzierende Substanz durch die Verdauung abgespalten sei, lag danach auf der Hand. Es war mir aber zweifelhaft, ob diese Reaktion nicht auf Spuren von Zucker beruhte, welche dem Präparate anhängen mochten, und welche in der Tat nicht leicht vollständig auszuschließen sind.“

Nach meinen Versuchen können wir, glaube ich, mit Bestimmtheit sagen, daß die Pepsinsalzsäure die Kohlehydratgruppe aus dem Ovomukoid abspaltet.

Ich möchte noch auf einen Punkt, der aus meinen Versuchen hervorgeht, aufmerksam machen: Wie die angeführten Analysenzahlen zeigen, ist das Reduktionsvermögen der 48stündigen Verdauungsflüssigkeit bemerkenswert kleiner, als das der 24stündigen. Ich habe nämlich gefunden 0,0466—0,0388 g CuO nach 24stündiger Verdauung und nur 0,0296—0,0304 CuO nach 48stündiger Verdauung in 0,2 g Ovomukoid.

Eine Erklärung für diese Erscheinung konnte ich nicht finden. Vielleicht liegt der Grund darin, daß das abgespaltene Glukosamin bei längerer Einwirkung von Pepsinsalzsäure durch diese zerstört wird, oder daß vielleicht nach Angaben von J. Lewinski<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> J. Lewinski, Berl. klin. Wochenschr. N. 5. 1906.

das dabei gebildete Pepton störend auf die Reaktion mit Fehling-scher Lösung einwirkt.

#### 4. Pankreasverdauung.

Die Versuche wurden mit Pankreaspulver (nach Kühne) angestellt. Rinderpankreas, welches 24 Stunden gelegen hat, wurde sorgfältig von allem sichtbaren Fett befreit, zerkleinert, mit Alkohol absol. zerrieben, abgepreßt, wieder mit Alkohol absol. verarbeitet, mit Äther zweimal verrieben (um Alkohol zu entfernen), abgepreßt, getrocknet und durch Drahtgaze gesiebt. 10 g von diesem Pulver wurden dann mit 500 ccm Chloroformwasser unter Zusatz einiger Tropfen Natriumkarbonatlösung einen Tag über im Brutschrank digeriert und das Filtrat hiervon zu den Versuchen verwendet.

Die Verdauungskraft dieser Lösung, wie auch bei der Pepsinsalzsäure, wurde mit Blutfibrin geprüft. Zu den Versuchen ist 1 g Ovomukoid mit 100 ccm dieser Pankreaslösung genommen worden. Kontrollproben waren: Digerieren des Ovomukoids mit gekochter Pankreaslösung, mit schwacher Natriumkarbonatlösung und der reinen Pankreaslösung ohne Ovomukoid.

Wie in der Hauptprobe, so auch in allen Kontrollproben habe ich kein Reduktionsvermögen bekommen, durch Pankreasverdauung wird also die Kohlehydratgruppe im Ovomukoid nicht abgespalten.

#### 5. Autolyse mit Milz.

In der einen Reihe von Versuchen wurde frische, zerkleinerte Milz gebraucht, in der andern aus ihr dargestelltes Acetonpulver.

Die Wirksamkeit dieser beiden Präparate in bezug auf Eiweißspaltung habe ich nach Entstehung und Stärke der Peptonreaktion nach 24stündiger Selbstverdauung geprüft.

##### a) Versuche mit frischem Milzbrei.

Frische, klein zerkleinerte Rindermilz wurde auf drei Portionen zu je 50 g verteilt.

Eine Portion wurde mit 2 g Ovomukoid (in einer kleinen Menge Wasser gelöst) und Chloroformwasser bis auf 500 ccm aufgefüllt, eine andere zuerst mit 200 ccm Wasser gekocht und dann in derselben Weise bis auf 500 ccm mit Ovomukoid und Chloroformwasser aufgefüllt; die dritte Portion des Milzbreis

wurde nur mit Chloroformwasser ohne vorheriges Kochen und ohne Ovomukoid bis auf 500 ccm aufgefüllt.

So bekam ich:

1. Milzbrei + Ovomukoid,
2. Milzbrei ohne Ovomukoid und
3. Gekochten Milzbrei + Ovomukoid in Chloroformwasser.

Alle diese Flüssigkeiten wurden fünf Tage lang unter täglichem Schütteln im Brutschrank bei 38° C digeriert. Nachdem Essigsäure bis zur schwachsauren Reaktion hinzugesetzt war, wurden dieselben gekocht, abfiltriert, der Rückstand so lange ausgewaschen, bis das Waschwasser keine Reaktion mehr auf Chloride gab, und die Flüssigkeitsmenge auf 1 Liter mit Wasser nachgefüllt.

Für die Analysen wurden von jeder Flüssigkeit je 100 ccm (0,2 g Ovomukoid entsprechend) genommen und nach Neutralisierung mit Fehlingscher Lösung 5 Minuten gekocht. Folgende Quantitäten CuO habe ich erhalten:

- a) Autolyse der Milz + Ovomukoid.  
Gefunden CuO: 0,0194 und 0,0208 g.
- b) Autolyse der Milz ohne Ovomukoid,  
Gefunden CuO: 0,0203 und 0,0213 g.
- c) Autolyse von gekochter Milz + Ovomukoid.  
Gefunden CuO: 0,0046 und 0,0044 g.

#### b) Versuche mit Acetonpulver.

Acetonpulver wurde nach der Methode von Buchner dargestellt und zwar auf folgende Weise: zerkleinerte Milz wurde zweimal mit großen Mengen Aceton verrieben und durchgeschüttelt, dann abgepreßt, mit Äther so lange gewaschen, bis der Geruch nach Aceton verschwunden war, abgepreßt, bis zur Trockne verrieben und durch feine Drahtgaze gesiebt.

Für Versuche sind genommen:

- a) 2 g Acetonpulver + 1 g Ovomukoid in 200 g Chloroformwasser.
- b) 2 g Acetonpulver in 200 ccm Chloroformwasser ohne Ovomukoid.
- c) 2 g gekochtes Acetonpulver + 1 g Ovomukoid in 200 ccm Chloroformwasser.

Diese Proben blieben auch im Brutschrank bei 38° C. 5 Tage stehen. Nachdem mit Essigsäure gekocht und bis auf

250 ccm mit Wasser und Natriumkarbonatlösung aufgefüllt war, wurden dieselben abfiltriert und je 50 ccm (= 0,2 g Ovomukoid) mit Fehlingscher Lösung gekocht. Alle Proben gaben vollkommen negative Resultate oder bestätigten die oben gegebenen Befunde. Ich muß hier noch bemerken, daß das Acetonpulver im Gegensatz zu dem frischen Milzbrei selbst keine Reduktion gab, d. h., es war aller Zucker bei der Bearbeitung mit Aceton aus der Milz gelöst und entfernt.

Für Kontrollversuche wurden auch bei beiden Versuchsanordnungen die Fällung mit Alkohol nach dem Eindampfen der Verdauungsflüssigkeit (wie es bei der Darstellung des Ovomukoids beschrieben ist) und Hydrolyse mit 10 % HCl des Niederschlages gemacht. Es ist mir gelungen, in jedem Falle die entsprechende Menge der reduzierenden Substanz wiederzufinden, was noch einmal bestätigt, daß wirklich keine Abspaltung des Glukosamins stattgefunden hatte.

#### 6. Fäulnisversuche.

Für diese Versuche wurde ein Fäulnisgemisch (30 g zerhacktes Fleisch + 5 ccm Natriumkarbonatlösung + 300 ccm Wasser wurden 48 Stunden im Brutschrank digeriert) gebraucht, und drei Proben eingestellt:

- a) 2 g Ovomukoid in 100 ccm Wasser + 1 ccm Natriumkarbonatlösung + 1 ccm der Fäulnisflüssigkeit;
- b) 2 g Ovomukoid in 100 ccm des Fäulnisgemisches aufgelöst, und
- c) das Fäulnisgemisch ohne Ovomukoid (Kontrollversuch).

Alle diese Proben blieben im Brutschrank fünf Tage hindurch stehen; nach dieser Zeit wurde unter Zusatz von Essigsäure gekocht, abgekühlt, mit Natriumkarbonatlösung neutralisiert, auf 200 ccm mit Wasser aufgefüllt und abfiltriert.

Das Filtrat von allen drei Proben gab keine Reduktion mit Fehlingscher Lösung.

Die Ursache der negativen Resultate konnte man durch folgende Kontrollanalysen bestätigen:

Für diesen Zweck wurden je 100 ccm (= 1 g Ovomukoid) von jedem Filtrate genommen, bis auf ungefähr 20 ccm eingedampft, mit 100 ccm Alkohol absol. versetzt und der erhaltene Niederschlag nach bekannter Weise hydrolisiert. 50 ccm von

dem Filtrat a gaben 0,053 und 0,051 g CuO, die anderen Proben ergaben gar keine Reduktion.

Diese Resultate beweisen, daß in ovomukoidhaltigen Flüssigkeiten die Kohlehydratgruppe abgespalten und das freigewordene Glukosamin zersetzt worden ist.

In Probe a war ein Teil des Ovomukoids (ungefähr  $\frac{1}{5}$ ) noch unverändert geblieben (Fäulnis war unvollkommen), dagegen war in Probe b alles Ovomukoid gespalten und das Glukosamin zersetzt. Es ist außerdem festgestellt, daß diese Zersetzung von Glukosamin bei starker Fäulnis schnell geht; deswegen habe ich auch bei der Hauptprobe a keine Reduktion mehr bekommen.

Diese Befunde sind auch deswegen interessant, weil es bisher in der Literatur noch keine Angaben über die Möglichkeit der Zersetzung von Glukosamin bei der Fäulnis gab.

#### Ergebnisse.

Wenn wir jetzt die Resultate noch einmal kurz zusammenfassen, so ist es gelungen, auf oben gestellte Fragen folgenderweise zu antworten:

Da das Ovomukoid den Charakter eines Glukoproteids hat und nach Einführung in den Magen nicht wiedererscheint, also oxydiert wird, so ist es höchstwahrscheinlich, daß dasselbe zu den Eiweißnährstoffen gehört.

Beim Genusse von Hühnereiern gelangt diese Substanz vollkommen zur Geltung. Sie ist schon in frischen Eiern präformiert und ändert sich nicht beim Kochen. In meinen Versuchen wurde die Kohlehydratgruppe im Ovomukoid bei der Verdauung mit Pepsin und bei der Fäulnis abgespalten, dagegen konnte ich bei der Verdauung mit Trypsin und bei der Autolyse keine Abspaltung des Glukosamins finden.

Wie die Versuche mit Fäulnis gezeigt haben, ist es auch anzunehmen, daß sich das Glukosamin bei Fäulnisvorgängen zersetzen kann. Das Ovomukoid gibt bei Anwesenheit von Glyoxylsäure im Eisessig schwach positive Adamkiewitzsche Reaktion.

Zu großem Danke fühle ich mich Herrn Prof. E. Salkowski gegenüber verpflichtet, der mich bei der Ausarbeitung des von ihm gütigst angeregten Thema stets in liebenswürdiger Weise unterstützt hat.

---



# Zur Frage über die Entstehung des Rhodans im Organismus.

Von

**Dr. K. Willanen aus Petersburg.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts  
der Universität zu Berlin.)

*(Eingegangen am 12. Mai 1906.)*

Schon vor vielen Jahren hat man die Schwefelcyanverbindungen in verschiedenen Teilen des Tierkörpers gefunden: Tiedemann und Gmelin<sup>1)</sup> im Speichel, Leared<sup>2)</sup> im Blut, Nencki<sup>3)</sup> im Magensaft, Gscheidlen<sup>4)</sup>, J. Munk<sup>5)</sup>, G. Külz<sup>6)</sup> u. a. im Urin. Die Entstehung des Rhodans im Organismus ist aber bisher noch nicht aufgeklärt.

Nach der Anschauung von Bernard (zit. nach Gscheidlen) sind die Rhodanverbindungen in dem Speichel nicht präformiert, sondern entstehen in letzterem durch einen unbekanntem Zersetzungsprozeß. Gscheidlen<sup>4)</sup> hat durch Anlegung von Fisteln an den Ausführungsgängen der Parotis und Submaxillaris die Ausscheidung des Speichels nach außen herbeigeführt und fand, daß das Rhodan bei solchen Tieren aus dem Urin ganz verschwunden war. Deswegen meinte er, daß die Schwefelcyan-

---

<sup>1)</sup> Zit. nach Gscheidlen s. u.

<sup>2)</sup> Zit. nach Gscheidlen s. u.

<sup>3)</sup> Ber. d. d. Chem. Gesellsch. **28**, 10, 1318 (1895).

<sup>4)</sup> Pflügers Arch., **14**, 401 (1877).

<sup>5)</sup> Virchows Arch. **69**, 354 (1877).

<sup>6)</sup> Sitzungsberichte der Ges. z. Beförder. d. Ges. Naturwiss. in Marburg, 76 (1878).

verbindungen des Harns aus dem Speichel oder den Speicheldrüsen stammen.

J. Kelling<sup>1)</sup> betrachtet den verschluckten Speichel auch als Quelle des Vorkommens von Rhodan im Magen.

Nencki und Schuman-Simanowski<sup>2)</sup> halten dagegen diese Auffassung für irrtümlich, weil der von ihnen untersuchte Magensaft bei ösophagotomierten Hunden, bei denen keine Speichelbeimischung zum Magensaft stattfinden konnte, immer rhodanhaltig war.

Auch Rjasantzen<sup>3)</sup> hat bei wiederholten Untersuchungen Sulfocyansäure im vollkommen getrennten Fundusblindsack gefunden.

Nach Bruylants<sup>4)</sup> wird die Schwefelcyansäure im Organismus gebildet, denn ihre Ausscheidung ist unabhängig von der Art der Ernährung. Die Schwefelcyansäure kann nach ihm ihre Quelle nur in den Albuminstoffen haben; das sei anzunehmen, denn die Cyangruppe könne in Albuminstoffen vorkommen und erhalte sich in den von denselben abstammenden Xanthinkörpern. Verfasser nimmt deswegen die Möglichkeit an, daß die Schwefelcyansäure aus letzteren entstehen könne.

Im allgemeinen hielt er es für wahrscheinlich, daß im Organismus die Synthese von Cyan und Schwefel stattfinden könne.

Die Ausscheidung des Rhodans im Urin ist nach ihm deswegen so gering, weil der größere Teil der gebildeten Schwefelcyansäure wieder zersetzt werde.

Er hat nämlich gefunden, daß von in den Organismus eingeführten schwefelcyansauren Salzen nur ein kleiner Teil wieder im Urin erscheint. Lang<sup>5)</sup> konnte bei einem Versuche am Hunde auch nur  $\frac{1}{6}$  der eingeführten Rhodanmenge im Harn wiederfinden.

Andererseits gibt es schon viele Angaben, welche darauf hinweisen, daß Cyanwasserstoff im Organismus in Rhodanwasserstoff übergehen kann. Nach der Fütterung mit Blau-

<sup>1)</sup> Zit. nach Nencki.

<sup>2)</sup> Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakolog., **84**, 332, (1894).

<sup>3)</sup> Zit. nach Nencki.

<sup>4)</sup> Jahresbericht der Tierchemie 134 (1888).

<sup>5)</sup> Arch. f. experim. Pathol. und Pharmakol. **84**, 247 (1899).

säure und Nitrilen der Fettreihe hat man ihren Übergang in Rhodanverbindungen beobachtet. Giacosa<sup>1)</sup> hat nachgewiesen, daß bei der Fütterung mit Acetonitril und Propionitril die Ausscheidung des Rhodans im Harn sich vermehrte. Lang<sup>2)</sup> bestätigte dies bei der Einführung der Aceto-, Propio-, Butyro-, Capronitrile und der Blausäure selbst in den Organismus.

Pascheles<sup>3)</sup> hat außerdem bei seinen Versuchen mit Muskeln, Rinderleber, Eiereiweiß, Eierdotter und Cystin gefunden, daß die Eiweißstoffe, welche locker gebundenen Schwefel enthalten, unter Verhältnissen, wie sie im Organismus gegeben sind, Cyankalium leicht in Rhodankalium überführen. Diese Experimente von Pascheles können das von Lang gefundene Verhalten der Blausäure und der aus den Nitrilen abgespaltene Cyangruppe aufklären: Die Organe des Körpers bestehen zum großen Teil aus Eiweißstoffen, die locker gebundenen Schwefel enthalten. Wie die Stoffwechseluntersuchungen lehren, findet überdies ein fortwährender Eiweißzerfall unter Schwefelspaltung statt. Unter diesen Verhältnissen muß die in den Körper gelangte Cyangruppe in den Rhodanrest übergeführt werden.

So herrscht jetzt die allgemeine Ansicht, daß Cyanwasserstoff im Organismus in Rhodanwasserstoff übergehen müsse.

Andererseits gibt es auch Befunde, welche zeigen, daß Cyan säureverbindungen aus Eiweißstoffen oder aus Zersetzungsprodukten der Eiweißstoffe herkommen können.

Wie oben erwähnt, hat schon Bruylants darauf aufmerksam gemacht, daß die Cyangruppe im Organismus aus den aus Eiweißstoffen herkommenden Xanthinkörpern her rühren könne.

Auch Nencki<sup>4)</sup> meint, daß man auf Grund der Arbeiten von Lang und Pascheles annehmen kann, daß in der Magenschleimhaut während der Saftbildung aus den Eiweißstoffen durch Hydrolyse zunächst Amidosäuren der Fettreihe entstehen, die bei der Oxydation in die um einen Kohlenstoff ärmeren Nitrile übergehen; diese würden dann durch den

<sup>1)</sup> Ztschr. f. physiol. Chem. VIII, 95. Annali di Chim. e di Farmacol. (1885).

<sup>2)</sup> A. a. O.

<sup>3)</sup> Arch. f. experim. Pathol. und Pharmakol. 84, 281.

<sup>4)</sup> A. a. O.

Schwefel des Eiweißes unter Abspaltung des mit der C:N-Gruppe verbundenen Alkyls in Rhodan übergeführt.

In jüngster Zeit hat Plimmer<sup>1)</sup> gefunden, daß bei der Oxydation verschiedener Eiweißkörper mit der Neumannschen Salpetersäuremischung oder mit Chromsäure Blausäure entsteht. Er hat nämlich bei der Oxydation einzelner Spaltungsprodukte der Eiweißkörper folgende Zahlen bekommen: Glykokoll gab 11,1 % HCN, Asparagin 7,7 %, Alanin, Leucin, Tyrosin, Tryptophan u. s. w. viel weniger.

Da nun nach der allgemeinen Ansicht Cyanwasserstoff im Organismus in Rhodanwasserstoff übergeht, andererseits Aminosäuren, u. a. Glykokoll bei der Oxydation außerhalb des Körpers nicht unerheblich Cyanwasserstoff liefern, so liegt die Annahme nahe, daß auch im Organismus als Nebenreaktion eine Oxydation von Aminosäuren unter Bildung von Blausäure stattfindet, welche dann in Rhodan übergeht.

Diese Hypothese suchte ich auf Anregung von Herrn Prof. E. Salkowski experimentell zu prüfen, und zwar durch Einführung von großen Mengen Glykokoll bei Tieren.

Für die Versuche wurden Kaninchen gewählt, weil normaler Kaninchenharn frei von Rhodan ist oder nur kleine Spuren davon enthält. Das Rhodan im Urin wurde durch die Probe mit Ferrichlorid und Salzsäure nachgewiesen. Für Kontrollversuche habe ich immer auch die Methode von J. Munck angewandt.

Diese letzte besteht darin, daß man 200 ccm Urin mit Salpetersäure ansäuert, mit Silbernitrat ausfällt, den Niederschlag, der außer Chlorsilber auch Rhodansilber enthält, unter Wasser mit H<sub>2</sub>S zersetzt, abfiltriert und im Filtrat mit Eisenchlorid und Salzsäure durch die eintretende Rotfärbung des Rhodan nachweist. Munck sagt weiterhin hierüber: „Bleibt diese Reaktion aus oder ist sie nicht deutlich genug, so destilliert man die Flüssigkeit mit Schwefelsäure, und man wird dann im Destillat die Anwesenheit von Blausäure stets dartun können“ (J. Munck, a. a. O.).

Bei meinen Untersuchungen nahm ich 100 ccm Urin, zersetzte den Silberniederschlag in 50 ccm Wasser und nach

<sup>1)</sup> Journ. of Physiol. **82**, 51—58 30. 12 1904, zitiert nach Chem Zentralbl. 1905.

Durchleitung von  $H_2S$  benutzte ich immer die gleiche Menge des Filtrats (10 ccm) für die Prüfung. Zu dieser Probe wurden 3—5 Tropfen Eisenchlorid und 1 ccm  $HCl$  hinzugesetzt. So konnte ich sehr gut bei allen Untersuchungen die Stärke der Reaktion vergleichen. Auch frischer Harn wurde in gleicher Weise im normalen Zustande und nach Einführung des Präparats untersucht.

Der normale Kaninchenharn gab bei solcher Verarbeitung keine oder nur sehr schwache rötliche Färbung. Auch nach der Destillation konnte ich keine Spuren von Blausäure finden. Was diesen Punkt betrifft, so bin ich zu einem von den Angaben Muncks abweichenden Resultat gekommen. Auch wenn ich im Filtrat schon deutlich rote Färbung mit Eisenchlorid und Salzsäure bekommen hatte, fiel die Berliner Blauprobe im Destillat jedesmal ganz negativ aus. Dasselbe konnte ich auch mit reinem schwefelcyansaurem Salze in wässrigen Lösungen verschiedener Stärke bestätigen.

Nach den beschriebenen Methoden ist es mir gelungen, das Vorkommen von Rhodan im Urin darzutun, nachdem das Glykokoll in den Magen der Kaninchen eingeführt war. Bei allen Tieren, deren Harn im normalen Zustande keine Rhodanreaktion gab, habe ich nach Einführung von nicht zu kleinen Mengen des Glykokolls (5—10 g, je nach der Größe des Tieres) starke Rotfärbung im Urin nach Bearbeitung mit Eisenchlorid +  $HCl$ , direkt oder nach J. Munck, erhalten.

Dasselbe Resultat gab auch Kreatinin, das Anhydrid des Kreatins, schon bei Einführung von viel kleineren Mengen (1 g auf jedes Kaninchen). Kreatin ist bekanntlich synthetisch aus Cyanamid und Sarkosin (Methylglykokoll) dargestellt und spaltet sich beim Kochen, u. a. in Harnstoff und Sarkosin, daher kann es auch Blausäure bei der Spaltung geben.

Unsere positiven Befunde mit Kreatinin bestätigten die angenommene Voraussetzung.

Die Versuche mit Adenin<sup>1)</sup> gaben positive Resultate. Die Reaktionen waren sehr schwach, was wahrscheinlich darauf

---

<sup>1)</sup> Wir verdanken dasselbe der Firma Böhringer und Söhne in Waldhof bei Mannheim.

zurückzuführen ist, daß uns zu kleine Mengen von Adenin<sup>1)</sup> zur Verfügung standen. Alle oben angegebenen Versuche zeigen mit Bestimmtheit, daß Aminosäuren (Glykokoll), wie auch einige andere Substanzen, die Blausäure bei ihrer Oxydation oder Spaltung geben (Kreatin, Kreatinin, Adenin), als Quelle des Rhodans im Organismus anzusehen sind. Diese Angaben bestätigen die Ansichten von Autoren, die den Eiweißkörpern und ihren Zersetzungsprodukten die Hauptrolle bei der Entstehung des Rhodans im Organismus zuschreiben.

---

<sup>1)</sup> Die Versuche mit Adenin haben mir auch gezeigt, daß es von Kaninchen sehr gut vertragen wird. Nach Einführung von 1 g Adenin konnte ich keine pathologische Veränderung des Harns nachweisen; dieser Befund steht in Übereinstimmung mit solchen von Schittenhelm (Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmak. 47, 432—437), der auf den auffälligen Unterschied in dem Verhalten von Hunden und Kaninchen zu Adenin hingewiesen hat.

---

**Biochemische Untersuchungen  
über Vergiftung und Entgiftung bei der Lysolvergiftung.**

Von

**Prof. Dr. Ferdinand Blumenthal.**

(Aus der I. medizinischen Klinik zu Berlin.)

*(Eingegangen am 12. Mai 1906.)*

Während wir wissen, daß die Wirkung der bakteriellen Toxine u. a. darin besteht, daß sie im Tierkörper Antitoxinbildung anregen, ist etwas derartiges von zahlreichen aus der Chemie bekannten Giften nicht nachgewiesen, und es besteht bis jetzt nach dieser Richtung ein scharfer Gegensatz zwischen den bakteriellen Toxinen und diesen Substanzen. Die Toxine werden mit ihrer haptophoren Gruppe an die entsprechende Gruppe der Zelle gebunden, und wenn zugleich die toxophore Gruppe in der Zelle zur Wirksamkeit kommt, so tritt eine Vergiftung ein. Dann stößt die Zelle das Toxinmolekül mit- samt der haptophoren Gruppe der Zelle ab, und es wird der Defekt durch eine hypertrophische Bildung von haptophorer Substanz in der Zelle wieder gut gemacht. Die hypertrophisch gebildete Substanz wird in die Zirkulation resorbiert und ist dort zum schützenden Antitoxin geworden, da sie nunmehr in der Zirkulation etwaiges an sie herantretendes Gift neutralisieren kann. Ganz anders verläuft die Vergiftung der gewöhnlichen Gifte, wenigstens nach bisheriger Anschauung. Diese verursachen entweder lokale Veränderungen, Anätzungen, dort, wo sie hingeraten, wie die Ätzgifte, andere scheinen durch den Reiz, den sie auf die Nervenzellen ausüben, Krämpfe hervorzurufen oder Gefäßverengung, Gefäßerweiterung usw.

Ob dabei überhaupt eine gewisse Entgiftung statthat, ist für viele zweifelhaft. Nur bei einer bestimmten Gruppe von Giften, die an Schwefelsäure oder Glukuronsäure gebunden werden, können wir einen solchen Entgiftungsprozeß nachweisen. Die Wirkung der Gifte stellten wir uns bisher vor als beruhend auf anatomischer Läsion des Substrats. Von vermehrter Antitoxinbildung oder Gegengiftbildung wissen wir bisher nichts. Tritt ja doch auch keine Immunität auf, die auf zirkulierendem Antitoxin beruht; dagegen findet bei einzelnen eine Gewöhnung statt, d. h. der Organismus zeigt eine geringere Empfindlichkeit.

Gelegentlich einer Anzahl von Fällen von Lysolvergiftung habe ich den Modus der Vergiftung der methylierten Karbonsäure, der Kresole, die ja 50 % des Lysols ausmachen, untersucht. Dabei ergab sich zuerst, daß das Lysol nicht immer die gleiche Menge von Kresolen enthält. Die von der Fabrik angegebenen 50 % mögen ja in den meisten Flaschen vorhanden sein, ich habe aber auch weit niedrigere Werte gefunden: 33 und 25 %. Meine Untersuchungen habe ich angestellt mit einem Lysolpräparat, welches 48 % Lysol enthielt. Der Einfachheit halber werde ich es als 50 %-iges Kresol in Anrechnung bringen.

#### I. Verbrennungsfähigkeit des Organismus für Kresole.

Wir müssen also, wenn wir die tatsächliche Menge der im Lysol aufgenommenen Kresole berechnen wollen, diese Zahlen zugrunde legen. Es entstand nun für mich die Frage: wieviel Lysol wird denn nun eigentlich resorbiert oder aufgenommen, ohne daß die Kranken zu sterben brauchen. Die größte Dosis, nach der Genesung erfolgte, war beim Erwachsenen 60 g (Haberda) und 25 g beim Kind; die kleinste tödliche Dosis bei Kindern 4—5 g. Dahmen rechnet pro Kilo Mensch 0,83 g d. h. für 60 kg ca. 50 g. Ich habe einige mit Lysol Vergiftete durchkommen sehen und habe bei vieren täglich den Urin genau auf die ausgeschiedene Menge Kresol untersucht. Ehe ich darüber einen klaren Blick bekam, mußte ich wissen, wie groß die Verbrennungsfähigkeit des menschlichen Organismus für Kresol war. Ich gab einer Patientin ein Gramm Lysol in Gelatine-kapseln, nachdem ich am Tage vorher die Menge des Kresols im Harn bestimmt hatte; sie betrug 0,062 g Kresol, nach 1 g Lysol



also nach  $\frac{1}{3}$  g Kresol, da 50 % des Lysols Kresol sind, stieg die Menge auf 0,174, um am nächsten Tage wieder auf die gewöhnliche Menge Kresol 0,0828 g zu sinken; d. h. die Patientin hatte 0,112 g Kresol oder ca. 20 % des eingeführten Kresols ausgeschieden, 80 % wurden verbrannt. Die Patientin erhielt nunmehr 2 g Lysol. Sie hatte am folgenden Tage 0,336 g und am Tage darauf wieder die normale Menge 0,0814 g, also 0,25 g des gesamten Kresols, ca. 25 % ausgeschieden.

## Versuche am Menschen.

Datum	Urin- menge	Stick- stoff	Kresol	Gesamt- Schwefelsäure	Äther- Schwefelsäure	Indikan	Fäces- Kresol	Bemerkungen
a) Schmalke.								
22. 2.	400	3,99	0,0336	0,753	0,0706	0,0121	0,0139	—
23. 2.	400	2,91	0,0484	0,467	0,063	0,00208	0,0112	am 24. 2. 2 g Lysol
25. u. 26. 2.	1300	5,17	0,370	0,863	0,328	Spur	0,0410	am 25. 2. 2 g Lysol
27. 2.	900	6,12	0,0707	1,035	0,140	0,0093	0,0087	am 28. 2. 2 g Lysol
1. 3.	600	5,29	0,167	0,927	0,290	0,00312	—	—
2. 3.	800	7,57	0,0547	1,360	0,158	0,0041	—	—
b) Schulz.								
9. 2.	1300	9,41	0,062	1,780	0,180	0,0067	1 g Lysol	—
10. 2.	2000	12,10	0,174	2,284	0,336	gering	—	0,1 Pol.
11. 2.	2300	—	0,0828	—	—	—	2 g Lysol	—
12. 2.	2200	17,06	0,336	3,32	0,647	gering	—	0,15 Pol.
13. 2.	1900	14,84	0,0814	2,33	0,279	0,0099	—	—
14. 2.	2200	12,32	0,298	2,254	0,452	0	—	—

Eine zweite Patientin Schmalke schied an den Tagen vor der Lysoldarreichung 0,03 und 0,04 g Kresol aus. Sie erhielt 4 g Lysol und schied nunmehr am folgenden Tage 0,370 und am Tage darauf 0,0707 g Kresol aus, d. h. die Kresolmenge war um 0,4 gestiegen; da sie 2 g Kresol in 4 g Lysol bekommen hatte, so ist die Ausscheidung ca. 20 % der aufgenommenen.

Die Verbrennungsfähigkeit für Kresol ist danach außerordentlich hoch. Wir sehen, daß kaum 20—25 % des aufgenommenen Kresols im Harn erscheinen. Nun kann man den Einwand machen, daß ein Teil des Kresols mit den Fäces ausgeschieden wird und gar nicht zur Resorption gelangt. Um diesen Einwand zu entkräften, habe ich die Fäces untersucht, aber keine wesentliche Erhöhung der Kresole in den Fäces nachweisen können. Daraus geht hervor, daß unsere An-

schauungen über die Verbrennungsfähigkeit der Phenole im Organismus eine Korrektur erfahren müssen. Man kann nicht von der Verbrennungsfähigkeit der Karbolsäure ohne weiteres schließen auf die Verbrennungsfähigkeit der Karborderivate und es scheint, als ob z. B. für die Kresole eine größere Verbrennungsfähigkeit existiert. Diese Tatsache ist von nicht unwesentlicher Bedeutung für unsere Kenntnisse von der Phenolausscheidung bei Krankheiten. Wir werden also in Zukunft rechnen müssen erstens mit einer verschiedenen Fähigkeit des Organismus, die einzelnen Phenole zu verbrennen, und da wir immer nur die Gesamtmenge der destillablen Phenole, nicht ein einzelnes bestimmen, so wird die Verbrennungsfähigkeit, d. h. die Größe der Ausscheidung davon abhängen, welches der Phenole gebildet wurde. Zweitens werden wir namentlich in pathologischen Zuständen die anzunehmenden individuellen Schwankungen in der Verbrennungsfähigkeit für die einzelnen arom. Körper berücksichtigen müssen, und es ist nicht unwahrscheinlich, daß häufig eine vermehrte Phenolausscheidung ihre Ursache weniger hat in einer vermehrten Bildung als vielmehr in einer gestörten Verbrennungsfähigkeit des Organismus dafür. Ausgeschlossen ist es nicht, daß das auch für eine andere ähnliche Substanz, für das Indol zutrifft, und daß wir in der häufig beobachteten, gar nicht durch vermehrte Fäulnisprozesse zu erklärenden vermehrten Indikanausscheidung einen Mangel des Organismus für die Verbrennungsfähigkeit von Indol erblicken müssen, eine Auffassung, die, wie ich gesehen habe, in dem neuesten Handbuch von Noorden auch von Strauß vertreten wird. Legen wir diese durch meine Zahlenbefunde sehr wahrscheinlich gemachte Möglichkeit der verschiedenen Verbrennungsfähigkeit für die einzelnen Phenole unserer Betrachtungsweise für das Verhalten der aromatischen Substanzen im Tierkörper zugrunde, so wird sich vielleicht endlich Licht in diese verworrene Lehre bringen lassen.

Da nun meine experimentellen Kenntnisse über die Lysolvergiftung im wesentlichen am Hunde gewonnen sind, so suchte ich die am Menschen gewonnenen Ergebnisse am Hund zu kontrollieren. Ein Hund schied vor der Lysoldarreichung pro Tag 0,01 g Kresol aus, nach 2 g Lysol per os 0,35 g Kresol, d. h. ca. 34 %; nach 4 g Lysol 0,72 g, d. h. 35 % Kresol.

In einem andern Falle anstatt 0,0126 g vor der Darreichung 0,97 g nach der Darreichung von 4 g Lysol, d. h. also ca. 48 %. Bei der subkutanen Darreichung schied er aus anstatt 0,03 g 0,15 g, d. h. 25 %, in einem andern Falle vorher 0,02 g, nach 1 g Lysol subkutan 0,20 g, d. h. 36 %. Es ergibt sich also daraus, daß bei der subkutanen Darreichung mehr Kresol verbrannt wird, als bei der Darreichung per os. Ein dritter Hund

Datum	Urin- menge	Stick- stoff	Kresol	Äther- Schwefel- säure	Indikan	Bemerkungen
<b>Hund I.</b>						
13. 1.	500	14,56	0,014	0,0650	0,0045	—
14. 1. } 15. 1. }	800	25,65	0,030	0,1243	0,0104	am 15. 1 g Lysol subkutan
16. 1.	400	9,52	0,152	0,324	0,0050	—
17. 1.	400	13,15	0,0209	0,0941	0,058	am 18. 1 g Lysol subkutan
19. 1.	300	10,54	0,207	0,401	0,093	— 0,3 Pol.
20. 1.	300	12,18	0,113	0,073	0,093	—
<b>Hund II (Gewicht 6,5 kg).</b>						
23. 1.	400	12,46	0,0115	0,0368	0,0065	am 24. 2 g Lysol per os
25. 1.	400	17,63	0,358	0,480	0,018	— 0,6 Pol.
26. 1.	500	13,62	0,112	0,071	0,0068	am 28. 4 g Lysol
29. 1.	500	16,45	0,637	0,857	—	— 1,2 Pol.
30. 1.	400	12,99	0,096	0,161	0,0175	— 0,2 Pol.
31. 1.	700	13,44	0,0126	0,0706	0,0121	am 2. 2. 4 g Lysol
3. 2.	700	16,66	0,97	1,03	0,0247	— 0,8 Pol.
4. u. 5. 2.	600	20,23	0,0356	0,184	—	— 0,2 Pol.
<b>Hund III.</b>						
			Gesamt- Schwefel- säure			
23. 2.	800	15,79	2,27	0,074	—	am 23. 2. 4 g Lysol
24. 2.	600	8,11	3,30	0,607	—	— 0,9 % Pol.
25. u. 26. 2.	600	17,36	3,56	0,179	—	—

schied aus vor der Darreichung 0,07 g Kresol, er erhält 4 g Lysol und scheidet nunmehr aus 0,60 g, also mehr 0,53 g oder 20 % des zugeführten Kresols. Wir sehen also, daß die Hunde eine verschiedene Verbrennungsfähigkeit für Kresol haben. Der eine Hund verbrennt ungefähr wie der Mensch 80 % des zugeführten Kresols, der andere Hund nur ca. 50 %.

## II. Menge des aufgenommenen Kresols bei der menschlichen Lysolvergiftung.

Da für uns für die Betrachtung der Lysolvergiftungen die bei Menschen gewonnenen Zahlen natürlich wichtiger sind, so wollen wir diese bei der Frage der aufgenommenen Mengen Kresol bei Lysolvergiftungen zugrunde legen. Ich habe vier Fälle von Lysolvergiftung genauer untersucht. In dem Falle Hinz, der sofort nach der Vergiftung eingeliefert wurde, betrug die am Tage der Vergiftung entleerte Kresolmenge 0,396 g, die am folgenden Tage 0,492 g. Es waren also resorbiert worden 0,888 g Kresol. Nehmen wir also an, daß zirka 25% des gesamten Kresols ausgeschieden wurden, so würde die vierfache Menge genommen worden sein, also 3,5 g Kresol oder 7,0 g Lysol würden zur Resorption gelangt sein. Die übrige Menge ist entweder durch Magenauspülung, vielleicht auch ein kleiner Teil durch den Darm zur Ausscheidung gekommen. Am dritten Tage war die Gesamt-Kresolmenge bereits 0,058 g, d. h. normal. Die ganze Vergiftung spielte sich also in 48 Stunden ab; erhebliche Nierenstörungen waren nicht zu beobachten, Störungen von seiten des Magens und des Darms ebenfalls nicht. Die Patientin machte bei der Aufnahme einen schweren Eindruck, war bewußtlos, cyanotisch mit schwachem Puls. Wir machten nun die übliche Magenauspülung und gaben Herzmittel (Digalen) intramuskulär. Bereits am selben Abend war die Patientin wieder ziemlich munter. Wenn man diese geringen Mengen Lysol, die hier zur Resorption gelangt sind, betrachtet, so wird man sich nicht wundern, daß die Patientin durchgekommen ist, zumal man beim Hund 4 g Lysol per os ohne die geringste Störung gegeben hat. Natürlich hat die Patientin eine weit größere Menge zu sich genommen als resorbiert wurde, aber auch lokal scheinen diese Ätzwirkungen, die man manchmal bei der Lysolvergiftung sieht, nicht sehr groß gewesen zu sein, denn sonst hätte sie nicht dauernd sich eines guten Allgemeinbefindens erfreuen können.

Im Falle Kunert hielten wir die Kranke bei der Aufnahme für vollständig hoffnungslos. Patientin war pulslos, cyanotisch, kalt; wir hüllten sie erst bei der Aufnahme in

## Lysolvergiftungen beim Menschen.

Datum	Urin- menge	Ge- samt- Stick- stoff	Chloride	Kresole	Äther- Schwe- fel- säure	Gesamt- Schwe- felsäure	Indikan	Drehung
-------	----------------	---------------------------------	----------	---------	-----------------------------------	-------------------------------	---------	---------

## a) Hinz.

12. 12. 05	800	5,46	2,88	0,396	1,429	—	Spur	— 6,5
13. 12. 05	950	19,5	4,37	0,492	1,003	—	"	— 0,5
14. 12. 05	550	11,5	1,66	0,058	0,0878	—	"	—
15. 12. 05	1050	15,88	3,88	0,084	0,198	—	etwas mehr	—
16. 12. 05	1500	12,94	6,75	0,087	0,0882	—	Spur	—

## b) Kunert.

29. 12. 05	1200	11,39	—	2,270	1,350	—	—	— 6,6
30. 12. 05	780	16,66	—	0,088	1,300	—	—	— 1,2
2. 1. 06	730	13,07	—	0,132	0,190	—	—	— 0,2
3. 1. 06	450	8,38	—	0,055	0,079	—	—	—

Datum	Urin- menge	Ge- samt- Stick- stoff	Chloride	Kresole	Äther- Schwe- fel- säure	Gesamt- Schwe- felsäure	Dre- hung	Ge- samt- Schwe- fel	Neu- traler Schwe- fel
-------	----------------	---------------------------------	----------	---------	-----------------------------------	-------------------------------	--------------	-------------------------------	---------------------------------

## c) Kriesel.

7. 1.	1550	12,5	—	2,89	2,28	2,81	— 6,0	—	—
8. 1.	1250	25,0	—	0,778	1,097	—	— 1,9	—	—

## d) Keller.

19. 4. 06	700	5,27	3,92	2,81	0,976	1,32	— 6,4	1,446	0,126
	(12 Std.)								
20. 4. 06	700	8,30	6,16	0,636	0,711	1,213	— 1,6	1,658	0,445
22. u. 23. 4.	1300	31,81	5,72	0,272	0,382	5,42	— 0,4	5,897	0,447
	(650)	(15,9)	(2,85)	(0,136)	(0,191)	(2,71)		(2,948)	
24. 4.	1000	20,10	3,10	0,087	0,184	3,46	—	—	0,2235

warme Decken und machten ihr eine Reihe von Kampfer-, Äther- und Digaleneinspritzungen, und erst als wir etwa nach einer Viertel- bis einer halben Stunde den Puls wieder fühlen konnten, wagten wir es, den Magenschlauch einzuführen. Wir entfernten durch denselben eine große Menge Lysol. Diese Patientin schied aus in den ersten 24 Stunden 2,27 g Phenol, am nächsten Tage 0,88 g, am dritten Tage 0,13 g, am vierten Tage 0,05 g. Wir sehen also auch hier im wesentlichen die Lysolvergiftung abgeklungen nach 48 Stunden, vollständig nach 72. Die ausgeschiedene Kresolmenge betrug 3,2 g. Legen wir hier wieder 20—25% der nicht ausgeschiedenen

Menge zugrunde, so kommen wir hier zu dem erheblichen Werte von 12—15 g Kresol oder von 24—30 g Lysol, die zur Resorption gelangt sind. Auch hier wird natürlich die aufgenommene Menge eine weit größere gewesen sein, da ein großer Teil durch die Magenausspülung entfernt wurde. Auch bei dieser Patientin war es nach 24 Stunden sicher, daß sie durchkommen würde.

Ein dritter Fall Kriesel zeigte nach gleicher Berechnung; es wurden 3,6 g Kresole ausgeschieden = 28,8 g Lysol; im vierten Fall Keller waren die Zahlen 3,44 g Kresole = 28 g Lysol.

### III. Verhalten der Phenole im Tierkörper.

Über den Mechanismus der Phenol-Vergiftungen ist folgendes bekannt. Die in den Organismus eingeführten Phenole werden, wie Baumann u. a. gezeigt haben, ausgeschieden zum Teil als Schwefelsäure, zum Teil als Glukuronsäure. Die Schwefelsäure wird geliefert von den Eiweißkörpern, die Glukuronsäure wahrscheinlich von Kohlenhydraten und Eiweißkörpern. Beide Verbindungen sind relativ ungiftig. Es handelt sich also bei der Paarung der Phenole an die Schwefelsäure und Glukuronsäure um einen echten Entgiftungsprozeß. Da der entgiftende Körper auch aus dem Eiweiß stammt, so ist es nicht wunderbar, daß ein ziemlich starker Eiweißzerfall statthat. Im Falle Hinz sehen wir am zweiten Tage nach der Einlieferung, obwohl die Nahrungsaufnahme infolge der Verätzung des Mundes nur eine höchst kümmerliche war, 19,5 g Stickstoff im Harn, während die Charité-Kranken bei guter Ernährung ca. 10 g pro Tag auszuschcheiden pflegen. Einen Anhaltspunkt für die geringe Nahrungsaufnahme erhält man auch in der Ausscheidung der Chloride. Dieselbe betrug an diesem Tage 4,37 g, während normalerweise die Ausscheidung der Chloride gleich der Stickstoffmenge ist. Am folgenden Tage wurden 11,5 g Stickstoff ausgeschieden gegen 1,66 g Chloride, dann 15,8 g Stickstoff gegen 3,8 g Chloride; erst am 16. steigt die Chlormenge auf 6,7 g gegenüber einer Stickstoffmenge von 12,9 g; es ist also eine vollkommene Ausgleichung auch an diesem Tage noch nicht erzielt.

Im Falle Kunert, wo die Lysolvergiftung noch weit schwerer war, sind die Verhältnisse nach dieser Richtung hin

sehr interessant. Wir finden im Harn eine Chlorausscheidung, die der Stickstoffausscheidung entsprach, resp. sie noch überstieg. Das ist uns ein Zeichen, daß die Patientin, ehe sie den Vergiftungsversuch unternommen hat, sehr reichlich Nahrung aufgenommen haben muß, und diesem Umstand verdankt sie vielleicht auch ihre Rettung. Am folgenden Tage ist die Stickstoffausscheidung 16,66 g, die der Chloride 2,09 g; sie hat also nach der Vergiftung gehungert. Am Tage darauf ist die Stickstoffausscheidung 13,07 g, die Ausscheidung der Chloride 3,7 g. Am dritten Tage ist die Ausscheidung an Stickstoff nur 8,3 g, die Ausscheidung der Chloride 7,6 g, also hier ist der Stoffwechsel schon am dritten Tage wieder ein normaler.

Wenn wir uns nun die Frage vorlegen, ein wie großer Teil der Phenole als Schwefelsäureverbindungen und ein wie großer als Glukuronsäure ausgeschieden wird, eine Frage, die nicht unwichtig ist, weil eine Anzahl von Autoren immer noch gewohnt ist, aus der Menge der Ätherschwefelsäure, das heißt der gepaarten Schwefelsäuren einen Rückschluß zu machen auf die Menge der im Harn ausgeschiedenen aromatischen Körper, so finden wir folgendes: Im Falle Hinz beträgt am ersten Tage die Phenolmenge 0,396, die Menge der Ätherschwefelsäuren 1,429 g. Am zweiten Tage ist die Phenolmenge höher, 0,492, die Menge der Ätherschwefelsäure 1,003, also niedriger. Eine schätzungsweise Bestimmung für die Glukuronsäure finden wir in der Linksdrehung des Harns. Bekanntlich drehen die gepaarten Glukuronsäuren links. Wir finden am Tage nach der Aufnahme eine Linksdrehung des Harns berechnet auf Traubenzucker 6,2% bei einer Urinmenge von 800. Am folgenden Tage 0,5% Linksdrehung. Später ist überhaupt eine Linksdrehung nicht mehr zu konstatieren. Wir sehen also fast die gesamten gepaarten Glukuronsäuren schon in den ersten 24 Stunden im Harn erscheinen, und es zeigt sich ferner in diesem Falle, daß gar keine Kongruenz ist in bezug auf die Menge des ausgeschiedenen Kresols und die Summe der im Harn erscheinenden gepaarten Schwefelsäuren und Glukuronsäuren. Am zweiten Tage ist die Glukuronsäuremenge höher als am ersten. Im Falle Kunert wurden am ersten Tage 2,27 g Phenole ausgeschieden und nur 1,35 g Ätherschwefelsäure. Die Linksdrehung des Harns beträgt 6,6%, am nächsten Tage

noch 1,2 %, am dritten Tage 0,2 %. Wir sehen also im zweiten Falle ungefähr die gleiche Menge Ätherschwefelsäure im Harn erscheinen, obwohl über dreimal so viel Phenol ausgeschieden war, woraus hervorgeht, daß die Ausscheidung der Ätherschwefelsäuremenge in keiner Weise proportional ist der ausgeführten Phenolmenge.

Baumann hat behauptet, daß zuerst die Schwefelsäure zur Entgiftung herangezogen werde, und erst, wenn dieselbe verbraucht sei, die Glukuronsäure. Es ist nun in neuerer Zeit von Wang und anderen gezeigt worden, daß bei der Darreichung des Indols gleichzeitig die Bildung der Glukuronsäure mit der Schwefelsäure stattfindet, daß immer ein Teil des Indols als Glukuronsäure ausgeführt wird. Wenn wir nun unsere Zahlen hier ansehen, so sehen wir bei dem Falle Keller, daß am Tage der Lysolvergiftung fast die gesamte Schwefelsäure als Ätherschwefelsäure ausgeschieden ist. Im Falle Kriesel ist das gleiche der Fall. Wir sehen aber, daß in beiden Fällen mehr Kresol im Harn erschienen ist, als der gesamten Menge der im Harn erschienenen Ätherschwefelsäure entspricht, namentlich im Falle Keller. Wir könnten uns also, wenn wir den Fall Keller zugrundelegen, sehr wohl mit der Baumannschen Theorie abfinden. Doch ist auch in diesem Falle, ebenso wie in anderen Fällen, die gebildete Menge Glukuronsäure zu groß, als daß sie nur als Ergänzung dienen könnte zur Entgiftung des durch die Schwefelsäure noch nicht gebundenen Kresols. Außerdem ist es unwahrscheinlich, daß der Organismus nicht genügend Schwefelsäure zur Verfügung gehabt haben sollte, denn wir sehen die Menge der Schwefelsäure direkt bei der Einführung von Phenol herabgehen. Wolff<sup>1)</sup> und ich haben vor zwei Jahren beim Kaninchen festgestellt, daß bei Zuführung von Phenol in den Organismus sofort die gesamte Schwefelsäuremenge stark herabging und zwar von 0,203 auf 0,079, während die Ätherschwefelsäure 0,054 g betrug. Dasselbe sehen wir in auffallendster Weise im Falle Keller, und ferner, wie die Schwefelsäure wieder in die Höhe geht, als die Kresolvergiftung abgelaufen war, am 22., 23. und 24. April. Daraus geht hervor, daß dem Organismus in keiner Weise

---

<sup>1)</sup> Blumenthal u. Wolff, Ztschr. f. klin. Medizin 1904.



Schwefel zur Entgiftung mangelt, denn er würde ja sonst nur den Schwefel anstelle von anorganischem Schwefel, d. h. von anorganischer Schwefelsäure als organische Schwefelsäure, d. h. Ätherschwefelsäure ausscheiden. Es würde also eine Verschiebung zwischen diesen beiden Faktoren eintreten, eine Verschiebung, wie sie auch Wohlgemuth<sup>1)</sup> neuerdings in einem Falle gesehen hat. Wir sehen aber, daß die gesamte Schwefelsäure heruntergeht, daß überhaupt weniger Schwefel in Form von Säure ausgeschieden wird. Das ist uns ein Zeichen dafür, daß der Organismus an Fähigkeit, den Schwefel zu oxydieren, überhaupt verloren hat, das heißt also mit anderen Worten, es besteht bei der Lysolvergiftung auch eine Oxydationsstörung.

#### IV. Versuche zur Klarstellung des Chemismus der Kresolvergiftung.

Wenn ich nun zu den künstlichen Versuchen mit Lysol übergehe, welche mir den Mechanismus der Lysolvergiftung noch genauer dartun sollten, so sehen wir an der Patientin Schmalke, daß bei kleinen Gaben von Lysol ebenfalls ein Teil der Glukuronsäure den Harn verläßt, denn wir finden am 25./26. Februar mehr Kresol im Harn, als der Gesamtmenge an Ätherschwefelsäuren entspricht. In gleicher Weise sehen wir bei der Patientin Schulz weniger deutlich nach 1 g Lysol als nach 2 g die Stickstoffausscheidung steigen. Bei der Patientin Schmalke ist das nicht zu beobachten. Beim Hund steigt die Ätherschwefelsäuremenge proportional der eingeführten Kresolmenge wenigstens bei einem Gramm Lysol. Bei 4 g Lysol finden wir, daß das nicht mehr der Fall ist. Es zeigt sich, daß im wesentlichen bei kleineren Mengen Lysol die Bildung und Ausfuhr der Ätherschwefelsäuren vermehrt ist. Dann aber bleibt dieselbe zurück und tritt dann mehr die Glukuronsäurebildung zutage. Bei Einfuhr des Lysols in solchen Mengen, die den Organismus nicht erheblich schädigen, wie das beim Hund geschieht, sehen wir proportional der eingeführten Lysolmenge die Kresol-, Ätherschwefelsäure- und Glukuronsäuremenge ansteigen. Nach 2 g Lysol zeigt der Harn 0,6 % Linksdrehung, nach 4 g 1,2 % und an einem andern Tage, wo die

<sup>1)</sup> Wohlgemuth, Berliner klin. Wochenschr. 1905, April.

Urinmenge etwas höher ist, 700 gegen 500 ccm 0,8%. Vielleicht wachsen die Werte etwas; es bedarf aber nach dieser Richtung noch spezieller Untersuchungen. Dort aber, wo die Einführung von Lysol eine wirkliche schwerere Vergiftung hervorruft, da läßt sich die Bildung und Ausscheidung der einzelnen Verbindungen des Kresols nicht mehr so regulieren.

V. Ist die Entgiftung der Kresole durch Glukuronsäure in Analogie zu setzen mit der Entgiftung der Toxine durch Antitoxine?

Wir haben also gesehen, daß das Gegengift gegen das Kresol besteht in der Bildung von Schwefelsäure und Glukuronsäure, die sich an das Kresol anlagern und zu einer ungiftigen Verbindung führen. Es ist dies insofern nicht uninteressant, als Ehrlich und seine Schule solche Anlagerungen bei den bakteriellen Toxinen und Antitoxinen annehmen, denn sie konnten in vielen Fällen die Verbindung des Antitoxins und Toxins derart wieder zerlegen, daß die eine oder andere Substanz dabei wieder wirksam wurde. Es beruht also die Unschädlichmachung der Toxine im Organismus nicht etwa in einer vollständigen Vernichtung des Giftes, sondern in einer Überführung in eine ungiftige Modifikation durch Anlagerung der Antitoxine, die von den Zellen geliefert werden. — Vorbedingung für die Wirkung der Toxine ist ihre Bindung an die Zellen.

a. Ablagerung der Kresole in den Zellen.

Hund 1, 7 kg schwer, erhält 10 g Lysol am Nachmittag 5 Uhr; eine halbe Stunde später beginnen die Krämpfe, nach etwa einer Stunde liegt er in krampfartigen Zuckungen da. Er stirbt gegen morgen des folgenden Tages. Der Darminhalt enthält 0,0662 g Kresol, der Mageninhalt 0,160 g, zusammen also ca. 0,2 g sind nicht resorbiert worden. Die Verarbeitung der Lunge ergibt 0,0418 g, der Leber 0,192 g, des Gehirns 0,0292 g, der Niere 0,0406 g.

Hund 2, 10 kg, erhält 20 g Lysol um 7 Uhr abends. Nach wenigen Minuten starke Krämpfe, am nächsten Morgen ebenfalls Krämpfe, die schon schwächer geworden sind. Er droht jeden Augenblick zu verenden; durch Verbluten aus der Karotis wird der Hund getötet. Der Darminhalt des Hundes

enthielt 600 g mit Spülwasser; nach direkter Destillation enthält er 0,1508 g Kresol, nach Destillation mit Schwefelsäure 0,0216 g, zusammen 0,1724 g. Mageninhalt ist nicht untersucht. 100 g Lunge enthalten 0,027 g, 100 g Leber 0,032 g, 100 g Gehirn 0,027 g, 100 ccm Blut 0,0228 g Kresole. Wir sehen also, daß das Blut am wenigsten enthielt.

**Hund 1.**

Darminhalt . .	0,0662 g	Leber . . . .	0,192 g
Mageninhalt . .	0,160 g	Gehirn . . . .	0,0292 g
Lunge . . . .	0,0418 g	Blut . . . .	—

Organ	Gewicht	Kresol		Summe	100 g Organ enthalten
		ohne Schwefelsäure	mit destilliert		

**Hund 2 (10 kg mit 20 g Lysol vergiftet).**

Darminhalt.	600 g	0,1508	0,0216	0,1744	—
Mageninhalt	—	—	—	—	—
Lunge . . .	160 g	0,0248	0,0173	0,0421	0,027
Leber . . .	550 g	0,090	0,0855	0,1755	0,032
Gehirn . . .	84 g	0,0176	0,0052	0,0228	0,027
Niere . . .	56 g	0,0144	0,0468	0,0612	—
Blut . . . .	100 ccm	0,00668	0,0162	0,0228	—

**Hund 3 (8,5 kg mit 10 g Lysol vergiftet).**

Blut . . . .	25 ccm	0,0023	0,0045	0,0068	0,0272
Gehirn . . .	72 g	0,0272	0,0068	0,0340	0,047
Leber . . . .	200 g	0,0789	0,0828	0,1617	0,0808
Lunge . . . .	86 g	0,0328	0,0131	0,0459	0,0540
Muskel . . .	100 g	0,0337	0,0103	0,0440	0,0440
Niere . . . .	33 g	0,01944	0,0068	0,0262	0,080

**Hund 4 (10 g Lysol) am 3. 4. 1906 vergiftet.**

Fettgewebe	(60 g) auf 100 g berechnet	0,069	0,0233	0,0923	0,0923
Gehirn . . .	70 g	0,0204	0,0027	0,0231	0,0311
Blut . . . .	25 ccm	kaum nachweisbare Spuren			
Leber . . . .	192 g	0,0659	0,0698	0,1357	0,0770
Lunge . . . .	128 g	0,0652	0,0259	0,0911	0,0712
Muskel . . .	100 g	0,0232	0,0061	0,0293	0,0293

Hund 3 erhält 10 g Lysol um 5 Uhr nachmittags. Der Hund wird am nächsten Morgen durch Verbluten getötet, nachdem er vorher ebenfalls die heftigsten Krämpfe gehabt hat. 100 g Blut enthalten 0,027 g, 100 g Gehirn 0,047 g, 100 g

Leber 0,080 g, 100 g Lunge 0,054 g, 100 g Muskel 0,044 g. Auch hier enthält das Blut am wenigsten. Auch in dem Falle von menschlicher Lysolvergiftung, der zum Tode kam, enthielt das Aderlaßblut kaum nachweisbare Mengen von Kresol. Hund 4 wurde nach Vergiftung mit 10 g Lysol ebenso untersucht, außerdem noch das Fettgewebe. 100 g Fettgewebe enthielten 0,0928 g, Gehirn 0,0331 g, Leber 0,0770 g, Lunge 0,0712 g, Muskel 0,0293 g.

Aus diesen Zahlen geht zuerst hervor, daß die Ablagerung und die Entgiftung des Kresols nicht im Blut statthat, sondern daß das Kresol schnell aus der Blutbahn verschwindet und in die Gewebe gelangt, und hier ist es in allen Fällen besonders die Leber, welche das Kresol aufnimmt. Nun fragt es sich erstens, was bedeutet die Ablagerung des Kresols in den einzelnen Organen, zweitens, wo findet die Entgiftung, das heißt die Überführung des Kresols in Kresolglukuron- resp. -Schwefelsäure statt. Um dies zu entscheiden, wurden alle Organe zuerst destilliert unter Zusatz von einer Spur Sodalösung, um das noch freie Kresol zu bestimmen und dann mit Schwefelsäure, um das an Schwefelsäure resp. Glukuronsäure gepaarte Kresol frei zu machen und zu bestimmen. Dabei zeigte sich, daß im Darminhalt, wie aus Hund 2 hervorgeht, fast die gesamte Kresolmenge ungebunden war und nur eine minimale Spur gebunden gefunden wurde. In der Lunge war ebenfalls eine weit größere Menge in ungebundener Form, ebenso im Gehirn. In letzterem wurde überhaupt weder bei Hund 2 noch bei Hund 3 eine nennenswerte gebundene Menge konstatiert. Dagegen sind sehr groß die Zahlen der gebundenen Kresolmenge in der Leber, sowohl bei Hund 2, wo sie ebenso groß ist wie die des ungebundenen Kresols und bei Hund 3, wo sie noch etwas größer ist, und in der Niere, namentlich bei Hund 2. Die Niere kommt weniger in Betracht, da hier möglicherweise schon etwas Urin in den Harnkanälchen vorhanden ist, in welchem gepaarte Glukuronsäure enthalten ist. Wir sehen also, daß die Entgiftung in geringem Grade in allen Zellen vor sich gehen kann, ganz besonders aber in der Leber oder daß die Leber das Organ ist, in welchem von allen Organen am meisten entgiftende Substanz deponiert wird. Nun habe ich vorhin gezeigt, daß die Lysolvergiftung einen Reiz ausübt auf das Zentralnervensystem und damit scheint im Widerspruch zu stehen der sehr geringe Gehalt des Gehirns an Kresol. Das spricht

aber nicht dagegen, daß das Kresol einen besonderen Reiz ausübt auf die Nervensubstanz, denn die Größe der Giftaufnahme einer Zelle geht nicht proportional der Intensität der Vergiftung. Die Nervenzelle kann ja bereits auf kleinere Reize reagieren, während eine andere z. B. Leberzelle größerer Mengen hierzu bedarf. Es ist auch nicht nötig, daß jede Zelle durch die Aufnahme eines Giftstoffes mit einer Vergiftung antwortet. Es müssen hierzu zwischen der Zelle und dem Gifte noch besondere Beziehungen bestehen. Es kann sogar im Gegenteil dadurch, daß im Organismus außer den für das Gift empfindlichen Zentren, z. B. für das Nervengift, noch andere Zellen vorhanden sind, welche das Gift in sich aufnehmen, ein Schutz geschaffen werden für die Nervenzentren, indem das Gift auf seinem Wege zu den Nervenzentren von anderen Organen abgefangen und dadurch gehindert wird, die giftempfindlicheren Zentren zu schädigen. So kann ja auch hier die Aufnahme des Kresols in die Lungen- und Leberzellen eine Art Schutz darstellen für die Nervenzellen, indem die Lungen- und Leberzellen das Gift auf dem Wege zum Gehirn und Rückenmark der Blutbahn entziehen. Ähnliches sehen wir beim Tetanusgifte. Bei diesem Gifte zeigt sich, daß die Tiere, z. B. Kaninchen, deren Leber-, Lungen-, sowie Muskelzellen usw. eine besondere Affinität zum Tetanusgifte haben, viel weniger empfindlich sind für Tetanus als solche Tiere, bei denen das Gift vorzugsweise vom Zentralnervensystem angezogen wird und bei denen andere Organe für die Resorption des Giftes nicht in Betracht kommen, z. B. Meerschweinchen. Wenn nun auch das Eindringen der Kresole in die Nervenzellen für die eigentliche Vergiftung von allein wesentlicher Bedeutung ist, so soll nicht gesagt sein, daß die übrigen Zellen vollständig reaktionslos sich gegenüber dem Kresol verhalten. Es spielt bloß die Aufnahmefähigkeit der übrigen Zellen des Organismus für Kresol eine untergeordnete Rolle gegenüber den Wirkungen, welche das Kresol ausübt, wenn es in die Nervenzellen gerät. —

#### **b. Entgiftung der Kresole.**

Man hat angenommen, daß die Antitoxine vorzugsweise in denjenigen Organen entstehen, in denen auch die Vergiftung sich vollzieht, Diese Ansicht fand ihre Grundlage in den

schönen Befunden A. Wassermanns, der nachgewiesen hat, daß beim Tetanus im Gehirn und Rückenmark Antitoxine präformiert vorhanden sind. Es ist aber nicht nötig, daß nur das vergiftete Organ das Antitoxin bildet. Wir wissen im Gegenteil, daß alle Organe an der Antitoxinbildung teilnehmen können. Für die Kresolvergiftung ist von präformierten Antitoxinen keine Rede. Von der Glukuronsäure ist zu sagen, daß die Gewebe, soweit bisher bekannt, keine Glukuronsäure präformiert enthalten. Sie entsteht erst im Moment, wo der Organismus ihrer zur Entgiftung bedarf. Nun finden wir bei der Vergiftung mit bakteriellen Toxinen zumeist mehr Antitoxin im zirkulierenden Blute als der zugeführten Toxinmenge entspricht. Auf den ersten Blick scheint dies bei der Glukuronsäure nicht der Fall zu sein, denn wir finden überhaupt keine freie Glukuronsäure analog dem frei zirkulierenden Antitoxin. Die Zahlen zeigen aber, daß soviel Glukuronsäure gebildet wird, daß es kaum anzunehmen ist, daß dieselbe nur zur Neutralisierung der Phenole dient.

So ist im Fall a) 0,9 g Phenole vorhanden bei gleichzeitiger Anwesenheit 800 ccm — 6,2% und 950 ccm — 0,5% drehenden Harns. Würde die Drehung des Harns auf Traubenzucker bezogen, so wären 54 g Traubenzucker enthalten. Das ist ein so großer Wert, daß er um ein vielfaches die für 0,9 g Phenole nötige Menge Glukuronsäure übersteigt.

Im Fall b) Kunert sind die Zahlen 3,3 g Phenole. Die Drehung des Harns auf Traubenzucker berechnet ergibt 90 g.

Im Fall c) Kriesel sind die Zahlen 3,6 g Phenole. Entgiftende Substanz als Traubenzucker berechnet 116,7 g.

Im Fall d) Keller sind ausgeschieden 3,7 g Phenole. Entgiftende Substanz als Traubenzucker berechnet 61,2 g. Diese Zahlen als Phenolglukuronsäure berechnet sind a) 34 g; b) 56 g; c) 74 g; d) 38,4 g.

Nun ist allerdings zu berücksichtigen, daß ein Teil der in den Organismus eingeführten Kresole zu Hydrochinon und Brenzcatechin oxydiert wird und bei der Bestimmung der Phenole nach der Methode von Kossler-Penny, welche von mir teilweise mit der Neubergschen<sup>1)</sup> Modifikation in allen Untersuchungen verwandt wurde, sich dem Nachweis entzieht. Anderseits ist aber nur die Entgiftung durch Glukuronsäure in Betracht

<sup>1)</sup> C. Neuberg, Ztschr. f. physiol. Chem. **27**, 123. 1899.

gezogen und ganz außer acht gelassen, daß ein sehr großer Teil der Phenole durch Schwefelsäure entgiftet wird. Bei Nachuntersuchungen, wieviel Brenzkatechin und Hydrochinon in den einzelnen Fällen gebildet waren, wurden jedesmal nur einige Milligramm in je 200 Harn, also einige Zentigramm in der Tagesmenge gefunden.

Ich glaube daher annehmen zu dürfen, daß auch bei der Kresolvergiftung im Überschuß Glukuronsäure entsteht. Wenn dieselbe aber nicht frei im Organismus nach der Vergiftung zirkuliert, so ist das kein Gegenbeweis gegen meine Auffassung, sondern zeigt nur, daß die Glukuronsäure andere Substanzen findet, mit denen sie sich paaren kann z. B. mit Harnstoff (Neuberg<sup>1)</sup>). Es könnte nun allerdings dadurch eine Mehrbildung von Glukuronsäure nötig werden, daß bei dem durch die Kresolvergiftung bedingten Eiweißzerfall Produkte gebildet werden, die zur Neutralisierung der Glukuronsäure bedürfen.

Was nun die Frage anbetrifft, wie das Gift von der Zelle aufgenommen wird, so ist von großem Interesse dafür der Befund, daß Kresol in ganz bedeutender Menge in das Fettgewebe übertritt. Hierauf bin ich aufmerksam gemacht worden durch eine Arbeit von Ehrlich aus dem Jahre 1887<sup>2)</sup>, welcher zeigte, daß solche Substanzen, die eine besondere Affinität haben für die Hirnsubstanz, besonders Farbbasen, auch meist im Fettgewebe löslich sind. Es ist demnach sehr wahrscheinlich, daß das Kresol in den Lipoiden der Zellen sich löst und mit denselben in die Zellen eintritt. Die Kresole verbinden sich nicht mit den Eiweißkörpern der Zellen, denn ich habe durch einen besonderen Versuch die Eiweißkörper des mit Kresol vergifteten Hundes dargestellt, habe aber kein Kresol aus denselben darstellen können. Der Mechanismus ist also kurz folgender: durch die Lipoidsubstanz dringt das Gift in die Zellen hinein, sind besondere Beziehungen des Giftes zur Zelle vorhanden, so kommt es zur Vergiftung derselben; die vergiftete Zelle bildet nunmehr aus ihrem Eiweiß- und Kohlenhydratvorrat die Schwefelsäure und Glukuronsäure und zwar im Überschuß. Diese wirken dann wie echte Antitoxine d. h. sie werden an die Kresole gekuppelt und machen so den Entgiftungsprozeß.

<sup>1)</sup> C. Neuberg u. W. Neimann, Ztschr. f. physiol. Chem. **44**, 100. 1905.

<sup>2)</sup> P. Ehrlich, Therapeutische Monatshefte 1887.

## VI. Die Ausscheidung der Kresole durch die Galle.

Huber und Bial haben gezeigt, daß Glukuronsäure in den Fäces erscheinen kann und wahrscheinlich durch die Galle ausgeschieden wird. In diesem Falle fand sich zwar in den Fäces keine Kresol-Glukuronsäure oder nur minimale Spuren, dagegen in der Galle konnte dieselbe nachgewiesen werden. Es entstand erstens scharfer Kresolgeruch nach Kochen der Galle mit Schwefelsäure; ferner reduzierte die Galle nach Kochen mit Salzsäure und gab intensiv die Orcinprobe. Da nun das Blut so gut wie kein Kresol enthält, in der Galle aber das Kresol ziemlich angereichert ist, so ist es nicht ausgeschlossen, daß die Galle einen der Wege darstellt, durch den die Kresol-Glukuronsäure von der Leber aus den Organismus verläßt. Sie dürfte dann vom Darm aus wieder resorbiert und der Niere zugeführt werden.

Wir haben gesehen, daß nur die Wirkung des Kresols auf das Zentralnervensystem bez. auf die Nervenzelle eine schwerere Vergiftung hervorruft, daß es zwar von den anderen Zellen aufgenommen wird, aber hier keine allgemeine Schädigung zu verursachen braucht. So habe ich z. B. die Autolyse in der Leber und Lunge erhalten gefunden; obwohl die Leber ein sehr stark giftbindendes Organ ist.

Ich komme also zu dem Ergebnis, daß die Giftwirkung des Lysols auf dem Gehalt desselben an Kresolen beruht. Diese sind kein eigentliches Ätzgift, insofern als die Ätzwirkungen bei der Vergiftung nicht vorhanden zu sein brauchen. Das Kresol wirkt dadurch tödlich, daß es Krämpfe, vor allem Herzkollaps hervorruft. Diese Erscheinungen sind bedingt durch Aufnahme des Giftes durch die Zellen. Die Aufnahme geschieht durch die Lipoidsubstanz. Bei den Entgiftungsvorgängen wird mehr entgiftende Substanz gebildet, als dem zugeführten Gifte entspricht.

## Autolyse.

Leber eines durch Lysol vergifteten Hundes (30 g + 200 g Wasser mit Toluol und Chloroform).

24./3. 0,00378 g nicht koagulierbarer Stickstoff in 10 ccm

26./3. 0,01106 g

4./4. 0,01596 g

Lunge (30 g + 200 g Wasser mit Toluol und Chloroform).

24./3. 0,00308 g Stickstoff, 26./3. 0,00798 g, 4./4. 0,01092 g.

---



# **Die Chemie der Superazidität und ihre pathologisch-physiologische Erklärung.**

Von  
**Adolf Bickel.**

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen  
Instituts der Universität zu Berlin.)

*(Eingegangen am 16. Mai 1906.)*

Unter Superazidität (= Hyperazidität) versteht man bekanntlich den Krankheitszustand, bei dem der Mageninhalt die für ihn empirisch ermittelten durchschnittlichen normalen Säurewerte überschreitet. Die Bestimmung der Säure geschieht dabei durch Titration mit  $\frac{1}{10}$ -Normal-Natronlauge und Phenolphthalein als Indikator; der hierdurch festgestellte Säurewert wird, auf 100 ccm Mageninhaltfiltrat bezogen, „Gesamtazidität“ (G. A.) genannt.

Es ist klar, daß zu diesem Säurewert verschiedene Komponenten beitragen können: einmal die von der Magenschleimhaut selbst produzierte Salzsäure und die gleichfalls von ihr gelieferten anderweitigen sauren Produkte<sup>1)</sup>; außerdem aber alle diejenigen Säuren, die per os in die Magenöhle eingeführt oder die darinnen unter dem Einfluß einer Flora von Mikroorganismen aus Speisenmaterial gebildet werden (Fettsäuren, Milchsäure usw.).

Im Hinblick auf diese verschiedenartigen ätiologischen Momente, die zur Durchsäuerung des Mageninhalts beitragen können, ist es a priori nicht vorherzusagen, welche obere Grenze diese Werte für die G. A. in der Pathologie gelegentlich erreichen können. Denn diese gesamte Magensäure hängt ja nicht nur von denjenigen Bedingungen ab, unter denen die

---

<sup>1)</sup> Vergl. P. Fraenckel, Zeitschr. für experimentelle Pathologie und Therapie, 1.

Magenschleimhaut Säure abscheidet, sondern, wie wir sahen, ganz besonders auch von gewissen exogenen Momenten: der Einführung von Säure durch den Mund oder der Bildung von Säure in der Magenöhle durch Gärung.

Eine besondere Form der Hyperazidität ist diejenige, die sich durch einen abnorm hohen Gehalt des Mageninhalts an Salzsäure, die von der Magenwand abgeschieden wurde, auszeichnet. Man nennt diesen Krankheitszustand, der durch die chemische Analyse des Mageninhalts allein diagnostiziert werden kann, Hyperchlorhydrie. Sie kommt einmal als ein klinisch wohl charakterisiertes Krankheitsbild *sui generis* auf nervöser Basis vor. Die subjektiven Symptome bestehen dabei in Sodbrennen, Aufstoßen saurer Massen, Brennen und Bohren in der Magengegend. Diese Beschwerden sind stärker nach dem Genuß von kohlehydratreicher oder fettiger Nahrung, als nach einer Fleischmahlzeit. Der Appetit ist gut, oft besteht sogar Heißhunger. Der Stuhl ist mitunter angehalten, zuweilen auch diarrhöisch. Unter den objektiven Symptomen, die dieses Krankheitsbild auszeichnen, nenne ich eine gelegentlich vorkommende Druckempfindlichkeit der Magengegend, die aber ebenso, wie die manchmal beobachtete Dilatation und motorische Insuffizienz in reinen Fällen ganz fehlen kann. Die chemische Untersuchung des Mageninhalts nach der Gabe eines Probebrühstückes läßt eine Erhöhung der Gesamtazidität neben einer Vermehrung des prozentualen Salzsäuregehaltes des Mageninhaltes erkennen. In manchen Fällen finden sich jedoch auch durchaus normale Säurewerte trotz des Vorhandenseins der übrigen klinischen Symptome. Der Mageninhalt soll ferner bei dieser Krankheit nach Schüler ein abnorm niedriges spezifisches Gewicht haben. Im Harn ist die Chlorausscheidung oft herabgesetzt, ebenso die Azidität. Nicht selten besteht Phosphaturie.

Diesem hier skizzierten Krankheitsbilde [— ich habe mich an die Schilderung, die Boas von ihm gibt, gehalten —] der Hyperchlorhydrie auf nervöser Basis können einige andere Magenerkrankungen klinisch außerordentlich ähnlich verlaufen, so ähnlich, daß eine Differentialdiagnose in vielen Fällen ganz unmöglich ist: das ist ein chronisches Magengeschwür ohne manifeste Ulcus Symptome, der Magensaftfluß und die *Myasthenia ventriculi*.

Bei allen diesen Krankheiten finden wir — genau wie bei der nervösen Hyperchlorhydrie — eine Steigung des prozentualen Salzsäuregehaltes im Mageninhalt, und auch die übrigen Symptome können außerordentlich ähnliche sein. Indessen steht bei allen diesen Erkrankungen das Verhalten der Magensäure im Vordergrund des physiologischen Interesses.

Es war daher naheliegend, einmal die Frage zu untersuchen, welche Ursache der Störung in der Azidität des Mageninhaltes bei diesen verschiedenen Krankheiten zugrunde liegt, ob wir es bei allen mit der nämlichen Sekretionsstörung zu tun haben, oder ob verschiedene Sekretionsanomalien bei den genannten Erkrankungen des Magens, die sämtlich mit Hyperchlorhydrie einhergehen, anzunehmen sind, oder endlich ob eine Hyperchlorhydrie nicht auch bei normaler sekretorischer Funktion durch anderweitige Störungen bedingt sein kann.

Um diese Untersuchung anstellen zu können, müssen wir zunächst die Vorfrage erledigen: wodurch kann der prozentuale Salzsäuregehalt des Mageninhalts überhaupt gesteigert werden?

Bei der Beantwortung dieser Frage gehe ich von der Voraussetzung aus, daß dem Magen eine quantitativ und qualitativ bestimmte Nahrung, z. B. ein Ewald-Boassches Probefrühstück, bestehend aus 35 g Semmel und 400 ccm Wasser zugeführt und daß diese Mahlzeit innerhalb einer bestimmten Zeit (15 Minuten) von dem zu untersuchenden Individuum verzehrt wird. Eine Stunde nach Beginn der Aufnahme dieser Nahrung wird der Mageninhalt ausgehebert und untersucht. Ich nehme weiterhin an, daß auf diese Nahrung beim normalen Individuum eine gewisse Anzahl Kubikzentimeter Magensaft von der Magenwand in die Magenöhle ergossen wird und daß dabei die Dauer der Sekretion gleichfalls einen bestimmten durchschnittlichen Wert hat, eine Annahme, die allerdings nur bis zu einem gewissen Grade zutreffend ist. Denn wir wissen, daß bei demselben Individuum an verschiedenen Tagen zum Teil aus unbekanntem Gründen die sekretorische Leistung der Magenschleimhaut auch bei sonst gleichen äußeren Versuchsbedingungen sich innerhalb einer gewissen physiologischen Breite bewegt. Endlich wird angenommen, daß die dem Magen zufließenden Speichelmengen die gleichen sind und daß der Speichel einen konstanten Alkaleszenzgrad aufweist; die von der Magenschleimhaut pro-

duzierten Schleimmengen werden ebenfalls als konstanter Faktor bei diesen Versuchen angesprochen.

Bei den genannten Voraussetzungen kann nun der prozentuale Salzsäuregehalt des Mageninhalts, den man eine Stunde nach dem Beginne der Aufnahme des Probefrühstücks durch Aushebern erhält, noch immer von zwei Ursachen abhängen: 1. von dem prozentualen Salzsäuregehalt des nativen Magensaftes, 2. von der motorischen Leistung der Magenwand.

Wurde innerhalb der genannten Stunde allemal dieselbe Menge von Ingesta in den Darm befördert und dieselbe Menge Saft abgeschieden, so müßte der prozentuale Salzsäuregehalt des Mageninhaltes am Ende dieser Stunde umso höher sein, je reicher der native Saft an Salzsäure ist.

Der prozentuale Salzsäuregehalt des normalen menschlichen Magensaftes hat aber einen relativ konstanten Wert; er beträgt nach den Angaben von Hornborg, Roeder und Sommerfeld, wie nach meinen eigenen Beobachtungen 0,4 bis 0,5 %<sup>1)</sup> und wie Rubow<sup>2)</sup> überzeugend neuerdings nachgewiesen hat, ist nicht ein einziger Fall in der Literatur bekannt, bei dem im Mageninhalt des Menschen ein Salzsäuregehalt nachgewiesen worden wäre, der diesen Wert übertroffen hätte. Das gilt besonders auch für alle Fälle von sog. Hyperchlorhydrie.

Diese Beobachtungen deuten, wie eine Reihe tierexperimenteller Erfahrungen, darauf hin, daß der natürliche Magensaft einen bestimmten prozentualen Salzsäuregehalt hat, der auch unter pathologischen Verhältnissen nicht überschritten werden kann<sup>3)</sup>.

Denn alle diejenigen Momente, von welchen bekannt geworden ist, daß sie die Magensaftbildung günstig beeinflussen (Wasserzufuhr, Kochsalzzufuhr bei chlorarmen Tieren, starke Reize durch bestimmte Nahrung usw.) vermögen nicht den prozentualen Salzsäuregehalt des nativen Sekrets zu steigern, sondern nur die Sekretmenge zu erhöhen (Pawlow, Wohlgemuth).

---

<sup>1)</sup> Kongreß für innere Medizin 1906. Deutsche medizinische Wochenschr. 1906.

<sup>2)</sup> Archiv für Verdauungskrankheiten 1906.

<sup>3)</sup> Bickel, Experimentelle Untersuchungen über die Magensaftsekretion beim Menschen. Kongreß für innere Medizin 1906.

Aus alledem ergibt sich, daß für eine Salzsäurevermehrung im Mageninhalt bei der genannten Versuchsanordnung nur noch die motorische Funktion der Magenwand verantwortlich gemacht werden kann.

Bei gleicher sekretorischer, aber ungleicher motorischer Leistung des Magens kann der Mageninhalt verschieden sauer werden. Denn ist eine Stunde nach der Ingestion in dem einen Falle z. B. die Hälfte, in dem anderen  $\frac{2}{3}$  des eingeführten Probefrühstücks in den Darm befördert worden, so muß bei gleich starker und gleich lange währender Sekretion in dem letzteren Falle der Mageninhalt prozentisch mehr Salzsäure enthalten, als in dem ersteren. Die Resorption von Flüssigkeit bezw. Lösungen seitens der Magenwand — diese Resorption ist ja bekanntlich nur ganz minimal (v. Mehring u. a.) — kann dabei vernachlässigt werden.

In dieser Weise vermag eine Hypermotilität sehr wohl zu einer Steigerung des prozentualen Salzsäuregehaltes des Mageninhalts zu führen.

Die gleiche Erscheinung wird aber auch durch eine Herabsetzung der motorischen Leistung des Magens zustande kommen können. Je länger Ingesta im Magen liegen bleiben, umso länger dauern die Sekretionsreize, umso mehr Saft wird in Magenöhle ergossen. Wegen der motorischen Störung wird der Mageninhalt verzögert oder unvollkommen in den Darm entleert. Je schwerer die Myasthenie ist, umso seltener wird der Magen leer sein, umso kontinuierlicher wird die Magenschleimhaut zur Saftbildung gereizt. So kann im Magen ein Überschuß an Sekret vorhanden sein und dadurch wieder kann der Mageninhalt salzsaurer werden, auch wenn die Komposition des betreffenden nativen Sekretes hinsichtlich seines Säuregehaltes eine normale ist. So ließe sich diejenige Hyperchlohydrie erklären, die man im Anfangsstadium einer motorischen Insuffizienz so häufig beobachtet.

Jedenfalls zeigen diese Überlegungen, daß Motilitätsstörungen unter Umständen zu Veränderungen im prozentualen Salzsäuregehalt des Mageninhalts führen müssen und daß speziell dadurch dasjenige klinische Symptom erzeugt werden kann, das man „Hyperchlorhydrie“ nennt.

Ändern wir insofern die Voraussetzungen, die wir oben

machten, daß wir für die Konstante der abgeschiedenen Sekretmenge als Konstante eine bestimmte normale motorische Leistung einsetzen und die quantitativen Verhältnisse bei der Saftabscheidung sich ändern lassen, so werden wir zu folgenden Schlußfolgerungen geführt:

Eine Vermehrung der durchschnittlichen, in der Zeiteinheit abgesonderten Saftmenge muß gleichfalls zu einer Steigerung im prozentualen Salzsäuregehalt des Mageninhalts führen. Je mehr Sekret einem bestimmt zusammengesetzten Mageninhalt zufließt, umso mehr Salzsäure wird ihm beige-mischt, um so höher muß auch der prozentuale Salzsäuregehalt des gesamten Mageninhalts werden, wenn auch derjenige des abgesonderten Saftes seinen normalen konstanten Wert hat.

Man sieht: eine Steigerung in der Quantität bei der Absonderung eines normal komponierten Saftes kann zu einer Veränderung in der Qualität des Mageninhaltes führen. Dem Symptom der Hyperchlorhydrie liegt in diesem Falle eine quantitative Störung in der Saftbildung zugrunde.

Die tierexperimentelle Forschung lehrt nun, daß es durch künstliche Eingriffe leicht möglich ist, Störungen in der motorischen Leistung und solche in der Quantität des auf bestimmte Reize und Reizgruppen zur Abscheidung gelangenden Saftes zu erzielen, daß aber eine Alteration in der Komposition des Sekrets — soweit dieselbe den prozentualen Salzsäuregehalt betrifft — nur sehr schwer durchführbar ist. So vermögen z. B. psychische Prozesse die Motilität des Magens vorübergehend zu lähmen<sup>1)</sup>, die Sekretbildung auf ein Minimum herabzudrücken<sup>2)</sup>, aber es ist bis jetzt nicht möglich gewesen, dadurch den prozentualen Salzsäuregehalt des Sekretes zu alterieren. So vermindert die Chlorentziehung die Menge des abgesonderten Saftes, aber sein prozentualer Salzsäuregehalt bleibt nach wie vor ungefähr der nämliche (Wohlgemuth).

Wenn es auch a priori nicht ausgeschlossen ist, daß es Krankheitszustände in der Magenschleimhaut oder in ihrem sekretorischen Nervenapparat geben könnte, die zu einer Steigerung des prozentualen Salzsäuregehaltes des von der

---

<sup>1)</sup> Kongreß für innere Medizin 1906.

<sup>2)</sup> Bickel-Sasaki, Deutsche medizinische Wochenschr. 1905.

Schleimhaut gebildeten Sekretes führen, so ist doch ein stringenter Beweis für eine solche Funktionsänderung bislang nicht erbracht worden und alle Erfahrungen deuten im Gegenteil darauf hin, daß die Magenschleimhaut mit einer erstaunlichen Zähigkeit daran festhält, die normalen Säurewerte ihres Sekretes nicht nach oben zu verschieben.

Es wird nach alledem die weitere Aufgabe klinischer Forschung sein, festzustellen, wie weit die einzelnen Krankheitsbilder, bei denen das Symptom der „Hyperchlorhydrie“ auftritt, in dem Sinne durch Störungen in der Motilität bez. in der Größe der sich abscheidenden Sekretmengen kompliziert sind, daß aus diesen beiden Funktionsstörungen heraus die „Hyperchlorhydrie“ erklärt werden kann.

Ohne weiteres verstehen wir so die „Hyperchlorhydrie“ bei dem sog. Magensaftfluß (Reichmannsche Krankheit), ohne weiteres die Hyperchlorhydrie bei Hypermotilität, wie in den ersten Stadien der motorischen Insuffizienz; und es ist nur die Frage zu ventilieren, wie weit bei den einzelnen Fällen eine motorische Störung sich mit der sekretorischen verbindet, um das Symptom der Hyperchlorhydrie hervorgehen zu lassen. Auch der Hyperchlorhydrie beim Ulcus ventriculi scheint keine qualitative, sondern vornehmlich eine quantitative Störung in der Sekretbildung zugrunde zu liegen. Wenigstens sprechen dafür die reinen tierexperimentellen Beobachtungen Pawlows.

Daß durch die gewöhnlichen klinischen Untersuchungsmethoden wir keinen exakten Aufschluß über die abgesonderten Sekretmengen erhalten, ist klar, darum kann auch die Krankenbeobachtung allein nie mit Sicherheit entscheiden, ob im Falle einer bestehenden Hyperchlorhydrie die Quantität oder die Qualität des Saftes gestört ist. Hier können uns nur bestimmt angeordnete experimentelle Studien weiterbringen. Gerade diese lassen aber, wie ich zeigte, die Existenz einer Hyperchlorhydrie auf Grund einer Veränderung des prozentualen Salzsäuregehaltes des natürlichen Sekretes als höchst problematisch erscheinen.

Aus alledem ergibt sich, daß die Hyperchlorhydrie wahrscheinlich in ihrer Deutung kein einfaches Symptom ist, wie man früher annahm, sondern daß sie auf verschiedenen Ursachen, von denen mehrere sich gelegentlich wohl zu vereinigen

vermögen, beruhen kann. Besonders wird dabei die Veränderung in der motorischen Funktion und eine quantitative Sekretionsanomalie zu berücksichtigen sein.

Wenn so auch die Deutung der Hyperchlorhydrie als Symptom einer Revision bedarf, so bleibt darum die klinische Charakterisierung derjenigen Krankheitsbilder unverändert, bei denen sie beobachtet wird, und mag es sich auch um das Bild der nervösen Hyperchlorhydrie, also der reinsten Form dieser Störung handeln. Wie diejenigen Fälle allerdings zu erklären sind, bei denen der Chemismus des Mageninhalts sich bei vorhandenen sonstigen klinischen Erscheinungen der Hyperchlorhydrie als normal erweist, muß vor der Hand dahingestellt bleiben. Möglich ist es ja, daß es sich dabei um abnorme Reizzustände der sensibelen Magennerven handelt.

Für die Praxis aber lehren uns alle diese Betrachtungen, daß wir bei den Fällen von Hyperchlorhydrie — auch dann, wenn wir durch die chemische Untersuchung des Mageninhaltes diese Diagnose gestellt haben — die Motilitätsprüfung nicht vernachlässigen sollen. Gerade mit Berücksichtigung der Störungen in den motorischen Funktionen werden wir oftmals in wirkungsvoller Weise eine Therapie der Hyperchlorhydrie einleiten können. Im übrigen führen diese Vorstellungen, die ich hier über die pathologisch-physiologische Deutung der Hyperchlorhydrie entwickelte, zu einer Behandlung, die alles das fernhält oder mildert, was als starker Sekretionsreiz für die Drüsen der Magenschleimhaut uns bekannt ist, oder was durch direkten Einfluß oder indirekt durch Vermittlung des Nervensystems die quantitative sekretorische Leistung der Magenschleimhaut zu steigern geeignet ist.

Ich weise zum Schlusse noch darauf hin, daß man daran denken muß, es könnten sich gelegentlich die hier erörterten Faktoren so kombinieren, daß trotz vorhandener Störungen und krankhafter klinischer Erscheinungen ein normaler Chemismus bei der Mageninhaltprüfung gefunden wird. Dieser Fall ist gegeben, wenn z. B. die Sekretmenge vermindert und die Motilität herabgesetzt ist, oder wenn der entgegengesetzte Zustand besteht. Man muß eben allemal dieser Momente bei der Untersuchung der Magenfunktionen mit Hilfe des Probefrühstücks usw. eingedenk sein.

---



## Zur Chemie der Phosphorleber.

Von

**J. Wohlgemuth.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts  
der Universität zu Berlin.)

(Eingegangen am 16. Mai 1906.)

Gelegentlich meiner Untersuchung über den Gehalt des Phosphorharns von Kaninchen an Eiweißspaltprodukten<sup>1)</sup> wurde die Frage diskutiert, ob man den Eiweißerfall in der Leber als einen totalen oder als einen partiellen aufzufassen hat, d. h. ob man annehmen darf, daß bei dem gesteigerten Eiweißumsatz in der Leber die Lebersubstanz in toto abgebaut wird oder ob nur einzelne Komplexe vom Ganzen losgetrennt werden und der weiteren Zersetzung anheimfallen. Nun setzen sich die Eiweißsubstanzen der Leber, wenn wir von der Einteilung von Plósz<sup>2)</sup> absehen, im wesentlichen zusammen aus dem Eiweiß des Zellprotoplasmas und dem des Zellkernes. Für das erstere hat bereits Wakeman<sup>3)</sup> in Kossels Laboratorium festgestellt, daß es bei der Phosphorvergiftung an seinen basischen Bestandteilen, speziell an Arginin, verarmt ist.

Es war nun zunächst zu entscheiden, ob nicht auch andere Gruppen des Zelleiweißes bei der Phosphorvergiftung gegenüber der Norm vermindert sind wie z. B. der Cystinkomplex, dann aber auch besonders, wie sich das Eiweiß des Zellkerns gegen-

---

<sup>1)</sup> J. Wohlgemuth, Ztschr. f. physiol. Chemie **44**, 74 (1905).

<sup>2)</sup> Plósz, Pflügers Archiv **7**, 371.

<sup>3)</sup> Wakeman, Ztschr. f. physiol. Chemie **44**, 335 (1905).

über dem gesteigerten Zerfallsprozeß in der Phosphorleber verhält. — Zur Beantwortung dieser Frage war es notwendig, in einem möglichst unter gleichen Bedingungen gewonnenen Material neben dem Stickstoff die Repräsentanten jener beiden Komplexe, den Phosphor und Schwefel, zu bestimmen.

Der Gang der Untersuchung war folgender: Es wurden Kaninchen, die im Gewicht nicht wesentlich differierten, mit subkutanen Dosen von Phosphoröl vergiftet und kurz vor ihrem Tode durch Entbluten getötet. Sodann wurde die Leber gewogen, sofort zerkleinert, in Chloroformwasser aufgeschwemmt und so lange mit Wasser gewaschen, bis dasselbe keinen Blutfarbstoff mehr aufnahm. Die Substanz blieb darauf mehrere Tage unter 96% Alkohol, der von Tag zu Tag gewechselt wurde, kam 24 Stunden unter 99,8% Alkohol und wurde schließlich im Soxhletapparat entfettet. Darnach konnte die Substanz in einer Reibeschale leicht zu einem feinen Pulver zerrieben und von der Gerüstsubstanz mittels Absieben durch ein Haarsieb getrennt werden. — Mit den Lebern der Kontrolltiere wurde in gleicher Weise verfahren, nachdem die Tiere vier Tage gehungert hatten und durch Entbluten getötet waren. Die kurze Hungerperiode wurde jedesmal deshalb streng innegehalten, weil die mit Phosphor vergifteten Tiere gleich nach der ersten Giftdosis ebenfalls nicht mehr fraßen und für gewöhnlich von da ab noch vier Tage lebten. — Die Stickstoff-, Phosphor- und Schwefelbestimmung wurde in der üblichen Weise ausgeführt und hatte folgendes Ergebnis:

Tabelle I. Normale Kaninchenleber.

Versuchstier	Stickstoff in 100 g getrockneter Substanz	Phosphor in 100 g getrockneter Substanz	N : P	Schwefel in 100 g getrockneter Substanz	N : S
1	12,19	1,86	1 : 0,15	0,85	1 : 0,069
2	11,2	1,98	1 : 0,17	0,71	1 : 0,063
3	11,12	1,88	1 : 0,16	0,80	1 : 0,071
4	10,06	1,63	1 : 0,16	0,74	1 : 0,073
5	12,54	1,78	1 : 0,14	0,82	1 : 0,065
<b>Mittelzahlen</b>	<b>11,42</b>	<b>1,82</b>	<b>1 : 0,16</b>	<b>0,78</b>	<b>1 : 0,068</b>

Tabelle II. Kaninchenleber nach Phosphorvergiftung.

Versuchstier	Stickstoff in 100 g getrockneter Substanz	Phosphor in 100 g getrockneter Substanz	N : P	Schwefel in 100 g getrockneter Substanz	N : S
1	8,04	1,82	1 : 0,22	0,65	1 : 0,081
2	7,73	1,79	1 : 0,23	0,71	1 : 0,091
3	5,90	1,72	1 : 0,29	1,03	1 : 0,174
4	7,86	—	—	0,73	1 : 0,092
5	6,78	1,76	1 : 0,25	0,97	1 : 0,143
<b>Mittelzahlen</b>	<b>7,28</b>	<b>1,77</b>	<b>1 : 0,24</b>	<b>0,62</b>	<b>1 : 0,085</b>

Aus der ersten Tabelle ist ersichtlich, daß der Stickstoff sowohl wie der Phosphor und der Schwefel in allen fünf Fällen sich im großen und ganzen gleich hoch halten, und daß infolgedessen auch die Zahlen für die Quotienten  $\frac{N}{P}$  und  $\frac{N}{S}$  fast annähernd gleich sind.

In der II. Tabelle fällt zunächst auf, daß auf 100 g Trockensubstanz weit weniger Stickstoff kommt als bei sämtlichen normalen Lebern, und zwar geht die N-Zahl einmal bis fast um die Hälfte zurück. Vergleicht man aber die entsprechenden Mittelzahlen aus beiden Versuchsreihen, so ist die Differenz nicht so groß. — Im Gegensatz dazu stehen die Zahlen für Phosphor und Schwefel. Sie halten sich auf annähernd gleicher Höhe wie in den Kontrollversuchen, infolgedessen ist auch ihr Verhältnis zum Stickstoff wesentlich verschoben. Der P-Gehalt zeigt eine relative Zunahme, die etwa um ein Drittel die Normalzahl übersteigt, während der S-Gehalt auch relativ vermehrt erscheint, wenn auch nicht in so hohem Maße.

Aus diesen Versuchen geht zunächst hervor, daß die Kaninchenleber bei Phosphorvergiftung prozentisch ärmer an Stickstoff wird, ein Befund, den in gleicher Weise Wakeman an Hunden erheben konnte, und den er, wie ich schon eingangs erwähnte, dahin erweiterte, daß speziell der basische Anteil des Eiweißkomplexes es ist, der diesen N-Verlust bedingt. Diese Tatsache beansprucht insofern ein wesentliches Interesse, als wir andererseits wissen, daß überall da, wo normales Gewebe in Umwandlung begriffen ist, Proteinstoffe von vorwiegend

basischer Natur auftreten. So hat schon Miescher darauf hingewiesen, daß man es bei den basischen Eiweißkörpern mit Substanzen zu tun hat, die durch Umwandlung aus den gewöhnlichen Eiweißkörpern hervorgegangen sind, und ebenso konnte Kossel<sup>1)</sup> am Fischhoden zeigen, daß derselbe im unentwickelten Zustand zusammengesetzt ist wie die normalen Proteinstoffe, während bei zunehmender Reife die basische Gruppe ganz beträchtlich wächst. Ferner wies gelegentlich Bang<sup>2)</sup> darauf hin, daß bei Geschwülsten (Rundzellensarkom) Eiweißkörper vorkommen, die einen hohen Gehalt an basischen Produkten aufweisen können, und endlich zeigte Neuberg<sup>3)</sup> am Amyloid, daß es je nach dem Stadium der Metamorphose, in der es sich befindet, mehr oder weniger reich an Diaminosäuren ist, und betonte, daß Proteinstoffe von ausgeprägt basischem Charakter überall dort auftreten können, wo normales Gewebe in Umwandlung sich befindet. Demnach scheint der basische Anteil im Eiweißkomplex recht beweglich zu sein; denn in dem gleichen Maße wie das Eiweißmolekül bei gewissen Prozessen an Diaminosäuren reich wird, geht es ebenso leicht beim Zerfall wieder derselben verlustig.

Weit stabiler scheint dagegen derjenige Komplex im Eiweißmolekül zu sein, der mit dem Phosphor verknüpft ist, nämlich die Kernsubstanz. Sie widersteht offenbar längere Zeit selbst so destruktiven Prozessen, wie sie sich bei der Phosphorvergiftung in der Leber abspielen; denn die Zahlen sprechen unzweideutig dafür, daß der Phosphor und damit der Nukleingehalt sich fast auf gleicher Höhe gehalten hat wie in den Kontrollebern. Interessant ist hierbei die Übereinstimmung des chemischen Befundes mit dem mikroskopischen. Wissen wir doch, daß im mikroskopischen Bild die Leberzelle bei der Phosphorvergiftung wohl stark verfettet, daß dagegen der Zellkern sich noch lange Zeit gut erhält, bis auch er schließlich der Degeneration anheimfällt.

Eine Mittelstellung zwischen den basischen Produkten und dem Phosphor scheint der Cystinkomplex einzunehmen. Der

---

<sup>1)</sup> Kossel, Ztschr. f. physiol. Chemie **41**, 409, 1904.

<sup>2)</sup> Bang, Beitr. zur chem. Physiol. u. Pathol. **4**, 362, 1904.

<sup>3)</sup> Neuberg, Verhandlg. d. dtsh. pathol. Gesellsch. 19, 1904.

Schwefelgehalt zeigt zwar absolut eine Abnahme, wie aus dem Vergleich der beiden entsprechenden Mittelzahlen ersichtlich, aber dieselbe entspricht keineswegs der des N-Gehalts. Darnach scheint der Schwefelkomplex ebenfalls in das Eiweißmolekül ziemlich fest eingefügt zu sein.

Nach alledem beantwortet sich obige zu Anfang aufgeworfene Frage dahin, daß während das Protoplasmaeiweiß in der Phosphorleber sehr bald zerfällt, das Kerneiweiß noch recht lange dem Zerfallsprozeß Widerstand entgegen setzt. Natürlich wird auch dieses schließlich der Zerstörung anheim fallen, aber stets wird man finden, daß das Kerneiweiß bei weitem nicht in dem Maße zerfällt wie das Eiweiß des Zelleibes. Ein Vergleich des Gehaltes an Diaminosäuren und an Phosphor dürfte am besten Auskunft darüber geben, ob und inwieweit die beiden Faktoren miteinander Schritt halten.

Unsere nächste Aufgabe wird es nun sein, auch bei anderen destruktiven Prozessen der Leber obigen Untersuchungsmodus anzuwenden und dabei vielleicht noch, wie schon angedeutet, das Verhalten der Pentose zu berücksichtigen. Wir hoffen bald weiteres Material in dieser Frage beibringen zu können.

---

## Über gelatinöse anorganische Erdalkalisalze.<sup>1)</sup>

Von

**Carl Neuberg und Ernst Neimann.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts  
der Universität zu Berlin.)

(Eingegangen am 24. April 1906.)

Den gelatinösen und kolloidalen Substanzen wird augenblicklich eine besondere Beachtung geschenkt, die physikalische, die reine und die physiologische Chemie sind an denselben gleichmäßig interessiert. Die hier beschriebenen Verbindungen bilden eine Gruppe bisher unbekannter gelatinöser Substanzen.

Die Beobachtungen, die den Gegenstand der folgenden Mitteilung bilden, sind ursprünglich auf einem ganz anderen Gebiete als dem der anorganischen Chemie gemacht. Bekanntlich ist eine der elegantesten Methoden, Kohlehydrate aus komplizierten Substanzgemischen zu isolieren, das Benzoylierungsverfahren von Schotten-Baumann. Bei der mangelhaften Charakteristik der Ester ist man zumeist auf eine Regenerierung der zugrunde liegenden Kohlehydrate angewiesen. Die Verseifung der Benzoyl ester mit Mineralsäuren bleibt unvollständig<sup>2)</sup> oder zerstört die Zucker<sup>3)</sup>; in der Regel wird sie mit Natriumäthylat<sup>4)</sup> vorgenommen. Man befindet sich dann in der

---

<sup>1)</sup> Vorgetragen in der Sitzung der deutsch. chem. Ges. vom 11. Juli 1904. Siehe auch Chemikerzeitung 1905, S. 1044.

<sup>2)</sup> Wedenski, Ztschr. f. physiol. Chem. **13**, 126 (1888).

<sup>3)</sup> Neuberg und Heymann. Beitr. zur chem. Physiol.-Pathol. **2**, 206 (1902).

<sup>4)</sup> Kueny: Ztschr. f. physiol. Chem. **14**, 330 (1889).

Schwierigkeit, der man sich immer gegenüber sieht, wenn man Natriumsalze aus Lösungen zu entfernen hat.

Nachdem seit einiger Zeit wasserfreies Baryumoxyd zu einem billigen Preise in den Handel gebracht wird, hat der eine von uns (Neuberg) Versuche angestellt, die Versäufung der Benzoate mit methylalkoholischem Baryumoxyd auszuführen; sie verläuft in der Tat vielfach glatt und ermöglicht eine erhebliche Vereinfachung der Methode. Bei der Ausfällung überschüssigen Baryts aus derartigen methylalkoholischen Zuckerlösungen durch Kohlensäure resp. Schwefelsäure wurde zuerst ein Auftreten gelatinöser Baryumsalze beobachtet; anfangs wurde dieser Zustand auf die Gegenwart der Kohlehydrate geschoben, ist es doch bekannt, daß im Schutze kolloidaler oder auch hochmolekularer Medien sonst kristalloide Verbindungen Neigung zu Gelbbildung annehmen. Allein diese Vermutung erwies sich im vorliegenden Falle als unzutreffend, denn Versuche, die mit reinen methylalkoholischen Baryumoxydlösungen ausgeführt wurden, zeigten genau die gleichen Erscheinungen, die wegen ihrer Seltsamkeit eine etwas eingehendere Untersuchung erfuhren.

#### Gelatinöses Baryumsulfat.

Fügt man zu einer methylalkoholischen Barytlösung verdünnte wässrige (alkoholische ist nicht nötig!) Schwefelsäure, so scheidet sich ein opakes Gerinnsel ab, das schnell den Inhalt des Gefäßes in eine durchsichtige Gallerte verwandelt. Saugt man dieselbe ab und wäscht sie auf der Nutsche mit Methylalkohol schwefelsäurefrei, so bleibt die Verbindung im ursprünglichen rein gelatinösen Zustand zurück, der auch beim Trocknen im Vakuum und selbst beim Glühen bis zum gewissen Grade erhalten bleibt, indem nur die klare Durchsichtigkeit verloren geht; es hinterbleibt aber dabei das Baryumsulfat in größeren, sehr harten Stücken, die porzellanartig durchscheinend sind. Im Vakuum verliert die Substanz den mechanisch anhaftenden Methylalkohol und stellt nach der Analyse reines Baryumsulfat dar, obgleich es von dessen gewöhnlicher mikrokristallinischer Form erheblich abweicht. Erst durch sehr langes Kochen mit sehr viel Wasser gelingt die Umwandlung

in die gewöhnliche Form, die sich etwas schneller auf Zusatz von Salzsäure vollzieht.

Mit verdünnter methyl- oder äthylalkoholischer Schwefelsäure werden dieselben Resultate erhalten.

1. Analyse:  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

0,2914 g gegläute Substanz ergaben nach dem Aufschluß mit  $\text{K}_2\text{CO}_3 + \text{Na}_2\text{CO}_3$  und Fällung mit  $\text{BaCl}_2$ :

0,2903 g  $\text{BaSO}_4 = 99,62\%$  der Ausgangssubstanz.

2. Analyse: Ba.

0,2357 g gegläute Substanz ergaben nach dem Aufschließen mit Kaliumnatriumkarbonat etc. und Fällung mit Schwefelsäure:

0,2360 g  $\text{BaSO}_4 = 100,13\%$  des Ausgangsmaterials.

**Das gelatinöse Baryumphosphat.**

Färbt man die methylalkoholische Baryumoxydlösung mit Phenolphthalein und setzt wässrige Phosphorsäure bis zur genauen Entfärbung hinzu, so entsteht ein gelatinöser Niederschlag, der nach der Analyse das sekundäre Phosphat  $\text{BaHPO}_4$  darstellt (Präparat I). Auch diese Verbindung behält nach dem Absaugen den gelatinösen Zustand und wird beim Trocknen pulverig. Bei Fällung mit etwas überschüssiger Phosphorsäure entsteht gleichfalls das Salz  $\text{BaHPO}_4$  (Präparat II).

1. Analyse:

**I. Präparat.**

0,3822 g enthielten 0,2283 g Ba.

Ber. Ba 58,70 %.

Gef. „ 59,75 %.

Dieser Wert stimmt angenähert auf  $\text{BaHPO}_4$ .

**II. Präparat.**

0,2337 g enthielten 0,1367 g Ba.

Ber. Ba 58,70 %.

Gef. „ 58,50 %.

Diese Zahl stimmt genau auf  $\text{BaHPO}_4$ .



2. Analyse  $\text{PO}_4$ .0,1622 g ergaben 0,0780 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ .Ber.  $\text{PO}_4 = 40,70\%$ .Gef.  $\text{PO}_4 = 41,03\%$ .

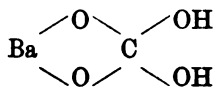
## Gelatinöses Baryumkarbonat.

Leitet man in Barytwasser Kohlensäure, so erzeugt die erste Gasblase bereits eine Ausfällung von Baryumkarbonat ( $\text{BaCO}_3$ ). Ganz anders verhält sich die methylalkoholische Baryumoxydlösung, bei der man vier deutlich verschiedene Zustände unterscheiden kann.

1. Läßt man selbst in eine gesättigte Lösung Kohlendioxyd einströmen, so bleibt die Flüssigkeit geraume Zeit klar; aufsteigende Blasen erzeugen schließlich an der Oberfläche gelatinöse Häutchen, die sich beim Umrühren jedoch vollständig klar wieder lösen.

2. Plötzlich erstarrt die Flüssigkeit unter deutlicher Erwärmung durch die ganze Masse zu einer Gallerte. Saugt man diese ab und wäscht mit Methylalkohol aus, so hinterbleibt die Verbindung im ursprünglichen rein gelatinösen Zustand und zeigt alkalische Reaktion.

3. Setzt man das Einleiten der Kohlensäure noch längere Zeit fort, so verwandelt sich die Gallerte langsam in ein weißes Pulver, daß sich gut absaugen und auswaschen läßt. Äußerlich gleicht es dem gewöhnlichen gefällten Baryumkarbonat ( $\text{BaCO}_3$ ), zeigt aber ein von diesem stark abweichendes Verhalten. Zunächst führt die Analyse nach mehrtägigem Trocknen im Vakuum über Phosphorpentoxyd und Paraffin zu der Formel:  $\text{BaCO}_3 + \text{H}_2\text{O}$ , die man vielleicht im Hinblick auf die eigentlichen Löslichkeitsverhältnisse in



(Monobaryumorthokarbonat?) auflösen kann.

## 1. Analyse: Ba.

0,2622 g Substanz enthielten 0,1668 g Ba.

Ber.:  $\text{BaCO}_3 + 1 \text{H}_2\text{O} \quad 63,72\%$ ,

Gef.: " + 1 " 63,62 "

2. Analyse:  $\text{CO}_2$ .0,2079 g Substanz ergaben 0,0432 g  $\text{CO}_2$ .Ber.:  $\text{CO}_2 = 20,43 \%$ ,

Gef.: „ = 20,78 „.

Die Verbindung ist im trockenen Zustande sehr beständig. Sie löst sich in bemerkenswerter Weise zum Unterschied vom gewöhnlichen Baryumkarbonat ( $\text{BaCO}_3$ ) in Wasser und zwar in viel weniger, als für das gewöhnliche Bikarbonat [ $\text{Ba}(\text{HCO}_3)_2$ ] erforderlich wäre.

Die Lösung in Wasser ist zunächst klar, trübt sich aber bald unter Abscheidung eines flockigen Niederschlages, dessen Zusammensetzung vorläufig nicht untersucht ist.

4. Sowohl das gelatinöse Baryumkarbonat (zweiter Zustand) wie sein Umwandlungsprodukt, das pulverige (dritter Zustand), haben die höchst auffallende und bemerkenswerte Eigenschaft, bei längerem Stehen unter Methylalkohol in Lösung zu gehen. Wenn die Substanzen abgesaugt und frisch oder getrocknet in dieses Lösungsmittel gebracht werden, so erfolgt, ebenso ohne weiteres beim Stehen der nicht filtrierten Niederschläge in der methylalkoholischen Mutterlauge, Lösung. Bei letzteren vollzieht sich dieselbe in einigen Tagen fast vollständig, wenn ursprünglich etwa zwei- bis dreiprozentige Lösungen von Baryumoxyd in Methylalkohol angewandt sind. Bei den zuvor abfiltrierten Niederschlägen dauert die Lösung etwas länger; sie erfolgt auch nicht ganz vollständig, indem ein kleiner Teil eines weißen Pulvers zurückbleibt, vielleicht an der Luft entstandenes, gewöhnliches Baryumkarbonat. Wie wir uns besonders überzeugt haben, ist auf die übliche Weise gefälltes Baryumkarbonat wie auch natürliches (Witherit) in Methylalkohol total unlöslich. Ähnlich verhält sich ein durch Ammonkarbonat aus der methylalkoholischen Baryumoxydlösung gefälltes Baryumkarbonat.

Die nicht filtrierte Lösung des gänzlich in Lösung gegangenen Baryumkarbonates oder die filtrierte des bis auf den erwähnten Rest gelösten zeigen das typische Aussehen kolloidaler Flüssigkeiten, d. h. sie sind durchsichtig in durchfallendem und milchig in auffallendem Licht. Die Lösungen enthalten neben Baryum Kohlensäure, denn sie brausen auf Zusatz von Salzsäure auf. Sie enthalten das Baryum in kolloidaler Form und

geben auf Zusatz von Schwefelsäure die früher beschriebene dicke Gallerte von Baryumsulfat, durch deren träge Masse sich fortwährend Kohlensäurebläschen drängen. Sie zeigen eine auffallend hohe Viskosität, obgleich ihr Gehalt an Baryum nur ein geringer ist und höchstens 3 % beträgt. Unter Abschluß von Feuchtigkeit läßt sich aus diesen Lösungen der Methylalkohol zum Teil abdestillieren, ohne daß der Kolloidcharakter gestört wird; man gelangt so zu vollkommen durchsichtigen ausgesprochenen Gallerten von der Konsistenz eines sehr dicken Kollodiums. Anfangs geben diese kolloidalen Baryumkarbonatlösungen Kohlensäure ab, es tritt beim Stehenlassen im geschlossenen Gefäß Druck auf; später ist dies nicht mehr der Fall, offenbar, nachdem ein gewisser Gehalt erreicht ist. Läßt man den Methylalkohol im Vakuum möglichst weit verdunsten, so hinterbleibt das Karbonat in Form zelluloidähnlicher, sich rollender Blättchen von hoher Durchsichtigkeit.

Um uns über die Zusammensetzung der methylalkoholischen Baryumkarbonatlösung zu orientieren, haben wir nach bekannten Methoden das Verhältnis von Baryum zu Kohlensäure bestimmt und gefunden, daß die Lösung mehr Kohlensäure enthält, als dem sauren Karbonat zukommen würde, wenn auch die Werte bei den Präparaten verschiedener Darstellung etwas schwanken. So wurde unter anderem das Verhältnis  $Ba : CO_2 = 1 : 4$  erhalten. Allem Anscheine nach liegt also ein Vertreter der bisher unbekanntem Polykarbonate des Baryums vor, vergleichbar den lange bekannten Polysilikaten, die bemerkenswerterweise ja auch zur Kolloidbildung neigen.

#### I. Methylalkoholische Baryumkarbonatlösung.

Analyse: Ba und  $CO_2$

5 ccm enthielten 0,0450 g Ba

5 ccm „ 0,0634 g  $CO_2$ .

Der gefundenen Menge Ba entsprechen, berechnet auf

$BaCO_3 + 1H_2O$ : 0,0144 g  $CO_2$

$$\text{Also: } \frac{0,0144}{0,0634} = \frac{1}{4}$$

## II. Methylalkoholische Baryumkarbonatlösung.

Analyse: Ba und CO<sub>2</sub>

5 ccm enthielten 0,0652 g Ba

5 ccm „ 0,0744 g CO<sub>2</sub>.

Der gefundenen Menge Ba entsprechen, berechnet auf

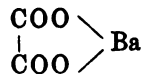
BaCO<sub>3</sub> + 1H<sub>2</sub>O: 0,0209 g CO<sub>2</sub>

$$\text{Also: } \frac{0,0209}{0,0744} = \frac{1}{3,6}.$$

Bezüglich der Analyse dieser kolloidalen Verbindungen — dasselbe gilt auch für die gewöhnlichen methylalkoholischen Baryumoxydlösungen — ist folgendes zu bemerken. Zur Bestimmung des Baryums müssen die zur Analyse bestimmten Flüssigkeitsmengen in einem Platingeß zunächst auf dem Wasserbade, schließlich durch schwaches Erwärmen über der Flamme möglichst vom Methylalkohol befreit werden, da auch auf Zusatz von viel Wasser zur methylalkoholischen Lösung der Kolloidcharakter insofern gewahrt bleibt, als auf Zusatz von Schwefelsäure mehr oder minder ausgeprägtes gelatinöses Baryumsulfat ausfällt. Auch Zusatz wässriger Salzsäure und gleichzeitiges Aufkochen beseitigt den Kolloidcharakter, eine Erscheinung, die damit zusammenhängt, daß nur die auch in der Norm unlöslichen anorganischen Sauerstoffsalze, nicht dagegen die löslichen und die halogenhaltigen bisher in gelatinösem Zustande erhalten sind.

Beim Verdünnen der methylalkoholischen Baryumkarbonatlösung mit dem gleichen Volumen Wasser wird der kolloidale Charakter nicht geändert. Beim Verdünnen mit viel destilliertem oder Leitungswasser erfolgt in der Regel gallertige Ausscheidung, die dem Aluminiumhydroxyd ähnelt.

## Das gelatinöse Baryumoxalat.



Wässrige Oxalsäure ruft in der methylalkoholischen Baryumoxydlösung einen ähnlichen Niederschlag hervor, wie er für das Sulfat angegeben ist; beim Trocknen verwandelt er sich in ein weißes Pulver.

1. Analyse: Ba.

0,4155 g Substanz enthielten 0,2561 g Ba

Ber. Ba 60,89 %

Gef. „ 61,63 %

2. Analyse: Oxalsäure.

0,2361 g Substanz ergaben titrimetrisch einen Gehalt von 0,0938 g Oxalsäure.

Ber. 39,93 % Oxalsäure

Gef. 39,74 % „

### Das methylalkoholische Baryumoxyd.

Gibt man zu der methylalkoholischen Baryumoxydlösung entweder ca. gleichviel Äthylalkohol und dann einige Tropfen Wasser, oder ein halb Volumen Wasser und dann etwas Äther, so entsteht ein grobkristallinischer Niederschlag, der in prächtigen Nadeln aus der Lösung ausfällt. Dieser Niederschlag zeigte nach kurzem Trocknen über Schwefelsäure die Zusammensetzung von  $\text{Ba}(\text{OH})_2 + 8 \text{H}_2\text{O}$ , wie das normale Hydrat. Bei etwas längerem Trocknen über Phosphorpentoxyd nahm der Wassergehalt ab und ging im Verlauf weniger Tage bis auf ein Molekül Wasser herunter, wobei Konstanz eintrat. Dieses Verhalten steht im Gegensatz zu dem des normalen Hydrates, das auch nach längerem Aufbewahren über Phosphorpentoxyd seinen Gehalt an 8 Molekülen Wasser bewahrt. Ferner besitzt das Oktohydrat möglicherweise andere Kristallform und löst sich zum Unterschied vom typischen Hydrat glatt in Methylalkohol. Läßt man methylalkoholische Baryumoxydlösung im Vakuumexsikkator langsam verdunsten, so hinterbleiben schöne, sternförmig gruppierte durchsichtige Nadeln, die das Methylat des Baryums darstellen.

### Baryummethylat.

Bei schneller Abscheidung bildet die Verbindung perlmuttartig glänzende cholesterinähnliche Plättchen, die von einigen wohlausgebildeten Nadeln durchsetzt sind. Die Analyse führt zur Formel  $\text{Ba}(\text{OCH}_3)_2$ .

0,2194 g Substanz: 0,2576 g BaSO<sub>4</sub>0,2535 g „ 0,1110 g CO<sub>2</sub> und 0,0737 g H<sub>2</sub>OBer. für Ba(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; Ba = 69,92; C = 12,04; H = 3,09 %.

Gef. Ba = 69,11; C = 11,94; H = 3,23 %.

Die Verbindung löst sich wieder unzersetzt und völlig klar in absolutem Methylalkohol, dem sie stark alkalische Reaktion erteilt; aus der Lösung in Methylalkohol fällt H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wieder gelatinöses BaSO<sub>4</sub>. In Äthylalkohol ist die Verbindung nur wenig, aber immerhin merklich löslich; die Flüssigkeit reagiert alkalisch und scheidet auf Zusatz von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gelatinöses Sulfat aus. In Äther und Aceton ist die Substanz gänzlich unlöslich, in Wasser löst sie sich zu einer fast klaren Flüssigkeit. Beim Erhitzen färbt sich die Substanz schwarz und es entweichen brennbare Dämpfe.

#### Das gelatinöse Baryumsulfoxyhydrat.

Fügt man zur methylalkoholischen Baryumoxydlösung äthylalkoholisches Kaliumsulfhydrat im Überschuß, so fällt eine gelatinöse Verbindung aus, die ihren Zustand aber beim Auswaschen ändert und ein feinkörniges Pulver liefert von der

Zusammensetzung BaS.H<sub>2</sub>O, vielleicht = Ba  $\begin{matrix} \text{SH} \\ \text{OH} \end{matrix}$

#### Analysen:

0,4145 g Substanz enthielten 0,3088 g Ba

0,2259 g „ 0,2773 g BaSO<sub>4</sub>0,2503 g „ 0,0244 g H<sub>2</sub>O

Ber. Ba 73,26 %, H = 1,07 %; S = 17,11 %.

Gef. „ 74,33 %, H = 1,08 %; S = 16,84 %.

Versucht man dieselbe Verbindung durch Anwendung von methylalkoholischem Kaliumsulfhydrat darzustellen, so fällt keine feste Verbindung aus. Diese Erscheinung war Veranlassung, das Verhalten des festen Sulfoxyhydrates zu reinem Methylalkohol zu untersuchen. Es löst sich in demselben genau wie das gelatinöse Karbonat bei mehrtägigem Stehen glatt auf zu einer Flüssigkeit, die den typischen

Charakter der kolloidalen Lösungen zeigt, d. h. sie ist klar in durchfallendem Licht und erscheint im reflektierten trübe. Aus dieser Lösung, die etwas nach Schwefelwasserstoff riecht, fällt wässrige Schwefelsäure unter Entbindung von Schwefelwasserstoff wieder gelatinöses Baryumsulfat.

Kurz bemerkt sei, daß u. a. auch Baryumsulfocyanat und -tannat in gelatinöser Form existieren.

Wenn sich durch weitere Untersuchungen herausstellt, daß die Lösungen des gelatinösen Baryumkarbonates und Sulfoxydhydrates den bisher bekannten wässrigen kolloidalen Zuständen analog sind, so hätte man hier den eigentümlichen Fall, daß Kolloide in einem Medium (Methylalkohol) sich bilden, das man bisher stets für einen Feind dieses Zustandes gehalten hat; man hätte dann von Hydrogelen Alkoholgele zu unterscheiden, wie man eine Alkoholyse neben der Hydrolyse kennt. Für diese Auffassung ist es gleichgültig, ob die gelatinösen Verbindungen, wie nicht ganz sicher bewiesen, in reiner Form wirklich frei von Methylalkohol sind, oder ob sie den Hydraten vergleichbare Alkoholate darstellen.

Kurz erwähnt sei noch, daß man auf ähnlichem Wege auch gelatinöse Kalzium-, Strontium- und Magnesium-Verbindungen bereiten kann und auch andere Substanzen, die bisher nur schwer oder nicht gelatinös erhältlich waren.

Zur Erzeugung des gelatinösen Zustandes bedarf es bei den Erdalkalisalzen keineswegs des Methylalkohols; auch mit gewöhnlichem Alkohol versetzte wässrige Lösungen des Hydroxyds und der löslichen Salze zeigen z. T. die gleichen Phänomene, wenn auch weniger deutlich, sodaß es eigentlich wunderbar ist, daß diese Erscheinungen bisher in der Literatur nicht beschrieben sind.

Die Beständigkeit dieser Klasse von gelatinösen Verbindungen und auch die Neigung zu ihrer Bildung nimmt allem Anschein nach vom Magnesium über Kalzium, Strontium, also mit steigendem Molekulargewicht, bis zum Baryum zu und ist bei letzterem am deutlichsten ausgeprägt. Es ist nicht undenkbar, daß dem in diese Reihe gehörendem noch höher molekularen Radium vielleicht in besonders ausgeprägtem Maße jene Eigenschaft zukommt. Da das gelatinöse Sulfat äußerst

voluminös ist, erscheint ein Versuch in dieser Richtung nicht ohne Aussicht.

Die kolloidalen Baryumsalze, insbesondere das lösliche Karbonat, haben ein pharmakologisches Interesse. Die Toxizität des letzteren ist ca. dreimal so gering wie die gewöhnlicher Baryumsalze, analog der Erfahrung, daß Substanzen im kolloidalen Zustande zumeist weniger giftig sind als im kristallinen.

---



# Über die Anteilnahme des elementaren Stickstoffes am Stoffwechsel der Tiere.

(Aus dem tierphysiologischen Institut der landwirtschaftlichen Hochschule in Berlin.)

Von

**Dr. phil. et med. Carl Oppenheimer,**  
Assistent am Institut.

*(Eingegangen am 11. Juni 1906.)*

## Vorläufige Mitteilung.

Die Frage, ob bei den Stoffumsetzungen der Tiere der gasförmige Stickstoff der Atmosphäre eine Rolle spielt, sei es, daß er in den Stoffwechsel hineinbezogen werden, oder umgekehrt sich aus zerfallenden Eiweißsubstanzen bilden könne, darf als eine der wichtigsten in der Physiologie des Stoffwechsels gelten, da alle Bilanzen darauf aufgebaut sind, daß eine solche Anteilnahme nicht stattfindet. Man hat deshalb schon sehr frühzeitig angefangen, sich mit diesem Problem experimentell zu beschäftigen. Obwohl seit Lavoisier eine große Anzahl von Arbeiten erschienen sind, kann die Frage noch nicht als restlos gelöst gelten, da immer wieder Einwände erhoben worden sind. Man hat nach zwei Verfahren gesucht, der Entscheidung näher zu kommen. Wenn man Einnahmen und Ausgaben an gebundenem Stickstoff genau berechnet, so müßte sich ein Zuwachs oder ein Defizit ergeben. Die andere Methode arbeitet mit dem Respirationsapparat und bestimmt den Gehalt der Atemluft an Stickstoff vor und nach dem Versuch direkt.

Mit der ersten Methode hat besonders Voit in einer Reihe von klassischen Arbeiten die Frage untersucht und ist zu der

Entscheidung gekommen, daß bei den von ihm untersuchten Tieren an eine Anteilnahme gasförmigen Stickstoffes nicht zu denken ist. Es sind aber gegen diese Ergebnisse besonders von Seegen und Nowak Einwände erhoben worden, die die Genauigkeit der Voitischen analytischen Methoden anzweifeln und im Stoffwechselversuch erhobene Resultate ihnen gegenüberstellen. Diese Einwände sind nun nicht unbegründet, die Voitischen Zahlen sind tatsächlich mit Fehlern behaftet. Indessen kann man diese Fehler zahlenmäßig in Rechnung stellen, und findet dann, daß trotzdem die Hauptergebnisse in ihrem entscheidendem Wert völlig unangetastet bleiben. Was dann an Beweismaterial noch fehlt, liefert der berühmte Versuch von Gruber, der an Hunden den absolut stringenten Beweis geführt hat, daß hier von einer Anteilnahme des elementaren Stickstoffes gar keine Rede sein kann. Nicht so absolut sicher läßt sich der Beweis an anderen Tieren führen. Hier sind die experimentellen Schwierigkeiten enorm groß. Immerhin aber ergibt eine genauere Durcharbeitung der Arbeiten von Henneberg, Stohmann, Maercker u. a., daß auch für die Wiederkäuer der Beweis so gut wie geführt ist. Beim Pferde, wo die groß angelegten Arbeiten von Wolff vorliegen, sind die Zahlen weniger sicher, vor allem, weil der Stickstoff des Schweißes nicht berücksichtigt worden ist. Am schlechtesten sind die Ergebnisse bisher beim Menschen, für den unter den zahllosen Stoffwechselversuchen nur wenige aufzufinden sind, bei denen in längeren Zeiträumen die Einfuhr und Ausfuhr an Stickstoff sich deckten. Es zeigen sich meist regelmäßige Schwankungen. Die Schwierigkeiten sind also hier bisher unüberwindbar gewesen.

Mit der Methode der direkten Messung der Atemgase im geschlossenen Respirationsapparat haben an einer großen Reihe von Tieren Regnault und Reiset die Stickstofffrage untersucht und kommen zu folgenden Resultaten: In den meisten Fällen finden sie eine nicht unbedeutende Ausscheidung von Stickstoff, in einer geringen Zahl dagegen auch eine Aufnahme. Irgendwelche sicheren Hinweise über die näheren Umstände, unter denen das eine oder das andere sich vorfindet, können sie nicht geben; ihre eigenen in hypothetischer Form aufgestellten Ideen halten einer strengen Kritik nicht stand.

Späterhin hat Reiset allein an einem viel geräumigeren Apparat die Frage an größeren Tieren geprüft und hat dabei in einigen Fällen ganz ungeheure Werte von Stickstoffausscheidung gefunden.

Bei dem glänzenden Ruf, dessen sich speziell Regnault mit Recht erfreute, wurden diese Resultate als sicherer Besitz angesehen. Da sie aber zum mindesten für den Hund in direktem Widerspruch mit den Voit-Gruberschen Ergebnissen standen, so klappte hier eine Lücke zwischen den beiden unvereinbaren Angaben. Seegen und Nowak, die mit unermüdlichem Eifer gegen Voit zu Felde zogen, haben die Mühe nicht gescheut, auch ihrerseits in mehreren großartig angelegten Arbeiten mit Hilfe eines neuen Respirationsapparates die Frage nochmals zu untersuchen. Sie finden nun regelmäßig Ausscheidung von Stickstoff, befinden sich also auch im Gegensatz zu Regnault und Reiset, die, wie gesagt, in einer Minderzahl von Fällen auch Aufnahme gefunden hatten. Ja noch mehr, sie finden in dieser Ausscheidung auffallende Regelmäßigkeiten, die eine Abhängigkeit dieser Größe von dem Gewicht des Tieres, seiner Spezies, und der Dauer des Versuches erkennen lassen.

Hier sind also mehrere unvereinbare Widersprüche, die es notwendig erscheinen lassen, die Frage nochmals aufzunehmen.

Wenn man die Arbeiten im Respirationsapparate einer eingehenden Kritik unterzieht, so gelingt es tatsächlich, eine ganze Reihe von Fehlerquellen aufzufinden, und zwar sowohl bei Regnault und Reiset, wie bei Seegen und Nowak. Neben einer Reihe von weniger wesentlichen Dingen, auf die ich in dieser vorläufigen Mitteilung gar nicht eingehen will, ist es vor allem die Frage der Temperaturmessung, die die wichtigste Fehlerquelle darstellt. Genaue Überlegungen, die durch meine eigenen gleich zu erwähnenden Experimente gestützt werden, zeigen, daß in allen früheren Versuchen eine richtige Bestimmung der wahren Durchschnittstemperatur in dem Kasten zum Schlusse des Versuches unmöglich gewesen ist, daß hier vielmehr Fehler von einer Größenordnung vorliegen müssen, die in der Tat imstande sind, die gefundenen Differenzen im Stickstoffgehalt zu erklären. Wenn nämlich die Temperatur am Schlusse

des Versuches zu niedrig abgelesen wird, so ergibt die Reduktion auf 0° und 760 mm ein zu hohes Volum und infolgedessen einen zu hohen Stickstoffgehalt. Umgekehrt natürlich einen zu niederen, wenn die Temperatur zu hoch abgelesen worden ist. Eine genauere Erwägung der Bedingungen, unter denen Regnault und Reiset einerseits, Seegen und Nowak andererseits gearbeitet haben, läßt nun zeigen, daß bei den Arbeiten der Franzosen beiden Möglichkeiten Raum gegeben war, es konnte bald eine zu hohe, bald eine zu niedrige Ablesung der Temperatur in Frage kommen, und so ist zu erklären, daß sie bald Zuwachs, bald Ausfall an Stickstoff gefunden haben. Dagegen ergibt eine Prüfung der Versuchsbedingungen von Seegen, daß er immer zu niedrig abgelesen haben muß, so daß er also immer einen größeren Gehalt an Stickstoff finden mußte. Bei Seegen kommt noch als zweiter wichtiger Einwand hinzu, daß seine Probeentnahme aus dem Kasten zwecks Analyse den Fehler hatte, daß sie notwendigerweise ein an Kohlensäure ärmeres, infolgedessen aber an Stickstoff reicheres Gas geben mußte, als dem Durchschnitt entsprach. Auch dies mußte natürlich eine Ausscheidung von Stickstoff vortäuschen. So hatten denn alle diese Arbeiten ihre Fehler, und es war nötig, an einem Apparat diese Versuche zu wiederholen, bei dem die Fehlerquellen nach Möglichkeit vermieden waren. Besonders mußte also nach dem Gesagten auf eine recht genaue Messung der wahren Durchschnittstemperatur geachtet werden. Die wesentlichsten Teile dieses neuen Apparates sind schon vor Jahren von Zuntz konstruiert worden, aber bisher nicht zur Benutzung gekommen. Ich habe den Apparat zusammengebaut und einige Verbesserungen angebracht. In seiner jetzigen Gestalt ist der Apparat von Zuntz in der Physiologischen Gesellschaft zu Berlin (12. V. 1905) demonstriert worden. Er besteht im wesentlichen aus folgenden Hauptbestandteilen: Der Atemraum ist ein ca. 160 Liter fassender starker Kasten, der mit Hilfe eines Deckels und Gummiverschlusses abgedichtet werden kann. Durch eine Pumpe wird die Luft im Kasten hin- und hergesaugt. Dabei passiert sie Ventile, die mit starker Kalilauge gefüllt sind, um die Kohlensäure zu absorbieren. Am Kasten findet sich ferner ein feines Manometer, sowie ein Thermobarometer, das in Form eines

langen Metallrohres den ganzen Kasten durchzieht und am einen Ende geschlossen ist, während das andere Ende ebenfalls mit einem empfindlichen Manometer verbunden ist. Diese von Zuntz erdachte Vorrichtung ist eigentlich das prinzipiell Wichtigste an dem Apparat, da sie eine der Wirklichkeit sehr nahe kommende Messung der wahren Durchschnittstemperatur im Kasten während und am Schlusse des Versuches gestattet und so den wesentlichsten Fehler aller bisherigen Arbeiten vermeiden läßt. Ganz anders wie bei allen vorhergehenden Versuchen ist auch die Zufuhr des Sauerstoffes, bei der nach vielen Bemühungen schließlich auf die Messung durch Gasuhren ganz verzichtet und anstatt dessen ein Glasgasometer verwendet wurde, in dem das Volum Sauerstoff durch Wägung des aus einem Druckgefäß nachfließenden Wassers sehr genau bestimmt werden konnte. Die genaueren Details aller dieser Vorrichtungen werde ich in meiner später erscheinenden ausführlichen Publikation geben.

In diesem Kasten wurde nun der Stickstoffgehalt aus den abgelesenen physikalischen Konstanten und den Analysen am Schlusse des Versuches ermittelt.

Eine Erwägung der Fehlergrenzen der Methodik ergab, daß im günstigen Falle man auf etwa 100 ccm Stickstoff nach beiden Seiten hin rechnen muß. Nur erheblich größere Ausschläge also könnte man als Beweise für eine Ausscheidung resp. Aufnahme von Stickstoff ansehen. Ich habe nun an diesem Apparat eine größere Reihe von Respirationsversuchen mit gesunden und diabetischen Hunden, sowie mit Kaninchen gemacht, und nur die Versuche, die gute analytische Werte lieferten, für die vorliegende Frage benutzt. Dabei ergab sich nur in einem Falle eine jeder Erklärung spottende, kolossale Abnahme des Stickstoffes, die sicherlich auf einem unbeachteten groben Versuchsfehler beruhen muß. Sonst aber geben meine Resultate nicht den geringsten Hinweis, daß der Stickstoff im Kasten sich irgendwie an den Stoffwechselforgängen des Tieres beteiligt. Die Differenzen, die sich etwa gleichmäßig im Sinne eines Zuwachses und eines Defizits verteilten, blieben meist unter 100, nur wenige gingen unwesentlich darüber hinaus. Besonders wichtig aber ist, daß ich unter den mannigfachsten Bedingungen Gelegenheit hatte zu konstatieren, daß die an dem

Thermometer im umgebenden Wasser abgelesene Temperatur sich von der wirklichen, mit Hilfe des Thermobarometers gefundenen so sehr unterscheiden kann, daß die erstere völlig falsche, die Resultate der früheren Autoren durchaus erklärende Werte ergeben kann. Nur unter bestimmten Umständen, wenn nämlich die Änderungen der Temperatur im Kasten und Arbeitsraum sehr geringfügig sind, kann man die Thermometerablesungen gelten lassen. Ganz besonders treten die Fehler hervor, wenn man die Versuche bei künstlich geänderter Temperatur vornimmt, es zeigen sich dabei Fehler, die mit Sicherheit in der durch die Überlegung geforderten Richtung liegen. Dadurch wird also das durch kritische Überlegung gewonnene Resultat, daß die früheren Versuche mit falschen Temperaturangaben gearbeitet haben, durch eigene Beobachtung bestätigt und ferner erwiesen, daß an eine irgendwie erhebliche, über die erwähnten Fehlergrenzen hinausgehende Anteilnahme des elementaren Stickstoffes an den metabolischen Vorgängen der untersuchten Tiere nicht fernerhin gedacht werden kann.

Wegen der Einzelresultate und aller Details muß ich auf die ausführliche Publikation verweisen, die aus äußeren Gründen sich noch einige Zeit hinziehen wird.

---

## Versuche über den chemischen Charakter des Befruchtungsvorgangs.

Von  
**Jacques Loeb.**

(From the Herzstein Research Laboratory of the University of California.)

(Eingegangen am 25. Juni 1906.)

### I. Einleitung.

Vor sieben Jahren gelang mir der Nachweis, daß es möglich ist, normale Larven aus den befruchteten Eiern von Seeigeln dadurch hervorzubringen, daß man diese Eier ca. 2 Stunden (bei einer Temperatur von etwa 18°) hypertonisch gemachtem Seewasser aussetzt. Die für diesen Zweck benutzte Lösung bestand aus ungefähr 50 ccm Seewasser + 8 bis 10 ccm einer 2½ N.-NaCl-Lösung. Das normale Seewasser hat eine Konzentration, die einer ½ bis ⅔ N.-NaCl-Lösung gleich ist. Die Seeigeleier, bei denen diese Versuche ausgeführt werden, entwickeln sich nicht zu Larven und furchen sich nicht ohne die erwähnte Behandlung mit hypertonischem Seewasser oder Befruchtung mit Samen. Die Fortsetzung dieser Versuche ergab, daß nicht nur die unbefruchteten Eier von Seeigeln, sondern auch von Repräsentanten anderer Tiergruppen, nämlich Mollusken und Anneliden, durch dieselbe vorübergehende Behandlung mit hypertonischem Seewasser zur Entwicklung bis zu schwimmenden Larven veranlaßt werden können. Ja, Bataillon hat durch dieselbe Methode selbst die Anfänge der Entwicklung bei den Eiern von Wirbeltieren, nämlich Fröschen und Petromyzon, erzielt.

Es war von vornherein klar, daß diese Versuche berufen sein würden, Aufklärung über das Wesen des Befruchtungsvorganges zu geben, da es ja aussichtslos schien, aus der Beschaffenheit des Spermatozoons eine solche Aufklärung zu erlangen. Allein es waren in der physiologischen Literatur — soweit ich sie kenne — keine Angaben vorhanden, welche uns erlaubten einen Schluß auf den Einfluß hypertonischer Lösungen zu ziehen. Es war zu vermuten, daß derartige Lösungen dem Ei Wasser entziehen, allein wie der Wasserverlust die Befruchtung veranlassen könne, war ein Rätsel. Wer meine ersten Abhandlungen über den Gegenstand liest, wird finden, daß ich schwankte, ob es sich um eine physikalische Wirkung (auf die Kolloide im Ei) handle, oder um eine chemische Wirkung, obwohl ich mich bald der letzteren Möglichkeit zuwendete. Erst im vorigen Jahr führte mich eine zu anderen Zwecken angestellte Versuchsreihe auf die Vermutung, daß die hypertonen Lösungen vielleicht Oxydationsvorgänge im Ei anregen oder beschleunigen. Ich hatte nämlich bei meinen Versuchen an Molluskeneiern (*Lottia gigantea*) stets beobachtet, daß die Eier, welche durch Behandlung mit hypertonischem Seewasser befruchtet werden können, durch den Samen von *Lottia* nicht befruchtet wurden<sup>1)</sup>. Die Eier waren offenbar „unreif“ und ich fand, daß sie auch nach tagelangem Liegen in normalem Seewasser nicht reiften. Sie konnten aber ziemlich rasch zur Reife gebracht werden, wenn man sie alkalisch gemachtem Seewasser (50 ccm Seewasser + 1 ccm N/10-KHO) aussetzte<sup>2)</sup>. Brachte man solche Eier nach etwa 4 Stunden (bei etwa 18° C.) in normales Seewasser zurück, so wurden sie auf Samenzusatz befruchtet. Das alkalische Seewasser hatte aber diese Wirkung nur in Gegenwart von freiem Sauerstoff. Vertreibt man den atmosphärischen Sauerstoff aus dem alkalischen Seewasser durch einen Strom von sorgfältig gewaschenem, reinem Wasserstoff, so reifen die Eier nicht. Das brachte mich auf die Vermutung, daß die Behandlung der Eier von *Lottia* mit hypertonischem Seewasser nicht nur ihre Entwicklung anrege, sondern sie auch außerdem zur Reife bringe. Die letztere Vermutung bestätigte

<sup>1)</sup> University of California Publications, Physiology vol. I, p. 7. 1903.

<sup>2)</sup> Daselbst, vol. III, p. 1. 1905.



sich, die mit hypertonischem Seewasser behandelten Eier konnten durch Samen befruchtet werden. Das ließ sich dadurch nachweisen, daß die durch künstliche Parthenogenese mit hypertonischem Seewasser und die durch Samenbefruchtung erzielten Larven von *Lottia* sich in bestimmter Weise unterscheiden; die durch Samenbefruchtung erzielten Larven schwimmen an der Oberfläche und leben lange, die durch hypertonisches Seewasser bis jetzt erzielten Larven schwimmen am Boden und gehen nach zwei Tagen zugrunde. Fügt man zu den mit hypertonischem Seewasser von *Lottia* behandelten Eiern Samen zu, so erhielt man Larven von der durch Befruchtung entstehenden Art. Das führte mich auf den Gedanken, zu untersuchen, ob nicht auch für die entwicklungsregenden Wirkungen des hypertonsischen Seewassers die Anwesenheit von atmosphärischem Sauerstoff in der hypertonischen Lösung absolute Vorbedingung sei. Diese Vermutung prüfte ich am Seeigelei und sie erwies sich als richtig. Wie ich bereits in einer kurzen Notiz <sup>1)</sup> mitteilte, findet die Entwicklungserregung im unbefruchteten Seeigelei nur dann statt, wenn das hypertonische Seewasser freien Sauerstoff enthält. Diese Versuche regten den Gedanken an, daß die wesentliche Seite in der Entwicklungserregung des Eis, sei es durch Samen, sei es durch künstliche Mittel, in einer Anregung resp. Beschleunigung von Oxydationsvorgängen bestehe. Ich habe diese Vermutung neuerdings weiter verfolgt und will die Ergebnisse hier mitteilen. Wo nicht das Gegenteil gesagt ist, wird es sich im folgenden um Versuche am Seeigelei (*Strongylocentrotus purpuratus*) handeln.

## II. Versuche am befruchteten Seeigelei.

### 1. Ohne freien Sauerstoff kann sich das befruchtete Seeigelei nicht furchen.

Vor zehn Jahren veröffentlichte ich die Beobachtung, daß, wenn man frisch befruchtete Seeigeleier in eine Engelmannsche Gaskammer bringt und in derselben die Luft durch reinen Wasserstoff ersetzt, kein Ei sich zu furchen imstande ist <sup>2)</sup>. Da es eine Zeitlang dauert, bis der Wasserstoffstrom alle Luft aus-

<sup>1)</sup> University of California Publications, Physiology, vol. III, p. 39. 1906.

<sup>2)</sup> Pflügers Archiv 62, 249. 1895.

getrieben hat, und da in dieser Periode das Ei Zeit hat, die Kernteilung und vielleicht auch eine Furchung auszuführen, muß man die Engelmanssche Kammer zunächst auf Eis stellen und dann zwei Stunden lang einen Wasserstoffstrom durchtreiben. Nimmt man dann die Engelmanssche Kammer vom Eis, so tritt keine Kernteilung und keine Zellteilung ein. Bringt man die Eier aber (nach nicht zu langem Verweilen in der Wasserstoffatmosphäre) in lufthaltiges Seewasser zurück, so furchen sie sich mit der der Temperatur entsprechenden Geschwindigkeit und absolut regelmäßig. Diese Versuche habe ich neuerdings wiederholt und bestätigt. Es folgt daraus, daß die Befruchtung durch das Spermatozoon nur dann zur Furchung führt, wenn freier Sauerstoff zugegen ist. Das führt auf die Vermutung, daß die durch die Befruchtung angeregten Prozesse wesentlich Oxydationsprozesse sind. In einem eben erschienenen Buche <sup>1)</sup> habe ich darauf hingewiesen, daß ein zweiter chemischer Prozeß unstreitig durch die Befruchtung eingeleitet wird, nämlich die Bildung von Nukleinverbindungen aus gewissen Bestandteilen des Protoplasmas. Da diese Umwandlung ebenfalls nur in der Gegenwart von freiem Sauerstoff stattfindet, so ist zu vermuten, daß Oxydationen direkt oder indirekt dieser Synthese von Nukleinverbindungen zugrunde liegen.

## 2. Eine Spur von Cyankalium hemmt die Furchung des befruchteten Seeigeleis.

Da, wie Schönbein, Claude Bernard, Geppert und andere gezeigt haben, die Autoxydation durch KCN gehemmt wird, so schien es wünschenswert zu versuchen, ob die Furchung des befruchteten Seeigeleies ebenfalls durch Zusatz von KCN zu Seewasser gehemmt wird. Es ist erstaunlich, wie wenig KCN für diesen Zweck nötig ist. Schon der Zusatz von  $\frac{1}{2}$  ccm einer  $\frac{1}{20}$  % KCN-Lösung hemmte die Furchung vollständig. Die Konzentration des Cyankaliums in einer solchen Lösung war also  $\frac{1}{2000}$  %! Setzt man aber etwas weniger Blausäure zu, so tritt eine Furchung ein, deren Verlauf um so mehr der normalen Geschwindigkeit sich nähert, je geringer die Menge des

<sup>1)</sup> Vorlesungen über die Dynamik der Lebenserscheinungen S. 98 u. 239. Leipzig 1906.

zugesetzten KCN ist. Zu je 50 ccm Seewasser wurden 0,1, 0,2, 0,3 und 0,4 ccm einer  $\frac{1}{20}$  % Lösung von KCN zugefügt, und in jede dieser Lösungen wurden Seeigeleier gebracht, welche 6 Minuten vorher durch Samen befruchtet worden waren. Nach 4 Stunden waren die Eier in der Lösung mit 0,2 ccm oder mehr  $\frac{1}{20}$  % KCN alle ungefurcht, die Eier in der Lösung mit nur 0,1 ccm  $\frac{1}{20}$  % KCN im Vierzellstadium, während die in normalem Seewasser gebliebenen Kontrolleier im Acht- bis Sechszellstadium waren. Am nächsten Morgen fanden sich ca.  $\frac{1}{10}$  % der Eier in der Lösung mit 0,4 ccm KCN im Zwei- bis Vierzellstadium, in der Lösung mit 0,3 ccm KCN etwa 10 % der Eier in den ersten Furchungsstadien (2—4 Zellen), in der Lösung mit 0,2 ccm waren die Resultate nur wenig besser, aber in der Lösung mit 0,1 ccm  $\frac{1}{20}$  % KCN waren fast alle Eier zu schwimmenden Larven entwickelt. Wir werden später sehen, daß der Zusatz von 0,5 bis 3 ccm  $\frac{1}{20}$  % KCN zu 50 ccm Seewasser die befruchteten Eier des Seeigels nicht dauernd schädigt, sondern nur die Entwicklung derselben hemmt. Bringt man dieselben in normales Seewasser zurück, so entwickeln sie sich, vorausgesetzt, daß sie nicht zu lange dem vergifteten Seewasser ausgesetzt blieben. Wir werden ferner zeigen, daß das KCN (wie der Sauerstoffmangel) nur die Bildung der Chromatinsubstanz aus Protoplasma und damit indirekt auch die Kern- und Zellteilung hemmt, während es andere Funktionen des Eies intakt läßt.

### 3. Das befruchtete Ei bildet mehr Säure als das unbefruchtete Ei.

Wenn es wahr ist, daß das Wesen der Befruchtung in einer Anregung resp. Beschleunigung von Oxydationsprozessen besteht, so muß sich eine Zunahme der Kohlensäurebildung im Seeigelei nach der Befruchtung nachweisen lassen. In einfacher, aber überzeugender Weise läßt sich der Versuch so ausführen. Gleiche Volumina von Eiern werden in Flaschen von etwa 300 ccm Volumen mit 50 ccm Seewasser gebracht. In der einen Partie wird Samen zugesetzt und die Flaschen werden dann luftdicht geschlossen. Nach etwa 15 bis 20 Stunden wird der Säuregehalt des Seewassers in beiden Flaschen titrimetrisch festgestellt. Das Seewasser in Pacific Grove gibt mit Phenol-

phthalein keine Rotfärbung (es unterscheidet sich darin vom Seewasser des atlantischen Ozeans in Woods Hole). Bestimmt man nun die Menge von KHO, welche man zusetzen muß, um mit Phenolphthalein Rotfärbung des Seewassers zu erzielen, so findet man, daß diese Menge größer ist für die befruchteten als die unbefruchteten Eier, und daß die Menge zunimmt mit der Zahl der sich entwickelnden Eier. So waren in einem Versuch, in welchem die Eier bei ungefähr 15° 17 Stunden lang in den verschlossenen Gefäßen geblieben waren, ca. 0,2 ccm N/10-KHO für die Erzielung der Rotfärbung des Seewassers bei den unbefruchteten Eiern nötig, während die befruchteten für den gleichen Zweck etwas über 0,4 ccm derselben Lauge erforderten. Kontrollversuche mit Seewasser allein und mit Seewasser, dem Spermatozoen in derselben Masse zugefügt waren, wie im Falle der befruchteten Eier, ergaben, daß 0,1 bis 0,2 ccm N/10-KHO zur Rotfärbung von 50 ccm Seewasser ausreichen. Es scheint also, daß auch die unbefruchteten Eier etwas Säure bilden und daß die Befruchtung die Säurebildung nur erheblich beschleunigt. Diese Versuche wurden vielfach wiederholt und variiert, ergaben aber stets dasselbe Resultat. In einer Versuchsreihe wurden die Eier von vornherein in alkalisch gemachtes Seewasser (50 ccm Seewasser + 0,5 ccm N/10-KHO) gebracht und dann nachher durch Säurezusatz der übrig gebliebene Alkaligehalt festgestellt. Wie ich schon früher zeigte, regt derartig alkalisch gemachtes Seewasser die ersten Furchungsvorgänge bei unbefruchteten Seeigeleiern an; aber zu einer über die erste Furchung hinausgehenden Entwicklung kommt es nicht. Auch bei diesem Versuche fällt der Unterschied im Verhalten der befruchteten und unbefruchteten Eier in demselben Sinne aus, wie bei der früher erwähnten Versuchsanordnung.

Daß die befruchteten Eier des Seeigels CO<sub>2</sub> abgeben, ist schon von Lyon gezeigt worden. Es ist ferner eine allgemeine Tatsache, daß bei der Entwicklung von Eiern wie von keimenden Pflanzensamen CO<sub>2</sub> gebildet wird. Es ist deshalb zu vermuten, daß die in diesen Versuchen gefundene Säurebildung ganz oder zum Teil in der Abgabe von CO<sub>2</sub> durch das Ei besteht.

### III. Die Rolle des Sauerstoffs und der Oxydationen bei der künstlichen Parthenogenese.

#### 1. Der Vorgang der Entwicklungserregung beim Seeigeelei setzt sich aus zwei verschiedenen Prozessen zusammen<sup>1)</sup>.

Wir können nicht direkt entscheiden, wie das Spermatozoon die Entwicklung des Eies bewirkt, und diese Lücke muß in der Weise ausgefüllt werden, daß wir versuchen, den Vorgang der Befruchtung in allen Details durch uns bekannte physikalische oder chemische Agentien nachzumachen. Dieser Versuch ist für das Seeigeelei gelungen und hat ergeben, daß der Vorgang der Entwicklungserregung sich aus zwei verschiedenen Eingriffen zusammensetzt. Der eine Eingriff ist die Membranbildung des Eies, welche erfolgt, sobald das Spermatozoon in das Seeigeelei eingedrungen ist. Es scheint, daß dieser Vorgang in einer Sekretion von Flüssigkeit von seiten des Eies besteht, wodurch die Oberflächenlamelle des letzteren abgehoben wird. Der Vorgang ist vielleicht äußerlich vergleichbar dem Vorgang der Abhebung der Epidermis durch einen Flüssigkeitserguß bei oberflächlicher Verbrennung der Haut. Dieser Sekretionsvorgang oder die Membranbildung kann künstlich beim unbefruchteten Ei durch verschiedene Mittel eingeleitet werden, am besten dadurch, daß man die Eier etwa 1½ bis 2 Minuten (bei 15 ° C.) in 50 ccm Seewasser bringt, dem man etwa 3 ccm einer N/10-Lösung einer einbasischen Fettsäure, z. B. Buttersäure zusetzt. Wenn man die Eier dann herausnimmt, so bilden sie alle Membranen, die ebenso vollkommen sind, wie die von befruchteten Eiern gebildeten.

Wenn man solche Eier dann weiter beobachtet, so findet man, daß der Kern anfängt, sich zu teilen und daß auch oft eine oder mehrere Zellteilungen eintreten; aber das Ei entwickelt sich nicht zu einer Larve, sondern zerfällt und ist in weniger als 24 Stunden abgestorben. Der Vorgang der Membranbildung hat also zwei Wirkungen: erstens die Zellteilungsvorgänge oder richtiger die Synthese von Nukleinverbindungen in den Gang

---

<sup>1)</sup> Ich habe eine kurze Darlegung der Methoden der künstlichen Parthenogenese in meinen „Vorlesungen über die Dynamik der Lebenserscheinungen“, Leipzig 1906, gegeben.

zu setzen, und zweitens das Ei zu töten; denn das unbefruchtete Ei kann eine Reihe von Tagen am Leben bleiben, wenn man die künstliche Membranbildung in demselben nicht anregt.

Setzt man aber Eier, in welchen man die künstliche Membranbildung hervorgebracht hat, hinterher (bei 16° C.) etwa 30 bis 50 Minuten lang hypertonischem Seewasser (50 ccm Seewasser + 8 ccm 2 $\frac{1}{2}$  N.-NaCl.) aus, so entwickeln sich alle oder die meisten dieser Eier zu schwimmenden Larven. Ein gewisser, oft recht großer Prozentsatz dieser Eier furcht sich völlig regelmäßig und entwickelt sich zu normalen Larven. In der Art der Furchung und dem Verhalten und Aussehen der Larven ist die Entwicklung dieser Eier nicht zu unterscheiden von der durch Samen bewirkten Furchung und Entwicklung. Ein Teil der Eier aber furcht sich nicht so regelmäßig und man findet, daß die Furchung um so unregelmäßiger wird, je länger die Eier dem hypertonsischen Seewasser ausgesetzt bleiben. Es handelt sich hier um eine toxische Nebenwirkung des hypertonsischen Seewassers, die dadurch nahezu vollständig oder doch wenigstens in hohem Grade vermieden werden kann, daß man die Eier früh genug aus der hypertonsischen Lösung nimmt. Diese Behandlung der Eier mit hypertonischem Seewasser für die kurze Dauer von etwa 40 Minuten genügt nicht zur Entwicklungserregung, wie Kontrollversuche an Seeigeleiern, die nicht zur Membranbildung veranlaßt worden waren, zeigen. Die kurze Behandlung der Eier mit hypertonischem Seewasser nach voraufgegangener Membranbildung dient vielmehr dazu, die fehlerhaften chemischen oder sonstigen Prozesse in solchen Eiern in die richtigen Bahnen zu lenken.

Daß nun auch bei der Befruchtung durch Samen die Membranbildung ein besonderer Prozeß ist, der in seiner Wirkung der künstlichen Membranbildung durch eine einbasische Fettsäure vergleichbar ist, wird durch Beobachtungen, welche Herr Dr. H. Kupelwieser neuerdings in meinem Laboratorium ausgeführt hat, sichergestellt. Ich hatte schon vor 3 Jahren beobachtet, daß man bei Seeigeleiern die Membranbildung durch Annelidensamen (*Ophelia*) hervorrufen kann. Diese Eier entwickelten sich nicht. Herr Dr. Kupelwieser hat nun gefunden, daß, wenn man den Samen von Seeigeln, Seesternen, ja von Mollusken durch Hitze zum Gerinnen bringt und filtriert,

das klare Filtrat die Membranbildung beim unbefruchteten Seeigeleier hervorruft. Seeigeleier, welche auf diese Weise zur Membranbildung gezwungen werden, verhalten sich ganz genau so, wie die Seeigeleier, bei denen eine Membranbildung durch Buttersäure hervorgerufen wird. Die Kernteilung (Spindelbildung) beginnt, die Eier gehen aber dann im Laufe der nächsten 24 Stunden zugrunde. Behandelt man sie jedoch nach der Membranbildung etwa 40 Minuten lang mit hypertonischem Seewasser<sup>1)</sup>, so entwickeln sie sich zu normalen Larven, in genau derselben Weise wie die Eier, deren Membranbildung durch eine einbasische Fettsäure veranlaßt war. Welcher Stoff im Spermatozoenextrakt die Membranbildung verursacht, ist noch nicht untersucht worden, allein es ist nicht wahrscheinlich, daß es sich um eine Säure handelt. Mit Hilfe dieser Daten ist es nun möglich, die Rolle des Sauerstoffs bei der Entwicklungserregung etwas genauer zu untersuchen.

## 2. Der Vorgang der Membranbildung wird durch geringe Dosen von KCN nicht verhindert.

Wir haben erwähnt, daß schon der Zusatz von  $\frac{1}{2}$  ccm  $\frac{1}{20}$  % KCN zu 50 ccm Seewasser genügt, um die Entwicklung frisch befruchteter Eier völlig zu unterdrücken. Setzt man aber 1, 2 oder selbst 3 ccm KCN zu 50 ccm Seewasser zu, so findet in solchem Seewasser doch noch die Membranbildung auf Zusatz von Samen statt. Auch die künstliche Membranbildung durch Buttersäure wird durch einen solchen Zusatz von KCN nicht gehemmt. Ich glaubte anfangs, daß das vielleicht daher rühre, daß das KCN nicht rasch genug in das Ei eindringe. Ich ließ daher Eier bei 15° C. eine Reihe von Stunden — bis zu 24 Stunden lang — in einer Mischung von 50 ccm Seewasser + 2 ccm  $\frac{1}{20}$  % KCN und fügte dann Samen zu. Die Eier bildeten in dem cyankaliumhaltigen Seewasser doch sofort eine vollkommene Befruchtungsmembran. Es ist also damit erwiesen, daß der Akt der Membranbildung durch solche Mengen von Cyankalium, welche ausreichen, die Furchung absolut zu unterdrücken, nicht gehemmt wird. Wir dürfen daraus schließen,

<sup>1)</sup> Im folgenden wird unter hypertonischem Seewasser die Mischung von 50 ccm Seewasser + 8 ccm  $2\frac{1}{2}$  N.-NaCl verstanden, wenn nicht das Gegenteil ausdrücklich bemerkt ist.

daß der Akt der Membranbildung (oder die der Membranbildung zugrunde liegenden Sekretion) entweder keinen freien Sauerstoff oder weniger Sauerstoff und Oxydationen erfordert, als der Akt der Furchung, oder die chemischen Vorgänge, welche der Furchung zugrunde liegen. Das ist auffallend angesichts der Tatsache, daß die Membranbildung die Entwicklung, also energische Oxydationsvorgänge, einleitet. Es ist aber möglich, daß die Sekretion, welche der Membranbildung zugrunde liegt, Stoffe aus dem Ei entfernt, welche diese Oxydationen zu hemmen imstande sind<sup>1)</sup>.

3. Durch die Membranbildung allein werden Oxydationsprozesse im Ei hervorgerufen oder beschleunigt, welche zum raschen Zerfall und Tod des Eies führen.

Wir haben bereits erwähnt, daß die künstliche Membranbildung im Ei zunächst die der Furchung zugrunde liegenden Kernveränderungen hervorruft. Eine Spindel wird gebildet und es mag auch eine Zellteilung erfolgen, aber dann setzt meist der rasche Zerfall und Tod des Eies ein. Daß die Bildung der Spindel nur in Gegenwart von Sauerstoff möglich ist und durch Sauerstoffmangel und Zusatz von KCN verhindert wird, haben wir bereits für das befruchtete Ei erwähnt. Ich habe mich nun durch Versuche überzeugt, daß dieselben Agentien, nämlich eine Wasserstoffatmosphäre<sup>2)</sup> oder Zusatz von 1 ccm  $\frac{1}{20}$  % KCN zu 50 ccm Seewasser die Bildung der Spindel auch bei der künstlichen Membranbildung hindern. Es stellte sich aber weiter auch die höchst überraschende Tatsache heraus, daß in einer Wasserstoffatmosphäre oder bei dem Zusatz der erwähnten geringen Menge von KCN der Zerfall und Tod des Eies nach der künstlichen Membranbildung ausbleiben. Wenn man nach 24 Stunden oder später die Eier untersucht, welche nach der Bildung der Membran durch eine Fettsäure in cyankaliumhaltiges Seewasser gebracht wurden und dort verblieben, so wird man finden, daß sie genau so aussehen, wie zur Zeit als sie in die Lösung gebracht wurden; während die Eier derselben Serie,

<sup>1)</sup> Siehe Dynamik der Lebenserscheinungen S. 252.

<sup>2)</sup> University of California Publications, Physiology vol. III, p. 33. 1906.



welche in gewöhnliches Seewasser gebracht wurden, alle zerfallen und tot sind.

Daß in der Tat die Bildung der künstlichen Membran die Oxydationsvorgänge im Ei anregt resp. beschleunigt, ist schon aus dem Gesagten ersichtlich. Man kann es aber noch direkt durch die früher erwähnte Titration des Seewassers feststellen. Ich habe nur zwei derartige Bestimmungen ausgeführt, die in der Tat das Gesagte stützen, wenn auch die Säurebildung geringer war als bei den mit Samen befruchteten Eiern.

Man gewinnt den Eindruck, daß infolge der Membranbildung die Oxydationsvorgänge, welche zur Synthese der Chromatinsubstanz führen, angeregt werden, daß aber die Oxydationsvorgänge oder von diesen abhängende Vorgänge in fehlerhaften Bahnen verlaufen, wodurch das Ei zerfällt oder abstirbt. Hemmt man die Oxydationen durch Sauerstoffmangel oder Zusatz von Cyankalium, so treten jene fehlerhaften Prozesse nicht ein und das Ei bleibt am Leben.

Ich habe schon vor Jahren einen Fall beobachtet, in dem Sauerstoffmangel und Cyankalium das Leben eines Eies retteten<sup>1)</sup>. Es handelte sich um das Seesternei. Sobald das Ei dieser Tiere ins Seewasser gerät, erfolgt (zur geeigneten Jahreszeit) die Reifung des Eies, die sich in wenigen Stunden vollzieht. Dieser Reifungsvorgang ist, wie ich vermute, ebenfalls ein Oxydationsprozeß, oder von einem solchen abhängig, da Zusatz von KCN die Reifung hemmt. Wenn nun solche Eier reifen, ohne hinterher befruchtet oder sonstwie zur Entwicklung veranlaßt zu werden, so sterben sie in wenigen Stunden ab; während sie tagelang am Leben bleiben, wenn man ihnen den Sauerstoff entzieht oder dem Seewasser Cyankalium zusetzt. Man kann auch hier sagen, daß die im reifen aber unbefruchteten oder nicht zur Entwicklung angeregten Ei verlaufenden Oxydationsvorgänge den raschen Tod des Eies herbeiführen. In beiden Fällen wird das Ei in einen Anaëroben in sofern verwandelt, als nun der Sauerstoff für dasselbe giftig ist.

---

<sup>1)</sup> Loeb und Lewis, Am. Journ. of Physiology vol. VI, p. 305. 1902 und Loeb, Pflügers Archiv, 93, 59. 1902.

4. Die Behandlung des Seeigeleies mit hypertonischem Seewasser nach der künstlichen Membranbildung leitet die Vorgänge im Ei in richtige Bahnen, aber nur in Gegenwart von freiem Sauerstoff.

Wenn man die Eier, in denen man eine künstliche Membranbildung hervorgerufen hat, hinterher etwa 40 Minuten bei geeigneter Temperatur in hypertonisches Seewasser bringt, so entwickeln sie sich alle, und bei einer relativ großen Zahl derselben ist die Entwicklung völlig normal. Es macht nicht viel Unterschied, wie bald nach der Membranbildung die Eier in das hypertonische Seewasser gebracht werden, wenn man nicht zu lange wartet. Ich habe selbst noch Erfolg gesehen, wenn die Eier erst in die hypertonische Lösung gebracht wurden, nachdem sich schon die Spindel gebildet hatte und der Zerfall schon anfang. Natürlich ist der Erfolg erheblich besser, wenn man die Eier schon nach etwa 10 Minuten in das hypertonische Seewasser bringt.

Daß nun in der Tat das hypertonische Seewasser chemisch und nicht physikalisch auf das Ei wirkt, wird, wie ich schon mitgeteilt habe<sup>1)</sup>, durch Messung des Temperaturkoeffizienten klar. Wie erwähnt, muß man die Eier eine bestimmte Zeit im hypertonischen Seewasser lassen, um den Zerfall der Eier zu verhindern und eine Entwicklung derselben zu Larven zu veranlassen. Diese Zeit ist eine Funktion der Temperatur und durch Erhöhung der Temperatur um etwa 10° C. wird die nötige Expositionszeit auf etwa  $\frac{1}{3}$  reduziert. Einen Temperaturkoeffizienten von  $\geq 3$  finden wir aber nur bei chemischen Reaktionen.

Die chemischen Reaktionen, um die es sich hier handelt, sind, wie es scheint, an Oxydationen geknüpft; denn wenn man die Eier in hypertonisches Seewasser bringt, dessen freien Sauerstoff man vorher durch einen Wasserstoffstrom ausgetrieben hat, so benehmen sich die Eier genau so, wie wenn sie nicht in hypertonischem Seewasser gewesen wären. Diese Versuche sind aber technisch schwierig, weil mit den Eiern immer etwas Luft in die hypertonische Lösung gebracht wird. Man könnte

<sup>1)</sup> University of California Publications, Physiology, vol. III. p. 39. 1906.

nun diese Schwierigkeit umgehen, allein ich hielt es für viel bequemer statt dessen die Versuche in hypertonischem Seewasser anzustellen, dem man etwas Cyankalium zusetzt.

Bei den Eiern eines Weibchens wurde künstliche Membranbildung mittels Buttersäure hervorgerufen und zehn Minuten später wurden die Eier in zwei Gefäße mit hypertonischem Seewasser (50 ccm Seewasser + 8 ccm  $2\frac{1}{2}$  N.-NaCl) übertragen. Dem einen dieser Gefäße war 2 ccm  $\frac{1}{20}$  ‰ KCN zugesetzt worden. Die Temperatur war  $18^{\circ}$  C. Nach bestimmten Intervallen wurde eine Partie Eier aus jedem der beiden Gefäße in normales Seewasser zurückgebracht. Am nächsten Morgen fand sich das folgende Ergebnis. Die nach 30 Minuten aus dem hypertonschen Seewasser in normales Seewasser übertragenen Eier waren meist zerfallen, ganz wie die Eier, welche nach der Membranbildung nicht mit hypertonischem Seewasser behandelt worden waren. Nur etwa 2 ‰ der Eier hatten sich zu Blastulae entwickelt, die völlig normal waren. Von den nach 40 Minuten aus dem hypertonschen Seewasser genommenen Eiern hatten sich etwa 50 ‰ entwickelt, meist zu normalen Blastulen. Die nach 50 Minuten herausgenommenen hatten etwa ebensoviele Larven, aber eine größere Zahl der Larven sah nicht normal aus. Eier, die 135 Minuten im hypertonschen Seewasser gewesen waren, hatten sich in großer Zahl zu entwickeln angefangen, aber sie gingen in frühen Stadien zugrunde. In solchen überexponierten Eiern sind, wie ich schon früher gezeigt habe, die ersten Furchungsvorgänge schon abnorm und solche Eier sterben, je nach der relativen Dauer der Überexposition, rasch ab. Eier, die noch länger, nämlich 195, 285 und 335 Minuten dem hypertonschen Seewasser ausgesetzt gewesen waren, hatten in noch höherem Grade gelitten, und viele dieser Eier gingen sofort nach dem Übertragen in normales Seewasser an schwarzer Cytolyse<sup>1)</sup> zugrunde.

Die Eier dagegen, die gleichzeitig aus dem cyankaliumhaltigen hypertonschen Seewasser übertragen worden waren, gingen alle in wenigen Stunden nach der Herausnahme zugrunde, und zwar in derselben Weise, wie die dauernd in normalem Seewasser gebliebenen Eier. Erst unter den Eiern, die

<sup>1)</sup> University of California Publications, vol. III, p. 49. 1906.

nach 8 und 22 Stunden aus dem cyankaliumhaltigen hypertonen Seewasser genommen wurden, entwickelten sich ein paar Eier zu Larven.

Dieser Versuch wurde mit ungefähr demselben Erfolg zehnmal wiederholt. Meist verhinderte der Zusatz von Cyankalium zum hypertonen Seewasser dessen Wirkung absolut, in anderen Fällen nahezu vollständig. Für die Wiederholung dieser Versuche wird es beachtenswert sein, daß das Cyankalium mit dem hypertonen Seewasser gründlich gemischt sein muß, ehe die Eier hineingebracht werden dürfen.

Diese Versuche lassen aber das Bedenken aufkommen, daß vielleicht das Cyankalium die Eier getötet oder wenigstens entwicklungsunfähig gemacht habe. Dieses Bedenken wird durch die folgenden Versuche beseitigt.

Die Eier eines Weibchens wurden nach künstlicher Membranbildung (mittels Buttersäurebehandlung) in zwei Gefäße mit je 50 ccm hypertonischem Seewasser gebracht. Dem einen Gefäß wurde 2 ccm  $\frac{1}{20}$  % KCN zugesetzt. Je eine Portion Eier wurde in Intervallen von 10 Minuten aus dem hypertonen Seewasser in normales Seewasser übertragen. Das Ergebnis war folgendes.

Von den früher als nach 35 Minuten aus dem hypertonen in normales Seewasser übertragenen Eiern entwickelte sich nichts, von den nach 35 Minuten in normales Seewasser übertragenen Eiern entwickelten sich etwa 5 % zu guten Larven, von den nach 45 Minuten übertragenen entwickelten sich fast alle, und zwar meist zu normalen Larven. Von den nach 55 Minuten übertragenen waren fast alle entwickelt, aber nur 20 % bildeten normale Larven; die noch länger in dem hypertonen Seewasser gewesenen Eier lieferten mit zunehmender Expositionsdauer schlechter werdende Resultate.

Von den Eiern, die gleichzeitig in dem cyankaliumhaltigen Seewasser gewesen waren, entwickelte sich kein einziges nach dem Übertragen in normales Seewasser. Die Eier gingen vielmehr rasch in derselben Weise zugrunde, wie die Eier, welche nach der künstlichen Membranbildung in normalem Seewasser bleiben. Von den Eiern, die nach 55 Minuten aus dem cyankaliumhaltigen Seewasser genommen worden waren, wurde der größere Teil in hypertones Seewasser ohne Cyankalium gebracht.

Nach 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten wurde je eine Partie dieser Eier in normales Seewasser übertragen. Von den nach 40 Minuten aus dem hypertonen Seewasser genommenen Eiern entwickelten sich etwa 5%, von den nach 50 Minuten herausgenommenen etwa 30%, und die nach 60 Minuten herausgenommenen entwickelten sich so gut wie alle, wenn auch ein Teil derselben sich abnorm furchte — also bereits die Effekte der Überexposition zeigte. Dieser Versuch, der mit demselben Erfolg mehrfach wiederholt wurde, zeigt, daß die hypertone Lösung in Gegenwart der geringen Menge Cyankalium unwirksam bleibt, daß aber die Eier, in so kurzer Zeit wenigstens, nicht geschädigt werden.

Da nun, wie ich in einer früheren Mitteilung gezeigt habe<sup>1)</sup>, Sauerstoffmangel ebenso wirkt, so folgt daraus, daß das hypertone Seewasser seinen Einfluß auf die Entwicklung der Eier nur im Zusammenhang mit Oxydationsvorgängen äußert. Vermutungsweise kann erwähnt werden, daß das Ei im hypertonen Seewasser gewisse Stoffe bildet, welche die durch die Membranbildung angeregten oder beschleunigten Oxydationsprozesse wieder in die richtigen Bahnen lenkt, und daß diese Stoffe selbst nur in der Gegenwart von freiem Sauerstoff entstehen können.

5. Hypertones Seewasser bringt die unbefruchteten Seeigelleier, welche keine Membran besitzen, ebenfalls nur dann zur Entwicklung, wenn freier Sauerstoff zugegen ist.

Die Methode der künstlichen Parthenogenese, welche ich in meinen ersten Arbeiten benutzte, bestand darin, daß unbefruchtete Seeigelleier direkt (ohne vorausgehende Membranbildung) in hypertones Seewasser gebracht wurden. In dem Falle aber war es nötig, die Eier erheblich länger in der hypertonen Lösung zu lassen, als in dem vorhin beschriebenen Versuche an Eiern mit Membran, nämlich etwa 2 bis 3 Stunden bei einer Temperatur von 18° oder etwas darüber. Hierbei findet keine Membranbildung statt und auch in anderer Hinsicht unterscheidet sich die Entwicklung solcher Eier etwas

---

<sup>1)</sup> University of California Publications, vol. III, p. 33. 1906.

von der durch Befruchtung hervorgerufenen, worauf wir aber hier nicht näher eingehen wollen. (Es sei nur in Parenthese erwähnt, daß die neue Methode der künstlichen Parthenogenese eine nahezu vollkommene Nachahmung des natürlichen Befruchtungsvorgangs ist.)

Es läßt sich nun noch viel besser zeigen, als das bei den bis jetzt diskutierten Versuchen der Fall war, daß das hypertontische Seewasser nur dann beim unbefruchteten, membranlosen Seeigeli die Entwicklung anzuregen vermag, wenn das Seewasser freien Sauerstoff enthält und wenn die Oxydationen im Ei stattfinden können.

Unbefruchtete Eier wurden in fünf Flaschen mit je 50 ccm hypertontischen Seewassers verteilt. Eine Flasche bleibt offen, d. h. der Luft ausgesetzt stehen, die andern, aus denen durch eine zwei Stunden lange Wasserstoffdurchströmung alle Luft verdrängt war, bleiben dem Wasserstoffstrom auch ferner ausgesetzt. Nach 2, 3, 4 $\frac{1}{2}$  und 5 $\frac{1}{2}$  Stunden wurde je eine Flasche vom Wasserstoffapparat getrennt und die darin enthaltenen Eier wurden in normales lufthaltiges Seewasser übertragen. Die Eier waren völlig unverändert und furchten und entwickelten sich nicht. Daß sie nicht bloß dem Aussehen nach, sondern auch in Wirklichkeit unverändert waren, ging daraus hervor, daß sie sich auf Samenzusatz alle normal furchten und entwickelten. Gleichzeitig wurde je eine Probe von Eiern aus dem lufthaltigen hypertontischen Seewasser in normales Seewasser übertragen. Die nach 2 Stunden in normales Seewasser übertragenen Eier entwickelten sich in großer Zahl in normale Blastulae, von den nach 3 Stunden übertragenen entwickelten sich nur wenige (ca. 1%), von den später übertragenen entwickelten sich keine, sondern alle zerfielen (schwarze Cytolyse).

Als zweiter Versuch sei der folgende erwähnt. Normale unbefruchtete Eier ohne Membran wurden in eine Reihe von Flaschen mit hypertontischem Seewasser verteilt. Eine dieser Flaschen blieb offen stehen, in Berührung mit Luft und die übrigen Flaschen wurden mit einem Wasserstoffentwicklungsapparat verbunden. Vor Beginn des Versuchs war aus den letzteren Flaschen alle Luft durch einen Wasserstoffstrom ausgetrieben worden. Nach 2, 3, 4 und 5 Stunden wurde je eine Flasche vom Wasserstoffapparat getrennt. Ein Teil der in der

Flasche enthaltenen Eier wurde sofort in normales Seewasser übertragen. Keins dieser Eier furchte und entwickelte sich. Sie waren intakt und auf Zusatz von Samen furchten sie sich in normaler Weise. Der andere Teil der Eier blieb 1 resp. 2 Stunden lang in dem hypertonen Seewasser, das aber nunmehr der Luft ausgesetzt wurde. Die Eier, welche 3 Stunden in dem hypertonen Seewasser ohne Sauerstoff und 1 Stunde in demselben hypertonen Seewasser mit Sauerstoff gewesen waren, entwickelten sich der Mehrzahl nach zu schwimmenden Blastulen. Das hypertone Seewasser ohne Sauerstoff bleibt unwirksam, das mit Sauerstoff regt die Entwicklung an.

Analoge Versuche, in welchen 1 oder 2 ccm  $\frac{1}{20}\%$  KCN zu 50 ccm des hypertonen Seewassers zugesetzt wurden, zeigten, daß die Verhinderung der Oxydationen durch Cyankalium im Ei auch die entwicklungsregende Wirkung des hypertonen Seewassers hemmt.

In diesen Fällen muß die hypertone Lösung die Entwicklung sowohl anregen, wie auch die Oxydationsvorgänge in die richtigen Bahnen lenken. Die Versuche zeigen, daß hypertones Seewasser diese Wirkungen nur in der Gegenwart von freiem Sauerstoff hat.

6. Sind die Oxydationsvorgänge die einzigen Vorgänge, welche durch die Befruchtung beschleunigt resp. modifiziert werden?

Es ist sicher, daß mit der Hemmung der Oxydationsvorgänge alle Entwicklungsvorgänge und auch die Umwandlung von Protoplasmabestandteilen in Chromatin resp. Nukleinverbindungen unterbleiben. Es fragt sich, ob auch noch andere chemische Vorgänge als die auf Oxydation beruhende oder mit der Oxydation verknüpfte Synthese der Chromatinsubstanz durch die Befruchtung im Ei angeregt werden. Das scheint der Fall zu sein, wenn auch in relativ geringem Grade.

So lange wir nicht die gesamten Stoffwechselvorgänge im Ei direkt bestimmen können — wozu einstweilen wenig Aussicht vorhanden ist — bietet sich nur ein indirekter Weg zur Entscheidung dieser Frage. Wenn nämlich die Oxydationsvorgänge der einzige Vorgang sind, der durch die Befruchtung angeregt resp. beschleunigt wird, so darf die Unterdrückung

der Oxydationsvorgänge durch Sauerstoffmangel oder Cyankalium im befruchteten Ei keine schlimmeren Folgen haben, als im unbefruchteten Ei. Lewis und ich haben nun vor Jahren gezeigt, daß das unbefruchtete Ei des Seeigels eine Reihe von Tagen in cyankaliumhaltigem Seewasser verweilen kann, ohne seine Befruchtungs- und Entwicklungsfähigkeit einzubüßen<sup>1)</sup>. Die Frage ist, kann das befruchtete Ei dasselbe leisten? Ich muß dem Bericht über derartige Versuche die Angabe vorausschicken, daß das Cyankalium unwirksam wird, wenn die Lösung den Geruch nach Blausäure verliert. Das dürfte vielleicht darin seine Erklärung finden, daß die gesamte oder die wesentliche giftige, in diesem Falle oxydationshemmende Wirkung des Cyankaliums auf der durch hydrolytische Dissoziation gebildeten Blausäure beruht. Da die letztere flüchtig ist, so muß allmählich alles Cyankalium in Blausäure verwandelt werden und zuletzt verdampfen. Sobald das geschehen ist, ist kein CN mehr vorhanden. Die Giftwirkung des KCN beruht vielleicht auch nur auf der Wirkung der in das Ei eindringenden HCN, die dort mit Katalysatoren (und vielleicht anderen Stoffen) Verbindungen bildet, welche deren Wirksamkeit aufhebt. Diese Reaktionen müssen umkehrbar sein, da sonst die völlige Erholung der Eier, wenn man sie in normales Seewasser zurückbringt, nicht verständlich wäre. Fügt man Cyankalium im Überschuß zum Seewasser, so erholen sich die Eier nur sehr langsam, weil dann das Ei zu viel HCN erhält und die Abgabe nur sehr allmählich erfolgt. Es gibt aber eine Konzentrationsgrenze für das KCN, bei der seine giftigen Wirkungen zum Tod des Eies führen. Ob es sich hier um die Bildung nicht umkehrbarer Verbindungen handelt — was ich nicht glaube — sondern lediglich um eine Komplikation, brauchen wir hier nicht zu diskutieren; für die Dosen von Cyankalium, welche in unseren Versuchen angewendet wurden, können die Reaktionen des KCN oder vermutlich HCN als völlig umkehrbar angesehen werden.

Unbefruchtete und befruchtete Eier desselben Weibchens wurden je in eine Schale mit 50 ccm Seewasser + 2 ccm  $\frac{1}{20}$  % KCN gebracht. Nach verschiedenen Intervallen wurden Proben dieser Eier in normales Seewasser zurückgebracht. Die unbe-

---

<sup>1)</sup> Loeb u. Lewis, Am. Journ. of Physiology, vol. VI, p. 305. 1902.



fruchteten Eier wurden nach dem Herausbringen befruchtet, um zu sehen, ob sie völlig normal seien, und die schwächer befruchteten zeigten durch ihre weitere Entwicklung ihren Zustand an.

Das Resultat der Versuche ließ an Deutlichkeit nichts zu wünschen übrig. Die Eier, welche unbefruchtet im cyankaliumhaltigen Seewasser gewesen waren, entwickelten sich noch nach zweitägigem Verweilen in der Lösung in normaler Weise, während die, welche vor dem Einbringen in das cyankaliumhaltige Seewasser befruchtet worden waren, bereits nach 24stündigem Verweilen in der cyankaliumhaltigen Lösung im frühen Blastulastadium abstarben. Schon nach vier- bis fünfständigem Verweilen in cyankaliumhaltigem Seewasser wurden befruchtete Eier etwas geschädigt, was sich darin zeigte, daß die Larven nicht an der Oberfläche, sondern am Boden des Gefäßes schwammen und daß viele während der ersten Tage starben. In keinem Falle trat bei diesen Eiern, während sie im cyankaliumhaltigen Seewasser verweilten, eine Furchung ein. (Ich setzte, wenn der Geruch nach HCN in der Lösung verschwand, eine neue Spur  $\frac{1}{20}$  % KCN zu, so daß stets genug KCN zur Unterdrückung der Furchung und Entwicklung vorhanden war.) Bei den zahlreichen Versuchen, welche ich mit KCN bei Eiern angestellt habe, ist mir dieser Unterschied im Verhalten der befruchteten und unbefruchteten Eier in cyankaliumhaltigem Seewasser stets aufgefallen.

Diese Beobachtungen werden ergänzt durch parallele Beobachtungen über die Wirkung des Sauerstoffmangels auf befruchtete und unbefruchtete Eier. Bringt man befruchtete und unbefruchtete Eier in Seewasser, aus dem aller Sauerstoff durch Wasserstoff verdrängt ist, so findet man, daß nach 24stündigem Verweilen in dieser Lösung die befruchteten Eier sich zwar noch entwickeln, daß aber ein Prozentsatz derselben früh zugrunde geht, während das bei unbefruchteten Eiern nicht der Fall ist.

Diese Versuche beweisen nun, daß die Oxydationsvorgänge resp. die davon abhängende Chromatinbildung zwar die wesentlichen aber nicht die einzigen Vorgänge im Ei sind, welche durch die Befruchtung angeregt resp. beschleunigt werden. Die Oxydationsvorgänge, welche der Entwicklung zugrunde liegen,

werden durch das Cyankalium soweit wenigstens unterdrückt, daß keine Kern- und Zellteilung erfolgt. Daneben müssen aber, wenn das Spermatozoon einmal in das Ei eingedrungen ist, noch andere chemischen Vorgänge angeregt resp. modifiziert werden, welche an sich nicht zur Kernteilung oder Zellteilung führen. So lange diese Vorgänge im Verband mit den Oxydationsvorgängen verlaufen, gehören sie wohl in den normalen Chemismus der Entwicklung, sobald aber die Oxydationsvorgänge gehemmt sind, während die anderen Vorgänge weiter gehen (wie im Falle des Sauerstoffmangels), müssen in immer zunehmendem Maße Stoffwechselprodukte entstehen, welche schließlich durch ihre Masse die Entwicklung schädigen. Das ist wohl auch, wie hier in Parenthese erwähnt werden soll, der Grund, daß die Hemmung der Oxydationsvorgänge im Ei zwar für eine Zeitlang, aber nicht dauernd die toxischen Wirkungen von hyper-tonischen Lösungen auf das Ei zu verhindern imstande ist.

Für die hier entwickelte Auffassung der giftigen Wirkung kleiner Dosen von Cyankalium und des Sauerstoffmangels, daß sie die Oxydationsvorgänge im Ei unterdrücken, während nebensächliche, aber auf die Dauer bemerkbare andere chemische Veränderungen im Ei weitergehen, spricht auch die folgende Beobachtung. Wenn man nämlich befruchtete Eier auf Eis bringt und nahe dem Gefrierpunkt des Wassers hält, so bleiben dieselben lange Zeit ungeschädigt, viel länger als bei Sauerstoffmangel oder Cyankaliumvergiftung. Bei 0° werden nämlich nicht nur die Oxydationsvorgänge, sondern alle chemischen Änderungen im Ei gehemmt.

#### 7. Über Umstände, unter denen niedrige Temperatur, Sauerstoffentziehung und Cyankalium die künstliche Parthenogenese begünstigen.

Die im vorausgehenden erwähnten Tatsachen geben, wie ich vermute, den Schlüssel für das Verständnis einer sonst sehr paradoxen Tatsache, nämlich daß eine vorübergehende Verringerung der Oxydationsgeschwindigkeit im Ei durch Temperaturerniedrigung oder vorübergehende Aufhebung der Oxydationsvorgänge durch Sauerstoffmangel oder Cyankaliumvergiftung die parthenogenetische Entwicklung begünstigen kann. Diese Tatsachen führen uns zurück zur Besprechung der Folgen

der künstlichen Membranbildung. Wir sehen, daß die Hervorufung einer künstlichen Membran beim Seeigeli die Bildung einer Spindel und gelegentlich eine oder mehr Zellteilungen im Gefolge hat, daß aber solche Eier rasch zugrunde gehen (und zwar außerordentlich viel rascher als normale unbefruchtete Eier), wenn sie nicht mit hypertonischem Seewasser in Gegenwart von Sauerstoff behandelt werden. Wir schlossen daraus, daß die Membranbildung die Entwicklung hervorruft, daß aber gewisse Prozesse im Ei in falschen Bahnen verlaufen, und daß das den raschen Zerfall des Eies bedingt. Durch die Einwirkung des hypertonischen Seewassers werden die durch die Membranbildung hervorgerufenen falschen Prozesse in die richtigen Bahnen gelenkt.

Nun haben wir bereits gesehen, daß, wenn die Eier nach der künstlichen Membranbildung in sauerstoffreies oder cyankaliumhaltiges Seewasser gebracht werden, der Zerfall ausbleibt. Das weist darauf hin, daß die in falschen Bahnen verlaufenden Prozesse Oxydationsvorgänge oder von solchen abhängende Stoffwechselprozesse sind.

Ich habe nun gefunden, daß, wenn man die Eier nach der künstlichen Membranbildung in normalem Seewasser einer niederen Temperatur, etwa  $2^{\circ}$  bis  $5^{\circ}$  C., aussetzt, eine regelmäßige wenn auch der Temperatur entsprechend langsame Furchung und Entwicklung eintreten kann. Ich habe auf diese Weise einen kleinen Prozentsatz solcher Eier sich bis zum Blastulastadium entwickeln gesehen, während solche Eier bei gewöhnlicher Zimmertemperatur alle ohne Ausnahme rasch, ohne sich zu entwickeln, zugrunde gingen. Die niedere Temperatur bot also einen allerdings schlechten Ersatz für die Behandlung mit hypertonischem Seewasser. Ich bin geneigt anzunehmen, daß auch das Ei ohne Hilfe des hypertonischen Seewassers nach der Membranbildung die Stoffe bilden kann, welche die Entwicklungsvorgänge in die richtige Bahn lenken; nur geschieht das viel langsamer als bei der Behandlung der Eier mit hypertonischem Seewasser. Kann man also die Geschwindigkeit der Oxydationsvorgänge herabsetzen, so daß die zu rasche Zerstörung des Eies vermieden wird, und werden die anderen Stoffwechselprozesse im Ei nicht ganz gehemmt, so kann eine Entwicklung bis zur Blastula eintreten. Aber solche

Eier sind nicht ganz normal und sterben doch früh ab. Viel günstiger erweist sich für diesen Zweck die Sauerstoffentziehung und die Behandlung mit Cyankalium, wie ich bereits in einer früheren Arbeit mitgeteilt habe. So will ich als Beispiel hier einen schon in einer früheren Mitteilung erwähnten Versuch wieder mitteilen. Unbefruchtete Eier, bei denen eine Buttersäuremembran gebildet war, wurden in 50 ccm Seewasser + 1 ccm einer 1%igen KCN-Lösung gebracht. Die Konzentration des KCN war also zehn- bis vierzigmal größer als zur Hemmung der Furchungsvorgänge und der Degenerationsprozesse nötig war. Von den nach 45 Minuten aus dieser Lösung herausgenommenen und in normales Seewasser zurückgebrachten Eiern entwickelten sich etwa 5% zu normalen Larven. Es war nötig, die Eier in Uhrschildchen zu halten, um die Verdampfung des in den Eiern zurückgebliebenen resp. gebildeten HCN zu erleichtern. In diesem Falle trat die Furchung nach einer Reihe von Stunden (14 Stunden oder mehr) ein. Es scheint nun, daß dieser letztere Umstand eine Vorbedingung für das Gelingen dieses Versuches ist. Ich bin geneigt mir das so zurechtzulegen, daß in diesem Falle das allmählich erst aus dem Ei diffundierende Cyankalium die Oxydationsprozesse hemmte oder verzögerte, während andere chemische Vorgänge im Ei weitergehen konnten. Die letzteren führten nun im Laufe einiger Stunden zur Bildung der Stoffwechselprodukte, welche die normale Entwicklung des Eies erlaubten und welche in den früher erwähnten Versuchen durch die Behandlung mit dem hypertonen Seewasser gebildet wurden. Als dann das Cyankalium aus dem Ei verschwunden war und die Oxydationsvorgänge wieder eintraten, konnte eine normale Entwicklung erfolgen. Ähnliches gilt für die Wirkung des Sauerstoffmangels. Ich will aber betonen, daß in allen diesen Fällen mittels KCN, Sauerstoffmangel oder niedriger Temperatur nur wenige Eier sich entwickelten, während dieselben Eier, welche nach der Membranbildung mit hypertonischem Seewasser behandelt wurden, sich alle entwickeln konnten. •

Lyon hat vor drei Jahren in Neapel gefunden<sup>1)</sup>, daß unbefruchtete Eier, welche keine Membranen besitzen — die Bedeutung der Membranbildung für die Entwicklung war erst im

<sup>1)</sup> Am. Journ. of Physiology, vol. IX, p. 312. 1903.

vorigen Jahre erkannt worden — gelegentlich dadurch zur Entwicklung veranlaßt werden können, daß man sie lange Zeit in ziemlich konzentrierte Cyankaliumlösung bringt. Er erhielt nur in vier Versuchen positive Resultate und die Zahl der Larven war stets sehr klein. Ich habe diesen Versuch wiederholt, aber ohne jeden Erfolg. Nur an Eiern, bei denen eine künstliche Membran hervorgebracht war, erhielt ich positive Resultate. Daraus möchte ich aber nicht schließen, daß Lyon sich geirrt hat, ich vermute vielmehr, daß es sich hier um einen Unterschied bei verschiedenen Spezies von Seeigeln handelt. Lyons Versuche waren an *Strongylocentrotus lividus* in Neapel angestellt, meine Versuche an *Strongylocentrotus purpuratus* der californischen Küste. Es ist jedem, der auf diesem Gebiete arbeitet, bekannt, daß die verschiedenen Arten Unterschiede in ihrer Reaktion zeigen, wie sie ja auch vermutlich Unterschiede in anderen Reaktionen zeigen würden. Es handelt sich wohl darum, daß wohl jedes Ei die Stoffe oder Änderungen des chemischen Gleichgewichts, welche zur Entwicklungserregung nötig sind, aufzubringen vermag, daß aber die Zeit und sonstige Bedingungen, die hierzu erforderlich sind, erheblichen Schwankungen unterliegen. Diese Verschiedenheiten bilden die Brücke von den spontan parthenogenetischen Eiern zu den Eiern, die sich nur durch Samen oder durch künstliche Eingriffe zur Entwicklung bringen lassen.

#### IV. Zusammenfassung der Resultate.

Wir dürfen es wohl als sicher ansehen, daß das Wesen der Entwicklungserregung bei der Befruchtung wie bei der künstlichen Parthenogenese in einer Beschleunigung von Oxydationsprozessen im Ei besteht. Diese Oxydationsvorgänge bilden die Voraussetzung für die Entstehung von Nukleinverbindungen aus protoplasmatischen Substanzen des Eies und damit für die Kern- und Zellteilung. Unsere Versuche machen es wahrscheinlich, daß der Vorgang der Entwicklungserregung beim Seeigeli aus zwei getrennten Prozessen besteht. Der eine dieser Prozesse ist die Membranbildung resp. der dieser Membranbildung zugrunde liegende Sekretionsprozeß. Dieser Prozeß genügt, um eine Beschleunigung der Oxydationsvorgänge im Ei anzuregen (vielleicht durch Beseitigung oxydationshemmender

Stoffe oder Bedingungen). Allein diese Oxydationsprozesse verlaufen in falschen Bahnen und führen zum raschen Tod des Eies. Wir finden so die paradoxe Tatsache, daß für solche Eier der Sauerstoffmangel oder Cyankaliumvergiftung, auf eine Zeitlang wenigstens, lebensrettend wirken.

Der zweite Prozeß bei der Entwicklungserregung besteht in einem Eingriff, durch welchen die Oxydationsprozesse in richtige Bahnen gelenkt werden. Das geschieht bei der künstlichen Parthenogenese durch kurze Behandlung der Eier mit hypertonischem Seewasser. Es wurde gezeigt, daß diese Behandlung chemisch wirkt und daß sie nur in Gegenwart von freiem Sauerstoff Erfolg hat. Es ist deshalb zu vermuten, daß es sich hierbei um die Bildung gewisser Stoffe handelt, welche nunmehr die Oxydationsvorgänge in die richtigen Bahnen lenken.

Allein die Oxydationsprozesse sind vielleicht nicht die einzigen Prozesse, welche durch die Befruchtung im Ei angeregt oder beschleunigt werden. Das zeigt sich darin, daß die Cyankaliumvergiftung und der Sauerstoffmangel schädlicher für das befruchtete als für das unbefruchtete Ei sind. Diese sekundären Prozesse werden also durch das Cyankalium und den Sauerstoffmangel nicht gehemmt.

Es scheint, daß die sekundären Prozesse ebenfalls, wenn auch relativ langsam, zur Bildung von Stoffen führen können, welche die durch die Membranbildung im Ei beschleunigten Oxydationsprozesse wieder in richtige Bahnen lenken. So erklärt es sich, daß, wenn man im Ei nach der Membranbildung die Oxydationsprozesse durch Cyankalium oder Sauerstoffmangel verzögert, ohne die anderen chemischen Reaktionen in gleichem Maß zu verzögern, ein kleiner Prozentsatz von Eiern sich ebenfalls zu entwickeln vermag.

---

# **Über den Einfluß der Muskelarbeit auf Gewicht, Zusammensetzung und Wassergehalt der Organe des Tierkörpers.**

Von

**Dr. Felix Rogozinski (Krakau).**

(Aus dem tierphysiologischen Institut der Kgl. landwirtschaftlichen  
Hochschule zu Berlin.)

*(Eingegangen am 25. Juni 1906.)*

Die Frage, inwieweit die Gewebe des tierischen Organismus unter der Einwirkung verschiedener Faktoren ihre chemische Zusammensetzung verändern, hat bis jetzt in der Wissenschaft keine gebührende Würdigung gefunden. Die darüber herrschenden Ansichten beruhen teils auf Hypothesen, die einer exakten Begründung entbehren, teils beschränken sie sich nur auf ein Gewebe, nämlich auf das Blut. Schon im Jahre 1878 vertrat G. Jäger<sup>1)</sup> die Ansicht, daß das Muskelgewebe infolge andauernder Arbeit reicher an aktiven Bestandteilen (Eiweißkörpern) wird, während die inaktiven (Fett und Wasser) abnehmen. Diese Ansicht stützte Jäger auf seine Beobachtungen über das spezifische Gewicht des Körpers bei Rekruten und gedienten Soldaten. Bei letzteren fand er das spezifische Gewicht erheblich höher und erklärte diese Zunahme, an der das Muskelgewebe als hauptsächlichster Bestandteil des Körpers einen erheblichen Anteil haben mußte, durch Schwund des leichteren Fettes und Wassers, und Ersetzung derselben durch das spezifisch schwerere Eiweiß.

Als weiteres Beispiel führt Jäger den Unterschied in den Bein- und Flügelmuskeln unserer Hausvögel an: die Flügelmuskeln, die im domestizierten Zustande wenig gebraucht werden, sind bedeutend weicher, lockerer und fetter. Bei wild lebenden Tieren dieser Arten, bei denen beide Gruppen der

---

<sup>1)</sup> G. Jäger, Die menschliche Arbeitskraft. 1878.

Muskeln stark in Anspruch genommen sind, ist dieser Unterschied viel geringer.

Da zur Prüfung der Ansicht Jägers bis jetzt keine exakten Untersuchungen vorliegen, so muß die Frage über den Einfluß andauernder Arbeit auf die Zusammensetzung der Muskeln noch als ungelöst betrachtet werden.

Nur der eine Punkt steht fest, daß während der Tätigkeit der arbeitende Muskel wasserreicher wird. Diese von mehreren Forschern konstatierte Tatsache wurde durch Zunahme des osmotischen Druckes in dem arbeitenden Muskel infolge der Entstehung von Spaltungsprodukten erklärt. Diese Wasserbereicherung des Muskels ist jedoch von kurzer Dauer und scheint mit den gleichzeitigen Vorgängen in dem Blute im engsten Zusammenhang zu stehen. Es ist nämlich längst bekannt, daß als Folge der Muskelarbeit eine Eindickung des Blutes eintritt. Sie ist nur zum kleinsten Teil aus der bei der Arbeit gesteigerten Verdunstung zu erklären, im wesentlichen entsteht sie durch Übertritt von Wasser in das Muskelgewebe. Sie gibt sich kund sowohl durch Erhöhung der Zahl der roten Blutkörperchen in einem Volumteile, wie auch durch Zunahme des spezifischen Gewichtes des Blutes. Wir verweisen in der Hinsicht auf die Untersuchungen an Menschen von Zuntz<sup>1)</sup> und seinen Mitarbeitern. Sie fanden, daß diese Eindickung des Blutes nur von kurzer Dauer ist: schon am nachfolgenden Tage läßt sie sich nicht mehr feststellen. Selbst wochenlang dauernde angestrengte Arbeit brachte keine dauernde Veränderung in der Zusammensetzung des Blutes hervor.

Die folgende Arbeit, in welcher ich mir das Ziel gesetzt habe, in die Frage über die Zusammensetzung des Blutes und einiger Organe unter der Einwirkung der Muskelarbeit etwas mehr Klarheit zu bringen, habe ich auf Anregung und unter der Leitung des Herrn Prof. Dr. N. Zuntz in dem tierphysiologischen Institut der Kgl. landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin ausgeführt. Obgleich die gewonnenen Resultate nicht ganz eindeutig sind, erscheinen sie mir doch der Veröffentlichung wert, teils um andere Forscher vor gleichen Fehler-

<sup>1)</sup> Zuntz und Schumburg, Studien zu einer Physiologie des Marsches. 1901. — N. Zuntz, A. Loewy, F. Müller, W. Caspari, Höhenklima und Bergwanderungen in ihrer Wirkung auf den Menschen. 1906.



quellen zu warnen, teils aber um einige positive Tatsachen bekannt zu machen.

Da in den beiden ausgeführten Versuchsreihen die Versuchsanordnung die gleiche war, so lasse ich eine kurze Beschreibung der letzteren dem Zahlenmaterial vorausgehen.

### Die Versuchsanordnung.

Als Versuchstiere wurden Hunde benutzt. Für jeden Versuch sollten möglichst ähnliche Tiere gewählt werden. Die Auswahl geschah nach ungefährender Schätzung, so gut es das vorhandene Material zuließ. Die individuellen Unterschiede, zu denen sich in meinem Falle auch vielleicht Rasse- und Altersdifferenzen gesellten, erwiesen sich leider als groß genug, um den etwaigen Einfluß der Muskelarbeit nahezu zu verschleiern. Das einzige Mittel, um diesem Übelstande wenigstens teilweise abzuhelpen, würde in der Verwendung von Tieren eines gleichen Wurfs bestehen. Die Umstände haben mich leider verhindert, so zu verfahren.

Am Beginne des Versuches wurde auf Grund des Lebendgewichts die Menge des dazureichenden Futters berechnet. Die Berechnung geschah nach den Ergebnissen der zahlreichen an Hunden ausgeführten Respirationsversuche von N. Zuntz. Die Hälfte des ganzen Energiebedarfs wurde durch Pferdefleisch gedeckt; auf diese Weise wurde den Tieren eine genügende Menge von Eiweiß zugeführt. Die andere Hälfte des Bedarfs wurde durch Reis gedeckt. Im Versuche I bewährten sich die so berechneten Futterrationen sehr gut: das Lebendgewicht blieb fast konstant, die Tiere befanden sich sehr wohl und fraßen gern. Im Versuche II dagegen schienen die in gleicher Weise berechneten Futterrationen eine Zunahme des Lebendgewichts und somit eine Ablagerung von Fett zu verursachen. Deshalb wurden in diesem Versuche nachträglich Veränderungen in der Fütterung vorgenommen, die weiter unten noch besprochen werden sollen. Das aufgenommene Wasser wurde im Versuche I nicht direkt bestimmt: ich beschränkte mich darauf, für die beiden Tiere bei der Zubereitung des Futters stets die gleiche Menge Wasser zu nehmen; im Versuche II dagegen wurde das im Futter gebotene Wasser täglich durch Wägung genau bestimmt. In beiden Versuchen wurde Wasser in reichlicher

Menge gereicht; das ergibt sich schon daraus, daß die Tiere das ihnen täglich zur Verfügung gestellte Trinkwasser stets, mit einer einzigen Ausnahme, verschmähten.

Nachdem die Tiere ein paar Tage in der bezeichneten Weise gefüttert waren und das täglich vor der Fütterung und nach Entleerung von Harn und Kot bestimmte Lebendgewicht sich als annähernd konstant erwiesen hatte, wurde zur Blutentnahme geschritten. Sie geschah morgens nach 24stündigem Fasten aus der arteria femoralis der rechten Seite unterhalb des Abgangs der art. profunda. Es wurden jedesmal ca. 40 ccm Blut entnommen. Von dem Blute wurde ein Teil mit Quecksilber defibriniert, ein zweiter der Gerinnung überlassen und behufs Serumausscheidung 24 Stunden in der Kälte verschlossen stehen gelassen. Eine Probe wurde direkt aus der Arterie in die Thoma-Zeißsche Mischpipette behufs Zählung der roten Blutkörperchen aufgesaugt. Die Zählung geschah stets in 100 Quadraten. In dem defibrinierten Blute wurden bestimmt: 1. das spezifische Gewicht und zwar sowohl mit dem Pyknometer, wie auch nach der von Hammerschlag angegebenen Methode; 2. der Gehalt an Trockensubstanz; 3. der Gehalt an Stickstoff. Im Serum endlich, das in allen Fällen ganz klar und frei von Farbstoff zur Ausscheidung gelangte, wurden bestimmt: 1. das spezifische Gewicht (nur pyknometrisch); 2. der Gehalt an Trockensubstanz; 3. der Gehalt an Stickstoff; 4. der Gefrierpunkt.

Da die Operation möglichst aseptisch ausgeführt wurde, so heilten die Wunden sehr schnell. Nur bei dem Arbeitstier im Versuch II verzögerte eine oberflächliche Eiterung die Heilung um zwei Tage.

An dem Tage der Blutentnahme wurde den Tieren kein Futter gereicht. Vom nächsten Tage ab fraßen sie wieder regelmäßig.

Nach einigen Tagen, nachdem die Wunden ganz verheilt waren, schritt ich zu dem eigentlichen Versuch. Er bestand darin, daß von den beiden Versuchstieren das eine auch weiter in vollständiger Ruhe (im Versuchskäfig) blieb, während das andere täglich eine bestimmte Arbeit auf der Treibahn<sup>1)</sup> leistete. Aus der Zahl der Umdrehungen, der Neigung der Bahn, dem

<sup>1)</sup> N. Zuntz, A. Loewy, F. Müller, W. Caspari, a. a. O., S. 168—170.

Lebendgewicht des arbeitenden Tieres ließ sich die täglich geleistete Arbeit genau berechnen. Auf Grund der an arbeitenden Hunden ausgeführten Respirationsversuche von Prof. Zuntz wurde der dieser Arbeit entsprechende Verbrauch des Tierkörpers in Kalorien berechnet und dem arbeitenden Tiere eine Zulage an Schweinefett gereicht, welche dem Mehrverbrauch entsprach. An den Tagen, an welchen keine Arbeit geleistet wurde, entfiel auch die Fettzulage. Die Periode der Arbeitsleistung dauerte je 18 Tage. Am Vortage des Todes arbeiteten die Tiere nur morgens, um dem Blute und den Organen Zeit genug zu lassen, sich von den unmittelbaren Folgen der Arbeit zu erholen und ihre normale, dauernde Zusammensetzung zu gewinnen. Im Versuche I, wo die Tiere nach 24stündigem Fasten getötet wurden, war der Darmkanal bis auf Spuren von Schleim leer. Im Versuche II wurde am Vortage aus Versehen das Futter um 4 Stunden später gereicht und infolgedessen fanden sich bei der Sektion im Darmkanal noch Futterrückstände. Dieselben wurden sorgfältig gesammelt, gewogen, das Gewicht von dem Lebendgewicht abgezogen, und die so erhaltene Zahl den weiteren Berechnungen zugrunde gelegt, um mit Versuch I vergleichbare Resultate zu erzielen.

Die Tötung der Tiere fand durch Verblutung aus der arteria femoralis der linken Seite statt. Aus der Kanüle wurden zuerst die für die Untersuchung nötigen Blutproben entnommen, ebenso wie bei der Blutentnahme im Vorversuch; ihr Gewicht wurde genau bestimmt. Die übrige Blutmasse wurde in einem tarierten Gefäße gesammelt. In den letzten Stadien wurde der Ausfluß des Blutes durch Massage des Bauches und des Brustkastens befördert. Das bei der Sektion hervortretende Blut, sowie die in der Bauchhöhle angetroffene Blutmenge wurde mit gewogener Watte gesammelt und das Gewicht ebenfalls bestimmt. Die Summe aller dieser Zahlen ergab die Menge des frei ausfließenden Blutes. Die Untersuchung der gewonnenen Blutproben geschah genau in derselben Weise, wie im Vorversuch.

Unmittelbar nach dem Verbluten und dem Tode des Tieres wurde die Sektion vorgenommen. Zunächst wurde eine Anzahl scharf begrenzter Muskeln des linken Hinterbeines möglichst rein abpräpariert, ihr Gewicht in tarierten verschlossenen Gefäßen bestimmt, die ganze auf diese Weise gewonnene Muskel-

masse auf einem Hackbrett zerkleinert. Von dem Brei wurden 50 g für die Glykogenbestimmung abgewogen und in die bereit stehende heiße Kalilauge gebracht; außerdem wurde eine kleine Portion des Breies für die direkte Trockensubstanz-Bestimmung verwendet. Der gewogene Rest des Muskelbreies wurde in einem Vakuumtrockenapparat bei ca. 70° 24 Stunden lang getrocknet, 48 Stunden an der Luft stehen gelassen, gewogen, zerkleinert, in einer kleinen Probe der Wassergehalt bestimmt, und der Rest in wohlverschlossenen Gefäßen für die Analyse aufbewahrt.

Nach dem Abpräparieren der Muskulatur wurde die Bauchhöhle geöffnet, mit der Leber ebenso wie mit den Muskeln verfahren und dann das Gewicht einer Anzahl der inneren Organe bestimmt. Das Gekröse wurde zusammen mit dem Fett besonders gewogen, ebenso wie der Muskel- und Leberbrei getrocknet und aufbewahrt. Endlich wurde der Schädel geöffnet und das Gewicht des dicht hinter der Pyramidenkreuzung abgeschnittenen Hirns bestimmt.

Die chemische Untersuchung der gewonnenen Muskel- und Lebersubstanz geschah nach den üblichen Methoden: der Stickstoffgehalt wurde nach Kjeldahl bestimmt, der Fettgehalt durch 24stündige Extraktion im Soxhletschen Apparat mit wasserfreiem Äther, Behandlung mit salzsaurem Alkohol, Trocknen, abermaliger 24stündiger Extraktion mit Äther. Die Glykogenbestimmungen wurden in frischem Material nach der von Pflüger<sup>1)</sup> angegebenen Methode ausgeführt. Für die Fettbestimmung im Gekröse wurde das mit einer Schere grob zerkleinerte Gekröse in eine Flasche gebracht, mit 750 ccm Äther übergossen und 10 Tage unter häufigem Umschütteln stehen gelassen. Das gewonnene Extrakt wurde abfiltriert, auf 1 l ergänzt und in je 50 resp. 100 ccm der Fettgehalt bestimmt. Der Rückstand samt dem zerschnittenen Filter wurde getrocknet und in gewöhnlicher Weise mit Äther extrahiert. Nach den gewonnenen Daten wurde die Summe des Fettes im Gekröse berechnet.

Ich gehe nunmehr zu den Ergebnissen der Versuche über<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> E. Pflüger, Das Glykogen und seine Beziehungen zur Zuckerkrankheit. 1905. S. 104–115.

<sup>2)</sup> Der Kürze halber bezeichne ich im folgenden die arbeitenden Tiere im Versuch I und II mit A<sub>1</sub> resp. A<sub>2</sub>, die ruhenden mit R<sub>1</sub> resp. R<sub>2</sub>.

## Versuch I.

Die zu diesem Versuche benutzten zwei ausgewachsenen männlichen Hunde wiesen keine bedeutenden Unterschiede auf, weder im Körperbau, noch im Ernährungszustand und Temperament; dagegen differierte ihr Lebendgewicht ziemlich bedeutend. Am 11. Dezember wurden sie gewogen und jedes Tier für sich in einen Käfig gebracht. Der Energiebedarf der 7080 resp. 5840 g wiegenden Hunde wurde, da nach den bisherigen Erfahrungen bei Hunden dieser Größe einem Kilogramm Lebendgewicht ein Ruhebedarf von etwa 80 Kal. entspricht, für den Hund A<sub>1</sub> zu 560 Kal., für Hund R<sub>1</sub> nach dem Verhältnis der Körperoberflächen zu 492 Kal. berechnet.

Die hiernach für die beiden Tiere bestimmten Rationen hatten folgende Zusammensetzung und folgenden Wert:

Hund A <sub>1</sub>		Hund R <sub>1</sub>	
200 g Fleisch	260 Kal.	170 g Fleisch	221 Kal.
75 g Reis	300 Kal.	67 g Reis	268 Kal.
Zusammen	560 Kal.	Zusammen	489 Kal.

Die Fütterung fand immer um 11 $\frac{1}{2}$  Uhr vormittags statt; das Futter wurde im Laufe einer Viertelstunde vollständig aufgefressen. Am 15. Dezember fand in der oben beschriebenen Weise die Blutentnahme aus der arteria femoralis statt. Am 29. Dezember wurde mit der Arbeit begonnen. Sie bestand darin, daß das Tier auf der geneigten Tretbahn lief, und zwar zweimal täglich: von 9—10 Uhr vormittags und von 5—6 Uhr nachmittags. Am 29. und 30. Dezember wurde nur die Hälfte der bestimmten Arbeit geleistet (4000 Touren); vom 2. Januar an dagegen die ganze Anzahl (8000 Touren an dem Tourenzähler). Diese Arbeit läßt sich auf folgende Weise berechnen: 5,5 Touren am Tourenzähler entsprachen einer Umdrehung der ganzen Tretbahn, welche eine Länge von 358,4 cm hatte; die Steigung betrug 28,52 %. Demzufolge entsprachen 8000 Touren einer Strecke von 5213 m mit 1486,7 m Steigung.

Folgende Tabelle I gibt eine Übersicht über die Schwankungen des Lebendgewichts, die Menge des aufgenommenen Futters und der geleisteten Arbeit.

Tabelle I.

Datum	Hund A <sub>1</sub>			Hund R <sub>1</sub>	
	Lebendgewicht in g	Futter	Arbeit	Lebendgewicht in g	Futter
11. XII.	7080	200 g Fleisch 75 g Reis	keine Arbeit	5840	170 g Fleisch 67 g Reis
12.	6900	"	"	5630	"
13.	7070	"	"	5700	"
14.	7000	"	"	5670	"
15.	6920	kein Futter	"	5660	kein Futter
16.	6520	200 g Fleisch 75 g Reis	"	5440	170 g Fleisch 67 g Reis
17.	6930	} 6875	}	5510	} 5525
18.	6820			"	
19.	6710	"	"	5560	"
20.	6720	"	"	5540	"
21.	6760	"	"	5560	"
22.	6870	"	"	5570	"
23.	6600	"	"	5570	"
24.	6600	"	"	5570	"
25.	6620	"	"	5620	"
26.	6700	"	"	5700	"
27.	6930	"	"	5700	"
28.	6920	"	"	5670	"
29.	6920	+ 6 g Fett	4000 Touren	5740	"
30.	6900	"	"	5790	"
31.	6850	kein Fett	keine Arbeit	5750	"
1. I.	6870	"	"	5820	"
2.	6900	+ 12,5 g Fett	8000 Touren	5840	"
3.	6900	"	"	5800	"
4.	7030	"	"	5820	"
5.	6970	"	"	5850	"
6.	6890	"	"	5860	"
7.	7020	kein Fett	keine Arbeit	5870	"
8.	6900	+ 12,5 g Fett	8000 Touren	5850	"
9.	6700	"	"	5870	"
10.	6850	"	"	5870	"
11.	6875	"	"	5885	"
12.	6900	"	"	5860	"
13.	7000	"	"		
14.	6870	kein Fett	keine Arbeit		
15.	6870	+ 12,5 g Fett	4000 Touren		
16.	6790				

Der der geleisteten Arbeit entsprechende Stoffverbrauch läßt sich aus den von Zuntz (Pflügers Archiv 95, S. 202, Tab. V) zusammengestellten Ergebnissen der Respirationsversuche berechnen. Danach ist der Energieverbrauch für die Horizontalbewegung nicht dem Körpergewicht  $k$ , sondern dem Ausdruck  $k^{1/2}$  proportional. Im Mittel zahlreicher Versuche an 7 Hunden beträgt er für  $k^{1/2} = 1,61 \text{ mkg} = 3,788 \text{ kal}$ . Es braucht daher unser Hund von 6,8 kg Gewicht für 5213 m Weg:

$$6,8^{1/2} \times 3,788 \times 5213 = 70,9 \text{ Kal.}$$

Für die Steigarbeit von 1 mkg ergeben

dieselben Versuche einen Energieverbrauch = 3,0 mkg = 7,06 kal.

Unser Hund braucht daher für 1486 m

$$\text{Steigung} \quad . \quad . \quad . \quad . \quad 6,8 \times 7,06 \times 1486,7 = 71,4 \text{ Kal.}$$

Im ganzen also Mehrverbrauch für Arbeit = 142,3 Kal.

Zur Deckung des Mehrverbrauchs erhielt der Hund an den Arbeitstagen 12,5 g Fett, welche bei einer Verbrennungswärme von 9,5 Kal. und einem Verlust von etwa 2 % durch den Kot und einer Verdauungsarbeit von 0,21 Kal. pro g rund 9 Kal. nutzbare Energie liefern. Die Zulage deckte also 112,5, so daß noch etwa 30 Kal. durch Körpermaterial zu decken waren. Wenn dieses Defizit durch Körperfett allein gedeckt wurde, mußte der Hund täglich nahezu 4 g an Körpergewicht einbüßen. In der Tat wog der Hund

im Mittel des 17. u. 18. XII. = 6875 g

am 28. XII. = 6920 g

Er nahm also vor der Arbeit in 10 Tagen um: 55 g = 5,5 p. d. zu. — An den beiden letzten Arbeitstagen wog er 6870 g, hat also in 18 Tagen, wovon aber nur 13 volle Arbeitstage waren, um 50 g abgenommen, oder pro Arbeitstag um 4 g. Gegenüber dem vorher beobachteten Ansatz von 5,5 g beträgt der Gewichtsverlust 9,5 g, also mehr als das Doppelte des aus dem Energieverbrauch berechneten Verlustes. Da ein Fleischverlust nach den Erfahrungen über die Einwirkung der Arbeit auf den Stickstoffumsatz nicht anzunehmen ist, spricht das Resultat für eine geringe Wasserverarmung des Körpers durch die Arbeit. Freilich wäre der ganze Wasserverlust nur auf etwa 90 g, also etwas über 1 % des Körpergewichts zu taxieren.

Der Ruhezund, welcher in der Vorperiode vom 17./18. XII. bis 28. XII. um täglich 14,5 g zugenommen hat, zeigt fast dieselbe Zunahme, nämlich 13,0 g für die Zeit vom 28. XII. bis 12. I. — Da beide Hunde nebeneinander in zwei Käfigen sich aufhielten, dürfen wir wohl annehmen, daß außer der Arbeit keine den Stoffwechsel ändernde Momente einwirkten.

Am 12. Januar wurde das ruhende, am 16. das arbeitende Tier in der oben beschriebenen Weise getötet. Die Ergebnisse der Blutuntersuchung, die unmittelbar nach dem Tode erfolgte, sind in der Tabelle II mit denen der früheren Entnahme zusammengestellt.

Tabelle II.

	Hund A <sub>1</sub>		Hund B <sub>1</sub>	
	Erste Blut- entnahme (15. Dezemb.)	Zweite Blut- entnahme (16. Januar)	Erste Blut- entnahme (15. Dezemb.)	Zweite Blut- entnahme (12. Januar)
Zahl der roten Blutkörperchen . . . .	7 736 000	7 232 000	6 880 000	7 368 000
Spezifisches Gewicht:				
a) m. Pyknometer . .	1,063	1,062	—	1,058
b) n. Hammerschlag	1,064 <sup>1)</sup>	1,062	1,051 (?)	1,059
Trockensubstanz im defibrinierten Blut	22,75 %	23,63 } 23,73 % 23,83 }	20,02 %	21,37 } 21,55 % 21,72 }
Stickstoffgehalt des defibrinierten Blutes	—	3,50 } 3,52 % 3,54 }	—	3,22 } 3,25 % 3,27 }
Spezifisches Gewicht des Serum . . . . .	1,025	1,024	1,024	1,023
Trockensubstanz im Serum	8,08 %	7,82 } 7,85 % 7,87 }	7,48 %	7,32 } 7,33 % 7,33 }
Stickstoffgehalt im Serum	1,02 %	1,06 } 1,06 % 1,06 }	0,97 %	0,97 } 0,97 % 0,97 }
Gefrierpunkt des Serum	-0,475° <sup>1)</sup>	-0,470°	-0,460°	-0,450°

Die Sektion und die damit verbundene Bestimmung der Gewichte der einzelnen Körperorgane gab folgende Resultate:

<sup>1)</sup> Die Zahlen für das spezifische Gewicht nach Hammerschlag und für den Gefrierpunkt des Serum bilden das Mittel aus je drei gut übereinstimmenden Einzelbestimmungen.



Tabelle III.

Bezeichnung der Organe	Hund A <sub>1</sub>			Hund B <sub>1</sub>		
	Gewicht in g	Gewicht in % des Lebendgewichts	Gewicht in % des Hirngewichts	Gewicht in g	Gewicht in % des Lebendgewichts	Gewicht in % des Hirngewichts
Musc. sartorius . . . . .	2,5	0,037	4,06	2,7	0,046	4,72
„ rectus femoris . . . . .	9,7	0,143	15,75	6,7	0,114	11,71
„ adductores . . . . .	57,2	0,840	92,80	77,0	1,310	134,60
„ rectus abdominis . . . . .	29,8	0,439	48,38	21,3	0,363	37,24
Baugemuskeln und Glutaeen .	236,3	3,480	383,60	136,0	2,321	28,78
Oberflächliche Wadenmuskeln	28,3	0,417	46,52	22,7	0,387	39,68
Hauptmasse des Fettes von der Rückseite des Oberschenkels und Gesäßes . . . . .	59,3	0,873	96,26	73,4	1,253	128,32
Magen (leer) . . . . .	56,0	0,825	90,91	56,8	0,969	99,30
Herz mit Herzbeutel und mediastinalem Fett . . . . .	74,9	1,103	121,59	56,2	0,959	98,25
Herz am Herzbeutelrand abgeschnitten . . . . .	64,5	0,950	104,71	39,5	0,674	69,06
Lunge an der Tracheateilung abgeschnitten . . . . .	50,4	0,742	81,82	40,9	0,698	71,50
Leber (ohne Blase) . . . . .	183,2	2,698	297,41	152,0	2,594	265,73
Milch . . . . .	15,6	0,230	25,32	11,0	0,188	19,23
Gekröse . . . . .	73,8	1,087	119,81	71,3	1,217	124,65
Beide Nieren . . . . .	30,5	0,449	49,51	26,4	0,450	46,15
Pankreas . . . . .	17,1	0,252	27,76	15,7	0,268	27,45
Hirn . . . . .	61,6	0,907	100,00	57,2	0,976	100,00
Linkes Femur . . . . .	24,5	0,361	39,77	19,6	0,334	34,27
Gesamtmenge des gewonnenen Blutes . . . . .	476,6	7,019	773,70	298,7	5,097	522,20

Ich gehe nunmehr zu den Ergebnissen der chemischen Untersuchung der in vorher beschriebener Weise vorbereiteten Organe.

Untersuchung der lufttrockenen Muskelsubstanz.

	Hund A <sub>1</sub>		Hund B <sub>1</sub>	
Trockensubstanz . . . . .	93,80	} 93,82 %	91,64	} 91,67 %
	93,83		91,69	
Stickstoffgehalt . . . . .	11,77	} 11,68 %	10,69	} 10,61 %
	11,59		10,53	
Fettgehalt . . . . .	17,75	} 17,93 %	22,82	} 22,47 %
	18,11		22,11	

Die Glykogenbestimmungen ergaben folgende Resultate: in 81 ccm Zuckerlösung nach Pflüger:

$$\left. \begin{matrix} 0,0546 \\ 0,0528 \end{matrix} \right\} 0,0537 \text{ g Cu}_2\text{O}; \left. \begin{matrix} 0,0572 \\ 0,0578 \end{matrix} \right\} 0,0575 \text{ g Cu}_2\text{O}.$$

Nach Umrechnung dieser Zahlen auf die angewandte Menge Substanz und Überführung der Glukosezahl in Glykogenzahl durch Multiplikation mit dem Faktor 0,9 wurden für den Glykogengehalt in der frischen Substanz folgende Zahlen ermittelt:

	Hund A <sub>1</sub>	Hund R <sub>1</sub>
	0,428 % Glykogen	0,458 % Glykogen.
Der Aschengehalt wurde in der entfetteten Substanz bestimmt; er betrug:	4,38 %	5,09 %.
Der gesamte Gehalt des frischen Fleisches an Trockensubstanz betrug:	28,25 %	23,90 %.

Bei dem Hunde A<sub>1</sub> wurde auch eine direkte<sup>1)</sup> Bestimmung der Trockensubstanz ausgeführt und dabei 28,26 % Trockensubstanz gefunden.

Durch Umrechnen der gewonnenen Mittelzahlen gewinnen wir folgende Werte:

	Trockensubstanz		Frisches Fleisch	
	Hund A <sub>1</sub>	Hund R <sub>1</sub>	Hund A <sub>1</sub>	Hund R <sub>1</sub>
Stickstoffgehalt .	12,45 %	11,57 %	3,52 %	2,77 %
Fettgehalt . . .	19,11 „	24,51 „	5,40 „	5,86 „
Glykogengehalt .	1,52 „	1,92 „	0,43 „	0,92 „
Aschengehalt . .	3,54 „	3,84 „	1,25 „	1,25 „

Untersuchung der Lebersubstanz.

	Hund A <sub>1</sub>		Hund R <sub>1</sub>	
Trockensubstanz . . .	93,89 } 93,96 }	93,93 %	95,00 } 95,09 }	95,05 %
Stickstoff . . . . .	9,86 } 9,80 }	9,83 %	9,72 } 9,65 }	9,69 %
Fett . . . . .	11,48 } 10,92 }	11,20 %	8,87 } 9,34 }	9,11 %

81 cem Zuckerlösung gaben:

0,2956 } 0,3018 }	0,2987 g Cu <sub>2</sub> O;	0,3426 } 0,3448 }	0,3437 g Cu <sub>2</sub> O
----------------------	-----------------------------	----------------------	----------------------------

und somit betrug der Gehalt an Glykogen in der frischen Lebersubstanz:

	2,82 %	3,29 %.
Der gesamte Gehalt an Trockensubstanz in der frischen Leber betrug:	29,59 %	30,01 %.

Die Zusammensetzung der Trockensubstanz läßt sich nach den gewonnenen Zahlen folgenderweise berechnen:

	Hund A <sub>1</sub>	Hund R <sub>1</sub>
Stickstoff . . . . .	10,47 %	10,19 %
Fett . . . . .	11,93 „	9,58 „
Glykogen . . . . .	9,53 „	10,96 „

<sup>1)</sup> Eine kleine Probe des Muskelbreies wurde im Wägegläschen zuerst auf dem Wasserbade, dann im Wassertrockenschranke bei etwa 97° 24 Stunden lang getrocknet.

Das Gekröse.

Die durch 10-tägige Extraktion des grob zerschnittenen Gekröses erhaltenen Ätherextrakte wurden auf je 1 l ergänzt. In je 50 ccm dieses Extraktes wurde durch Vertreiben des Äthers der Rückstand bestimmt. Er betrug bei

Hund A <sub>1</sub>	Hund R <sub>1</sub>
2,5586	2,5405
2,5636	2,5450
} 2,5611 g	} 2,5427 g.

Im ganzen Extrakt also:

$$2,5611 \times 20 = 51,222 \text{ g} \qquad 2,5427 \times 20 = 50,854 \text{ g.}$$

Die extrahierte Masse wurde im Mörser zerkleinert und auf gewöhnliche Weise mit Äther im Extraktionsapparat, mit salzsaurem Alkohol und abermals mit Äther extrahiert; sie lieferte dabei:

2,6555 g	1,3554 g.
----------	-----------

Die ganze Menge des nach den angewandten Methoden extrahierbaren Fettes im Gekröse betrug also bei Hund A<sub>1</sub> — 53,8775 g, bei Hund R<sub>1</sub> — 52,2094 g. In Prozenten des Lebendgewichts: bei A<sub>1</sub> — 0,793 %; bei R<sub>1</sub> — 0,891 %.

Versuch II.

Zu diesem Versuch wurden ebenso wie im Versuch I zwei ausgewachsene männliche Hunde verwendet. Im Gegensatz zu den Tieren A<sub>1</sub> und R<sub>1</sub> waren ihre Lebendgewichte annähernd gleich, sie wiesen dagegen bedeutende Unterschiede in ihrem Körperbau und im ganzen Habitus auf. Der zur Arbeitsleistung bestimmte Hund A<sub>2</sub> hatte gedrungenen Körperbau, einen schweren, großen Kopf und dicke, kurze, etwas krumme Beine. Der Hund R<sub>2</sub> dagegen war schlank gebaut, hatte einen kleinen, leichten Kopf und lange, dünne Beine. Zur Veranschaulichung dieser Unterschiede mögen die Dimensionen des os femoris der beiden Tiere dienen: Bei A<sub>2</sub> betrug die Länge 11,05 cm, die Dicke an der schmalsten Stelle 1,15 cm; bei R<sub>2</sub> dagegen war die Länge 12,55 cm, die geringste Dicke 1,05 cm. Diese Wahl, die durch Unmöglichkeit passendere Tiere zu finden veranlaßt wurde, dürfte von entscheidendem Einfluß auf die Versuchsergebnisse sein.

Am 18. Januar, wo die Vorfütterung begann und die Tiere in die Versuchskäfige gebracht wurden, wogen sie: A<sub>2</sub> — 8410 g, R<sub>2</sub> — 8850 g. Der Futterbedarf wurde ebenso wie in Versuch I berechnet und zunächst gereicht:

Hund A <sub>2</sub>	Hund R <sub>2</sub>
260 g Fleisch = 338 Kal.	272 g Fleisch = 354 Kal.
85 g Reis = 340 „	90 g Reis = 360 „
Zusammen = 678 Kal.	Zusammen = 714 Kal.

Da aber bei dieser Futtermenge eine stetige Zunahme des Lebendgewichts stattzufinden schien, wurde vom 24. Januar an die Menge von Reis für A<sub>2</sub> auf 65 g, für R<sub>2</sub> aber auf 80 g herabgesetzt. Mit dieser neuen Ration blieb das Lebendgewicht der Tiere annähernd konstant. Die Versuchsanordnung war der im Versuch I gleich; nur wurde die Menge des täglich im gekochten Futter aufgenommenen Wassers genau reguliert (bei A<sub>2</sub> — 405 g, bei R<sub>2</sub> — 408 g). Angebotenes Trinkwasser verschmähten die Tiere regelmäßig. Seit dem 8. Februar, das heißt in den letzten 11 bzw. 13 Tagen, wurde gehacktes Pferdefleisch von bekannter Zusammensetzung, das auf einmal abgewogen und in Glasbüchsen präserviert worden war, gereicht. Von dem 14. Februar ab wurde auch der Kot behufs Ermittlung der Ausnutzung gesammelt. Die Blutentnahmen und die Sektion wurden genau ebenso wie im Versuch I ausgeführt. Die Arbeit war in bezug auf die Länge des Weges und die Steigung die gleiche; die Zulagen an Schweinefett wurden anfangs etwas zu niedrig bemessen, später im Hinblick auf die Abnahme des Körpergewichts ein wenig (von 16 auf 21 g) erhöht.

S. Tab. IV.

Der für Hund A<sub>2</sub> in der S. 215 dargelegten Weise berechnete Mehrverbrauch für die Arbeit betrug für die ganze Arbeitszeit . . . . . 2534 Kal.  
 Die zugelegten 271 g Fett entsprechen . . . . . 2439 „  
 Es wurde also der Mehrverbrauch bis auf . . . . . 95 Kal.  
 entsprechend 11 g Fettgewebe oder 0,7 g pro Tag durch die Zulage gedeckt.

Das Körpergewicht von A<sub>2</sub> hatte vor der Arbeit vom 26. I. bis 31. I. um 220 g, also um 44 g pro Tag zugenommen. Während der Arbeit sank es vom 3. II. bis 18. II. um 100 g, d. h. um 6,7 g pro die. — Wenn wir die Gewichtsänderung auf durch die Arbeit bedingten Wasserverlust beziehen dürfen, hätte derselbe pro Arbeitstag  $(44 + 6,7 - 0,7) = 50$  g betragen.

Tabelle IV.

Datum	Hund A <sub>2</sub>			Hund B <sub>2</sub>	
	Lebendgewicht in g	Futter	Arbeit	Lebendgewicht in g	Futter
18. I.	8410	260 g Fleisch 85 g Reis	keine Arbeit	8850	272 g Fleisch 90 g Reis
19.	8520	"	"	8970	"
20.	8600	"	"	9010	"
21.	8640	"	"	9000	"
22.	8660	"	"	9120	"
23.	8800	kein Futter	"	9060	kein Futter
24.	8350	260 g Fleisch 65 g Reis	"	8650	272 g Fleisch 80 g Reis
25.	8600	"	"	8900	"
26.	8750	"	"	9050	"
27.	8780	"	"	8980	"
28.	8800	"	"	9000	"
29.	8850	"	"	9050	"
30.	8910	"	"	9080	"
31.	8970	"	"	9110	"
1. II.	8950	"	500 Touren	9120	"
2.	8980	"	3000 Touren	9130	"
3.	8950	+ 8 g Fett	4000 Touren	9150	"
4.	8950	+ 12 g Fett	6000 Touren	9100	"
5.	8950	+ 15 g Fett	8000 Touren	9020	"
6.	8930	"	"	9020	"
7.	8900	+ 16 g Fett	"	9050	"
8.	8870	"	"	9000	"
9.	8870	+ 21 g Fett	"	9050	"
10.	8870	"	"	8950	"
11.	8870	"	"	8980	"
12.	8850	"	"	8950	"
13.	8860	"	"	8960	"
14.	8850	"	"	8970	"
15.	8840	"	"	8900	"
16.	8850	"	"	8920	"
17.	8820	"	"	8870	"
18.	8850	+ 13 g Fett	4000 Touren	8900	"
19.	8940	"	"	8980	"
20.				8890	"
21.				8910	"

Tabelle V. Untersuchung des Blutes.

	Hund A <sub>2</sub>		Hund R <sub>2</sub>	
	Erste Blut- entnahme (23. Januar)	Zweite Blut- entnahme (19. Februar)	Erste Blut- entnahme (23. Januar)	Zweite Blut- entnahme (21. Februar)
Zahl der roten Blut- körperchen . . . .	7 224 000	6 312 000	7 536 000	6 552 000
Spezifisches Gewicht:				
a) m. Pyknometer . .	1,061	1,061	1,064	1,064
b) n. Hammerschlag	1,060	1,061	1,062	1,063
Trockensubstanz im de- fibrinierten Blut	23,34 %	22,43 } 22,50 % 22,57 }	23,49 %	24,71 } 24,53 % 24,34 }
Stickstoffgehalt des de- fibrinierten Blutes	3,40 } 3,41 % 3,41 }	3,26 } 3,23 % 3,20 }	3,49 } 3,49 % 3,49 }	3,44 } 3,47 % 3,49 }
Spezifisches Gewicht des Serum . . . . .	1,023	1,023	1,024	1,025
Trockensubstanz im Serum	7,79 %	7,65 } 7,64 % 7,63 }	8,59 %	8,42 } 8,38 % 8,34 }
Stickstoffgehalt im Serum	1,06 } 1,06 % 1,06 }	1,00 } 1,00 % 0,99 }	1,10 } 1,11 % 1,11 }	1,09 } 1,10 % 1,10 }
Gefrierpunkt des Serum	- 0,460 °	- 0,450 °	- 0,460 °	- 0,450 °

Nun hat aber auch der Kontrollhund analoge Gewichtsänderungen erfahren. Vom 26. I. bis 31. I. hat er um 60 g = 12 g pro Tag zugenommen, vom 4. II. bis 18. II. hat er um 200 g = 14,3 g abgenommen. Es ist also ohne Änderung der Lebensweise eine tägliche Gewichtsänderung um (12 + 14,3) = 26,3 g erfolgt. Als durch die Arbeit bedingten Wasserverlust dürfen wir also nur (50 - 26,3) = 23,7 g in Rechnung stellen. Der Umschlag im Verhalten des Körpergewichts beruht wohl zum Teil darauf, daß die Hunde bei der kohlenhydratreichen Kost anfangs Glykogen ansetzten, das ja mit seinem 4fachen Gewicht an Wasser<sup>1)</sup> angelagert wird, und dabei etwas Fett einbüßten. Als der Glykogenansatz beendet war, und dafür die äquivalente Menge Fett, welche etwa nur  $\frac{1}{9}$  wiegt, angesetzt wurde, nahm das Gewicht nicht mehr zu.

<sup>1)</sup> Vgl. Zuntz u. Cons., Höhenklima u. Bergkrankheit, Berlin 1906, S. 114.

Tabelle VI. Organgewichte.

Bezeichnung der Organe	Hund A <sub>1</sub>			Hund B <sub>1</sub>		
	Gewicht in g	Gewicht in % des Lebend- gewichts <sup>1)</sup>	Gewicht in % des Hirn- gewichts	Gewicht in g	Gewicht in % des Lebend- gewichts	Gewicht in % des Hirn- gewichts
Musc. sartorius . . . . .	5,2	0,059	7,08	3,6	0,041	5,76
„ rectus femoris . . . . .	12,2	0,138	16,62	19,1	0,216	30,56
„ vasti . . . . .	86,0	0,971	117,16	79,6	0,902	127,36
„ adductores . . . . .	91,7	1,035	124,93	66,4	0,752	106,24
„ pectineus . . . . .	2,3	0,026	3,13	3,8	0,043	6,08
„ rectus abdominis . . . . .	47,8	0,539	65,12	47,0	0,533	75,20
Beugemuskeln und Glutaeen.	168,9	1,906	230,11	258,3	2,927	413,27
Oberflächliche Wadenmuskeln	34,9	0,394	47,55	39,2	0,444	62,72
Hauptmasse des Fettes von der Rückseite des Oberschenkels und Gesäßes . . . . .	34,3	0,387	46,73	52,0	0,589	83,20
Magen (leer) . . . . .	90,0	1,016	122,62	79,1	0,896	126,56
Herz mit Herzbeutel und me- diastinalem Fett . . . . .	85,0	0,959	115,80	94,2	1,067	150,72
Herz am Herzbeutelrand ab- geschnitten . . . . .	73,2	0,826	99,73	84,4	0,956	135,04
Lunge an der Tracheateilung abgeschnitten . . . . .	56,5	0,638	76,97	75,7	0,858	121,12
Leber (ohne Blase) . . . . .	227,3	2,566	309,67	242,4	2,747	387,84
Milz . . . . .	21,7	0,245	29,56	14,7	0,167	23,52
Gekröse . . . . .	110,9	1,252	151,09	157,2	1,781	251,52
Beide Nieren . . . . .	43,0	0,485	58,58	47,6	0,539	76,16
Pankreas . . . . .	21,0	0,237	28,61	22,7	0,257	36,32
Hirn . . . . .	73,4	0,828	100,00	62,5	0,708	100,00
Linkes Femur . . . . .	29,2	0,330	39,78	29,1	0,330	46,56
Gesamtmenge des gewonnenen Blutes . . . . .	601,7	6,792	819,75	615,0	6,968	984,00

Die Untersuchung der Muskel- und Lebersubstanz geschah genau in derselben Weise wie im Versuch I und ergab folgende Resultate:

Untersuchung der Muskelsubstanz.

	Hund A <sub>1</sub>	Hund B <sub>1</sub>
Trockensubstanz . . . . .	92,49 } 92,65 % 92,81 }	96,03 } 95,97 % 95,90 }
Stickstoff . . . . .	11,01 } 11,02 % 11,02 }	12,65 } 12,77 % 12,89 }

<sup>1)</sup> Von dem Lebendgewicht wurde das Gewicht des Inhaltes des Darmkanals (bei A<sub>1</sub> — 80,6 g, bei B<sub>1</sub> — 84,4 g) in Abzug gebracht und die auf diese Weise gewonnene Zahl der Berechnung zugrunde gelegt.

	Hund A <sub>1</sub>		Hund R <sub>2</sub>
Fett . . . . .	— 16,28	}	10,66 10,76
			16,28 %      10,71 %

Die Glykogen-Bestimmungen ergaben folgende Zahlen:

in 81 ccm der Zuckerlösung:	0,0820 0,0836	}	0,0828 g Cu <sub>2</sub> O;    0,0714 0,0728	}	0,0721 g Cu <sub>2</sub> O
-----------------------------	------------------	---	---	---	----------------------------

und nach Umrechnung auf frische Muskelsubstanz:

Hund A <sub>1</sub>	Hund R <sub>2</sub>
0,702 % Glykogen	0,599 % Glykogen.

Der Aschengehalt der entfetteten trockenen Muskelsubstanz betrug:

4,43 %	4,24 %.
--------	---------

Der gesamte Gehalt des frischen Fleisches an Trockensubstanz:

26,84 % (direkt 27,36 %)	26,89 % (direkt 26,84 %).
--------------------------	---------------------------

Durch Umrechnung der Mittelzahlen gewinnen wir folgende

Werte:

	Trockensubstanz		Frisches Fleisch	
	Hund A <sub>1</sub>	Hund R <sub>2</sub>	Hund A <sub>1</sub>	Hund R <sub>2</sub>
Stickstoff . . . . .	11,89 %	13,31 %	3,25 %	3,57 %
Fett . . . . .	17,57 „	11,56 „	4,81 „	3,00 „
Glykogen . . . . .	2,61 „	2,23 „	0,70 „	0,60 „
Asche . . . . .	3,65 „	3,75 „	1,00 „	1,01 „

Untersuchung der Lebersubstanz.

	Hund A <sub>1</sub>		Hund R <sub>2</sub>
Trockensubstanz . . . . .	93,42 93,49	}	95,83 96,35
			93,46 %      96,09 %
Stickstoff . . . . .	8,88 8,89	}	9,33 9,40
			8,89 %      9,37 %
Fett . . . . .	8,09 8,15	}	7,59 7,61
			8,12 %      7,60 %

81 ccm der Zuckerlösung gaben:

	0,5184 0,5190	}	— 0,4074	}	0,4074 g Cu <sub>2</sub> O
--	------------------	---	-------------	---	----------------------------

und somit war der Gehalt an Glykogen in der frischen Lebersubstanz:

5,404 %	4,006 %.
---------	----------

Der gesamte Gehalt an Trockensubstanz in der frischen Leber betrug:

30,85 %	31,17 %.
---------	----------

Die Zusammensetzung der Trockensubstanz der Leber läßt sich nach den gewonnenen Mittelzahlen folgenderweise berechnen:

	Hund A <sub>1</sub>	Hund R <sub>2</sub>
Stickstoff . . . . .	9,51 %	9,75 %
Fett . . . . .	8,69 „	7,87 „
Glykogen . . . . .	17,52 „	12,85 „



Das Gekröse.

Durch 10-tägige Extraktion des grob zerschnittenen Gekröses in Flaschen mit Äther wurde je 1 l Ätherextrakt gewonnen. In 100 ccm dieses Extraktes ermittelte ich folgende Fettmengen:

<b>Hund A<sub>2</sub></b>		<b>Hund R<sub>2</sub></b>	
7,0258	}	10,6762	}
7,0348		10,6694	
	7,0303 g		10,6728 g.

Im ganzen Extrakt also:

$$7,0303 \times 10 = 70,303 \text{ g} \qquad 10,6728 \times 10 = 106,728 \text{ g.}$$

Durch die Extraktion des Rückstandes in der üblichen Weise wurde gewonnen:

$$2,344 \text{ g} \qquad 5,818 \text{ g.}$$

Die ganze extrahierbare Menge des Fettes im Gekröse betrug also: bei Hund A<sub>2</sub> — 72,647 g, bei Hund R<sub>2</sub> — 112,546 g. In Prozenten des Lebendgewichts: bei A<sub>2</sub> — 0,820 %; bei R<sub>2</sub> — 1,275 %.

Der Ausnutzungsversuch.

Wie oben erwähnt, wurde in der zweiten Periode des Versuchs II den Tieren analysiertes Fleisch gereicht und der Kot gesammelt. Dieser Versuch sollte einen Beitrag zu der Frage über die Ausnutzung des Futters bei dem arbeitenden und dem ruhenden Tiere liefern. Die gewählte Versuchsanordnung schloß freilich individuelle Unterschiede der beiden Tiere nicht aus, dennoch mögen die gewonnenen Zahlen hier Erwähnung finden. Analysiertes Fleisch wurde vom 6. II. an gereicht; am 13. II. wurde den beiden Tieren als Abgrenzungsmittel Kieselsäure und Fuchsin mit einem kleinen Teil des täglichen Futters, und nach drei Stunden das übrige Futter gereicht. Der so sehr deutlich abgegrenzte Kot wurde von diesem Tage ab bis zum Tode der Tiere gesammelt. Der Kot wurde im Wassertrockenschrank bei ca. 70° 24 Stunden lang getrocknet, nachdem er mit alkoholischer Oxalsäurelösung befeuchtet worden war. Am Ende des Versuches wurde der bei der Sektion der Tiere gewonnene Inhalt des Dick- und Mastdarms in derselben Weise getrocknet und mit dem Kote vereinigt.

Untersuchung des Fleisches.

Die Stickstoff-Bestimmung wurde im frischen Fleisch ausgeführt und dabei  $\left. \begin{matrix} 3,44 \\ 3,52 \end{matrix} \right\} 3,48 \%$  N gefunden. Die Trockensubstanz-Bestimmungen, die sowohl direkt wie indirekt gemacht worden sind, ergaben:  $\left. \begin{matrix} 26,37 \\ 25,97 \end{matrix} \right\} 26,17 \%$ .

Der Fettgehalt, auf Trockensubstanz berechnet, betrug:  $\left. \begin{matrix} 10,87 \\ 11,16 \end{matrix} \right\} 11,02\%$ .

Außerdem wurde in der Mahlerschen Bombe die Verbrennungswärme des lufttrockenen Fleisches bestimmt und dabei auf 1 g Substanz folgende Werte gefunden:

5,021 Kal.  
5,084 Kal.  
5,058 Kal.

Im Mittel also 5,054 Kal. für 1 g lufttrockenes Fleisch (mit 89,28% Trockensubstanz).

#### Untersuchung des Kotes.

Die ausgeschiedene Kotmenge betrug in frischem Zustande (samt Darminhalt): bei Hund A<sub>2</sub> — 119,4 g; bei Hund R<sub>2</sub> — 261,7 g. Diese Mengen gaben nach dem Trocknen 39,9 bzw. 82 g lufttrockene Substanz von folgender Zusammensetzung:

	Hund A <sub>2</sub>	Hund R <sub>2</sub>
Trockensubstanz . . . . .	$\left. \begin{matrix} 95,82 \\ 95,68 \end{matrix} \right\} 95,75\%$	$\left. \begin{matrix} 91,84 \\ 92,42 \end{matrix} \right\} 92,13\%$
Stickstoff . . . . .	$\left. \begin{matrix} 7,46 \\ 7,52 \end{matrix} \right\} 7,49\%$	$\left. \begin{matrix} 6,04 \\ 5,88 \end{matrix} \right\} 5,96\%$
Fett . . . . .	$\left. \begin{matrix} 8,09 \\ 8,03 \end{matrix} \right\} 8,06\%$	$\left. \begin{matrix} 7,18 \\ 7,66 \end{matrix} \right\} 7,42\%$

Auf Trockensubstanz berechnet:

Stickstoff . . . . .	7,82%	6,47%
Fett . . . . .	8,43 "	8,11 "

Es erscheint unbedenklich für die Zusammensetzung des geschälten Reises und des Schweineschmalzes, die direkt nicht untersucht worden sind, die Mittelzahlen nach J. König<sup>1)</sup> zu verwenden. So würden sich an der Hand der gewonnenen Zahlen die Verdauungs-Koeffizienten in folgender Weise berechnen lassen:

#### Hund A<sub>2</sub>.

Im Futter wurde während der 6-tägigen Versuchsperiode gereicht: 390 g Reis, 1560 g Fleisch, 118 g Schweineschmalz und darin:

	Trocken- substanz	Stickstoff	Fett
Im Reis . . . . .	338,63	5,07	5,03
" Fleisch . . . . .	408,25	54,29	44,93
" Schmalz . . . . .	117,17	0,05	116,87
Gereicht zusammen:	864,05 g	59,41 g	166,83 g
Im Kot ausgeschieden . . . . .	38,20	2,99	3,22
Somit verdaut:	825,85 g	56,42 g	163,61 g
Verdauungs-Koeffizienten . . . . .	95,58%	94,97%	98,07%

<sup>1)</sup> Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel I, 38 und 565. 1903.

**Hund R<sub>2</sub>.**

Im Futter wurde während der 8-tägigen Versuchsperiode gereicht: 640 g Reis, 2176 g Fleisch und darin:

	Trocken- substanz	Stickstoff	Fett
Im Reis . . . . .	555,72	8,33	8,26
„ Fleisch . . . . .	569,46	75,73	62,67
Gereicht zusammen:	1125,18 g	84,06 g	70,93 g
Im Kot ausgeschieden . . . . .	75,92	4,91	6,16
Somit verdaut:	1049,26 g	79,15 g	64,77 g
Verdauungs-Koeffizienten . . . . .	95,43 %	94,16 %	91,31 %

Vorstehender Versuch zeigt für den Stickstoff nur einen innerhalb der Fehlergrenzen liegenden Unterschied zwischen beiden Tieren. Die Ausnutzung des Fettes ist dagegen beim Arbeitshund sehr viel besser.

Zur Erklärung der Differenz wird man daran denken müssen, daß bei absolut geringen Fettmengen in der Nahrung, wie sie Hund R<sub>2</sub> erhielt, die ätherlöslichen Darmsekrete das Resultat erheblich beeinflussen. Dies Moment genügt aber nicht. Denn selbst wenn man das verfütterte Schmalz als absolut verdaulich rechnet, würde von dem nun gleichen übrigen Nahrungsfett 93,56 % bei A<sub>2</sub>, dagegen nur 91,31 % bei R<sub>2</sub> resorbiert sein.

Im Hinblick auf die im hiesigen Institut ausgeführten Versuche von Rosenberg (Pflügers Archiv 52, S. 401), welcher bei ruhenden und arbeitenden Hunden ganz gleiche Ausnutzung der Nahrung gefunden hat, kann dies Resultat keine allgemeine Gültigkeit beanspruchen. Wahrscheinlich beruht es auf einer individuellen Besonderheit des Hundes R<sub>2</sub>, der ja auch bei gleicher Nahrung viel weniger Fett an Muskeln und Leber zum Ansatz gebracht hat als A<sub>2</sub>. —

Im übrigen sei als Resultat der vorstehenden Arbeit folgendes hervorgehoben:

1. Weder die physikalischen Eigenschaften noch die chemische Zusammensetzung des Blutes haben unter dem Einfluß der Arbeitsperioden eine Veränderung erlitten.
2. Die Untersuchung des Wassergehalts der Organe, welche meine Hauptaufgabe bildete, spricht im Sinne einer Verarmung der Muskelsubstanz an Wasser infolge lange fortgesetzter

Arbeit. Die Wasserarmut der trainierten Muskeln war in dem einwandfreieren Versuch I recht erheblich, in Versuch II lag der Unterschied im Bereich der Fehlergrenzen. Die Annahme einer geringen Wasserverarmung wird auch durch das Verhalten des Körpergewichts während der Arbeitsperiode gestützt.

3. Eine Zunahme der Masse der arbeitenden Muskeln und des Herzens konnte nur in Versuch I nachgewiesen werden.

Angesichts der erheblichen, durch Individualität und Rasse bedingten Schwankungen der Organgewichte und auch des Wassergehalts der Organe erscheinen weitere Untersuchungen der hier angeschnittenen Frage erforderlich.

---

# Über den Einfluß der alkalischen Reaktion auf die autolytischen Vorgänge in der Leber.

Von

**Dr. med. Alexis von Drjewezki aus St. Petersburg.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität zu Berlin.)

*(Eingegangen am 28. Juni 1906.)*

Die Frage der Selbstverdauung, oder wie man sich jetzt auszudrücken pflegt, der Autolyse, wurde im Jahre 1890 von E. Salkowski<sup>1)</sup> als erstem systematisch bearbeitet. Seit der Zeit ist eine größere Reihe von Arbeiten erschienen, die die näheren Einzelheiten der Autolyse in den Geweben und Organen des tierischen Körpers behandeln. Trotzdem sind manche Einzelheiten dieses Vorganges bis jetzt noch nicht erkannt und harren ihrer Entdecker. Ohne mich eingehender mit der gesamten einschlägigen Literatur zu befassen, bezüglich deren ich aber auf die zusammenfassende Abhandlung „Über die Autolyse“<sup>2)</sup> von E. Salkowski verweise, möchte ich nur bei einer von den hierher gehörigen Untersuchungen verweilen, und zwar bei der Frage, welchen Einfluß die alkalische Reaktion auf die Autolyse ausübt.

Von grundlegender Bedeutung ist die Frage, ob die Autolyse im lebenden Organismus vor sich geht, oder ob sie nur eine dem Tode zukommende Erscheinung ist. Zur Aufklärung dieser Frage soll diese Arbeit beitragen.

---

<sup>1)</sup> Zeitschr. für klinische Medizin Bd. XVII, Supplbd. S. 77. 1890.

<sup>2)</sup> Die Deutsche Klinik Bd. XI, S. 147.

Wie bekannt, läßt man eine Autolyse in üblicher Weise in einem antiseptischen Medium in frischen Organen vor sich gehen, wobei die Flüssigkeit stets sauer reagiert. Nun haben aber, während die Zellen leben, die Flüssigkeiten, die ihnen den Stoffwechsel ermöglichen — Blut und Lymphe —, alkalische Reaktion. Daraus ergibt sich die Frage, ob die Autolyse in einem alkalischen Medium überhaupt vor sich gehen kann, ob ferner, wenn die Möglichkeit erwiesen ist, die Autolyse einen ähnlichen Verlauf nimmt, wie in einem saueren Medium, oder einen anderen.

Die ersten Untersuchungen in dieser Richtung stellte Schwiening <sup>1)</sup> an und erbrachte den Nachweis, daß die alkalische Reaktion die Autolyse aufhält und zwar anscheinend proportional dem Grade der Alkaleszenz. Leider hatte der Verfasser andere Ziele im Auge, aus welchem Grunde er die Versuche nur nebenher und nur zweimal im ganzen ausführte. So ist auch die Konzentration und die Menge der angewendeten Natriumkarbonatlösung nicht genau vermerkt und es sind auch nur Bestimmungen des als nicht koaguliertes Albumin vorliegenden Stickstoffes ausgeführt worden. Zu demselben Resultat gelangte auch Hildebrand <sup>2)</sup>. Hedin und Rowland <sup>3)</sup> zeigten, daß die alkalische Reaktion die Wirkung der proteolytischen Fermente in dem Milzsaft verschiedener Tiere aufhält. Bei ihren Versuchen entsprach die Konzentration der Alkalilösungen der des Blutes. Im vorigen Jahre erschienen dann gleichzeitig die Arbeiten von Baer und Loeb <sup>4)</sup> und von Wiener <sup>5)</sup>. In der Abhandlung der beiden an erster Stelle Genannten tauchte auch die Frage auf, welchen Einfluß die Alkaleszenz auf die Autolyse

<sup>1)</sup> „Über fermentative Prozesse in den Organen“, Virchows Archiv Bd. CXXXVI, p. 443.

<sup>2)</sup> „Zur Lehre von der Milchbildung“, Hofmeisters Beiträge 1904, V, p. 493.

<sup>3)</sup> „Untersuchungen über das Vorkommen von proteolytischen Enzymen im Tierkörper“, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiolog. Chemie XXXII, 1901, p. 531.

<sup>4)</sup> „Über die Bedingungen der autolytischen Eiweißspaltung in der Leber“, Archiv f. experimentelle Pathologie und Pharmakologie Bd. 53, Heft I. 1905.

<sup>5)</sup> „Über den Einfluß der Reaktion auf autolytische Vorgänge“, Zentralblatt f. Physiologie 1905, Bd. XIX, Nr. 11.

ausübt. Leider war bei ihren Versuchen der Gehalt an Alkalien derartig gering, daß man meiner Meinung nach auf Grundlage ihrer Ergebnisse keine unanfechtbaren Schlußfolgerungen hinsichtlich der vorliegenden Frage aufstellen kann. Die Autoren selbst nehmen an, daß die alkalische Reaktion die Autolyse bestenfalls etwas aufhält, jedenfalls aber nicht unterbricht. Wiener (a. a. O.) hingegen verwendete bei seinen Versuchen eine Lösung von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  oder  $\text{NaHCO}_3$ , deren Konzentration einem Gehalt von 0,2—0,4  $\text{NaOH}$  entsprach, also etwa der Alkaleszenz des Blutes entsprach. Auf Grund seiner Versuche kam der Verfasser zu dem Schlusse, daß eine Alkaleszenz von angeführtem Gehalte im Verlaufe von mindestens 7 Tagen die Autolyse vollständig aufhebt. Mit seiner Schlußfolgerung stellt Wiener sich auf die Seite derjenigen Forscher, die es für unmöglich halten, daß in der lebenden Zelle und im lebenden Organ die Autolyse vor sich gehen kann (Pohl, Langstein, Neubauer). Alle oben erwähnten Autoren haben sich mit der Frage nach dem Einfluß der Alkaleszenz auf die Autolyse nur nebenher beschäftigt, ohne daß deren Aufklärung ihnen Selbstzweck war. Außerdem wurden nur Gesamtstickstoffbestimmungen ausgeführt, die Autoren begnügten sich eben festzustellen, ob die Autolyse bei Anwesenheit von Alkalien stärker oder schwächer auftritt als bei Abwesenheit der Alkaleszenz. Ob aber der Prozeß in der üblichen Weise, entsprechend dem Verlauf einer gewöhnlichen Autolyse, stattfindet, oder ob er auf einem anderen, ihm eigentümlichen Wege vor sich geht, darüber finden wir keine Andeutungen in den erwähnten Arbeiten. Unter der Bezeichnung „gewöhnlicher Gang der Autolyse“ verstehe ich die Erscheinung, die wir an tierischen Organen beobachten können, wenn wir sie in einem antiseptischen Mittel ohne Zusatz von Säuren oder Alkalien sich selbst überlassen. In Hinblick auf alles, was ich bis jetzt auseinandergesetzt habe, steckte ich mir auf Anraten von Prof. E. Salkowski das Ziel, den Einfluß der alkalischen Reaktion auf die Autolyse, sowie den Verlauf dieses Prozesses unter diesen Bedingungen im Vergleich zu den gewöhnlichen einer sorgfältigeren Untersuchung zu unterwerfen.

Ich bereitete die autolytischen Lösungen nach der im hiesigen Laboratorium üblichen Methode, die oft von Salkowski selbst, wie auch von seinen Schülern erprobt und angewendet

worden ist. An dieser Stelle werde ich den allgemeinen Gang meiner Untersuchungen beschreiben, die näheren Einzelheiten und Abänderungen werde ich an der betreffenden Stelle auführen.

Käufliche Kalbsleber wurde in möglichst frischem Zustande, d. h. einige Stunden nach dem Schlachten, mittels der Fleischhackmaschine zerkleinert. Von der auf diese Weise breiförmig erhaltenen Leber wurden immer abgewogene Mengen untersucht. Als Grundlage für die in antiseptischem Mittel auszuführende Autolyse diente Chloroformwasser.

Der Gang der Untersuchung war folgender:

Versuch A. In eine 1,5 l fassende weithalsige Flasche mit eingeschliffenem Stopfen wurden 100 g kleingehackte Leber mit 1 l destilliertem Wasser unter Zusatz von 7,5 ccm Chloroform gut durchgeschüttelt.

Versuch B. In einem ebensolchen Gefäß wurden von demselben Leberbrei 100 g mit 1 l Chloroformwasser verührt. Dazu wurde eine weiter unten bemerkte Menge Natriumcarbonat zugegeben und gut gemischt.

Versuch C. Man verfuhr wie bei B und benutzte dieselbe Menge Natriumcarbonat, nur das man die gehackte Leber vor dem Einbringen in das Autolysengefäß kochte, um die Fermente zu vernichten.

Alle drei Flaschen wurden dann gleichzeitig in einen auf 37—40° gehaltenen Brutschrank gestellt und dort 70—72 Stunden unter öfterem Schütteln belassen. Außerdem wurden gewöhnlich noch 100 g gehackte Leber in schwach essigsaurer Lösung aufgeköcht und sofort verarbeitet.

Nach Beendigung der Autolyse reagierte die Flüssigkeit des Versuches A immer sauer, in B und C aber alkalisch. Die Portionen B und C wurden mittels verdünnter Schwefelsäure schwach angesäuert. Dann wurde der Inhalt der drei Flaschen gleich lange Zeit hindurch gekocht, um das durch Hitze koagulierbare Eiweiß abzuschneiden. Nach dem Abkühlen wurden die Mengen auf je 1 l (einschließlich fester Substanz) gebracht und durch ein trockenes Filter in einen mit Marke versehenen Kolben von genau 800 ccm Inhalt filtriert. Nach eintägigem Stehen eingedampft, auf etwas weniger als 400 ccm mit Wasser



verdünnt, in einen Meßkolben von 400 ccm quantitativ übergeführt, auf 400 ccm genau nachgefüllt und wiederum durch ein trockenes Filter filtriert. Auf diese Weise wurde eine konzentriertere, von koagulierbaren Substanzen freie Lösung erhalten, und zwar in A nach gewöhnlicher Autolyse, in B nach einer in derselben Zeit in alkalischer Lösung verlaufenen Autolyse, in C endlich nur die Produkte einer Hydrolyse, da die Fermente durch vorheriges Kochen zerstört worden waren. Aus D wurde eine Lösung erhalten, die noch stickstoffhaltige, nicht mehr koagulierbare Substanzen der frischen Leber enthielt.

Was die chemische Analyse selbst betrifft, so bestimmte ich den Gesamtstickstoff nach der Kjeldahlschen Methode. Zu diesem Zwecke wurden je 2 Proben von je 20 ccm entnommen, mit konzentrierter Schwefelsäure verbrannt, der Stickstoff in Ammoniak überführt und als solcher titrimetrisch mit  $\frac{1}{10}$  Normal-Schwefelsäure bestimmt. Das Mittel aus beiden Bestimmungen wurde auf 1 kg Leber umgerechnet. Darauf wurde der sogenannte Monaminsäuren-Stickstoff auf folgende Weise bestimmt. 50 ccm Lösung wurden mit 5 ccm verdünnter Salzsäure ausgesäuert und darauf eine 10 %ige Phosphorwolframsäurelösung solange zugesetzt, bis kein Niederschlag mehr entstand. Im Niederschlag befanden sich alle möglichen stickstoffhaltigen Substanzen. Filtrat samt Niederschlag wurden mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen gebracht, durch ein trockenes Filter filtriert, dem Filtrat mittels einer Pipette eine bekannte Menge Flüssigkeit entnommen und darin der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt und auf 1 kg Leber berechnet. Außerdem bestimmte ich die Menge des als Albumosen vorliegenden Stickstoffs. Zu diesem Zweck wurden 50 ccm Flüssigkeit mit 1 ccm verdünnter Schwefelsäure angesäuert und dann mit pulverisiertem Zinksulfat gesättigt nach der Vorschrift von K. Baumann und Bömer<sup>1)</sup>. Nach den Angaben von Rosenberg<sup>2)</sup> dauert die Sättigung 24—28 Stunden. Der so erhaltene Albumosenniederschlag wurde filtriert, an der Luft ein wenig

---

<sup>1)</sup> Zitat nach Zunz, Zeitschr. f. physiolog. Chemie Bd. 27, p. 219.

<sup>2)</sup> „Über den Umfang der Eiweißverdauung im menschlichen Magen unter normalen und pathologischen Verhältnissen“, Zeitschr. für klinische Medizin Bd. 76, Heft 5, 6, p. 1.

getrocknet und mit dem Filter nach Kjeldahl verbrannt, der Stickstoff bestimmt und auf 1 kg Leber umgerechnet. Ich halte es nicht für überflüssig, hierbei zu bemerken, daß, wenn man die Waschflüssigkeit von der Albumosenfällung sorgfältig ablaufen läßt und zur Verbrennung Schwefelsäure von 1,84 spez. Gew. anwendet, die Verbrennung ruhig und ohne zu stoßen vonstatten geht. Wenn aber der Albumosenniederschlag noch mit einer gewissen Menge Flüssigkeit vermenget ist, dann muß man diese erst auf dem Wasserbad eindampfen, sonst kommt es häufig vor, daß der Kjeldahlkolben springt. Selbstverständlich muß man sich bei diesen Analysen vorher vergewissern, daß das anzuwendende Zinksulfat frei von Ammonsalzen ist. Endlich bestimmte ich den Stickstoff, der in den Purinbasen enthalten war. Zu diesem Zwecke wurden 100 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit mit einigen Tropfen Ammoniak alkalisch gemacht, von den ausgefällten Phosphaten abfiltriert, und im Filtrat die Purinbasen mit 3 %iger ammoniakalischer Silbernitratlösung gefällt. Nach 6—12stündigem Stehen an einem dunkeln Orte wurde abfiltriert, der Niederschlag gut gewaschen und darauf der Stickstoff bestimmt und auf 1 kg Leber umgerechnet. So wurde bestimmt:

1. Gesamtstickstoff,
2. Sog. Monoaminosäurenstickstoff,
3. Albumosenstickstoff,
4. Purinbasenstickstoff.

Die Differenz zwischen dem Gesamtstickstoff und der Summe von 2, 3 und 4 ergibt den Stickstoff der Diaminosäuren, der Peptone und des Ammoniaks.

In folgenden Tabellen sind die Resultate meiner Versuche enthalten.

#### Versuch I.

Dauer der Autolyse 72 Stunden. Portion C wurde 5 Minuten lang vor dem Einstellen in den Brutschrank gekocht, um die Fermente abzutöten. Nach Beendigung der Autolyse wurden alle Portionen 10 Minuten lang gekocht.

auf 1 Kilo berechnet	A ohne Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		B mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		C mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , ohne Fermente	
	g	% des Ge- samt-N	g	% des Ge- samt-N	g	% des Ge- samt-N
Gesamtstickstoff . . . .	6,370		3,7975		4,2875	
Monoaminosäuren . . . .	3,906	61,31	1,827	48,10	1,491	34,77
Albumosen . . . . .	0,518	8,13	0,616	16,22		
Purinbasen . . . . .	1,015	15,93	0,714	18,80	0,056	1,30
Diaminosäuren u. Peptone	0,931	14,63	0,6405	16,88		

Die Resultate A, B und C sind nur unter Vorbehalt miteinander vergleichbar, weil C im ganzen 15 Minuten gekocht hatte, während A und B nur 10 Minuten gekocht hatten.

Versuch II.

Dauer der Autolyse 72 Stunden. Portion C wurde 5 Minuten vor dem Einbringen in den Thermostaten gekocht. A und B wurden nach der Autolyse 5 Minuten lang dem Sieden unterworfen.

	A ohne Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		B mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		C mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , ohne Fermente		D sofort koa- guliert
	g	% des Ge- samt-N	g	% des Ge- samt-N	g	% des Ge- samt-N	g
Gesamtstickstoff .	5,9763		3,770		3,815	—	2,975
Monoaminosäuren .	3,612	60,44	1,995	52,91			
Albumosen . . . .	0,560	9,37	0,588	15,59			
Purinbasen . . . .	0,924	15,36	0,651	17,27			
Diaminosäuren und Peptone . . . .	0,880	14,83	0,536	14,23			

Versuch III.

Dauer der Autolyse 72 Stunden. Alle Portionen werden im ganzen je 6 Minuten gekocht, C 2 Minuten vor, 4 nach der Autolyse.

Tabelle S. 236.

	A ohne $\text{Na}_2\text{CO}_3$		B mit $\text{Na}_2\text{CO}_3$ mit Fermenten		C mit $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ohne Fermente		D sofort koa- guliert	
	g	% des Ge- samt-N	g	% des Ge- samt-N	g	% des Ge- samt-N	g	% des Ge- samt-N
Gesamtstickstoff .	6,545		4,1125		3,570		3,15	
Monoaminosäuren .	4,022	61,60	2,184	53,16	1,722	48,23		
Albumosen . . .	0,490	7,48	0,532	19,93	0,601	16,83	0,756	24,00
Purinbasen . . .	0,826	12,62	0,490	11,91	0,049	1,37		
Diaminosäuren und Peptone . . .	1,197	18,3	0,9065	15,00	1,198	33,57		

## Untersuchungen mit einer 3%-igen Sodalösung.

## Versuch IV.

Dauer der Autolyse 72 Stunden. Dauer des Siedens wie oben.

	A ohne $\text{Na}_2\text{CO}_3$ mit Fermenten		B mit $\text{Na}_2\text{CO}_3$ mit Fermenten		C mit $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ohne Fermente		D sofort koa- guliert	
	g	% des Ge- samt-N	g	% des Ge- samt-N	g	% des Ge- samt-N	g	% des Ge- samt-N
Gesamtstickstoff .	5,215		3,3775		3,6975		2,240	
Monoaminosäuren .	2,919	55,97	1,680	49,74	1,512	40,89	1,378	59,06
Albumosen . . .	0,448	8,59	0,574	16,99	0,686	18,55	0,378	16,87
Purinbasen . . .	0,777	14,89	0,462	12,49	0,021	0,57	0,238	10,62
Diaminosäuren und Peptone . . .	1,071	20,55	0,6615	20,78	1,4785	39,99	0,301	13,45

## Versuch V.

Dauer der Autolyse 72 Stunden. Dauer des Siedens je 5 Minuten.

	A ohne $\text{Na}_2\text{CO}_3$ mit Fermenten		B mit 0,3% $\text{Na}_2\text{CO}_3$ mit Fermenten		C mit $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ohne Fermente		D sofort koa- guliert	
	g	% des Ge- samt-N	g	% des Ge- samt-N	g	% des Ge- samt-N	g	% des Ge- samt-N
Gesamtstickstoff .	6,380		3,9725		3,570		2,555	
Monoaminosäuren .	3,759	58,92	1,680	42,29	1,491	41,76	1,302	50,96
Albumosen . . .	0,518	8,12	0,896	22,55	0,938	26,27	0,602	23,56
Purinbasen . . .	0,938	14,70	0,476	11,98	0,042	1,17	0,035	1,37
Diaminosäuren und Peptone . . .	1,165	18,26	0,9205	23,18	1,099	30,80	0,616	24,11

Versuche mit einer Alkaleszenz, welche die des Blutes übersteigt.

Versuch VI.

Dauer der Autolyse 70 Stunden. Dauer des Siedens je 6 Minuten.

	A ohne Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> mit Fermenten		B mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> mit Fermenten		C mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ohne Fermente		D sofort koaguliert	
	g	% des Gesamt-N	g	% des Gesamt-N	g	% des Gesamt-N	g	% des Gesamt-N
Gesamtstickstoff .	5,600		3,5875		3,2375		2,450	
Monoaminosäuren .	3,339	59,62	1,596	44,48	1,470	45,40	1,281	52,29
Albumosen . . .	0,378	6,75	0,910	25,36	0,812	28,08	0,504	20,57
Purinbasen . . .	0,826	14,75	0,035	0,92	0,028	0,87	0,014	0,57
Diaminosäuren und Peptone . . .	1,071	18,88	1,0465	29,24	0,9275	28,65	0,651	26,57

Wenn man also ein Medium von 0,5 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Alkaligehalt anwendet, so ergibt sich eine vollständige Übereinstimmung in dem prozentualen Verhältnis aller Zahlen in den Portionen B und C, d. h. eine Autolyse findet bei diesem Gehalt an Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> nicht mehr statt.

Zur deutlicheren Veranschaulichung meiner Ergebnisse hielt ich es für angebracht, eine kombinierte Tabelle zusammenzustellen; sie enthält die Zahlen des Gesamtstickstoffs in Gramm.

Gesamtstickstoff.

	A ohne Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		D sofort koaguliert
		B mit Fermenten	C ohne Fermente	
		0,2 %	0,2 %	
Versuch I	6,370	3,7975	4,2875	
" II	5,976	3,770	3,815	2,975
" III	6,545	4,1125	3,570	3,150
		0,3 %	0,3 %	
Versuch IV	5,215	3,3775	3,6975	2,240
" V	6,380	3,9725	3,5700	2,555
		0,5 %	0,5 %	
Versuch VI	5,600	3,5875	3,2375	2,450

Diese Tabelle zeigt deutlich, daß die Eiweißkörper unter dem Einfluß der Alkalien bedeutend langsamer gespalten werden. Vergleicht man nun Kolumne B mit C, d. h. die Autolyse in einem alkalischen Mittel mit der alleinigen Wirkung der Hydrolyse ohne Fermente, so scheint es, als ob die Fermente hierbei gar keine Rolle spielen, weil die Zahlen, die die Menge des Gesamtstickstoffes angeben, fast gleich sind, vielleicht, daß die Fermentwirkung ein kleines Plus verursacht. Bei dieser Aufstellung übergehe ich den Versuch I, wo eine beträchtliche Differenz im entgegengesetzten Sinne vorliegt, die, wie ich schon andeutete, wahrscheinlich darin ihre Begründung findet, daß Portion C länger als die übrigen gekocht hatte. Solche Ergebnisse koinzidieren vollständig mit den Angaben von Wiener (a. a. O.), der darum auch die Tätigkeit der autolytischen Fermente in einem alkalischen Medium, dessen Gehalt etwa dem des Blutes entspricht, verneint. Dennoch muß man eine derartige Anschauung fallen lassen, wenn man sich nicht nur an die Zahlen des Gesamtstickstoffes hält, sondern sein Augenmerk auf die Art der Eiweißspaltung richtet, nämlich auf das quantitative Verhältnis der verschiedenen stickstoffhaltigen Körper zueinander bei Anwesenheit von Fermenten und bei ihrer Abwesenheit.

## Stickstoff der Monoaminosäuren-Fraktion in g.

	A ohne $\text{Na}_2\text{CO}_3$	Mit $\text{Na}_2\text{CO}_3$		D sofort koaguliert
		B mit Fermenten	C ohne Fermente	
		0,2 %	0,2 %	
Versuch I	3,906	1,827	1,491	
"  II	3,612	1,995	nicht bestimmt	
"  III	4,032	2,184	1,722	
		0,3 %	0,3 %	
Versuch IV	2,919	1,680	1,512	1,323
"  V	3,759	1,680	1,491	1,302
		0,5 %	0,5 %	
Versuch VI	3,339	1,596	1,470	1,281

**Gehalt an Purinbasen.**  
(Die Zahlen geben Stickstoff in g an.)

	A ohne Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		D sofort koa- guliert
		B mit Fermenten	C ohne Fermente	
		0,2 %	0,2 %	
Versuch I	1,015	0,714	0,056	
"  II	0,924	0,651	?	
"  III	0,826	0,490	0,049	
		0,3 %	0,3 %	
Versuch IV	0,777	0,462	0,021	0,238
"  V	0,938	0,476	0,042	0,035
		0,5 %	0,5 %	
Versuch VI	0,826	0,035	0,028	0,014

Wir bemerken beständig eine deutliche Steigerung der Monoaminosäuremenge und eine außerordentliche, in die Augen fallende Zunahme der Purinbasen in der Kolonne B, wenn wir sie mit Spalte C vergleichen; d. h. es bilden sich mehr Aminosäuren und Purinbasen bei der Eiweißspaltung, wenn die Fermente wirksam sind, als bei der Wirkung des Alkalis allein. Was andererseits die Albumosen und die Diaminosäuren + Peptone betrifft, so ist ihre Menge bei Fermentwirkung entsprechend geringer als bei Ausschluß letzterer.

**Gehalt an Albumosen.**  
(Die Zahlen geben Stickstoff in g an.)

	A ohne Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		D sofort koa- guliert
		B mit Fermenten	C ohne Fermente	
		0,2 %	0,2 %	
Versuch I	0,518	0,616	—	—
"  II	0,560	0,588	—	—
"  III	0,490	0,532	0,601	0,756
		0,3 %	0,3 %	
Versuch IV	0,448	0,574	0,686	0,378
"  V	0,518	0,896	0,938	0,602
		0,5 %	0,5 %	
Versuch VI	0,378	0,910	0,812	0,504

## Gehalt an Diaminosäuren und Peptonen.

(Die Zahlen geben Stickstoff in g an.)

	A ohne $\text{Na}_2\text{CO}_3$	Mit $\text{Na}_2\text{CO}_3$		D sofort koaguliert
		B mit Fermenten	C ohne Fermente	
		0,2 %	0,2 %	
Versuch I	0,931	0,6405	—	
„ II	0,8802	0,536	—	
„ III	1,197	0,9065	1,198	
		0,3 %	0,3 %	
Versuch IV	1,071	0,6675	1,4785	0,301
„ V	1,165	0,9205	1,099	0,616
		0,5 %	0,5 %	
Versuch VI	1,071	1,0465	0,9275	0,651

Aus allen diesen Tabellen geht zweifellos hervor, daß die Autolyse in einem alkalischen Mittel von der Konzentration 0,2—0,3 % stattfindet, und zwar in derselben Weise wie unter gewöhnlichen Bedingungen, nur tritt die autolytische Wirkung weniger stark hervor. Wenn nun die Alkaleszenz die Autolyse verlangsamt, so ergibt sich daraus die Frage, wie weit man die Konzentration treiben muß, um die Tätigkeit der Fermente aufzuheben. Aus meinen Versuchen kann man ersehen, daß die Grenze der Alkaleszenz nicht weit von dem Gehalte des Blutes an basisch reagierenden Stoffen entfernt ist. Aus der Tabelle, die zum Versuche VI gehört, ist ersichtlich, daß bei einer Alkaleszenz von 0,5 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  die absoluten Werte sowohl für den Gesamtstickstoff als auch für die übrigen stickstoffhaltigen Körper nur überaus wenig voneinander abweichen. Was aber den Gang der Spaltung betrifft, den man besser in dem prozentualen Verhältnis zwischen den einzelnen Körpern zu dem Gesamtstickstoff überblicken kann, so sind die Verhältnisse bei Fermentwirkung sowie bei Ausschluß derselben fast die gleichen, ihre Abweichungen liegen innerhalb der Fehlergrenze.

Bei meiner Arbeit begegnete ich einigen Tatsachen, die mit den Literaturangaben in Widerspruch stehen. Das veranlaßte mich, einige Kontrollversuche anzustellen, über die ich kurz zu berichten nicht für unangebracht halte. Wie man aus den beigelegten Tabellen ersehen kann, vermochte ich immer bei



der Autolyse eine verhältnismäßig beträchtliche Menge Albumosen feststellen (0,378—0,896 N entsprechen etwa 2,268 bis 5,376 Albumosen). Andere Autoren dagegen (Salkowski, Jakobi, Biondi), die den autolytischen Prozeß in der Tierleber erforscht haben, fanden Albumosen entweder gar nicht oder nur in Spuren. Vor allem taucht der Verdacht auf, ob diese Erscheinung nicht ihre Ursache in einem Fehler der von mir angewandten Methode hat, ob nämlich das Zinksulfat in gesättigter Lösung auch noch andere stickstoffhaltige Körper ausfällt, z. B. Purinbasen.

Die auf oben beschriebene Weise erhaltenen Albumosen wurden in Wasser gelöst. Dabei blieb ein geringer Rückstand, der abfiltriert und in mäßig konzentrierter Natronlauge gelöst wurde. Beide Lösungen, sowohl die der Albumosen als auch des Niederschlages, gaben eine negative Reaktion auf Purinbasen. Ich wiederholte die Probe, um festzustellen, ob in dem durch ammoniakalisches Silbernitrat nicht niedergeschlagenen Anteilen Purinbasen enthalten wären. Die Albumoselösung wurde  $\frac{1}{2}$  Stunde mit Salpetersäure gekocht und nach dem Erkalten wiederum auf Anwesenheit von Purinbasen mittels ammoniakalischem Silbernitrat geprüft. Die Probe fiel negativ aus. Man mußte also noch die durch Zinksulfat ausgefallenen Körper darstellen, um ihre chemische Natur nach Möglichkeit zu ergründen.

1 kg Kalbsleber wurde mit 10 l Chloroformwasser übergossen und 70 Stunden lang einer gewöhnlichen Autolyse überlassen, wobei die Reaktion schwach sauer wurde. Danach wurde das Gemisch 3 Minuten gekocht, vom koagulierten Eiweiß und den übrigen festen Anteilen abfiltriert und das Filtrat auf 1 l eingedampft, welches man sodann mit 25 ccm verdünnter Schwefelsäure ansäuerte. Bei Zusatz von Zinksulfatpulver erfolgte rasch ein Niederschlag (A). Da nun der Niederschlag bei dem zunächst in geringer Menge angewandten Zinksulfat nicht aus Albumosen bestehen konnte, wurde die Lösung zur weiteren Untersuchung abfiltriert und nochmals gekocht. Das Filtrat wurde mit Zinksulfat vollständig gesättigt, worauf ein weiterer Niederschlag (B) erhalten wurde, der sorgfältig mit gesättigter Zinksulfatlösung ausgewaschen wurde.

Der Niederschlag A wurde in Wasser unter Zusatz von NaOH gelöst, filtriert, durch Salzsäure gefällt, zum besseren

Absetzen mit Alkohol versetzt, abfiltriert, mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Der Niederschlag zeigte Nukleoalbuminreaktion, d. h. es wurde die Anwesenheit von Phosphor festgestellt, und durch den positiven Ausfall der Xanthoproteinreaktion und Millonschen Reaktion war der Eiweißcharakter des Niederschlages konstatiert worden. Die Orzinreaktion war undeutlich.

Der sehr voluminöse Niederschlag B löste sich ganz in Wasser unter Erwärmen auf. Diese Lösung wurde durch Eindampfen konzentriert, mit 93 % Alkohol versetzt, der erhaltene Niederschlag abfiltriert, nochmals gelöst, dann wieder mit absolutem Alkohol gefällt, abfiltriert, mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Der erhaltene sehr feine Niederschlag gab alle Albumosenreaktionen:

1. er löste sich vollständig in Wasser;
2. beim Erhitzen blieb die mit Essigsäure angesäuerte Lösung klar;
3. die Probe mit gesättigter Kochsalzlösung war positiv, die entstandene Trübung verschwand beim Erwärmen und trat beim Erkalten wieder auf;
4. Biuretkation positiv;
5. Xanthoproteinreaktion schwach positiv.

Demnach entstehen bei der gewöhnlichen Autolyse Albumosen in ganz beträchtlichen Mengen, allerdings mit dem Vorbehalt, daß bei der Abscheidung der Albumosen durch Zinksulfat auch Spuren von Nukleoalbumin auftreten, das durch Kochen mit Essigsäure noch nicht koaguliert wurde. Ferner möchte ich bemerken, daß in der Autolysenflüssigkeit die Biuretkation direkt nicht ausführbar ist. Bedingt wird meiner Meinung nach letztere Erscheinung durch die große Verdünnung der Albumosenlösung, hauptsächlich aber durch die bernsteingelbe Farbe der Flüssigkeit, welche die Biuretkation verdeckt. Es ist möglich, daß obige Erscheinung der Grund ist, weshalb meine Beobachtungen mit denen anderer Autoren nicht übereinstimmen.

Ferner fielen mir bei meiner Arbeit die hohen Werte für den Stickstoff der Monoaminosäurenfraktion auf, die 61,31 % des Stickstoffes für sich beanspruchen. Um die von mir angewandte Methode zur Bestimmung der Monoaminosäuren auf

ihre Zuverlässigkeit zu prüfen, unternahm ich einige Kontrollversuche.

Albumosen, Peptone und Ammon werden von Phosphorwolframsäure vollständig ausgefällt. Weiterhin geht aus meinen Versuchen hervor, daß, der allgemeinen Annahme entsprechend, auch die Purinbasen durch Phosphorwolframsäure gefällt werden, so daß man sie im Filtrat weder in latenter noch in manifester Form neben den Monoaminosäuren antreffen kann. Schließlich konnte man annehmen, daß ein derartig reichliches Vorkommen der Monoaminosäuren von Prozessen abhängig ist, die in der Kalbsleber von dem Augenblick des Todes bis zum Beginn der Autolyse stattfinden. Um diese Frage zu entscheiden, unterzog ich eine Hundeleber unmittelbar nach dem Tode des Tieres der Analyse. Der Hund wurde im Laboratorium getötet, die Leber sofort entnommen, sofort mit Wasser extrahiert, auskoaguliert etc.; es wurden folgende auf 1 kg umgerechnete Zahlen festgestellt:

Gesamtstickstoff . . . . .	3,08
Monoaminosäuren . . . . .	1,806 = 58,64 %
Albumosen . . . . .	0,686 = 22,27 „
Purinbasen . . . . .	0,105 = 3,41 „
Diaminosäuren und Peptone	0,483 = 15,68 „

Diese Resultate widersprechen den Versuchen an käuflicher Leber durchaus nicht (vergl. die Zahlen in den Versuchen V, VI D).

Die Größe der Monoaminosäurenfraktion widerspricht allen unseren bisherigen Vorstellungen über das Vorkommen von Monoaminosäuren in den normalen Organen. Es ist nun von vornherein einleuchtend, daß der Ausdruck „Stickstoff der Monoaminosäuren“ in diesem Falle nur einen Sammelbegriff darstellt, unter den alles fällt, was an löslichen stickstoffhaltigen Substanzen in der Leber vorhanden und nicht durch Phosphorwolframsäure fällbar ist. Dahin gehört von bekannten Körpern u. a. der Harnstoff, das Taurin, das man in der Regel nicht im Sinne hat, wenn man von Monoaminosäuren spricht, ferner die stickstoffhaltigen Gallensäuren, die mindestens nicht vollständig durch Phosphorwolframsäure fällbar sind. Dazu mögen noch manche andere unbekannte Körper kommen. Ja! es ist noch gar nicht einmal bestimmt erwiesen, ob sich in dieser

„Monoaminosäurenfraktion“ überhaupt Monoaminosäuren befinden. Diese Frage läßt sich mit Hilfe der neuen Naphthylcyanat-Methode von Neuberg und Manasse<sup>1)</sup> leicht entscheiden.

170 g Leber eines eben getöteten Hundes wurden mit 1,7 l Wasser ausgekocht, filtriert und auf ca. 75 ccm eingeeengt, von dem dabei Ausgefallenen abfiltriert. Das Filtrat wurde mit Phosphorwolframsäure total ausgefällt, der entstandene Niederschlag am nächsten Tage abfiltriert, aus dem Filtrat der Überschuß von Phosphorwolframsäure mit Barytwasser und dessen Überschuß mit verdünnter Schwefelsäure entfernt. Es resultierte eine wasserklare Flüssigkeit, die keine sichere Schwefelbleiprobe und negative Millonsche und Biuret-Reaktion ergab, aber Kupferoxyd mit tiefblauer Farbe löste.

Nach Konzentration auf ca. 20 ccm wurde mit verdünnter Natronlauge zunächst neutralisiert und dann wurden 25,0 ccm n-NaOH zugesetzt und mit  $\alpha$ -Naphthyl-iso-cyanat behandelt, von dem 4 g angewendet wurden.

Nach 1 $\frac{1}{2}$ stündigem Stehen wurde filtriert und das Filtrat mit verdünnter Salzsäure angesäuert. Sofort fiel ein dichter weißer Niederschlag aus, der sich beim Stehen an der Luft schwach violettstichig färbte. Am nächsten Tage wurde dieser aus den  $\alpha$ -Naphthylcyanaten der Monoaminosäuren bestehende Niederschlag auf einer kleinen Nutsche abgesaugt, mit kaltem Wasser, dann mit 10% Alkohol enthaltendem Äther und schließlich reichlich mit reinem Äther gewaschen. Dabei nahm die Fällung eine fast rein weiße Färbung an. Nach Trocknung im Vakuum wog sie 1,84 g.

Durch Lösung in heißem Ammoniak unter Zusatz einer Spur Alkohol, Filtration von einer minimalen Trübung und Zugabe von Ba-Acetatlösung wurde auf Glykokoll geprüft. Von dem schwer löslichen Ba-Salz des  $\alpha$ -Naphthylcyanatglykokolls



schied sich eine kleine Menge aus = 0,0134 g. Damit ist der Nachweis des Glykokolls geliefert.

Das Filtrat wurde abermals mit verdünnter Salzsäure ausgefällt, abgesaugt, mit Wasser, Alkohol-Äther und reinem Äther getrocknet. Es hinterbleiben dann die  $\alpha$ -Naphthylhydantoin-

<sup>1)</sup> Ber. d. deutschen chem. Ges. **38**, 2359. 1905.

säuren als rein weißes Pulver, in dem das Gemisch der Monoaminosäuren außer dem Glykokoll und dem Tyrosin vorhanden sein muß. Der Schmelzpunkt lag nicht ganz scharf bei 157—162,5°; die Menge betrug 1,08 g.

Eine Bestimmung des Stickstoffs nach Dumas ergab einen N-Gehalt = 9,11 %.

Die Zahl stimmt angenähert aus  $\alpha$ -Naphthylisocyanatleucin, das 9,33 % N enthält. Auch der Schmelzpunkt liegt dem der Leucinverbindung nahe; für diesen geben Neuberg und Manasse 163,5° an. Demnach kann man annehmen, daß von den wirklichen Aminosäuren der „Monoaminosäuren-stickstofffraktion“ der Hauptanteil auf „Leucin“ entfällt.

Am Schlusse meiner Arbeit angelangt, möchte ich noch einmal bemerken, daß die Autolyse, wie aus meinen Versuchen hervorgeht, auch in alkalischer Lösung, deren Gehalt dem des Blutes entspricht, vor sich geht, nur daß der Prozeß viel langsamer verläuft als in saurer Lösung, indem er aber trotzdem seinen ihm eigentümlichen Charakter bewahrt. Meine Resultate stehen offenbar mit den theoretischen Erwägungen in Einklang. Und in der Tat will es nicht recht einleuchten, warum ein vorhandenes Ferment während des ganzen Lebens der Gewebe und Organe zur Untätigkeit verurteilt sein soll, um erst nach dem Tode in Wirksamkeit zu treten. Es ist darum auch erklärlich, daß die Erscheinung dem Zwecke entsprechend langsam vor sich geht. Solange irgend ein Organ, irgend ein Gewebe noch lebt, solange die lebende Zelle von alkalisch reagierenden Säften, Blut und Lymphe, von ihnen Nahrung empfangend, umspült wird, solange werden auch die Fermente nur schwach wirken, in dem Maße, als die Zelle danach verlangt, unlösliche Eiweißkörper in Lösung zu bringen, um sie beim Stoffwechsel als Abfallstoffe zu entfernen. So dient also die in den lebenden Geweben, also in alkalisch reagierenden Medien, stetig, aber langsam stattfindende Autolyse dazu, den Organismus von abgestorbenen Stoffen zu befreien, die ihm schädlich, zum mindesten aber nur unnötig sein können.

Zum Schlusse sei es mir noch gestattet, Herrn Prof. E. Salkowski für seine freundliche Unterstützung bei Ausführung der Arbeit meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

---

## Über den Gehalt des Eidotters an Lecithin.

Von

**Dr. Armand Manasse,**

Volontärassistent der Abteilung.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts  
der Universität zu Berlin.)

*(Eingegangen am 30. Juni 1906.)*

Angesichts der großen Bedeutung, welche in neuerer Zeit von verschiedenen Seiten dem Lecithin für die Ernährung zugeschrieben wird — ob mit Recht oder Unrecht mag hier unerörtert bleiben — ist es gewiß eine höchst auffallende Tatsache, daß quantitative Bestimmungen des Lecithins im Eidotter, von einer älteren Angabe abgesehen, nicht vorliegen. Auf Veranlassung von Herrn Prof. E. Salkowski, der mich auf diesen Tatbestand aufmerksam machte, habe ich diese Lücke durch einige Bestimmungen auszufüllen gesucht.

In den Lehrbüchern findet sich meines Wissens eine Angabe über den Lecithingehalt des Eidotters nicht, dagegen ist eine solche in den „Vereinbarungen über einheitliche Untersuchung und Beurteilung von Nahrungs- und Genußmitteln usw., Berlin, Verlag von J. Springer 1897“, enthalten. In dem betreffenden, über Eier handelnden, von A. Kossel und Weigmann bearbeiteten Abschnitt in Heft I, S. 52 heißt es: „Der Dotter der unbebrüteten Hühnereier enthält nach Parke etwa 52,8 % feste Stoffe, darin 15,6 % Eiweiß, 10,7 % Lecithin, 22,8 % Fett, 1,7 % Cholesterin, 0,35 % lösliche Salze und 0,61 % unlösliche Salze“.

Die Arbeit von Parke, auf welche sich diese Angaben stützen, ist in den von Hoppe-Seyler herausgegebenen

„Medizinisch-chemischen Untersuchungen, Berlin 1866, Verlag von A. Hirschwald“ unter dem Titel „Über die chemische Konstitution des Eidotters“ (S. 209) erschienen. Von Lecithin ist in dieser Arbeit allerdings nicht die Rede; das konnte auch nicht sein, denn das Lecithin war damals noch nicht bekannt. Parke bezog deshalb den Phosphorgehalt auf das von Liebreich im Gehirn entdeckte Protagon, dessen Quantität im frischen Eidotter er zu 27,45 % berechnet. Diesen „Protagongehalt“ haben die genannten Autoren auf Lecithin umgerechnet. Die Angabe von Parke stützt sich auf eine einzige Untersuchung von drei gemischten Eidottern!<sup>1)</sup> Das ist alles, was in der Literatur über diesen so wichtigen Gegenstand vorliegt.

Das Lecithin läßt sich bekanntlich nicht quantitativ von den Fetten trennen und als solches wägen, wir sind vielmehr darauf angewiesen, das Lecithin mit Alkohol resp. Äther-Alkohol zu extrahieren, den Phosphorgehalt dieses Auszuges, der zuverlässig von Phosphaten frei sein muß, nach dem Schmelzen mit Salpetermischung zu bestimmen. Aus dem Phosphorgehalt wird dann mit Zugrundelegung eines vereinbarten Faktors die Quantität des Lecithins berechnet. Ich lasse nunmehr meine Versuche folgen.

#### Versuch I.

14,38 g vom Eiweiß getrennten Eidotters wurden wiederholt mit warmem Alkohol absolut. (ca. 80—100°) extrahiert, bis der alkoholische Auszug farblos war. Von diesem letzten Auszuge wurden 50 ccm mit 100 ccm Äther versetzt einen Tag lang stehen gelassen, darauf von dem entstandenen, übrigens minimalen Niederschlag abfiltriert, das Filtrat verdampft und der beim Verdampfen bleibende Rückstand qualitativ auf Phosphor untersucht. Das Resultat war ein negatives, ein Beweis dafür, daß das Eigelb durch die vorangegangene Extraktion mit Alkohol vollkommen erschöpft war.

Es fragt sich nun, ob in die Alkoholauszüge Phosphate übergehen. Zur Prüfung wurden ca. 50 ccm des im ganzen 310 ccm betragenden alkoholischen Auszuges verdunstet, mit 10 ccm Alkohol wieder aufgenommen, mit 20 ccm Äther versetzt und stehen

---

<sup>1)</sup> Es ist außerdem noch Eidotter am 10. und 17. Tage der Bebrütung untersucht, doch kommt dieses hier nicht in Betracht.

gelassen. Das vom entstandenen Niederschlag Abfiltrierte wurde zur quantitativen Phosphorbestimmung verwandt. Die Untersuchung des Niederschlages ergab übrigens, daß er keine Phosphate enthielt. Es ergibt sich also, daß wenn man sehr erhebliche Quantitäten Alkohol absolut. für kleine Mengen Eidotter nimmt, Phosphate nicht nachweisbar in Lösung gehen. Natürlich müssen die Lösungen ganz klar filtriert sein. Sehr häufig wurde übrigens trotzdem noch der zur quantitativen Bestimmung genommene Anteil des Alkoholauszuges mit dem doppelten Volumen Äther versetzt, um etwaige Phosphate auszufällen. Dabei entstanden mitunter ganz minimale Niederschläge, die jedoch frei von Phosphorsäure und organischem Phosphor waren. Von dem gesamten, wie oben gesagt 310 ccm betragenden, alkoholischen Auszuge wurden zur Analyse je 25 ccm verwandt.

Der Alkohol wurde abgedampft, der Rückstand mit Soda und Salpeter geschmolzen und dann mit Ammoniummolybdat und Magnesiamischung in der üblichen Weise die Phosphorbestimmung vorgenommen.

Es wurden gefunden a) 0,0146 g  $Mg_2P_2O_7$   
 b) 0,0133 g „  
 im Durchschnitt 0,014 g „ .

Wenn man, wie das hier und in den folgenden Untersuchungen geschehen ist, im Lecithin 3,94 % P annimmt, so ergibt das einen Lecithingehalt von 8,896 %.

#### Versuch II.

Bei einem zweiten Versuche wurde ein Eigelb im Gewicht von 15,63 g diesmal mit Äther wiederholt im Schütteltrichter extrahiert und nach dem Schütteln 12 Stunden stehen gelassen.

Als der ätherische Auszug farblos war, ergab eine Prüfung desselben, daß er keinen Phosphor mehr enthielt.

Von 360 ccm Ätherauszug wurden zur Analyse je 25 ccm verwandt.

Es wurden gefunden a) 0,0098 g  $Mg_2P_2O_7$   
 b) 0,0098 g „  
 im Durchschnitt 0,0098 g „  
 = 6,184 % Lecithin.



## Versuch III.

Bei Versuch III wurden 17,50 g Eigelb wieder wie bei I mit Alkohol absol. in der Wärme extrahiert und der Auszug in der dort angegebenen Weise behandelt.

Von dem 400 ccm betragenden alkoholischen Auszug wurden wieder je 25 ccm zur Analyse verwandt.

Es wurden gefunden a) 0,0139 g  $Mg_2P_2O_7$

b) 0,0144 g „

im Durchschnitt 0,0141 g „

was 9,10 % Lecithin entspricht.

Während Versuch I und III mit einem Lecithingehalt von 8,896 und 9,10 % ziemlich gut übereinstimmen, wurde bei dem mit Äther extrahierten Eigelb in Versuch II mit 6,18 % ein bedeutend geringerer Lecithingehalt konstatiert.

Um festzustellen, ob diese Abweichung eine zufällige, durch die Verschiedenheit der Eier bedingte sei, oder auf den Unterschied in der Extraktionsflüssigkeit zurückgeführt werden müsse, wurde bei einem

## Versuch IV

ein Eigelb in zwei Teile zerlegt und der eine mit Alkohol, der andere mit Äther extrahiert.

Mit Äther behandelt wurden: 5,84 g Eidotter. Von dem 300 ccm betragenden Auszug wurden 50 g zur Phosphor-Bestimmung angewandt.

Gefunden: 0,0098 g  $Mg_2P_2O_7$ , entsprechend 7,114 % Lecithin.

Mit Alkohol extrahiert wurden 7,9552 g. Von 250 ccm Alkohol-Extrakt wurden zur Analyse 25 ccm genommen.

Gefunden: 0,0110 g  $Mg_2P_2O_7$ , entsprechend 9,769 % Lecithin.

Auch in diesem Falle erhält man bei der Ätherextraktion eine geringere Menge Lecithin wie bei der mit Alkohol.

## Versuch V.

Zum Vergleiche wurden mehrere Teile ein und desselben Eidotters mit Alkohol extrahiert, um zu untersuchen, wie die Bestimmungen untereinander übereinstimmen würden.

Der eine Teil des Eigelb, 5,1000 g, wurde mit 230 ccm Alkohol extrahiert. Davon zur Bestimmung 50 ccm.

Gefunden: 0,0154 g  $Mg_2P_2O_7$ , entsprechend 9,814 % Lecithin.

Der andere Teil, 4,4176 g Eidotter, wurde mit 225 ccm Alkohol extrahiert.

Hiervon wurden zur Untersuchung ebenfalls 50 ccm verwandt.

Gefunden: 0,0134 g  $Mg_2P_2O_7$ , entsprechend **9,644** % Lecithin.

Die Übereinstimmung ist demnach eine zufriedenstellende.

Der Unterschied in den Resultaten der Untersuchungen ist also mit ziemlicher Sicherheit darauf zurückzuführen, daß mit Äther nur eine teilweise Extraktion des im Eigelb enthaltenen Lecithins gelingt. Vermutlich handelt es sich dabei um das im Dotter frei vorhandene Lecithin, während das an Vitellin gebundene nur bei der Behandlung mit Alkohol in Lösung geht.

#### Versuch VI.

Im nächsten Versuche wurde nun, um dies zu konstatieren, ein Teil eines Eidotters mit Alkohol, ein anderer mit Äther extrahiert.

Der von der Behandlung mit Äther restierende Rückstand wurde noch mit Alkohol behandelt, um das in Äther nicht, wohl aber in Alkohol lösliche, vermutlich in gebundener Form vorhandene Lecithin in Lösung zu bringen.

Es wurde außerdem eine N-Bestimmung nach Kjeldahl und eine Bestimmung des Wassergehalts in dem zu analysierenden Eidotter vorgenommen.

Die Teilung des Eigelbs wurde in der Weise ausgeführt, daß das gesamte Dotter in ein Wägegglas gegeben, für jede Bestimmung eine Portion desselben herausgegossen, und die Differenz gewogen wurde.

Das Gewicht des ganzen Eigelbs betrug 18,0986 g.

- a) Die  $H_2O$ -Bestimmung ergab einen Wassergehalt von 55,1 %.
- b) Die N-Bestimmung ergab 2,1 % N (bezogen auf feuchtes Eigelb).
- c) Extrahiert wurden 2,8854 g Eidotter mit 125 ccm Alkohol. Davon dienten 50 ccm zur Bestimmung. Gef. 0,0150 g  $Mg_2P_2O_7$ , entsprechend **9,183** % Lecithin.
- d) Extrahiert wurden 5,0270 g Eigelb mit 300 ccm Äther. Davon wurden zur Analyse 50 ccm verwendet. Gef. 0,0088 g  $Mg_2P_2O_7$ , entsprechend **7,43** % Lecithin.

- e) Der Rückstand der 5,0270 g ausgeätherten Eigelbs wurde mit Alkohol extrahiert.

Der gesamte Alkoholauszug wurde zur Bestimmung verwandt und enthielt

0,0167 g  $Mg_2P_2O_7$ , entsprechend **2,347** % Lecithin.

Die im Ätherauszug und Alkoholauszug zusammen gefundene Menge Lecithin (9,77 %) überschreitet die bei c gefundene merkwürdigerweise etwas.

#### Versuch VII.

Bei einem weiteren Versuche wurde in der Weise verfahren, daß zwei Portionen desselben Eidotters zunächst mit Äther, darauf der Rückstand der Ätherextraktionen mit Alkohol ausgezogen wurden. Auch hier wurde eine Stickstoff- und Wasserbestimmung vorgenommen. Gewicht des Gesamteigelbs 15,0056 g.

- a) N-Bestimmung: 2,344 %.

- b)  $H_2O$ -Bestimmung: 58,37 %.

- c) 4,1876 g Eigelb mit 300 ccm Äther extrahiert; davon zur Bestimmung 100 ccm.

Gef. 0,0162 g  $Mg_2P_2O_7$ , entsprechend **8,473** % Lecithin.

- d) Der Rückstand hiervon mit 130 ccm Alkohol extrahiert; davon 50 ccm zur Analyse.

Gef. 0,0034 g  $Mg_2P_2O_7$ , entsprechend **1,4915** % Lecithin.

In Summa **9,9645** % Lecithin.

- e) 3,7938 g Eigelb mit 300 ccm Äther extrahiert; davon 100 ccm zur Analyse.

Gef. 0,0153 g  $Mg_2P_2O_7$ , entsprechend **8,548** % Lecithin.

- f) Der Rückstand davon mit 100 ccm Alkohol extrahiert; davon zur Bestimmung 50 ccm.

Gef. 0,0036 g  $Mg_2P_2O_7$ , entsprechend **1,3405** % Lecithin.

In Summa **9,8885** % Lecithin.

Die gute Übereinstimmung der einzelnen Versuche untereinander scheint die Annahme zu bestätigen, daß das bei der Extraktion mit Äther nicht in Lösung Gegangene an Vitellin gebundenes Lecithin sei.

Eine Reihe von Bestimmungen, die vorgenommen wurden, um zu konstatieren, in welchen Mengen Lecithin an Vitellin gebunden vorkommt, sollen demnächst zum Abschluß gelangen.

Hier sollen nur noch zwei Bestimmungen angeführt werden, bei denen etwas größere Mengen Eigelb in der anfangs angegebenen Weise mit Alkohol extrahiert und in dem Auszug P-Ermittlungen vorgenommen wurden.

#### Versuch VIII.

Bei der einen Bestimmung wurden von einem Eigelb 16,646 g mit 500 ccm Alkohol extrahiert, davon zur Analyse 250 ccm verbraucht. Es wurden gefunden: 0,1043 g  $Mg_2P_2O_7$ , entsprechend 8,856 % Lecithin. Die Stickstoff-Analyse hatte 2,6 % N, die  $H_2O$ -Bestimmung einen Wassergehalt von 53,5 % ergeben.

#### Versuch IX.

Bei der anderen Bestimmung wurden 11,4388 g Eigelb mit 350 ccm Alkohol extrahiert und davon 150 ccm verwandt.

Gefunden: 0,0688 g  $Mg_2P_2O_7$  = 9,916 % Lecithin.

Die N-Bestimmung ergab: 2,50 % Stickstoff, die  $H_2O$ -Bestimmung: 53,49 % Wasser.

Vergleicht man die Mengen Lecithin, die bei der Behandlung des Eigelbs mit Alkohol erhalten worden sind:

I. 8,896 %,	VI. 9,18 %,
III. 9,10 %,	VII. 9,96 % und 9,888 %,
IV. 9,76 %,	VIII. 8,856 %,
V. 9,81 % und 9,64 %,	IX. 9,916 %,

so kann man sagen, daß die gefundenen Unterschiede nicht größer sind, als bei der individuellen Verschiedenheit einzelner Eier zu erwarten steht.

Der Durchschnittswert, der aus diesen Untersuchungen gewonnen wird, würde einen Gehalt von 9,41 % Lecithin im feuchten Hühnereigelb ergeben, wovon sich der in den Vereinbarungen angegebene Wert von 10,7 % nicht allzuweit entfernt.

**Über einen neuen Apparat zur Extraktion wässriger  
Flüssigkeiten mittels Äther, Ligroin usw. sowie anderer  
Lösungen mittels nicht damit mischbarer, spezifisch  
leichterer Solventien.**

Von

**C. Zelmanowitz.**

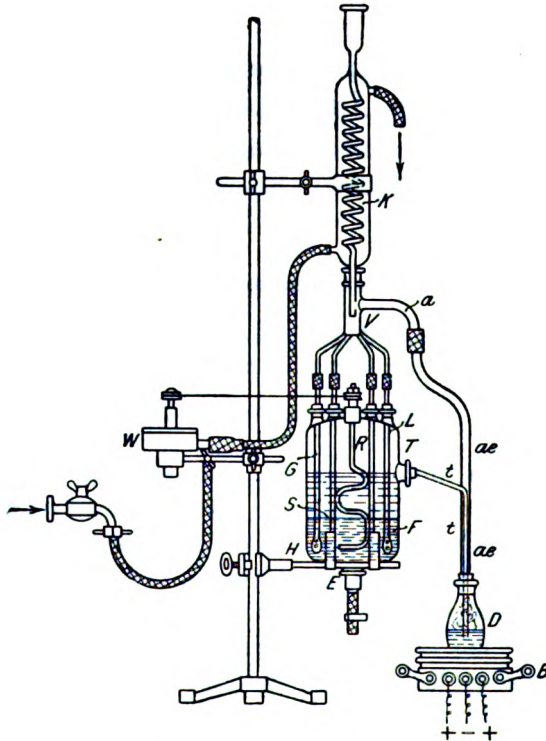
(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts  
der Universität zu Berlin.)

*(Eingegangen am 30. Juni 1906.)*

Im Laboratorium macht sich oftmals der Übelstand bemerkbar, daß zur Erschöpfung größerer Mengen wässriger Flüssigkeiten kein geeigneter Extraktionsapparat vorhanden ist.

Der Grund hierfür liegt wohl darin, daß die in den wissenschaftlichen Laboratorien gebräuchlichen Extraktionsapparate zumeist nur auf kleine Flüssigkeitsmengen berechnet sind. Die für größere Quanten in Betracht kommenden Apparate sind meist sehr unvollkommen und obendrein recht teuer. Aus diesem Grunde nun habe ich einen neuen Apparat konstruiert, der gegenüber anderen Extraktionsapparaten die Vorteile besitzt, daß er nicht nur unabhängig von den Konzentrationsverhältnissen der Flüssigkeiten schnell und gründlich extrahiert, sondern auch für jede beliebige Flüssigkeitsmenge angefertigt werden kann. Die Herstellung der zur Aufnahme der extrahierenden Flüssigkeit bestimmten Flasche in allen Größen verursacht keine nennenswerten Schwierigkeiten, und die ganze Vorrichtung stellt sich im Vergleich mit anderen Extraktionsapparaten bedeutend billiger.

Der Ätherextraktionsapparat besteht, wie ihn die Zeichnung wiedergibt, aus einer mit mehreren Tuben versehenen Glasflasche *G*, welche zur Aufnahme der zu extrahierenden Flüssigkeit bestimmt ist; sie wird mittels eines eisernen Ringes *H*, der an einem Stativ befestigt ist, gehalten. Die auf den oberen Teil der Flasche angebrachten 4 Tuben dienen zur Aufnahme von 4 Glasröhren, durch welche der kondensierte Äther aus



dem 4-teiligen Aufsatzstück („Verteiler“) *V* in die wässrige Flüssigkeit *F* geleitet wird. Das Aufsatzstück trägt an einer Seite ein im rechten Winkel gebogenes Rohr *a*; es ist einerseits zur Aufnahme des aus dem Ätherdampfleitungsrohr *ae* steigenden Ätherdampfes und Weiterführung desselben bis in den Kühler *K* bestimmt, andererseits wie bereits bemerkt, zur Ableitung des kondensierten Äthers in die 4 Röhren und durch sie in die zu extrahierende Flüssigkeit *F*. In etwa  $\frac{2}{3}$  der Höhe ist an der Flasche *G* ein weiterer Tubus *T* angebracht, durch welchen ein

Glasrohr *t* bis in den zur Erzeugung des Ätherdampfes und Aufnahme der schon extrahierten Substanz bestimmten Kolben *D* hineinragt. Durch dieses Rohr fließt der mit der Flüssigkeit bereits in Berührung gekommene extrakthaltige Äther in den Kolben *D* ab. Am Boden der Flasche sitzt noch ein Tubus *E*, durch dessen mit Quetsch- oder Glashahn versehenen Stopfen die bereits mit Äther erschöpfte Lösung abgelassen werden kann. Dieser Tubus *E* bietet besondere Vorteile, einerseits beim Reinigen des Gefäßes, andererseits bei Bildung einer starken Emulsion. Für den ersten Zweck ist man nicht darauf angewiesen, den ganzen Apparat auseinander zu nehmen, sondern verfährt folgendermaßen. Nach dem Ablassen der ausgeätherten Flüssigkeit schliesse man bei *E*, entferne den in der kleinen Öffnung *L* am oberen Teil des tubulierten Gefäßes befindlichen Korken und gieße durch diese Öffnung mittels eines kleinen Trichters Wasser hinein. Dasselbe fließt aus dem seitlichen Rohr wieder ab. Auf diese Weise wird die Flasche für eine neue Extraktion gebrauchsfähig gemacht. Man kann auch einen an die Wasserleitung angeschlossenen kleinen Schlauch in die Öffnung einführen und so die Flasche reinigen. Der andere Vorteil, der durch den am Boden des Gefäßes angebrachten Tubus geboten wird, ist folgender: Es ist eine nur zu bekannte Tatsache, daß stark eingeengte Flüssigkeiten, z. B. besonders Harn usw., sehr zur Bildung von Emulsionen neigen. In diesem Falle ist es zweckmäßig, in folgender Weise zu verfahren. Man lasse die zu extrahierende wässrige Flüssigkeit *F* bis zu der unteren Emulsionsschicht durch den Tubus ablaufen. Dann stelle man den im Gefäß *G* angebrachten Schlangen- oder Wittschen Rührer *R* so ein, daß eine Windung resp. die Löcher desselben knapp die obere Fläche der Emulsionsschicht berühren und lasse ihn nun ziemlich stark arbeiten. Nach kurzer Zeit schon wird man beobachten können, daß die Emulsion mehr und mehr verschwindet. Nun gieße man durch *L* mit dem kleinen Trichter die kurz vorher abgelassene Flüssigkeit wieder in die Flasche zurück und fahre mit der Extraktion fort. Sollte nach einmaligem Ablassen der wässrigen Flüssigkeit und Auffüllen derselben nach kurzer Zeit die Emulsion sich wieder zeigen, so verfare man in derselben Weise noch einmal, achte aber

bei Einstellen des Rührers darauf, daß dieser zuerst nicht die unteren Schichten der Flüssigkeit, sondern mehr die oberen berührt. Auf keinen Fall ist es notwendig, neuen Äther zu verwenden.

Der schon erwähnte Rührer *R*, der von der Wasserturbine *W* angetrieben wird, dient noch einem weiteren Zwecke, einer Beschleunigung der Extraktion. Mittels dieser Rührvorrichtung wird nämlich die wässrige Flüssigkeit in ständiger Bewegung gehalten, wodurch der durch die 4 Röhren gedrückte Äther immer wieder mit neuen Flüssigkeitsteilchen in Berührung gebracht wird. Auf diese Weise geht im Gegensatz zu anderen Apparaten, bei denen die zu extrahierende Flüssigkeit ruhig lagert, die Erschöpfung gründlicher und schneller vonstatten. Aber noch ein anderer Faktor bedingt die gründliche und schnelle Extraktion. Die Ätherteilchen, welche durch die 4 Glasröhren in die Flüssigkeit geleitet werden, steigen nicht wie bei anderen Apparaten gleich wieder in die Höhe, sondern werden infolge der drehenden Bewegung der wässrigen Flüssigkeit zu äußerst feinen Teilchen zerstäubt, die dann mehrmals die Bewegungen der Flüssigkeit mitmachen, ehe sie sich mit dem überstehenden Äther *S* mischen. Dieser Äther fließt dann (über *T* durch *t*) stark gesättigt in das zur Aufnahme bzw. Entwicklung der Ätherdämpfe dienende Kölbchen *D*. Zur Erzeugung des Ätherdampfes kann man zweckmäßig einen elektrischen Heizkörper (*B*) verwenden, der eine Feuergefahr durch eventuelles Entweichen von Ätherdämpfen vollständig ausschließt. Da im ganzen Gefäß *G* kein Druck und kein dampfförmiger Äther vorhanden ist, besonders da die Ätherschicht *S* völlig kalt ist, hält die Dichtung durch den eingesetzten Rührer *R* so vollkommen, daß keine nachweisbaren Mengen Äther entweichen. Deshalb kann unbedenklich auch jede andere Heizquelle (Dampf- oder Wasserbad) verwendet werden.

Das zum Antrieb der Turbine verwendete Wasser läßt man (s. Abbildung) der Ersparnis halber gleich durch den Kühler gehen <sup>1)</sup>. Der Gang der Extraktion sowie die Handhabung des

<sup>1)</sup> Später hat es sich bewährt, die umgekehrte Anordnung zu wählen, d. h. das Wasser erst durch den Kühler und von dort durch die Turbine laufen zu lassen.



Apparates ist äußerst einfach. Zuerst gießt man in das Gefäß *G* durch die kleine Öffnung *L* die zu extrahierende Flüssigkeit *F* und schichtet über sie Äther (*S*) bis nicht ganz zur Höhe von *F*; dann wird *L* durch einen Kork geschlossen. Nun wird das Kölbchen *D*, das mit der großen Flasche *F* durch *t* in Verbindung steht, erhitzt, die dadurch erzeugten Ätherdämpfe steigen in das Ätherdampfleitungsrohr *Ae* hinauf in den Kühler *K*, werden hier kondensiert und fallen in flüssiger Form in den Verteiler *V*. Von hier aus wird der Äther durch die 4 Röhren, die am unteren Ende zu einer kleinen mit mehreren Löchern versehenen Kugel auslaufen, in die wässrige Flüssigkeit *F* geleitet, nimmt hier die zu extrahierende Substanz auf und mischt sich mit der über der Flüssigkeit stehenden Ätherschicht *S*, welche durch den fortwährend nachströmenden Äther vermehrt wird und den seitlichen Tubus *T* als Überlauf benutzend durch *t* ins Kölbchen *D* fließen muß. Auf diese Weise arbeitet die Vorrichtung völlig selbsttätig. Wie aus den nachstehenden Daten ersichtlich ist, sind die mit dem Apparat erzielten Daten sowohl hinsichtlich der Ausbeute wie der Zeit recht zufriedenstellend.

a) Es wurden aus 100 ccm einer 6%igen Hippursäurelösung — sie war in der Kälte so konzentriert, daß Substanz ausfiel — in 3 Stunden 2,3 g, in weiteren 3 Stunden 1,95 g und in den folgenden 4 Stunden 1,72 g Substanz extrahiert. Die Extraktion dauerte **10 Stunden**. Angewandt wurden 6 g, wiedergewonnen 5,97 g.

b) Ein weiterer Versuch, in dem 10,0 g Oxalsäure in 1 l destillierten Wassers gelöst wurden, ergab folgende Werte. Nach 10stündiger Extraktion **5,54 g**, nach weiteren 10 Stunden **3,4 g**. Die Extraktion wurde zufällig nicht zu Ende geführt.

c) 0,5 g Hippursäure wurden in 250 ccm Harn gelöst, mit etwas verdünnter Schwefelsäure angesäuert und ca. 6 Stunden extrahiert. Die Ausbeute war eine absolut quantitative.

d) Um nun feststellen zu können, ob der Apparat auch eine vollständige Ausbeute bei sehr verdünnten Lösungen ergibt, wurde eine Lösung von 0,5 g Hippursäure in ca. 1,2 l destillierten Wassers extrahiert. Nach einer ca. 8stündigen Erschöpfung konnte auch hier das volle Gewicht der hineingekommenen Substanz zurückerhalten werden.

So wurden noch verschiedene weitere Versuche angestellt, die ein ähnliches günstiges Resultat aufwiesen.

Es braucht kaum besonders betont zu werden, daß dieser neue Extraktionsapparat<sup>1)</sup> in jeder beliebigen Größe konstruiert werden kann. Vorläufig bringt die Firma Albert Dettloff, Berlin NW. 6, Luisenstr. 59, auf meine Veranlassung 3 verschiedene Größen in den Handel, von je 250, 500 ccm u. 1 Ltr. Kapazität des tubulierten Gefäßes *G*.

Da Glasschliffe durchgehends grundsätzlich vermieden sind, ist der Ersatz ev. beschädigter Teile sehr billig und der Preis der Apparate niedrig, insofern, als Turbine, Stativ und Heizvorrichtung vielfach in den Laboratorien vorhanden sind.

Der Wert des Apparates liegt auch darin, daß er nicht allein zur Extraktion wässriger Flüssigkeiten mittels Äther dienen kann, sondern ganz allgemein zur Erschöpfung beliebiger Lösungen mittels einer nicht damit mischbaren spezifisch leichteren Flüssigkeit brauchbar ist.

---

<sup>1)</sup> D. R. P. a.

---

# **Eine Methode zur Bestimmung des osmotischen Druckes sehr geringer Flüssigkeitsmengen<sup>1)</sup>.**

Von

**H. J. Hamburger in Groningen.**

(Aus dem physiologischen Institut der Universität.)

(Eingegangen am 5. Juli 1906.)

## **I. Einleitung.**

Nicht selten kommt es vor, daß man von normalen oder pathologischen Körperflüssigkeiten, von denen man nicht mehr als  $\frac{1}{2}$  oder  $\frac{1}{4}$  ccm zur Verfügung hat, den osmotischen Druck zu ermitteln wünscht.

Vor solch einen Fall sah ich mich vor einiger Zeit gestellt, als mir von ophtalmologischer Seite die Frage vorgelegt wurde, wie groß die Konzentration von Flüssigkeiten, speziell von Borsäure, sein müsse, die man für die Behandlung des Auges anwenden soll. Es schien mir rationell — und die Untersuchungen von Massart rechtfertigten diese Meinung<sup>2)</sup> — für Substanzen, für die das Epithelium nicht oder kaum permeabel ist, eine solche Konzentration zu wählen, daß sie denselben osmotischen Druck besitzen wie das natürliche Medium von Cornea und Conjunctiva, nämlich wie die Tränenflüssigkeit.

Bis jetzt aber wurde der osmotische Druck von Tränenflüssigkeit, jedenfalls auf direktem Wege, nicht ermittelt, höchstwahrscheinlich wegen der Schwierigkeit, eine Quantität dieser Flüssigkeit zu bekommen, groß genug für die Anwendung der

---

<sup>1)</sup> Von diesen Untersuchungen erschien eine vorläufige Mitteilung in den Sitzungsberichten d. Königl. Akad. d. Wissensch. zu Amsterdam, 28. Oktober 1905.

<sup>2)</sup> Massart, Archives de Biologie, 9, 335. 1889.

gebräuchlichen Verfahren, nämlich der Blutkörperchen-<sup>1)</sup> und der Gefrierpunktmethode<sup>2)</sup>. Dies veranlaßte mich einen Modus operandi zu suchen, bei welcher  $\frac{1}{2}$  ccm, nötigenfalls  $\frac{1}{4}$  ccm Flüssigkeit genügen würde. Es ist mir nun in der Tat gelungen, eine derartige Methode ausfindig zu machen.

## II. Prinzip der Methode.

Die Methode beruht auf dem bereits früher von mir und anderen ausgesprochenen Prinzip, daß das Volum der Blutkörperchen in hohem Maße vom osmotischen Druck der Lösung abhängig ist, in der sie sich befinden<sup>3)</sup>.

Dieses Prinzip ist hier in folgender Weise in Anwendung gebracht worden.

In ein trichterförmiges Glasröhrchen, dessen zylindrischer Teil aus einem kalibrierten, unten zugeschmolzenen Kapillarrohr gebildet wird<sup>4)</sup>, bringt man die zu untersuchende Flüssigkeit. Es sei die Menge  $\frac{1}{2}$  ccm. In andere trichterförmige Röhrchen von gleicher Form und Größe bringt man je  $\frac{1}{2}$  ccm NaCl-Lösung von verschiedenen Konzentrationen (0,8 ‰, 0,9 ‰, 1 ‰, 1,1 ‰, 1,2 ‰, 1,3 ‰, 1,4 ‰, 1,5 ‰, 1,6 ‰) und beschickt alle Röhrchen mit 0,02 bis 0,04 ccm Blut (vergl. unten S. 265). Dann werden Flüssigkeit und Blut tüchtig vermischt und eine halbe Stunde sich selbst überlassen, damit die Blutkörperchen genügend Gelegenheit haben, sich mit ihrer Umgebung in osmotisches Gleichgewicht zu setzen. Darauf werden die Röhrchen zentrifugiert, und zwar so lange, bis die Bodensätze ihr Volumen nicht mehr ändern.

Es liegt auf der Hand, daß der osmotische Druck der zu untersuchenden Flüssigkeit dem jener NaCl-Lösung entsprechen wird, in der das Blutkörperchensediment das gleiche Volumen besitzt, wie in der zu untersuchenden Flüssigkeit. — So fanden wir z. B. in einem Fall, daß das Blutkörperchenvolumen in der Tränenflüssigkeit 71 betrug, und daß die NaCl-Lösung, in der das Blutkörperchensediment gleichfalls ein Volumen von 71 Skalen-

<sup>1)</sup> Hamburger, Osmotischer Druck u. Ionenlehre 1, 440.

<sup>2)</sup> Dreser, Archiv f. experim. Path. u. Pharmakol. 29, 305. 1892.

<sup>3)</sup> Hamburger, Centralbl. f. Physiol. 17. Juni 1893.

<sup>4)</sup> Hamburger, Journal de Physiol. norm. et pathol. 1900, p. 889.

teilen besaß, eine 1,4 %ige war. Also war die Tränenflüssigkeit mit dieser NaCl-Lösung isotonisch.

### III. Ausführung der Methode.

#### a. Das anzuwendende Blut und die Weise, es abzumessen und zu vermischen.

Es liegt auf der Hand, daß man für die Versuche eine Blutart wählen muß, von der die Blutkörperchen seitens der zu untersuchenden Flüssigkeit keine Zerstörung erfahren. So werden z. B. Kaninchenblutkörperchen von Serum des Menschen hämolytisch. Handelt es sich also um die Bestimmung des osmotischen Druckes von Menschenblutserum, so darf man kein Kaninchenblut benutzen. Von menschlicher Tränenflüssigkeit aber wurden die Kaninchenblutkörperchen nicht angegriffen. Im allgemeinen empfiehlt es sich, das Blut derjenigen Tierart zu nehmen, von der die zu untersuchende Flüssigkeit stammt.

Es ist notwendig, das Blut vor dem Gebrauch zu defibrinieren. Dieses erfolgt sehr leicht, indem man in ein kleines dickwandiges Röhrchen (ein Röhrchen von 2,5 cm Länge und  $\frac{3}{4}$  cm Durchmesser genügt hier), das mit 3 bis 4 Glasstückchen (Scherben) beschickt ist, Blut tröpfeln läßt und dasselbe nach Korkverschluß schüttelt;  $\frac{1}{4}$  Stunde genügt. Dann wird das Blut filtriert, nicht durch Gaze, weil dieses kleine Fibrinpföpfchen durchläßt, sondern durch Filtrierpapier.

Die genaue Abmessung von 0,02 ccm Blut erfordert besondere Vorsicht.

Die von mir benutzte Pipette besteht aus einem Kapillarrohr von  $\frac{1}{4}$  mm lichte Weite; die Länge beträgt 212 mm. Am Ende ist sie zu einer Spitze ausgezogen. Auf einer Distanz von 143 mm vom ausgezogenen Ende trägt sie einen Teilstrich, der 0,02 ccm angibt.

Behufs der Abmessung des Blutes wird die Pipette von einem schlaffen etwa 20 cm langen Gummischlauch versehen, der am Ende ein Glasröhrchen trägt. Letzteres hält man im Munde, um das Blut aufzusaugen und nachher wieder durch Ausblasen zu entfernen.

Man saugt das Blut etwas über den Teilstrich hinauf und drückt das Gummirohr mit dem Finger zu, am besten in der Nähe der Meßpipette. Indem man letztere aus dem Gefäß ent-

fernt, hält man, um das Ausfließen von Blut aus der Pipette zu verhindern, dieselbe möglichst schnell horizontal und trocknet die Spitze mit einem Tuche (nicht mit Filtrierpapier) ab. Wenn nun das Niveau der Blutsäule noch über dem Teilstrich steht, d. h. wenn noch zu viel Blut in der Pipette sich befindet, so muß das Übermaß entfernt werden. Man erzielt das, indem man, die Pipette immer horizontal haltend, die Spitze entweder ein oder mehrere Male gegen den trockenen Finger oder gegen ein Tuch (nicht gegen Filtrierpapier) tupft. Es empfiehlt sich, den Stand der Blutsäule in der horizontal gehaltenen Pipette so zu beurteilen, daß man ein Stück auf dem Tisch liegendes Filtrierpapier als Hinterlage wählt.

Wenn man in der hier beschriebenen Weise verfährt, so geht die genaue Abmessung rasch vor sich. Versäumt man eine der genannten Vorsichtsmaßregeln, so wird die Manipulation langwierig und unsicher.

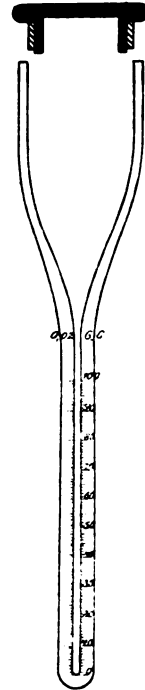
Dieser Umstand möge die detaillierte Beschreibung für die Ausführung einer so einfachen Aufgabe rechtfertigen.

Auch das Überbringen des Blutes in die trichterförmigen Röhrcchen erfordert besondere Vorsicht. Wenn man die Ausflußöffnung der Pipette oberhalb der Flüssigkeit des trichterförmigen Röhrcchens hält und dann das Blut ausbläst, so wird immer noch etwas Blut in der Ausflußöffnung und um sie zurückbleiben. Deshalb tauche ich die Spitze in die Flüssigkeit und sauge letztere bis zum Teilstriche 0,02 ein, blase aus, sauge wieder ein und wiederhole das noch ein paarmal. Auf diese Weise wird alles Blut aus der Pipette entfernt. Freilich bleibt dann an der Wand noch ein wenig von dem Gemisch von Blut und Flüssigkeit haften, aber dieses Quantum darf man vernachlässigen. Dieses Verfahren hat noch den großen Vorteil, daß bei der jetzt folgenden erneuten Abmessung von 0,02 ccm Blut die Kapillarwand der Pipette nicht mehr mit reinem Blute bedeckt ist. Lehrt ja die Erfahrung, daß, wenn man mittels einer engen Pipette zwei oder drei Male Blut abgemessen hat, es stets schwieriger wird, dasselbe aufzusaugen, insbesondere es auszublasen. Vielleicht rührt das daher, daß an der Innenwand etwas Blut antrocknet und die Reibung sehr groß macht. Eine Befechtung mit Salzlösung hebt die Beschwerde vollständig auf.

Um die Bedingungen, unter welchen die Abmessungen stattfinden, für alle Röhrrchen gleich zu gestalten, ist es notwendig, vor der ersten Abmessung von 0,02 ccm Blut die Pipette mit einer NaCl-Lösung (0,9% oder 1%) zu benetzen.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß es sich empfiehlt, vor jeder Abmessung von 0,02 ccm Blut das dieses Blut enthaltende Gefäß zu bewegen, Sonst senken sich die Erythrocyten und man mißt jedesmal ungleiche Quantitäten Blutkörperchen ab. Schaumbildung ist aus demselben Grunde bei dieser Bewegung zu vermeiden.

Schließlich habe ich noch folgendes hervorzuheben: um eine vollständige Vermischung des Blutes mit der Salzlösung im Röhrrchen zu erzielen, derart daß alle Blutkörperchen überall von einer vollkommen homogenen Flüssigkeit umgeben werden, genügt es meiner Erfahrung nach nicht, die Suspension mittels eines Stäbchens kurze Zeit umzurühren. Es empfiehlt sich, das Trichter-röhrrchen entweder unter Verschuß mittels des reinen trockenen Daumens, oder unter Ebonit-verschluß (siehe unten S. 264) einigemale hin und wieder zu bewegen.



b. Die Trichterröhrrchen und die  
Reinigung derselben.

Die Röhrrchen sind bereits vielfach angewandt worden<sup>1)</sup>.

Ein Trichter, dessen Inhalt etwa  $2\frac{1}{3}$  ccm beträgt, endigt in einem unten zugeschmolzenen Kapillarrohr. Dasselbe ist in 100 Teile genau kalibriert. Der kalibrierte Teil hat bei einer Länge von 57 mm einen Inhalt von 0,01 ccm<sup>2)</sup>. Also entspricht der Raum zwischen 2 Teilstrichen einem Volumen von 0,0001 ccm. Die Anfertigung der Röhrrchen erfordert große Sorgfalt. Zunächst muß der trichterförmige Teil allmählich in den kapillaren Teil übergehen. Ist das nicht der Fall, so bleiben die Blutkörperchen

<sup>1)</sup> Vergl. u. a. Hamburger, Journal de Physiol. norm. et pathol. 1900, p. 889; Hamburger, Osmotischer Druck und Ionenlehre. 1, 379.

<sup>2)</sup> Vergl. S. 265.

oft an dieser Stelle stecken. Weiter muß dafür gesorgt werden, daß nicht das Glas nach einiger Zeit zerspringt. Früher ereignete es sich oft, daß ohne nachweisbare Ursache der untere Teil der Kapillare an der Abschmelzungsstelle zersprang.

Drittens kommt vieles auf eine sehr genaue Kalibrierung an, die hier durch Abmessung mit Quecksilber erzielt wird<sup>1)</sup>. Um eine vollständige Vermischung von Blutkörperchen und Flüssigkeit zu ermöglichen, und weiter um Verdampfung von Wasser beim Zentrifugieren vorzubeugen, werden die Trichter-  
röhrchen mittels Ebonitkämpchens verschlossen. Dieselben sind derart konstruiert, daß sie genau in den Trichter passen, was dadurch erreicht wird, daß ein Kautschukring um den unteren Teil gelegt wird. Der obere Teil des Kämpchens ragt zur Seite nicht über das Glas hinaus, damit das gleichzeitige Zentrifugieren von drei Röhrchen in einer Einsatzhülse möglich bleibt.

Man wird begreifen, daß für eine ungestörte Sedimentierung die Reinheit des Kapillarrohres eine erste Bedingung ist.

Sie wird in folgender Weise erzielt:

Nachdem ein Versuch beendet ist, wird mittels eines feinen Platindrahtes das Sediment wieder mit der im Trichter sich befindenden Flüssigkeit vermischt und der Inhalt des Trichters herausgeworfen. Was im Kapillarteil zurückbleibt, wird mittels eines fein ausgezogenen Glasrohres, das jeder sich durch Ausziehen eines Stückes Glasrohr in einer Bunsenschen Flamme sehr leicht herstellen kann, entfernt.

Dann wird der Kapillarteil mittels des soeben gebrauchten Kapillarröhrchens mit einer 0,9%igen Kochsalzlösung angefüllt. Man benutzt hierzu kein Wasser, weil dadurch Blutkörperchen sich lösen und die Hämoglobinlösung weniger leicht von der Innenwand entfernt wird.

Auch die nunmehr Blutkörperchen enthaltende NaCl-Lösung wird entfernt. Wieder wird mit Kochsalzlösung ausgewaschen, bis man sicher sein darf, daß alle Blutkörperchen ausgespült sind.

Weiter werden die Röhrchen mit destilliertem Wasser ausgespült. Diese Ausspülung erfolgt wieder derart, daß man

---

<sup>1)</sup> Die Firma Franz Hegershoff, Leipzig, Carolinenstraße 13, liefert die Trichterröhrchen sowie auch die Pipetten zu meiner großen Zufriedenheit.



das Wasser mittels feiner Glaspipette in die Kapillare des Trichterröhrchens bringt und aus demselben entfernt.

Hat man die Trichterröhrchen ein paarmal für Versuche gebraucht, so empfiehlt es sich, nach der soeben genannten Ausspülung mit Wasser eine Behandlung mit doppelt chromsauren Kali und Schwefelsäure vorzunehmen, derselben Flüssigkeit die man auch für die bekannten Chromsäure-Elemente benutzt. Man füllt also die Röhrchen mit diesem Gemisch, läßt es einige Stunden in demselben verweilen und spült dann mit destilliertem Wasser aus.

Endlich müssen die Röhrchen getrocknet werden. Das geschieht einfach dadurch, daß man die Trichterröhrchen, mit der offenen Seite nach unten gekehrt, in die Zentrifuge setzt. Das Wasser wird dann vollständig ausgeschleudert. Dieses Verfahren ist weit besser als Trocknung im Trockenschrank, weil es sich so leicht ereignen kann, daß das destillierte Wasser einige Verunreinigungen gelöst enthält, welche sich natürlich beim Eintrocknen auf der Kapillarwand absetzen.

Die Reinigung von Röhrchen mit 0,01 ccm Kapillarinhalt erfordert viel Aufmerksamkeit und Geduld. Außerdem ist das Trocknen durch Ausschleudern des anhaftenden Wassers ohne sehr kräftige Zentrifuge nicht möglich. Viel bequemer wird das Arbeiten, wenn man statt Trichterröhrchen von 0,01 ccm Kapillarinhalt solche von **0,02** ccm Kapillarinhalt nimmt. Da das Blut wohl niemals mehr als 50 Volumenprozent Blutkörperchen enthält, empfiehlt es sich, dann auch das doppelte Blutquantum zu benutzen von dem, was wir für die Röhrchen mit 0,01 ccm Kapillarinhalt vorschlugen, d. h. nicht 0,02 ccm, sondern **0,04** ccm. Je größer die Sedimentvolumina, desto geringer sind die Fehler. Dementsprechend habe ich auch Pipetten anfertigen lassen, welche zu den Röhrchen von 0,02 ccm Kapillarinhalt gehören und 0,04 ccm Blut fassen. Sie haben dieselbe Länge, wie die für die Abmessung von 0,02 ccm Blut.

Der Leser wird mir die Frage vorlegen, weshalb dann nicht immer Röhrchen mit 0,02 ccm Kapillarinhalt gebraucht werden? Darauf möchte ich antworten, daß, wenn man nur 0,25 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit zur Verfügung hat, so übt das Bluteserum von 0,04 ccm Blut einen wohl etwas großen

Einfluß auf den osmotischen Druck der zu untersuchenden Flüssigkeit aus. Hat man dagegen  $\frac{1}{2}$  ccm zur Verfügung, so wird der betreffende Einfluß viel geringer. Größtenteils jedoch wird diese Beeinträchtigung aufgehoben, wenn man dafür sorgt, auch genau dasselbe Volumen (0,25 ccm) von den NaCl-Lösungen anzuwenden. Denjenigen also, die nicht zu viel Geduld und viel Sorgfalt erfordernder experimenteller Arbeit veranlagt sind, rate ich, Röhrchen von 0,02 ccm Kapillarinhalt und eine entsprechende Pipette von 0,04 ccm Inhalt zu nehmen. Die Reinigung und ganze Behandlung erfolgt bei den letzteren freilich in derselben Weise wie bei den von 0,01 ccm Kapillarinhalt, aber es geht alles viel bequemer und handlicher, wie bei einem so außerordentlich engen Lumen. Angesichts der Reinigung der 0,02 ccm-Röhrchen möchte ich noch hinzufügen, daß man dieselbe hier noch durch Benutzung einer Feder befördern kann. Hierzu nimmt man eine feine Vogelfeder, entfernt die Federhaare an beiden Seiten, ausgenommen an der Spitze. Ist letztere benetzt, so kann man dieselbe in das Lumen hineindrehen.

### c. Die Zentrifuge.

Die Zentrifuge soll eine recht kräftige sein. Da die Zentrifugalkraft der Größe des Radius und dem Quadrat der Umdrehungszahl proportional ist, kann man auf zwei Weisen zum Ziel gelangen, entweder indem man eine Zentrifuge mit großem Radius und kleiner Tourenzahl oder eine mit kleinerem Halbmesser und großer Umdrehungsgeschwindigkeit nimmt. Bei der gegenwärtig vielfachen Anwendung von Zentrifugen sind bereits viele Modelle angegeben worden, die, insofern sie eine genügend große Zentrifugalkraft entwickeln, für den vorliegenden Zweck brauchbar sind.

Es ist vielleicht nützlich, für diejenigen, die sich eine auch zu anderen Zwecken bestimmte Zentrifuge kaufen wollen, hier die Bemerkung hinzuzufügen, daß nur wenige der käuflichen Maschinen für größere Flüssigkeitsmengen brauchbar sind, nicht daß die Einsatzröhre eine zu geringe Kapazität hat, sondern daß die übliche Verkupplung der Maschine an die Triebkraftsachse zu wünschen übrig läßt. Die meisten Zentrifugen leiden nämlich an dem Übelstande, daß beim Absetzen der Triebkraft die Umdrehungsgeschwindigkeit eine plötzliche, schroffe Verringerung erfährt, so daß die Maschine bald stillsteht, statt allmählich auszulaufen. Die flüssigkeithaltenden Röhren gehen dann aus dem horizon-

talen rasch in den vertikalen Stand über und erleiden dadurch eine Erschütterung, infolge deren das Sediment aufwirbelt und also der Zweck verfehlt wird. Sind die Sedimentiergläser lang, wie bei der oben beschriebenen Versuchsmethode, so tritt das Aufwirbeln nicht auf; bei weiten Sedimentiergläsern aber macht sich dasselbe in sehr erheblichem Maße geltend. Das einzige Mittel, diesen Übelstand zu umgehen, besteht darin, daß eine Vorrichtung angebracht wird, welche die Verbindung der Zentrifuge mit dem Motor ganz aufzuheben ermöglicht und zwar in der Weise, daß die Maschine vollkommen frei auslaufen kann, d. h. ohne irgend welche fremde Scheibe mitnehmen zu müssen. Man könnte geneigt sein, zu meinen, daß, wenn die Triebkraft von einem Elektromotor stammt, ein allmähliches Auslaufen auch zu erzielen sei durch langsame Einschaltung von Widerstand in den elektrischen Strom. Das ist jedoch nicht der Fall; der Abfall der Stromstärke erfolgt auf diese Weise immer noch in Stößen. Auch ist es nicht empfehlenswert, den Riemen auf eine auf der Triebachse sich befindende Leerscheibe zu werfen, wenn nämlich diese Leerscheibe von der auslaufenden Zentrifuge noch mitgenommen werden soll.

Die Leerscheibe oder auch eine Friktionsvorrichtung soll also an der Zentrifugenachse selbst angebracht sein. Ich wiederhole, daß man auf diesen Punkt zu achten hat, wenn man die Zentrifuge auch für die Sedimentation in weiten Röhren zu benutzen wünscht.

Für unsere Methode haben diese Überlegungen keine prinzipielle Bedeutung, da, wenn die Blutkörperchen einmal in den Kapillarteil getrieben sind, von einem Aufwirbeln — selbst bei plötzlichem Stillstand der Zentrifuge — nicht die Rede ist.

Die von mir für alle in dieser Arbeit als Belege mitgeteilten Versuche benutzte Zentrifuge hat eine Umdrehungsgeschwindigkeit von 1800 in der Minute, während die Distanz zwischen den Bodenflächen zweier in horizontaler Richtung einander gegenüberliegender Metallgefäße (in denen die zu zentrifugierenden Glasröhrchen sich befinden) 48 cm beträgt. Diese Maschine wird von einem Elektromotor von 2 PS. getrieben<sup>1)</sup>.

Bei Anwendung einer so bedeutenden Zentrifugalkraft kann man das zugeschmolzene Ende der Metallröhrchen nicht auf dem Metallboden der Metallröhre ruhen lassen. Der Druck zerbricht dann den Kapillarteil unmittelbar. Ich nehme zwei hohe Korken, in denen drei entsprechende Kanäle gebohrt sind, welche den Kapillarteilen von drei Trichterröhrchen in bequemer Weise den Durchgang gestatten. Die Höhe der Korken ist so gewählt, daß, wenn das Trichterrohr so weit wie möglich in den

<sup>1)</sup> Die Zentrifuge stammt von der Firma Franz Hegershoff, Leipzig, und ist sehr solide; ich habe dieselbe bereits 4 Jahre fast täglich gebraucht.

oberen Kork gesteckt ist und mit dem breiter werdenden Teil auf dem Kork ruht, das zugeschmolzene Ende des Kapillarteiles noch wenigstens einen Zentimeter vom Boden des Metallgefäßes entfernt ist. Freilich nähert es sich dann beim Zentrifugieren dem Boden, aber erreicht denselben nicht. Das Trichterröhrchen wird von der Oberseite des oberen Korkes getragen. Die Metallröhren meiner Zentrifuge haben einen Durchmesser von 44 Millimetern. Wie gesagt, können in jedem Korkenpaar drei Trichterröhrchen einen Platz finden, so daß gleichzeitig zwölf Trichterröhrchen zentrifugiert werden können.

Da die Zentrifugenwahl hier von hervorragender Bedeutung ist, möchte ich hier noch hinzufügen, daß ich in der letzten Zeit eine vom Mechaniker Fr. Runne in Heidelberg gebaute Zentrifuge in meinem Laboratorium versucht habe, welche vor den bis jetzt von mir angewandten viele Vorzüge hat und die, wenn sie sich bewährt — was ich zu glauben berechtigt bin — in hohem Maße empfehlenswert ist. Die Vorzüge sind: geringerer Zeitaufwand zur Erzielung der gleichen Aufgabe, bedeutende Raumersparnis, viel geringere Betriebskosten, bequemere Handhabung und viel geringerer Preis.

In der Hauptsache besteht die Zentrifuge aus einer kupfernen Schale, welche auf einem Elektromotor angebracht ist. Innerhalb der Schale befindet sich ein Gestell, das 4 Metallhülsen trägt. In diesen Metallhülsen können 4 Gefäße von je 80 ccm einen Platz finden. Zu unserem speziellen Zweck hat Herr Runne 4 Metallgestelle konstruiert, die je 3 Trichterröhrchen fassen können, so daß 12 solcher Röhrchen gleichzeitig zentrifugiert werden können. Der Motor bringt die Schale in Bewegung und damit auch das vierarmige Kreuz, das an der Schale befestigt ist. Durch die Anordnung, daß sich die Schale dreht, ist der Reibungswiderstand, den die Maschine erfährt, äußerst gering. Sie braucht etwa 1 Minute, um frei auszulaufen. Bei sorgfältiger Fundamentierung läuft die Maschine äußerst ruhig und absolut geräuschlos. Es ist als ob sie stillsteht! Tourenzahl 3000 pro Minute. Die Distanz zwischen den Bodenflächen zweier in horizontaler Lage einander gegenüberstehender Metallhülsen beträgt 26 cm.

## IV. Kritik der Methode. Kontrollversuche.

Zunächst wäre vom theoretischen Standpunkte gegen die Methode einzuwenden, daß, wenn man 0,5 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit mit 0,02 ccm Blut versetzt und die Flüssigkeit einen andern osmotischen Druck besitzt, wie das Blutserum, diese Hinzufügung von Blutserum eine Änderung des osmotischen Druckes der zu untersuchenden Flüssigkeit herbeiführen wird. Man ermittelt mit anderen Worten eigentlich nicht den Einfluß der zu untersuchenden Flüssigkeit auf das Volumen der Blutkörperchen, sondern den eines Gemisches von dieser Flüssigkeit und des Blutserums.

Wir wollen uns eine Vorstellung von der Größe des Fehlers machen.

Wir nehmen an, daß im angewandten Blute 60 Volumenprozent Serum vorhanden waren. Es enthielten dann 0,02 ccm Blut 0,012 ccm Serum. Betrug das Quantum der zu untersuchenden Flüssigkeit  $\frac{1}{2}$  ccm, so wird das Gesamtvolumen von Flüssigkeit und Serum 0,512 ccm betragen. Wir nehmen an, daß der osmotische Druck der zu untersuchenden Flüssigkeit den einer 1,2 %-igen NaCl-Lösung besaß, und daß das Serum einer NaCl-Lösung von 0,9 % entspricht, so wird das Gemisch einen osmotischen Druck von etwa  $\frac{0,012 \times 0,9 + 0,5 \times 1,2}{0,012 + 0,5}$

= 1,19 % NaCl besitzen. Also hat durch Vermischung von  $\frac{1}{2}$  ccm Flüssigkeit mit 0,02 ccm Blut der osmotische Druck um 0,01 % NaCl abgenommen, ein Wert, der mittels des Beckmannschen Apparates kaum mit Sicherheit nachgewiesen werden kann (die Depression einer 1 %-igen NaCl-Lösung beträgt ungefähr  $-0,59^\circ$ , also ein Unterschied von 0,01 % NaCl-Lösung etwa  $-0,0059^\circ$ ).

Wird statt 0,5 ccm Flüssigkeit nun 0,25 ccm gebraucht, so lehrt die Berechnung, daß Hinzufügung von 0,02 ccm Blut den osmotischen Druck um den einer NaCl-Lösung von 0,014 % abgenommen hat, was mit einer Depression von  $-0,0084^\circ$  übereinstimmt. Einen derartigen Depressionsunterschied kann man gerade noch mittels des Beckmannschen Apparates entdecken.

Nun haben wir hier den Fall vorausgesetzt, daß der osmotische Druck der zu untersuchenden Flüssigkeit von dem

des Blutserums ziemlich viel abweicht. Gewöhnlich aber ist die Abweichung kleiner, also auch der Fehler dementsprechend geringer. Aber selbst wenn der Fehler statt kleiner noch größer wäre, so würde das kein Bedenken gegen die Methode bedeuten, weil ja auch die NaCl-Lösungen mit demselben Blutquantum vermischt werden.

Diese Erwägung hat Veranlassung gegeben zu untersuchen, ob die Methode nicht dahin zu vervollständigen wäre, daß mit der bereits gebrauchten Flüssigkeitsmenge neue Versuche an- gestellt würden. Darüber wird unter V die Rede sein.

Es erhebt sich noch ein zweiter theoretischer Einwand gegen die Methode. Man wird sich erinnern, in welcher Weise wir im Anfang das Prinzip ausgesprochen haben. Wir hoben hervor, daß es auf der Tatsache beruht, daß das Volumen der Blutkörperchen vom osmotischen Druck der umgebenden Flüssigkeit abhängig ist. Das ist jedoch nur der Fall, wenn die Blutkörperchen für die in der sie umgebenden Flüssigkeit gelösten Stoffe vollständig impermeabel sind. Dieser Umstand liegt bei unserer Versuchsanordnung aber nicht vor; denn wenn ein Blutkörperchen mit einer reinen NaCl-Lösung in Berührung gebracht wird, so findet ein Austausch zwischen einem Ion  $\text{CO}_2$  der Blutkörperchen und zwei Cl-Ionen der Umgebung statt. Da jedes Ion, von welcher Natur dasselbe auch sei, denselben osmotischen Druck ausübt, so wird durch den genannten Austausch der osmotische Druck des Blutkörpercheninhaltes gesteigert; dem zufolge quillt das Blutkörperchen in einer NaCl-Lösung, mit welcher der Inhalt bei völligem Fehlen von Permeabilität für Ionen isotonisch gewesen wäre und in der das Blutkörperchen das ursprüngliche Volumen hätte behalten müssen, wenn das Volumen lediglich vom osmotischen Druck der umgebenden Flüssigkeit abhängig war.

Es ist nun aber die Frage, ob die Blutkörperchen nicht dieselbe Quellung auch in der zu untersuchenden Flüssigkeit erfahren. Ist das der Fall, so wird der Einwand hinfällig. In der Tat werden die meisten Körperflüssigkeiten, die zur Untersuchung gelangen, wohl NaCl enthalten, nur in der Regel nicht in so großer Konzentration wie in der reinen NaCl-Lösung, die mit der zu untersuchenden Flüssigkeit isotonisch ist. Es liegt deshalb auf der Hand, daß durch den genannten Ionenaustausch

ein Fehler immerhin möglich bleibt. Nur das Experiment wird hier entscheiden können, ob dieser Fehler so groß werden kann, daß derselbe einen merkbaren Einfluß auf das Resultat ausübt.

Zu diesem Zweck haben wir den osmotischen Druck einiger Flüssigkeiten ermittelt mittels Gefrierpunktserniedrigung und mittels der neuen Methode, d. h. wir haben von der zu untersuchenden Flüssigkeit und von der nach unserer Methode bestimmten damit isotonischen NaCl-Lösung die Depression ermittelt. War unsere Methode zuverlässig, so sollten die beiden Gefrierpunktswerte miteinander übereinstimmen.

Die eine der zum genannten Zweck benutzten Flüssigkeiten war Lymphe aus dem Halsgefäße eines Kälbchens. Nachdem Koagulation stattgefunden und das Gerinnsel sich zurückgezogen hatte, wurde letzteres mittels Gaze entfernt und dann die klare gelbe Flüssigkeit durch Filtrierpapier filtriert. Dann wurde in Trichterröhrchen von 0,02 ccm Kapillarinhalt 1 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit gebracht und letztere mit 0,04 ccm Rinderblut versetzt. Gleiches geschah mit Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration. Mit jeder Flüssigkeit wurden zwei Parallelversuche angestellt. Nachdem die Blutkörperchen eine halbe Stunde mit den Flüssigkeiten in Berührung gewesen waren, wurden dieselben abzentrifugiert und zwar solange, bis das Sediment ein konstantes Volumen erreicht hatte.

Die folgende Tabelle zeigt den Gang eines Versuches.

Flüssigkeiten	Volumen des Blutkörperchensedimentes nach Zentrifugierung während						
	1/2 Std.	1/3 Std.	1/2 Std.	1/2 Std.	1/2 Std.	15 Min.	10 Min.
Lymphe	58	51	48	47	46	46	46
„	55	50	47	47	46	46	46
NaCl 0,9 ‰	58	54	50	49	49	49	49
„ „	59	54	52	50	49	49	49
NaCl 0,95 ‰	58	49	48	47	47	47	47
„ „	55	51	48	47	47	47	47
NaCl 1 ‰	56	50	47	46	45	45	45
„ „	54	49	47	46	45	45	45
NaCl 1,05 ‰	50	46	44	43	43	43	43
„ „	51	46	44	43	43	43	43

Aus diesem Versuche geht hervor, daß die Lymphe den Blutkörperchen ein Volumen von 46 erteilt, während eine 0,95 %ige Kochsalzlösung ein Volumen von 47 herbeiführt, eine 1 %ige dagegen ein Volumen von 45. Die Kochsalzlösung also, welche den Blutkörperchen dasselbe Volumen wie die Lymphe erteilt, liegt zwischen einer 0,95 %igen und einer 1 %igen.

Obgleich die richtige Zahl einwandfrei durch Interpolation berechnet hätte werden können, wurde, weil es sich hier um einen Beleg handelte, diese betreffende Zahl auf rein experimentellem Wege ermittelt, indem noch zwei neue NaCl-Lösungen zwischen den genannten bereitet wurden, nämlich NaCl 0,96 % und 0,98 %.

Weiter wurde statt 0,04 ccm 0,06 ccm Blut genommen. Wie nämlich aus obiger Tabelle ersichtlich, konnte eine viel größere Blutkörperchenmenge als die, welche 0,04 ccm Blut entspricht, im Kapillarteile des Trichterröhrchens noch einen Platz finden. Und natürlich ist es empfehlenswert, eine größere Blutmenge für die Versuche zu nehmen, weil dann der eventuelle Fehler geringer ist.

Aus der folgenden Tabelle sind die erhaltenen Zahlen ersichtlich.

Flüssigkeiten	Volumen des Blutkörperchensedimentes nach Zentrifugierung während						
	1/2 Std.	1/2 Std.	1/2 Std.	1/2 Std.	1/2 Std.	15 Min.	10 Min.
Lymphe	98	90	85	82	79	79	79
„	90	86	85	80	79	79	79
NaCl 0,9 %	105	100	94	89	84	83	83
„ „	93	90	88	87	83	82	82
NaCl 0,95 %	100	94	90	86	81	81	81
„ „	105	96	88	82	81	81	81
NaCl 0,96 %	98	91	85	81	80	80	80
„ „	99	92	83	80	80	80	80
NaCl 0,98 %	93	88	83	81	79	79	79
„ „	95	89	83	80	79	79	79
NaCl 1 %	88	84	80	79	78	78	78
„ „	95	88	85	80	79	78	78



Man ersieht aus dieser Tabelle, daß die Lymphe einer Kochsalzlösung von 0,98 % entspricht, denn beide Flüssigkeiten erteilen den Blutkörperchen ein Volumen von 79. Diese Kochsalzlösung ist auch diejenige, welche sich bei der Berechnung aus der vorigen Tabelle ergibt.

Es erhebt sich nun die weitere Frage, haben die Lymphe und die gefundene 0,98 %-ige NaCl-Lösung dieselbe Gefrierpunktserniedrigung?

Lymphe . . . . .	$\Delta = -0,612$
NaCl 0,9 % . . . . .	$\Delta = -0,563$
„ 0,95 % . . . . .	$\Delta = -0,598$
„ 0,98 % . . . . .	$\Delta = -0,615$
„ 1 % . . . . .	$\Delta = -0,623$

Man sieht, daß auch die Gefrierpunktserniedrigung der Lymphe mit der einer 0,98 %-igen NaCl-Lösung sehr gut übereinstimmt.

Praktisch kann also auch der letzte (siehe Seite 270) gegen die Methode erhobene Einwand als hinfällig betrachtet werden.

Indessen könnte man noch die Bemerkung machen, daß in aller Strenge die Kontrolle mittels Gefrierpunktserniedrigung nicht einwandfrei ist, denn bei der Depressionsbestimmung handelt es sich um einen elektrolytischen Dissoziationszustand bei etwa  $-0,6^\circ$ , während bei der Volumenbestimmung mittels Blutkörperchen die Temperatur Zimmertemperatur ist. Man vergesse aber nicht, daß sich bei beiden Methoden Lymphe und Kochsalzlösung jedesmal unter denselben Umständen befinden.

#### V. Genauigkeitsgrad und Zuverlässigkeit des Verfahrens.

Ogleich das Beispiel, an dem wir gezeigt haben, daß unsere Methode dasselbe Resultat gibt wie die Gefrierpunktserniedrigung, auch die Genauigkeit des Abmessens und die Zuverlässigkeit der Volumenermittlung aus den Parallelversuchen ersehen läßt, wollen wir zum Überfluß noch ein paar Versuche erwähnen, aus welchen letzteres noch einmal hervorgeht. Sie betreffen Tränenflüssigkeit und Humor aquaeus. Die Experimente mit Tränenflüssigkeit sind ausgeführt worden mit Trichterröhrchen von 0,01 ccm Kapillarinhalt; die Trichterröhrchen für das Kammerwasser hatten einen Kapillarinhalt von 0,02 ccm.

Die Tabellen werden ohne weitere Erklärung verständlich sein.

**Osmotischer Druck von Tränenflüssigkeit.**

Benutzt sind hier Trichterröhrchen von 0,01 ccm Kapillarinhalt. Das Volumen der Tränenflüssigkeit betrug 0,25 ccm, die Menge des angewandten Kaninchenblutes 0,02 ccm. Es wurden jedesmal zwei Versuche mit derselben Flüssigkeit angestellt.

Salzlösungen	Volumen der Bodensätze nach den folgenden Zentrifugierzeiten				
	$\frac{1}{2}$ Std.	$\frac{1}{2}$ Std.	$\frac{1}{2}$ Std.	$\frac{1}{2}$ Std.	$\frac{1}{4}$ Std.
Tränenflüssigkeit	78	63	$59\frac{1}{2}$	57	<b>57</b>
„	$76\frac{1}{2}$	64	60	57	<b>57</b>
NaCl 0,9 %	74	69	68	68	68
„	73	69	68	68	68
NaCl 1,1 %	71	65	64	64	64
„	68	64	$64\frac{1}{2}$	$64\frac{1}{2}$	$64\frac{1}{2}$
NaCl 1,2 %	68	65	63	$61\frac{1}{2}$	$61\frac{1}{2}$
„	69	$65\frac{1}{2}$	63	62	62
NaCl 1,3 %	67	62	60	59	59
„	67	62	60	59	59
NaCl 1,4 %	69	62	$58\frac{1}{2}$	57	57
„	67	$62\frac{1}{2}$	58	$57\frac{1}{2}$	$57\frac{1}{2}$
NaCl 1,5 %	62	58	55	55	55
„	64	59	56	56	56

Aus diesem Versuch geht hervor, daß die NaCl-Lösung, welche den Blutkörperchen des 0,02 ccm Kaninchenblutes ein Volumen von 57 erteilt, eine 1,4 %-ige ist. Übrigens ersieht man, daß die Zahlen der Parallelversuche sehr gut miteinander übereinstimmen. (Jede Teilung der Röhrchen entspricht hier  $\frac{0,01}{100} = 0,0001$  ccm.)

Das andere Beispiel, das ich hier vorführen möchte, betrifft Kammerwasser des Rindes. Ich will dieses Beispiel aber auch noch zu einem anderen Zweck benutzen.

Auf S. 270 wurde nämlich mitgeteilt, daß ich versucht habe, mit derselben kleinen Menge der zu untersuchenden Flüssigkeit mehrere Experimente anzustellen. Ich verfuhr in folgender Weise.

Nachdem nach der beschriebenen Methode der osmotische Druck der zu untersuchenden Flüssigkeit ermittelt war, wurden

alle in den Trichterröhrchen sich befindenden Flüssigkeiten daraus entfernt, in andere Trichterröhrchen übergebracht und mit gleichen Mengen vom bereits gebrauchten Blute versetzt.

Dann wurde zentrifugiert bis zum Eintritt von konstantem Volumen und wieder verglichen, welche Salzlösung den Blutkörperchen dasselbe Volumen erteilte wie die zu untersuchende Flüssigkeit. Diese Salzlösung sollte dann dieselbe sein, wie die erst gefundene.

Ich lasse hier einen Versuch zur Bestimmung des osmotischen Druckes von Lymphe folgen.

Röhrchen von 0,02 ccm Kapillarinhalt.

Die zu untersuchende Flüssigkeit ist Lymphe eines Kalbes. Das gebrauchte Blut stammt vom Rind. Es werden 1 ccm Flüssigkeit und 0,06 ccm defibriniertes und filtriertes Blut angewandt.

Das Resultat war, daß die Lymphe den Blutkörperchen ein Volumen von 85 erteilte, und daß das ebenso der Fall war mit der Kochsalzlösung von 0,95 %. Somit war die Lymphe isotonisch mit einer 0,95 %-igen NaCl-Lösung.

Weiter wurden dann die Flüssigkeiten (Lymph- und Kochsalzlösungen) aus den Trichterröhrchen entfernt, in andere übergebracht und aufs neue mit 0,06 ccm des Rinderblutes versetzt. Nach Zentrifugierung zum konstanten Volumen ergab sich nun für die Lymphe 74, während die NaCl-Lösung, welche den Blutkörperchen ebenfalls ein Volumen von 74 erteilte, wieder eine 0,95 %-ige war.

Beim ersten Anblick könnte man mit diesem Resultate zufrieden sein, denn in beiden Fällen erwies sich die Lymphe als isotonisch mit einer 0,95 %igen NaCl-Lösung.

Bei näherer Betrachtung muß man sich aber die Frage vorlegen, weshalb das Blutkörperchen-Volumen im ersten Fall 85 und im zweiten nur 74 betrug.

Es hat ziemlich viel Zeit gekostet, diese Frage zu lösen. Ich werde die systematischen Untersuchungen, die ich darüber angestellt habe, dem Leser ersparen. Schließlich erwies sich die Erklärung als lächerlich einfach. Der durch das Zentrifugieren herbeigeführte Luftstrom hatte in den offenen Röhrchen eine erhebliche Wasserverdunstung veranlaßt und dadurch Einengung der Flüssigkeit. Deshalb wurde dieselbe konzentrierter und das Blutkörperchen-Volumen kleiner.

Aus diesem Grunde wurden dann die beschriebenen Ebonitkämpchen angefertigt. Und von dieser Zeit an kamen die Abweichungen nicht mehr vor.

Man könnte hier zwei Bemerkungen machen. Zunächst, warum die Korke, mit denen die Röhren doch nach der Vermischung von Flüssigkeit und Blut ca.  $\frac{1}{2}$  Stunde verschlossen waren, nicht auch während der Zentrifugierung darauf stehen blieben. Die Antwort ist, daß dieselben gerade durch das Zentrifugieren zu tief in die Röhren und dann in die Flüssigkeit gedrückt werden.

Weiter wird man einwenden können, daß die Verdunstung sich auch in der ersten Versuchsreihe auf das Blutkörperchen-Volumen geltend gemacht haben wird. Das kann aber nicht der Fall sein, da dieselben bereits nach 10—15 Minuten ganz in den Kapillarraum getrieben sind. Sie erfahren dann den Einfluß der Oberflächenverdunstung nicht mehr.

Es steht also nichts im Wege, dieselbe kleine Flüssigkeitsmenge, die man zur Bestimmung des osmotischen Druckes zur Verfügung hat, zwei oder mehr Male zu benutzen. Hierdurch gewinnt die Methode in erheblichem Maße an Brauchbarkeit. Ich erwähne jetzt noch einen Versuch mit Kammerwasser.

Röhren von 0,02 ccm Kapillarinhalt.

$\frac{1}{2}$  ccm Humor aquaeus des Rindes und auch  $\frac{1}{2}$  ccm Chlornatriumlösungen werden vermischt mit 0,04 ccm defibriniertem Rindsblut. Die Gemische werden  $\frac{3}{4}$  Stunde sich selbst überlassen, dann zentrifugiert zu konstantem Volumen.

Nr.	Flüssigkeiten	Volumen des Sedimentes nach Zentrifugierung während				
		1 Std.	1 Std.	$\frac{1}{2}$ Std.	$\frac{1}{2}$ Std.	15 Min.
1	$\frac{1}{2}$ ccm Humor aquaeus + 0,04 ccm Blut	75	73	73	73	73
2	" " + " "	75	73	73	73	73
3	$\frac{1}{2}$ ccm NaCl 0,9 % + " "	79	76	76	76	76
4	" " " + " "	79	76	76	76	76
5	$\frac{1}{2}$ ccm NaCl 0,95 % + " "	77	75	75	75	75
6	" " " + " "	77	75	75	75	75
7	$\frac{1}{2}$ ccm NaCl 1 % + " "	74	71	71	71	71
8	" " " + " "	74	71	71	71	71
9	$\frac{1}{2}$ ccm NaCl 1,05 % + " "	74	70	70	70	70
10	" " " + " "	73	70	70	70	70
11	$\frac{1}{2}$ ccm NaCl 1,1 % + " "	76	72	69	69	69
12	" " " + " "	71	70	69	69	69

Aus dieser Versuchsreihe geht hervor:

1. daß die Parallelversuche immer dieselben Resultate geben,
2. daß der osmotische Druck des Kammerwassers einer NaCl-Lösung entspricht, welche zwischen 0,95 und 1 % und zwar in der Mitte gelegen ist.

Nachdem dieser Versuch beendet war, wurden die Flüssigkeiten aus den Trichterröhrchen genommen und in andere gleichartige Trichterröhrchen übergeführt. Dann wurden diese Flüssigkeiten beschickt mit je 0,04 ccm des oben benutzten Blutes, das jedesmal vor der Abmessung gut durchgeschüttelt war. Nachdem die Flüssigkeiten mit je 0,04 ccm Blut versetzt waren, wurden die Trichterröhrchen mit den Ebonitdeckeln verschlossen; dann wurde geschüttelt und die Gemische  $\frac{3}{4}$  Stunde sich selbst überlassen. Die Zentrifugierung ergab die folgenden Resultate:

Nr.	Flüssigkeiten	Volumen des Sedimentes nach Zentrifugierung während				
		1 Std.	1 Std.	$\frac{1}{2}$ Std.	$\frac{1}{2}$ Std.	15 Min.
13	Humor aquaeus + 0,04 ccm Blut	78	73	73	73	73
14	„ + „ „	78	73	73	73	73
15	NaCl 0,9 % + „ „	81	76	76	76	76
16	„ „ + „ „	81	76	76	76	76
17	NaCl 0,95 % + „ „	78	75	75	75	75
18	„ „ + „ „	79	75	75	75	75
19	NaCl 1 % + „ „	75	72	71	71	71
20	„ „ + „ „	76	71	71	71	71
21	NaCl 1,05 % + „ „	76	71	70	70	70
22	„ „ + „ „	76	71	70	70	70
23	NaCl 1,1 % + „ „	82	72	70	69	69
24	„ „ + „ „	82	72	70	69	69

Aus dieser Tabelle erhellt:

1. daß die Parallelversuche schön übereinstimmende Resultate geben,
2. daß der Humor aquaeus einen osmotischen Druck besitzt, welcher übereinstimmt mit einer Kochsalzlösung, die in der Mitte steht zwischen dem einer Koch-

salzlösung von 0,95 % und 1 %, was auch mit den Ergebnissen von nach anderen Methoden ausgeführten Untersuchungen übereinstimmt.<sup>1)</sup>

3. Sind die in der zweiten Versuchsreihe gewonnenen Zahlen für das Volumen der Sedimente genau dieselben, wie die, welche in der ersten Versuchsreihe gefunden wurden.

Hieraus ergibt sich, daß wir in der erwähnten Ausbreitung der Methode eine sehr zuverlässige Kontrolle besitzen.

In Wirklichkeit haben wir in diesen Versuchsreihen die Resultate dreimal kontrolliert; denn wir haben jedesmal zwei Parallelversuche angestellt. Eigentlich ist letzteres nicht notwendig; auch wird es nicht immer ausführbar sein, wenn man nicht über die doppelte Menge der zu untersuchenden Flüssigkeit verfügt. In diesem Falle kann man dann doch Kontroll-Experimente ausführen, indem man, wie oben gezeigt wurde, die Flüssigkeit aus dem Trichterröhrchen entfernt und aufs neue mit Blut untersucht.

Wenn erwünscht, kann dann die Zeit auch noch erheblich abgekürzt werden.

Man braucht nämlich nicht mit der zweiten Versuchsreihe zu warten, bis in der ersten konstantes Volumen erreicht ist. Sobald in der ersten Versuchsreihe die Blutkörperchen in den Kapillarteil der Röhrchen getrieben sind — und das ist immer schon innerhalb einer halben Stunde der Fall — so kann man die Flüssigkeiten bereits abheben und für die zweite Versuchsreihe benutzen.

Hat die Zentrifuge nur Raum für 12 Röhrchen, so können beide Versuchsreihen noch gleichzeitig zentrifugiert werden.

Da ein Unterschied von 0,1 % NaCl-Lösung im Mittel 4 Teilstrichen entspricht und bei der Ablesung Fehler von einem Teilstrich nicht gemacht zu werden brauchen, so geht die Genauigkeit des Verfahrens doch wenigstens bis zu 0,025 % NaCl-Lösung, d. h. Unterschiede des osmotischen Druckes,

---

<sup>1)</sup> Dreser, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmak. **29**, 318. 1892. — Hamburger, Verhand. d. koninkl. Akad. v. Wetensch. **3**, Nr. 5. 1893. — Kunst, Beitr. zur Kenntnis der Farbenzerstreuung und des osmotischen Druckes einiger brechenden Medien des Auges, Inaug.-Diss., Freiburg i. Br. 1895. — Vergl. auch Hamburger, Osmot. Druck u. Ionenlehre, **3**, 163.

einer 0,025 %igen NaCl-Lösung entsprechend, können sicher aufgedeckt werden. Diese Genauigkeit steht der mittels des Beckmannschen Apparates erzielbaren nur wenig nach.

#### VI. Anwendbarkeit der Methode.

Leider aber ist die Anwendbarkeit unserer Methode eine beschränkte und nicht so allgemein wie die der Gefrierpunktniedrigung. Sie läßt nämlich im Stich, erstens für diejenigen Lösungen, welche Hämolyse bei den Blutkörperchen herbeiführen, wie z. B. Galle, und zwar weil die Schatten sich gegenüber Konzentrationsunterschieden der umgebenden Flüssigkeit grundverschieden verhalten von den unversehrten Erythrocyten. Zweitens ist die Methode auch unbrauchbar für Flüssigkeiten, die in erheblicher Menge Substanzen enthalten, welche trotz ihres bedeutenden Anteiles am osmotischen Druck der Flüssigkeit das Volumen der Blutkörperchen nicht beeinflussen.

Als Beispiel ist Harn zu nennen. Der Harnstoff nämlich ist in nicht zu vernachlässigender Weise am osmotischen Druck, z. B. an der Gefrierpunktniedrigung des Harns beteiligt. Auf das Volumen der Blutkörperchen übt die Substanz jedoch keinen Einfluß aus, weil sie sich über diese Zellen und die Umgebung gleichmäßig verteilt. Haben z. B. die Blutkörperchen einer gewissen Blutmenge in einer 0,9 %igen NaCl-Lösung ein Volumen von 88, so bleibt das Volumen nahezu unverändert, wenn man in dieser NaCl-Lösung einige Prozente Harnstoff auflöst. Ich sage „nahezu“, denn der Harnstoff drängt die elektrolytische Dissoziation der 0,9 %igen NaCl-Lösung etwas zurück und erniedrigt in dieser Weise ein wenig deren osmotischen Druck.

Hier beim Harnstoff handelt es sich also nicht wie im ersten Falle um einen hämolytischen Stoff, der beim Eindringen in die Blutkörperchen dieselben zerstört, sondern um eine Substanz, welche, obgleich sie ebenfalls in die Blutkörperchen eindringt, dieselben unversehrt läßt.

In keinem der beiden Fälle aber ist die Methode zu der Ermittlung des osmotischen Druckes brauchbar. Ganz unnütz aber würde im zweiten Falle eine Bestimmung nicht sein, denn man kann mittels derselben denjenigen Teil des osmotischen Druckes der Lösung feststellen, welcher den Substanzen entspricht, die nicht in die Blutkörperchen eindringen. Auch diese

Zahl hat vom physiologischen Standpunkte einen Wert. Bei Kombination mit Gefrierpunktniedrigung kann man durch Subtraktion den Gehalt derjenigen Stoffe ermitteln, für die, wie Harnstoff, die Zellen permeabel sind <sup>1)</sup>).

Schließlich sei noch erwähnt, daß Färbung der zu untersuchenden Lösung der Methode nicht schadet. Sie ist also auch anwendbar für blutfarbstoffhaltende Transsudat- und Exsudatflüssigkeit, Cerebrospinalflüssigkeit etc.

### Résumé.

Das oben beschriebene Verfahren läßt sich folgenderweise zusammenfassen:

1. Man nimmt 6 Trichterröhrchen von der angegebenen Gestalt und bringt in das erste 0,25 ccm oder mehr der zu untersuchenden Flüssigkeit und in die 5 andern dasselbe Volumen an Kochsalzlösungen steigender Konzentration.

Die genannten Flüssigkeiten werden versetzt mit derselben Menge defibrinierten und durch Filtrierpapier filtrierten Bluts.

Nachdem die Trichterröhrchen mittels genau passenden Ebonitdeckelchen verschlossen sind, werden die Gemische geschüttelt und  $\frac{1}{2}$  bis  $\frac{3}{4}$  Stunden sich selbst überlassen.

Nachher wird bis zum Eintritt von konstantem Volumen zentrifugiert. Der osmotische Druck der zu untersuchenden Flüssigkeit entspricht dann derjenigen Kochsalzlösung, welche den Blutkörperchen dasselbe Volumen erteilt, wie die zu untersuchende Flüssigkeit selbst.

2. Das Resultat läßt sich kontrollieren, indem man die Flüssigkeiten, welche in der vorigen Versuchsreihe im trichterförmigen Teil der Röhrchen sich befinden, abhebt und in neue Röhrchen überbringt, aufs neue mit gleichen Quantitäten Blut versetzt, wie oben benutzt wurden, schüttelt, wartet und zentrifugiert bis zum konstanten Volumen.

Die nunmehrigen Sedimentvolumina sollen genau dieselbe Kochsalzlösung als diejenige anzeigen, welche mit der zu untersuchenden Flüssigkeit isotonisch ist und auch in der ersten Versuchsreihe gefunden wurde.

3. Mit diesem sub 2 angegebenen Kontrollversuch braucht man nicht zu warten, bis in der Versuchsreihe konstantes Volumen

<sup>1)</sup> Hamburger, Centralbl. f. innere Medizin 21, Nr. 12. 1900.



erreicht ist, denn man kann die klaren Flüssigkeiten immer schon nach einer Zentrifugierung von einer halben Stunde abheben. In diesem Zeitverlauf sind nämlich alle Blutkörperchen in den Kapillarteil getrieben.

4. Was die Wahl der Röhrrchen betrifft, kann man hierzu solche anwenden, deren kalibrierter Kapillarteil nur 0,01 ccm faßt. In diesem Falle hat man 0,02 ccm Blut hinzuzufügen. Obgleich diese Röhrrchen vollkommen zuverlässige Resultate geben, muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß die Reinigung viel Geduld und Aufmerksamkeit erfordert. Das ist aber bei weitem nicht in dem Maße der Fall bei Röhrrchen, deren kalibrierter kapillarer Teil 0,02 ccm faßt. Das Lumen bei diesen ist weiter. Die hierzu erforderliche Blutmenge beträgt 0,04 ccm.

Hat man 1 ccm Flüssigkeit zur Verfügung, so empfiehlt es sich, Röhrrchen von 0,04 ccm Kapillarinhalt zu verwenden, denn diese Apparätchen haben bei derselben Größe wie die vorigen selbstverständlich ein noch weiteres Lumen und lassen sich deshalb noch bequemer reinigen. Es ist empfehlenswert hier 0,08 ccm Blut zu gebrauchen. In den meisten Fällen verwende ich Röhrrchen von 0,02 ccm.

5. Das Abmessen des Blutes erfolgt mittels einer an der Spitze ausgezogenen Kapillarpipette, welche mit einem Gummrohr versehen ist. Wenn das Blut über den Teilstrich hinaufgezogen ist, hält man die Pipette horizontal, trocknet die Spitze mit einem Tuch ab und beurteilt den Stand des Blutes über einem Stück weißen Papiers als Untergrund. Steht das Blut noch über den Teilstrich, so tupft man die Spitze so lange gegen die flache Hand oder gegen ein Tuch — nicht gegen Filtrierpapier — bis der Teilstrich erreicht ist.

6. Eine kräftige Zentrifuge ist notwendig. Die Runnesche elektrische Zentrifuge, welche nach meiner Angabe 4 Gestelle enthält, die je 3 Trichterröhrrchen aufnehmen können, genügt allen Anforderungen vollkommen (vergl. S. 266 ff.).

Da es sich hier um sehr kleine Quantitäten handelt, liegt es auf der Hand, daß man äußerst genau arbeiten muß. Bedenkt man das aber, so erhält man überaus zuverlässige Resultate.

---

## Synthese von Oxy- und Di-aminosäuren.

### III. Mitteilung<sup>1)</sup>.

Über  $\alpha$ - $\alpha_1$ -Diamino-azelaänsäure,  $\alpha$ - $\beta$ -Diamino-buttersäure und  $\alpha$ -Oxy- $\beta$ -aminobuttersäure.

Von

**Carl Neuberg.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts  
der Universität zu Berlin.)

(Eingegangen am 12. Juni 1906.)

Die Aminosäuren haben ein allgemeineres Interesse erlangt, seitdem man weiß, daß sie das Material sind, aus dem sämtliche Eiweißkörper sich aufbauen. Schon fast 100 Jahre alt ist die Kenntnis des Monoaminosäuren, speziell des Leucins und des Tyrosins, die als leicht isolierbare Produkte bereits den ersten Untersuchern der Proteinstoffe auffielen. Sehr viel jüngeren Datums ist die Kenntnis der etwas komplizierter gebauten Diaminosäuren und Oxyaminosäuren. Die Entdeckung der ersteren verdankt man Drechsel, während die allgemeine Beteiligung der letzteren am Aufbau der Eiweißkörper erst auf Grund der Arbeiten von Emil Fischer<sup>2)</sup>, Zd. H. Skraup<sup>3)</sup> u. a. nachgewiesen wurde.

Bei den drei genannten Kategorien hat man wieder ein- und zwei- und mehrbasische Säuren zu unterscheiden, d. h. Säuren vom Typus des Glykokolls und der Asparaginsäure

<sup>1)</sup> I. Mitteilung siehe Ztschr. f. physiol. Chem. **44**, 147. 1905.

II. Mitteilung siehe Ztschr. f. physiol. Chem. **45**, 92. 1905.

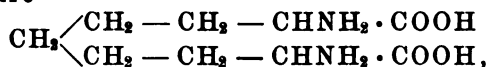
<sup>2)</sup> Ber. **33**, 2660. 1902.

<sup>3)</sup> Ztschr. f. physiol. Chem. **42**, 274. 1904. Wiener Monatshefte 26, 247. 1905.

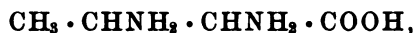
einerseits, des Lysins und der Kaseinsäure, sowie schließlich des Serins und der Diaminotrioxydodekansäure andererseits.

Bei weitem die Mehrzahl der bei der Spaltung der Eiweißkörper aufgefundenen Aminosäuren sind  $\alpha$ -Aminosäuren. Doch scheinen gelegentlich Autoren, wie Levene und Ellinger, auch  $\beta$ -Säuren begegnet zu sein.

Die Substanzen, die der einen wie der anderen Reihe angehören, besitzen ein gewisses Interesse, und im folgenden sei die Synthese einer neuen Diaminodikarbonsäure, der Diaminoazelaänsäure



einer neuen Diaminomonokarbonsäure, der  $\alpha$ - $\beta$ -Diaminobuttersäure



und die einer Oxyaminosäure, der  $\alpha$ -Oxy- $\beta$ -aminobuttersäure (Methylisoserin)

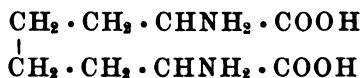


beschrieben.

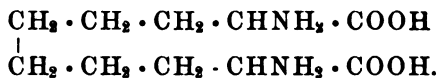
Die Zahl der künstlich dargestellten Diaminodikarbonsäuren war bisher eine sehr spärliche. Sie beschränkte sich auf die  $\alpha\alpha_1$ -Diaminobernsteinsäure



von Th. Lehrfeld<sup>1)</sup> und J. Tafel<sup>2)</sup>, sowie auf die jüngst von C. Neuberg und E. Neimann<sup>3)</sup> dargestellten  $\alpha$ - $\alpha_1$ -Diaminokorksäure



und  $\alpha$ - $\alpha_1$ -Diaminosebazinsäure



Daß im Gegensatze zu den Monoaminosäuren nur wenige Vertreter der Diaminodikarbonsäuren dargestellt wurden, liegt an der Schwierigkeit der Synthese. Bei den  $\alpha$ -Halogenfettsäuren der Essigsäurereihe vollzieht sich der Austausch von Chlor oder Brom gegen die Aminogruppe bei den niederen wie höheren

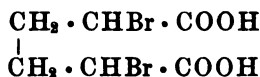
<sup>1)</sup> Ber. **14**, 1817.

<sup>2)</sup> Ber. **20**, 244; **26**. 1890.

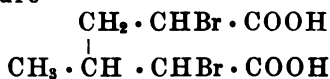
<sup>3)</sup> Ztschr. f. physiol. Chem. **45**, 98. 1905.

Gliedern mit ziemlich gleicher Leichtigkeit. Dagegen bestehen bei den  $\alpha\alpha_1$ -Dihalogensäuren der Bernsteinsäurereihe erhebliche Differenzen. Die letztgenannte Säure läßt sich zwar durch Behandlung mit Ammoniak in kleinen Mengen in die entsprechende Diaminosäure umwandeln. Doch die Hauptmenge der Reaktionsprodukte besteht nach Neuberg und Silbermann aus anderen Substanzen, und zwar Acetylendikarbonsäuren, resp. Acetylen.

Die  $\alpha\alpha_1$ -Dibromadipinsäure<sup>1)</sup>



und ihr  $\beta$ -Methylsubstitutionsprodukt, die  $\alpha\alpha_1$ -Dibrom- $\beta$ -Methyladipinsäure



werden durch Ammoniak, wie R. Willstätter<sup>2)</sup> fand, in ringförmige Verbindungen mit einem Stickstoffatom verwandelt, in Dikarbonsäuren des Pyrrolidins. Der gleiche Autor fand<sup>3)</sup>, daß die  $\alpha\alpha_1$ -Dibrompimelinsäure durch wässriges Ammoniak auch in eine ringförmige, aber stickstofffreie Verbindung übergeführt wird, in eine Dikarbonsäure des Cyklopentens. Dagegen liefert der Ester der letztgenannten Säure nach Emil Fischer<sup>4)</sup> bei Behandlung mit flüssigem Ammoniak wiederum eine heterocyclische Substanz, die 1,5-Piperidindikarbonsäure.

Glatt aber und in typischer Weise verläuft die Reaktion zwischen Ammoniak und den höheren Dibromsäuren dieser Reihe. Sie führt nach Neuberg und Neimann (a. a. O.) von der  $\alpha\alpha_1$ -Dibromkorksäure und der  $\alpha\alpha_1$ -Dibromsebazinsäure zu der entsprechenden  $\alpha\alpha_1$ -Diaminokorksäure und der  $\alpha\alpha_1$ -Diaminosebacinsäure.

Einen weiteren Weg für die künstliche Darstellung von Aminosäuren dieser Reihe hat jüngst S. P. L. Sörensen<sup>5)</sup> angekündigt, dem es gelang, aus Na-Phthalimidomalonester mit Äthylenbromid Äthylendiphthalimidomalonester und weiterhin

<sup>1)</sup> Ber. **33**, 2065. 1902.

<sup>2)</sup> Ber. **32**, 1290. 1890.

<sup>3)</sup> Ber. **23**, 657. 1895.

<sup>4)</sup> Ber. **34**, 2544. 1901.

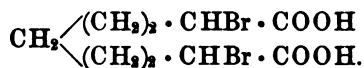
<sup>5)</sup> Ztschr. f. physiol. Chem. **44**, 452. 1905.

$\alpha\alpha_1$ -Diaminoadipinsäure, ferner auf analogem Wege mit Trimethylenbromid die  $\alpha\alpha_1$ -Diaminopimelinsäure darzustellen.

Somit sind die hierhergehörigen Säuren mit 6, 7, 8 und 10 Kohlenstoffatomen durch Synthese zugänglich.

Zu der noch fehlenden  $C_9$ -Säure gelangt man auf folgendem Wege:

Die Bromierung der normalen Azelainsäure bei Gegenwart von Phosphor führte zu der bisher unbekanntem  $\alpha\alpha_1$ -Dibromazelainsäure



Letztere ist ölig und liefert bei Behandlung mit konzentriertem, wässrigem Ammoniak und kohlenurem Ammon bei  $125^\circ$  die  $\alpha\alpha_1$ -Diaminoazelainsäure. Diese ist auffallenderweise leichter löslich, als die Diaminokork- und Diaminosebazinsäure, zwischen denen sie doch in der Mitte steht. Immerhin kann sie durch einfaches Auswaschen von dem bei der Umsetzung entstehenden Bromammonium befreit werden. Gleich ihren Homologen vereinigt sie den Charakter einer Mono- und einer Diaminosäure.

Sie löst sich in heißem Wasser, noch leichter in Alkalien oder Mineralsäuren, desgleichen in Ammoniak. Sie bildet außerordentlich wenig lösliche Salze mit den Schwermetallen, z. B. mit Kupfer, Silber, Quecksilber und Blei.

Durch die Fällbarkeit mit Blei unterscheidet sie sich von den gewöhnlichen Aminosäuren, gleich diesen gibt sie aber weder mit Pikrinsäure noch mit Platinchloridchlorwasserstoffsäure oder Goldchlorid eine in Wasser schwer lösliche Verbindung. Dagegen nähert sie sich wieder den Diaminosäuren durch die wenn auch unvollständige Fällbarkeit durch Phosphorwolframsäure aus saurer Lösung.

Mit zwei Molekülen Phenylisocyanat vereinigt sich die Diaminoazelainsäure zu einer kristallinischen Phenylhydatoin-säure; mit Alkohol und Salzsäuregas kann sie verestert werden.

Bemerkenswert ist, daß die Substanz, die beim Überhitzen fichtenspanrötende Dämpfe liefert, nicht süß, sondern lediglich fade schmeckt. Trotzdem ist sie zweifelsohne eine  $\alpha$ -Aminosäure und enthält zweimal die dulcigene Gruppe



Genau das gleiche Verhalten haben Neuberg und Neimann (a. a. O.) bei der Diamino-korksäure und Diamino-sebacinsäure

beobachtet. Später haben E. Fischer und O. Warburg<sup>1)</sup> mitgeteilt, daß die verschiedenen Antipoden des Leucins ungleich schmecken, die natürliche l-Verbindung schwach bitter, die d-Form stark süß und der Racemkörper entsprechend schwach süß. Der fade Geschmack der erwähnten Diaminocarbonsäuren, die alle optisch inaktiv sind, kann durch geringe Süßigkeit einer der aktiven Komponenten bedingt sein, aber auch durch die Länge der Atomkette; bekanntlich nimmt der süße Geschmack der meisten Aminosäuren bei den Peptiden schon ab, viele Peptone sind intensiv bitter.

Von der Buttersäure leiten sich drei verschiedene Diaminosäuren ab. Die  $\alpha$ - $\beta$ -,  $\alpha$ - $\gamma$ - und  $\beta$ - $\gamma$ -Säure, wenn man von dem wenig wahrscheinlichen Falle absieht, daß zwei Aminogruppen an einem Kohlenstoffatom haften würden. Die  $\alpha$ - $\gamma$ -Säure ist durch Synthese von Emil Fischer<sup>2)</sup> dargestellt. Im folgenden sei die Darstellung der bisher unbekanntenen  $\alpha$ - $\beta$ -Säure beschrieben.

Das Ausgangsprodukt bildet das sogenannte Crotonsäuredibromid oder die  $\alpha$ - $\beta$ -Dibrombuttersäure, erhältlich durch Addition von zwei Atomen Brom an Crotonsäure. Diese Verbindung gibt bei Behandlung mit Ammoniak Bromammonium und  $\alpha$ - $\beta$ -Diaminobuttersäure. Die Trennung von Bromammonium läßt sich durch Entfernung des Halogens mittels  $\text{Ag}_2\text{O}$  und Verdampfen des Ammoniaks ausführen. Es hinterbleibt nach der Konzentration ein gelbgefärbter Sirup, der zum großen Teil aus der Diaminosäure besteht; gleich der Mehrzahl der bekannten Diaminosäuren kristallisiert sie selbst nicht, resp. schlecht.

Es wurde jedoch beobachtet, daß in einer über Phosphor-pentoxyd aufgehobenen Probe nach einiger Zeit Abscheidung von Kristallen begann. Bei etwa vierwöchentlichem Stehen, während dessen auf eine reichhaltige Kristallabscheidung gehofft wurde, gingen dieselben aber wieder in Lösung, um auf Zusatz von wenig Wasser wieder auszufallen. Sie wurden durch Umkristallisieren rein erhalten, und ihre nähere Untersuchung zeigte, daß sie keine Diaminosäure darstellen, indem z. B. ihre wässrige Lösung nicht mit Phosphorwolframsäure fällbar ist, wohl aber Kupferoxyd mit tiefblauer Farbe löst und überhaupt den Charakter einer Monaminosäure zeigt.

<sup>1)</sup> Ber. **88**, 3997. 1905.

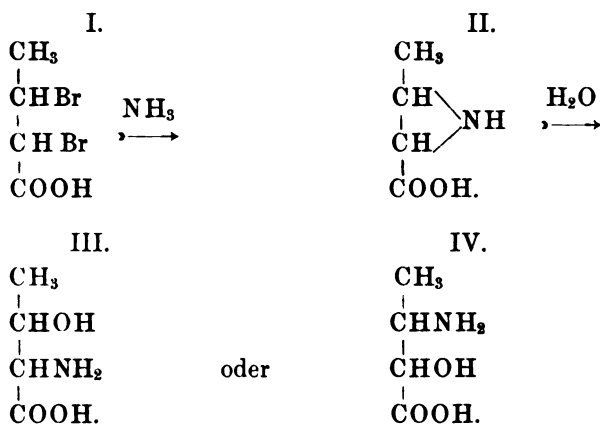
<sup>2)</sup> Ber. **84**, 2900. 1901.

Die Analyse führte scharf zur Formel  $C_4H_9O_3N$ , welche einer Oxyaminobuttersäure entspricht, und zur Annahme der gleichen Zusammensetzung führte die Analyse des kristallisierenden  $\alpha$ -Naphthylisocyanatderivates



Die Bildung einer Oxyaminosäure kann man sich nun etwa auf folgendem Wege erklären.

Vielleicht reagieren zunächst die zwei Bromatome der  $\alpha$ - $\beta$ -Dibrombuttersäure (I) mit einem Molekül Ammoniak unter Bildung einer Imidobuttersäure (II) die dann unter Wasseraufnahme die  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -oxybuttersäure (III) oder die  $\beta$ -Amino- $\alpha$ -oxybuttersäure (IV) liefern kann,



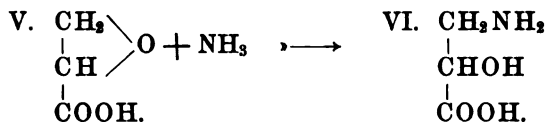
Nun ist bekannt, daß bei den in vielen Beziehungen den Imidosäuren analogen Epihydrinsäuren<sup>1)</sup> bei Behandlung mit Ammoniak die Aufrichtung der Äthylenoxydbindung derart erfolgt, daß Oxyaminosäuren und zwar  $\alpha$ -Oxy- $\beta$ -aminosäuren entstehen. So erhält man nach Melikoff aus Epiglyzidsäure<sup>2)</sup> (V) durch Ammoniak eine Oxyaminopropionsäure, für die aus

<sup>1)</sup> Ber. 13, 958. 1880.

<sup>2)</sup> Die nahe Beziehung der Epiglyzidsäuren zu den Dibromsäuren folgt auch aus einer Beobachtung, die jüngst von Neuberg und Marx (noch unveröffentlicht) gemacht ist. Die  $\gamma$ - $\delta$ -Dibromvaleriansäure  $CH_2Br - CHBr - CH_2 - CH_2 \cdot COOH$  gibt mit wässrigem Ammoniak statt der entsprechenden  $\gamma$ - $\delta$ -Diaminvaleriansäure die Epihydrinsäure  $CH_2 - CH - CH_2 - CH_2 - COOH$ .

$$\begin{array}{c} \diagdown \quad \diagup \\ O \end{array}$$

einer späteren Untersuchung von Emil Fischer und Leuchs<sup>1)</sup> die Konstitution des Isoserins folgt (VI)

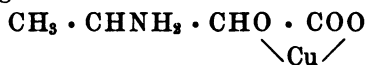


Da bei der Umwandlung der Epiphydrinsäure in die Oxyaminosäure intermediär wohl die Imidosäure auftritt, war nicht unwahrscheinlich, daß im vorliegenden Falle das Methylhomologe des Isoserins, die  $\alpha$ -Oxy- $\beta$ -aminobuttersäure, entstanden wäre. Dieser Schluß kann unbedenklich als richtig gelten, da die ganz analoge Bildung des Isoserins aus  $\alpha$ - $\beta$ -Dibrompropionsäure inzwischen von Neberg und Ascher<sup>2)</sup> konstatiert ist.

Auch hier begleitet die Oxyaminosäure zu einigen Prozenten die hauptsächlich entstehende Diaminoverbindung.

Der Beweis für die Bildung einer  $\alpha$ -Oxy- $\beta$ -aminobuttersäure konnte durch die Analyse des Kupfersalzes erbracht werden. Emil Fischer und Leuchs (a. a. O.) haben zuerst gezeigt, daß das Isoserin abweichend von allen anderen Amino- und Oxyaminosäuren ein Kupfersalz bildet, das auf ein Molekül Aminosäure ein ganzes Atom Cu bindet, indem Substitution des Wasserstoffatoms vom Carboxyl und des vom benachbarten Hydroxyl eintritt. Kupfersalze von ähnlichem Typus findet man bei verschiedenen anderen  $\alpha$ -Oxy- $\beta$ -aminosäuren, z. B. bei der  $\alpha$ - und  $\beta$ -2-Aminoglukoheptonsäure von Neberg und Wolff<sup>3)</sup>, den beiden isomeren Tetraoxybutyl-isoserinen. Er tritt auch bei der Diaminotrioxydodekansäure von E. Fischer und Abderhalden<sup>4)</sup> auf.

Die vorliegende Oxyaminobuttersäure lieferte in der Tat ein Kupfersalz vom Typus des Isoserinkupfers, d. h. von der Zusammensetzung



aus der man mit großer Sicherheit die angenommene Formel herleiten kann.

<sup>1)</sup> Ber. **35**, 3787. 1902.

<sup>2)</sup> Noch unveröffentlicht.

<sup>3)</sup> Ber. **35**, 4012. 1902 u. **36**, 618. 1903.

<sup>4)</sup> Ztschr. f. physiol. Chem. **42**, 543. 1904.



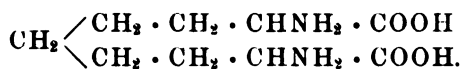
Der gelbliche Sirup, der nach der Abtrennung von der kristallinen Oxyaminobuttersäure resultiert, enthält die  $\alpha$ - $\beta$ -Diaminobuttersäure. Im freien Zustande ist sie nicht ganz rein gewonnen worden, da kleine Mengen der vorerwähnten Oxyaminosäure in ihr gelöst bleiben. Dagegen sind solche Derivate, die unter bestimmten Bedingungen wohl bei Diamino-, nicht aber bei Oxyaminosäuren isolierbar sind, z. B. das Pikrat und das normale Quecksilbersalz, rein erhalten. Außerdem wurde die Phenylhydantoinensäure dargestellt, die durch Addition zweier Moleküle Phenylisocyanat entsteht.

Die  $\alpha$ - $\beta$ -Diaminobuttersäure zeigt die gewöhnlichen Eigenschaften der Diaminosäuren, wie stark alkalische Reaktion, Bindungsvermögen für Kohlensäure, Fällbarkeit durch Phosphorwolframsäure usw. Sie bildet Salze mit Säuren und Basen, so mit Kupferoxyd und Platinchlorid. Auffallend ist ihre große Zersetzlichkeit. Sie ist z. B. aus dem Phosphorwolframat durch Zerlegung mit Baryt nur zum Teil zurückzugewinnen, sie erleidet hierbei weitgehende Zersetzung. Hierdurch unterscheidet sie sich von den höheren Diaminosäuren, beispielsweise von Lysin, das aus dem Phosphorwolframat durch Barytwasser unzersetzt zurückerhalten werden kann. Sie teilt aber die Empfindlichkeit mit der nächst niederen Säure, der  $\alpha$ - $\beta$ -Diaminopropionsäure, die nach eigenen Beobachtungen aus dem Phosphorwolframate durch Barythydrat auch nur zum Teil unverändert in Freiheit gesetzt wird.

### Experimentelles.

(Mitbearbeitet von Max Federer.)

#### A. Diaminoazelaensäure.



Als Ausgangsmaterial diente die  $\alpha$ - $\alpha_1$ -Dibromazelaensäure, die bisher unbekannt ist. Sie wurde nach dem von Auwers und Bernhardt<sup>1)</sup> eingeschlagenen Verfahren zur Bromierung von Dikarbonsäuren durch Einwirkung von Brom und rotem Phosphor auf Azelaensäure erhalten. Es wurden 30 g Azelaensäure nach inniger Mischung mit 6,5 g Phosphor mit 235 g Brom behandelt. Jedoch wurde statt des von den genannten

<sup>1)</sup> Ber. 24, 2232. 1891.

Autoren vorgeschriebenen komplizierten Apparates die einfachere von Neuberg und E. Neimann (a. a. O.) gewählte Apparatur benutzt, d. h. ein gewöhnlicher Rundkolben mit eingeschlifftem Kühlrohr, um welches von außen der Mantel eines Liebig'schen Kühlers gelegt wurde, während durch das Innere ein dünneres, oben erweitertes Glasrohr bis fast auf den Boden des Kolbens führte; durch letzteres tropfte das Brom hinzu.

Durch Eingießen in Wasser werden das zunächst entstandene Säuredibromid sowie Halogenverbindungen des Phosphors zer-  
setzt; dabei erwärmt sich die Masse, und es scheidet sich  $\alpha$ - $\alpha_1$ -Dibromazelaänsäure als schwach gelbliches Öl ab. Trotz längeren Stehens kristallisierte dasselbe nicht<sup>1)</sup>. Es wurde daher mit Äther ausgeschüttelt und durch Verdampfen des Äthers zurückerhalten. Die so erhaltene Dibromazelaänsäure ist bei 0° flüssig. Sie wurde ohne weiteres zu den folgenden Versuchen benutzt:

30 g Dibromazelaänsäure wurden mit der gleichen Quantität gepulverten Ammoniumkarbonats und der zwanzigfachen Menge konzentrierten Ammoniaks (25 %) 6 Stunden lang im eisernen Autoklaven auf 120° erhitzt. Es resultierte eine gelbgefärbte Flüssigkeit, die durch Abdampfen in flachen Schalen vom überschüssigen Ammoniak befreit und konzentriert wurde. Nach 24stündigem Stehen verwandelte sich die dickflüssige Masse in einen Kristallbrei, der abgesaugt wurde. Wegen der verhältnismäßig großen Schwerlöslichkeit der Diaminoazelaänsäure in kaltem Wasser konnte das bei der Reaktion zugleich entstandene Bromammonium leicht durch Auswaschen entfernt werden.

Das zurückbleibende, weiße Produkt wurde in heißem Wasser gelöst und nach einiger Konzentration durch Zusatz von Alkohol zur Abscheidung gebracht.

Die Diaminoazelaänsäure bildet ein mikrokristallinisches Pulver, das keinen ausgeprägten, jedenfalls keinen süßen Geschmack besitzt. Es schmilzt noch nicht bei 330°.

Die Ausbeute an reiner Verbindung betrug 20 % der Theorie, berechnet auf angewandte Azelaänsäure.

#### Analyse.

0,1619 g Substanz ergaben 0,2932 CO<sub>2</sub> und 0,1186 H<sub>2</sub>O.

0,1530 g „ „ 17,0 cm<sup>3</sup> N (21°, 762 mm).

C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>:

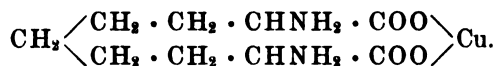
<sup>1)</sup> Besondere Versuche, sie ev. weiter zu reinigen, sind nicht angestellt.

Ber. C 49,54 % H 8,25 % N 12,84 %.

Gef. C 49,39 „ H 8,14 „ N 12,68 „

Die Diaminoazelaïnsäure ist leicht löslich in Mineralsäuren und Alkalien. Die Salze der Schwermetalle sind außerordentlich wenig löslich und können deshalb nicht durch Kochen der Diaminosäure mit den entsprechenden Metalloxyden oder Karbonaten dargestellt werden, sondern nur durch doppelte Umsetzung der Alkalisalze, bereitet durch Lösen der Diaminosäure in der berechneten Menge Normalalkali.

#### Diaminoazelaïnsaures Kupfer.



0,5 g Diaminoazelaïnsäure wurden mit 5 cm<sup>3</sup> n-Natronlauge versetzt, mit etwas Wasser verdünnt und erwärmt. Zu der filtrierten Lösung, die das stark dissoziierte Na-Salz enthält, wurde nach völligem Erkalten Kupfersulfat im Überschuß gegeben, wobei das diaminoazelaïnsaure Kupfer sofort als hellblauer Niederschlag ausfiel. Es wurde abgesaugt, mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

#### Analyse.

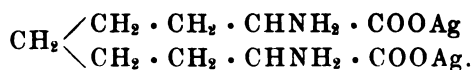
0,2926 g Substanz ergaben nach dem Glühen 0,822 g CuO

C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Cu.

Ber. Cu 22,74 %.

Gef. Cu 22,44 „

#### Diaminoazelaïnsaures Silber.



Diese Verbindung wurde in analoger Weise aus Diaminoazelaïnsäure, n-Natronlauge und Silbernitrat erhalten. Sie stellt ein weißes Pulver dar, das abgesaugt und mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen wurde. Es ist im Wasser ganz unlöslich, löst sich aber leicht in Ammoniak und Salpetersäure. Dem Lichte ausgesetzt, bräunt es sich allmählich.

#### Analyse.

0,3140 g Substanz ergaben durch Verglühen 0,1574 g Ag

C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Ag<sub>2</sub>.

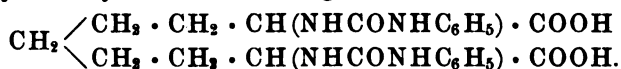
Ber. Ag 49,97 %.

Gef. Ag 50,12 „

Ganz ebenso kann man die anderen Salze der Diaminoazelaänsäure darstellen. Die Lösung des Natronsalzes ergibt mit Quecksilberchlorid eine schwere, weiße Fällung, und mit normalem Bleiacetat einen dichten, weißen Niederschlag, die beide im Überschuß des Fällungsmittels unlöslich sind.

Wie schon erwähnt, fällen die Alkaloidreagentien die Diaminoazelaänsäure nicht. Nur Phosphorwolframsäure erzeugt in mineralaurer Lösung eine schwache Fällung.

Phenyl-iso-cyanatverbindung der Diaminoazelaänsäure.



1,1 g Diaminoazelaänsäure wurde in 10 cm<sup>3</sup> n-Natronlauge gelöst, mit 20 cm<sup>3</sup> Wasser verdünnt, und mit 1,8 g Phenylcyanat in bekannter Weise behandelt. Nach mehrstündigem Stehen wurde filtriert und die Phenylcyanatverbindung mit Salzsäure ausgefällt. Sie stellt ein weißes Pulver dar. Aus verdünntem Alkohol umkristallisiert, schmilzt es unscharf gegen 120°.

Analyse.

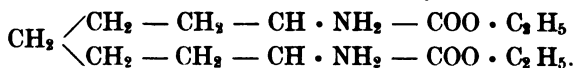
0,1263 g Substanz ergaben 13,6 cm<sup>3</sup> N (21°, 753 mm).

C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>.

Ber. N 12,28 %.

Gef. N 12,14 „

Diaminoazelaänsäurediaethylester.



Analog der Diaminosebazinsäure läßt sich die Diaminoazelaänsäure verestern. Man übergießt 3 g mit 30 ccm abs. Alkohol und leitet einen raschen Strom von trockenem Salzsäuregas ein. Die Aminosäure geht bald in Lösung, und die gesättigte Flüssigkeit wird noch eine Viertelstunde auf dem Wasserbade erwärmt. Die im Vakuum konzentrierte Lösung hinterläßt als krümelige Menge das Chlorhydrat des Esters, das nach dem Trocknen über Kalk und Waschen mit Aether rein ist.

0,1470 g Substanz verbrauchten: 8,5 ccm  $\frac{n}{10}$ -AgNO<sub>3</sub> = 0,0302 g Cl

0,1206 g Substanz ergaben: 8,8 ccm N (762 mm u. 22°).

C<sub>13</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Ber. Cl 20,46 %; N 8,07 %

Gef. Cl 20,54 %; N 8,26 %.

Der freie Ester entsteht als alkalisch reagierendes Öl durch Zerlegung des Chlorhydrates in konz. wässriger Lösung mit festem KOH und kann mit etwas Alkohol enthaltendem Äther ausgeschüttelt werden.

### B. $\alpha$ - $\beta$ -Diaminobuttersäure.



Für die Darstellung der Diaminobuttersäure diene als Ausgangsmaterial die  $\alpha$ - $\beta$ -Dibrombuttersäure, welche nach den Angaben von Kolbe<sup>1)</sup> aus Crotonsäure erhalten wurde.

Zu einer kalt gehaltenen Lösung von Crotonsäure in Schwefelkohlenstoff wurde die berechnete Menge Brom, ebenfalls in Schwefelkohlenstoff gelöst, zugetropft, das Gemisch 2 Tage im verschlossenen Gefäße gehalten und dann der freiwilligen Verdunstung überlassen. Die zurückbleibende Dibrombuttersäure zeigte aus Schwefelkohlenstoff umkristallisiert den angegebenen Schmelzpunkt 87°.

50 g Dibromsäure wurden zur Umwandlung in die Diaminosäure mit der gleichen Menge festen, gepulverten Ammoniumkarbonates und der zwanzigfachen Menge wässrigen Ammoniaks (25%) 6 Stunden lang im eisernen Autoklaven auf 120° erhitzt. Es resultierte eine gelb gefärbte Flüssigkeit, die durch Eindampfen vom Ammoniak befreit wurde. Aus dem durch Konzentration gewonnenen dicken Sirup konnte jedoch das bei der Reaktion entstandene Bromammonium wegen der leichten Löslichkeit der Diaminosäure nicht von dieser getrennt werden. Es wurde deshalb das Gemisch von neuem in Wasser gelöst, mit Silberoxyd zersetzt und bei gelinder Wärme das Ammoniak verdunstet, filtriert, alles in Lösung befindliche Silber mit Schwefelwasserstoff ausgefällt und die Flüssigkeit zum dünnen, hellgelben, alkalisch reagierenden Sirup konzentriert. Dieser wurde über Phosphorpentoxyd der freiwilligen Kristallisation überlassen.

Nach kurzer Zeit war geringe Kristallabscheidung bemerkbar. Die Kristalle verschwanden in dem Maße, als dem Sirup Wasser entzogen wurde und fielen bei Zusatz von wenig Wasser wieder aus. Da die Diaminobuttersäure selbst äußerst hygroskopisch und demgemäß sehr leicht löslich ist, die Kristalle außerdem in wässriger Lösung im Gegensatze zu dem Sirup

<sup>1)</sup> C. Kolbe, Journ. f. prakt. Chem. [2], 25, 396.

neutral reagierten und mit Phosphorwolframsäure keine Fällung gaben, mußten sie als eine von der  $\alpha$ - $\beta$ -Diaminobuttersäure verschiedene Substanz angesehen werden. Sie erwiesen sich, wie dargelegt ist, als  $\alpha$ -Oxy- $\beta$ -aminobuttersäure.

Der Sirup wurde von den Kristallen durch Absaugen auf der Nutsche getrennt und wiederum konzentriert. Er stellte dann eine gelbe, dickflüssige, eigenartig nach Leim riechende Masse dar, die, mit Alkohol oder Äther übergossen, erstarrte, in Berührung mit der atmosphärischen Luft aber sehr schnell Feuchtigkeit anzog und in kurzer Zeit zerfloß. Von einer Analyse wurde deshalb Abstand genommen und nur einige Derivate der  $\alpha$ - $\beta$ -Diaminobuttersäure analysiert.

Die Menge des über  $P_2O_5$  getrockneten Sirups betrug 15 g gleich 24 % der Theorie (berechnet auf die angewandte Dibromsäure).

Der qualitativen Prüfung unterworfen, zeigt die  $\alpha$ - $\beta$ -Diaminobuttersäure folgendes Verhalten:

Die wässrige Lösung nimmt mit  $CuCO_3$  gekocht tiefblaue Färbung an.

$HgCl_2$  erzeugt einen weißen, flockigen Niederschlag.

Phosphorwolframsäure erzeugt in neutraler oder schwefelsaurer Lösung eine starke, weiße, massige Fällung.

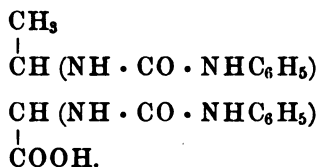
Jodwismut-Jodkalium erzeugt einen Niederschlag, der sich im Überschuß des Fällungsmittels wieder auflöst.

Bleiacetat erzeugt weiße Fällung, löslich im Überschuß des Reagenzes.

#### Derivate der Diaminobuttersäure.

Da das durch Kochen der wässrigen Lösung der Säure mit Kupferkarbonat erhaltene Kupfersalz bei der Analyse stets einen zu hohen Kupfergehalt ergab, was darauf schließen ließ, daß die Diaminobuttersäure noch durch beigemengte Oxyaminosäure verunreinigt sei, wurde zunächst versucht, erstere durch Fällung mit Phosphorwolframsäure und nachherige Zerlegung mit Barytwasser im reinen Zustande zu erhalten. Dabei trat aber weitgehende Zersetzung der Diaminosäure ein. Deshalb mußte auf die Isolierung des reinen Kupfersalzes verzichtet werden. Dagegen konnten das Phenyl-iso-cyanat und Pikrat, sowie das Quecksilbersalz rein dargestellt werden.

## Phenyl-iso-cyanatverbindung der Diaminobuttersäure.



1 g rohe Diaminobuttersäure wurde in 20 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst, mit 8,5 cm<sup>3</sup> n-Natronlauge versetzt, 3 g Phenyl-i-cyanat hinzugefügt und kräftig geschüttelt, bis der Geruch des Phenylcyanates verschwunden war. Die Lösung wurde nach mehrstündigem Stehen vom ausgeschiedenen Diphenylharnstoff abfiltriert, und die Phenylcyanatverbindung mit Salzsäure als ein zunächst gelblich gefärbter Niederschlag ausgefällt. Durch Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol wurde sie in rein weißem Zustande erhalten. Sie schmolz dann bei 238°.

## Analyse

der im Vakuum über Schwefelsäure getrockneten Substanz:

0,1747 g Substanz ergaben 23,9 cm<sup>3</sup> N (20°, 760 mm).



Ber. N 15,73 %.

Gef. N 15,66 %.

## Pikrat der Diaminobuttersäure.



Eine Lösung von 1,5 g Pikrinsäure in heißem Wasser wurde mit etwas mehr als der berechneten Menge Diaminobuttersäure versetzt, und die Flüssigkeit durch Eindampfen konzentriert. Nach dem Erkalten schied sich auf Zusatz von Alkohol das Pikrat als gelber, flockiger Niederschlag aus, der abgesaugt und über Schwefelsäure getrocknet wurde.

Das Pikrat zersetzt sich beim Erhitzen im Kapillarrohr schon gegen 90°.

Es ist hygroskopisch und demgemäß leicht in Wasser löslich.

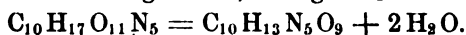
Die Analyse ergab einen Kristallwassergehalt<sup>1)</sup> von 2 mol.

<sup>1)</sup> Das Pikrat der homologen  $\alpha$ - $\beta$ -Diaminopropionsäure enthält ebenfalls 2 Moleküle Kristallwasser.

## Analyse.

0,1196 g Substanz ergaben 19,0 cm<sup>3</sup> N (20,5°, 786 mm).

0,1235 g Substanz ergaben 0,1411 g CO<sub>2</sub> und 0,0511 H<sub>2</sub>O.



Ber. C 31,33 % H 4,44 % N 18,25 %

Gef. C 31,16 „ H 4,59 „ N 18,32 „

Eine direkte Wasserbestimmung konnte wegen des niedrigen Zersetzungspunktes des Pikrates nicht ausgeführt werden.

## Quecksilbersalz der Diaminobuttersäure.



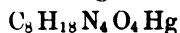
Trägt man in die wässrige Lösung der Diaminobuttersäure frisch gefülltes Quecksilberoxyd ein und erwärmt auf dem Wasserbade, so löst sich ein Teil desselben auf. Nach einstündigem Erwärmen wird abfiltriert, und die klare, schwach gelb gefärbte Flüssigkeit auf dem Wasserbade bis auf ein kleines Volumen eingeeengt. Dabei scheiden sich schillernde Häutchen ab; von diesen wird abfiltriert und die dabei abfließende Flüssigkeit in das 10-fache Volumen absoluten Alkohols eintropfen gelassen. Dabei fällt das Quecksilbersalz als weiße, amorphe Masse, die abfiltriert, nochmals in Wasser gelöst und von neuem mit Alkohol gefällt wird. Sie bildet dann ein weißes, durchaus luftbeständiges Pulver, das die Zusammensetzung des normalen Quecksilbersalzes besitzt. Letzteres löst sich außerordentlich leicht im Wasser und erteilt ihm alkalische Reaktion.

## Analyse

der bei 90° getrockneten Verbindung:

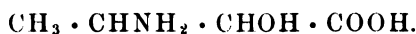
0,2440 g Substanz ergaben 0,1315 g HgS

0,2392 g Substanz ergaben 13,7 cm<sup>3</sup> N (18°, 750 mm).



Ber. Hg 46,08 % N 6,45 %

Gef. Hg 46,48 „ N 6,44 „

C.  $\alpha$ -Oxy- $\beta$ -aminobuttersäure.

Die bei der Synthese der Diaminobuttersäure als Nebenprodukt erhaltene Substanz ließ ihrem qualitativen Verhalten nach auf eine Monoaminosäure schließen. Denn sie gibt mit



Kupferkarbonat gekocht eine dunkelblaue Lösung, dagegen mit Phosphorwolframsäure keine Fällung. Ebensowenig wird sie durch Bleiacetat, Bleisubacetat oder Bleisubacetat und Ammoniak gefällt. Auf Grund der Elementaranalyse muß ihr die empirische Formel  $C_4H_9O_3N$  zugeschrieben werden, welche einer Oxyaminobuttersäure entspricht.

## Analyse.

0,1557 g Substanz ergaben 0,2303 g  $CO_2$  und 0,1060 g  $H_2O$   
 0,1325 g Substanz ergaben 13,5  $cm^3$  N (21°, 758 mm).



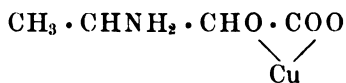
Ber. C 40,34 % H 7,56 % N 11,76 %.

Gef. C 40,34 „ H 7,56 „ N 11,56 „

Die Verbindung bildet, aus verdünntem Alkohol umkristallisiert, schöne, rhombische Tafeln, die sich über 200° zersetzen und intensiv fichtenspanrötende Dämpfe entwickeln.

10  $cm^3$  Wasser lösen bei Zimmertemperatur 0,5278 g der Säure.

Über die Konstitution der Säure, ob die Aminogruppe sich in  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Stellung zur Karboxylgruppe befinde, sollte die gewöhnliche oder abnorme Zusammensetzung des Kupfersalzes eine Entscheidung geben. Denn  $\beta$ -Oxy- $\alpha$ -aminosäuren bilden regelmäßig normale,  $\alpha$ -Oxy- $\beta$ -aminosäuren anomal zusammengesetzte Kupfersalze.

Kupfersalz der  $\alpha$ -Oxy- $\beta$ -aminobuttersäure.

Dieses wurde in gewohnter Weise durch Kochen der wässrigen Lösung mit Kupferkarbonat dargestellt, filtriert und eingengt. Da das so bereitete Kupfersalz zu einem nicht kristallisierenden, blauen Firnis eintrocknet, wurde es aus der konzentrierten Lösung durch Alkohol ausgefällt. Es bildet dann ein himmelblaues Pulver. Dieses zeigt beim Trocknen im Vakuum bei 100° keine Gewichtsabnahme, und ist daher — bei der angegebenen Art der Darstellung — frei von Kristallwasser, im Gegensatz zum Isoserinkupfer, das davon drei Moleküle enthält und diese erst bei 160° abgibt.

## Analyse.

0,1535 g der im Vakuum bei 100° getrockneten Substanz ergaben 10,2 cm<sup>3</sup> N (20°, 762 mm).

0,2132 g Substanz ergaben 0,0935 g CuO.

C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>NCu.

Ber. Cu 35,21 % N 7,74 %.

Gef. Cu 35,04 „ N 7,62 „

Demnach wird auf ein Molekül Oxyaminosäure ein ganzes Atom Kupfer gebunden.

$\alpha$ -Naphthyl-iso-cyanatverbindung der  $\alpha$ -Oxy- $\beta$ -aminobuttersäure.



0,5 g der Säure werden 6 cm<sup>3</sup> n-Natronlauge und 20 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und mit 1,2 g  $\alpha$ -Naphthyl-i-cyanat, dem jüngst von Neuberg und Manasse<sup>1)</sup> empfohlenen Reagenz, behandelt. Sie gibt damit glatt die  $\alpha$ -Naphthylhydantoinensäure, die aus der alkalischen Lösung durch HCl fast quantitativ ausfällt und deren Vorliegen die Analyse bestätigte. Das Naphthylcyanatadditionsprodukt wurde zur Reinigung aus alkoholischer Lösung durch Wasser ausgefällt.

Beim Erhitzen im Kapillarrohre zersetzt es sich oberhalb 170°.

## Analyse.

0,1947 g Substanz ergaben 16,8 cm<sup>3</sup> N (25°, 756 mm).

C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>.

Ber. N 9,72 %.

Gef. N 9,57 „

<sup>1)</sup> Ber. 38, 2359. 1905.

## Berichtigung

zu: J. Wohlgemuth: Chemie der Phosphorleber.

(Biochemische Zeitschrift 1, S. 161.)

S. 163, Tabelle II, Versuch 3 und 5 sind die Zahlen für Schwefel und folglich N : S durch 2 zu dividieren, müssen also heißen 0,52 und 0,49, dementsprechend 1 : 0,88 und 1 : 0,72.

## Über Glykaemie und Glykosurie.

Von

**E. Liefmann** und **B. Stern.**

(Aus der inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses  
zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 18. Juli 1906.)

Wenn wir von den anscheinend nur nach Phlorizinvergiftung auftretenden renalen Glykosurien absehen, sind alle uns bekannten Formen der Glykosurie hämatogenen Ursprungs, d. h. Vorbedingung für die Glykosurie ist die Hyperglykaemie. Es ist demzufolge eine genaue Kenntnis des Verhaltens des Blutzuckers bei den verschiedenen Formen der Zuckerausscheidung naturgemäß von großer, nicht nur theoretischer, sondern auch praktischer Bedeutung. Es muß befremdlich erscheinen, wie wenig sicheres über den Blutzucker unter pathologischen, ja selbst unter normalen Verhältnissen bekannt ist. Wechseln doch die Angaben der einzelnen Autoren über den normalen Blutzuckergehalt des Menschen von Werten von 0,05 bis zu solchen von 0,33.

Es sind augenscheinlich mehrere Umstände, die diesen außerordentlichen Mangel an Einheitlichkeit der Resultate bedingen. Einmal kommt es gerade bei Bestimmungen des Blutzuckers, wie es scheint, sehr auf die Art der Entnahme an. Wissen wir doch, daß bei manchen Tieren schon geringe mechanische Insulte, wie die Fesselung, genügen, um eine vermehrte Ausschwemmung von Zucker aus der Leber zu veranlassen, und ebenso dürfte sehr gesteigerte Muskeltätigkeit und

andere hier nicht zu erörternde Faktoren auf den Gehalt des Blutes an Zucker einwirken.

Mehr noch aber als die schon geschilderten Verhältnisse waren es die rein chemisch-methodischen Schwierigkeiten, die die außerordentliche Divergenz der Resultate der einzelnen Untersucher hervorriefen. Manche der namentlich früher für die Bestimmung des Blutzuckers angewandten Methoden birgt gerade bei ihrer Ausführung an Blutfiltraten äußerst starke subjektive Momente. Wir denken hier in erster Linie an die Titration nach Fehling. Weit besser anwendbar ist die Methode nach Allihn und mehr noch die Knappsche Methode, die bei richtiger Anwendung Resultate von ganz außerordentlicher Schärfe liefert. Was bei allen diesen Methoden, in denen die reduzierende Kraft von Blutfiltraten gemessen wird, in Wirklichkeit zur Titration gelangt, ist zwar sicherlich in der Hauptsache Traubenzucker, unsere Kenntnis von den Filtratkörpern des Blutes ist aber keine so vollkommene, daß wir das Vorkommen anderweitiger reduzierender Substanzen völlig ausschließen können, ja es erscheint sogar recht wahrscheinlich, daß geringe Mengen anderweitiger reduzierender Substanzen, so namentlich leicht spaltbare Glukuronsäuren, im Blute vorkommen können. Müssen wir unter diesen Umständen auch immer die mit den Reduktionsmethoden gewonnenen Werte mit einer gewissen Zurückhaltung betrachten, so ist es doch im allgemeinen, namentlich von praktischen Gesichtspunkten aus, gerechtfertigt, sie auf Traubenzucker zu berechnen.

Es schien uns daher durchaus erforderlich, unseren Untersuchungen über den Blutzucker unter pathologischen Bedingungen eine größere Reihe von Normalbestimmungen und zwar mit der gleichen Methode, mit der wir später zu arbeiten gedachten, zugrunde zu legen, da die von den verschiedenen Autoren gefundenen Werte viel zu sehr divergieren, um an ihnen die Grenze des Normalen und Pathologischen festlegen zu können.

Wir lassen zuvor eine Anzahl älterer Werte tabellarisch geordnet folgen:

1) Claude Bernand .	Hund	0,1 —0,25	Mittel aus 16 Bestimmungen
2) Pavy . . . . .	Hund, Katze, Schaf, Ochse	0,06—0,1	
3) Seegen . . . . .	Mensch	0,17	
4) Frerichs . . . . .	Mensch	0,12—0,33	
5) v. Mering . . . . .	Mensch	0,1 —0,15	
6) v. Noorden . . . . .	Mensch	0,05—0,15	
7) Naunyn . . . . .	Mensch	0,08—0,09	

Wir gingen bei unseren Untersuchungen so vor, daß wir am ruhenden, nüchternen Menschen mittels einer Hohlnadel die V. cubitalis punktierten und das Blut in einen Kolben, der 100 ccm einer HCl-Lösung von 2 % und 50 ccm Wasser enthielt, einströmen ließen. Nach Fällung mit 100 ccm einer 5prozentigen Sublimatlösung nach Schenck ließen wir die Lösung sich mehrere Stunden, doch nicht länger als höchstens 24 Stunden absetzen, da es, wie sich in bisher unveröffentlichten Versuchen von Embden gezeigt hat, bei längerem Stehen mit Sublimat zu Zuckerverlusten kommen kann. Im Durchschnitt ließen wir die Lösung 6 Stunden stehen und filtrierten dann ab. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff entquecksilbert, der Schwefelwasserstoff durch einen Luftstrom verjagt, ein aliquoter Teil neutralisiert, mit HCl schwach angesäuert und im Vakuum auf 20 ccm eingeengt, die eingeengte Flüssigkeit auf 50 ccm aufgefüllt, schwach alkalisch gemacht und, wie in der Arbeit von Embden<sup>5)</sup> über Zuckerbildung in der glykogenfreien Leber eingehend beschrieben ist, nach Knapp titriert.

Wir legten Wert darauf, die Untersuchung am ruhenden Menschen vorzunehmen, da es auf Grund vorläufiger Versuche<sup>9)</sup> sehr möglich erscheint, daß Muskelbewegungen durch Ausschwemmung des Leberglykogens den Blutzuckergehalt steigern

1) Zitiert nach Seegen, Zuckerbildung S. 104.

2) Physiology of the carbohydrates S. 161.

3) s. o. S. 109.

4) Frerichs, Diabetes melitus S. 9.

5) v. Mering, Diabetes melitus im Penzoldt-Stintzing.

6) Pathologie des Stoffwechsels S. 408.

7) Der Diabetes melitus S. 13.

8) Hofmeisters Beiträge Bd. VI, S. 49.

9) Die Versuche werden fortgesetzt.

können, eine Frage, der wir im Tierexperiment näher zu treten gedenken.

Wir lassen jetzt unsere Normalwerte folgen:

Nr.	Stand	Zucker %	Bemerkungen
1	Arbeiter . . . .	0,071	
2	Arbeiter . . . .	0,074	
3	Tagelöhner . . . .	0,072	
4	Tagelöhner . . . .	0,0966	
5	Arbeiter . . . .	0,078	
6	Arbeiter . . . .	0,066	
7	Arbeiter . . . .	0,065	
8	Arzt . . . . .	0,104	Nach körperlichen Bewegungen.
9	Arzt . . . . .	0,093	
10	Arzt . . . . .	0,08	
11	Arbeiter . . . .	0,086	
12	Cand med. . . . .	0,101	Nach längerem Spaziergang.
13	Arzt (cfr. Nr. 10) .	0,0996	Nach längerem Spaziergang.
14	Arbeiter . . . .	0,0916	
15	Arzt (cfr. Nr. 8) .	0,09003	Morgens im Bett.
16	Handwerksbursche .	0,0905	
17	Bergmann . . . .	0,105	
18	derselbe . . . . .	0,08	Nach Schwitzbad.
19	Arbeiter . . . . .	0,094	
20	Arzt . . . . .	0,081	

Wir finden also als den höchsten Normalwert 0,105 Prozent, als den niedrigsten 0,065. Als Mittel aus 20 Normalbestimmungen ergibt sich 0,086. Wir betrachten demnach einen Blutzuckergehalt von 0,1 als hochnormal, 0,11 % bereits als Hyperglykaemie. Dieser von uns gefundene Normalwert deckt sich unter allen publizierten Zahlen nur mit der von Naunyn angegebenen (0,08—0,09), welche nach der Methode von Abeles gewonnen wurde. —

Das wohl einzig dastehende Diabetesmaterial der von Noordenschen Abteilung gab uns reiche Gelegenheit, einer Anzahl interessanter und für das Verständnis des Diabetes wichtiger Fragen näher zu treten. Es galt vor allem, Beziehungen aufzudecken zwischen Glykaemie und Glykosurie, resp. Zuckerfreiheit. Ferner war es von hohem Interesse, die Abhängigkeit der Hyperglykaemie von der Dauer und Schwere

der Erkrankung, sowie das Verhalten des Blutzuckers bei Komplikationen (Coma, Nephritis) zu studieren.

Wir lassen zuerst die untersuchten Diabetesfälle, tabellarisch geordnet, folgen:

	Name	Dauer des Diabetes	Urin	Blut	Bemerkungen
Diabetes fraglich oder nicht vorhanden	Ki.	0	0	0,105	
	Bu.	?	0	0,114	
Dauer bis zu einem Jahre	Ro.	Seit 8 Tagen bek.	Spuren	0,105	
	Ro.	" 8 " "	0,1	0,115	
	Sch.	2 Monate	1,3	0,28	
	Gr.	1/2 Jahr	2,0	0,25	
	Gr.	1/2 " "	0	0,095	
	Co.	7 Monate	1,2	0,152	
	Co.	7 " "	0	0,11	
	Co.	7 " "	0	0,12	
	Co.	7 " "	0,7	0,163	
	Kl.	1 Jahr	0	0,152	
1—2 Jahre	Ma.	1 1/2 Jahre	0,7	0,17	
	La.	2 " "	2,1	0,247	
	E.	2 " "	5,1	0,268	
3 Jahre	Kr.	3 Jahre	Spuren	0,134	
	Jc.	3 " "	1,9	0,209	
4—5 Jahre	Schl.	4—5 Jahre	0	0,163	
	Schl.	4—5 " "	0,97	0,2	
	Schw.	4—5 " "	Spuren	0,188	
	Schw.	4—5 " "	1,05	0,204	
	Pr.	4—5 " "	4,85	0,209	
10—15 Jahre	St.	10 Jahre	0	0,154	
	W.	15 " "	Spuren	0,224	
Diabetes und Albuminurie	Kn.	wenige Tage	0	0,143	1/8 ‰ Albumen
	Kn.	" " "	0,26	0,152	
Diabetes und Nephritis	We.	wenige Tage	4,4	0,381	Erste zuckerfreie Tagesportion Seit längerer Zeit zuckerfrei
	Ey.	4—5 Jahre	2,4	0,286	
	Ey.	4—5 " "	0	0,183	
	Ey.	4—5 " "	0	0,107	
Glykosurie bei Hirntumor	Se.	?	?	0,237	

	Name	Dauer des Diabetes	Urin	Blut	Bemerkungen
Coma diabeticum et uraemicum	R.	?	3,9	0,44	
	G.	?	3,89	0,573	
	Schl.	2 Jahre	3,1	0,53	
	Schl.	2 "	Spuren	1,01	
	Kr.	?	1,4	0,85	Urämie
Alimentäre Gly- kosurie	Ka.	—	0,2	0,218	
	Ma.	—	1,0	0,147	
	Ko.	—	2,7	0,126	
	Hol.	—	—	0,0812	Normal
	Hol.	—	—	0,069	100 g Glykose
	Hol.	—	—	0,52	0,098 200 g "

Die Untersuchungsreihe bringt von neuem den Beweis der zuerst von Claude Bernard aufgestellten, wohl nur von Seegen auf Grund unrichtiger Normalzahlen bezweifelter Behauptung, daß der Glykosurie primär eine Hyperglykämie zugrunde liegt, mit andern Worten, daß jede Glykosurie (außer der Phlorizinglykosurie) eine hämatogene ist. Wir sehen, und zwar besonders bei frischen Fällen, daß schon eine geringe Überschreitung der Norm (0,115) genügt, um Zucker im Harn auftreten zu lassen.

Es mußte von besonderem praktischen wie theoretischen Interesse sein, das Verhalten der Glykämie an ein und demselben Individuum im glykosurischen und aglykosurischen Zustande zu studieren. So konnte man erwarten, über die ja an sich nicht eben überraschende Tatsache der Hyperglykämie bei Glykosurie hinaus feinere Aufschlüsse über die Vorgänge des Zuckerhaushaltes zu erhalten. Wir verfügen hier über eine Anzahl interessanter Daten. Fall Gr., ein fettleibiger Diabetiker der leichten Form, zeigt bei 2% Harnzucker 0,25% Blutzuckergehalt, welcher bei Zuckerfreiheit glatt auf die Norm 0,095 absinkt. Co., mittelschwerer Diabetiker (vgl. Tabelle), erreicht nur einen Wert von 0,11 bei Zuckerfreiheit, derselbe bleibt bei längerer Zuckerfreiheit konstant, um bei dem ersten Auftreten von Glykosurie wieder auf 0,163 zu steigen. Bei Patient Sch. finden wir einen Wert von 0,163 bei Zuckerfreiheit, im Falle Schw. 0,188 bei minimaler Glykosurie. Fall Ey. bleibt bei 0,183% zuckerfrei, bei lange dauernder Kohlehydratentziehung



sinkt der Blutzucker auf 0,107 und steigt bei der ersten wieder auftretenden Glykosurie auf 0,286. —

Wir stehen also vor dem theoretisch wie praktisch wichtigen Faktum, daß zwar Hyperglykaemie die Vorbedingung der Glykosurie, letztere aber nicht die notwendige Folge der Hyperglykaemie sein muß, wir also auch ohne Glykosurie tiefgreifenden Störungen des Kohlehydratstoffwechsels gegenüberstehen können. Wir halten es für nicht unangebracht, diesen Tatsachen mit der Einführung des Begriffes der inneren Toleranz Rechnung zu tragen. Wir verstehen unter der inneren Toleranz die Summe der Vorgänge, welche teils durch Regulierung der Einfuhr des Zuckers aus den Reservoirs in das Blut, teils durch den Verbrauch in den Geweben, die normale Höhe des Blutzuckers gewährleisten. Wir sehen, daß im normalen Organismus diese Einstellungsvorgänge ungemein fein arbeiten und jedenfalls nur ganz geringe Schwankungen des Blutzuckergehaltes zulassen. Wie schon erwähnt, haben wir Grund zu der Annahme, daß Muskelarbeit sowie Einflüsse der äußeren Temperatur die Hauptfaktoren sind, welche diese Schwankungen, vermutlich durch eine verstärkte Glykogenausschwemmung aus der Leber, bedingen, während normalerweise eine Abhängigkeit von der Nahrungszufuhr nicht zu bestehen scheint (vgl. Fall Holl.). Der inneren Toleranz stellen wir als etwas viel Größeres die äußere Toleranz, d. h. die Dichtigkeit des Nierenfilters für Zucker entgegen. Wir sehen also, daß beim zuckerfreien Diabetiker die innere Toleranz noch schwerste Störungen aufweisen kann, und wir gehen wohl nicht fehl, wenn wir die Neigung des Diabetikers zu Entzündungen aller Art, zu Neuritiden und Muskelschmerzen, auf die trotz Zuckerfreiheit weiter bestehende Hyperglykaemie beziehen. Die Möglichkeit, bei länger dauernder Kohlehydratentziehung auch die innere Toleranz zu steigern, zeigt sich sehr klar am Fall Ey. und führt zu wichtigen therapeutischen Konsequenzen.

Auffallend ist die bei den einzelnen Individuen ungemein schwankende äußere Toleranz. Da wir nicht leicht in die Lage kommen, gerade den Schwellenwert der zur Glykosurie führenden Glykaemie zu finden, so müssen wir uns mit dem Vergleich der Werte begnügen, denen bei den einzelnen Individuen die äußere

Toleranz noch standhält. Eine kleine Tabelle wird diese Verhältnisse am besten erläutern.

Name	Dauer	Harn	Blut	Bemerkungen
Ro. . . .	Seit 8 Tagen	Spuren	0,105	
Co. . . .	7 Monate	0	0,11	
Kl. . . .	4—5 Jahre	0	0,152	
Schl. . . .	4—5 „	0	0,163	
Schw. . . .	4—5 „	Spuren	0,188	
Ey. . . .	4—5 „	0	0,183	Nephritis
St. . . .	10 „	0	0,154	
W. . . .	15 „	Spuren	0,224	

Man kann sich bei dem Vergleich dieser Zahlen dem Eindruck nicht verschließen, daß auf die äußere Toleranz die Dauer der Erkrankung einen offenbaren Einfluß hat. Es scheint, daß das Nierenparenchym auf irgend eine Weise sich auf einen höheren Schwellenwert einstellt. Es kann hier natürlich nicht von den schwersten Fällen die Rede sein, die bei dauernder Glykosurie und Einschmelzung von Körpereweiß einen Vergleich zwischen innerer und äußerer Toleranz überhaupt nicht gestatten, sondern von den leichteren und mittelschweren, bei denen überhaupt noch von einer äußeren Toleranz gesprochen werden kann.

Bei diesen scheint allerdings das Nierenfilter an Dichtigkeit zu gewinnen<sup>1)</sup>, während das Hauptsymptom der diabetischen Stoffwechselstörung, die Hyperglykämie, ungestört ihren Fortgang nimmt. Die Wichtigkeit der Aufgabe, diesem Symptom durch unsere Therapie entgegenzuarbeiten, den Blutzuckerwert möglichst weit unter den Schwellenwert herabzudrücken, auch wenn Zuckerfreiheit des Harns schon erreicht ist, leuchtet ein. Sie findet ihren schärfsten Ausdruck in der Naunynschen Auffassung der diätetischen Behandlung als einer Schonung und Kräftigung der dem Zuckerstoffwechsel dienenden Gewebe. Einen zahlenmäßigen Ausdruck findet diese Kräftigung in dem Absinken des Blutzuckers von 0,183 auf 0,107 im Fall Ey. bei lange durchgeführter strenger Diät.

<sup>1)</sup> Es sei ausdrücklich darauf hingewiesen, daß außer in dem Fall Ey. weder Nephritis noch Albuminurie bestand.

Den höchsten Grad der Hyperglykaemie finden wir in jenen Fällen, wo das Nierenfilter nahezu vollständig verstopft ist für die angehäuften Stoffwechselgifte, nämlich im Coma diabeticum. Wir finden hier Werte von 0,44 bis zu der erstaunlichen Höhe von 1,01. Ebenso finden wir in einem Falle von Uraemie bei Diabetes den enormen Wert von 0,85. Ähnlich hohe Zahlen fand Naunyn<sup>1)</sup> in seinen Fällen von Coma, sowie in einem Fall von Diabetes mit eitriger Nephritis. Es sprechen auch diese Zahlen sehr für die Abhängigkeit der Glykaemie von der Beschaffenheit des Nierenfilters.

Da wir aus den ausgedehnten Untersuchungen von Poll<sup>2)</sup>, welche auf der hiesigen Krankenabteilung vorgenommen wurden, wissen, daß mehrtägiges Fieber in hohem Maße zur alimentären Glykosurie (e saccharo) disponiert, so schien uns die Untersuchung des Blutzuckergehalts bei fieberhaften Erkrankungen von besonderem theoretischen Interesse. — Wir wählten hierzu Patienten mit kruppöser Pneumonie, bei denen aus therapeutischen Gründen ein Aderlaß gemacht wurde. Es sind diese Untersuchungen noch nicht abgeschlossen, doch halten wir es für wichtig, die bisherigen höchst auffallenden Ergebnisse schon mitzuteilen.

Tabelle:

Name	Harn		Blut	Bemerkungen
	Alb.	Z.		
1. M. . . .	?	0	0,098	
2. A. . . .	0	0	0,108	
	0	0	0,17	1 Stunde nach Einnahme von 200 g Glukose
3. R. . . .	+	0	0,136	
	+	0	0,281	1 Stunde nach Einnahme von 100 g Glukose
4. Pr. . . .	0	0	0,155	

Wir stehen hier vor der Tatsache, daß bei der Pneumonie nicht nur sehr hohe Blutzuckerwerte ohne Glykosurie vorkommen, sondern daß in zwei Fällen sich durch Glukose eine ganz beträchtliche Anreicherung des Blutzuckers erzielen läßt,

<sup>1)</sup> A. a. O. S. 150.

<sup>2)</sup> Arbeiten aus dem Städt. Krankenhause in Frankfurt a. M. 1896.

ohne daß Glykosurie auftrat. (Daß die Angaben über den Urinzucker sich hier, wie in allen untersuchten Fällen, auf den unmittelbar vor der Punktion gelassenen Harn beziehen, ist wohl selbstverständlich.) Diese eigentümliche Tatsache dürfte wohl mit der im Fieber gesteigerten Verbrennung und dem entsprechend erhöhten Zuckertransport aus der Leber ins Blut in Verbindung zu bringen sein, während das Ausbleiben der Glykosurie wohl auf febrile Schädigung des Nierenfilters zu beziehen ist.

Immerhin scheinen hier so komplizierte Verhältnisse vorzuliegen, daß wir uns mit diesem Hinweisen begnügen müssen, ohne uns auf weiteres Theoretisieren einzulassen.

Ob diese eigentümlichen Störungen der inneren Toleranz in spezifischer Weise der Pneumonie, oder lediglich dem begleitenden Symptom, dem Fieber, ihre Entstehung verdanken, müssen weitere Untersuchungen an anderen fieberhaften Erkrankungen lehren.

---

# Über die Ursachen der Immunität der Bienenmotte (*Galeria melonella*) gegen Tuberkulose.

Von

**S. Metalnikoff.**

(Aus der zoologischen Abteilung der Kaiserl. Akademie der Wissenschaften  
und der chemischen Abteilung des Kaiserl. Instituts f. experim. Medizin  
in St. Petersburg.)

(Eingegangen am 23. Juli 1906.)

Die Raupen der Bienen- (oder Wachs-) Motte (*Galeria melonella*) besitzen zweifellos eine Immunität in bezug auf Infektion mit Tuberkulose (Centr. f. Bact., XLI. Bd., 1906).

Von dieser Immunität kann man sich unschwer überzeugen, indem man größere Dosen virulenter Tuberkelbazillen in die Leibeshöhle dieser Insekten injiziert. Diese Bazillen werden sowohl innerhalb der Leukocyten wie auch im Inneren besonderer vielkerniger Zellen und Kapseln, welche in der Leibeshöhle zur Bildung gelangen, mit erstaunlicher Geschwindigkeit vernichtet. Bereits eine oder zwei Stunden nach erfolgter Injektion kann man die Bildung dieser vielkernigen Zellen und Kapseln beobachten. Nach 24 Stunden sind fast alle Bazillen zerstört und in ein dunkelbraunes Pigment verwandelt. Die Geschwindigkeit, mit welcher die Zerstörung der Tuberkelbazillen vor sich geht, steht in Abhängigkeit von zwei Ursachen:

Einerseits spielt hier die Virulenz der Bazillen selbst eine Rolle. Stärkere und jüngere Kulturen werden in dem Organismus der Raupe mit geringerer Geschwindigkeit zerstört, als ältere und schwächere Kulturen. Schwächere Tuberkelbazillen

pflügen nach 2—3 Stunden in so hohem Grade der Vernichtung zu unterliegen, daß es unmöglich wird, in dem Organismus der Raupe ganze, unveränderte Bazillen nachzuweisen.

Andrerseits hängt die Geschwindigkeit, mit welcher die Zerstörung der Bazillen vor sich geht, auch von der Temperatur ab, welcher die Raupen ausgesetzt sind. Bei niederen Temperaturen geht der Zerstörungsprozeß weniger rasch vor sich. Bringt man dagegen mit Tuberkulose infizierte Raupen in einen Thermostat mit einer Temperatur von 38—39°, so erfolgt die Vernichtung der Bazillen mit einer erstaunlichen Geschwindigkeit. Bereits nach  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde kann man in der Leibeshöhle der infizierten Tiere ungeheure Mengen dunkelbrauner Gebilde entdecken, welche nichts anderes darstellen, als Zerstörungsprodukte der Tuberkelbazillen.

Die Zerstörung der Tuberkelbazillen erfolgt nicht nur im Inneren der Raupe, sondern auch durch das Blut außerhalb des Organismus, *in vitro*.

Nimmt man eine kleine Quantität von Raupenblut und fügt Tuberkelbazillen hinzu, so kann man schon nach kurzer Zeit diejenigen Veränderungen bemerken, welchen die Bazillen unterliegen. Diese letzteren schwellen stark an, hören auf, sich mit Fuchsin zu färben, verkleben miteinander und verwandeln sich in stark lichtbrechende, glänzende Körper von unregelmäßiger Gestalt, welche man anfangs nur sehr schwer als differenzierte Tuberkelbazillen erkennen kann; diese Gebilde sind so sehr charakteristisch, daß man nach ihrem Vorhandensein auf dem Präparat stets darauf schließen kann, ob eine Zerstörung der Bazillen vorliegt.

Das Blut der Raupen besitzt demnach unzweifelhaft bakteriolytische Eigenschaften in bezug auf die Tuberkelbazillen. Um mir eine Vorstellung von der Intensität dieser bakteriolytischen Eigenschaften zu machen, verwendete ich die Methode der Verdünnung des Blutes durch eine bestimmte Quantität physiologischer Kochsalzlösung.

Bei der Verdünnung des Blutes durch physiologische Kochsalzlösung verringert sich seine Wirkung auf die Tuberkelbazillen nach und nach, wobei dieselbe bei einer Verdünnung von 1 zu 20 oder 25 schließlich gänzlich aufhört. Diese Zahlen

können in Abhängigkeit von dem Alter und der Stärke der Kulturen bedeutend variieren. Es erwies sich, daß ältere Kulturen empfindlicher gegen die Wirkung des Blutes sind, als jüngere.

Alle diese Versuche zeigen uns, daß in dem Blute der Raupen ein Grundbestandteil enthalten ist, welcher imstande ist, Tuberkelbazillen zu zerstören. Welches ist nun diese Substanz?

Um die Frage zu entscheiden, ob dieser Grundbestandteil zu der Kategorie der Fermente gehört, stellte ich eine ganze Reihe von Versuchen an, wobei ich das Blut der Raupen bis zu gewissen Temperaturgrenzen erwärmte.

Indem ich das verdünnte Blut der Raupen bis zu einer Temperatur von 56°, 60° und 65° erwärmte, konnte ich mich davon überzeugen, daß solche Temperaturen keine Wirkung auf die bakteriolytischen Eigenschaften des Blutes ausüben. Erst wenn das Blut im Verlaufe einer halben Stunde bis zu 72—75° erwärmt worden ist, verliert es endgültig seine Fähigkeit, auf die Tuberkelbazillen einzuwirken. Durch das Filtrieren des Blutes durch ein Chamberlandsches Filter werden die bakteriolytischen Eigenschaften bedeutend herabgesetzt.

Diese Versuche veranlassen uns zu der Annahme, daß wir es möglicherweise mit einem Fett spaltenden Ferment, resp. Lipase oder ihr nahestehendem Körper zu tun haben, welcher ähnliche Eigenschaften besitzt. Wie bekannt, wird die Lipase bei 72—75° zerstört und durch ein Filter zurückgehalten. Diese Voraussetzung erscheint um so wahrscheinlicher, als die Tuberkelbazillen bis zu 40% fett- resp. wachsartige Substanzen enthalten und die Lipase bekanntlich die Fähigkeit besitzt, Fette zu zerlegen.

Ist diese Annahme richtig, so muß das Blut der Raupen eine beträchtliche Quantität einer solchen Lipase enthalten, welche imstande ist, nicht nur Fett, sondern auch die in den Tuberkelbazillen enthaltene fett- resp. wachsartige Substanz zu zerlegen. Um diese Frage zu entscheiden, wurde eine Anzahl von Versuchen über die Wirkung des Blutes der Raupen auf Fett und auf Tuberkulosewachs angestellt. Diese Versuche wurden gemeinschaftlich mit Fr. Dr. N. O. Schumowa-Siber in dem chemischen Laboratorium des Instituts für experimentelle Medizin

angestellt<sup>1)</sup>. Dem verdünnten Blute von Raupen wurden bestimmte Quantitäten von Fett und Emulsionen gewöhnlichen und tuberkulösen Wachses hinzugefügt.

Bereits nach 24 Stunden konnte eine beträchtliche Zunahme der Acidität konstatiert werden. Erst durch Erwärmen des Blutes auf 72° gelingt es, die demselben innewohnenden lipolytischen Eigenschaften zu zerstören.

Wenn es sich durch weitere Versuche definitiv herausstellen sollte, daß die Lipase in der Tat jene Grundsubstanz ist, welche die Ursache für die Zerstörung der Tuberkelbazillen in dem Blute der Bienenmotte darstellt, so drängt sich naturgemäß die Frage auf, warum die Lipase nicht dieselbe Rolle auch in dem Blute anderer Tiere spielt, welches Lipase enthält?

Um diese Frage zu beantworten, stellte ich Versuche über die Wirkung des Serums verschiedener Tiere auf Tuberkelbazillen *in vitro* an. Diese Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt. Es wurde einem bestimmten Quantum Serum in einem sterilen Reagensglas eine gewisse Quantität Emulsion von Tuberkelbazillen hinzugefügt. Nach einigen Stunden, wenn die Bazillen sich auf dem Boden des Reagensglases niedergeschlagen hatten, holte ich mit Hilfe eines Kapillarröhrchens eine kleine Menge dieses Niederschlags vom Boden des Reagensglases und machte daraus ein Schmierpräparat auf dem Objektträger. Dieses Präparat wurde in der gewohnten Weise gefärbt.

Ein jedes Serum, welches ich in letzter Zeit prüfen konnte (und zwar das Serum des Pferdes, des Hammels, des Hundes, der Maus, der Ratte, des Kaninchens und des Meerschweinchens), wirkte in höherem oder geringerem Maße auf die Tuberkelbazillen ein. Ich fand auf den in der oben beschriebenen Weise verfertigten Präparaten ähnliche, stark lichtbrechende Körper, wie sie für die in Zerstörung begriffenen Tuberkelbazillen so überaus charakteristisch sind. Diese stark lichtbrechenden, glänzenden Körper sehen kleinen Kristallen ähnlich, und zwar besonders in denjenigen Fällen, wo die Bazillen untereinander verkleben und ziemlich große Gruppen bilden.

<sup>1)</sup> Die Frage über die Rolle der Lipase bei der Infektion mit Tuberkelbazillen wird Gegenstand einer speziellen Arbeit bilden, welche wir in Gemeinschaft mit Fr. Dr. N. O. Schumowa-Siber unternommen haben; über die von uns erhaltenen Resultate werden wir später berichten.



Wenn man die Präparate genauer untersucht, so kann man alle Übergangsetadien zwischen normalen, gut färbbaren Bazillen und jenen lichtbrechenden, kristallähnlichen Körpern auffinden.

Verdünnt man das Serum mit physiologischer Kochsalzlösung, so läßt sich jene Grenze mit Leichtigkeit feststellen, über welche hinaus das verdünnte Serum aufhört, eine Wirkung auf die Tuberkelbazillen auszuüben. Das Serum der Mäuse und Ratten behält seine Wirksamkeit bei einer Verdünnung von 1 auf 12 bei, dasjenige der Pferde bei einer solchen von 1 auf 8—10, des Kaninchens von 1 auf 4—5, des Meerschweinchens von 1 auf 2—3. Selbstverständlich sind alle diese Zahlen als relative zu betrachten, indem die Wirkung des Serums auf die Bazillen ebenfalls von der größeren oder geringeren Widerstandsfähigkeit der Tuberkelbazillen abhängig ist.

Läßt man die Tuberkelbazillen zwei, drei und mehr Tage der Wirkung des Serums ausgesetzt, so erfolgt noch keine vollständige Zerstörung aller Tuberkelbazillen. Es bleibt stets ein kleiner Rest von Tuberkelbazillen zurück, welche der Wirkung des Serums nicht unterliegen. Man wird eins von beiden zugeben müssen: entweder enthält das Serum jene Grundsubstanz, welche auf die Tuberkelbazillen einwirkt, in nicht genügender Menge, oder aber die Kultur enthält unter anderen sehr widerstandsfähige Bazillen, welche der Einwirkung des Serums länger Widerstand zu leisten vermögen. Die zweite Voraussetzung scheint mehr Wahrscheinlichkeit zu enthalten.

Bei höheren Temperaturen (bis zu 35—39 °) wirkt das Serum bedeutend stärker. Indem man das Serum bis zu verschiedenen Wärmegraden erhitzt, kann man sich davon überzeugen, daß dasselbe erst bei 72 ° seine bakteriologischen Eigenschaften endgültig verliert. Wir haben es demnach hier mit demselben Grundbestandteil zu tun, welcher auch in dem Blute der Raupe beobachtet wird.

Es entsteht nun naturgemäß die Frage: Behalten die mit Serum bearbeiteten Tuberkelbazillen ihre Virulenz oder nicht? Zu meinem Bedauern war es mir bis jetzt nicht möglich gewesen, diesbezügliche Versuche anzustellen. In der Literatur existieren übrigens Beobachtungen in dieser Richtung, z. B. verlieren nach den von Marogliano mitgeteilten Angaben zu urteilen, die mit Serum behandelten Tuberkelbazillen Meer-

schweinen gegenüber ihre Schädlichkeit (Berl. Klin. Woch. 1903, Nr. 25, 29).

Für den Fall, daß die von mir angestellten Beobachtungen durch fernere diesbezügliche Versuche eine Bestätigung finden sollten, wird man mit noch größerer Wahrscheinlichkeit behaupten können, daß gerade diese Substanz jenen Grundbestandteil darstellt, welcher die Entwicklung der Tuberkulose im infizierten Organismus verhindert, d. h. jenen Grundbestandteil, welcher den Prozeß der Tuberkulose, selbst bei dieser Krankheit gegenüber sehr empfindlichen Tieren, einen außerordentlich langsamen Verlauf nehmen läßt.

Diese Erwägungen finden eine teilweise Bestätigung in gewissen Erscheinungen, welche gewöhnlich während der Tuberkulose auftreten.

Nach den Beobachtungen von Garnier (Compt.-Rend. soc. biol. 1903, p. 1423) findet bei chronischer Tuberkulose eine allmähliche Herabsetzung der Serolipase statt. Bei erfolgreicher Heilung und bei Wiedergenesung wächst die lipolytische Energie des Blutes, selbst wenn sie anfangs außerordentlich gering gewesen ist, allmählich wieder bis zum normalen Stande heran. Die Tuberkulose wird unzweifelhaft von irgend welchen Störungen im Stoffwechsel des Fettes begleitet. Die Heilung der Tuberkulose besteht bekanntlich neuerdings hauptsächlich in der Ernährung mit Fetten, wodurch höchstwahrscheinlich eine Steigerung der lipolytischen Energie befördert wird.

Zum Schlusse muß ich nochmals auf die Versuche mit den Raupen der Bienenmotte zurückkehren. Wie bekannt, besitzen diese Raupen eine Immunität in bezug auf die Tuberkulose des Menschen und zeigen gleichzeitig eine außerordentliche Empfindlichkeit gegenüber der Fischtuberkulose. Wird ihnen letztere injiziert, so gehen sie gewöhnlich in 4—5 Tagen ein. Hängt nun die Immunität der Raupen von der Anwesenheit eines besonderen, auf die Zerlegung des fett- resp. wachsähnlichen Bestandteils der Tuberkelbazillen gerichteten Fermentes im Blute und in den Zellen dieser Tiere ab, so würde es unverständlich scheinen, warum denn dieses Ferment nicht auch auf die Bazillen der Fischtuberkulose einwirkt.

Zur Beantwortung dieser Frage stellte ich folgenden Versuch an.

Ich infizierte einige Dutzende von Raupen mit Fischtuberkulose. Einen Teil dieser Raupen ließ ich bei der gewöhnlichen Zimmertemperatur (20°), die übrigen verbrachte ich in den Thermostat bei einer Temperatur von 38—39°.

Die ersteren Raupen gingen in der gewohnten Weise nach 4 Tagen zugrunde. Der zweite Teil dagegen blieb am Leben und verwandelte sich in Puppen und Falter. Bei der Untersuchung des Blutes dieser letzteren konnte ich mich davon überzeugen, daß die Raupen bei erhöhter Temperatur die Bazillen der Fischtuberkulose ausgezeichnet zu zerstören vermögen. Diese Zerstörung erfolgt sowohl innerhalb der Leukocyten als auch im Inneren spezieller Kapseln, gleich denen, welche bei der Injektion mit Menschentuberkulose zur Beobachtung kommen.

Wir haben es demnach im gegebenen Falle mit einem Tiere zu tun, welches bei hohen Temperaturen eine Immunität in bezug auf Tuberkelbazillen besitzt, bei niederen Temperaturen dagegen diese Immunität einbüßt.

Es sind für diese Erscheinung zwei Erklärungen möglich. Entweder zerstören die Raupen die Bazillen der Fischtuberkulose nur aus dem Grunde, weil diese letzteren bei höheren Temperaturen geschwächt sind. (In diesem Falle könnte diese Eigenschaft aber nicht als Immunität bezeichnet werden.) Oder aber es erfolgt diese Zerstörung der Tuberkelbazillen aus dem Grunde, weil der Organismus der Raupen bei niederen Temperaturen geschwächt ist und die Raupen ihre Kräfte im Kampfe mit der Tuberkulose nur bei hohen Temperaturen ausnützen können. Alle Anzeichen sprechen für die zweite dieser Voraussetzungen. Die Raupen unserer Motte entwickeln sich nur bei höheren Temperaturen. Bei niederen Temperaturen fühlen sie sich nicht wohl, nehmen wenig Nahrung auf und entwickeln sich gar nicht.

Außerdem sprechen zugunsten dieser Annahme auch die Versuche mit Tuberkelbazillen des Menschen. Teilt man mit Menschentuberkelbazillen infizierte Raupen in zwei Gruppen ein, und läßt die eine derselben bei einer Temperatur von etwa 20° (Zimmertemperatur), während die andere in den Thermostat von 38 oder 39° verbracht wird, so werden sich beide Gruppen mit Leichtigkeit von den Tuberkelbazillen befreien; von Interesse ist dabei der Umstand, daß die Zerstörung der Bazillen bei 38°

bedeutend rascher vor sich geht, trotzdem die menschliche Tuberkulose sich gerade bei dieser Temperatur durch größte Aktivität auszeichnet. Bei niederer Temperatur entwickelt sich die menschliche Tuberkulose, im Gegensatz zu der Fischtuberkulose, nicht, und es ist aus diesem Grunde sehr begreiflich, daß die Raupen leicht mit ihr fertig werden.

Auf Grund dieser Versuche müssen wir demnach zugeben, daß den Raupen der Bienenmotte eine unzweifelhafte Immunität sowohl in bezug auf Menschentuberkulose als auch in bezug auf Fischtuberkulose zukommt, und daß diese Immunität ihren Ursprung einem speziellen Grundbestandteil verdankt, welcher die Fähigkeit besitzt, fett- resp. wachsähnliche Bestandteile zu zersetzen und ferner Tuberkelbazillen sogar *in vitro* zu zerstören.

---

## **Biologisch-chemische Untersuchungen über das Chloroform.**

Ein Beitrag zur Frage  
nach der Wirkung des Chloroforms auf den Organismus.

### **Vorläufige Mitteilung**

von

**Johann Feigl** und **Hugo Meier.**

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Kgl. Pathologischen  
Instituts der Universität zu Berlin.)

*(Eingegangen am 26. Juli 1906.)*

Das wichtigste Inhalationsanästheticum ist das Chloroform. Bald nach seiner Entdeckung und chemischen Erforschung erfolgte seine medizinische Verwendung. Die pharmakologische Wirkung ist der Häufung der Chloratome im Molekül zuzuschreiben, haben doch die Halogenderivate je nach ihrer Struktur abgestufte hypnotische Eigenschaften. Speziell für die Methanderivate geht diese Staffelung der Wirkung aus der Reihe hervor, die sich durch schrittweisen Ersatz der Wasserstoffatome durch Chlor ergibt.

Substanz	Formel	Wirkung
Methan . . . . .	$\text{CH}_4$	keine
Chlormethyl . . . .	$\text{CH}_3\text{Cl}$	schwach
Methylenchlorid . .	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	stärker
Chloroform . . . . .	$\text{CHCl}_3$	ausgesprochen
Tetrachlormethan . .	$\text{CCl}_4$	stark

Bei der Häufung der Chloratome bemerkt man ein allmähliches Ansteigen, und zwar ist das Optimum der gesuchten Wirkung beim Chloroform, da Tetrachlormethan bereits Erregung

der Krampfzentren zur Folge hat und durch Herzstillstand zum Tode führt. Von England aus wurde daher Methylchlorid empfohlen, da es kein Erbrechen verursacht. Französische Autoren schlugen, gestützt auf theoretische Betrachtungen obiger Reihe von Chlorderivaten, das Methylchloroform  $\text{CH}_3 - \text{CCl}_3$  vor, welches eine gefahrlosere Narkose bedingen sollte. Es zeigt sich hierin das Bestreben, den Rest unerwünschter Wirkung im Chloroform pharmakodynamisch zu beseitigen. Jedoch ist die weite Verbreitung des Chloroforms ebensowenig durch diese Mittel eingeschränkt worden, als durch die bereits früh beobachtete Unsicherheit im Gebrauche. Der wesentliche Nachteil ist und bleibt, daß seine Wirkung innerhalb gewisser Grenzen unkontrollierbar ist. Es bezieht sich dies auf das Verhalten des fertigen Präparates und auf seine geringe Stabilität gegenüber Luft und Licht. Diesen Umständen mußte die Technik entgegengetreten durch fortschreitende Versuche zur Verbesserung der Darstellung wie der Reinigung und Haltbarmachung des Präparates. Es ist jedoch eine Frucht der jüngsten Bestrebung auf dem vorliegenden Gebiete, daß man einsehen lernte, inwieweit die technischen Verbesserungen prinzipiell nicht den Kern der Sache trafen. Ausgehend von der Überzeugung, daß es nur darauf ankomme, ein Präparat rein herauszuarbeiten durch Ausschaltung der Nebenvorgänge im Betriebe oder durch sorgfältige nachträgliche Reinigung, um es dauernd haltbar zu machen, entstanden die Chloroforme Schering, Pictet, Anschütz; jedoch sind auch diese, der gleichen Behandlung im Handgebrauch wie die gewöhnlichen Präparate unterworfen, nicht haltbarer. Wir versuchen nun, die ganze Frage auf einen neuartigen Boden zu stellen.

Um den physiologischen Eigenschaften der Chloroformpräparate näherzutreten, richteten wir unser Augenmerk zunächst auf das chemische Verhalten; geht doch aus ihm — aus der Klarlegung der chemischen Umsetzungen und Beeinflussungen durch Luft und Licht — die Bildung verschiedener Umwandlungsprodukte hervor, deren Giftigkeit man in reinem Zustande schon längere Zeit erkannt hat. Indem wir nun den Oxydationsvorgängen unsere Aufmerksamkeit schenkten und zur Kontrolle ihres Verlaufes chemische Methoden heranzogen, zeigte es sich, daß diese bei weitem nicht ausreichen.

Unsere Versuche ergaben, daß mit aller Wahrscheinlichkeit das Phosgen  $\text{COCl}_2$  der alleinige Träger der Giftwirkung im Chloroform ist; daß aber bei Mengen, in denen es bei der biologischen Prüfung schon die schwersten Erscheinungen hervorruft, vielfach die chemischen Methoden versagen oder prinzipiell unanwendbar sind. Wir untersuchten Präparate verschiedener Herkunft, u. a. Anschütz, Pictet, Schering, Duncan, Kahlbaum und Chloroform PH. G. IV. Wir stellten uns die Frage, ob die schädlichen Wirkungen in Verunreinigungen von der Darstellung her zu suchen seien, und wie schnell ein einmal gereinigtes Chloroform giftige Eigenschaften erwirbt. Zur Klärung der letzteren Frage variierten wir die Versuchsbedingungen in weiten Grenzen.

Wir stützten uns zunächst auf die rein chemischen Untersuchungsmethoden, die uns aber bald genug im Stiche ließen. Wir gewannen die Überzeugung, daß sie für feinere Zwecke nicht verwendbar sind, und müssen Langgaard<sup>1)</sup> beipflichten, der in einer Arbeit mit Nachdruck betonte, daß die seither angewandten Prüfungen nicht ausreichend seien, um die Garantie zu bieten, die man zu therapeutischen Zwecken zu fordern berechtigt ist. Langgaard führt loc. cit. eine neue Prüfungsmethode<sup>2)</sup> an, die zur chemischen Untersuchung dienen soll und die von ihm als eine äußerst empfindliche beschrieben wird.

Wir machten von ihr Gebrauch und unterwarfen unsere Chloroformsorten sowie zur näheren Kenntnis des Umfanges der Reaktion auch eine Reihe anderer Substanzen der Behandlung mit Formalin-Schwefelsäure nach Langgaard<sup>1)</sup>. Wir konnten zunächst bestätigen, daß diese Probe ungewein empfindlich ist und bei einer Reihe organischer Verbindungen eintritt, so z. B. bei aromatischen Substanzen (Benzol, Toluol, Xylol), ferner bei Aceton, namentlich aber bei Stoffen mit reaktionsfähigen Bindungen, besonders bei Aldehyden.

Für die Empfindlichkeit sei folgendes Beispiel angeführt. Ein Reagensglas mit wenigen Tropfen des Reagens wurde schräg gegen ein anderes leeres benzoldampfhaltiges Glas geneigt, sodaß die Mündungen einander nahe waren. Wir konnten beobachten,

---

<sup>1)</sup> Ther. Monatsh. 1902. V.

<sup>2)</sup> Reagens v. Marquis 3 ccm  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 2 Tropfen HCHO.

wie fast momentan beim Hinüberfließen der Dämpfe die Wandung des Glases mit der Formalinschwefelsäure erst rot, dann rotbraun angehaucht erschien. Beim Umschütteln erschienen im Reagens rostrote Flocken. Besonders beobachteten wir die Reaktion bei den Verdunstungsrückständen vieler Chloroformsorten. Unterzogen wir dagegen unsere frischen, wie auch der Oxydation durch Belichtung und Berührung mit Luft anheimgefallenen Chloroforme der Prüfung, so erhielten wir verschiedene Ergebnisse. Es traten intensivere Färbungen auf bei frischen Präparaten, während mitunter alte, länger gestandene, die bereits deutlich nach Phosgen und freier Säure rochen, nur schwach reagierten. Wir kommen daher zu dem Endergebnis, daß eindeutige Folgerungen aus dem positiven oder negativen Ausfall der Reaktion nicht ableitbar sind. Aus den vielen Versuchen glauben wir das eine entnehmen zu dürfen, daß die so scharfe Reaktion im vorliegenden Falle von geringem Werte darum ist, weil ihr Chemismus unklar ist. Es ist eben schwer zu sagen, was im einzelnen Falle reagiert: ob es die physiologisch indifferenten Verunreinigungen sind, oder das Phosgen, bez. seine nächsten Umwandlungsprodukte. Die Bedeutung der Reaktion ist jedenfalls darin zu suchen, daß sie uns über manche Substanzen aufklären kann, deren Gegenwart im Chloroform unerwünscht ist, womit noch nicht gesagt zu sein braucht, daß sie die Träger der Giftwirkung sind. Es ist bekannt und wird von den pharmazeutischen Reinheitsproben gebührend berücksichtigt, daß Handelschloroforme Rückstände hinterlassen. Diese können mehr oder minder gefärbt sein und einen unangenehmen Geruch besitzen, wie wir entsprechend Langgaard feststellten. Ihr Aussehen ist meist weiß, gelblich, gelegentlich dunkler. Es scheinen fettige Tröpfchen zu sein. Wir sehen also in der Prüfung nach Langgaard eine erwünschte Erweiterung der Untersuchungen des Chloroforms auf Reinheit von technischen Verunreinigungen, können jedoch weitergehende Folgerungen bezüglich der Ungiftigkeit eines Chloroforms daraus nicht ableiten. Mit Rücksicht hierauf müssen wir sagen, daß die rein chemischen Methoden zum endgültigen Urteil (ob ein Chloroform zu therapeutischen Zwecken unbedenklich verwendet werden kann), nicht ausreichen, daß uns darüber erst die biologische Versuchsmethode Aufschluß gibt. Fälle, in denen der Rückstand



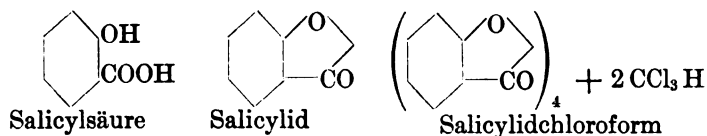
Gifte enthält, werden stets Ausnahmen — Zufälligkeiten — sein. Es ist uns nur ein Fall bekannt, der vor einigen Jahren dem chemischen Staatslaboratorium zu Hamburg vorlag und der das Ergebnis hatte, daß eine giftige Substanz, die mit dem Chloroform nicht das geringste zu tun hatte, im Rückstand aufgefunden wurde; sie kann nur durch unsachgemäße Behandlung in das Chloroform hineingelangt sein. Von der Darstellung her Nebenprodukte im Chloroform zu suchen, ist bisher erfolglos gewesen. Es könnte sich ja bei dem alten Verfahren, nach dem bereits die Entdecker arbeiteten, um Umsetzungsprodukte gechlorter Acetale handeln; wird doch bei dem Verfahren der Alkohol durch Chlor gleichzeitig oxydiert und chloriert, wobei nacheinander eine ganze Reihe von Stoffen intermediär gebildet wird — Aldehyd, Chloracetal, Trichloracetal etc. Wenn auch aus diesen schließlich durch die Reaktionsfolge Chloroform hervorgeht, so unterliegen doch die Zwischenprodukte mancherlei Einwirkungen; vielleicht käme Tetrachlormethan in Frage, das bei einer Unregelmäßigkeit des Betriebes mitgebildet werden könnte und dann schwer ganz zu entfernen wäre. Besonders leicht könnte es sich in Chloroformsorten aus Methan und Chlormethyl finden und wäre immerhin bedenklich. Ausgeschlossen ist es bei dem Verfahren von Schering, da dieser als endliches Chlorierungsprodukt Chloral erst rein gewinnt und dann mit Alkali entspaltet. Ganz umgangen wird — jedenfalls prinzipiell — diese Gefahr, daß Verunreinigungen von der Darstellung her im Chloroform enthalten bleiben, durch die Reinigungsmethoden von Pictet und Anschütz. Wenngleich diese von der irrigen Voraussetzung ausgingen, daß ein einmal gereinigtes Chloroform nun auch Garantie böte für weitergehende Haltbarkeit, so ist durch sie doch die Chloroformfrage um ein wesentliches weitergekommen. Da bei der üblichen unvorsichtigen Behandlung diese Präparate ebenso schnell verdarben, so kann man den Ausspruch Fränkels<sup>1)</sup> wohl verstehen, »daß auch sie keinen Wandel geschaffen haben«. Man glaubte bei den reinen Sorten den zum Schutze zugesetzten Alkohol entbehren zu können, hat aber diese Ansicht als irrig wieder aufgeben müssen, so daß heutzutage die Frage dahin entschieden werden

---

<sup>1)</sup> S. Fränkel, Arzneimittelsynthese, 2. Aufl., Berlin, Julius Springer 1906.

kann, daß es lediglich Sache der Behandlung und Aufbewahrung ist, ein einmal gereinigtes Chloroform möglichst lange unschädlich zu erhalten.

Von den Reinigungsmethoden ist jedenfalls das Verfahren Anschütz das geeignetste und die Voraussicht, die sich auf chemische Betrachtung stützt, hat auch ergeben, daß das Chloroform Anschütz ein zuverlässiges Präparat ist; denn während Pictet auf dem physikalischen Wege der Unterkühlung (Ausfrieren und Zentrifugieren) arbeitet, so ist das Verfahren Anschütz<sup>1)</sup> eine speziell nur für das Chloroform gültige Reaktion. Die Bindung an das innere Anhydrid der Salicylsäure, das Salicylid,



erfolgt so, daß das entstehende Produkt, das Salicylidchloroform, nicht nur leicht gereinigt werden kann, sondern auch das Chloroform in lockerer Bindung enthält. Es wird also bei mäßiger Wärme durch Abdestillieren rein und frei von Verunreinigungen gewonnen.

Über die Oxydationsvorgänge, die zur Bildung des Phosgens führen, ist zu sagen, daß sie bei feuchten Präparaten leichter eintreten als bei trockenen. Die einmal gebildete Salzsäure wirkt katalytisch beschleunigend auf die weitere Zersetzung. Lichtwirkung allein ist nicht zu konstatieren, wie denn z. B. das englische Chloroform (Duncan, Flockhardt & Co.), das bekanntlich in weißen Flaschen in den Handel kommt, ein sehr gutes Präparat ist. Die Einwirkung von Licht und Luft zusammen erfolgt ungemein schnell und ist unbedingt zu einem bedenklichen Umfange gediehen, wenn der schützende Alkohol verbraucht ist. Daher könnte man wohl Biltz<sup>2)</sup> zustimmen, der in einer kleinen Schrift die Möglichkeit erwog, ob es nicht angezeigt sei, den Alkoholgehalt über das eine Prozent der Pharmakopöe zu steigern. Verwenden doch die Engländer z. B. in dem guten Chloroform Duncan von jeher 2% Alkohol. Ob der von

<sup>1)</sup> Ber. d. Chem. Ges. **25**, 3512. Liebigs Ann. 273, 97. DRP. 69708, 70158, 70614.

<sup>2)</sup> A. Biltz, Der Schutz des Chloroforms usw. Erfurt, 1892.

den Franzosen durchgeführte Zusatz von Schwefel wirkungsvoller ist, ist vorerst nicht untersucht, jedenfalls vermag er einmal entstandenes freies Chlor leichter zu binden.

Das Ergebnis unserer chemischen Untersuchungen glauben wir jedenfalls darin suchen zu dürfen, daß die üblichen Reinheitsproben für sich allein nicht ausreichend sind. Wenngleich sie besonders seit ihrer Ergänzung durch die Probe von Langgaard auch in der Lage sind, uns unliebsame Verunreinigungen besonders im Rückstande zu zeigen, so versagen sie doch vollständig da, wo es sich darum handelt, annähernd quantitativ den Oxydationsvorgang und somit die steigende Giftigkeit des Chloroforms zu verfolgen. Sie ermöglichen uns das Erkennen einer Reihe von Verunreinigungen, deren Gegenwart gewiß auf das schärfste zu verurteilen ist, obgleich sie, wenn überhaupt zur Wirkung gelangend, in der Mehrzahl der Fälle physiologisch indifferent sind. In der Hervorziehung dieser Tatsache liegt die Stärke und die Schwäche der chemischen Prüfung.

Die biologische Methode, die obendrein durch den glücklichen Zufall sehr an Wert gewinnt, daß Hunde gegen Chloroform und seine Umwandlungsprodukte ungleich empfänglicher sind, kann erst das entscheidende Wort sprechen. Freilich darf man nicht außer acht lassen, daß die Anwendung von Prüfungsmethoden wohl nur dem Pharmazeuten, der sein Präparat kontrolliert, und dem Gerichtsarzte, bez. Gerichtschemiker in forensen Fällen vorbehalten bleiben. Für die medizinische Praxis — das muß betont werden —, liegt der Schwerpunkt vor allem in der sachgemäßen Handhabung und Aufbewahrung des Chloroforms. Eine unbedingte Garantie hat man jedenfalls bei der Verwendung der wertvolleren Originalpräparate. Daß diese untereinander innerhalb geringer Grenzen ziemlich gleichwertig sind, konnten unsere biologischen Versuche zeigen, da sie ebenso, wie ein selbst gereinigtes Präparat, die nämlichen Resultate ergaben.

---

Die physiologische Wirkung des Chloroforms besteht darin, daß die Funktionsfähigkeit des Gehirns, des Rückenmarks und der Medulla oblongata erst vermindert und allmählich ganz aufgehoben wird; eine vorangehende Erregung findet nicht statt, die Reflexerregbarkeit wird zum Unterschied von der Morphin-

wirkung, bei der in größeren Dosen die Reflexerregbarkeit erhöht, in kleinen nicht vermindert wird, beim Chloroform von vornherein herabgesetzt und schließlich ganz aufgehoben<sup>1)</sup>.

Die Gefäße des Gesichts, der Haut und der Gehirnoberfläche beginnen infolge verminderter Erregbarkeit der zentralen Ursprünge ihrer Nerven schon sehr früh sich zu erweitern; die Körperoberfläche erscheint bei der Chloroformwirkung bis in die höheren Grade der Narkose stark gerötet. Beim Kaninchen tritt die Erweiterung der kleinen arteriellen Gefäße genau wie nach Sympathicusdurchschneidung sehr deutlich zutage, zu Anfang der Narkose findet man eine hochgradige Füllung der Ohrgefäße, die wie bei der Sympathicusdurchschneidung ebenfalls mit einer Temperatursteigerung im Ohr begleitet ist; verbindet man den Sympathicus mit Elektroden und reizt nun, nachdem durch das Chloroform die Füllung der Ohrgefäße eingetreten ist, den Sympathicus elektrisch, so verengern sich die Gefäße momentan wieder, es kann sich hier also nicht um eine periphere Wirkung handeln<sup>2)</sup>. Bei fortschreitender Narkose verlieren auch andere Gefäßgebiete ihren Tonus, bei der tiefen Narkose sind die Gefäßwandungen völlig erschlafft, diese Erschlaffung wird durch eine Lähmung der Gefäßnervenursprünge im Zentralnervensystem bedingt, dazu gesellt sich bei der tiefen Narkose noch eine direkte lähmende Wirkung der Chloroforms auf die Muskulatur und auf die Endigungen der Nerven in der Wandung der kleinen Arterien, die Kapillaren werden direkt nicht beeinflußt, es entsteht bei der Chloroformnarkose also keine Kapillarhyperaemie<sup>3)</sup>.

Am Herzen selbst wird die Motilität vermindert, diese Wirkung führt bei Fröschen zum diastolischen Herzstillstand, bei Säugetieren zur Abschwächung der Herztätigkeit, zuweilen kommt es auch zum Stillstand. Clemens<sup>4)</sup> ließ Chloroformdämpfe auf das ausgeschnittene Froschherz einwirken, es trat Stillstand ein; wurden die Dämpfe entfernt, so setzte die Bewegung wieder ein; dasselbe erhält man, wenn man das aus-

<sup>1)</sup> Zitiert nach Schmiedeberg, Pharmakologie 1902, S. 24.

<sup>2)</sup> Scheinesson, Arch. d. Heilk. 10, 36. 1869.

<sup>3)</sup> Zitiert nach Schmiedeberg, Pharmakologie. 1902.

<sup>4)</sup> Clemens, Untersuchung über die Wirkung des Äthers und Chloroforms auf Menschen, Tiere und Pflanzen. Diss. Bern 1850.

geschnittene Herz mit physiologischer Kochsalzlösung, welche etwas Chloroform gelöst enthält, umspült, dem diastolischen Stillstand des Herzens folgt nach Fortspülung der chloroformhaltigen Kochsalzlösung wieder die normale Schlagtätigkeit. Bock<sup>1)</sup> wies die gleiche Wirkung auch am Säugetierherzen nach; er unterband nahe am Herzen alle Arterien des großen Kreislaufs und ersetzte diese durch starre Röhren, es bestand also nur der kleine Kreislauf in normaler Weise; der durch die Herztätigkeit in der arteriellen Röhrenabteilung erzeugte Blutdruck sank beim Einblasen von Chloroform in die Lunge ganz bedeutend. Unter dieser Versuchsbedingung kann das Sinken des Blutdrucks nur die Folge einer Abschwächung der Herztätigkeit sein.

Der Blutdruck in den Arterien sinkt infolge dieser Herzschwäche und Gefäßerweiterung während der Chloroformierung kontinuierlich, bis die Reflexe — und namentlich der Kornealreflex — erloschen sind; dann hält er sich dauernd in der Tiefe. Bei längerer Dauer der tiefen Narkose sinkt der arterielle Blutdruck im raschen Tempo; beim Kymographionversuch sehen wir jetzt, wie der Blutdruck fast gleich Null geworden ist, bei jeder Herzkontraktion eine weit höhere Pulselevation wie vorher, weil die vollkommen erschlaffte Arterienwand durch die Blutwelle weit leichter ausgedehnt werden kann; die Frequenz der Herzkontraktionen ist verlangsamt.

Das Atemzentrum wird bei der Chloroformwirkung am spätesten außer Tätigkeit gesetzt, durch seinen Stillstand tritt der Tod ein; die Atemzüge werden immer langsamer und lassen sich auf reflektorischem Wege kaum noch beeinflussen. Treten infolge der starken Blutdrucksenkung Kreislaufstörungen ein, so nimmt die Respirationsfrequenz wieder zu, ähnlich wie bei der Erstickung.

Die Ursache der bei der Chloroformnarkose hin und wieder vorkommenden Todesfälle läßt sich nicht mit Bestimmtheit angeben. Man unterscheidet drei Arten von Todesursachen: die erste Möglichkeit besteht im Shok als Reflex von der Nasenschleimhaut aus, die zweite Möglichkeit ist durch den Herztod als akute Chloroformwirkung zu suchen, und

---

<sup>1)</sup> Bock, Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. 41, 158. 1898.

endlich die dritte Möglichkeit kann durch fettige Degeneration des Herzens während der Narkose zustandekommen.

Der zuweilen gleich zu Beginn der Narkose beobachtete Tod hat seinen Grund vermutlich in dem Reflexe, welcher durch Reizung der Nasenschleimhaut und der Respirationswege durch die Chloroformdämpfe ausgelöst wird. Diesen Reflex kann man bekanntlich am besten am Kaninchen demonstrieren; verbindet man die Carotis des Kaninchens mit dem Blutwellenschreiber und läßt das Tier nunmehr Chloroform einatmen, so sehen wir mit dem Respirationsstillstand gleichzeitig eine Blutdruckreaktion auftreten, siehe Fig. 1; lassen wir das Chloroform durch eine eingebundene Trachealkanüle einatmen, so tritt ebenfalls eine, wenn auch schwächere Reaktion auf, siehe Fig. 2. Daß es sich hier tatsächlich nicht um eine spezifische Chloroformwirkung handelt, sondern um einen Reiz, der bekanntlich allen stark riechenden Gasen eigentümlich ist, zeigen Fig. 3 und 4, bei denen das eine Mal Tabaksdampf, das andere Mal Schwefelkohlenstoff dem Tier auf die Nase geblasen wurde; bläst man diese Dämpfe in die Trachealkanüle, so tritt bei diesen beiden ein ganz unerheblicher Reflex auf. Beim Hund kann man nur einen weit kleineren Reflex — selbst beim Chloroform — beobachten, bei Anwendung einer Kanüle sind Reflexe nicht zu bemerken.

Der Grund für den zuweilen erst spät nach der Chloroformnarkose auftretenden Tod ist höchstwahrscheinlich darin zu suchen, daß das Chloroform mehrere Organe — worunter in erster Linie das Herz zu nennen ist — fettig degeneriert. Diese fettige Degeneration ist bereits eingehend studiert, vor allem von Junkers<sup>1)</sup>, Unger<sup>2)</sup>, Straßmann<sup>3)</sup>, Stommel<sup>4)</sup>, Ostertag<sup>5)</sup> und Offergeld<sup>6)</sup>.

<sup>1)</sup> Junkers, Über fettige Entartung infolge von Chloroforminhalation. Ing.-Diss. Bonn 1883.

<sup>2)</sup> Unger, Vierteljahrschrift für gerichtliche Medizin, N. F. 47. 1887.

<sup>3)</sup> Straßmann, Arch. für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin. Bd. 115.

<sup>4)</sup> Stommel, Zur Lehre von der fettigen Entartung nach Chloroformeinatmungen. Ing.-Diss. Bonn 1889.

<sup>5)</sup> Ostertag, Arch. f. patholog. Anat. u. Physiologie u. f. klin. Med. Bd. 118.

<sup>6)</sup> Offergeld, Arch. f. klinische Chirurgie, Bd. 75, Heft 3.

Straßmann beantwortet die Frage, ob die Verfettung der Organe als bloße Fettanhäufung — Fettinfiltration — oder als fettiger Zerfall — Fettmetamorphose — anzusprechen sei, dahin, daß es sich hier, wie seine Stoffwechselversuche unzweideutig ergaben, um eine Verfettung handle, die zur Kategorie der fettigen Metamorphosen zu rechnen sei. Ostertag kommt zu folgenden Schlüssen: „Nach langdauernder Chloroformeinatmung können bei den verschiedensten Tieren Verfettungen der Organe auftreten, und zwar Fettinfiltration der Leber, Fettmetamorphose der Herz- und Skelettmuskulatur, der Nieren und des Magens. Die Fettmetamorphose ist die Folge einer Einwirkung des Chloroforms auf das Blut (Zerstörung roter Blutkörperchen) und auf die Gewebszellen selbst. Gewisse Individuen zeigen eine so große Empfänglichkeit für die Nebenwirkungen des eingeatmeten Chloroforms, daß sie kürzere oder längere Zeit nach der Anwendung denselben erliegen. Die tödliche Nachwirkung des Chloroforms äußert sich in einer Lähmung des Herzens, welche durch eine bisweilen nur wenig bemerkbare anatomische Schädigung des Myocardiums und durch eine allmähliche Kohlensäureüberladung des Blutes herbeigeführt wird.“ Stommel stellte fettige Entartung der Leber und des Epithelbelags der Lungenalveolen fest.

Diese mitgeteilten Resultate wurden durch Versuche mit gewöhnlichem Chloroform gewonnen; im nachstehenden möchten wir über Versuche berichten, die wir mit völlig reinem und unverdorbenem Chloroform ausführten. Bei diesen Experimenten kamen wir zu wesentlich anderem Ergebnis: das reine Chloroform hat bei Gaben, die die Narkose herbeiführen, auf das Gefäßsystem und auf den Blutdruck fast keinen, auf das Herz fast keinen akuten Einfluß, die Atmung erfährt unter der Wirkung der reinen Substanz eine sehr kleine Alteration und zwar ist sie verlangsamt. Läßt man das reine Chloroform am Licht und an der Luft offen stehen, so zeigt es bald die oben auseinandergesetzten Wirkungen.

Aus der chemischen Betrachtung geht hervor, daß von allen Chloroformdarstellungsmethoden die sogenannte Anschütz-Methode die einwandfreieste ist, dieses Chloroform haben wir für unsere Versuche zunächst verwandt und haben uns mit

Hilfe dieses Chloroforms Aufschluß über die Wirkung des reinen Chloroforms verschafft.

Bevor wir zu unseren Versuchen übergehen, wollen wir zunächst die Versuchsanordnung beschreiben, da uns diese für einwandfreie Versuche als sehr wichtig erscheint. Die Versuche wurden an kräftigen Hunden angestellt; die Carotis wurde mit dem Blutwellenschreiber und dieser mit dem Kymographion in Verbindung gesetzt. In die Trachea wurde eine Kanüle eingebunden, die durch einen kurzen Schlauch in einen Trichter endete (Chloroformiertrichter). In diesen Trichter wurde ein Tupferbausch gelegt, der mit der jeweils zu untersuchenden Flüssigkeit in gleicher Weise und gleichmäßig getränkt wurde; der Tupfer wurde in allen Fällen, bei denen die Versuchsergebnisse miteinander verglichen werden sollten, gleich stark getränkt, auch war die Zeit, während der das Mittel gegeben wurde, in diesen Versuchen die gleiche. Bei Ausführung der Operation wurden natürlich keinerlei schmerzlindernde Mittel gegeben. Die absolute Millimeter-Zahl Hg wurde nach dem Versuch mit einem Quecksilber-Manometer auskalibriert.

Vorversuchsweise wurde in den Chloroformiertrichter ein mit Wasser durchnässter Tupfer gelegt, eine bemerkbare Einwirkung auf den Blutdruck war hierbei nicht zu beobachten.

Fig. 5—11 zeigt uns einen Versuch mit reinem Chloroform (Anschütz). Fig. 5 ist die normale Blutdruckkurve, jetzt wurde ein mit dem Chloroform getränkter Tupfer in den Trichter gelegt, die Wirkung zeigen die nächsten Figuren. Der Blutdruck sinkt bis zu Fig. 9 insgesamt um 5 mm Hg, die Atemfrequenz ist zuerst etwas beschleunigt (Fig. 6, 7, 8 und 9); nun wird, da das Tier völlig chloroformiert ist, der Tupfer entfernt, der Blutdruck steigt sogleich wieder an (Fig. 10), und jetzt sehen wir gleichzeitig eine verlangsamte Atmung, 5 Minuten später ist der Hund wieder als normal anzusehen (Fig. 11).

Ob die beobachtete Blutdrucksenkung dem Chloroform zuzuschreiben ist, oder den bekannten und unbekanntem im Chloroform enthaltenen anderen Körpern, läßt sich nicht mit Bestimmtheit angeben. Die die Langgaardsche Reaktion gebenden chemischen Körper, wie z. B. Benzol, Toluol und ähnliche, zeigten sich in den in Frage kommenden Dosen als absolut unwirksam. Jedes Chloroform enthält jedoch noch Alkohol als Konservierungs-



zusatz, und daß dieser zu der erhaltenen Reaktion auf den Organismus beiträgt, ist möglich, jedenfalls bedingt er aber nicht allein die Wirkung; in dem nachfolgenden Versuch nahmen wir statt des Chloroforms eine 10%ige wässrige Lösung von Alkohol. Die erhaltenen Kurven ähneln den Chloroformkurven auch bezüglich des Sinkens des Blutdruckes sehr (siehe Fig. 12—18). In Fig. 16 ist der Blutdruck um 5 mm Hg gesunken. Unregelmäßigkeiten im Puls sind ebenfalls nicht zu beobachten, eine bemerkenswerte Veränderung der Atemfrequenz ist nicht eingetreten, höchstens scheint die Atmung, im Gegensatze zur Chloroformkurve, etwas beschleunigt zu sein. 10 Minuten nach Entfernung des Alkoholtupfers ist der Blutdruck wieder normal (Fig. 17). Nach weiteren 5 Minuten zeigt sich eine kleine Nachwirkung, die Atemfrequenz ist verlangsamt, sie wird jedoch bald wieder normal.

Die Alkoholkurve gleicht der Chloroformkurve sehr. Da nun aber Chloroform etwa nur den 10. Teil des angewandten Alkohols, und das Anschütz-Chloroform, welches hiermit verglichen wird, nur den 50. Teil enthält, kann dem Alkohol unmöglich die ganze Wirkung zugesprochen werden: es müssen entweder selbst im reinsten Chloroform noch Körper existieren, die den Blutdruck beeinflussen, oder diese nur sehr unbedeutende Reaktion muß dem Chloroform selbst zugesprochen werden.

Die bekannte Wirkung des Chloroforms erhielten wir, wenn wir das Chloroform am Licht und an der Luft stehen ließen; bereits nach 24 Stunden erzeugt das Chloroform, wie Fig. 19—25 erweisen, schwere Pulsstörungen. Fig. 19 zeigt die normale Kurve vor dem Versuch; jetzt wird auf den Chloroformiertrichter das der Zersetzung 24 Stunden ausgesetzte Chloroform gegeben, die sich in den Figuren 20—22 ausbildenden Arrhythmien sind von einer nennenswerten Blutdruckwirkung nicht begleitet, in Fig. 23 ließen wir das Tier auf einen Augenblick sich erholen, jetzt wurde der Versuch wiederholt, sofort bilden sich ausgesprochene Arrhythmien aus, die Pulselevationen sind vergrößert. Es gibt uns die Kurve Beweise dafür an die Hand, daß sich beim Chloroform Zersetzungsprodukte — gegen das Hereinfallen von Schmutz u. dergl. war das Chloroform natürlich geschützt worden — gebildet haben, die auf das Herz eine Wirkung ausüben.

In den nächsten Versuchen, die mit  $6 \times 24$  Stunden gestandenem Anschütz-Chloroform ausgeführt wurden, finden wir

bereits alle Symptome der Chloroformvergiftung vor (Fig. 26—35), Fig. 26 zeigt den normalen Puls, es beginnt jetzt die Chloroformierung, für einen Augenblick fällt der Blutdruck für eine Weile (Fig. 27), dann steigt er auf kurze Zeit wieder an (Fig. 28), von jetzt an fällt er stetig ohne Unterbrechung (Fig. 29—35) [die Vorgänge in den Figuren sind zeitlich durch wenige Sekunden getrennt], es bildet sich eine stets zunehmende Arrhythmie aus. Beim Sinken können wir jetzt die oben erwähnte Verlangsamung der Herzkontraktion und die großen Elevationen entstehen sehen, diesem Punkt folgt alsbald der Tod (Fig. 35). Die Kurvenbilder zeigen uns, daß das Chloroform jetzt vollkommen die Wirkung aufweist, die über dasselbe bereits seit langem bekannt ist.

Der folgende Versuch zeigt das Verhalten des verdorbenen Chloroforms auf das deutlichste. Der Versuch wurde so angestellt, daß der Anfang des Versuchs, *a*, und das Ende, *b*, genau übereinander stehen; jedem Versuch geht eine normale Kurve voran, von einem Versuch zum andern wurde solange gewartet, bis das Tier wieder aus der Narkose erwacht, wenn die Kurve als normal anzusehen war. Fig. 36 zeigt das auf 3 Tage dem Licht und der Luft ausgesetzte Anschütz-Chloroform, das für den Versuch Fig. 37 verwandte Chloroform hatte 6 Tage gestanden, und endlich zeigt uns der Versuch Fig. 38 das 9tägige Chloroform mit den schweren Wirkungen der Zersetzungsprodukte. Bei allen drei Chloroformportionen treten Arrhythmie und Blutdrucksenkung auf, die dem Grade der Zersetzung proportional sind. Die Dauer der Erholung von den einzelnen Versuchen ist ebenfalls der Schwere der Vergiftung proportional; am langsamsten, und zwar erst nach Wiederbelebungsversuchen, erholt sich das Tier von dem letzten Versuch, bei der langsamen Erholung sehen wir, wie der Blutdruck ganz ebenmäßig steigt (Fig. 39), und gleichzeitig ist die Pulsverlangsamung mit der Begleiterscheinung der höheren Elevation deutlich ausgesprochen.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das absolut reine Chloroform in den narkotisierenden Gaben wenig oder gar nicht auf den Blutdruck, auf das Herz, auf das Gefäßsystem einwirkt, die bekannten Wirkungen sind nur auf die Zersetzungsprodukte des Chloroforms zurückzuführen, das Chloroform zersetzt sich bei Gegenwart von Licht, Luft und Feuchtigkeit sehr schnell.

Es läßt sich nicht mit Bestimmtheit angeben, welches Produkt resp. welche Produkte diese Wirkung verursachen, wir sind geneigt, wegen seiner großen Ähnlichkeit in der Blutdruckkurve, die das schlechte Chloroform mit dem Phosgen hat, diesem die größte oder die ganze Schuld aufzubürden.

Phosgen wirkt, in geringen Spuren, die chemisch nicht nachweisbar sind, eingeatmet, prinzipiell wie schlechtes Chloroform, siehe Fig. 40—43. Fig. 40 zeigt das normale Bild des Pulses, durch das Phosgen wird eine kleine Blutdruckerhöhung, die von einer Senkung gefolgt ist, hervorgebracht, Arrhythmie ist zu beobachten (Fig. 41), ebenfalls die Pulsverlangsamung und die heftige Elevation der einzelnen Pulswellen (Fig. 42).

---

Die mitgeteilten Versuche zeigen, daß die biologische Prüfung weit empfindlicher als die chemische ist, vor allem ist die biologische Prüfung des Chloroforms zur Beurteilung der Güte für Narkotisierzwecke weit maßgebender als die chemische Prüfung, welche uns nur eine Güte in chemischer Hinsicht garantiert.

In den nachfolgenden Kurven (Fig. 44—49), geben wir eine biologische Prüfung verschiedener Chloroformsorten wieder, die Versuche wurden gleich angeordnet, d. h. es wurden gleiche Mengen Chloroform gegeben, die Exponierzeit war dieselbe, und zum besseren Vergleiche wurden Anfang und Ende des Versuchs übereinander gesetzt. Diese Kurven bestätigen die chemischen, oben bereits erwähnten Tatsachen.

Die als gut erprobten Chloroformsorten, Anschütz und Duncan, haben wir je 6 Tage der Zersetzung ausgesetzt, das Resultat zeigen uns die Kurven Fig. 50 und 51, die Chloroformsorten sind proportional ihrer ursprünglichen Güte verschlechtert. Diese Kurven lehren ferner, daß das Licht allein das fertige Chloroform nicht sehr beeinflußt, da das Duncan-Chloroform, wie bereits erwähnt, in weißen Gläsern verschickt und aufbewahrt wird; sobald die Luft herantritt, fällt auch dies Chloroform der Zersetzung anheim.

## Über den Aminosäurenstoffwechsel des Gichtikers.

Von

**J. Wohlgemuth.**

(Aus der chemischen und experimentell-biologischen Abteilung des  
Pathologischen Instituts der Universität zu Berlin.)

*(Eingegangen am 27. Juli 1906.)*

Seitdem Ignatowski<sup>1)</sup> im Harn eines Gichtikers Glykokoll und daneben noch andre Aminosäuren nachgewiesen hatte, sind eine Reihe von Autoren gefolgt, die diese Tatsache speziell für das Glykokoll bestätigen konnten. Man hat dann auch im normalen Harn auf Eiweißspaltprodukte gefahndet, ist aber hier zu stark divergierenden Resultaten gekommen. Es hat sich in der Folge gezeigt, daß diese Verschiedenheit, in den Resultaten zurückzuführen ist auf die Art der für die Isolierung angewandten Methodik. Schüttelte man nämlich den Harn mit Naphthalinsulfochlorid bei stark alkalischer Reaktion, wie Embden und Reese<sup>2)</sup> es empfehlen, so erhielt man weit mehr von dem Reaktionsprodukt, als wenn man nach Fischer und Bergell<sup>3)</sup> nur eine schwache Alkaleszenz wählte. Ich konnte dann im Verein mit Neuberg<sup>4)</sup> mittels der Naphthylcyanat-Methode zeigen, daß der tatsächliche Gehalt des nativen Harns an Aminosäuren, wenn solche überhaupt in ihm vorkommen, ein äußerst spärlicher ist und für physiologische

---

<sup>1)</sup> Ignatowski, Ztschr. f. physiol. Chem. **42**, 388. 1904.

<sup>2)</sup> Embden und Reese, Hofmeisters Btrg. **7**, 411. 1905.

<sup>3)</sup> Fischer und Bergell, Berichte d. deutsch. chem. Ges. Jahrgang **35**. 1903.

<sup>4)</sup> Wohlgemuth und Neuberg, Medizin. Klinik **1906**, Nr. 9.

Probleme nicht weiter in Frage kommt. Zu demselben Resultat kam unabhängig von uns in der Friedrich Müllerschen Klinik Forßner<sup>1)</sup> und später auch Samuely<sup>2)</sup>. Ersterer teilte gleichzeitig mit, daß es auch Fälle von Gicht gibt, bei denen sich keine Eiweißspaltprodukte im Harn nachweisen lassen. Das stimmt befriedigend mit dem überein, was ich gleichzeitig mit den bereits zitierten Untersuchungen am normalen Harn in einem Falle schwerster Gicht konstatieren konnte, und worüber ich hier kurz berichten möchte.

Es handelt sich um einen Patienten, der seit 37 Jahren gichtleidend war, und bei dem sich im Laufe der Zeit enorme Tophi an der Metatarsophalangealgelenken, an den Ellbogen-, den Fersen- und Kniegelenken entwickelt hatten. Der Patient bekam sehr häufig typische Gichtanfälle bald in diesem, bald in jenem Gelenk, war auch in den Zwischenzeiten selten frei von Schmerzen, und es genügte mitunter nur eine kleine psychische Erregung, um einen Anfall auszulösen. Den Harn dieses Patienten untersuchte ich zu den verschiedensten Zeiten nach der Methode von Neuberg und Manasse<sup>3)</sup>. Dieselbe besteht — kurz skizziert — darin, daß man den nativen Harn, ohne ihn irgendwie vorzubehandeln, mit einer bestimmten Menge Naphthyl-i-cyanat versetzt, die entsprechende Menge n-Natronlauge zufügt und ihn einige Zeit schüttelt. Dabei addiert sich das Naphthyl-i-cyanat zu der etwa vorhandenen Aminosäure zu einem schwer löslichen Harnstoffderivat, einer Naphthylhydantoinsäure, die auf Zusatz von Salzsäure in gut filtrierbarem Zustand ausfällt. Der Niederschlag wird zur Reinigung in Alkohol oder Ammoniak gelöst, mit Knochenkohle behandelt und aus der stark entfärbten Lösung das Glykokoll z. B. als Barytsalz isoliert. Auf diese Weise konnte ich weder in der anfallsfreien Zeit noch während eines Anfalls Aminosäuren im Harn nachweisen. Gleichzeitig zur Kontrolle ausgeführte Untersuchungen mittels der Naphthalinsulfomethode hatten dasselbe negative Ergebnis. Darnach ist das Vorkommen von Eiweißspaltprodukten speziell von Glykokoll im Harn des

---

<sup>1)</sup> Forßner, Ztschr. f. physiol. Chem. **47**, 15. 1906.

<sup>2)</sup> Samuely, Ztschr. f. physiol. Chem. **47**, 376. 1906.

<sup>3)</sup> Neuberg und Manasse, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **88**, 2359. 1905.

Gichtikers keine durchaus immer zutreffende Tatsache, sondern man wird selbst schwere Fälle von Gicht finden, in denen sich nach den uns heute zur Verfügung stehenden Methoden Aminosäuren nicht nachweisen lassen.

Nun hat aber, gestützt auf den Befund von Ignatowski und auf die Untersuchungen von Frey<sup>1)</sup> vor einiger Zeit Kionka<sup>2)</sup> die Theorie aufgestellt, daß man sich die Entstehung der Gicht oder vielmehr des Gichtanfalles so vorzustellen habe, daß der Gichtiker die Fähigkeit verloren hat, das im Körper freiwerdende Glykokoll ganz zu verbrennen, und daß das im Blut kreisende Glykokoll das saure harnsaure Natron leicht zum Ausfall bringt; da nun der Knorpel besonders reich an Glykokoll ist, so sei es leicht erklärlich, warum gerade die Harnsäureablagerungen stets an den knorpelhaltigen Knochenenden zu finden seien. So bequem nun diese Theorie des Harnsäureausfalles wäre, so wenig Wahrscheinlichkeit hat sie für sich. Abgesehen davon, daß bereits Abderhalden und Schittenhelm<sup>3)</sup> auf Grund rechnerischer Überlegungen zu dem Schluß kamen, daß die von Frey aus dem Knorpel isolierten Mengen an Glykokoll viel zu gering sein müssen, um eine genügende Identifizierung zu gestatten, lassen auch rein theoretische Erwägungen diese Hypothese bedenklich erscheinen. Da aber ein praktischer Versuch mehr beweist als alles Theorctisieren, so soll hier an einem Beispiel gezeigt werden, daß die Theorie von Kionka nicht immer zuzutreffen braucht. War es nämlich richtig, daß das im Blute frei kreisende Glykokoll zu einem Ausfall der Harnsäure führt, so müßte bei einem Gichtiker — und noch dazu bei einem solchen, der schon aus ganz geringen Anlässen einen Anfall bekommt — dadurch, daß man sein Blut mit Glykokoll überschwemmt, prompt ein Gichtanfall ausgelöst werden.

Es gab nun drei Wege, das Glykokoll dem Körper einzuverleiben, entweder per os oder subkutan oder intravenös.

---

<sup>1)</sup> Frey, Ztschr. f. experimentelle Pathologie u. Therapie **2**, 26. 1905.

<sup>2)</sup> Kionka, Deutsch. medicin. Wochenschr. 1905, S. 1141 u. Ztschr. f. experim. Pathologie und Therapie **2**, 1. 1905.

<sup>3)</sup> Abderhalden und Schittenhelm, Ztschr. f. experim. Pathologie u. Therapie **2**, 431. 1906.

Der letztangedeutete verbot sich wegen der mit ihm verbundenen Lebensgefahr von selbst, und auch der zweite hatte sein Mißliches, da subkutane Injektionen von größeren Flüssigkeitsmengen stets heftige Schmerzempfindungen verursachen und so das Krankheitsbild hätten beeinflussen können. So blieb denn nur der Weg per os. 45 g Glykokoll wurden in 250 ccm Wasser gelöst und das ganze Quantum von dem Patienten auf einmal getrunken. Der Effekt war ein im Sinne der Kionkaschen Theorie durchaus negativer: Der Patient blieb den nächsten und die folgenden Tage ohne alle Schmerzen und hatte nicht das geringste Unbehagen. Der Urin, der darnach innerhalb 24 Stunden gelassen wurde, gab mit Naphthyl-i-cyanat behandelt und mit Salzsäure versetzt, einen beträchtlichen Niederschlag. Derselbe wurde in der üblichen Weise mit Ammoniak ausgekocht, wobei die Harnsäure ungelöst zurückblieb, mit Knochenkohle entfärbt, das fast farblose Filtrat bis zur beginnenden Kristallisation eingeeengt und dann durch Zusatz von Salzsäure die Naphthylcyanatverbindung wieder in Freiheit gesetzt, wobei dieselbe teils kristallisch, teils gelatinös ausfiel. Nach dem Abfiltrieren und Auswaschen mit Wasser wurde die Substanz in der gerade ausreichenden Menge verdünnten Ammoniak gelöst und tropfenweise Chlorbaryum zugesetzt, solange noch ein Niederschlag entstand. Derselbe wurde nach kurzem Stehen abgesaugt, gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute betrug ca. 2,1 g, das entspricht 0,5 g Glykokoll. Die Analyse bestätigte das Vorliegen von Baryumnaphthylcyanatglykokoll.

0,3694 g Substanz ergaben 0,1150 g  $\text{BaCO}_3$

gefunden: Ba = 21,65 %

berechnet für  $(\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}_2)_2\text{Ba}$  = 21,98 %.

Es geht aber aus diesem Versuch hervor, daß, obwohl Glykokoll in solcher Menge in die Blutzirkulation gelangte, daß noch ein halbes Gramm zur Ausscheidung kam, ein Gichtanfall nicht ausgelöst wurde. Darnach dürfte der Beweis erbracht sein, daß die Theorie von Kionka bezüglich der Entstehung der Gicht, speziell des Gichtanfalles nicht allgemeine Gültigkeit hat.

Im Anschluß hieran wurde untersucht, wie der Gichtiker sich Aminosäuren gegenüber überhaupt verhält. Denn vielleicht konnten sich bei den interessanten Harnbefunden, auf die ein-

gangs hingewiesen wurde, ähnliche Verhältnisse bei der Gicht zeigen, wie sie Loewy und Neuberg<sup>1)</sup> in einem Falle von Cystinurie beobachtet haben, und die sie veranlaßten, die Cystinurie aufzufassen als eine Störung im Aminosäurenstoffwechsel großen Stiles, die sich nicht allein auf das Cystin beschränkt. Sie konnten nämlich dartun, daß ihr Cystinuriker nicht bloß Cystin im Harn ausschied, sondern auch Tyrosin und Asparaginsäure, wenn sie ihm solches per os verabfolgten. Zwar konnte Simon<sup>2)</sup> in einem anderen Falle von Cystinurie nicht das gleiche Verhalten beobachten, aber die späteren Untersuchungen von Abderhalden und Schittenhelm<sup>3)</sup>, die in einem anderen Falle schon normaler Weise neben Cystin noch Tyrosin und Leucin fanden, sprechen doch sehr zu gunsten jener Auffassung. Man geht vielleicht nicht fehl, wenn man annimmt, daß je nach dem Grade der Stoffwechselstörung die Versuche positiv oder negativ ausfallen können, wobei die Menge des zur Ausscheidung kommenden Cystins noch nicht einmal der Maßstab für den Grad der Störung zu sein braucht.

Wir stellten unsere Versuche an mit Leucin und inaktivem Alanin. Das Leucin stammte aus mit Pankreas verdaulichem Fibrin und war durch mehrmaliges Umkristallisieren aus heißem Wasser unter Zusatz von Knochenkohle gründlich gereinigt worden. 25 g davon wurden dem Patienten in Kartoffelbrei verabfolgt, der Harn von den nächsten 24 Stunden gesammelt, mit Bleiacetat behandelt, nach dem Entfernen des Bleies bis zum Sirup eingengt und im Vakuumexsikkator der Kristallisation überlassen. Aber weder so noch durch abermaliges Lösen des Sirups in Wasser und Behandeln mit Naphthalinsulfochlorid gelang es Leucin oder das entsprechende Derivat zu isolieren. Darnach war die Gesamtmenge des Leucins glatt verbrannt worden.

Von dem racemischen Alanin wurden 35 g in Wasser gelöst gegeben und ebenfalls der Harn von den nächsten 24 Stunden gesammelt. Bei der Verarbeitung desselben nach der Sulfochloridreaktion trat sofort beim Ansäuern ein beträchtlicher

---

<sup>1)</sup> Loewy und Neuberg, *Ztschr. f. physiol. Chem.* **48**, 338. 1904/5.

<sup>2)</sup> Simon, *Ztschr. f. physiol. Chem.* **45**, 357. 1905.

<sup>3)</sup> Abderhalden und Schittenhelm, *Ztschr. f. physiol. Chem.* **45**, 468. 1905.



Niederschlag auf, der zunächst als helles Öl ausfiel. Derselbe wurde mit Wasser gewaschen, nochmals umgelöst und kristallisierte dann nach längerem Stehen in der Kälte vollständig. Nach einmaligem Umkristallisieren aus heißem Wasser erschien die Substanz rein und setzte sich aus sehr feinen, meist büschelförmig verwachsenen Nadelchen zusammen. Die alkoholische Lösung sowohl wie die ammoniakalische drehten die Ebene des polarisierten Lichtes stark links. Im Kapillarröhrchen erhitzt, sinterte die Verbindung bei 98—100° und schmolz bei 117 bis 120°.

Die Ausbeute betrug 1,8 g.

0,2060 g Subst. verbrauchten nach Kjeldahl 7,4 ccm  $\frac{n}{10}$  NaOH  
darnach gefunden: N = 5,00%  
berechnet für  $C_{13}H_{13}O_4NS$ : N = 5,01%.

Es war somit, wie zu erwarten war, das racemische Alanin im Körper zerlegt, der Anteil des d-Alanin verbrannt und ein Teil des l-Alanin unverändert wieder ausgeschieden worden.

Darnach verhält sich der Gichtiker, wenn diese wenigen Versuche schon einen Schluß gestatten, Aminosäuren gegenüber wie der normale Mensch. Nur beim Glykokoll hat es den Anschein, als ob für dieses die Assimilationsgrenze beim Gichtiker tiefer als normal liegt. Jedenfalls erscheint es uns notwendig, an einer großen Zahl von Gichtfällen diese Verhältnisse eingehend nachzuprüfen und außer den drei angewandten Aminosäuren noch andre in den Kreis des Experiments zu ziehen, möglich, daß sich hier dieselben Unterschiede zeigen wie bei der Cystinurie. Alle diese Versuche werden aber nur dann einen Wert haben, wenn man die Dosen der zu verfütternden Substanzen nicht allzu klein wählt. Denn es ist klar, daß die Assimilationsgrenze beim Menschen für Eiweißspaltprodukte weit höher liegt als beim Hund oder gar beim Kaninchen, und es ist darum mit kleinen Dosen von 6—10 g, wie sie z. B. Reiß<sup>1)</sup> an Menschen verfütterte oder Baumgarten<sup>2)</sup> bei seinen Versuchen mit Kohlehydratsäuren anwandte, — vorausgesetzt natürlich, daß man die in der Natur vor-

<sup>1)</sup> Reiß, Hofmeisters Beitr. 8, 370. 1905.

<sup>2)</sup> Baumgarten, Ztschr. f. experim. Pathologie u. Therapie 8, 220. 1906.

kommende Komponente wählt — kaum ein Ausschlag zu erwarten. Und ebenso wird man bei der Versuchsperson auf den Grad ihrer Ernährung achten müssen, nachdem R. Hirsch<sup>1)</sup> an Hunden gezeigt hat, daß im Hunger dieselbe Menge i-Alanin spurlos verschwindet, von der sonst bei normal ernährten Tieren ein beträchtlicher Teil wieder zur Ausscheidung gelangt.

---

<sup>1)</sup> R. Hirsch, Ztschr. f. experim. Pathologie u. Therapie **2**, 668. 1906.

---

## Über die Bedeutung von Bleisalzen für die polarimetrische Untersuchung des Harns und der Gewebssäfte.

Von  
**Hermann Großmann, Berlin.**

*(Eingegangen am 31. Juli 1906.)*

Die Bestimmung des optischen Drehungsvermögens besitzt für die Analyse des Harns und der Körperflüssigkeiten bekanntlich besondere Bedeutung, da die d-Glukose, der Traubenzucker, ja am leichtesten auf diesem Wege qualitativ erkannt und quantitativ bestimmt werden kann. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Abwesenheit anderer optisch-aktiver Substanzen, resp. deren vorherige Entfernung, was gewöhnlich durch Zusatz einiger ccm Bleiacetatlösung (Bleizucker) geschieht, welche den Harn etc. von Farbstoffen, Phosphaten, Harnsäure sowie eventuell vorhandenen albuminhaltigen Substanzen usw. z. T. befreit.

Von optisch-aktiven Substanzen, deren Vorhandensein in größerer Menge natürlich eine exakte Bestimmung des Traubenzuckers auf polarimetrischem Wege unmöglich machen würde, kommen nach neueren Untersuchungen vor allem die folgenden in Betracht: die Maltose<sup>1)</sup>, die Isomaltose<sup>2)</sup>, die linksdrehende Fruktose<sup>3)</sup>, das sogenannte tierische Gummi oder Mucin<sup>4)</sup>, ferner

---

<sup>1)</sup> Wedenski, Ztschr. f. physiol. Chem. **18**, 122.

<sup>2)</sup> Baisch, Ztschr. f. physiol. Chem. **19**, 364 u. **20**, 248. Rosin u. Alfthan, Chem.-Ztg. **24**, Rep. 238.

<sup>3)</sup> Vergl. über das Vorkommen O. von Lippmann, Chemie der Zuckerarten (1904), S. 808, sowie Neuberg u. Strauß, Ztschr. f. physiol. Chem. **36**, 227. 1902.

<sup>4)</sup> Landwehr, Centr.-Bl. 1885, 571. Albertoni, Centr.-Bl. 1890, 399. Coronedi, Centr.-Bl. 1892, 759 u. a.

Glykogen<sup>1)</sup> und gepaarte Glukuronsäuren<sup>2)</sup>, unter besonderen Umständen Milchzucker<sup>3)</sup>, Milchsäure<sup>4)</sup>,  $\beta$ -Oxybuttersäure<sup>5)</sup> und vielleicht auch amidierte Kohlehydrate<sup>6)</sup>.

Es ist schon von verschiedenen Seiten darauf hingewiesen worden, daß die Anwesenheit dieser Stoffe, deren Drehungsvermögen zum Teil dem des Traubenzuckers entgegengesetzt ist, eine optische Bestimmung der Glukose vollkommen illusorisch machen können<sup>7)</sup>.

Eine andere Fehlerquelle kann aber auch durch den Zusatz des Bleiacetats entstehen, besonders in solchen Fällen, wo alkalische Reaktion vorhanden ist, wie es beim Harn öfter und bei den Gewebsflüssigkeiten fast ausnahmslos der Fall ist. Abgesehen von der Tatsache, daß verdünnte Alkalien selbst schon in Spuren<sup>8)</sup> und ebenso alkalisch reagierende Salze auf die meisten Zuckerarten zersetzend einwirken, wobei tiefgreifende Veränderungen (Umlagerungen und Zersetzungen) auftreten, wird auf Zusatz des an und für sich schon schwach alkalischen Bleiacetats diese Zersetzung noch begünstigt, da auch Bleioxvd in ganz ähnlicher Weise, wenn auch z. T. unter Bildung anderer Umwandlungsprodukte zu reagieren vermag<sup>9)</sup>; ferner liegt die Gefahr vor, daß bei der Ausfällung der Phosphate usw. zugleich Zucker als unlösliche Verbindung mit dem Bleiniederschlag ausgefällt wird, während andererseits ein Teil als lösliche Bleialkalizucker-

<sup>1)</sup> Abeles, Ber. **19**, Ref. 385. Fütterer, Centr.-Bl. 1888, 1183. Leube, ibid. 1278. Simon, Chem.-Ztg. **26**, 966. Wolff, Biochem. Centr. **1**, 490.

<sup>2)</sup> Flückiger, Ztschr. f. physiol. Chem. **9**, 321. Mayer u. Neuberg, Ztschr. f. physiol. Chem. **29**, 256.

<sup>3)</sup> Hofmeister, Ztschr. f. physiol. Chem. **1**, 101. Porcher, Biochem. Centr. **2**, 115.

<sup>4)</sup> Araki, Ztschr. f. physiol. Chem. **20**, 365. 1895 und Langstein u. Neuberg, Verh. d. physiolog. Ges. 1902/03, S. 114.

<sup>5)</sup> Külz Ber. **17**, Ref. 534; **18**, Ref. 451. Magnus-Levy, Centr.-Bl. 1899, II, 63.

<sup>6)</sup> Pittarelli, Chem.-Ztg. **21**, Ref. 283.

<sup>7)</sup> Cantani, Ztschr. anal. Chem. **16**, 132. Salkowski, Ztschr. f. physiol. Chem. **17**, 228. Catillon, Journ. de pharm. [V] **21**, 43. Carles, Journ. de pharm. [V] **21**, 108.

<sup>8)</sup> A. Bickel, Pflügers Archiv **75**, 248.

<sup>9)</sup> Lobry de Bruyn u. van Ekenstein, Rec. trav. chim. **14**, 156 u. 203; **16**, 259 u. 278.

verbindung in der Lösung bleibt, die nun häufig ganz andere Rotationswerte zeigen kann als die reine optisch aktive Substanz. Mit anderen Worten: ein alkalischer Harn, der Bleizucker enthält, verhält sich ganz ebenso, als wäre Bleiessig hinzugefügt, und es ist schon lange bekannt, daß Bleiessig verdünnte Traubenzuckerlösungen, welche Salze — z. B. Kochsalz — enthalten, fällt <sup>1)</sup>. Ferner ist ebenfalls schon von anderer Seite beobachtet worden, daß das Drehungsvermögen der Glukose bei längerem Stehen mit Bleiessig allmählich abnimmt, wobei sich die Lösung anfangs gelblich und später dunkler färbt <sup>2)</sup>.

Die chemische Natur dieser unlöslichen Niederschläge ist kaum genau bekannt <sup>3)</sup>; wahrscheinlich handelt es sich um basische Verbindungen, deren Zusammensetzung von den Mengenverhältnissen des Fällungsmittels und der Konzentration der Lösung abhängt. Um diese ja schon länger bekannten Unzuträglichkeiten, welche bei der Verwendung von Bleiacetat als Klärungsmittel auftreten können, zu vermeiden, hat Patein <sup>4)</sup> vorgeschlagen, als Klärungsmittel eine Lösung von Quecksilbernitrat  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  zu benutzen. Dieses Verfahren hat allerdings den Vorzug, daß bei der stark sauren Reaktion der Lösung (die Anwesenheit freier Salpetersäure ist ja bei der Herstellung der Lösung zur Vermeidung von unlöslichen basischen Nitraten notwendig) die Fällung basischer Verbindungen ausgeschlossen erscheint, aber es können durch die freie Salpetersäure, die ja sowohl oxydierend wie auch — besonders auf die Disaccharide und gepaarten Glukuronsäuren — invertierend wirken kann, in anderer Hinsicht Fehler entstehen. Vielleicht würde es sich empfehlen, Bleiacetat wie bisher zur Klärung zu benutzen, aber stets für saure Reaktion der Flüssigkeit zu sorgen, indem man einige ccm verdünnte Essigsäure hinzufügt. Die Essigsäure wirkt als eine sehr schwache, wenig dissoziierte Verbindung nur wenig lösend auf die Niederschläge der Substanzen, die

<sup>1)</sup> Pellet, Bull. Assoc. des chim. **14**, 28; vergl. auch Brücke, Ber. Wien. Akad. **89**, 10.

<sup>2)</sup> Macquaire, Journ. de pharm. [V] **18**, 197. Lobry de Bruyn, Ztschr. Zuckerind. **46**, 69 u. **47**, 102f.

<sup>3)</sup> Vergl. Lippmann, Zuckerarten S. 552 u. 553, Bleiglykosate.

<sup>4)</sup> Siehe Denigès, Ber. des V. internat. Congr. f. angew. Chem. Berlin 1903. Band **4**, S. 130.

entfernt werden sollen, sie verhindert aber die Bildung basischer unlöslicher Verbindungen und wirkt nur äußerst langsam in der Kälte invertierend<sup>1)</sup>, ferner erscheint eine Oxydation bei Zusatz dieser Säure natürlich ausgeschlossen.

Daß es sich bei der Bildung löslicher Bleialkalizuckerverbindungen keineswegs etwa um nur geringe Drehungsbeeinflussungen handelt, soll im folgenden gezeigt werden, wo die Einwirkung alkalischer Bleilösung auf das Drehungsvermögen der Glukose, der Fruktose, Galaktose, Maltose, Laktose, der  $\beta$ -Oxybuttersäure, einiger gepaarten Glukuronsäuren, sowie auf zwei Glukoside beschrieben ist. Wenn auch bei der Analyse des Harns bei vorsichtig bemessenem Bleiacetatzusatz derartig außerordentliche Drehungsveränderungen, und zwar sowohl Drehungssteigerung wie Drehungsumkehrung, selten in der Praxis vorkommen dürften, so erscheinen doch vielleicht den Lesern dieser Zeitschrift die folgenden Versuche<sup>2)</sup> von Interesse, da sie auch auf die chemische Seite der hier in Betracht kommenden Reaktionen einiges Licht werfen.

Ferner möchte ich darauf aufmerksam machen, daß man in einer alkalischen Bleilösung ein Mittel besitzt, um häufig die Drehungsgröße aktiver Verbindungen erheblich zu steigern, was bei der Charakterisierung besonders von für sich nur schwach aktiven Hydroxylverbindungen von Bedeutung erscheint. Bisher hat man zu diesem Zwecke sich meist nur des Bleiacetats ohne Alkalizusatz bedient.

Die Arbeitsweise, deren ich mich bei dieser Untersuchung stets bediente, war die folgende. Zu einer bestimmten Menge Lösung der optisch aktiven Substanz wurde eine bekannte Menge Bleiacetat in steigenden Mengen hinzugefügt. Hierauf wurde Natronlauge zugegeben, wodurch zuerst weiße Niederschläge entstanden, die sich in überschüssiger Lauge beim Schütteln leicht lösten. Die Menge des freien Alkalis wurde möglichst gering bemessen, um die Anwesenheit größerer Überschüsse an Base zu vermeiden, da diese nach den Unter-

---

<sup>1)</sup> Das Verhältnis der Inversionskonstanten ist 100 : 0,400. Ostwald, Journ. prakt. Chem. [II] 29, 385.

<sup>2)</sup> Vergl. auch H. Großmann, Ztschr. Zuckerind. 55, 651 u. 940. 1905.

suchungen von Lobry de Bruyn und van Ekenstein<sup>1)</sup> in komplizierter Weise auf die Zucker einwirkt. Bleihydroxyd löst sich ja bekanntlich bei Gegenwart von Zuckern und ähnlichen Verbindungen viel leichter in Alkali auf als aus reinen Bleilösungen gefälltes, was auf die Bildung von Bleialkaliverbindungen schließen läßt, in denen die Hydroxylgruppen ganz oder teilweise durch Blei ersetzt sind. Die alkalischen Lösungen sind nicht sehr beständig, ihre Rotation ändert sich mit der Zeit, jedoch verschieden bei den einzelnen Verbindungen.

Zur Untersuchung diente mir ein Landolt-Lippischer Polarisationsapparat von Schmidt und Haensch. Die wie oben erwähnt hergestellten Lösungen wurden stets mit Wasser auf 20 ccm aufgefüllt. Es sei noch erwähnt, daß die Lösungen der multirotierenden Zuckerarten vorher zur Beseitigung der Multirotation kurze Zeit erhitzt worden waren.

Tabelle I.

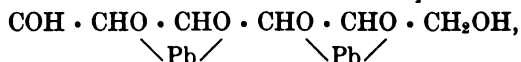
Einwirkung von Bleiacetat auf Glukose bei Gegenwart von Natronlauge.

	I 100 ccm = 8,0895 g C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>			II 100 ccm = 19,811 g Pb(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> + 3 H <sub>2</sub> O			III 100 ccm = 17,470 g NaOH		
	t = 16°			l = 2 dcm					
	I	II	III	α <sub>D</sub>	[α] <sub>D</sub> <sup>16</sup>				
	ccm	ccm	ccm		bezogen auf C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>				
I	2	—	—	+ 0,42°	+ 52,0				
II	2	1	1	+ 0,37°	+ 45,7				
III	2	2	1	+ 0,70°	+ 86,5				
IV	2	3	1,4	+ 0,84°	+ 103,8				
V	2	4	3	+ 1,10	+ 136,0* Ma				
VI	2	5	4	+ 1,08	+ 133,5				
VII	2	6	6,5	+ 1,08	+ 133,5				
VIII	2	7	8	+ 1,07	+ 132,3				
IX	2	8	10	+ 1,06	+ 131,0				

Aus dieser Tabelle ergibt sich, daß durch alkalische Bleilösung eine sehr beträchtliche Erhöhung der Rotation von Glukose erzielt wird. Die abgelesenen Winkel bezeichnen nur die möglichst schnell beobachteten Anfangsdrehungen. Nach einiger Zeit nimmt besonders in den bleireichen Lösungen die

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

Drehung wieder ab, ohne jedoch, selbst nach 24 Stunden, auf den Anfangswert für die spezifische Drehung der reinen Glukose herabzusinken. Nach 15 Minuten wurde für Lösung V  $\alpha_D = +0,95^\circ$  beobachtet, woraus sich  $[\alpha]_D = +117,4$  ergibt. Aus dem anfänglichen Ansteigen und nachherigen fast Konstantbleiben der Drehung auf weiteren Zusatz von Blei und Alkali ergibt sich die wahrscheinliche Anwesenheit einer Komplexverbindung



in welcher 4 Atome Wasserstoff durch 2 Bleiatome ersetzt sind.

Ganz ähnliche Drehungssteigerungen ergeben sich auch, wenn man Bleiacetat durch Bleinitrat ersetzt.

Noch merkwürdiger ist das Verhalten der an sich links drehenden Fruktose, welche neben der Glukose im Harn der Diabetiker sowie in manchen Körperflüssigkeiten auftreten kann und die unter Umständen die Rechtsdrehung gleichzeitig vorhandener Glukose vollständig verdecken kann. Natürlich muß die Beurteilung solcher Harne mit großer Vorsicht geschehen, da außerdem nicht selten andere linksdrehende Verbindungen, wie gepaarte Glukuronsäuren, vorhanden sind.

Gegen Alkali ist die Fruktose ebenfalls sehr empfindlich, ebenso gegen Bleiessig, der, wie zuerst Gill<sup>1)</sup> gefunden hat, in größeren Mengen Übergang von Links- in Rechtsdrehung bewirken kann. Auch durch Zusatz von Blei und Alkali wird die Linksdrehung leicht in Rechtsdrehung umgekehrt, wie sich aus der folgenden Tabelle ergibt.

Tabelle II.

Einwirkung von Bleiacetat auf Fruktose bei Gegenwart von Natronlauge.

I	100 ccm	= 11,75	g	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		
II	100 "	= 19,811	Pb	$(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 + 3 \text{H}_2\text{O}$		
III	100 "	= 17,47	NaOH			
		$l = 1$	dc		$t = 17^\circ$	
	I	II	III	$\alpha_D$	$[\alpha]_D^{17}$	
	ccm	ccm	ccm		bezogen auf $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}$	
	I	2	—	—	1,18°	— 92,6
	II	2	0,5	0,3	— 0,80°	— 62,7
	III	2	1	0,5	— 0,59°	— 46,3

<sup>1)</sup> Americ. chem. Journ. 1871, 167.



	I	II	III	$\alpha_D$	$[\alpha]_D^{17}$ bezogen auf $C_6H_{12}O_6$
	ccm	ccm	ccm		
IV	2	1,5	0,6	- 0,24°	- 18,0
V	2	1,75	0,7	- 0,08°	- 6,3 U
VI	2	2	0,7	+ 0,15°	+ 11,5
VII	2	2,5	0,9	+ 0,37°	+ 29,0
VIII	2	3	1	+ 0,56°	+ 43,9
IX	2	3,5	1,1	+ 0,81°	+ 63,5
X	2	4	1,25	+ 0,85°*	+ 66,7 * Ma
XI	2	4,5	1,5	+ 0,74°	+ 58,0
XII	2	5	1,7	+ 0,61°	+ 47,8
XIII	2	5,5	1,8	+ 0,52°	+ 40,8
XIV	2	6	2	+ 0,36°	+ 28,2
XV	2	6	2,2	+ 0,08°	+ 6,3 U
XVI	2	6,5	2,5	- 0,10	- 7,8
XVII	2	7	3	- 0,20	- 15,7
XVIII	2	8	4	- 0,34	- 26,7
XIX	2	9	5	- 0,38	- 29,1
XX	2	10	6	- 0,39	- 30,6

Das Auftreten eines Maximalpunktes der Rechtsdrehung bei dem Molekularverhältnis  $2 C_6 H_{12} O_6 : 3 Pb(C_2 H_3 O_2)_2$  und die hierauf stattfindende Bildung bleireicherer linksdrehender Komplexe zeigt, daß in Lösung sicher verschiedene Bleifruktosate existieren. Auch hier nimmt bei längerem Stehen, jedoch langsamer, die Rechtsdrehung ab.

Eine invertierte Rohrzuckerlösung zeigte die nach obigen Versuchen mit Glukose und Fruktose zu erwartende Drehungsänderung von links nach stark rechts und das Auftreten eines Maximalpunktes; in den bleireicheren Lösungen tritt jedoch infolge der Anwesenheit des stark rechtsdrehenden Bleiglukosats nicht wie bei der Fruktose Linksdrehung auf<sup>1)</sup>.

Die Galaktose tritt zwar nur selten unter den Produkten des Stoffwechsels auf. Ihr Verhalten gegen alkalische Bleilösung ist aber so interessant, daß es hier wiedergegeben sei. Galaktose ist noch erheblich empfindlicher gegen alkalische Bleilösung als Glukose. Es tritt sehr bald Linksdrehung auf, sämtliche Lösungen, besonders aber die alkalireichen, färben sich schnell gelb, wobei wieder Umkehrung und steigende Rechtsdrehung auftritt. Die in der Tabelle III angegebenen, möglichst schnell abgelesenen Anfangswerte haben deshalb nur relativen Wert.

<sup>1)</sup> Großmann, Ztschr. Zuckerind. 55, 945. 1905.

In der Tabelle IV ist der Einfluß der Zeit auf das Drehungsvermögen einmal einer alkalischen Galaktoselösung ohne, im anderen Falle mit Bleizusatz angegeben. Während im ersten Fall die Drehung mit der Zeit nur langsam sinkt, tritt diese Veränderung im zweiten sehr schnell ein. Bereits nach einer Viertelstunde besitzt die anfänglich linksdrehende Lösung erhebliche Rechtsdrehung. Weiterhin unterliegt eine solche Lösung der umlagernden Wirkung des freien Alkalis, welche die Wirkung wieder herabdrückt. Die Lösung färbt sich schließlich so dunkel, daß eine weitere Beobachtung nicht mehr möglich ist.

Tabelle III.

Einwirkung von Bleiacetat auf Galaktose bei Gegenwart von Natronlauge.

I	100 ccm = 8,364 g $C_6H_{12}O_6$
II	100 " = 20,115 " $Pb(C_2H_3O_2)_2 + 3 H_2O$
III	100 " = 17,47 " $NaOH$
	$l = 1$ dcm <span style="margin-left: 100px;"><math>t = 17^\circ</math></span>

	I	II	III	$\alpha_D$	$[\alpha]_D^{17}$	Bemerkungen
	ccm	ccm	ccm			
I	4	—	—	1,37	+ 82,0	
II	4	0,5	0,5	+ 1,00°	+ 58,9	
III	4	1	0,7	+ 0,75°	+ 44,9	} Die Rechtsdrehung nimmt mit der Zeit zu
IV	4	1,5	1	+ 0,44°	+ 26,3	
V	4	2	1,2	+ 0,25°	+ 15,0	
VI	4	2,5	1,5	+ 0,12°	+ 7,2	
VII	4	3	1,75	— 0,17°	— 10,2	
VIII	4	4	2,5	— 0,50°	— 29,9	nach 25 Minuten $\alpha_D = + 0,20^\circ$
IX	4	5	3	— 0,80°	— 47,9	" 10 " " = — 0,30°
X	4	6	4	— 0,98°	— 58,6	" 10 " " = — 0,60°
XI	4	7	6	— 0,99°	— 59,2	" 10 " " = — 0,40°
XII	4	8	8	— 1,05°	— 62,8	

Tabelle IV.

Einfluß der Zeit auf das Drehungsvermögen der Bleialkaligalaktosate.

I	100 ccm = 7,120 g $C_6H_{12}O_6$
II	100 " = 33,398 " $Pb(NO_3)_2$
III	100 " = 16,40 " $NaOH$
	$l = 2$ dcm <span style="margin-left: 100px;"><math>t = 22^\circ</math></span>

a) 4 ccm I und 2 ccm III auf 20 ccm verdünnt

t (Minuten)	$\alpha_D$	$[\alpha]_D^{22}$
5 farblos . . . . .	1,70°	59,7
10 " . . . . .	1,69°	

t (Minuten)	$\alpha_D$	$[\alpha]_D^{22}$
15 farblos . . . . .	1,68°	
30 schwach gelb . . . . .	1,66	
45 hellgelb . . . . .	1,64°	
150 gelb . . . . .	1,59	55,8

b) 4 ccm I, 2,5 ccm II, 3,5 ccm III auf 20 ccm verdünnt

b		
t (Minuten)	$\alpha_D$	$[\alpha]_D^{22}$
2 . . . . .	- 1,10°	- 36,7
3 . . . . .	- 0,88°	
4 . . . . .	- 0,78°	
5 . . . . .	- 0,73°	
7 . . . . .	- 0,54°	
10 . . . . .	- 0,24°	
13 . . . . .	- 0,02°	
15 . . . . .	+ 0,12°	
20 . . . . .	+ 0,35°	
25 . . . . .	+ 0,57°	
30 . . . . .	+ 0,72°	
35 . . . . .	+ 0,76°	
40 . . . . .	+ 0,80°	
50 . . . . .	+ 0,85°	
60 . . . . .	+ 0,90°	+ 31,6
20 Stunden dunkel . . . . .	+ 0,67°	

Von Disacchariden, die unter Umständen im Harn vorkommen können, habe ich die Laktose oder Milchzucker und die Maltose untersucht. Isomaltose dagegen stand mir leider nicht zur Verfügung.

Der Milchzucker wird durch alkalische Bleilösungen wie die Hexosen in seiner Drehungsrichtung umgekehrt. Es löst sich auf 1 Mol. Milchzucker 1 Atom Blei in alkalischer Lösung glatt auf, erheblich mehr wird nicht aufgenommen. Man erhält auch bei sehr großem Überschuß an freier Natronlauge dann nur stets trübe Lösungen. Natronlauge selbst setzt die Drehung auch bei Anwendung von größeren Überschüssen verhältnismäßig wenig herab. Die Lösungen bleiben längere Zeit unverändert und färben sich nicht so schnell gelb wie die Lösungen der Hexosen.

Tabelle V.

Einwirkung von Bleiacetat auf Milchezucker bei Gegenwart von Natronlauge.

	I	II	III	$\alpha_D$	$[\alpha]_D^{18}$
	I 100 ccm = 14,374 g $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$				
	II 100 " = 13,811 " Pb $(C_2H_3O_2)_2$				
	III 100 " = 17,47 " NaOH				
	l = 1 dcm		t = 18°		
	I	II	III	$\alpha_D$	$[\alpha]_D^{18}$
	ccm	ccm	ccm		
I	4	—	—	+ 1,50°	+ 51,9
II	2	0,5	0,5	+ 0,45°	+ 31,3
III	2	1	1	+ 0,12°	+ 8,5
IV	2	1,5	1	— 0,05°	— 3,5
V	2	2	1,5	— 0,34°	— 23,7
VI	2	2	3	— 0,75°	— 52,2
VII	2	2,5	2	— 0,58°	— 40,3
VIII	2	3,5	2,5	— 0,98°	— 68,2
IX	2	4	3	— 1,07°	— 75,4

Um zu zeigen, daß sich Bleinitrat ganz analog dem Acetat verhält, sei hier noch die folgende Tabelle VI wiedergegeben, welche den Einfluß verschiedener Konzentration auf die Drehung besser illustriert.

Tabelle VI.

Einwirkung von Bleinitrat auf Milchezucker bei Gegenwart von Natronlauge.

	I	II	III	$\alpha_D$	$[\alpha]_D^{16}$
	I 100 ccm = 18,00 g $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$				
	II 100 " = 33,398 " Pb $(NO_3)_2$				
	III 100 " = 16,40 " NaOH				
	l = 2 dcm		t = 16°		
	I	II	III	$\alpha_D$	$[\alpha]_D^{16}$
	ccm	ccm	ccm		
I	2	—	0,5	+ 1,66°	+ 46,1
II	2	—	1	+ 1,54°	+ 42,8
III	2	—	2	+ 1,52°	+ 42,2
IV	2	—	4	+ 1,46°	+ 40,6
V	2	0,5	3	+ 0,33°	+ 9,2
VI	2	1	3	— 0,78°	— 21,7
VII	2	1,5	3	— 1,38°	— 38,3
VIII	2	2	3	— 1,64°	— 45,6
IX	2	2	4	— 2,18°	— 59,2
X	2	2,5	5	— 2,40°	— 66,7

	I	II	III	$\alpha_D$	$[\alpha]_D^{16}$
	ccm	ccm	ccm		
XI	1	0,25	0,6	+ 0,45°	+ 25,0
XII	1	0,5	0,7	+ 0,10°	+ 5,6
XIII	1	0,75	1,25	- 0,26°	- 15,6
XIV	1	0,75	3	- 0,38°	- 21,1
XV	1	1	1,8	- 0,88°	- 49,3
XVI	1	1	3	- 1,07°	- 59,4
XVII	1	1,25	2,5	- 1,15°	- 63,9
XVIII	1	1,25	3	- 1,18°	- 65,6
XIX	1	1,25	5	- 1,25°	- 69,4

Auch die Maltose erleidet durch Blei und Alkali eine sehr erhebliche Veränderung, die für die spezifische Drehung etwa 200 Einheiten beträgt. Es tritt auch hier Umkehrung der Drehungsrichtung ein; wie bei Milchzucker scheint nur 1 Atom Blei in das Maltosemolekül zu treten, denn auch hier steigt bei weiterem Bleizusatz die zur Erzielung klarer Lösungen notwendige Menge Alkali sehr erheblich. Auch der Einfluß der Zeit macht sich in derartigen Lösungen stark bemerkbar. Vergl. Nr. 7, Tab. VII.

Tabelle VII.

Einwirkung von Bleiacetat auf Maltose bei Gegenwart von Natronlauge.

I	100 ccm =	4,177 g	$C_{12}H_{22}O_{11}$	+ $H_2O$	
II	100 "	= 20,115 "	$Pb(C_2H_3O_2)_2$	3 $H_2O$	
III	100 "	= 17,47 "	$NaOH$		
		$l = 1$ dem		$t = 16^\circ$	
	I	II	III	$\alpha_D$	$[\alpha]_D^{16}$
	ccm	ccm	ccm		
I	4	0,5	0,5	+ 0,82°	+ 97,9
II	4	1	0,75	+ 0,40°	+ 47,8
III	4	1,5	1,2	+ 0,06°	+ 7,2
IV	4	2	1	- 0,33°	- 39,4
V	4	2,5	1,8	- 0,46°	- 54,9*
VI	4	3	3	- 0,34°	- 40,6
VII	4	4	7,5	+ 0,22°	+ 26,3
		nach 18 Stunden		+ 0,44°	+ 52,5
IX	4	—	—	+ 1,16°	+ 138,1

Sehr interessant wäre noch eine Untersuchung des Glykogens und der Beeinflussung seiner Drehung durch alkalische Bleilösung.

Während Blei auch die Hydroxylwasserstoffe optisch aktiver Polyoxysäuren wie Wein- und Chinasäure leicht ersetzt<sup>1)</sup>, wobei ebenfalls Drehungssteigerungen und Umkehrungen beobachtet werden, tritt ein Ersatz bei Monooxysäuren wie Milchsäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure nur schwierig ein.

Bei der aktiven Milchsäure habe ich eine Veränderung durch alkalische Bleilösung überhaupt nicht beobachten können, während bei der  $\beta$ -Oxybuttersäure eine solche zu konstatieren war. Das zur Untersuchung gelangte Natriumsalz dieser Säure verdanke ich der Liebenswürdigkeit des Herrn Professor A. Magnus-Levy, Berlin, der selbst früher die drehungssteigernde Wirkung des reinen Bleiacetats auf diese Verbindung beobachtet hat<sup>2)</sup>. Überschüssiges Alkali löst den anfangs ausfallenden Niederschlag von Bleihydroxyd viel schwieriger als bei Gegenwart von Zucker auf und auch bei Anwendung eines recht beträchtlichen Überschusses von Lauge blieb ein merkbarer Niederschlag. Die filtrierte Lösung zeigte in einem Falle eine erhebliche Schwächung der Linksdrehung, im andern vollkommene Inaktivität. Der Zusatz von Bleiacetat allein bewirkt eine Steigerung der Linksdrehung und ist unter allen Umständen bei der Polarisation von Traubenzuckerlösungen zu berücksichtigen, da hierdurch ein erheblicher Mindergehalt von Glukose vorgetäuscht werden kann.

Tabelle VIII.

Einwirkung von Bleiacetat auf Natrium  $\beta$ -Oxybutyrat bei Gegenwart von Natronlauge.

I	100 ccm =	2,352 g $\text{CH}_3 \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COON}$
II	100 „ =	11,606 „ $\text{OC}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2)_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$
III	100 „ =	5,34 „ $\text{NaOH}$

$l = 2 \text{ dem}$

$t = 22^\circ$

I	II	III	$\alpha_D$	$[\alpha]_D$
5	—	—	— 0,16	— 13,6
5	2	—	— 0,28	— 23,8
5	1	3	+ 0	+ 0
10	4	—	— 0,48	— 20,4
10	1	4	— 0,10	— 3,4

<sup>1)</sup> Ztschr. Zuckerind. **55**, 956 ff. 1905.

<sup>2)</sup> Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakolog. **41**.

Von gepaarten Glukuronsäuren konnte ich durch die Liebenswürdigkeit von Prof. Neuberg die Urochloralsäure, ebenfalls in Form des Natriumsalzes, und die Euxanthinsäure untersuchen. Die Urochloralsäure zeigt nur eine sehr geringe Veränderung ihrer optischen Drehung.

Tabelle IX.

Einwirkung von Bleiacetat auf Urochloralsäures Natrium bei Gegenwart von Natronlauge.

I		II		III		$\alpha_D$	$[\alpha]_D$	
100 ccm	= 1,154 g	100 „	= 11,606 „	Pb (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )	3 H <sub>2</sub> O			
100 „	= 5,34 „			NaOH				
		l = 2 dcm				t = 22°		
I	II	III						
5	—	—			— 0,26		— 45,0	
5	2	—			— 0,26		— 45,0	
5	1	1			— 0,27		— 43,3	
5	2	2			— 0,25		— 46,7	
5	3	mit überschüssigem NaOH keine klare Lösung.						

Von der Euxanthinsäure, die bekanntlich eine stark gelbe Eigenfärbung besitzt, wurden 0,576 g in 3 ccm NaOH 100 ccm = 10,68) gelöst und auf 50 ccm verdünnt. Die ziemlich dunkel gefärbte Lösung, polarisiert im 2 dcm Rohr bei 4facher Verdünnung  $\alpha_D$ : — 0,40°  $[\alpha]_D$ : — 69,4; eine Lösung, welche außerdem noch 1 ccm Bleiacetat und 4 ccm NaOH von der bei der Urochloralsäure beschriebenen Konzentration enthielt, zeigte denselben Wert. Ein Zusatz von der doppelten Menge Bleisalz verbrauchte zur Lösung des anfangs ausfallenden Niederschlags eine große Menge Natronlauge 10 ccm. Die Drehung der filtrierten Lösung war etwas geringer  $\alpha_D$ : — 0,38°  $[\alpha]_D$ : — 66,7. Für die freie Euxanthinsäure selbst fanden Gräbe und Aders<sup>1)</sup>  $[\alpha]_D$ : — 110.

Die beiden untersuchten gepaarten Glukuronsäuren zeigen also nur eine geringe Beeinflussung ihrer optischen Aktivität durch alkalische Bleilösung. Dies hängt jedenfalls mit der ringförmigen Struktur, nach Neuberg und Neimann<sup>2)</sup> Glukosidbindung, dieser Substanzen zusammen.

<sup>1)</sup> Ann. 318, 345.

<sup>2)</sup> Ztschr. f. physiolog. Chem. 44, 114. 1905.

Ähnlich wie die gepaarten Glukuronsäuren verhalten sich nun die eigentlichen Glukoside, von denen ich zwei, das  $\alpha$ -Methylglukosid, das ich ebenfalls Herrn Professor C. Neuberg verdanke, und Salicin, welches von Kahlbaum bezogen wurde, untersucht habe.

Tabelle X.

Einwirkung von Bleiacetat auf  $\alpha$ -Methylglukosid bei Gegenwart von Natronlauge.

I	100 ccm =	6,580 g	$C_6H_{10}O_5 \cdot O \cdot CH_3$	
II	100 „ =	11,606 „	$Pb(C_2H_3O_2)_2 \cdot 3 H_2O$	
III	100 „ =	5,34 „	NaOH	
	$l = 2$ dcm		$t = 22^\circ$	
I	II	III	$\alpha_D$	$[\alpha]_D$
5	—	—	5,24	159,3
2,5	4	—	2,64	160,5
2,5	—	2	2,64	160,5
2,5	4	4	2,63	— 159,9
2,5	6	6	2,63	— 159,9

Tabelle XI.

Einwirkung von Bleiacetat auf Salicin bei Gegenwart von Natronlauge.

I	100 ccm =	3,940 g	$C_{13}H_{18}O_7$	
II	100 „ =	11,606 „	$Pb(C_2H_3O_2)_2 \cdot 3 H_2O$	
III	100 „ =	5,34 „	NaOH	
	$l = 2$ dcm		$t = 21^\circ$	
I	II	III	$\alpha_D$	$[\alpha]_D$
4	—	—	— 0,98	— 64,4
4	2	—	— 1,02	— 66,8
4	—	2	— 1,00	— 65,6
4	2	4	— 1,02	— 66,8
4	4	10	— 1,02	— 66,8

Beide Glukoside zeigen demnach bemerkenswerterweise nur eine geringe Beeinflussung des Drehungsvermögens gegen alkalische Bleilösung wie gegen neutrales Bleiacetat.

#### Zusammenfassung.

Es wurde gezeigt, daß alkalische Bleilösung auf das Drehungsvermögen von Zuckern verschiedener Natur stark einwirkt, wobei sowohl Erhöhung wie Umkehrung beobachtet wird, während  $\beta$ -Oxybuttersäure verhältnismäßig schwach, Milchsäure,



gepaarte Glukuronsäuren und Glukoside fast gar nicht beeinflusst werden.

Für die praktische Analyse des Harns und die Körpersäfte auf polarimetrischem Wege ergibt sich demnach die Vorschrift, unter keinen Umständen alkalisch-reagierende Flüssigkeiten mit Bleiacetat oder gar mit Bleiessig zu klären, sondern mindestens Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaktion hinzuzufügen. Hierdurch werden jedenfalls eine Reihe von prinzipiellen Fehlerquellen vermieden. Eine genaue chemische Untersuchung der einzelnen optisch aktiven Bestandteile ist natürlich auch bei der vorgeschlagenen Klärungsmethode unentbehrlich.

Wissenschaftl. chem. Institut. Berlin N. August 1906.

---

## **Über Beobachtungen reversibler Veränderungen an Toxinen.**

Von

**J. Morgenroth und D. Pane.<sup>1)</sup>**

*(Eingegangen am 2. August 1906.)*

Der Nachweis chemischer Veränderungen von Toxinen läßt sich bis jetzt nur mittels zweier Methoden führen, einer rein biologischen und einer zweiten, die man als chemisch-biologische bezeichnen kann. Die biologische Methode begreift die vergleichende Untersuchung der veränderten und unveränderten Toxine in ihren Beziehungen zum tierischen Organismus (Toxizität und Antikörperbildung) oder zu isolierten Zellen (Reagensglasversuch); die biologisch-chemische Methode untersucht das Verhalten des veränderten und unveränderten Toxins zum Antitoxin und läuft in letzter Linie wiederum auf die biologische Untersuchung des Toxins hinaus. Da Methoden zur chemischen Konstitutionsbestimmung der Toxine nicht existieren, läßt sich über die Qualität der durch verschiedene Eingriffe hervorgerufenen Veränderungen der Toxine im allgemeinen wenig auf Grund rein chemischer Vorstellungen aussagen, es dienen vielmehr nach dem Vorgang von Ehrlich Hypothesen zur Grundlage der Betrachtung, die wiederum chemisch-biologischer Art sind, die sozusagen eine erste Annäherung an exaktere strukturchemische Vorstellungen bilden. Die Fermentforschung befindet sich in einer ähnlichen Lage, vielleicht um weniges günstiger. Setzt man die spezifische Fermentwirkung in Analogie

---

<sup>1)</sup> Die Versuche wurden im Kgl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. begonnen und im Berliner Pathologischen Institut weitergeführt.

mit der spezifischen Toxinwirkung, so ist dort eine Beziehung der Fermente zu der Konfiguration des Substrates, wenigstens bei gewissen Gruppen, durch Emil Fischers Vorgang hergestellt, die hier noch fehlt, indem man auf Differenzen des Substrates der Toxinwirkung, des „Protoplasmas“, nur ganz allgemein schließen kann aus dessen funktioneller Verschiedenheit in den jeweils vom Toxin angegriffenen Zellbezirken<sup>1)</sup>.

Man spricht seit langem von der hochgradigen „Labilität“ der Toxine. Darunter versteht man ein Verhalten, welches sich darin äußert, daß Toxinlösungen ihre charakteristischen Eigenschaften ganz oder zum Teil verlieren, wenn sie gewissen thermischen (schon mäßige Temperaturerhöhungen) oder chemischen (Säuren, Alkali, Oxydationsmittel) Einwirkungen unterworfen werden. Geht die Giftwirkung zu Verlust, während die eng miteinander koordinierten Fähigkeiten, Antitoxin zu binden und Antitoxinbildung auszulösen, erhalten bleiben, so bezeichnet man auf Grund der Ehrlichschen Theorie den Vorgang als Toxoidbildung. Wenn aber das Toxin durch den Eingriff für unsere Methoden überhaupt nicht mehr nachweisbar wird, dann hat nach dem üblichen Sprachgebrauch eine „Zerstörung“ des Toxins stattgefunden.

Es ist klar, daß mit dem Ausdruck „Toxinzerstörung“ sehr wenig ausgesagt ist. Ob hier wirklich ein weitgehender Zerfall des Toxinmoleküls stattfindet, ob nur irgend eine mehr oder

<sup>1)</sup> Daß es trotz dieser schmalen Basis, auf der die chemische Erforschung der Toxine noch steht, nicht ausgeschlossen ist, durch bestimmte Eingriffe zu präziseren Vorstellungen über Art und Ort chemischer Veränderungen der Toxine zu gelangen, darauf weisen neuere Untersuchungen von Obermeyer und Pick (Wien. klin. Wochenschr. 1906, Nr. 12) hin. Diese Autoren haben auch die Bedeutung ihres Verfahrens für das Studium der Toxine durchaus erkannt, sie mußten sich aber aus technischen Gründen auf Antigene anderer Art, nämlich die präzipitablen Substanzen, beschränken. Sie behandelten die Lösungen dieser Substanzen nach Methoden, die zu einer Nitrierung, Jodierung oder Diazotierung (mit weiterer Bildung von Azoverbindungen) führen mußten, und untersuchten dann die Antikörperbildung durch diese modifizierten Antigene. Die so erzielten tiefgehenden qualitativen Veränderungen der biologischen Reaktion der Antigene, auf die hier nicht näher eingegangen werden kann, erlaubten den Schluß auf die wesentliche Bedeutung aromatischer Kerne für Zustandekommen und Richtung der Immunitätsreaktionen der präzipitablen Substanzen.

weniger eingreifende Umlagerung, läßt sich nicht feststellen. Eines haben die bis jetzt bekannten zahlreichen Veränderungen dieser Art gemeinsam: Sie sind anscheinend nicht reversibel. Nach Herstellung der ursprünglichen chemischen oder thermischen Bedingungen bleiben die gesetzten Veränderungen der Toxine bestehen. Ein durch Alkalizusatz unwirksam gewordenes Tetanusgift, ein durch Aufkochen der Lösung wirkungslos gewordenes Diphtheriegift gewinnt nach Neutralisation der Lösung durch Säure, resp. nach Abkühlung derselben seine Toxineigenschaften nicht wieder.

Die Betrachtung der Vorgänge, wie sie sich bei den eben erwähnten Eingriffen, sowie bei der Toxoidbildung abspielen, die fruchtbaren theoretischen Vorstellungen über die Bindung der Toxine an die Zelle und ihre Giftwirkung, sowie über die Bindung an die Antitoxine ließen es bis jetzt als genügend erscheinen, wenn man das Toxinmolekül gleichsam als einen starren Bau betrachtete, aus dem ein einzelner Teil herausgebrochen werden (Toxoidbildung) oder der sozusagen ganz in Trümmer geschlagen („Zerstörung“) werden kann. Intramolekulare Umlagerungen, wie sie die Strukturchemie in immer höherem Maß als Erklärungsprinzip in Anspruch nimmt, kamen bisher auf dem Toxingebiet kaum in Betracht.

Zur Annahme derartiger intramolekularer Umlagerungen — über deren Natur an dieser Stelle keinerlei Vermutungen aufgestellt werden sollen — wird man erst dann geführt, wenn reversible Veränderungen in Toxinlösungen hervorgebracht werden können. Eine derartige Erscheinung ist von dem einen von uns für die beiden Komponenten des Cobragiftes, das Hämolyysin und das Neurotoxin, beschrieben worden<sup>1)</sup>. Es handelt sich um die Beobachtung, daß unter dem Einfluß geringer Salzsäurekonzentrationen diese Toxine in eine Modifikation übergeführt werden, die nicht mehr fähig ist, mit dem spezifischen Antitoxin zu reagieren, so zwar, daß nicht nur die Verbindung mit dem Antitoxin in saurer Lösung unterbleibt, sondern auch die eingetretene Verbindung wieder aufgehoben wird. Die Umwandlung ist als vollkommen reversibel gekennzeichnet, indem nach nicht zu langer Einwirkung der Säure

<sup>1)</sup> Morgenroth, Berlin. klin. Wochenschr. 1905, No. 50 u. Arbeiten aus dem Patholog. Institut zu Berlin, Berlin, Hirschwald 1906.

durch Abstumpfen derselben rasch der ursprüngliche Zustand des Toxins, insbesondere seine Fähigkeit, mit dem Antitoxin zu reagieren, wieder zurückkehrt.

Schon längere Zeit vor diesen Beobachtungen waren wir bei Studien über das Hämolyisin des Cobragiftes auf Erscheinungen aufmerksam geworden, die zweifellos gleichfalls in das Gebiet der reversiblen Toxinumlagerungen fallen. Die Bedingungen für ihr Zustandekommen sind weit weniger gut definiert, als in dem oben erwähnten Fall, und es ist nicht möglich, sie in so regelmäßiger Weise wie in diesem zustande zu bringen. Das Phänomen selbst ist aber so eklatant und durch eine Modifikation des ursprünglichen Verfahrens immerhin in der Mehrzahl der Fälle so sicher hervorzurufen, daß angesichts seiner prinzipiellen Bedeutung eine Mitteilung gerechtfertigt ist. Wir bezweifeln nicht, daß Vorgänge ähnlicher Art, wenn erst einmal die Aufmerksamkeit darauf gerichtet ist, auf dem Toxingebiet noch öfter zur Beobachtung kommen und eine erhebliche Bedeutung gewinnen werden.

Daß es sich nicht um einen singulären Fall handeln dürfte, sondern daß hier Erscheinungen von prinzipieller Wichtigkeit und größerer Verbreitung vorliegen, dafür spricht auch die Existenz einer den unsrigen entsprechenden Beobachtung, die Pawlow und Parastschuk<sup>1)</sup> am Pepsin gemacht und mit der Aussicht auf eine weitere eingehende Untersuchung in ihrer bekannten Arbeit über die Identität des Pepsins und des Labs mitgeteilt haben.

„Wir sahen das Ferment unter Einwirkung der alkalischen Reaktion aus dem tätigen in einen untätigen, latenten Zustand übergehen, wobei die umgekehrte Umwandlung, der Übergang aus dem latenten in den tätigen Zustand, längere Zeit dauernde neutrale Reaktion des Mediums erfordert.“

Diese Erscheinung entspricht in ihrem Wesen offenbar unseren Beobachtungen, von denen zuerst diejenigen, die sich auf das Hämolyisin des Cobragiftes beziehen, mitgeteilt seien.

Nach Beobachtungen von Kyes und Sachs<sup>2)</sup>, die wir vielfach bestätigt fanden, wird das Cobra-Hämolyisin, das in

---

<sup>1)</sup> Ztschr. f. physiol. Chem. **42**. 1904.

<sup>2)</sup> Berlin. klin. Wochenschr. **1903**, Nr. 2—4.

neutraler Lösung auf 100° erhitzt rasch seine Wirkung verliert, in saurer Lösung in erheblichem Maße kochbeständig.

Unsere eigentümlichen Befunde bestehen nun in folgendem: Erhitzt man Cobragift in einer Lösung, die etwa  $\frac{n}{20}$  HCl enthält, längere Zeit, und prüft man seine hämolytische Wirkung unmittelbar nach Abkühlung und Neutralisation der Säure in der üblichen Weise, so beobachtet man eine Verringerung der hämolytischen Wirksamkeit, die sehr wechselnd sein kann und von der Dauer des Erhitzens nicht in klarer Weise abhängig ist, die aber einen sehr hohen Grad erreichen kann. Läßt man nun eine derartige neutralisierte Lösung einige Tage bei Zimmer-temperatur oder im Eisschrank stehen und prüft dann ihre hämolytische Wirkung von neuem, so beobachtet man in einer Anzahl von Fällen das überraschende Resultat, daß die hämolytische Wirkung wieder stärker geworden, ja in ihrer ursprünglichen Stärke zurückgekehrt ist. Die Mitteilung eines derartigen Versuchs wird den Vorgang ohne weiteres veranschaulichen.

Eine Lösung von Cobragift 1%, Verdünnung 1:10, mit einem Gehalt von  $\frac{n}{20}$  HCl wird im siedenden Wasserbad erhitzt, und zwar A 1 Stunde, B 2 Stunden lang. Nach dem Kühlen mit NaOH neutralisiert. Sofort nach der Neutralisation wird mit 0,2 Lecithin 1%  $\frac{1}{10}$  eine Bestimmung der hämolytischen Wirkung an Ochsenblut vorgenommen. Die Lösungen bleiben 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen und werden dann von neuem auf ihre hämolytische Wirkung geprüft. Jedesmal Kontrolle (C) mit genuinem Cobragift <sup>1)</sup>.

#### I. Sofort nach Neutralisation.

A.		B.		C.	
1. 0,5	$\frac{1}{1000}$ komplet	1. 1,0	$\frac{1}{1000}$ komplet	1. 0,6	$\frac{1}{10000}$ komplet
2. 0,3	komplet	2. 0,7	komplet	2. 0,4	komplet
3. 0,2	mäßig	3. 0,5	fast komplet	3. 0,35	mäßig
4. 0,15	"	4. 0,3	wenig	4. 0,3	"
5. 1,0	$\frac{1}{10000}$ wenig	5. 0,2	"	5. 0,2	wenig
6. 0,5	Kuppe	6. 0,15	Kuppe	6. 1,0	$\frac{1}{100000}$ sehr wenig
		7. 1,0	$\frac{1}{10000}$ "	7. 0,8	" "
		8. 0,8	Spur	8. 0,5	Spur
		9. 0,6	0		

<sup>1)</sup> Die Versuchstechnik ist aus den Arbeiten von Kyes, Kyes und Sachs und Morgenroth zu ersehen. Eine Übersicht aller einschlägigen Arbeiten gibt H. Sachs, Biochem. Centralblatt 1906.

II. Nach 3 Tagen.

A.		B.		C.	
1. 0,4	$\frac{1}{10000}$ komplet	1. 0,3	$\frac{1}{1000}$ komplet	1. 0,4	$\frac{1}{10000}$ komplet
2. 0,35	ziemlich stark	2. 0,2	komplet	2. 0,35	komplet
3. 0,3	ziemlich	3. 0,15	mäßig	3. 0,3	mäßig
4. 0,2	wenig	4. 1,0	$\frac{1}{10000}$ "	4. 0,2	"
5. 0,15	sehr wenig	5. 0,6	sehr wenig	5. 0,15	"
				6. 0,8	$\frac{1}{100000}$ sehr wenig

Nach 1stündigem Kochen in saurer Lösung ist hier bei Prüfung unmittelbar nach der Neutralisation noch ca.  $\frac{1}{8}$  des ursprünglichen Hämolytins vorhanden, nach 2stündigem Erhitzen ca.  $\frac{1}{17}$ . Drei Tage später ist der Gehalt an Hämolytin im ersten Fall auf seine ursprüngliche Höhe, im zweiten Fall auf ca.  $\frac{1}{8}$  derselben, also beinahe wieder auf das Dreifache gestiegen. Die zur Grundlage dienenden Kontrollen zeigen die Resistenz der verwendeten Ochsenblutkörperchen.

Derartige Beobachtungen konnten in größerer Zahl gemacht werden. Wenn die Abschwächung weniger als  $\frac{9}{10}$  betrug, so war die Rückverwandlung nach 2—3 Tagen mehr oder weniger vollständig erfolgt; war die Abschwächung stärker, so war die Rückverwandlung meist geringfügig, blieb auch häufig ganz aus. Wurde kürzere Zeit als eine Stunde erhitzt, so war eine Abschwächung nicht zu beobachten.

Daß auch nach einer sehr erheblichen primären Abschwächung eine bedeutende und dabei ungemein rasch verlaufende Restitution des Giftes eintreten kann, zeigt folgender Versuch:

1%ige Lösung von Cobragift  $\frac{1}{10}$  Verdünnung in  $\frac{n}{20}$  HCl 90 Minuten im kochenden Wasserbad. Gekühlt und neutralisiert. Prüfung auf Ochsenblut mit Lecithin 1% 0,2  $\frac{1}{10}$ . Kontrolle (C) mit genuinem Cobragift.

I. Sofort nach Neutralisation.

1. 1,0	$\frac{1}{10}$ komplet	3. 0,25	komplet
2. 0,5	"	4. 0,1	0

II. 4 Stunden später.

1. 0,5	$\frac{1}{1000}$ komplet	6. 1,0	$\frac{1}{10000}$ mäßig
2. 0,35	"	7. 0,75	wenig
3. 0,25	"	8. 0,5	"
4. 0,2	komplet	9. 0,25	Kuppe
5. 0,15	fast komplet	10. 0,1	minimal

C.			
1,0 $\frac{1}{100000}$	komplet	0,25	wenig
0,75	fast komplet	0,2	"
0,5	wenig	0,15	minimal
		0,1	"

In diesem Fall ist die Abschwächung, bei der nur  $\frac{1}{250}$  der ursprünglichen Hämolsinmenge erhalten geblieben war, schon im Laufe von 4 Stunden bei Zimmertemperatur derart zurückgegangen, daß wieder 12mal so viel Toxin manifest war, als unmittelbar nach dem Erhitzen. Der Vergleich dieses Versuches mit dem vorher beschriebenen zeigt deutlich das Fehlen einer klaren Abhängigkeit des Giftverlustes von der Dauer der Einwirkung der verändernden Faktoren. Während dort nach 2 Stunden noch  $\frac{1}{17}$  der ursprünglichen Giftmenge nachweisbar war, ist hier nach  $1\frac{1}{2}$  stündigem Erhitzen nur mehr  $\frac{1}{250}$  vorhanden.

Nach Kyes und Sachs wird Cobragift, nach halbstündigem Erhitzen auf  $100^{\circ}$  gar nicht geschädigt, ist aber nach zweistündigem Erhitzen vollständig zerstört. Auch diese Beobachtung weist auf besondere Inkonsequenzen hin, indem ein derartiger Sprung durchaus nicht dem allmählichen Verlauf der gewöhnlichen Giftabschwächung entspricht.

Hätten wir uns mit der Untersuchung der Hämolyse unmittelbar nach der Neutralisation begnügt, so hätte man in dem Vorgang eine einfache „Abschwächung“ des Giftes sehen können. Die vollkommene Restitution des Giftes bei der späteren Untersuchung lehrt, daß hier ein völlig neuartiger Vorgang in Frage kommt: die Umwandlung des Giftes in eine ungiftige Modifikation und die Rückbildung derselben nach Herstellung der ursprünglichen Verhältnisse.

Man darf diese Rückbildung des Hämolsins in gewissem Sinne als eine spontane bezeichnen, als einen Vorgang, der wesentlich von den Gesetzen des chemischen Gleichgewichts beherrscht wird. Die fehlende Regelmäßigkeit der Erscheinung weist aber darauf hin, daß gewisse Bedingungen, die den Ablauf der Erscheinungen regeln und die offenbar erheblich variieren, noch unbekannt sind. Es erscheint durchaus nicht unstatthaft, hier die Mitwirkung katalytischer Einflüsse vorauszusetzen und zwar solcher, die die Umwandlungsgeschwindigkeit in beiden



Richtungen, in positivem oder negativem Sinne, beeinflussen. Unter der Voraussetzung, daß derartige Katalysatoren bei der Zurückverwandlung der ungiftigen Modifikation in das Toxin zur Wirkung kommen, gelangte man zu folgender Vorstellung über den Ablauf der Erscheinungen, die eine gewisse Grundlage für ein weiteres Eindringen in die hier vorliegenden Fragen geben dürften. Man kann sich vorstellen, daß durch Kochen der sauren Giftlösung eine Umwandlung in die ungiftige Modifikation stattfindet, die nach einer gewissen Zeit nahezu vollständig ist. Sowie die Lösung neutralisiert ist, sind wieder die Bedingungen für die Existenz der ursprünglichen, giftigen Form gegeben und es setzt nun die Rückbildung derselben ein, durch die vorauszusetzenden katalytischen Einflüsse beschleunigt, resp. gehemmt. Auf alle Fälle verläuft die Umwandlung im Anfang relativ rasch. Stellt man also sofort nach der Neutralisation den hämolytischen Versuch an, so zeigt dessen Resultat nicht etwa das Maß der ursprünglichen Umwandlungen, sondern die Hämolytinquote, die beim Beginn des Versuches oder auch noch in dessen Verlauf zurückgebildet worden ist. Die im Laufe des hämolytischen Versuches selbst rückgebildete Menge dürfte wegen der starken Verdünnung relativ gering sein. Die weitere Umsetzung verläuft immer langsamer und erreicht unter Umständen erst nach Tagen ihr Ende. Sind die positiv katalytischen Einflüsse bedeutend, so kann ein völliges Ausbleiben der Umwandlung in die ungiftige Modifikation vorgetäuscht werden. Die verschieden starke Abschwächung durch gleich langes Kochen in verschiedenen Fällen wäre also nur eine scheinbare, beruhend auf der sehr differenten Geschwindigkeit bei der Restitution des Hämolytins. Diese oder ähnliche Betrachtungsweisen zieht man bis auf weiteres wohl mit Recht zur Erklärung der ungleichen Resultate heran. Hierzu kommt noch ein weiterer, die Versuche erschwerender Umstand. Die reversible ungiftige Modifikation stellt offenbar nur ein Zwischenprodukt in einer Umwandlungsreihe dar, die bei einer dauernd ungiftigen, nicht mehr reversiblen Modifikation endigt. Denn dies geht, wie schon erwähnt, aus zahlreichen Versuchen hervor, daß länger anhaltendes Kochen, über 2—3 Stunden hinaus, störend auf das Phänomen einwirkt. Man hat es also nicht in der Hand, gerade im günstigsten Moment den Versuch abzubrechen, in

dem möglichst viel von dem Hämolsin in die reversible Modifikation umgewandelt, aber möglichst wenig von dieser weiter (wohl zu Toxoiden sensu strictiori)<sup>1)</sup> verändert ist.

Die Rücksicht auf diesen letzteren Umstand veranlaßte uns, nach einer schonenderen Prozedur zu suchen und womöglich die schädigenden Einflüsse hoher Temperaturen zu vermeiden. Zugleich ging unser Bestreben dahin, eine Versuchsanordnung zu treffen, welche die Störung durch eine rasche Rückverwandlung der unwirksamen Modifikation während des hämolytischen Versuchs nach Möglichkeit ausschaltet. Wenn man bedenkt, daß die Lecithidbildung, die Vereinigung von Cobragift und Lecithin im Laufe des hämolytischen Versuchs, bei der oben gewählten Prüfungsmethode eine sehr erhebliche Zeit in Anspruch nimmt, so kann gerade in dieser Periode eine Rückverwandlung die Resultate in ungünstiger Weise beeinflussen. Es gelang uns auch, in der Einwirkung der Säure bei niederer Temperatur durch einen längeren Zeitraum und Benutzung des fertigen Lecithids an Stelle des Cobragiftes mit Lecithinzusatz eine Versuchsanordnung zu finden, die regelmäßigere sehr übersichtliche Resultate gibt. Die Beurteilung geht hier nicht von dem absoluten Grad der Hämolyse aus, sondern berücksichtigt besonders den zeitlichen Verlauf derselben. Da die Hämolyse durch größere Mengen fertig gebildeten Cobralecithids fast momentan eintritt, so äußert sich das Bestehen der unwirksamen Modifikation zunächst in dem anfänglichen Ausbleiben der Hämolyse, die allmähliche Rückverwandlung läßt sich aber an deren nachträglichem Eintritt beobachten und sogar zeitlich messend verfolgen. Die folgenden Versuchsbeispiele illustrieren das Verfahren ohne weiteres.

Ein Gemisch von Cobragift 1 % Verdünnung 1 : 200, 4,0 ccm + Lecithin 5 % in Methylalkohol 0,4 ccm +  $\frac{n}{1}$  HCl 0,12 ccm bleibt 6 Tage im Eisschrank. Hierauf wird neutralisiert, verschiedene Giftmengen werden sofort auf je 1 ccm Kaninchenblut 5 % aufgegossen; der Verlauf der Hämolyse bei Zimmertemperatur beobachtet. Blut frisch vom Eis.

- |        |   |
|--------|---|
| 1. 1,0 | } nach 26 Min. stark, nach 36 Min. komplet; |
| 2. 0,5 |   |

<sup>1)</sup> S. Flexner u. Noguchi, Univ. of Penna. Medical Bulletin, Nov. 1902.

3. 0,25 nach 26 Min. geringe Aufhellung, nach 35 Min. stärker, nach 1 Stunde 14 Min. wohl komplet;
4. 0,15 nach 47 Min. geringe Aufhellung, nicht fortschreitend; nächster Tag komplet.
5. 0,1 nach 1 Stunde 10 Min. geringe Aufhellung, am nächsten Tage komplet;
6. 0,05 unverändert, erst am nächsten Tage fast komplet;
7. 0 0.

Das neutralisierte Gemisch bleibt über Nacht bei Zimmertemperatur stehen, am nächsten Morgen zum selben Blut, das bis dahin auf Eis gelegen hat, zugesetzt.

1. 0,25 nach höchstens 2 Min. komplet;
2. 0,1 nach einigen Minuten komplet;
3. 0,05 beginnt bald Aufhellung, nach 4 Std. nicht komplet, nächsten Morgen stark.

Es werden folgende Gemische hergestellt:

- I. 20,0 Cobragift 1% Verdünnung 1 : 100 + 6,0 Lecithin 10% in Methylalkohol + 1,0  $\frac{n}{1}$  HCl,
- II. 20,0 „ 1% Verdünnung 1 : 100 + 6,0 Lecithin 10% + 0,4  $\frac{n}{1}$  HCl.

Die Gemische bleiben 9 Tage im Eisschrank, werden dann neutralisiert (Lackmuspapier und Phenolphthalein) und ohne weiteren Lecithinzusatz geprüft mit Kaninchenblut 5% 1,0. Immer Blut vom gleichen Kaninchen, für den letzten Versuch frisch aus der Ohrvene gewonnen. Die Versuchsreihen stehen 2 Stunden im Brutschrank bei 37° (öfters zur Beobachtung herausgenommen) und bleiben dann über Nacht im Eisschrank.

I.

	Sofort nach Neutralisation	Nach eintägigem Verweilen des neutralisierten Gemisches bei Zimmertemperatur
0,5	nach 20 Min. stark, nach 2 Std. komplet	nach 5 Min. komplet
1,0 $\frac{1}{10}$	} nach 2 Stunden komplet	} nach 45 Min. komplet
0,5		
0,25		
0,5 $\frac{1}{100}$	nach 2 Stunden nichts deutliches, nächsten Morgen komplet	nächsten Morgen komplet
0,25	nächsten Morgen wenig	am nächsten Morgen stark
0	0	0

## II.

	Sofort nach Neutralisation	Nach einem Tage	Nach 4 Tagen
0,5	nach 2 Std. stark, nächst. Morg. kompl.	nach 5 Min. komplet	sofort komplet
1,0 $\frac{1}{10}$	nach 2 Std. stark, nächst. Morg. kompl.	nach 45 Min. komplet	sofort komplet
0,5	nach 2 Std. stark, nächst. Morg. kompl.	nach 45 Min. komplet	nach 2 Std. komplet
0,25	nach 1½ Std. wenig, nächst. Morg. kompl.	nach 45 Min. stark, nächst. Morg. kompl.	nach 2 Std. komplet
0,5 $\frac{1}{100}$	nach 2 Std. 0, nächst. Morg. kompl.	nächst. Morg. kompl.	nächst. Morg. wenig, Kuppe
0,25	wenig	nächst. Morgen stark, Kuppe	0
0	0	0	0

Wir haben bei unseren nach diesem Verfahren angestellten Versuchen stets beobachtet, daß der Endeffekt der Hämolyse derselbe ist wie in den Kontrollproben mit unbeeinflusstem Gift, daß also durch die hier gewählten weniger eingreifenden Versuchsbedingungen die Bildung irreversibler Produkte vermieden werden kann und die Entstehung und Rückverwandlung der reversiblen Modifikation im zeitlichen Verlauf der Hämolyse klar zum Ausdruck kommt. Es mag sein, daß die Lecithidbildung zum Stabilerwerden des Giftmoleküls beiträgt, wie sie ja nach den Untersuchungen von Kyes an und für sich schon genügt, das Hämolysin kochbeständig zu machen.

Endlich sei noch über analoge Beobachtungen berichtet, die sich auf das Neurotoxin des Cobragifts beziehen. Auch hier ruft die Einwirkung der Salzsäure eine Umwandlung hervor, die der eben beschriebenen des Hämolysins offenbar in ihrem Wesen entspricht. Injiziert man Mäusen subkutan das Zehnfache der Dosis letalis von Cobragift, so sterben sie nach 12 bis 15 Minuten unter den bekannten Erscheinungen der Paralyse. Hält man dagegen eine Cobragiftlösung (1 % Verdünnung 1 : 10) mit einem Gehalt von  $\frac{n}{20}$  HCl während 14 Tage im Eisschrank, so findet man ihre Giftigkeit quantitativ erhalten, im Verlauf der Symptome aber eine wesentliche Differenz, indem eine Inkubationszeit auftritt, die am deutlichsten bei höheren Dosen erscheint. So tötet die zehnfache Dosis letalis nach ungefähr einer Stunde, hat also eine Latenzzeit, die 5mal größer ist, als die des

genuinen Giftes. Läßt man nun die neutralisierte Giftlösung weitere zwei Tage im Eisschrank stehen, so bleibt die Giftigkeit der Lösung dieselbe, der Verlauf der Intoxikation ist aber zu der ursprünglichen Norm zurückgekehrt und die Tiere, denen man die zehnfache Dosis letalis injiziert, sterben wieder im Verlauf von 12—15 Minuten.

Die vorstehenden Versuche, an welche sich dieselben Betrachtungen, wie an die hämolytischen Versuche knüpfen lassen, zeigen, daß es sich auch hier um eine reversible Umwandlung des Toxins handelt und daß sich das Neurotoxin des Cobragiftes wie in einigen anderen Beziehungen, so auch in seiner Wandlungsfähigkeit dem Cobrahämolysin analog verhält.

Dieses Verhalten des modifizierten Neurotoxins im Tierversuch beansprucht unseres Erachtens ein ganz besonderes theoretisches Interesse. Die Neurotoxine der Schlangengifte gehören zu den wenigen Toxinen, die keine oder nur eine sehr geringe Latenzzeit haben. Mehrfache Multipla der Dosis letalis töten in wenigen Minuten, ein Zeitraum, von dem bei subkutaner Injektion der Giftlösung noch ein Teil auf Rechnung der Resorptionszeit zu setzen ist. Die Versuche zeigen nun, daß durch die stattgehabte Umwandlung die Toxizität des Giftes als solche nicht vermindert ist, indem die Dosis letalis dieselbe geblieben ist. Dagegen hat das Toxin eine ausgesprochene Latenzzeit gewonnen. Der Vergleich mit den nach der zweiten Methode ausgeführten hämolytischen Versuchen drängt sich auf und hier wie dort muß auch zur selben Erklärung für die Latenzzeit gegriffen werden: Sie repräsentiert beim Neurotoxin den Zeitraum, der von der Injektion resp. Resorption und Bindung der unwirksamen Modifikation bis zur Restitution mindestens einer Dosis letalis des Toxins verstreicht.

Es liegt also hier eine Art der Latenzzeit vor, die eine wesentlich andere Erklärung erfordert, wie die bisher bei genuinen Toxinen beobachtete. Bekanntlich betrachtet Ehrlich die Latenzzeit der Toxine als das Intervall, das zwischen der Verankerung der haptophoren Gruppe des Toxins und dem Wirksamwerden der toxophoren Gruppe liegt, eine Auffassung, die der eine von uns durch besondere Versuche gestützt hat<sup>1)</sup>.

---

<sup>1)</sup> Morgenroth, Arch. internat. de Pharmacodyn. 1899.

Die von uns beobachtete neuartige Latenzzeit läßt nun offenbar den Ausblick zu auf eine zweite Erklärungsmöglichkeit dieses Phänomens, die möglicherweise für gewisse Fälle auch bei genuinen Toxinen Gültigkeit haben könnte. Angesichts der hier demonstrierten weitgehenden Umlagerungsfähigkeit der Toxinmoleküle sehen wir für folgende hypothetische Betrachtung kein Hindernis: Die Toxine seien in ihrer ursprünglichen Lösung (Giftbouillon, Auszüge aus tierischen oder pflanzlichen Organen) nicht oder nur zum Teil als solche vorhanden, dagegen ganz oder überwiegend als ungiftige Modifikationen derselben Art, wie sie in unseren Versuchen künstlich erzeugt wurden. Die ursprüngliche Lösung bietet nicht die Bedingungen zu einer Rückverwandlung. Nach Injektion der Lösung und Aufnahme der Giftmodifikation in die Blutbahn oder in gewisse Zellterritorien sind durch die Änderung der chemischen Eigenschaften des Lösungsmittels oder durch Bindungen an Zellrezeptoren die Bedingungen zu einer Umwandlung in das eigentliche Toxin gegeben, eine Umwandlung, die mehr oder weniger Zeit in Anspruch nähme. Dieser Zeitraum würde einen integrierenden Teil der Inkubationszeit ausmachen.

Daß mit der Annahme derartiger Umwandlungen im Tierkörper auch eine Erklärung für die Empfindlichkeitschwankungen verschiedener Tierspezies gegen Toxine gegeben werden kann, sei hier nur angedeutet. Unempfindliche Tiere (Huhn gegen Tetanusgift, Ratte gegen Diphtheriegift) wären dann gar nicht oder nur in geringem Maß imstande, die ungiftige primäre Modifikation in die sekundäre, das eigentliche Toxin, überzuführen<sup>1)</sup>.

---

<sup>1)</sup> Ganz ähnliche Annahmen hat bekanntlich s. Z. R. Pfeiffer für die Aktivierung der Choleraamboceptoren im Peritoneum des Meer-schweinchens gemacht unter Hinweis auf die Beziehungen der Fermente zu den Profermenten.

## Über Jodospongin.

(Vorläufige Mitteilung.)

Von

L. Scott.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts  
der Universität zu Berlin.)

(Eingegangen am 2. August 1906.)

Welche Gruppe der Schwammsubstanz man als Trägerin des organisch gebundenen Jods betrachten muß, hat bisher nicht festgestellt werden können. Bei der Hydrolyse des Jodospongins mit Mineralsäuren entweichen erhebliche Mengen Jod und Jodwasserstoffsäure, auch bei der Aufspaltung mittels Baryt wird Jod aus der organischen Verbindung gelöst.

Man durfte nun hoffen, daß bei schonender Hydrolyse, etwa Aufspaltung durch Enzyme, die Isolierung der jodhaltigen Gruppe möglich sei.

Tatsächlich gelingt es, die an sich unverdauliche Schwammsubstanz durch Behandlung mit starker Schwefelsäure löslich zu machen und in ein Produkt zu verwandeln, das nunmehr durch Pankreassaft bis zum Verschwinden der Biuretprobe verdaut wird.

Geschieht die Behandlung mittels Schwefelsäure unter der nötigen Vorsicht, so werden höchstens Spuren des organisch gebundenen Jods abgespalten. Nach Entfernung der Diaminosäuren durch Phosphorwolframsäure, der Hauptmenge des Leucins durch Kristallisation usw. kann eine stark jodhaltige organische Verbindung durch fraktionierte Kristallisation der Kupfersalze von begleitenden Monoaminosäuren getrennt und schließlich in einer in Alkohol löslichen Fraktion angereichert werden.

Das gleiche Verfahren wird auch auf die Eiweißkörper der Thyreoidea angewandt.

---

# Über die Entstehung optisch aktiver Fettsäuren in der Natur.

Von  
**Carl Neuberg.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts  
der Universität zu Berlin.)

*(Eingegangen am 1. August 1906.)*

Die Frage der Entstehung von optisch aktiven Fettsäuren in der Natur hängt eng mit dem Problem der Erdölbildung zusammen. Das letztere ist in eine neue Phase getreten, als P. Walden Biots in Vergessenheit geratene Beobachtung der optischen Aktivität beim Petroleum wieder ans Licht zog und nachdrücklich auf die Bedeutung dieses Befundes sowohl für die Naphthafrage wie als historisches Dokument der Biologie hinwies.

Die natürlich vorkommenden optisch aktiven Verbindungen haben sich bisher ausnahmslos als Produkte von Lebewesen der Fauna oder Flora erwiesen, und aus diesem Grunde erblickt man mit Recht im Drehungsvermögen des Petroleums eine Hauptstütze für die heute in erster Linie akzeptierte C. Englersche Theorie einer Erdölbildung aus organisierter Materie.

## I.

Nach der Englerschen Theorie sind animalische oder vegetabilische Fette, resp. die aus ihnen entstehenden Fettsäuren die Muttersubstanz der Naphta, zum mindesten bestimmter Erdöle, und in der Tat konnte Engler durch Druckdestillation von Fett künstlich „Petroleum“ darstellen.

Die Entdeckung, daß vielfach der natürlichen Naphtha optische Aktivität eigen ist, erheischte eine Revision der



Englerschen Theorie; denn mit verschwindenden Ausnahmen<sup>1)</sup> sind Fett und Fettsäuren der heutigen Lebewesen optisch inaktiv und könnten an sich nur ein optisch inaktives Erdöl liefern.

Die optische Aktivität des Petroleums war noch nicht befriedigend erklärt; Walden<sup>2)</sup> wie Engler<sup>3)</sup> haben jüngst zu dieser Frage das Wort ergriffen, und Engler hat eine Revision seiner früheren Versuche gerade im Hinblick auf die Aktivitätsverhältnisse in Aussicht gestellt. Beiden Autoren ist offenbar eine Mitteilung von mir entgangen, die ich auf der vorjährigen Naturforscherversammlung in Meran<sup>4)</sup> gemacht habe und von der auch Referate in die Literatur<sup>5)</sup> übergegangen sind.

Der Inhalt dieser Mitteilung war folgender:

„Der Ausgangspunkt meiner Betrachtungen ist die Beobachtung, daß in manchen Fällen das sogenannte Leichenwachs oder Adipocire optisch aktiv ist; die Entstehung des letzteren ist auch noch nicht völlig aufgeklärt. Da das untersuchte dextrogyre Produkt frei von Cholesterin war, ist es klar, daß es nicht aus den Kalk- und Magnesiasalzen der gewöhnlichen Fettsäuren (Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure) bestehen konnte; es lag nahe, an fettsäureähnliche Umwandlungsprodukte vom Eiweiß der Kadaver zu denken, eine Möglichkeit, deren für die Adipocirebildung schon vor vielen Jahren E. Salkowski<sup>6)</sup> gedacht hat.

Die Frage, ob solche Umwandlungsprodukte der Protein- stoffe optische Aktivität besitzen können, hat man früher nicht aufgeworfen; heute, wo wir über die Bausteine der Eiweißkörper so viel besser orientiert sind, muß sie aus theoretischen Gründen von vorneherein bejaht werden.

Dank den Aufklärungsarbeiten Emil Fischers wissen wir, daß abgesehen von aromatischen Komplexen im wesentlichen Aminofettsäuren am Aufbau der Proteine beteiligt sind; es

---

<sup>1)</sup> Siehe hierüber weiter unten.

<sup>2)</sup> P. Walden, Chem. Ztg. **1906**, Nr. 34, S. 391.

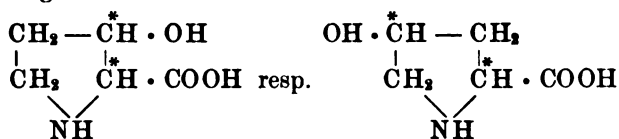
<sup>3)</sup> C. Engler, Chem. Ztg. **1906**, Nr. 58, S. 711.

<sup>4)</sup> Sitzung vom 26. Sept. 1905.

<sup>5)</sup> Chem. Ztg. **1905**, Nr. 79, S. 1045 u. Ztschr. f. angew. Chem. **1905**, Nr. 40, S. 1606.

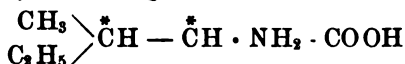
<sup>6)</sup> „Zur Kenntnis der Fettwachsbildung“, Festschrift f. Rud. Virchow **1891**, S. 19.

ist geradezu eine Forderung der Theorie, daß bestimmte Formen dieser Aminofettsäuren beim Übergang in Fettsäuren Produkte mit optischer Aktivität liefern müssen. Es sind dieses allgemein Aminosäuren mit zwei asymmetrischen Kohlenstoffatomen im Molekül, als deren erster Vertreter die Oxypyrrolidincarbon-säure<sup>1)</sup> aufgefunden wurde



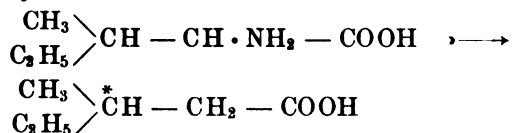
und zu denen auch das Cystin wie die Oxyaminobernstein-säure zählen.

Hierhin gehört auch das durch die ausgezeichneten Arbeiten von F. Ehrlich<sup>2)</sup> bekannt gewordene d-Isoleucin.



u. a. Verbindungen, die ähnliche verzweigte Kohlenstoffketten und daher mehrere asymmetrische Kohlenstoffatome enthalten, wie die Trioxyaminododekansäure<sup>3)</sup>, die Caseansäure<sup>4)</sup> und andere, z. T. wohl noch unbekannte Produkte.

Betrachten wir die Verhältnisse für das d-Isoleucin, wo sie besonders übersichtlich sind. Beim Übergang des d-Isoleucins in die entsprechende Fettsäure:



müßte die optisch aktive Capronsäure ( $\beta$ - $\beta_1$  Methyl-äthyl-propionsäure) entstehen, deren Radikal zahlreiche optische aktive Kohlenwasserstoffe bei der Kondensation mit gleichen oder anderen Resten ergeben kann.

Es ist aber klar, daß auch die Aminosäuren (die aromatischen ebenfalls) mit nur einem asymmetrischen C-Atom unter Umständen optisch aktive Fettsäuren oder deren Derivate liefern können,

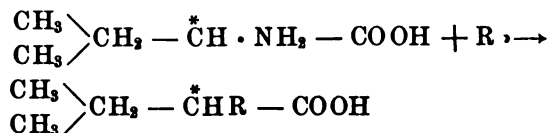
<sup>1)</sup> Ber. d. deutsch. chem. Ges. **35**, 2660. 1902.

<sup>2)</sup> Ber. d. deutsch. chem. Ges. **37**, 1809. 1904.

<sup>3)</sup> Ztschr. f. physiol. Chem. **42**, 543. 1904.

<sup>4)</sup> Ztschr. f. physiol. Chem. **42**, 274. 1904.

nämlich dann, wenn ein Zusammentritt zweier Reste vor oder bei der Eliminierung des Stickstoffs stattfindet. Am Beispiel des gewöhnlichen Leucins läßt sich dieser Vorgang folgendermaßen:



veranschaulichen; ein Fall, in dem R selbst auch optisch inaktiv sein kann.

Es fragt sich nun, ob ein Prozeß bekannt ist, bei dem sich unter natürlichen Verhältnissen ein derartiger Übergang von Aminosäuren in Fettsäuren vollzieht. Das ist der Fall; nämlich die Zersetzung der Eiweißstoffe durch Fäulnis. Überblicken wir die Resultate jener Forscher, die z. T. schon vor 20 Jahren die Produkte der Eiweißfäulnis studiert haben, wie E. u. H. Salkowski, M. Nencki, E. Baumann und L. Brieger, so kann man das Ergebnis dieser Forschungen heute dahin präzisieren, daß die Fäulnis der Proteinstoffe nichts als eine desamidierende Hydrolyse ist, bei der vornehmlich die Aminosäuren in N-freie Produkte übergehen, die gewöhnlichen Aminosäuren in Fettsäuren, die der aromatischen Reihe in fett-aromatische Säuren. Daneben verlaufen Kohlen-säureabspaltung, oxydative Synthesen und Kondensationen.

Neben der Fäulnis kommt noch ein zweiter biologischer Vorgang in Betracht, die Selbstverdauung oder Autolyse. Wo pflanzliche oder tierische Stoffe absterben, setzt nach E. Salkowskis Entdeckung diese Selbstverdauung ein, die auch nichts anderes als eine enzymatische Hydrolyse ist. A. Magnus-Levy hat nun gezeigt, daß auch unter streng aseptischen Bedingungen bei der Autolyse aus den Proteinstoffen Fettsäuren entstehen, also daß auch hier ohne Bakterien eine desamidierende Hydrolyse eintritt.

Daß diese Umwandlung von Aminosäuren in Fettsäuren so leicht vor sich geht, kann nicht wundernehmen, da ja die Fettbildung aus Eiweiß aller Wahrscheinlichkeit nach ein normaler physiologischer Stoffwechselvorgang ist.

Diese verschiedenen Überlegungen führen zu einer Erweiterung der Englerschen Theorie der Erdölbildung. Engler lehnt ausdrücklich eine Mitwirkung der Proteine oder ihrer Zer-

setzungsprodukte bei der Entstehung des Petroleums ab<sup>1)</sup> und erblickt allein im Fett das Ausgangsmateriel. Gewiß kommt letzteres in erster Linie in Betracht; aber neben ihm auch Fettsäuren, die durch Umwandlung der Proteinstoffe — sei es durch Fäulnis oder unter bestimmten geologischen Verhältnissen auch durch die Enzyme der absterbenden Zellen selbst (Autolyse) — entstanden sind und von denen ein Teil asymmetrische Struktur besitzt und ein optisch aktives Petroleum erzeugt. Einerlei, ob tierisches oder pflanzliches Material die Muttersubstanz ist, die Verhältnisse sind prinzipiell die gleichen; darum ist diese Ausdehnung der Fetttheorie auf die aus Eiweiß neugebildeten, z. T. optisch aktiven Fettsäuren auch mit der Krämer-Spilkerschen Hypothese (Petroleumbildung aus Algen, Diatomeen usw.) vereinbar.

Auf die bedeutende Anteilnahme der Proteinstoffe an der Erdölbildung weist der starke Stickstoffgehalt mancher Petroleumsorten hin, nicht minder nachdrücklich auch der Schwefelgehalt, der z. T. auf der Gegenwart organischer Sulfide beruht, wie ich sie künstlich durch gemeinsame Destillation von Cystin<sup>2)</sup>, gleichfalls einem Eiweißspaltprodukt, mit anderen Aminosäuren darstellen konnte.“

Diese meine Meraner Ausführungen habe ich nun inzwischen experimentell zu stützen versucht. Ein Blick durch den Polarisationsapparat bestätigte sofort die Forderung der Theorie.

Aus gefaultem Kasein wurden die Fettsäuren nach der Vorschrift von E. Salkowski<sup>3)</sup> abgeschieden. Diese Fraktion enthält die Fettsäuren von der Essigsäure bis zur Capronsäure und ist stark rechtsdrehend, im 2-Dezimeterrohr beträgt die direkte Drehung  $+1,2^{\circ}$ . Bei der Reinigung wurden die Fraktionen der Ameisen-, Essig- und Propionsäure fast inaktiv

---

<sup>1)</sup> Auf diesem Standpunkt steht Engler auch jetzt im wesentlichen, wenn er auch in seiner jüngst (nach meinem Meraner Vortrag) erschienenen Mitteilung [Chem. Ztg. 1906, Nr. 58] für den N-Gehalt mancher Naphthasorten stickstoffhaltige Ursbstanz annimmt.

<sup>2)</sup> Vielleicht gibt das Cystin mit seinen 2 asymmetrischen Kohlenstoffatomen zur Bildung optisch aktiver Sulfide Anlaß.

<sup>3)</sup> Practicum der physiol. u. pathol. Chem., 3. Aufl., S. 227, 1906.

befunden, dann nimmt die Drehung bis zu der Fraktion der Säuren mit 5 und 6 Kohlenstoffatomen zu.

In den Lehrbüchern findet sich meist die Angabe, daß die bei der Fäulnis entstehenden Fettsäuren die normale Struktur besäßen; diese Annahme kann angesichts der Herkunft dieser Fettsäuren aus den entsprechenden Aminosäuren nicht zutreffen, sie besitzen vielfach eine verzweigte Kette; näheres hierüber soll später mitgeteilt werden.

Ebenso wie die Fettsäuren aus Kasein verhielten sich die flüchtigen Säuren aus gefaultem Leim<sup>1)</sup>, hier war die Drehung etwas geringer.

Eine Herleitung der optischen Aktivität des Erdöles aus Proteinstoffen vermag auch vielleicht die großen Unterschiede im Betrage und der Richtung der Drehung zu erklären, die beim Petroleum beobachtet sind.

Dank den Untersuchungen E. Fischers und seiner Mitarbeiter wissen wir heute, wie außerordentlich verschieden die Eiweißkörper sowohl hinsichtlich der Natur wie der Menge der einzelnen Bausteine sind. Je nach dem Überwiegen der einen oder anderen Aminosäuren, nach der Kondensation mit diesem oder jenem Radikal, können bei dem Zersetzungsprozeß ganz verschieden drehende Produkte entstehen. Ein Schluß aber aus der Drehungsrichtung des Enderzeugnisses auf das Ausgangsmaterial oder umgekehrt ist natürlich ganz unmöglich.

Daß übrigens die Menge optisch aktiver Fettsäuren, die aus Eiweiß entstehen kann, nicht klein ist, lehrt eine einfache Überrechnung. Die Monoaminosäuren gehen bei intensiver Fäulnis nahezu quantitativ in Fettsäuren über. Von Rohleucin hat man bis 40 % in bestimmten Proteinen gefunden; nach F. Ehrlichs Ermittlungen kann etwa die Hälfte dieses Rohleucins aus Isoleucin bestehen, so daß ca. 20 % des Eiweißes unter Umständen aktive Capronsäure geben kann, die anderen drehenden Eiweißumwandlungsprodukte gar nicht gerechnet.

Das sind Mengen, die quantitativ weit gelegentliche optisch aktive Begleiter des Fettes (Cholesterine) an Quantität übertreffen.

---

<sup>1)</sup> Sie sind vor vielen Jahren von Herrn Prof. E. Salkowski dargestellt, der mir einen kleinen Teil für die polarimetrische Bestimmung gütigst überließ.

## II.

Es soll keineswegs behauptet werden, daß optisch aktive Eiweißumwandlungsprodukte allein das beim Erdöl beobachtete Drehungsvermögen bedingen. Für dessen Entstehung können auch andere Produkte unter Umständen verantwortlich gemacht werden.

So hat vor kurzem J. Marcusson<sup>1)</sup> die Hypothese aufgestellt, daß eine Quelle der optischen Aktivität in dem die tierischen und pflanzlichen Fette begleitenden Cholesterin und Isocholesterin bzw. Phytosterin zu suchen sei. Schon früher hatte A. Windaus<sup>2)</sup> durch Druckdestillation aus Cholesterin „Petroleum“ dargestellt und auf die event. Bedeutung dieser hydroaromatischen Substanz für die Entstehung von gesättigten cyclischen Kohlenwasserstoffen hingewiesen. Marcusson stützt seine Ansicht auf den gelungenen Versuch, aus Wollfett durch Autoklavenspaltung und Destillation des Rückstandes ein rechtsdrehendes Oleingemisch vom Charakter der Mineral-Maschinenöle zu erhalten.

Zu diesem interessanten Experiment ist zu bemerken, daß ein an optisch aktivem Material besonders angereichertes Ausgangsprodukt<sup>3)</sup> benutzt worden ist, daß im Lanolin kein gewöhnliches Fett, im wesentlichen keine Glycerinester, sondern Ester des optisch aktiven Cholesterins vorliegen und noch andere drehende Produkte von unbekannter Struktur, so die Lanocerin-körper von F. Roehmann<sup>4)</sup>, vorhanden sind.

Die gewöhnlichen Fette animalischer oder vegetabilischer Herkunft enthalten — nicht einmal regelmäßig — so kleine Mengen von Cholesterin oder dessen Verwandten, daß es zweifelhaft erscheinen muß, daß diese Produkte allein die Muttersubstanz der stark optisch aktiven Erdölbestandteile bilden könnten.

Wie bereits erwähnt, sind die gewöhnlichen Fette optisch-inaktiv; nur in vereinzeltten Fällen sind einige drehend

<sup>1)</sup> Chemische Revue **12**, 1. 1905.

<sup>2)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. **37**, 2028. 1904.

<sup>3)</sup> In den Destillationsrückständen von der Fettsäurendarstellung reichert sich immer das Cholesterin an. Vergl. Donath und Margosches. Chem. Ind. **1904**, S. 220.

<sup>4)</sup> F. Roehmann, Centralbl. f. Physiologie **19**, 317. 1905.

befunden und zwar Fette sowohl des Tier- wie des Pflanzenreiches.

Allerdings ist es manchmal möglich gewesen, den Grund dieser optischen Aktivität nachzuweisen und sie auf bestimmte Produkte zurückzuführen, so auf das Cholesterin und Isocholesterin beim Wollfett, auf die cyklische Chaulmugrasäure beim Chaulmugraöl, auf Isomere der Myristin- und Laurinsäure im Bürzeldrüsenfett (F. Roehmann), auf die Rizinusölsäure beim Rizinusöl, auf die d-Valeriansäure (Methyl-äthylelessigsäure) beim Angelicaöl und Convulvin und auf den aktiven Hexylalkohol beim Römisch-Kamillenöl<sup>1)</sup>; bei der Mehrzahl namentlich der schwachdrehenden Fette ist aber der Grund des Drehungsvermögens unbekannt.

Die Darstellungsweise mancher Fette schließt nun die Möglichkeit einer Verunreinigung außer mit Cholesterinkörpern mit einer anderen Klasse von Verbindungen nicht aus, die im tierischen und pflanzlichen Organismus weit verbreitet sind, den Lecithinen. Es wäre dankbar, daß diese nach C. Ulpiani<sup>2)</sup> Entdeckung optisch aktiven Lipoide z. T. das Drehungsvermögen jener Fette bedingen. Das Lecithin hat die bemerkenswerte Eigenschaft, eine große Anzahl sonst fettunlöslicher Körper mit Lipoïden mischbar zu machen, z. B. Zucker und andere optisch-aktive Substanzen (Paul Mayer<sup>3)</sup>); dieses Verhalten ist bei den pflanzlichen Lecithinen besonders ausgeprägt, die nach E. Winterstein und Hiestland<sup>4)</sup> regelmäßig einen erheblichen Gehalt an Pentosen, also aktivem Material, aufweisen.

Das reine Lecithin ist nach Ulpiani (a. a. O.) dextrogyr, existiert aber nach Paul Mayer<sup>5)</sup> auch in einer linksdrehenden Form.

---

<sup>1)</sup> In den beiden letzten Fällen handelt es sich möglicherweise um Eiweißumwandlungsprodukte, die im normalen pflanzlichen Stoffwechsel erzeugt werden analog der Bildung des aktiven Amylalkohols bei der Hefegärung, wo zuerst an der lebenden Pflanze die Umwandlung von aktivem, stickstoffhaltigem Material in ebensolches N-freies nachgewiesen wurde (F. Ehrlich). Solche Umwandlungen von stickstoffhaltigem Material in optisch aktive N-freie Substanzen besorgt auch der Tierkörper (Neuberg und Langstein).

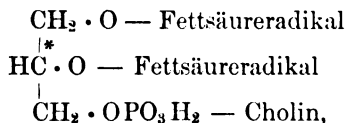
<sup>2)</sup> Gazz. chim. Ital. **31**, II, 47. 1901.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschr. **1**, 81. 1906.

<sup>4)</sup> Ztschr. f. physiolog. Chem. **47**, 496. 1906.

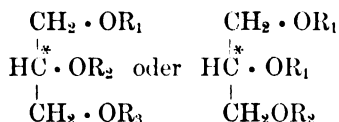
<sup>5)</sup> Diese Zeitschr. **1**, 39. 1906.

Die optische Aktivität der Lecithine selber ist nun eine derartige, daß sie für die Bildung optisch-aktiver Erdölkohlenwasserstoffe nicht in Betracht kommen kann. Sie beruht nämlich auf der asymmetrischen Anordnung der Fettsäureradikale und des Phosphorsäurerestes an den Glycerinhydroxylen, z. B.:



und nicht auf der Gegenwart eines nach vollkommener Hydrolyse optisch-aktiven Spaltungsproduktes. Da nun vor oder mindestens während der Petroleumbildung Verseifung eintritt, kann das Lecithin selbst keine optische Aktivität in das Erdöl hineintragen.

Bei dieser Gelegenheit mag darauf hingewiesen werden, daß die optische Aktivität mancher Fette und Öle auf der Gegenwart von sogenannten gemischten Glyceriden beruhen könnte; denn bei letzteren muß man bei bestimmten Anordnungen optische Aktivität erwarten, nämlich dann, wenn diese natürlich vorkommenden Glyceride 3 verschiedene Fettsäureradikale ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ) enthalten oder auch nur 2 ungleiche ( $R_1$ ,  $R_2$ ), die asymmetrisch am Glycerinrest haften:

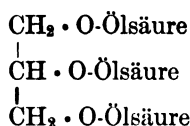


Diese Formen können zwar den Ölen und Fetten optische Aktivität verleihen, aber nicht dem daraus entstehenden Erdöl aus ähnlichen Gründen, wie wir sie beim Lecithin gesehen haben.

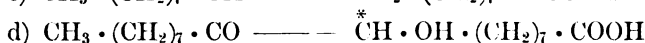
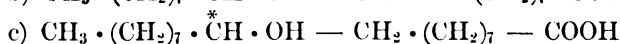
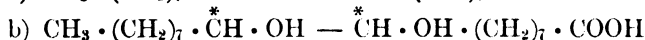
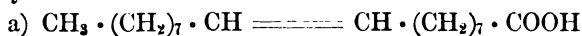
Von ungleich größerem Interesse war daher die Frage, ob es möglich sei, aus den symmetrischen, optisch-inaktiven Ölen und Fetten unter den natürlichen Verhältnissen analogen Bedingungen künstlich optisch-aktive Substanzen zu erzeugen, deren Drehungsvermögen auf einem wirklichen asymmetrischen Kohlenstoffatom der letzten hydrolytischen Spaltungsprodukte beruht. Das ist in der Tat möglich.

Das Ausgangsmaterial für die Versuche besteht in dem gewöhnlichen symmetrischen Triolein





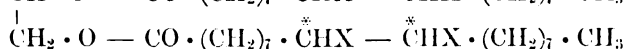
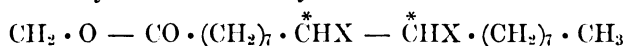
das bekanntlich einen überwiegenden Teil im Fette der maritimen Flora und Fauna ausmacht. Um jede Verunreinigung auszuschließen, wurde synthetisches Triolein benutzt. Das Trocknen ölsäurehaltiger Fette, aber auch die Veränderungen der freien Ölsäure (a) an der Luft beruht<sup>1)</sup> auf Sauerstoffaufnahme oder Wasseranlagerung an der Stelle der doppelten Bindung, wobei Dioxystearinsäure (b), Monoxystearinsäure resp. Stearolacton (c) oder andere Polyoxysäuren [Oxyketostearinsäure ?(d) usw.] entstehen, kurz lauter Verbindungen mit einem oder zwei asymmetrischen Kohlenstoffatomen:



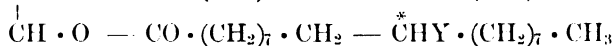
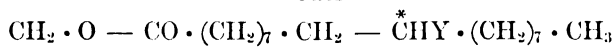
(oder Isomere).

Diese Systeme sind an sich zwar asymmetrisch, jedoch noch inaktiv, resp. racemisch, aber sie können unter Bedingungen, die in der Natur durchaus gegeben sind, optisch aktiv werden. Diese Bedingungen, die auch im Experiment verwirklicht werden konnten und drehende Fettsäuren ergaben, sind folgende:

Von einem Triolein, das durch Wasseraufnahme oder langsame Oxydation in das System



oder



<sup>1)</sup> Vergl. E. Salkowki, Festschrift f. Rud. Virchow 1891, S. 19. M. v. Senkowski, Ztschr. f. physiol. Chem. 25, 434. 1898. Scala zit. nach Ulzer-Klimont, Chemie der Fette, 1906. S. 93. D. Holde und J. Marcusson, Ber. d. dtsh. Chem.-Ges. 86, 2657. 1903.

übergegangen ist, läßt sich voraussehen, daß es durch fettspaltende Fermente bei deren asymmetrischer Wirkungsweise zur Hälfte verseift werden wird, indem Glycerin und freie aktive Säure entsteht, während deren Antipode mit der anderen Hälfte des Glycerins zum aktiven Glycerid vereint bleibt.

Der Versuch ist in der Weise praktisch ausgeführt<sup>1)</sup>, daß vollständig (durch 6 Atome Br) bromiertes synthetisches Triolein (Dibromstearinsäure-triglycerid) mit pflanzlicher Lipase gespalten wurde. Es resultiert rechtsdrehende freie Dibromstearinsäure und ein gleichfalls rechts drehendes Dibromstearinsäureglycerid.

Das verwendete Material ist formal vollkommen den Produkten der langsamen Oleinoxydation analog. Es ist klar, daß auch bei gemischten Glyceriden oder bei Umwandlung nur eines Ölsäurerestes prinzipiell ebensolche durch Lipase spaltbare Systeme mit asymmetrischen Stearinsäurederivaten entstehen können.

Fettspaltende Fermente sind in der Natur außerordentlich verbreitet, sie finden sich im tierischen und pflanzlichen Organismus in den Sekreten wie intrazellulär. Auch die Bakterien wie ihre Ausscheidungen wirken gleichfalls stark fettspaltend. Die halbseitige Verseifung durch Lipasen ist bereits mehrfach beobachtet, so von Paul Mayer<sup>2)</sup>, von H. D. Dakin<sup>3)</sup> (vergl. auch O. Warburg<sup>4)</sup>), sie ist ein Vorgang<sup>5)</sup>, wie er sich unter geologischen Verhältnissen sehr wohl abgespielt haben kann. Da die Erdölbildung wahrscheinlich ein langsam und allmählich verlaufender Prozeß ist, bietet es beispielsweise der Vorstellung keine Schwierigkeiten, daß etwa die durch Lipolyse entstandenen freien aktiven Fettsäuren entfernt oder schon

<sup>1)</sup> Aus äußeren Gründen ist das perbromierte Triolein verwandt; es ist leichter zugänglich und reiner erhältlich als die Sauerstoffderivate.

<sup>2)</sup> Berlin. klin. Wochenschr. **1905**, No. 35.

<sup>3)</sup> Journ. of Physiolog. **32**, 199. 1905.

<sup>4)</sup> Ztschr. f. physiolog. Chem. **48**, 205. 1906.

<sup>5)</sup> Die asymmetrische Verseifung durch Lipase ist übrigens vielleicht auch ein Mittel, um die öfter recht unsichere Existenz der gemischten Glyceride zu erweisen. Soweit sie asymmetrische Struktur besitzen, aber racemisch sind, werden sie wahrscheinlich durch Lipase halbseitig verseift und müßten ein durch das Enzym nicht angreifbares drehendes Glycerid ergeben. Versuche hierüber sind im Gange.

umgewandelt werden, während das aktive Glycerid erst später zu Petroleum wird.

Es ist also gezeigt, daß aus inaktiven Fetten infolge langsamer Oxydation und asymmetrischer Spaltung durch belebte oder leblose Fermente optisch-aktive Radikale entstehen können.

Bei der experimentellen Ausführung dieser in zwei Richtungen sich bewegenden Untersuchungen bin ich von Herrn cand. phil. E. Rosenberg unterstützt. Seine Dissertation wird die analytischen Einzelheiten bringen und die Mitteilung anderer Versuche über die Umwandlung optisch-aktiver Fettsäuren und Eiweiß<sup>1)</sup> in „Petroleum“, die ich mir vorbehalten möchte.

---

<sup>1)</sup> Beim Tieröl fanden wir schwaches Drehungsvermögen; diese Tatsache ist insofern von Interesse, da möglicherweise die stickstoffhaltigen Bestandteile des Rohpetroleums mit Träger seiner optischen Aktivität sind.

## Über optisch-aktive $\alpha$ - $\beta$ -Diaminopropionsäure und $\beta$ -Thioglyzerinsäure<sup>1)</sup>.

Von

C. Neuberg und E. Ascher.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität zu Berlin.)

(Eingegangen am 16. August 1906.)

In Fortführung der früheren Untersuchungen<sup>2)</sup> über konfigurative Beziehungen zwischen den Substanzen der Dreikohlenstoffreihe wurde die racemische  $\alpha$ - $\beta$ -Diaminopropionsäure in die aktiven Komponenten zerlegt. Die Spaltung gelingt angesichts des basischen Charakters der Diaminopropionsäuren durch direkte Salzbildung und zwar mittels d-Kamphersulfosäure.

Durch fraktionierte Kristallisation des schön kristallisierenden basischen Salzes:



erhält man die rechtsdrehende Form angenähert rein, die linksdrehende nur zum Teil.

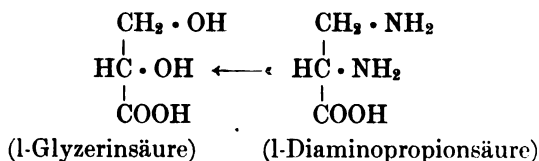
Das Sulfat der rechtsdrehenden Modifikation wird durch Baryumnitrit (zwei mol.  $\text{HNO}_2$ ) in l-Glyzerinsäure übergeführt.

Unter der Voraussetzung, daß die salpetrige Säure keine sterische Umwandlung bewirkt, ist die rechtsdrehende  $\alpha$ - $\beta$ -Diaminopropionsäure als l-Form zu bezeichnen, und es bestehen die Beziehungen:

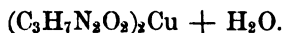
---

<sup>1)</sup> Vorgetragen in der Sitzung der deutschen chem. Ges. vom 9. Juli 1906.

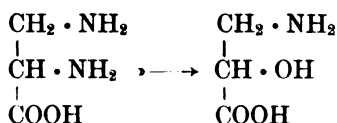
<sup>2)</sup> Ber. d. deutschen chem. Ges. **37**, 339 und 342. 1904; Ztschr. f. physiol. Chem. **44**, 134. 1905.



Das Chlorhydrat der 1-Diaminopropionsäure dreht rechts; das Kupfersalz der 1-Diaminopropionsäure hat die Zusammensetzung:



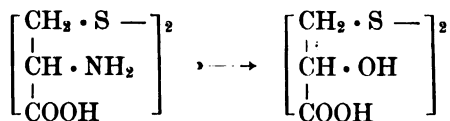
Da nach Neuberg und Silbermann sowie Ellinger Diaminopropionsäure durch ein mol.  $\text{HNO}_2$  in Isoserin



übergeht, ist dessen aktive Form gleichfalls zugänglich.

Die Konfiguration des Cystins ist bestimmt, wenn es gelingt, dieses in die aktive Glyzerinsäure zu verwandeln.

Durch Behandlung mit Baryumnitrit in schwefelsaurer Lösung geht Proteincystin in das Disulfid der  $\beta$ -Thioglyzerinsäure (Desaminocystin) über:



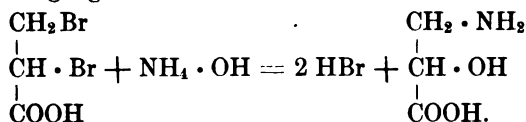
Letztere ist lävogyr ( $[\alpha]_D = \text{ca.} - 10,6^\circ$ ). Baryumsalz:  $(\text{C}_3\text{H}_4\text{SO}_3)_2 \text{Ba}$   $[\alpha]_D = - 19,08^\circ$ ; Silbersalz:  $\text{C}_6\text{H}_8\text{S}_2\text{O}_6\text{Ag}_2$ .

Die Lösung des Baryumsalzes gibt mit Mercurichlorid, Blei- und Kupferazetat starke Fällungen.

Durch Zinn + Salzsäure wird das Disulfid zur  $\beta$ -Thioglyzerinsäure ( $\alpha$ -Oxy- $\beta$ -thiopropionsäure) reduziert, die gut kristallisiert und mit Blei-, Kupfer- und Eisensalzen ähnliche Farbenreaktionen wie Cystein gibt.

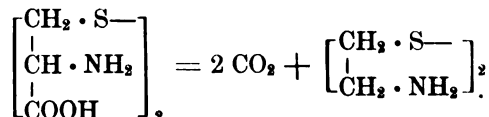
Durch Entschweflung muß diese Verbindung in aktive Glyzerinsäure übergehen. Gelingt diese Verwandlung nicht, so wird die Synthese des Desaminocystins von der  $\beta$ -Chlor- $\alpha$ -Oxypropionsäure ( $\beta$ -Chlorglyzerinsäure) möglich sein, die selbst durch Alkaloidsalze sich als spaltbar erwies.

Bei der Darstellung der inaktiven  $\alpha$ - $\beta$ -Diaminopropionsäure aus  $\alpha$ - $\beta$ -Dibrompropionsäure und Ammoniak entsteht bis zu 10% des Ausgangsmaterials Isoserin:



Diese Umsetzung ist ganz analog der jüngst von Neuberg und Federer<sup>1)</sup> beschriebenen Bildung von Methylisoserin ( $\alpha$ -Oxy- $\beta$ -aminobuttersäure)  $\text{CH}_3 - \text{CHNH}_2 - \text{CHOH} - \text{COOH}$  aus  $\alpha$ - $\beta$ -Dibrombuttersäure  $\text{CH}_3 - \text{CHBr} - \text{CHBr} - \text{COOH}$  und  $\text{NH}_3$ .

Durch trockene Destillation läßt sich Cystin zu Körpern der Äthylenreihe abbauen; es entsteht durch Abspaltung von Kohlensäure Diaminoäthylendisulfid (Aminoäthylendisulfid):



Die Verbindung bietet Interesse, da sie vielleicht das Zwischenprodukt ist, aus dem die verschiedenen schwefelhaltigen Substanzen bei der bakteriellen Zersetzung des Cystins entstehen; das geschwefelte Amin läßt sich als Pikrat isolieren und ist mit dem synthetischen Produkt von S. Gabriel<sup>2)</sup> identisch.

Die ausführliche Mitteilung der analytischen Daten wird in der Dissertation von E. Ascher erfolgen.

<sup>1)</sup> Diese Ztschr. **1**, 287. 1906.

<sup>2)</sup> Ber. d. dtsh. chem. Ges. **22**, 1138. 1889; **24**, 1112 u. 2133. 1891.

# Über den Wert der verschiedenen Farbenreaktionen zum Nachweis der Pentosen.

Von  
**Fritz Sachs.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts  
der Universität zu Berlin.)

*(Eingegangen am 3. August 1906.)*

Seitdem die Pentosurie von Salkowski und Jastrowitz<sup>1)</sup> zum ersten Male beobachtet und beschrieben worden ist (1892), sind zwar eine Reihe weiterer Fälle derselben Stoffwechsellanomalie bekannt geworden, ihre Zahl ist aber immerhin auch bis heute noch spärlich geblieben. Obgleich diese seltene Affektion dem Träger derselben keine Beschwerden verursacht und auch keine Gefahren für die Gesundheit mit sich bringt, so hat sie doch in nicht geringem Maße das Interesse der Ärzte in Anspruch genommen; und zwar mit Recht. Denn, wenn wir von der wissenschaftlichen Bedeutung ganz absehen, auch in der Praxis spielt die Pentosenausscheidung durch den Harn eine wichtige Rolle, da diese Zuckerart durch ihr starkes Reduktionsvermögen einen Diabetes vortäuschen kann. Wenn man bedenkt, daß es sich das eine Mal um eine harmlose Affektion, das andre Mal um eine schwere Erkrankung handelt, so wird man verstehen, daß eine solche Verwechslung Folgen recht unangenehmer Art nach sich ziehen kann. Die Diagnose der Pentosurie hat also auch für den Praktiker ein bedeutendes Interesse. Es gelingt nun wohl, durch Kombination mehrerer Verfahren, wie Reduktionsprobe, Gärung, Polarisation

---

<sup>1)</sup> Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1892, S. 337.

das Vorhandensein von Pentose wahrscheinlich zu machen und Traubenzucker auszuschließen, es gelingt auch durch umständlichere chemische Verfahren Pentose ganz einwandfrei nachzuweisen, vorausgesetzt, daß genügende Mengen von der verdächtigen Flüssigkeit zur Verfügung stehen: für den Arzt ist es aber nötig, ein Reagens in der Hand zu haben, mit dem er in einfacher Weise seine Diagnose sicherstellen kann. Es sind eine Anzahl Reaktionen bekannt, welche diesen Zweck erfüllen sollen, und deren sich auch der Chemiker öfters bedient. Im folgenden soll von ihnen die Rede sein. Die ältesten sind die Tollenssche Orcin- und Phloroglucinprobe<sup>1)</sup>, die schon vor der Beobachtung der Pentosurie bekannt waren und auch heute noch viel benutzt werden. Vor einigen Jahren wurde die erstere von diesen Proben von Bial<sup>2)</sup> modifiziert. In jüngster Zeit fand nun eine Diskussion über den Wert dieser Modifikation statt, durch welche die folgenden Untersuchungen veranlaßt wurden. Bial verwandte zunächst als Reagens rauchende Salzsäure, welche auf 500 g 1 bis 1½ g Orcin und 25 bis 30 Tropfen 10%ige Eisenchloridlösung enthielt. 4 bis 5 ccm dieser Flüssigkeit wurden mit 2 bis 3 ccm der zu untersuchenden eben aufgeköcht. Bei Anwesenheit von Pentose trat Grünfärbung auf, sowie der für die Orcinreaktion charakteristische Absorptionsstreifen im Spektrum. Das Wesentliche der Modifikation besteht in der Anwendung des Eisenchlorids, das als Sauerstoffüberträger die Reaktion beschleunigen und sie so bequemer und schärfer machen soll. Bial sah sich indessen ein Jahr später veranlaßt, seinen Vorschlag abzuändern<sup>3)</sup>, da bei Anwendung von seinem Reagens in der früher angegebenen Form eine Verwechslung mit Glukuronsäure möglich war<sup>4)</sup>. Um diesem Übelstande abzuhelfen, wandte er statt konzentrierter Salzsäure solche von 30% HCl-Gehalt an. Im übrigen behielt das Reagens dieselbe Zusammensetzung. Nur wurde die Ausführung der Reaktion dahin modifiziert, daß zunächst 4 bis 5 ccm von dem Reagens zum Sieden erhitzt und dann bis höchstens

<sup>1)</sup> Berichte d. deutsch. chem. Ges. **22**, 1046. Ann. d. Chem. **254**, 329; **260**, 304.

<sup>2)</sup> Deutsche med. Wochenschr. 1902 u. 1903.

<sup>3)</sup> Deutsche med. Wochenschr. 1903.

<sup>4)</sup> Vgl. Brat, Ztschr. f. klin. Med. **47**. 1902.



1 ccm Harn zugesetzt wurde, ohne weiter zu erhitzen. So sollte eine Verwechslung mit Glukuronsäure nicht möglich sein. Jolles<sup>1)</sup> hält nun das Reagens, in dieser Form angewandt, nicht für verlässlich und fein genug. Im Gegenteil hält er es für nötig, nach dem Vermischen aufzukochen. Andererseits, meint er, sei bei diesem Vorgehen eine Verwechslung mit Glukuronsäure möglich. Jolles bringt hier ein neues Verfahren zur Unterscheidung von Pentose und Glukuronsäure in Vorschlag, von dem weiter unten die Rede sein soll. Dieses hält wiederum Bial<sup>2)</sup> in der Praxis für nicht schnell und einfach genug, während sein einfaches Verfahren von ausreichender Schärfe und Feinheit sein soll. Zudem hält er ein Verfahren, das, wie das Jollessche es tun soll, minimale Spuren, wie 0,02 % Pentose, anzeigt, gar nicht für wünschenswert, da bei einer echten Pentosurie nicht Spuren, sondern etwa  $\frac{1}{2}$  % Zucker ausgeschieden werden.

Nach dem Gesagten schien es also wünschenswert, die beiden konkurrierenden Methoden von Bial und von Jolles nachzuprüfen. Dies geschah unter gleichzeitiger Berücksichtigung der alten Orcin-, Phloroglucinprobe, der Neumannschen Reaktion sowie der Reaktion mit Anilinacetatpapier.

#### Bialsche Probe.

Zur Untersuchung wurden hier, wie auch bei den anderen Reaktionen, herangezogen Lösungen von l-Arabinose, Xylose, Glukuronsäure<sup>3)</sup>, normaler Harn, sowie Harne, gesammelt nach Verabreichung paarungsfähiger Substanzen. Es sei vorausgeschickt, daß nach einigen orientierenden Versuchen immer nur  $\frac{1}{2}$  ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit dem Reagens zugesetzt wurde, da sich diese geringere Quantität für den Eintritt der Reaktion als günstiger erwies.

Das Reagens wurde in der zuletzt von Bial angegebenen Form benutzt, zum Teil käufliches, zum Teil selbst hergestelltes. Meine Beobachtungen haben nun folgendes ergeben:

1. Bei Lösungen sowie Urinen von 0,2 % Xylose-, resp. l-Arabinose-Gehalt tritt, wenn nur vor dem Zusatz der betr.

<sup>1)</sup> Centralbl. f. innere Med. 1905, Nr. 43; 1906, S. 100.

<sup>2)</sup> Centralbl. f. innere Med. 1906, S. 97.

<sup>3)</sup> Die Substanzen verdanke ich der Liebenswürdigkeit von Herrn Geheimrat Salkowski und Herrn Prof. Neuberg.

Flüssigkeit das Reagens aufgekocht wird, die Grünfärbung meist ein. Im Spektrum findet man einen intensiven Streifen im Beginn <sup>1)</sup> vom Rot, einen schwächeren zwischen Rot und Grün, die beide auch in dem beim Schütteln mit Amylalkohol entstehenden Auszug vorhanden sind. Der erste von ihnen ist, soweit mir erinnerlich, nicht von Bial beschrieben worden. Dagegen beschreibt Blumenthal <sup>2)</sup> einen Streifen im Rot, den er und P. Mayer bei Anstellung der gewöhnlichen Orcinreaktion mit verschiedenen Substanzen, namentlich ganz regelmäßig bei der Orcinprobe mit den Pentosazonen, sowie auch den Osazonen aller anderen untersuchten Kohlehydrate, fanden; er scheint mit dem hier bei Bials Probe beobachteten identisch zu sein. Blumenthal betont ausdrücklich, daß dieser Streifen nicht der charakteristische ist, vielmehr der am Ende des Rot zwischen C und D gelegene, den übrigens nach Blumenthals Angabe die Phenylhydrazinverbindungen der Glukuronsäure mit den Pentosazonen gemeinsam haben. Auch hier bei der Bialschen Probe scheint der Streifen im Rot durchaus nicht charakteristisch für Pentose zu sein, ich fand ihn zum Beispiel auch bei Anstellung der Probe mit Traubenzuckerlösung, wo aber der Streifen zwischen C und D fehlte.

Unter denselben Bedingungen wie oben ließen 1% ige Lösungen von Xylose und Arabinose stets sofort Grünfärbung erkennen. Es waren wieder dieselben Streifen zu sehen, wieder der links gelegene, im Rot, stärker ausgeprägt.

Ebenso verhielten sich noch konzentriertere Lösungen, bei denen natürlich beide Streifen gleichmäßig stärker erschienen. Gelegentlich hatten auch beide Streifen die gleiche Intensität, nie aber war der zwischen Rot und Grün stärker, als der im Rot. Bei käuflichem Pentose-Urin <sup>3)</sup> tritt stets Grünfärbung ein, wenn man nach der letzten Bialschen Angabe verfährt <sup>4)</sup>. Hier

---

<sup>1)</sup> Bei allen beschriebenen Spektralerscheinungen bezeichne ich immer als Beginn den nach links gelegenen Teil, als Ende den nach rechts gelegenen Teil einer Farbe, vorausgesetzt natürlich, daß sich links Rot, rechts Violett befindet.

<sup>2)</sup> Ztschr. f. klin. Med. **37**, 415.

<sup>3)</sup> Erhältlich bei der Firma Klönne u. Müller-Berlin, Luisenstraße.

<sup>4)</sup> Ein Pentose-Harn eigener Beobachtung stand mir leider nicht zur Verfügung.

ist immer der Streifen zwischen Rot und Grün stärker, als der im Beginn von Rot. Wenn man aber trotz Eintrittes der Grünfärbung nachträglich kocht, so ist auch hier der Streifen im Rot stärker, indem der eine an Intensität zu-, der andere abgenommen hat. Ebenso scheint auch ohne nachträgliches Erhitzen beim Ausschütteln mit Amylalkohol der Streifen im Rot mit der Menge des angewandten Amylalkohols an Intensität zu-, der andre abzunehmen.

2. 0,18%ige Lösung von freier Glukuronsäure gibt ohne nachträgliches Erhitzen keine Färbung, höchstens nach längerem Stehen der Probe eine geringe Andeutung, ohne daß dabei ein Streifen auftritt. Bei nachträglichem Erhitzen tritt die charakteristische Grünfärbung unter Sichtbarwerden derselben Absorptionsstreifen, wie oben ein. Wieder ist derjenige im Rot der stärkere. Eine 0,8%ige Lösung gibt auch ohne nachträgliches Erhitzen schwache, aber unverkennbare Grünfärbung. Die Absorptionsstreifen, ganz so wie früher, treten jedoch erst auf, wenn man nachträglich kocht, wobei die Grünfärbung auch wesentlich intensiver wird.

3. Normaler Menschenharn verdunkelt sich bei Vorgehen nach der letzten Bialschen Angabe unmerklich. — Keine Streifen vorhanden. Bei nachträglichem Erhitzen: Grünfärbung. (Dunkles Olivgrün). — Wiederum die beiden Absorptionsstreifen vorhanden.

4. Chloralharn vom Menschen, nach Verabreichung von 3 g Chloralhydrat gesammelt, stark reduzierend, Linksdrehung =  $-0,2\%$ , auf Traubenzucker berechnet, verhielt sich ebenso wie der normale Harn.

Ein Chloralharn vom Kaninchen (A), nach Einführung von 1 g Chloralhydrat, der stark reduzierte und eine Linksdrehung von  $-2,4\%$ , auf Traubenzucker berechnet, aufwies, verhielt sich ganz so, nur wurden trotz nachträglichen Erhitzens die Absorptionsstreifen vermißt.

Ein Chloralharn vom Kaninchen (B), nach Einführung von 1 g Chloralhydrat, der stark reduzierte und eine Linksdrehung von  $-0,8\%$ , auf Traubenzucker berechnet, aufwies, (er war mit Wasser verdünnt), verhielt sich genau so, wie der normale Menschenharn. Dasselbe Verhalten zeigte schließlich ein Hundeharn, nach Verfütterung von 3 g Parakresol, mit einer Links-

drehung von  $-0,8\%$ , auf Traubenzucker berechnet, und geringem Reduktionsvermögen, sowie ein Menschenharn nach subkutaner Verabfolgung großer Kampherdosen von geringem Reduktionsvermögen und geringer Linksdrehung.

Wie wir sahen, trat die Grünfärbung bei  $0,2\%$ igen Pentose-Lösungen und Urinen, wenn man nach der letzten Bialschen Angabe verfährt, d. h. nur vor dem Zusatz der pentosehaltigen Flüssigkeit aufkocht, meist ein, manchmal aber ohne bestimmten Grund nicht. Der Eintritt geschieht aber oft auch sehr zögernd, sodaß bei geringem Prozentgehalt an Pentose man annehmen muß, daß die Probe im Stiche lassen könnte. Wenn sie bei nachträglichem Erhitzen positiv ausfällt, so besagt das nichts, da auch normaler Harn sich dann ebenso verhält. Allerdings ist die Farbe bei den Pentoselösungen reiner. Aber auch eine  $0,18\%$  Glukuronsäurelösung gibt bei nachträglichem Erhitzen dieselbe reine Farbe. Gewiß ist mit dem Vorkommen von freier Glukuronsäure im Harn kaum zu rechnen, wenn auch die Beobachtung gemacht ist, daß sich die Menthol- und die Terpenoglukuronsäure (nach Verfütterung der entsprechenden Substanzen erhalten) beim Stehen der Harnen spontan spalten können<sup>1)</sup>. Man wird also bei der Bialschen Probe nur etwas aussagen können, wenn sie ohne nachträgliches Erhitzen positiv ausfällt. Und dies hat ja Bial auch selbst ausgesprochen. Sehr fein ist die Probe so aber nicht, da ein Gehalt von  $0,2\%$  Pentose gerade die Grenze zu bilden scheint, wo sie noch positiv ausfallen kann. Bei den beschriebenen Fällen von Pentosurie hat es sich aber zum Teil auch um geringere Mengen gehandelt. Denn sie schwankten zwischen  $0,08$  und  $1\%$ <sup>2)</sup> oder wenn man, wie Neuberg angibt, diese Zahlen verdoppeln muß<sup>3)</sup>, zwischen  $0,16$  und  $2\%$ . Zur Sicherung der Diagnose wird in jedem Falle das Aufsuchen des zwischen C und D gelegenen Absorptionstreifens nötig sein.

Zum Vergleich mögen nun auch die mit der alten Orcin- und Phloroglucin-Probe an denselben untersuchten Lösungen erzielten Resultate mitgeteilt sein.

<sup>1)</sup> P. Mayer, Berl. klin. Wochenschr. 1900, Nr. 1.

<sup>2)</sup> Zit. nach Neuberg, „Die Physiologie der Pentosen und der Glukuronsäure“ in „Ergebnisse der Physiologie“ III. Jahrg., 1. Abt. 1904.

<sup>3)</sup> a. a. O.

**Orcinprobe.**

Die Angaben über die Anstellung der Orcin- und Phloroglucinprobe, die man in der Literatur findet, weichen im einzelnen verschiedentlich voneinander ab, stimmen aber doch im Wesen mit den ursprünglichen Tollensschen Angaben<sup>1)</sup> überein.

Ich habe die Proben so angestellt, daß ich der zu untersuchenden Flüssigkeit, etwa 4 ccm, das gleiche Volumen rauchender Salzsäure,  $D = 1,19$ , zusetzte, darauf eine kleine Messerspitze Orcin, resp. Phloroglucin in das Reagensglas schüttete und zum Sieden erhitzte.

Bei typisch positivem Ausfall der Orcinprobe soll dann zunächst rötliche Färbung, darauf violettblaue Trübung eintreten. Die Farbennuancen wechseln aber, und so ist als das Charakteristischste an der Probe der Absorptionsstreifen zwischen C und D anzusehen, worauf schon Tollens aufmerksam gemacht hat. Man schüttelt nach Salkowskis Angabe<sup>2)</sup> mit Amylalkohol und betrachtet den Streifen im Amylalkoholauszug, der allmählich eine mehr grüne Farbe annimmt.

1. 0,2 %ige Pentose-Lösungen — positiver Ausfall.

Käuflicher Pentose-Urin Braun-Grünfärbung. Amylalkohol-auszug: rein grün. Streifen zwischen C und D.

2. 0,18 % Glukuronsäure-Lösung — schwach, aber unverkennbar positiv.

3. Normaler Harn — Braunfärbung. Kein Streifen.

4. Chloralharn (Mensch) — Braunrotfärbung. Kein Streifen.

Chloralharn (Kaninchen) A — Braungrünfärbung. Kein Streifen.

Chloralharn (Kaninchen) B — Rotbraunfärbung. Kein Streifen.

Parakresolharn (Hund) — Gelbbraunfärbung, Amylalkohol rötlich. Kein Streifen.

Kampherharn (Mensch) — Rotfärbung. Kein Streifen.

**Phloroglucin-Probe.**

Die Phloroglucinprobe wurde genau so angestellt wie die Orcinprobe. Hier kommt es noch mehr auf den typischen

<sup>1)</sup> s. a. O.

<sup>2)</sup> Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1892, Nr. 32.

Absorptionsstreifen an, der hier zwischen D und E im Beginn von Grün liegt. Es tritt beim Erhitzen zum Sieden erst Kirschrotfärbung, dann Trübung ein. In Amylalkohol klare Lösung mit roter Farbe.

1. 0,2 %ige Pentoselösungen — positiv.

Käuflicher Pentose-Urin positiv.

2. 0,18 %ige Lösung von Glukuronsäure — deutlich positiv.

3. Normaler Harn — Rotfärbung. Kein Streifen.

4. Chloralharn (Mensch) — Rotfärbung. Absorptionsstreifen zwischen D und E.

Chloralharn (Kaninchen) A — Rotfärbung. Kein Streifen.

Chloralharn (Kaninchen) B — Rotfärbung. Schwacher Streifen zwischen D und E.

Parakresolharn (Hund) — Rotfärbung. Streifen zwischen D und E.

Kampherharn (Mensch) — Rotfärbung. Absorptionsstreifen, schwach, aber unverkennbar, zwischen D und E.

Außer in der oben beschriebenen Weise wurde die Phloroglucinprobe auch in der von Salkowski angegebenen Form<sup>1)</sup> an Lösungen und Urinen von 0,2 % Pentosegehalt, an 0,18 %iger Glukuronsäurelösung, an normalem Harn, Kampherharn, Chloralharn vom Menschen und an Parakresolharn vom Hund ausgeführt. Der Ausfall der Proben zeichnete sich hier durch größere Reinheit des Farbtones und des Spektralbildes aus, stimmte aber im Grunde mit den oben notierten Resultaten überein, die ja auch Salkowski selbst erhalten hatte.

Der Nachteil der Phloroglucinprobe als Reaktion auf Pentose ist schon lange bekannt und, wie man sieht, auch hier wieder bestätigt worden. Nicht nur treten bei Anwendung der verschiedensten pentosefreien Lösungen Farbentöne auf, die

<sup>1)</sup> Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1892, S. 594. Ztschr. f. physiol. Chem. 27, 512. Nach Salkowski löst man eine kleine Messerspitze Phloroglucin in 7—8 ccm Salzsäure von 1,12 D, teilt die Lösung in zwei gleiche Hälften. Zu der einen fügt man 0,5 ccm des zu untersuchenden Harns, zu der anderen ebensoviel normalen Harns zum Vergleich. Setzt man dann beide Proben in siedendes Wasser, so färbt sich die reaktionsfähige Substanz enthaltende rot, während die andere fast unverändert bleibt, jedenfalls nicht rot wird. Die Spektraluntersuchung ergibt im ersten Falle den charakteristischen Absorptionsstreifen. Am normalen Harn sah Salkowski bei dieser Art der Anstellung die Reaktion nie eintreten.

dem typischen ganz ähnlich sind, sondern es weisen, wenn wir von den freien Glukuronsäuren ganz absehen wollen, auch die gepaarten des öfteren den Pentosenstreifen auf, sodaß also die Möglichkeit einer Verwechslung auf der Hand liegt. Mit der Probe mit Anilinacetatpapier erzielte ich übrigens noch schlechtere Resultate, indem hier auch normaler Harn eine mehr oder minder starke Rotfärbung des Streifens hervorrief. Es bestehen hier zwar graduelle Unterschiede, diese sind aber keineswegs geeignet, eine Entscheidung über das Vorliegen des einen oder des anderen Körpers zu bringen.

Mit der Orcinprobe habe ich dagegen befriedigende Resultate erzielt. Zwar ist der auftretende Farbenton des öfteren unbestimmt, der Absorptionsstreifen war aber bei den mit gepaarten Glukuronsäuren angestellten Proben nicht zu sehen. Nun weiß man ja, daß sich die verschiedenen gepaarten Glukuronsäuren verschieden verhalten, und es liegen in der Tat auch Beobachtungen vor, wo gepaarte Glukuronsäuren vollkommen charakteristischen Ausfall der Reaktion mit Absorptionsstreifen gaben, wie z. B. diejenige von Wohlgemuth an dem Harn einer Lysolvergiftung<sup>1)</sup> oder diejenige von P. Mayer an Menthol- und Terpenoglukuronsäure, die sich beim Stehen spontan zersetzen<sup>2)</sup>. Immerhin, glaube ich, wird es sich in diesen Fällen meist um leicht erkennbare künstlich gesetzte Bedingungen gehandelt haben, und die Empfehlung der Orcinreaktion durch Salkowski<sup>3)</sup> und Blumenthal<sup>4)</sup> für den klinischen Nachweis dürfte, wenn man bei Anstellung der Probe zu langes Kochen vermeidet<sup>5)</sup>, auch heute noch ihre Geltung haben.

#### Jolles' Methode.

Jolles<sup>6)</sup> empfiehlt zum Nachweis der Pentosen im Harn folgendes Verfahren; 10—20 ccm Harn werden mit

<sup>1)</sup> Berl. klin. Wochenschr. 1906, Nr. 17.

<sup>2)</sup> Berl. klin. Wochenschr. 1900, Nr. 1.

<sup>3)</sup> Ztschr. f. physiol. Chem. 27, 507.

<sup>4)</sup> a. a. O.

<sup>5)</sup> Eine Verwechslung mit gepaarter Glukuronsäure soll übrigens auch in zweifelhaften Fällen (Mentholglukuronsäure) vermieden werden können, wenn man bei Anstellung der Probe nicht kocht, sondern nur auf 90—95° erhitzt (vgl. Brat a. a. O.).

<sup>6)</sup> Centralbl. f. inn. Med. 1905, Nr. 43.

entsprechenden Mengen von essigsauerm Natron und salzsaurem Phenylhydrazin versetzt, ca. 1 Stunde im Wasserbad gekocht, dann 2 Stunden in kaltem Wasser stehen gelassen. Der Niederschlag wird auf ein Asbestfilter gebracht und einmal mit kaltem Wasser gewaschen. Darauf kommt der Niederschlag samt dem Filter in ein Destillierkölbchen, dazu 20 ccm destilliertes Wasser und 5 ccm rauchende Salzsäure. Nun werden 5 ccm in eine vorgelegte, in kaltem Wasser befindliche Epruvette abdestilliert, die vorher mit 5 ccm destillierten Wassers gefüllt wird. Bei Gegenwart von Pentose soll dann 1 ccm des Gemenges beim Kochen mit 4 ccm Bials Reagens intensive Grünfärbung geben. Nach Jolles' Angabe soll die Probe auch bei Anwesenheit größerer Zuckermengen anwendbar sein, da Dextrophenylhydrazin unter den angegebenen Bedingungen keinen furfurolähnlichen Körper liefert. Soweit die Jollesschen Angaben.

Diese Abweichung, die Jolles in dem Verhalten der Pentose-Phenylhydrazinverbindung von demjenigen der entsprechenden Traubenzucker- und Glukuronsäureverbindungen<sup>1)</sup> beobachtet hat, ist sehr bemerkenswert und es ist schwer zu erklären, warum in dem einen Falle ein furfurolähnlicher Körper gebildet wird, in den anderen nicht. Wenn nun die Neubergsche Ansicht<sup>2)</sup>, daß die gewöhnliche Orcinprobe nicht auf der Bildung von typischem Furfurol selbst beruht, auf die Bialsche Reaktion übertragen werden darf, so könnte es sich ja hier auch um einen anderen Körper handeln. Ich habe nun aber bei Anstellung der letzteren mit sehr verdünntem Furfurolwasser Grünfärbung und zwei Absorptionsstreifen erhalten, von denen der eine, zwischen C und D, vollkommen mit dem Pentosenstreifen zusammenfiel, während der andere im Rot gelegene in seiner Lage etwas nach rechts von dem sonst bei der Bialschen Probe im Beginn des Spektrums beobachteten abwich. Die Grünfärbung bei der Jollesschen Methode könnte also auf Furfurol beruhen<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> Jolles hatte auch mit Harnen, denen er 0,1 % freie Glukuronsäure zusetzte, negativen Ausfall seiner Probe beobachtet.

<sup>2)</sup> Ztschr. f. physiol. Chem. **81**, 564.

<sup>3)</sup> Bei der Orcinprobe mit Furfurolwasser habe ich wechselnde Farbtöne erhalten, der Amylalkohol nahm immer grüne Farbe an, nie konnte ich aber in Übereinstimmung mit Neuberg einen Absorptionsstreifen sehen. Nach Salkowski gelingt es jedoch gelegentlich, bei schwer



Wenn ich größere Mengen von Pentosazon (es waren einmal 0,8 g, ein anderes Mal 0,5 g) nach den Jollesschen Vorschriften verarbeitete, so gab das Destillat in der Tat mit Bialscher Probe Grünfärbung, Streifen waren aber im Spektrum nicht zu sehen. Mit dem Destillat wurden auch folgende Reaktionen angestellt: Proben mit  $\alpha$ -Naphthol, Phloroglucin, Orcin, ammoniakalischer Silbernitratlösung, Anilinacetat, die Trommersche und die unten zu besprechende Neumannsche Probe. Nur die  $\alpha$ -Naphtholprobe fiel positiv aus. Dies besagt, daß ein Derivat der Kohlehydrate im Destillat vorgelegen hat. Über die Natur desselben ist aber auch unter Heranziehung der Grünfärbung bei Bials Probe keine Entscheidung zu treffen. Mit entsprechenden Mengen der Glukuronsäure-Phenylhydrazinverbindung konnte ich die Jollessche Methode nicht ausführen, da ich hierzu nicht genug freie Glukuronsäure zur Verfügung hatte. Indessen kommen ja für den praktischen Nachweis gar nicht so bedeutende Mengen in Frage. So begnügte ich mich, schwächer konzentrierte Lösungen von Pentose und Glukuronsäure zu vergleichen, um die es sich ja doch hier handelt. Die Jollessche Methode wurde ausgeführt an Lösungen und Urinen von 0,2 % Arabinose- und Xylose-Gehalt, an 1 %iger Xyloselösung, an 0,18 %iger Glukuronsäurelösung und an käuflichem Pentose-Urin. Verwandt wurden meist 15 ccm, nie weniger als 10 ccm. Diese Mengen mußten genügen, da Jolles in 20 ccm Harn noch 0,05 % Arabinose nachweisen konnte. Mit dem Destillate bekam ich jedoch nur im Falle des käuflichen Pentose-Urins ganz minimale Andeutung einer Grünfärbung, in allen anderen Fällen gar keine Grünfärbung, während die Absorptionsstreifen in allen Fällen fehlten. Es ist mir ganz unverständlich, woran es liegen mag, daß ich zu so abweichenden Resultaten gekommen bin. Jedenfalls scheint mir nach meinen Erfahrungen die Jollessche Methode für die Praxis nicht brauchbar zu sein.

#### Neumannsche Probe.

Vor 2 Jahren hat Neumann ein einfaches Verfahren zur Unterscheidung verschiedener Zuckerarten, u. a. auch Pentosen,

---

zu bestimmender, geeigneter Zusammensetzung des Gemenges einen solchen darzustellen, der in seiner Lage nur wenig von dem eigentlichen Pentosenstreifen abweicht.

angegeben<sup>1)</sup>, welches bisher wenig Beachtung gefunden zu haben scheint. Es handelt sich auch hier um eine, allerdings wesentlich, modifizierte Orcinreaktion. Das Prinzip besteht darin, daß während der Bildung des Farbstoffs einerseits für das Vorhandensein eines Lösungsmittels desselben gesorgt, andererseits Gegenwart von Wasser bei der Reaktion nach Möglichkeit vermieden wird. Dadurch wird erstens die Probe verschärft, zweitens wird dadurch eine Differenzierung der Farbe bei Gegenwart verschiedener Zuckerarten bewirkt. Die Reaktion wird in folgender Weise ausgeführt: 10 Tropfen der zu prüfenden Lösung werden in einem Reagensglas mit 5 ccm 99 %igem Eisessig und einigen Tropfen einer 5 %igen alkoholischen Orcinlösung versetzt und nach Umschütteln bis zum völligen Sieden erhitzt. Während das Reagensglas im Halter gehalten wird, setzt man dann tropfenweise unter Umschütteln konzentrierte Schwefelsäure zu, bis ein deutlicher Farbenton bestehen bleibt. Mehr als 50 Tropfen sind dazu in keinem Falle nötig, können vielmehr Zersetzung und unreine Farbtöne hervorrufen. Nach Neumanns Angabe gibt auf diese Weise Arabinose: Violettrotfärbung, sowie im Spektrum einen Streifen rechts von D, der Gelb und Gelbgrün bedeckt; Xylose: Violettblaufärbung, sowie 2 Streifen, einen rechts von C im Orange, einen zweiten, wie bei Arabinose; Glukuronsäure: Grün-, resp. Grünblaufärbung, einen Streifen links von C im Rot; Glukose: Braunrotfärbung, sowie einen Streifen rechts von b im Grün. Neben anderen eingehenderen Angaben sei noch hervorgehoben, daß bei nachträglichem Wasserzusatz die Farbe bei den Pentosen und der Glukose unverändert bleibt, während sie bei Glukuronsäure rötlich wird. Diese Neumannsche Reaktion wurde wiederum an den bisher angewandten Lösungen nachgeprüft:

1. 0,2 %ige Xyloselösung: Blauviolett färbung, im Spektrum ein intensiver Streifen, der Gelb und Gelbgrün bedeckt, ein sehr schwacher links davon im Rot. 0,2 %ige Arabinoselösung: Rotviolett färbung, im Spektrum nur der intensive Streifen, wie bei Xylose. Bei 0,2 %igen Xylose- und Arabinose-Urinen derselbe Ausfall, und zwar nicht minder deutlich. Bei 1 %igen Pentoselösungen wird der Ausfall noch schöner. Bei Wasser-

---

<sup>1)</sup> Berl. klin. Wochenschr. 1904, Nr. 41.

zusatz bleiben die wässerigen Lösungen unverändert, während die Urine allmählich grünlich werden. Käuflicher Pentose-Urin: Grünblau- resp. Grünfärbung, die auf Wasserzusatz bestehen bleibt, deutlicher Absorptionsstreifen im Rot, etwa in der Mitte<sup>1)</sup>.

2. Traubenzucker-Lösung und Urin: Deutliche Rotfärbung mit Stich ins Violette. Bei schwächerer Färbung diffuse Verdunkelung im Grün, bei starker Färbung rechter Teil des Spektrums von Grün ab total verdunkelt. Grenze gegen Gelb scharf abgesetzt.

3. 0,18 % Glukuronsäurelösung: Ganz minimale Blaufärbung. Kein Streifen. Bei weiterem Zusatz von Schwefelsäure wird die Färbung braunviolett und schmutzig. Jetzt ist ein schwacher Streifen im Beginn von Grün zu sehen. Auf Wasserzusatz kein Farbenwechsel.

0,8 % Glukuronsäure: Blaufärbung. Schwacher Streifen im Beginn von Grün, auf Wasserzusatz deutlicher Umschlag in Rotviolett färbung.

4. Normaler Harn: bräunlich-grüne Farbe. Kein Streifen.

5. Chloralharn (Mensch): Schmutzig-Braunrotfärbung, Spektrum verdunkelt, kein Streifen.

Chloralharn (Kaninchen): Grünfärbung, kein Streifen. Auf Wasserzusatz kein Farbenumschlag.

6. Parakresolharn (Hund) und Kampherharn (Mensch): Burgunderrotfärbung. Verdunkelung des Spektrums von Grün ab nach rechts. Kein Streifen, kein Farbenumschlag auf Wasserzusatz.

Meine Befunde an Traubenzucker- und Glukuronsäurelösungen weichen in einigen Punkten von den Neumannschen Angaben ab. Namentlich scheint mir auch die Reaktion für Glukuronsäure nicht sehr empfindlich zu sein. Die Angaben über Pentoselösungen kann ich aber im wesentlichen durchaus bestätigen. Sehr merkwürdig ist der ganz andersartige Ausfall der Reaktion bei käuflichem Pentose-Urin, der sich ja auch, wie wir oben gesehen haben, bei der Bialschen Probe, durch das Verhalten der Absorptionsstreifen von den anderen Pentoselösungen unterschied und sich eher wie eine Furfurolösung ver-

---

<sup>1)</sup> Dasselbe Verhalten, wie der käufliche Pensoseharn, zeigte bei der Neumannschen Probe eine 1 %ige wässerige Lösung von Furfurol.

hielt. Es ist mir nichts Näheres über die Herkunft dieses Urines bekannt, und daher ist dieser Punkt eigentlich nicht diskutabel. Wenn man aber annimmt, daß der Harn von einem Pentosuriker stammt, so könnte man denken, daß die Verschiedenheit des Verhaltens darauf beruhe, daß, wie Neuberg<sup>1)</sup> gezeigt hat, ca. die Hälfte der Pentose in diesem Falle an Harnstoff gebunden ist. Mit inaktiver Arabinose, aus Pentoseharn in Substanz dargestellt, die mir Herr Prof. Neuberg freundlichst überließ, fiel die Reaktion ganz in der von Neumann für Arabinose typisch angegebenen Form aus. Es wäre jedenfalls von Interesse, eine Anzahl Pentosuriker-Urine auf ihr Verhalten zur Neumannschen Probe zu prüfen. Vielleicht ist das hier an dem käuflichen Pentose-Urin Beobachtete das charakteristische. Wenn ich aber von dem käuflichen Pentose-Urin ganz absehe, so muß ich sagen, daß das Reagens für Pentosen äußerst empfindlich ist und ihre Auffindung in einwandfreier Weise ermöglicht. Allerdings sind die Unterschiede bei Arabinose und Xylose nicht sehr deutlich und eine Verwechslung der beiden nicht ausgeschlossen. Das spielt ja aber, wenn es sich um die Frage handelt, ob überhaupt Pentose vorliegt oder nicht, gar keine Rolle. Der Hauptwert ist jedoch, meiner Meinung nach, auch bei der Neumannschen Probe auf den intensiven Absorptionsstreifen rechts von D zu legen. Denn bei Traubenzuckerlösungen habe ich doch ähnliche Farbentöne bekommen, wie bei Arabinose. Der Unterschied bei der Spektraluntersuchung ist aber eklatant. Freie Glukuronsäure könnte durch die Blaufärbung unter Umständen Pentose vortäuschen (auch die Probe, mit Xylose angestellt, wird allmählich blau). Die Lage des Streifens habe ich hier auch, abweichend von Neumann, ähnlich derjenigen des Arabinosestreifens gefunden, welcher allerdings unvergleichlich intensiver ist. Ganz charakteristisch ist aber, daß bei Glukuronsäureanwesenheit auf Wasserzusatz das Gemenge einen rötlichen Ton annimmt<sup>2)</sup>, und so kann auch eine Verwechslung mit freier

<sup>1)</sup> Ergebnisse der Physiologie 3. Jahrg., I. Abt. 1904, 373.

<sup>2)</sup> Daß ich bei 0,18 %iger Glukuronsäurelösung den Farbenwechsel nicht beobachtet habe, liegt wohl daran, daß hier von vornherein die Färbung zu minimal war.

Glukuronsäure vermieden werden. Dazu kommt als für den Pentosennachweis besonders günstiges Moment, daß das Reagens für freie Glukuronsäure sehr wenig empfindlich ist und die gepaarten Glukuronsäuren, wenn auch der Farbenton gelegentlich zur Verwechslung Veranlassung geben könnte, keinen Absorptionsstreifen aufweisen.

Wenn wir nun also mit der oben besprochenen Einschränkung in der Neumannschen Reaktion ein ausgezeichnetes Diagnostikum für Pentose erblicken dürfen, das mir feiner und zuverlässiger erscheint als die Orcinprobe in ihrer ursprünglichen Form und in der Bialschen Modifikation, so dürften doch auch die beiden letzteren Methoden noch ihren Platz behaupten, namentlich in der Klinik, solange die Frage über das Verhalten des echten Pentose-Urins zu dem Neumannschen Reagens noch nicht geklärt ist. Aber auch, wenn dies geschehen ist, dürfte es nur von Vorteil sein, wenn wir eine Auswahl von brauchbaren Reaktionen zur Verfügung haben. Denn, trotzdem es sich in allen drei Fällen um Orcinreaktionen handelt, der Ausfall ist doch in jedem Falle andersartig und für jede der Modifikationen charakteristisch, und wir sind so in der Lage, in zweifelhaften Fällen unsere Diagnose unter Heranziehung einer zweiten Methode zu stützen.

#### Nachtrag.

Während der Drucklegung hatte ich Gelegenheit, die Orcin-, die Bialsche und Neumannsche Reaktion an dem Harn einer Lysolvergiftung (Starkes Reduktionsvermögen, Linksdrehung =  $-3\%$ , auf Traubenzucker berechnet) zu erproben. Die Phloroglucinprobe fiel, wie nicht anders zu erwarten war, positiv aus. Es stellte sich folgendes heraus:

1. Orcinprobe: Nach Zusatz von Salzsäure Grünfärbung. Beim Kochen nimmt die Lösung einen dunklen, schmutzig-braunen Farbenton an; Amylalkoholauszug: schmutzig-braun. Deutlicher Absorptionsstreifen zwischen C und D.

2. Bialsche Probe: Ohne nachträgliches Kochen: geringe Verdunkelung. Bei nachträglichem Kochen: starke Verdunkelung, schmutzig-brauner Farbenton, der auch in den Amylalkohol übergeht. Im Spektrum nur ein sehr schwacher Streifen zwischen C und D.

3. Neumannsche Probe: Blauviolett färbung. Spektrum von Grün ab diffus verdunkelt. Die Verdunkelung ist im Beginn von Grün intensiver und erscheint hier als schlecht begrenzter Absorptionsstreifen. Auf Wasserzusatz deutlicher Umschlag in Rotviolett färbung.

Es ist bemerkenswert, daß ich hier am Lysolharn im Gegensatz zu den anderen von mir untersuchten Harnen mit gepaarten Glukuronsäuren und in Übereinstimmung mit der Beobachtung von Wohl gemuth am Lysolharn die Orcinprobe positiv ausfallen sah. Die Anwesenheit sehr großer Mengen gepaarter Glukuronsäure, wie sie sich hier fanden (3 % Linksdrehung), ist, wie ich glaube, nicht geeignet, die Tatsache hinreichend zu erklären. Vielmehr muß wohl in diesem Falle die Art der Bindung eine weniger feste sein. Denn einerseits war auch in einem Teil der Harnen, wo die Orcinprobe negativ ausfiel, die Menge der gepaarten Glukuronsäure ganz beträchtlich, und andererseits gibt, wie wir gesehen haben, eine weit schwächere Lösung von freier Glukuronsäure noch deutlich positiven Ausfall. Zudem fiel bei Anwendung desselben Harnes in sechsfacher Verdünnung die Reaktion, wenn auch weniger deutlich, so doch immer in demselben Sinne aus. Schließlich erklärt sich auch der Farbenton und die Spektralerscheinungen bei der Neumannschen Probe sehr wohl durch das Vorhandensein eines Gemisches von gepaarter und freier Glukuronsäure, welche letztere eben vermöge ihrer eigenartigen Bindung bei der Ausführung der Reaktion abgespalten werden mag. Ganz besonders ist aber der Farbenumschlag auf Wasserzusatz in Rotviolett für freie Glukuronsäure charakteristisch. Daß gerade hier beim Lysolharn im Gegensatz zur Orcinprobe die Bialsche bei nachträglichem Kochen so wenig schön und charakteristisch ausfiel, hat seinen Grund offenbar darin, daß die in sehr großer Menge ausgeschiedenen Phenolderivate mit dem Eisenchlorid in Reaktion treten und zur Bildung störender Farbstoffe Veranlassung geben.

Meine obigen Schlußfolgerungen hinsichtlich des Wertes der verschiedenen Methoden für den Nachweis von Pentosen erfahren natürlich angesichts der hier verzeichneten Ergebnisse durchaus keine Änderung.

---

# Über das Schicksal der Kresole im Organismus und ihren Einfluß auf den Stoffwechsel und die Darmfäulnis der Fleischfresser.

Von

**D. Jonescu aus Bukarest.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts  
der Universität zu Berlin.)

(Eingegangen am 6. August 1906.)

In seiner Arbeit über den Harn und den Stoffwechsel der Herbivoren<sup>1)</sup> beschreibt E. Salkowski auch die Rolle des Phenols und der Kresole bei der Darmfäulnis. Hierbei bemerkt er, daß, obschon man die Frage nach den Oxydationsprodukten der Kresole verfolgt hat, direkte Untersuchungen der nach Verfütterung von Kresolen durch Destillation des Harns wiedergewonnenen Menge nicht angestellt worden sind.

Da die Entscheidung hierüber für die Frage, welchen Umfang die Eiweißfäulnis im Darmkanal der großen Pflanzenfresser hat, von Wichtigkeit ist, so habe ich auf Veranlassung des Herrn Prof. Salkowski diese Frage zu verfolgen unternommen.

Nachdem Baumann die gepaarten Schwefelsäuren im Harn entdeckt hatte, hat er mit seinen Schülern auch das Verhalten der Kresole im Organismus studiert<sup>2)</sup>. So hat er

---

<sup>1)</sup> E. Salkowski, Zur Kenntnis des Harns und des Stoffwechsels der Herbivoren. *Ztschr. f. physiol. Chem.* **42**, 213. 1904.

<sup>2)</sup> E. Baumann und E. Herter, Über die Synthese von Ätherschwefelsäure und das Verhalten einiger arom. Substanzen. *Ztschr. f. physiol. Chem.* **1**, 264. 1877—78. — Baumann und Preuß, Zur Kenntnis der Oxydationen und Synthesen im Tierkörper. *Ztschr. f. physiol. Chem.* **3**, 156. 1879.

feststellen können, daß das verfütterte p-Kresol nur zum kleinen Teil zu p-Oxybenzoesäure und zu Phenol oxydiert wird<sup>1)</sup>, der größere Teil sich mit Schwefelsäure paart. Nach Verfütterung von o-Kresol kann man keine Salicylsäure nachweisen, sondern nur kleine Mengen von Tolhydrochinon; der Rest paart sich ebenfalls mit Schwefelsäure<sup>1)</sup>. Durch Preuße<sup>2)</sup> wurden diese Untersuchungen weiter geführt; er zeigte, daß man nach m-Kresol weder Metaoxybenzoesäure noch einen Körper von hydrochinonartiger Natur nachweisen kann.

Külz<sup>3)</sup> schloß die Reihe dieser Untersuchungen ab. Er beobachtete zum ersten Male, daß der Harn der mit Phenolen oder ihren Substitutionsprodukten gefütterten Kaninchen nach links dreht und eine Substanz enthält, die er als Phenylglukuronsäure nachwies.

Die Frage, die ich zu behandeln hatte, war in erster Linie die, wie viel von den eingeführten Kresolen man im Harn wieder finden konnte; ferner, wie viel sich davon mit Schwefelsäure und wie viel mit Glukuronsäure paart. Hierbei war noch der Einfluß dieser Körper auf die Darmfäulnis und die dabei entstehenden Produkte, wie Ammoniak und Indol, zu berücksichtigen. Schließlich war noch die Frage zu beantworten, welchen Einfluß die Kohlehydratfütterung gegenüber der Fleischfütterung auf die Menge der gebildeten Glukuronsäure ausübt.

Zunächst will ich die technische Ausführung der Versuche beschreiben. Eine 11960 g schwere Hündin wurde mit 250 g Pferdefleisch und 50 g Speck täglich ins Stickstoffgleichgewicht gebracht. Der Harn wurde morgens mit dem Katheter gewonnen, auf 400 ccm aufgefüllt und unter Zusatz einer kleinen Menge Chloroform aufbewahrt. Die Fäces wurden für jede Periode getrennt gesammelt. Die Abgrenzung geschah durch

<sup>1)</sup> Baumann, Entstehung des Phenols im Tierkörper und bei der Fäulnis. *Ztschr. f. physiol. Chem.* **3**, 250. 1879. — Ders., Die aromatischen Verbindungen im Harn und die Darmfäulnis. *Ztschr. f. physiol. Chem.* **10**, 123. 1885.

<sup>2)</sup> C. Preuße, Zur Kenntnis der oxyd. aromat. Substanzen im Tierkörper. *Ztschr. f. physiol. Chem.* **5**, 57, 66. Siehe auch: E. Tauber, Beiträge zur Kenntnis über das Verhalten des Phenols im tierischen Organismus. *Ztschr. f. phys. Chem.* **2**, 366. 1878.

<sup>3)</sup> Külz, Zur Kenntnis der synth. Vorgänge im Tierkörper. *Pflügers Arch.* **80**, 484. 1883.



Kieselgur. Nachdem der Hund im Stickstoffgleichgewicht war, wurde mit der Verfütterung der Kresole begonnen. Die Kresole wurden in Pillen gegeben, von jedem 1 g täglich, im ganzen 3 bis 4 g, und zwar ihrer steigender Toxizität folgend, erst meta-, ortho- und endlich para-Kresol. Zwischen jeder Kresolperiode wurde eine zwei- bis dreitägige Ruheperiode eingeschaltet.

Der Stickstoff wurde im Harn und den Fäces nach der Kjeldahlschen Methode bestimmt. Für die Ammoniakbestimmung wurden nach vergleichenden Untersuchungen zwischen den verschiedenen Vorschriften die von Krüger und Reich angegebene und von Schittenhelm in Zeitschrift für phys. Chemie <sup>1)</sup> beschriebene Methode bevorzugt. Die Methode ist kurz folgende: In einem mit einem Peligotschen Rohr verbundenen Destillationskolben mischt man ca. 25 ccm Harn mit ca. 10 g Natriumchlorid + 1 g Natriumkarbonat (dabei muß deutliche alkalische Reaktion vorhanden sein). Der Kolben wird auf ein Wasserbad gesetzt. In das mit Eiswasser gekühlte Peligotsche Rohr läßt man etwa 20 ccm  $\frac{n}{10}$  Schwefelsäure und einige Tropfen Rosolsäure hineinfließen und verbindet es dann mit der Wasserstrahlpumpe.

Sofort evakuiert man bis zu einem Vakuum von 25 bis 30 mm Quecksilber, und nun läßt man, um spätere Bildung von Schaum zu verhindern, durch den am Kolben angebrachten Trichter, der mittels eines Quetschhahns mit einem zu einer Kapillare ausgezogenen Rohr verbunden ist, 20 ccm absoluten Alkohol hineinfließen. Das Wasserbad wird dann auf eine Temperatur von 43 bis 45° erhitzt. Man destilliert ca. 40 bis 50 Minuten lang, indem man von Zeit zu Zeit etwa 10 bis 15 ccm Alkohol zuläßt. Nach dieser Zeit ist aller Ammoniak in die Säure übergegangen und man titriert mit  $\frac{n}{10}$  Natronlauge zurück.

Die Kresole wurden nach dem von Koßler und Penny angegebene und von Neuberg <sup>2)</sup> modifizierten Verfahren bestimmt.

<sup>1)</sup> A. Schittenhelm, Zur Methodik der Ammoniakbest. Ztschr. f. physiol. Chem. **89**, 73. 1903.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seyler-Thierfelder, Handbuch der phys.-chem. Analyse 1903, S. 438.

Was die Indikanbestimmung anbetrifft, so habe ich die Methode von Wang<sup>1)</sup> angewendet, die in folgender Ausführung besteht: 100 ccm Harn wurden mit 100 ccm Wasser + 20 ccm Bleisubacetat versetzt; dann auf 300 ccm mit Wasser aufgefüllt. Vom Filtrat mischt man 100 ccm mit 100 ccm Obermayer'schem Reagens (1000 ccm rauch. Salzsäure + 3 bis 4 g Eisenchlorid) und läßt die Mischung ca. 8 bis 10 Minuten stehen. Dabei wird das Indikan zu Indigo oxydiert, das man mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformlösung wird nach Maillard<sup>2)</sup> zur Reinigung mit gleichen Teilen stark verdünnter NaOH-Lösung (1 pro Mille) geschüttelt, von der Natronlauge getrennt und abdestilliert. Der Rückstand wird dann in 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure auf dem Wasserbad gelöst und noch einige Zeit daselbst digeriert. Man gießt dann die Lösung in ca. 100 ccm Wasser und titriert das Indigblau mit verdünnter, auf Oxalsäure eingestellter Kaliumpermanganatlösung (von einer ca. 3<sup>o</sup>/<sub>100</sub> Mutterlösung, die Monate lang haltbar ist, wird für jede Titrierung eine <sup>5</sup>/<sub>200</sub> Lösung frisch hergestellt).

Die Bestimmungen von Ammoniak, Stickstoff, Indigo wurden täglich vorgenommen. Zur Kresolbestimmung wurde ein aliquoter Teil des Harns jeder einzelnen Periode verwendet.

Am Ende des Experiments hatte der Hund nach unbedeutlichen Schwankungen um 160 g abgenommen.

Die Versuche wurden in drei Reihen angestellt. Die erste Reihe ergab die in nachstehender Tabelle dargestellten Resultate. In der zweiten Versuchsreihe habe ich noch einmal die quantitative Bestimmung der ausgeschiedenen Kresole wiederholt und speziell ihre Paarung mit Schwefelsäure und Glukuronsäure studiert. In der dritten Versuchsreihe habe ich den Einfluß der Kohlehydratfütterung auf die Glukuronsäureausscheidung untersucht.

---

<sup>1)</sup> Wang, Ztschr. f. physiol. Chem. **25**, 406. 1898 und **27**, 135. 1899. Siehe auch Ellinger, Ztschr. f. physiol. Chem. **38**, 178. 1903; Salkowski a. a. O. und Grosser, Ztschr. f. physiol. Chem. **44**, 321. 1905.

<sup>2)</sup> Maillard, Über die Entstehung der Indoxylfarbstoffe und die Bedeutung des Harnindoxyls. Ztschr. f. physiol. Chem. **41**, 437. 1904.

## Versuchsreihe I.

Harnmenge pro Tag 400 ccm	Versuchsperiode	Dauer des Versuchs	Eingeführte Substanz	Stickstoffzufuhr	Stickstoffausfuhr im Harn	Ammoniak Durchschnittsmenge pro Tag	Indigo Durchschnittsmenge pro Tag	Kresole	
								Durch Destillation des Harns wiedergefundene Menge	Prozentual berechnet
	Vorperiode	4 Tage	—	34,8	34,37	0,389	6,45	0	—
	I. Fütterungsperiode	4 Tage	1 g m-Kresol täglich	33,39	29,4	0,248	8,35	1,768	46,5
	Ruhe	2 Tage	—	16,46	16,29	0,312	8,9	0	—
	II. Fütterungsperiode	3 Tage	1 g o-Kresol täglich	24,96	22,96	0,284	16,0	0,907	30,2
	Ruhe	3 Tage	—	24,20	23,78	0,328	11,0	0	—
	III. Fütterungsperiode	3 Tage	1 g p-Kresol täglich	25,40	24,67	0,350	10,2	0,705	23,5
	Ruhe	3 Tage	—	25,20	25,66	0,414	10,0	0	—

Bemerkungen. Im normalen Hundeharn konnte ich keine Kresole bzw. Phenole nachweisen. Die Ausscheidung der Kresole war immer innerhalb 24 Stunden beendet. In dem Harn der Ruheperiode wurden niemals Kresole konstatiert; ebensowenig in den Fäces nach Kresol-fütterung. Die verabreichte Menge wurde, wie man sieht, aus dem Darmtraktus völlig resorbiert.

Bei der Betrachtung der Zahlen für die N-Ausscheidung in Harn sieht man, daß sie regelmäßig in den Fütterungsperioden etwas geringer sind, als in den Ruheperioden, vermutlich, weil die Ausnutzung des Eiweiß im Darmkanal etwas beeinträchtigt ist.

In bezug auf die täglich gebildete Ammoniakmenge beobachtet man folgende Tatsache: während in der Vorperiode die durchschnittliche Ammoniakausscheidung pro Tag 0,389 g beträgt, sinkt sie unter dem Einfluß des m-Kresols auf 0,248 g herab. Sie steigt dann wieder in der nachfolgenden Ruheperiode bis zu 0,312 g, vermindert sich bis zu 0,284 g unter der Wirkung des o-Kresols, erreicht aber 0,328 g in der Ruheperiode.

Endlich findet man nach Verfütterung von p-Kresol, 0,35 g Ammoniak täglich, das dann in der Nachperiode noch auf 0,404 g steigt.

Was die Deutung dieser Verminderung der Ammonsalze des Harns in den Fütterungsperioden betrifft, so könnte man daran denken, hierin einen Effekt der antiseptischen Wirkung der Kresole zu sehen. Dies ist indessen doch unwahrscheinlich, da die Verabreichung von Ammoniumkarbonat beim Hunde keine Zunahme der Ammonsalze im Harn bewirkt, und gerade bei Pferden und Rindern, die sicher eine starke Ammonbildung infolge der Fäulnis im Darm zeigen, der Gehalt des Harns an Ammonsalzen sehr gering ist. Die Erklärung liegt vielleicht darin, daß die Kresole im Organismus die zweiwertige Schwefelsäure zum Teil in die einwertige Ätherschwefelsäure umwandeln; dadurch also im Organismus den Bedarf an Alkali zur Neutralisation der Säuren herabsetzen. Damit steht in Einklang, daß die Verminderung im Ammoniakgehalt des Harns am geringsten ausgesprochen ist beim p-Kresol, weil dieses zum Teil in p-Oxybenzoesäure übergeht, die ihrerseits wiederum Alkali zur Neutralisierung braucht.

Weniger lehrreich sind die Indigozahlen. Nur so viel sieht man, daß nach m- und o-Kresoldarreichung die ausgeschiedene Indigomenge vermehrt ist. Man findet immer größere Werte als in den entsprechenden Ruheperioden. So hat man 6,45 mg pro Tag in der Vorperiode gegenüber 8,35 mg nach m-Kresol; 8,9 mg in der Ruheperiode gegenüber 16 mg nach o-Kresol; jedoch ist nach p-Kresol der Unterschied nicht mehr so deutlich vorhanden: 11 mg nach p-Kresol und 10 mg in der Ruheperiode.

Ich gehe jetzt über zu den Resultaten der quantitativen Bestimmung der unverändert ausgeschiedenen Kresole.

Es wurde von der gefütterten Menge, bei m-Kresol 46,5 bis 50 %, bei o-Kresol 30,2—35 %, bei p-Kresol nur 23 bis 27 % wieder gefunden.

Es geht daraus hervor, daß, je giftiger das Kresol ist, es desto mehr im Körper verbrannt wird, oder mit anderen Worten: die Angreifbarkeit des Moleküls steigt mit seiner Toxizität.

Aus der Tatsache, daß, wie Baumann und Preuße fanden, keine Zwischen-Oxydationsprodukte im Harn für m-Kresol, und

Oxydationsprodukte des o- und p-Kresol nur in sehr kleinen Mengen vorhanden sind, und aus den oben angeführten Zahlen folgt, daß der Rest eine sehr weit gehende Verbrennung im Körper erfährt.

Die Ausscheidung der Kresole ist binnen 24 Stunden vollständig beendet. In dem Harn des ersten Tages ohne Kresolverfütterung ist kein Kresol mehr nachzuweisen.

Ich habe weiter verfolgt, in welchen Verhältnissen die Kresole sich mit Schwefelsäure und mit Glukuronsäure paaren. Zu diesem Zweck habe ich für die Vorperiode und die m-Kresolperiode die Menge der Gesamtschwefelsäure und der Ätherschwefelsäure bestimmt und folgende Werte gefunden:

## Versuchsreihe II.

Harnmenge pro Tag 400 ccm	Gesamt- Schwefelsäure		Äther- Schwefelsäure		Kresol	
	Durchschnitt pro Tag	In 3 Tagen aus- geschie- dene Menge	Durchschnitt pro Tag	In 3 Tagen aus- geschie- dene Menge	Wieder- gefundene Menge	Prozent
Vorperiode 1 Tag .	0,9544	—	0,0505	—	0	—
3 Tage m-Kresol je 1 g pro Tag . .	0,828	2,4792	0,552	1,65	1,505	50,17 %
Desgl. o-Kresol 3 g	—	—	—	—	1,0536	35,12 %
Desgl. p-Kresol 3 g	—	—	—	—	0,816	27,2 %

Ich habe nun berechnet, wie viel Schwefelsäure für 1,505 m-Kresol zur Paarung theoretisch nötig war und 1,37 gefunden. Die Analyse gab 1,65; also 0,28 mehr. Der Überschuß der Ätherschwefelsäure ist an andere Körper im Harn gebunden. Aber die durch Analyse gefundene Menge konnte nicht insgesamt dem Kresol entsprechen, weil ein kleiner Teil mit Glukuronsäure gepaart war. Es ist deswegen unmöglich, nach der gefundenen Ätherschwefelsäure zu berechnen, wie viel Kresol sich mit ihm paart, und aus diesem Grunde habe ich auf die weitere Bestimmung der Schwefelsäure bei den anderen Kresolen verzichtet.

Hinsichtlich Glukuronsäure ist zuvörderst zu bemerken, daß ich normalen Hundeharn in meinen Versuchen immer optisch

inaktiv gefunden habe<sup>1)</sup>. Nach Kresolgabe findet man Linksdrehung und zwar — 0,2 % für m-Kresol; — 0,3 % für o-Kresol; — 0,4—0,5 % für p-Kresol (im Halbschattenapparat, auf Traubenzucker berechnet). Die Orcin- und die Phloroglucinprobe waren für m- und o-Kresole negativ, vor und nach dem Kochen mit Säure. Nach p-Kresol war vor der Spaltung die Orcinprobe negativ; die Phloroglucinprobe positiv; nach der Spaltung fielen beide positiv aus. Keines von den drei Kresolen reduziert Fehlingsche Lösung, wie schon Külz a. a. O. beobachtet hat.

Die bisher berichteten Versuche sind an einem mit Eiweiß und Fett gefütterten Tier gewonnen. Schon Cafiero<sup>2)</sup> hat aber beobachtet, daß bei der Kohlehydratfütterung die zur Paarung gebildete Glukuronsäure vermehrt ist und die Menge der organisch gebundenen Schwefelsäure herabgesetzt wird.

v. Fenyvessy<sup>3)</sup> konnte jedoch nicht durch Verfütterung von Traubenzucker die Glukuronsäure erhöhen; seine Versuche schienen aber Hildebrandt<sup>4)</sup> nicht beweisend, weil v. Fenyvessy zu seinen Versuchen Substanzen benutzte, die nur zum kleinen Teile die Paarung mit Glukuronsäure eingehen. Das ist eben mit Kresolen der Fall. Deshalb war es interessant, zu untersuchen, ob die Kresole bei der Kohlehydratfütterung imstande sind, die Glukuronsäureausscheidung zu vermehren.

Nach dem letzten p-Kresol-Tag folgte eine zweitägige Ruheperiode. Dann wurde der Hund drei Tage lang mit 50 g gekochtem Reis gefüttert und bekam wieder täglich 1 g p-Kresol. Der Harn zeigte eine Linksdrehung von — 0,8—0,9 %, gab nicht die Orcin-, aber sehr schön die Phloroglucinprobe, reduzierte nicht die Fehlingsche Lösung. Für die Spaltung wurden 100 ccm Harn mit 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt und in einer Druckflasche bei 100° 1½ Stunden lang im Koch-

<sup>1)</sup> Die Farbe der verschiedenen Harne war immer so dunkel, daß die Untersuchung der optischen Aktivität ohne partielle Entfärbung durch Tierkohle nicht möglich war.

<sup>2)</sup> Cafiero, Zur Kenntnis der Phenolausscheidung durch den Harn. *La clin. moderna* 1902, Nr. 13. Vgl. noch Maly, Jahresbericht für Tierchemie 1902, S. 314.

<sup>3)</sup> von Fenyvessy, *Arch. internat. de Pharmacodynamie* 12, 1904. Vgl. noch Maly, Jahresbericht f. 1904, 84.

<sup>4)</sup> Hildebrandt, Zur Frage der glykosidischen Struktur gepaarter Glukuronsäure. *Hofmeisters Beiträge* 7, 442.

topf gekocht. Der Harn zeigte alsdann eine Rechtsdrehung von 0,2 % und auch die Orcinprobe war positiv\*).

Fassen wir kurz die Resultate dieser Arbeit zusammen, so kommt man zu folgenden Schlüssen:

1. Die Giftigkeit der drei isomeren Kresole ist das Ausschlaggebende bei ihrem Verhalten im tierischen Organismus.

• So werden von den eingegebenen Kresolen ihrer steigenden Giftigkeit nach 50—53 % für m-Kresol; 65—69,8 % für o-Kresol; 73—76,5 % im Körper verbrannt.

2. Die Kresole bewirken eine Abnahme des Gehaltes des Harns an Ammonsalzen.
3. Die Paarung der Kresole findet in erster Linie mit Schwefelsäure statt; in kleinen Mengen auch mit Glukuronsäure, ohne daß man quantitativ die entstehenden Teile bestimmen kann. Die Paarung mit Glukuronsäure steigt etwas mit der Giftigkeit der drei Isomeren.
4. Ebenso steigt die gebildete Glukuronsäuremenge nach Kresoldarreicherung bei Verfütterung mit Kohlehydraten.

Herrn Prof. E. Salkowski bin ich für die Anregung zu dieser Arbeit und seine liebenswürdige Unterstützung zu größtem Danke verpflichtet.

---

\*) Ich erinnere hier an die von verschiedenen Seiten<sup>1)</sup> beobachtete Vermehrung der Glukuronsäure nach Vergiftungen mit Lysol (Gemisch von Phenol und Kresolen). Ich möchte aber bemerken, daß hierbei zu unterscheiden ist, ob die Vermehrung der Glukuronsäure nur eine absolute ist, entsprechend der größeren Menge der zu bindenden giftigen Substanz, oder auch eine relative, wobei die Glukuronsäure auf Kosten der Schwefelsäure zunimmt.

Blumenthal (a. a. O.) nimmt die zweite Möglichkeit an, da er beobachtete, daß bei solchen schweren Vergiftungen die Gesamtschwefelsäure heruntergeht und es sich um eine Störung in der Oxydationsfähigkeit des Schwefels im Organismus handelt.

---

<sup>1)</sup> F. Blumenthal, Chemie der Lysolvergiftung. Diese Zeitschr. 1, 135. 1906. Vgl. auch Wohlgemuth, Zur Kenntnis der Lysolvergiftung. Berl. klin. Wochenschr. Nr. 17, 1906.

# Über Diffusion von Enzymen durch Cellulosemembrane.

Von

**A. J. J. Vandeveld** (Gent-Belgien).

*(Eingegangen am 7. August 1906.)*

Gleichzeitig mit den Untersuchungen von H. Dewaele und E. Sugg<sup>1)</sup> und infolge ihrer Bitte habe ich die Diffusion einiger Enzyme durch Cellulosewandungen geprüft, und zwar an einer bestimmten Celluloseart, den von Leune-Paris gefertigten Hülsen. In dieser Zeitschrift hat jüngst M. Jacoby<sup>2)</sup> hochbedeutende Untersuchungen über Diffusion des Labs und Pepsins nach der Dialyseanordnung von von Calcar mit Amnionmembranen berichtet. Die Lektüre dieser Mitteilung veranlaßt mich, meine Untersuchungen kurz zu veröffentlichen.

Die folgenden Enzyme sind mit den Leuneschen Cellulosehülsen und auch mit Schweinedarmmembranen untersucht: Invertin, Maltase, Lab, Zymase und Katalase.

## I. Invertin.

Es wurde eine Lösung von 5 G.-V.- $\%$  Saccharose bereitet, welche mit dem Laurentschen Polarimeter eine Ablenkung von 31,8 Saccharimetergrade zeigte. Es wurden 240 ccm dieser Lösung in ein Becherglas gebracht, und in eine Cellulosehülse, welche in die Lösung eintauchte, 40 ccm einer 0,1  $\%$ igen Invertinlösung gegossen. Die Flüssigkeiten hatten im Becherglas

---

<sup>1)</sup> Sur la production de l'immunité par la méthode des sacs de collodion. Soc. Biol. Paris, 30. Dez. 1904.

<sup>2)</sup> Über die Beziehungen der Verdauungswirkung und der Labwirkung. Diese Zeitschr. 1, 53. 1906.



und in der Hülse dieselbe Höhe, und damit waren alle äußeren Druckerscheinungen ausgeschlossen.

Zugleich wurde ein Kontrollversuch ausgeführt, in dem sich 40 ccm Wasser in der Hülse, und 240 ccm Saccharoseauflösung in dem Becherglase befanden.

Nach 20stündigem Stehen bei Laboratoriumstemperatur wurde die Saccharoselösung polarimetrisch untersucht:

Mit Invertin = 25,3 Saccharimetergrade,  
ohne Invertin (Kontrolle) = 27,6 Saccharimetergrade.

Nach 26 Stunden:

Mit Invertin = 24,0 Saccharimetergrade,  
ohne Invertin = 26,2 Saccharimetergrade.

Nun wurde die Saccharoseauflösung des Becherglases, in welches die Hülse mit der Invertinlösung eintauchte, in zwei Teile geteilt, einen ersten Teil ohne Hülse, einen zweiten Teil mit der Hülse.

Nach 24stündigem Stehen wurde gefunden:

Erster Teil früher mit Invertin, nachher ohne Invertin:  
= 24,0 Saccharimetergrade,  
zweiter Teil, mit Invertin zusammen geblieben,  
= 18,0 Saccharimetergrade,  
ohne Invertin (Kontrolle) = 26,2 Saccharimetergrade.

Daraus kann geschlossen werden: 1. daß nach 26 Stunden die Saccharosediffusion durch die Cellulose eine vollständige ist; 2. daß durch die Cellulose kein Invertin zu diffundieren vermag, daß die Enzymwirkung allein im Innern der Hülsen vor sich geht, und daß nachher der Invertzucker aus der Hülse in die umgebende Rohrzuckerlösung hineindiffundiert.

Ein ähnliches Experiment wurde auch mit Schweinedarm angestellt und führte zu dem Schluß, daß das Invertin leicht hindurch zu diffundieren vermag. Nicht allein wenn die Hülse in die Zuckerflüssigkeit tauchte, sondern auch nach Trennung der Lösung von der Enzymhülse, wurde ein Fortschreiten der Inversion konstatiert; das Invertin dringt folglich leicht durch die Darmmembran.

## II. Maltase.

Die Maltaseauflösung wurde nach van Laer<sup>1)</sup> aus 100 g Gerstenmalz und 450 ccm Wasser bereitet. Die filtrierte Auflösung wurde in eine Cellulosehülle gebracht und in eine 1%ige Kartoffelstärkelösung eingetaucht, bis die beiden Flüssigkeiten dieselbe Höhe besaßen. Ich habe 50 ccm Maltase- und 300 ccm Stärkeauflösung benutzt. Die zwei Auflösungen waren noch mit einigen Chloroformtropfen versetzt, um eine Bakterienentwicklung zu vermeiden.

Als Kontrolle dienten: 1. eine direkte Mischung der Stärke mit der Maltaseauflösung; 2. eine Stärkeauflösung, in die eine Schweinedarmhülle mit Maltase tauchte. Nach 20 Stunden war die Stärke in diesen beiden Proben ganz verschwunden; in dem Experiment mit der Cellulosehülle dagegen war die Stärke unverändert geblieben, und selbst nach drei Tagen konnte keine Verzuckerung konstatiert werden.

Damit ist bewiesen, daß die Maltaseenzyme durch die Cellulose, nicht wohl aber durch die Darmmembran diffundieren.

## III. Labferment.

Auf gleiche Weise, wie die beiden vorigen Enzyme, wurde das Labferment untersucht; ich benutzte in der Cellulosehülle das flüssige Labpräparat von van Hasselt-Rotterdam.

Die Hülle tauchte in zentrifugierte, rohe, mit Wasserstoff-superoxyd versetzte Milch. Nach vier Tagen konnte noch keine Koagulation beobachtet werden. Dagegen fand bei Laboratoriumtemperatur nach 20 Stunden eine vollständige Koagulation statt, wenn die Milch mit dem Enzym direkt vermischt wurde.

Auch auf andere Weise wurde konstatiert, daß das Labenzym durch Cellulose nicht diffundiert. Die Hülle mit Labenzym ließ ich während zwei Tage in destilliertes Wasser tauchen. Das Wasser wurde dann mit der  $H_2O_2$  enthaltenden Milch versetzt, ohne daß nach mehreren Tagen eine Koagulation eintrat.

Sehr leicht diffundiert dagegen das Labenzym durch die Darmmembran. Die Milchkoagulation trat rasch und regelmäßig ein.

<sup>1)</sup> Bull. denrées alimentaires, 1901, S. 250.

#### IV. Zymase.

Ich untersuchte die Zymase nicht selbst, wohl aber in Form von Hefezellen. Die Hefe wurde mit Wasser vermischt und in diesem Stande in die Hülse eingebracht. (Temperatur = 25° C).

Es wurden im Becherglase 500 ccm einer 5%igen Glukoseauflösung, in der Hülse 40 ccm einer 4%igen Hefeauflösung benutzt. Als Kontrolle diente 500 ccm der Zuckerauflösung, und 40 ccm Wasser. Die Untersuchung geschah polarimetrisch mit dem Laurentschen Apparat in einer 20 cm langen Röhre.

Gefunden wurde am Anfang der Untersuchung:

4° 54' polarim. oder 22,5 Saccharimetergrade;

nach 5 Stunden:

Glukose und Hefe: 22,0 Saccharimetergrade,

Glukose ohne Hefe (Kontrolle): 22,3 Saccharimetergrade;

nach 29 Stunden:

Glukose und Hefe: 19,9 Saccharimetergrade,

Glukose ohne Hefe: 21,6 Saccharimetergrade.

Die Flüssigkeit wurde nun abgetrennt und blieb 24 Stunden ohne Hülse; die polarimetrische Untersuchung zeigte, daß keine Gärung mehr eingetreten und daß folglich kein Enzym in die Flüssigkeit durch die Wandung dialysiert war.

Durch die Cellulosemembranen diffundierte die Glukoseauflösung allein, und später auch der Alkohol, welcher in der Hülse entstanden war.

Die selben Ergebnisse, aber in viel kürzerer Zeit, bekam ich mit einer Darmmembran. Da ich keiner Zymase besaß, konnte ich die isolierten Enzyme selbst nicht untersuchen. Die Abwesenheit der Enzyme in den gärungsfähigen Flüssigkeiten und die Anordnung der Buchnerschen Versuche beweisen hinreichend, daß die Zymase durch die Zellen-(Cellulose-)Membrane nicht zu diffundieren vermag.

#### V. Katalase.

Als Katalaseauflösung diente lackfarbenes, defibriniertes Rinderblut, aus einem Volumen Blut und fünf Volumina Wasser bereitet. Die rote Flüssigkeit wurde in die Cellulosehülse gegossen, welche in ein mit Wasser gefülltes Becherglas tauchte.

Selbst nach fünf Tagen konnte ich die wohlbekannte Katalase-reaktion mit Wasserstoffhyperoxyd in der Außenflüssigkeit nicht bekommen, dagegen schon nach einem Tag, wenn die Cellulosewandung durch eine Darmwand ersetzt wurde.

Blutkatalase diffundiert demnach nicht durch Cellulose, wohl aber durch die tierischen Membranen.

Diese kurzen Untersuchungen haben zu der Schlußfolgerung geführt, daß die untersuchten Enzyme durch Cellulosemembranen nicht diffundieren und sich in dieser Hinsicht nicht wie die Toxine und Antitoxine verhalten. Diese Erscheinungen sind von denen an den tierischen Darmmembranen ganz verschieden.

---

# Beitrag zur Kenntnis des Schicksals des Cholesterins und der Cholesterinester im tierischen Organismus.

Von  
**Hugo Pribram aus Prag.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts  
der Universität zu Berlin.)

*(Eingegangen am 8. August 1906.)*

Das Cholesterin hat in der letzten Zeit durch eine Reihe chemischer und biologischer Forschungen an Interesse gewonnen, und es ist vor kurzem gelungen, wenigstens teilweise seine Bedeutung für den tierischen Organismus aufzudecken.

Ransom<sup>1)</sup> war es, der zuerst nachwies, daß zwischen Cholesterin und Saponin eine gewisse Beziehung besteht, derart, daß Cholesterin enthaltende Gewebe Saponin in irgend welcher Weise zu binden vermögen. Daher sind die Erythrocyten vermöge ihres Gehaltes als Cholesterin gegen Saponin empfindlich, während das Serum, das gleichfalls Cholesterin enthält, die Erythrocyten zu schützen vermag.

Pascucci<sup>2)</sup> fand, daß etwa  $\frac{1}{3}$  der Trockensubstanz des Stromas der Erythrocyten aus Cholesterin und Lecithin besteht. Aus verschiedenen Gründen sprach er sich für eine membranartige Struktur des Stroma aus. Dieser Vorstellung entsprechend machte er Versuche mit künstlichen Blutkörperchen, deren eine Wand Seidenstoff, imprägniert mit Cholesterin, Lecithin, beziehungsweise beiden Substanzen, bildete. Er prüfte die Durch-

---

<sup>1)</sup> Ransom, Saponin und sein Gegengift. Deutsche med. Wochenschr. 1901, S. 194.

<sup>2)</sup> Pascucci, Zusammensetzung des Blutscheibenstromas und die Hämolyse. Hofmeisters Beitr. 6, 543 u. 552.

lässigkeit der Membran verschiedenen Giften gegenüber und fand, daß dieselbe mit der Abnahme des Cholesteringehaltes wuchs.

Hausmann<sup>1)</sup> untersuchte zuerst, welche Veränderungen im Cholesterinmolekül seine antihämolytische Wirkung zu beeinflussen vermögen, und fand, daß bei Ersatz der Hydroxylgruppe durch andere Atomgruppen diese Eigenschaft des Cholesterins schwand, bei Aufhebung der doppelten Bindung dagegen bloß geschwächt wurde. Phytosterin verhielt sich wie Cholesterin.

Abderhalden und Le Count<sup>2)</sup> bestimmten dann die Beeinflussung der durch Cobragift, Tetanustoxin, Saponin und Solanin hervorgerufenen Hämolyse durch dem Blute zugesetzte Lösungen von Cholesterin verschiedener Provenienz und von dem Cholesterin mehr oder weniger nahestehenden Verbindungen.

Alle diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß dem Cholesterin eine gewisse entgiftende Rolle zukommt, und die Vermutung erscheint nicht unbegründet, daß es geeignet ist, den Organismus vor der Einwirkung endogener (vielleicht kommen hier die gallensauren Salze bei Icterus in Betracht) oder von außen zugeführter hämolytisch wirkender Substanzen zu schützen<sup>3)</sup>. Es drängt sich nun die Frage auf, welches die Quelle und welches das Schicksal des Cholesterins im Organismus ist. Bekanntlich enthalten alle Gewebe Cholesterin, in erster Linie die Leber vermöge ihres Gehaltes an Galle und das Gehirn. Seit den Untersuchungen von Bondzyński und Humnicki<sup>4)</sup> wissen wir ferner, daß der Mensch täglich ca. 1 g Koprosterin (= Dihydrocholesterin) ausscheidet.

Woher stammt nun das Cholesterin, wird es mit der Nahrung zugeführt und kann solches eingeführtes Cholesterin überhaupt resorbiert werden?

<sup>1)</sup> Hausmann, Über die Entgiftung des Saponins durch Cholesterin. Hofmeisters Beitr. **6**, 567. 1905.

<sup>2)</sup> Abderhalden und Le Count, Die Beziehungen zwischen Cholesterin, Lecithin und Cobragift, Tetanustoxin, Saponin und Solanin. Ztschr. f. exper. Path. u. Ther. **2**, 199. 1906.

<sup>3)</sup> Salkowski, Vortrag in der Gesellsch. d. Charitéärzte 1. Februar 1906. Ref. in der Berliner klin. Woch. No. 14, S. 434. 1906.

<sup>4)</sup> Bondzyński und Humnicki, Über das Schicksal des Cholesterins im tierischen Organism. Ztschr. f. physiol. Chem. **22**, 396. 1896/7.

In dieser Richtung hat Jankau<sup>1)</sup> interessante Untersuchungen angestellt. Er fand, daß per os eingeführtes Cholesterin resorbiert wird, ohne daß 6 Stunden nach der Darreichung eine Vermehrung des Gehaltes von Blut und Leber nachzuweisen wäre.

Ein Teil des verfütterten Cholesterins fand sich in den Fäces wieder. Daß wirklich eine Resorption eintrat, wies er dadurch nach, daß er nicht alles eingeführte Cholesterin in den Fäces wiederfinden konnte. Seine Versuche mit subkutan appliziertem Cholesterin ergaben, daß dieses an der Injektionsstelle nicht mehr nachweisbar war; es wurde somit auch bei diesem Verfahren das Cholesterin resorbiert.

Stadelmann<sup>2)</sup> schließt einen Kreislauf des Cholesterins aus. Auch Thomas<sup>3)</sup> findet, daß nach Verfütterung der Gehalt der Galle sich nicht ändert. Ähnliche Angaben rühren von Doyon und Dufour<sup>4)</sup> her.

Dies wären die wichtigsten einschlägigen Beobachtungen, größtenteils aus der älteren Literatur.

Was den normalen Gehalt der einzelnen Organe an Cholesterin betrifft, so wollen wir aus der Zahl der durchaus nicht übereinstimmenden Angaben folgende herausgreifen:

In der Galle: bis 5,6% Cholesterin (Neumeister<sup>5)</sup>).

Im Muskel (in trockenem Zustand) 0,23% (Dormeyer<sup>6)</sup>).

Im Harn äußerst selten, geringe Mengen.

Im Blut:

- a) Erythrocyten: 0,151% (beim Menschen, bezogen auf die organische Substanz d. Erythr., Manasse<sup>7)</sup>);  
0,072% (beim Kaninchen, Abderhalden<sup>8)</sup>);

---

<sup>1)</sup> Jankau, Über Chol.- u. Kalkausscheidung mit der Galle. Arch. f. exper. Path. **29**, 237. 1891.

<sup>2)</sup> Stadelmann, Über d. Kreislauf d. Galle im Organism. Ztschr. f. Biolog. **34**, 62. 1896.

<sup>3)</sup> Thomas, Dissert. Straßburg zitiert nach Magnus-Levy im Handbuch der Stoffwechselkrankh. v. Noorden.

<sup>4)</sup> Doyon und Dufour, Elim. de la chol. par la bile. Arch. de physiol. VIII, 587. Ref. in Virchow Jahresber. **1896**. 132.

<sup>5)</sup> Neumeister, Physiol. Chem. II. Aufl.

<sup>6)</sup> Dormeyer, zit. nach Neumeister a. a. O.

<sup>7)</sup> Manasse, Über d. Lecith. u. Chol. d. rot. Blutkörper. Ztschr. f. physiol. Chem. **14**, 437. 1890.

<sup>8)</sup> Abderhalden, Zur quant. vergleich. Blutanal. Ebenda **25**, 65. 1898.

- 0,275 % (beim Pferd, bezogen auf Trockensubst. Hepner)<sup>1)</sup>;  
 0,552 % (beim Hund, " " " Hepner)<sup>1)</sup>;  
 b) Serum: 0,0547 % (beim Kaninchen, Abderhalden)<sup>2)</sup>;  
 0,216 % (bei Pneumonie-Kranken, Hoppe-Seyler)<sup>3)</sup>;  
 c) Gesamtblut: 0,0611 % (beim Kaninchen, Abderhalden)<sup>2)</sup>;  
 0,0445 bis 0,0751 % (beim Menschen, Flint)<sup>4)</sup>;  
 0,147 % (Vena portae) } Drosdoff<sup>5)</sup>.  
 0,341 % (Ven. hepat.) } (Durchschnittswerte).

Im Tierfett konstant Cholesterin.

Im Nervensystem:

- a) Nerv. ischiad: 5,61 % (beim Menschen, in getrocknetem Zustand, Chevalier)<sup>6)</sup>;  
 b) Hirn: 1. weiße Subst.:  $\alpha$ ) frei: 1,8192 % } beim Pferde  
 $\beta$ ) gebunden: 2,6958 % } bezogen auf  
 2. graue Subst.:  $\alpha$ ) frei: 0,63 % } die feuchte  
 $\beta$ ) gebunden: 1,7505 % } Subst.  
 Baumstark<sup>7)</sup>

Die meisten Untersucher nahmen keine Rücksicht auf die Frage: ist das Cholesterin als solches oder in gebundenem Zustande vorhanden?

Baumstark<sup>7)</sup> versuchte zwar beim Gehirn (s. o.) beide Formen getrennt zu bestimmen, seine Befunde erfuhren jedoch durch Bünz<sup>8)</sup> eine Widerlegung, der mittels einer anderen Methode nachwies, daß im Hirn keine durch Verseifung spaltbare Verbindungen des Cholesterins vorhanden sind, die obige Unterscheidung also nicht begründet ist. Hürthle<sup>9)</sup> untersuchte das Blutserum auf Ester und kam zu folgenden Zahlen, die aber, wie er selbst angibt, etwas zu niedrig sind:

<sup>1)</sup> Hepner, Über d. Chol.-Gehalt d. Blutkörp. Pflüg. Arch. **73**, 595. 1898.

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

<sup>3)</sup> Hoppe-Seyler, Über Seifen als Bestandteil d. Blutplasma u. d. Chyl. Ztschr. f. physiol. Chem. **8**, 506. 1883/4.

<sup>4)</sup> Flint, New-York med. Journ. **65**, 752. 1897.

<sup>5)</sup> Drosdoff, Vergleich. Anal. d. Blutes d. V. port. u. der V. hep. Ztschr. f. physiol. Chem. **1**, 232. 1877/8.

<sup>6)</sup> Chevalier, Chem. Untersuch. d. Nervensubst. Ebenda **10**, 97. 1886.

<sup>7)</sup> Baumstark, Über eine neue Meth. d. Gehirn chem. zu erforschen usw. Ebenda. **9**, 145. 1885.

<sup>8)</sup> Bünz, Über das Vorkommen von Cholest.-Esteren im Gehirn. Ebenda **46**, 47. 1905.

<sup>9)</sup> Hürthle, Über d. Fettsäure-Ester d. Blutser. Ebenda **21**, 331. 1895/6.



1. Hundeserum, nach einer Hungerperiode einmal 0,22%, ein andermal 0,20%, nach verschiedener Fütterung: 0,13, bzw. 0,12 und 0,18% Ölsäureester. Er fand demnach nach dem Hungern mehr Ester, als nach mehr oder minder reichlicher Fütterung.
2. Pferdeserum: 0,08% Ölsäure- und 0,006% Palmitinsäureester.
3. Kälberserum: 0,09% Ölsäure- und 0,008% Palmitinsäureester.

Was die Erythrocyten betrifft, so erschien es schon seit dem Nachweis Hoppe-Seylers<sup>1)</sup>, daß dieselben keine Fettsäuren enthalten — eine Beobachtung, die Abderhalden<sup>2)</sup> bestätigte — sicher, daß das Cholesterin nicht als Ester vorhanden sein konnte.

Zu demselben Resultate kam Wooldridge<sup>3)</sup>, der durch einfache Ätherextraktion, das Cholesterin isolieren konnte. Hepner<sup>4)</sup> fand, daß in den Erythrocyten bloß freies Cholesterin sei, während im Plasma nur ausnahmsweise solches nachweisbar wäre, sondern in der Regel bloß Cholesterinester sich daselbst vorfinden.

Ein interessanter Nebenbefund Hepners besteht darin, daß seine Versuchshunde bei Hungern oder Kohlehydratfütterung keine Änderung im Cholesteringehalt zeigten.

Auf die Schwierigkeit, Cholesterin von seinen Estern zu trennen, und auf die Möglichkeit, jene zu überwinden, kommen wir später zurück.

Was unsere Fütterungsversuche betrifft, so wurde Cholesterin, der Palmitinsäure- und der Ölsäure-Ester desselben verfüttert. Die Ester wurden nach der Methode von Hürthle<sup>5)</sup> in der von Salkowski<sup>6)</sup> modifizierten Weise dargestellt. Die Darstellung des des Ölsäureesters war folgende:

---

<sup>1)</sup> Hoppe-Seyler, Handb. d. physiol. u. path.-chem. Anal. 1865, S. 304 (zit. nach Hepner).

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

<sup>3)</sup> Wooldridge, Zur Chem. d. Blutkörper. Arch. f. Physiol. 1881, S. 389 (zit. nach Hepner).

<sup>4)</sup> a. a. O.

<sup>5)</sup> a. a. O.

<sup>6)</sup> Salkowski, Arbeiten aus dem pathol. Institut. zu Berlin 1906, Seite 573.

Es wurde ein Teil Cholesterin mit fünf Teilen (es stellte sich später heraus, daß auch das Verhältnis 1 : 2 genügt) Ölsäure im Ölbad auf 200° durch drei Stunden erhitzt. Nach dem Erkalten wurde der Rückstand im Kolben in etwa 100 cm<sup>3</sup> Äther gelöst, die Lösung in das zwei- bis dreifache Volumen eiskalten Alkohols eingegossen. Hierbei schied sich der Ester aus, der abfiltriert, durch Waschen mit Alkohol von Cholesterin und Ölsäure befreit, dann durch nochmaliges Lösen in Äther und Fällern mit Alkohol gereinigt wurde.

Als Versuchstier diente das Kaninchen, das bei den meisten Versuchen Weißkohl, bei einigen Kohlrüben als Futter erhielt. Das Cholesterin bzw. seine Ester wurden in Olivenöl emulgiert, dem Tiere mittels Schlundsonde eingespritzt. Jeden Tag wurde 1 g verfüttert und 1 bis 2 Tage nach der letzten Fütterung wurde das Tier getötet. In parenthesi sei noch bemerkt, daß wir vom Cholesterin keine Giftwirkung beobachten konnten, im Gegensatz zu den früher so viel besprochenen Erscheinungen der Cholesterämie. Vielleicht waren auch die Dosen zu gering.

Von dem noch lebenden Tiere gewannen wir das Blut durch Einschnitt in die Carotis; nach der spontanen Gerinnung wurde es als Ganzes gewogen und in der später zu schildernden Weise weiter verarbeitet.

Die Leber wurde von der Gallenblase und dem Gallengange abgelöst, sorgfältig gewaschen, dann abgetrocknet, gewogen und zerkleinert.

Die Muskeln — wir nahmen die Muskulatur der Beine —, sowie die Dünndarmwand — einschließlich des Blinddarmes — wurden in analoger Weise behandelt.

Die zerkleinerten Organe wurden in Alkohol 24 Stunden stehen gelassen, der Alkohol dann abfiltriert und die Organstückchen im Soxhletapparate 6 Stunden lang mit Äther extrahiert. Der alkoholische Extrakt wurde eingedampft, in Äther aufgenommen und mit dem ätherischen Extrakte vereinigt, sodaß nunmehr alles in Äther gelöst war. Der Äther wurde abdestilliert, dann wurde wieder in Äther gelöst und abfiltriert und diese Prozedur ein- bis zweimal wiederholt.

Hierauf wurde der ätherische Extrakt mit etwas Alkohol und konzentrierter Kalilauge 2 Stunden erhitzt; dann wurde wiederholt mit Äther ausgeschüttelt, der Äther abgehoben und

mit dieser ätherischen Lösung die Verseifung und Ausschüttelung wiederholt.

Sodann wurde der Äther abdestilliert, der Rückstand in Petroläther gelöst, filtriert, abgedampft und gewogen.

Die Reindarstellung aus den Organen war mit erheblichen Schwierigkeiten verknüpft und es mußten daher des öfteren einige Prozeduren wiederholt werden.

Nach dem Abdampfen blieb in den meisten Fällen ein schöner weißer kristallinischer Belag zurück, der die Cholesterinreaktion von Neuberg und Rauchwerger<sup>1)</sup> mit Methylfurfurol und  $H_2SO_4$  in charakteristischer Weise gab.

Doch nicht in allen Fällen waren so schöne Kristalle vorhanden, wie es beim Blute die Regel war. Beim Darminhalte und den Fäces war meist eine Verunreinigung von bräunlicher Farbe nicht zu vermeiden. Wir gaben daher die Untersuchung derselben auf.

Bezüglich des Nachweises des Cholesterins ist folgendes zu bemerken:

Es wäre wünschenswert gewesen, genau zwischen Cholesterin und seinen Estern eine Unterscheidung zu treffen; wir haben davon abgesehen, weil das von E. Salkowski<sup>2)</sup> eingeschlagene Verfahren der Verseifung ohne Schädigung der Cholesterinester bisher nicht mit hinreichender Sicherheit arbeitet. Wir haben uns also bei unseren Tierversuchen mit der einfachen Angabe: Cholesterin, ohne Rücksicht, ob es frei oder gebunden ist, begnügt.

Weiterhin wurde der a. a. O. gemachte Vorschlag, die Spaltung des Fettes durch Lipase, wobei vielleicht die Ester unangegriffen bleiben, auf seine Brauchbarkeit geprüft.

Wir verwendeten ein Ferment, das von den Rizinussamen her stammt<sup>3)</sup>.

Zu 2 g Lipase setzten wir eine Lösung von 0,5 g Palmitinsäureester in 10 g Palmöl. Letzteres ist ein aus dem Frucht-

---

<sup>1)</sup> Neuberg u. Rauchwerger, Festschr. f. Salkowski 1904, S. 279.

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

<sup>3)</sup> Das Enzym war dem Laboratorium in entgegenkommendster Weise von den Vereinigten chemischen Werken Aktienges. Charlottenburg zur Verfügung gestellt, wofür auch an dieser Stelle bestens gedankt sei.

fleisch der Ölpalme gewonnenes Präparat, das in der Wärme leicht schmilzt und den Ester gut löst.

Es ist, wie Salkowski<sup>1)</sup> nachgewiesen hat, sicher frei von Cholesterin und Phytosterin.

Zu dem Gemenge wurden noch 0,25 cm<sup>3</sup> einer 0,5 % MnSO<sub>4</sub>-Lösung zugesetzt und sodann wurde dasselbe 3 Tage lang bei Brutschranktemperatur belassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde alkalisiert, mit Äther ausgeschüttelt und abgehoben, der Äther abgedampft, der Rückstand in wenig Äther gelöst, dann das dreifache Volum Alkohol zugesetzt, auf 24 Stunden in Eis gestellt, und die sich dabei abscheidenden Kristalle abfiltriert, gewogen und durch ihren Schmelzpunkt identifiziert.

Wir fanden bei diesen noch nicht abgeschlossenen Versuchen tatsächlich den ungespaltenen Palmitinsäureester, jedoch nicht quantitativ wieder. Vorläufig können wir daher diese Methode nur für den qualitativen Nachweis der Ester verwerten.

Was nun die Resultate bei der Untersuchung der Kaninchenorgane betrifft, so sind sie aus folgender Tabelle (Seite 421) zu ersehen.

Die Tabelle ergibt, daß durch die Fütterung mit Cholesterin oder Ester der Gehalt des Blutes an Cholesterin deutlich zunimmt.

Die Untersuchung der Leber, die durch die Schwierigkeit der Reinigung sehr erschwert war, zeigt, daß der Cholesteringehalt derselben abnimmt. Wir wollen diesen so auffälligen Befund einfach anführen, ohne ausschließen zu können, daß die Zahlen hiebei einerseits durch ausgiebige Reinigungsversuche zu gering, andererseits durch etwaige Verunreinigungen zu groß ausfielen.

Die Untersuchung von Darminhalt und Fäces scheiterte an demselben Umstand, der die Untersuchung der Leber erschwerte<sup>2)</sup> und den wir bereits hervorgehoben haben. Die Zahlen, welche den Cholesteringehalt von Darmwand und Muskel anzeigen, sind sehr schwankend und zeigen keine Regelmäßigkeit.

<sup>1)</sup> Salkowski, Ztschr. f. anal. Chem. **26**, 557. 1887.

<sup>2)</sup> Es sei diesbezüglich an die Arbeit von C. Virchow (Ztschr. f. Unters. d. Nahrungs- und Genußmittel 99. 7.) erinnert, der beim Versuche, Koprosterin aus den Fäces zu isolieren, beobachtete, daß sich eine ölige, dickflüssige, nicht kristallisierende Masse ausschied.

Ver- such	Gewicht des Kan- ninchens	Fütterung	Cho- lesterin- gehalt d. Leber	Cho- lesterin- gehalt d. Blutes	Cho- lesterin- gehalt d. Darmwand	Cho- lesterin- gehalt d. Muskels
I.	2200 g			0,017 g = 0,029 %	0,027 g = 0,0183 %	
II.	2200 g			0,0175 g = 0,0275 %		
III.	1100 g	9 Tage Hunger	0,222 g = 0,592 % <sup>1)</sup>		0,3188 g = 0,549 % <sup>1)</sup>	
IV.	1500 g	4 g Öl- säure- Ester	0,0352 g = 0,069 %	0,0365 g = 0,11 %	0,2556 g = 0,393 %	
V.	1200 g	2 g Öl- säure- Ester	0,1416 g = 0,209 %	0,041 g = 0,158 %	0,0594 g = 0,057 %	
VI.	2500 g	5 g Öl- säure- Ester		0,0148 g = 0,037 %	0,066 g = 0,0526 %	
VII.	1700 g (vor d. Versuche)	6 Tage Hunger 2,5 g Öl- säure- Ester	0,0985 g = 0,246 %			
VIII.	1950 g	3 g Cho- lesterin		0,0368 g = 0,081 %	0,0426 g = 0,0298 % <sup>1)</sup>	0,0224 g = 0,021 %
IX.	1600 g	3 g Palmi- tins.-Ester	0,0868 g = 0,16 % <sup>1)</sup>	0,0252 g = 0,033 %		0,0058 g = 0,008 % <sup>1)</sup>
X.	1500 g	3 g Cho- lesterin		0,0571 g = 0,127 % <sup>1)</sup>		0,038 g = 0,0475 %
XI.	1000 g				0,0542 g = 0,076 % <sup>1)</sup>	0,0304 g = 0,049 %
XII.	1000 g	3 g Chol. Tötung nach 5 d.		0,0195 g = 0,0375 % <sup>1)</sup>		

Wir können somit als alleiniges sicheres Resultat obiger Versuche feststellen, daß das Cholesterin, bzw. seine Ester resorbiert werden und, per os eingeführt, im Blute in vermehrter Weise auftreten.

Zum Schlusse sei noch bemerkt, daß dieses an Cholesterin reichere Blut für hämolytische Versuche ein geeignetes Objekt sein dürfte, und daß auf diesem Wege vielleicht die eingangs angeführten Beobachtungen ergänzt werden könnten.

Es könnte so nicht bloß die biologische Frage nach der antihämolytischen Bedeutung des Cholesterins sondern auch

<sup>1)</sup> Das Cholesterin konnte nicht ganz rein dargestellt werden.

die physiologisch-chemische Frage, ob Cholesterin als solches oder als Ester resorbiert wird, ob hauptsächlich im Serum oder in den Blutkörperchen, auf biologischem Wege entschieden werden.

In Kürze sei ein kleiner vorläufiger Vorversuch mitgeteilt; eine weitere Verfolgung der ganzen Frage behalte ich mir noch vor. Der Versuch gestaltete sich folgendermaßen. Wir entnahmen einem Kaninchen aus der Carotis Blut, defibrinierten dasselbe und machten uns eine 5 %ige Blutlösung in physiologischer Kochsalzlösung (0,85 %). Wir hatten somit eine Lösung von Blut eines nicht mit Cholesterin gefütterten Tieres.

Einem anderen Kaninchen, das durch drei Tage mit je 1 g Cholesterinemulsion in Olivenöl gefüttert wurde, entnahmen wir vor und einen Tag nach Ablauf der Fütterungsperiode Blut, ließen dasselbe spontan gerinnen und hatten somit Serum des Tieres, bevor und nachdem es mit Cholesterin gefüttert war. Bemerkt sei noch, daß das cholesterinhaltige Serum deutlich opaleszent war. Ein Ätherextrakt desselben enthielt Fett, so daß wir annehmen mußten, es sei Olivenöl resorbiert worden. Da das Tier dauernd unter denselben Verhältnissen gehalten war, so ist wohl anzunehmen, daß, wenn wir Differenzen beim hämolytischen Versuche fanden, diese bloß auf den größeren resp. kleineren Cholesteringehalt zu beziehen seien.

Als Hämolyticum wurde Saponin. alb. pur. (Merck) verwendet, von dem wir uns eine 0,01 bzw. 0,001 %ige Lösung in physiologischer Kochsalzlösung darstellten. Die ganze Versuchsreihe wurde gleichzeitig aufgestellt.

### I. Auswertung des Saponins.

Saponin		Physiol. Kochsalz- lösung	5 % Blut- lösung	Hämolyse
%	cm <sup>3</sup>			
0,01	1		2 cm <sup>3</sup>	fast sofort komplet
0,01	0,5	0,5	2 "	rasch komplet
0,01	0,25	0,75	2 "	" "
0,01	0,1	0,9	2 "	nach 10 Min. deutlich
0,001	1,0		2 "	" " "
0,001	0,5	0,5	2 "	nach 24 h keine Häm.
0,001	0,25	0,75	2 "	" " " "
0,001	0,1	0,9	2 "	" " " "
		1,0	2 "	" " " "

II. Auswertung der hemmenden Normalserumdosis.

0,01 % Sapon- lösung	Serum	Physiol. Kochsalz- lösung	5 % Blut- lösung	Hämolyse
0,5 cm <sup>3</sup>	0,5		2 cm <sup>3</sup>	fast sofort komplet
0,5 "	0,25	0,25	2 "	" " "
0,5 "	0,1	0,4	2 "	" " "
0,5 "	0,05	0,35	2 "	" " "
0,5 "		0,05	2 "	" " "
0,5 "	2		2 "	nach 24 h komplet
0,5 "	1		2 "	nach einigen Min. deutl. geringe Häm.

III. Auswertung der hemmenden Cholesterinserumdosis.

0,01 % Sapon- lösung	Serum	Physiol. Kochsalz- lösung	5 % Blut- lösung	Hämolyse
0,5 cm <sup>3</sup>	0,5		2 cm <sup>3</sup>	nach 24 h keine Häm.
0,5 "	0,25	0,75	2 "	" " " "
0,5 "	0,1	0,4	2 "	nach einiger Zeit komplet
0,5 "	0,05	0,35	2 "	Verzögerung, kompl. 1/2 Min. nach d. Kontrolle
0,5 "		0,5	2 "	fast sofort komplet

Ein anderer in ähnlicher Weise angestellter Versuch ergab analoge Resultate. Bei diesem letzteren war das Cholesterin-serum nicht lipämisch, so daß wir eine Beeinflussung der Hämolyse durch den Fettgehalt für unwahrscheinlich halten müssen.

Vergleichen wir die Ergebnisse in Tab. II und III, so finden wir, daß, während beim Cholesterin-serum bereits 0,25 cm<sup>3</sup> eine hemmende Wirkung ausübte, das Normalserum auch in der Dosis von 2 cm<sup>3</sup>, also in der etwa achtfachen Menge noch nicht antihämolytisch wirkte.

Um auszuschließen, daß das verfütterte Öl die Hämolyse beeinflusste, wurde ein Tier neben der einfachen Kost mit Öl — jeden Tag etwa 15 cm<sup>3</sup> — durch drei Tage gefüttert und am vierten Tage getötet; die unter denselben Bedingungen, wie oben angeführt, vorgenommenen hämolytischen Versuche mit dem Serum des noch ungefütterten und des gefütterten Tieres ergaben folgende Resultate:

## IV. Auswertung des Normalserums.

0,01% Sapon- lösung	Serum	Physiol. Kochsalz- lösung	5% Blut- lösung	Hämolyse
0,5	1,0		2 cm <sup>3</sup>	nach 24 h keine Hämolyse
0,5	0,5		2 "	nach 1/2 h komplet
0,5	0,25	0,25	2 "	fast sofort komplet
0,5	0,1	0,4	2 "	" " "
0,5		0,5	2 "	" " "

## V. Auswertung des Serums nach Olivenölfütterung.

0,01% Sapon- lösung	Serum	Physiol. Kochsalz- lösung	5% Blut- lösung	Hämolyse
0,5	1,0		2 cm <sup>3</sup>	nach 24 h keine Hämolyse
0,5	0,5		2 "	nach mehreren Stund. inkompl.
0,5	0,25	0,25	2 "	nach 10 Min. komplet
0,5	0,1	0,4	2 "	fast sofort komplet
0,5		0,5	2 "	" " "

Wir glauben demnach auf Grund von Tab. IV und V die Einwirkung des verfütterten Öles auf die Hämolyse als minimal betrachten und deshalb vernachlässigen, die Ergebnisse von Tab. II und III als bloß durch die Änderung des Cholesteringehaltes bedingt erklären zu können.

Trotz der Spärlichkeit dieser Versuche haben wir dieselben doch angeführt, da sie eine erfreuliche Übereinstimmung mit unseren chemischen Beobachtungen zeigen: sie sprechen für eine Vermehrung des Cholesteringehaltes im Blut; sie gestatten aber, noch andere Schlüsse, freilich bloß Wahrscheinlichkeitsschlüsse, zu ziehen. Die hemmende Wirkung des Serums spricht dafür, daß zumindest der größere Teil des Cholesterins im Serum, und zwar wahrscheinlich in der Form von freiem Cholesterin — Ester sollen nicht antihämolytisch wirken — vorhanden ist.

Herrn Prof. E. Salkowski erlaube ich mir für die gütige Anregung und liebenswürdige Förderung dieser Arbeit meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Desgleichen bin ich Herrn Prof. J. Morgenroth für seine freundliche Kontrolle der hämolytischen Versuche zu Dank verpflichtet.



# **Die photobiologischen Sensibilisatoren und ihre Eiweißverbindungen.**

Von

**Gunni Busck.**

(Finsens med. Lichtinstitut. Kopenhagen.)

[Aus dem pharmakologischen Institut der Universität  
zu München. (Prof. H. v. Tappeiner.)]

(Eingegangen am 14. August 1906.)

## I.

### **Historischer Überblick über die bisherigen Resultate der photobiologischen Sensibilisierungsuntersuchungen.**

Die Weise, auf welche die Energie des Lichtes in einem absorbierenden Körper umgesetzt wird, wird bekanntlich teils von der Schwingungsgeschwindigkeit der absorbierten Strahlen, teils von den Eigentümlichkeiten des Körpers bestimmt. Verändern sich diese letzten auf diese oder jene Art, so wird auch die Lichtwirkung quantitativ oder qualitativ eine andere werden. — Während uns die Erfahrung in einer Reihe bestimmter Fälle gelehrt hat, daß aus der Belichtung eine Temperaturerhöhung, ein chemischer Prozeß, eine Fluoreszenz usw. hervorgerufen wird, so ist es bisher nicht geglückt, zum Verständnis dessen zu gelangen, was in dem einzelnen Fall den Umsatzmodus der Lichtenergie bedingt. Der Überblick wird u. a. dadurch erschwert, daß das Licht in vielen Fällen nur katalytisch beschleunigend auf Prozesse zu wirken scheint, welche schon im Dunkeln vor sich gehen.

Es war lange Zeit die Annahme vorherrschend, daß langwellige Strahlen (die sogen. „Wärmestrahlen“) bei ihrer Absorption vorzugsweise in Wärmeenergie umgesetzt würden, und daß die kurzwelligen („chemischen“) Strahlen besonders leicht chemische

Reaktionen hervorriefen. Die Hypothese ist hauptsächlich der bekannten Empfindlichkeit der Silberhaloide gegenüber kurzwelligen Strahlen zuzuschreiben, und sie bekam durch Vogels bedeutungsvolle Entdeckung im Jahre 1873 ihren Grundschluß.

Vogel<sup>1)</sup> wies nach, daß man durch Zusetzung gewisser Stoffe, der sogenannten „Sensibilisatoren“, zu gewöhnlichen photographischen Bromsilbergelatine-Platten imstande ist, diese gegenüber Strahlenarten empfindlich zu machen, welche sonst nur eine minimale oder vielleicht gar keine photographische Wirkung besitzen, und es gelang ihm, Platten mit annähernd ebenso großer Empfindlichkeit gegenüber rotem oder gelbem Licht wie gegenüber stärker brechbaren Strahlen herzustellen. (Farbempfindliche, orthochromatische Platten.)

Die sensibilisierende Eigenschaften besitzenden Stoffe sind meistens, jedoch nicht immer, fluoreszierende organische Farbstoffe. Man kennt nun eine große Menge derartiger Sensibilisatoren — von verschiedenen chemischen Gruppen herrührend — und ist mittels derselben imstande die Empfindlichkeit der photographischen Platte gegenüber den verschiedenen Abschnitten des Spektrums zu erhöhen.

Während die photographische Technik besonders durch Vogels und Eders verdienstvolle Arbeiten in den letzten 30 Jahren eine glänzende Entwicklung durchgemacht hat, so daß man nun mit Expositionszeiten von  $\frac{1}{1000}$  einer Sekunde rechnet, hat unser Verständnis des Prinzips der Sensibilisierung keine entsprechenden Fortschritte zu verzeichnen. Wir wissen noch nicht, was die sensibilisierenden Eigenschaften eines Stoffes bedingt, obwohl es gewisse, für die meisten Sensibilisatoren gemeinsame Eigentümlichkeiten zu geben scheint. Es handelt sich häufig um Stoffe, welche eine große Atomzahl haben und deren Moleküle unter Lichteinwirkung leicht verändert werden. Die Stoffe bleichen in der Regel im Licht, und ihre Bleichung, die in starkem Licht und unter sonst günstigen Bedingungen mit bedeutender Geschwindigkeit vor sich gehen kann, ist nach Gros<sup>2)</sup> Untersuchungen wenigstens bezüglich eines Teiles der

<sup>1)</sup> Vogel, H. W., Photographische Mitteilungen. 9, 236. 1873.

<sup>2)</sup> Gros, O., Über die Lichtempfindlichkeit des Fluoreszeins, seiner substituierten Derivate sowie der Leukobasen derselben. Zeitschr. f. physikalische Chemie 37. 1901.

Stoffe einem Oxydationsprozeß zuzuschreiben. Eine andere den meisten, jedoch nicht allen Sensibilisatoren gemeinsame Eigentümlichkeit ist ihre Fähigkeit zu fluoreszieren; es ist sogar eine Möglichkeit dafür vorhanden, daß sich die Ausnahmen von dieser Regel nur als anscheinende Ausnahmen entpuppen werden. Untersuchungen von G. C. Schmidt<sup>1)</sup> machen es nämlich wahrscheinlich, daß alle Farbstoffe in dazu geeigneten Lösungsmitteln zum fluoreszieren — resp. phosphoreszieren — gebracht werden können, jedoch häufig erst als „feste Lösungen“. Es ist eine der direkten Untersuchung zugängliche Möglichkeit, daß die anscheinend nichtfluoreszierenden Sensibilisatoren gerade ihre Fähigkeit zu fluoreszieren resp. phosphoreszieren erreichen, wenn sie in fester Lösung in Gelatine, Collodium usw. gebracht werden.

Verschiedene biologische Phänomene sind schon seit langem als Resultate einer natürlichen Sensibilisierung aufgefaßt worden.

Engelmann<sup>2)</sup> und Timiriazeff<sup>3)</sup> haben derart die Bedeutung des Chromophylls der Pflanzen für die Kohlensäure-assimilation mit der Bedeutung der Vogelschen Sensibilisatoren für den photographischen Prozeß parallelisiert. (Becquerel hatte schon im Jahre 1874 nachgewiesen, daß sich die photographische Platte mittels Chlorophylls sensibilisieren läßt.) Bekanntlich variieren die Farben der Pflanzenchromophylle von grün nach braun und rot; die letztgenannten Farben finden wir besonders bei Tiefseepflanzen, welche gezwungen sind die kurzwelligen Strahlen auszunutzen, da das Wasser vorzugsweise die langwelligen Strahlen des Lichtes absorbiert. Engelmann, welcher auf diese Verhältnisse zuerst hinwies, hat im Verein mit Gaidukow<sup>4)</sup> experimentell Farbenveränderungen in *Oxillaria*

<sup>1)</sup> Schmidt, G. C., Beiträge zur Kenntnis der Fluoreszenz. *Ann. der Physik* **58**, 103. 1896.

<sup>2)</sup> Engelmann, Th. W., Farbe und Assimilation. *Botan. Zeitung* **1883**, Nr. 1 u. 2.

<sup>3)</sup> Timiriazeff, L'état actuel de nos connaissances sur la fonction chlorophyllienne. *Bulletin du Congrès intern. de Botanique et d'Horticulture*. St. Petersburg. 1884.

<sup>4)</sup> Engelmann, Th. W., Über experimentelle Erzeugung zweckmäßiger Änderungen der Färbung pflanzlicher Chromophylle durch farbiges Licht. *Archiv. f. Anatomie u. Physiologie*. 1902. *Physiol. Abtlg. Suppl.* S. 333—335.

sacta-Kulturen hervorrufen können, indem er diese in monochromatischem Licht züchtete. Die Kulturen nahmen immer die Komplementfarbe zur Farbe des Lichtes an, in welcher sie gezüchtet wurden — und die Farbenveränderung erwies sich obendrein als erblich, indem sie sich hielt, selbst wenn die Kulturen in gewöhnlichem Tageslicht weitergezüchtet wurden.

Im Tierreich finden wir im Sehpurpur der Retinastäbchen einen Farbstoff, dessen Eigenschaften (Fluoreszenz, Bleichung in Licht usw.) in hohem Grad mit denen der photographischen Sensibilisatoren übereinstimmen. Ebenso wie das Chromophyll bei den Pflanzen, variiert auch die Farbe des Sehpurpurs bei den verschiedenen Tierspezies von rot, durch purpur nach violett. Daß es, wenigstens betreffs des dunkel adaptierten Auges, für die Lichtperzeption von großer Bedeutung ist, darf wohl auch als sicher angenommen werden; Trendelenburg<sup>1)</sup> hat die größte Übereinstimmung zwischen der Kurve für die spektrale Absorption des Sehpurpurs, der Kurve für dessen Bleichung in den verschiedenen Spektralfarben und der Kurve für deren „Dämmerungswerte“ gefunden.

Obwohl man also schon seit langem großartige Beispiele einer natürlichen photobiologischen Sensibilisierung gehabt hat, scheint eigentümlicherweise bei keinem der Gedanken entstanden zu sein, daß andere der zahlreichen photobiologischen Prozesse vielleicht künstlich auf ähnliche Weise wie die Reduktion der Silberhaloide in der photographischen Platte beeinflusst werden könnten. Erst eine — in dieser Verbindung — zufällige Beobachtung von Raab<sup>2)</sup> sollte die biologische Forschung in diese Richtung leiten.

Bei einigen im Jahre 1898 ausgeführten Untersuchungen über die Toxizität des Akridins gegenüber Paramäcien fand Raab in seinen verschiedenen Versuchen eine eigentümliche Abweichung zwischen den Tötungszeiten: Bald gingen die Paramäcien schnell zugrunde, bald lebten sie viele Stunden in Lösungen von gleicher Stärke. Es gelang indessen Raab und H. v. Tappeiner —

---

<sup>1)</sup> Trendelenburg, W., Quantitative Untersuchungen über die Bleichung des Sehpurpurs in monochromatischem Licht. Zeitschr. f. Psych. u. Physiolog. d. Sinnesorgane. **37**. 1904.

<sup>2)</sup> Raab, O., Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. Zeitschr. f. Biologie **39**, H. 4. 1900.

unter dessen Leitung die Versuche ausgeführt wurden — nachzuweisen, daß die Ursache zur Inkonstanz der Tötungszeiten in den wechselnden Belichtungen zu suchen sei, welchen die Präparate ausgesetzt waren: Paramäcien in Akridinlösungen von 1 : 20 000 starben im Sonnenlicht innerhalb 6 Minuten, in gewöhnlichem Tageslicht in ca. 60 Minuten, während sie im Dunkeln noch nach 60 000 Minuten am Leben gefunden wurden.

Man fand eine ähnliche Wirkung bei der Untersuchung verschiedener anderer Stoffe (Phenylakridin, Eosin, Chinin), welche sämtlich die Eigenschaft mit dem Akridin gemeinsam haben, daß sie im Licht fluoreszieren. Die Versuche bewiesen ferner, daß die wirksamen Spektralstrahlen gerade dieselben sind wie die, welche Fluoreszenz in den betreffenden Lösungen hervorzurufen vermögen, sowie daß es andererseits nicht das Fluoreszenzlicht als solches ist, das tödend auf die Paramäcien wirkt. Raab vermutet, daß das Phänomen einer Umsetzung der Energie des Lichtes in chemische Energie zuzuschreiben sei, — analog derjenigen, welche in den chlorophyllhaltigen Zellen der Pflanzen vor sich geht, und v. Tappeiner<sup>1)</sup> vergleicht hier in seiner ersten Mitteilung über dieses Thema die Wirkungsart dieser Stoffe mit der der photographischen Sensibilisatoren — ein Vergleich, von welchem er jedoch später Abstand nimmt und zu welchem er erst in einigen vor kurzem veröffentlichten Untersuchungen über dieses Thema zurückkehrt<sup>2)</sup>.

In einer Arbeit aus dem Jahre 1902 erwähnt Raab<sup>3)</sup>, daß nicht alle fluoreszierenden Stoffe die hier erwähnte Wirkung im Licht besitzen, z. B. das Äskulin, das ja gerade wegen seiner prachtvollen Fluoreszenz bekannt ist. Da es sich ergab, daß Äskulin auch im Dunkel keine schädliche Wirkung auf Paramäcien ausübt, so schloß Raab, daß nur derartige Stoffe zu

---

<sup>1)</sup> Tappeiner, H. v., Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien — nach Versuchen von O. Raab. — Münch. med. Wochenschrift Nr. 1. 1900.

<sup>2)</sup> Tappeiner, H. v., Über die Beziehung der photochemischen Wirkung der Stoffe der Fluoreszeinreihe zu ihrer Fluoreszenzhelligkeit und ihrer Lichtempfindlichkeit. Deutsch. Arch. f. klin. Medizin **86**, 479. 1906.

<sup>3)</sup> Raab, O., Weitere Untersuchungen über die Wirkung fluoreszierender Stoffe. Zeitschr. f. Biologie **44**. 1902.

wirken vermögen, welche schon im Dunkel eine — wenn auch schwache — Wirkung besitzen. Er nimmt mit anderen Worten an, daß das Licht eine schon im Dunkel vorhandene schwache Giftwirkung nur verstärkt; also gerade das entgegengesetzte von dem, was betreff des photographischen Prozesses angenommen wird, wo der Sensibilisator eine im voraus nur schwache Lichtwirkung hervorruft oder erhöht. Jacobson<sup>1)</sup>, welcher fand, daß tierisches Gewebezellen-Flimmerepithel von der Ösophagus-schleimhaut des Frosches auf ähnliche Weise wie *Paramácien* beeinflußt wird, gibt dieser Ansicht in folgenden Thesen einen prägnanten Ausdruck:

1. Das Licht erhöht die Giftwirkung fluoreszierender Stoffe gegenüber Flimmerepithel.
2. Nichtfluoreszierende, giftige Stoffe erhalten keine erhöhte Wirkung im Licht.
3. Nichtgiftige, fluoreszierende Stoffe besitzen dieselbe Wirkung im Licht, wie im Dunkel.

Raab (a. a. O.) versuchte außerdem eine ähnliche Wirkung fluoreszierender Stoffe + Licht auf warmblütige Tiere hervorzurufen. Er injizierte verschiedene Farbstofflösungen subkutan weißen Mäusen, Meerschweinchen, Tauben usw. und exponierte danach die behandelten Tiere der Einwirkung des Sonnenlichtes. Der einzige deutliche auf diesem Wege von Raab erzielte Ausschlag bestand darin, daß bei den Eosin-injizierten Mäusen Nekrose der Ohren 1 — 2 Tage nach der Belichtung eintrat. Da die Nekrosen nicht durch Injektion anderer fluoreszierender Stoffe (Harmalin, Chinolinrot, Phosphin) und nur bei Mäusen hervorgerufen werden konnten — nicht z. B. bei Meerschweinchen —, so schließt Raab daraus, daß sie nicht mit den hier erwähnten Phänomenen in Verbindung stehen, sondern einfach einer Wärmewirkung, einer Verbrennung infolge der starken Absorption der langwelligen Strahlen des Lichtes in den Eosin-gefärbten, zarten Ohren zuzuschreiben sind. Diese Auffassung ist später mit theoretischen Gründen teils von Dreyer<sup>2)</sup>, teils

---

<sup>1)</sup> Jacobsohn, R., Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Flimmerepithel. Zeitschr. f. Biologie 41. 1901.

<sup>2)</sup> Dreyer, G., Sensibilisierung von Mikroorganismen und tierischen Geweben. Mitteilungen aus Finsens med. Lichtinstitut, Heft VII. 1904.

vom Verf.<sup>1)</sup> bestritten, und ihre Unrichtigkeit ist vor kurzem experimentell durch Versuche bewiesen worden, welche ich im Verein mit A. Jodlbauer<sup>2)</sup> vorgenommen habe. Es ergab sich nämlich, daß die Ohrnekrosen selbst in den Fällen entstehen, wo jede Möglichkeit einer schädlichen Wärmewirkung ausgeschlossen ist, und daß ähnliche Nekrosen überall auf dem Körper hervorgerufen werden können, nicht nur bei Mäusen sondern auch z. B. bei Kaninchen (siehe später).

Ledoux-Lebard<sup>3)</sup> lieferte einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Natur dieser Prozesse; er fand, daß die Eosin-Lichtwirkung gegenüber Paramäcien bedeutend stärker ist, wenn die Paramäcien in offenen Schalen belichtet werden, als wenn sie sich während der Belichtung in ganz gefüllten, luftdicht verschlossenen Glasrohren befinden.

Hiermit war auf die Bedeutung des Sauerstoffs für den Verlauf des Prozesses hingewiesen, und der Anstoß zu späteren Untersuchungen auf diesem theoretisch wichtigen Gebiet gegeben.

Ledoux-Lebard fand ferner, daß die Eosinlösungen während der Belichtung derart verändert werden, daß sie einen für die Paramäcien giftigen Stoff bilden. Es ergab sich nämlich, daß nicht-giftige Eosinlösungen nach langdauernder Belichtung auch im Dunkel tödend auf Paramäcien wirkten, und Ledoux-Lebard sucht hierin die Ursache zu dem schnellen Tod der Paramäcien während der Belichtung. Diese Beobachtung fand anfangs bei anderen Forschern (Dreyer (a. a. O.), v. Tappeiner und Jodlbauer)<sup>4)</sup> keine Bestätigung. Die zwei letztgenannten Verf. haben jedoch in einer späteren

---

<sup>1)</sup> Busck, G., Lichtbiologie. Eine Darstellung der Wirkung des Lichtes auf lebende Organismen, I. Teil. Mitteilungen aus Finsens med. Lichtinstitut, Heft VIII. 1904.

<sup>2)</sup> Jodlbauer, A. und G. Busck, Über die Wirkungen von Fluoreszein und Fluoreszein-Derivaten im Lichte und im Dunkeln. Arch. internat. de Pharmacodynamie et de Thérapie. Vol. XV, S. 263–278. 1905.

<sup>3)</sup> Ledoux-Lebard, Action du Serum sanguine sur les Paramécies. Ann. de l'Institut Pasteur **16**, 510. 1902.

<sup>4)</sup> Tappeiner, H. v. und A. Jodlbauer, Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme. Deutsch. Arch. f. klin. Medizin **80**. 1904.

Arbeit<sup>1)</sup> nachgewiesen, daß Ledoux-Lebards Beobachtung insofern zutreffend ist, als die Bleichung der betreffenden Farbstoffe im Licht unter Bildung einer Säure vor sich geht, und Paramäcien sind bekanntlich gegenüber Säurewirkungen äußerst empfindlich. Eine 0,45% Lösung von dichloranthracendisulfosaurem Natron wurde in einem Erlenmeyerschen Kolben in einer 1 cm hohen Schicht belichtet, und der Kolben wurde luftdicht verschlossen, um Absorption von Säure aus der Luft zu vermeiden. Zur Neutralisierung von 100 ccm der belichteten Flüssigkeit wurden nach 6 Tagen Belichtung 2,6 ccm einer  $\frac{1}{100}$  normalen Natronlauge gebraucht, während eine entsprechende Lösung, welche ebenso lange Zeit im Dunkel aufbewahrt gewesen war, nur 0,05 ccm erforderte. Es wurden betreff der Eosin- und Erythrosinlösungen entsprechende Verhältnisse gefunden. Werden die belichteten Lösungen genau neutralisiert, so verschwindet auch ihre Toxizität im Dunkeln gegenüber Paramäcien.

Die Beobachtungen über Säurebildung, über die Form des Absterbens der Paramäcien und über das Verhalten des Acridins führten die Verfasser zu dem Schlusse, daß die Bleichung der Farbstoffe, welche im Verhältnis zur schnellen Tötung der Paramäcien im Lichte nur langsam vor sich geht, kaum für die hier erwähnten Phänomene von irgend welcher Bedeutung sein könne. — Die destruirende Wirkung des Lichtes gegenüber sensibilisierten Fermenten liefert — wie es auch von den genannten Verfassern hervorgehoben wird — einen weiteren Beweis für die Richtigkeit dieser Auffassung, indem die fermentativen Prozesse von der gebildeten Säure ja eher beschleunigt als gehemmt werden.

Dreyer (a. a. O.), welcher in Finsens med. Lichtinstitut die Untersuchungen von Raab aufnahm und bestätigte, gebührt das Verdienst, die Frage von rein lichtbiologischem Standpunkt aus behandelt zu haben. Während das Prinzip für die früheren Untersuchungen im allgemeinen darauf ausging, den Unterschied zwischen der Wirkung der Farbstoffe auf die Mikroorganismen im Licht resp. im Dunkel festzustellen, veranschaulicht Dreyer tabellarisch den Unterschied zwischen der Wirkung des Lichtes

---

<sup>1)</sup> Jodlbauer, A. und H. v. Tappeiner, Die Beteiligung des Sauerstoffes bei der Wirkung fluoreszierender Stoffe. Deutsch. Arch. f. klin. Medizin 82. 1905.



auf die gefärbten und auf die nichtgefärbten Organismen, und er pointiert dadurch das Licht als den wirkenden Faktor, und den Farbstoff als den Sensibilisator, welcher nur die mikrobicide Fähigkeit des Lichtes erhöht.

Dreyer benutzte zu seinen Versuchen das nach Finsens Methode konzentrierte Licht einer starken elektrischen Kohlenbogenlampe und als Sensibilisator Erythrosin (Tetraiodfluoreszeinnatrium). Er fand, daß Bakterien sich gegenüber Licht auf ähnliche Weise wie Paramäcien sensibilisieren lassen; jedoch ist der Unterschied zwischen den Tötungszeiten für die gefärbten und für die nichtgefärbten Bakterienkulturen in bedeutend geringerem Grade ausgeprägt, als es bei den Paramäcien der Fall ist. Jodlbauer und v. Tappeiner<sup>1)</sup> kamen zu demselben Resultat; sie machten ferner die interessante Beobachtung, daß der von *Bac. pyocyaneus* produzierte fluoreszierende Stoff photodynamische (d. h. sensibilisierende) Eigenschaften gegenüber Paramäcien besitzt.

Durch Injektion von Erythrosinlösungen in den Rückenlymphsack von Fröschen und nachfolgende Belichtung der ad. mod. Cohnheim aufgespannten Zunge vermochte Dreyer außerdem Gewebereaktion mit Strahlen hervorzurufen, welche keine derartige Wirkung auf normales Gewebe hatten. Es ergab sich auch bei Warmblütern (Kaninchen, Menschen), daß eine lokale, kutane Erythrosin-Injektion mit nachfolgender Belichtung der injizierten Partie mit Licht, das vorher durch eine monochromsaure Kaliumlösung filtriert wurde, eine Gewebereaktion hervorrief. Auf Basis dieser Untersuchungen machte Dreyer<sup>2)</sup> den Vorschlag, die Finsensche Lichtbehandlung von Lupus vulgaris mit lokalen Injektionen sensibilisierender Lösungen zu kombinieren, um dadurch die langwelligen gut penetrierenden, aber sonst unwirksamen Lichtstrahlen auszunützen. Eine etwas andere Form einer derartig kombinierten Behandlung wurde

---

<sup>1)</sup> Jodlbauer, A. und H. v. Tappeiner, Über die Wirkung photodynamischer (fluoreszierender) Stoffe auf Bakterien. Münch. med. Wochenschr. Nr. 25. 1904.

Wirkung der fluoreszierenden Stoffe auf Spalt- und Fadenpilze. Deutsch. Arch. f. klin. Medizin 84, 529. 1905.

<sup>2)</sup> Dreyer, G., Lichtbehandlung nach Sensibilisierung. Dermatolog. Zeitschr. X. 1903.

gleichzeitig von v. Tappeiner und Jesionek<sup>1)</sup> an verschiedenen Fällen von tuberkulösen, cancrösen undluetischen Affektionen praktisch geprüft und insbesondere bei Ulcus rodens von Erfolg befunden. Die therapeutischen Versuche, die der Vorschlag von Dreyer zur Folge hatte, haben bisher keine befriedigenden Resultate ergeben, und das klinische Bild der Behandlung weicht auch recht bedeutend von dem ab, was die gewöhnliche Finsen-Behandlung charakterisiert. Die Belichtung der injizierten Partie ist schmerzhaft und die Gewebereaktion zeichnet sich im Gegensatz zu der normalen Lichtreaktion durch Ödeme und durch Neigung zu Nekrotisierung des Gewebes aus. Kolster<sup>2)</sup>, der auf Finsen med. Lysinstitut eine histologische Untersuchung der Lichtreaktion in sensibilisiertem Gewebe vornahm, benutzte weiße Mäuse als Versuchsobjekte. Nach subkutaner Injektion von Erythrosinlösungen belichtete er die injizierte Partie unter Wasserüberrieselung mit konzentriertem elektrischem Licht, welches erst ein Filter mit monochromsaurem Kalium passierte. In der Beschreibung seiner histologischen Funde hebt Kolster namentlich die ödematöse Beschaffenheit des Gewebes sowie die Zellenekrose hervor.

In den Betrachtungen über die Natur der Sensibilisierung, mit welchen Dreyer seine oben erwähnte Arbeit schloß, äußert er sich dahin, daß die Fluoreszenz für das Zustandekommen des Prozesses nicht entscheidend ist, da es Stoffe gibt, die stark fluoreszieren und welche doch entweder nur schwach oder überhaupt nicht sensibilisieren (Fluoreszein, Äsculin), und daß es andererseits Stoffe gibt, die nicht fluoreszieren und doch sensibilisierende Eigenschaften besitzen (Cyanin).

Halberstaedter<sup>3)</sup>, welcher Raabs resp. Dreyers Versuche wiederholte und deren Richtigkeit bekräftigte, ist ebenfalls

<sup>1)</sup> Tappeiner, H. v. und Jesionek, Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. Münch. med. Wochenschr. **47**, 2042. 1903. — Jesionek, Lichttherapie nach Prof. v. Tappeiner. Münch. med. Wochenschr. Nr. 19. 1904. — Jesionek und H. v. Tappeiner, Zur Behandlung der Hautcarcinome mit fluoreszierenden Stoffen. Deutsch. Arch. f. klin. Medizin **82**, 217. 1905.

<sup>2)</sup> Kolster, R., Studien über die Einwirkung gewisser Lichtstrahlen auf sensibilisiertes Gewebe. Mitteilungen aus Finsens med. Lichtinstitut, Heft X. 1906.

<sup>3)</sup> Halberstaedter, L., Mitteilungen über Lichtbehandlung nach

Dreyers Auffassung bezüglich der Natur dieser Phänomene und führt gegen die von v. Tappeiner stark hervorgehobene Bedeutung der fluoreszierenden Fähigkeit der Stoffe an, daß Neutralrotlösungen sensibilisierende Eigenschaften besitzen, obwohl sie nicht im Licht fluoreszieren<sup>1)</sup>. Nach v. Tappeiner und Jodlbauer<sup>2)</sup> ist dies indessen nicht richtig, indem Neutralrotlösungen eine schwache orangegelbe Fluoreszenz zeigen, wenn sie in konzentriertem Sonnenlicht untersucht werden, während das Cyanin rot fluoresziert.

In einer Reihe unter v. Tappeiners Leitung im pharmakologischen Institut in München ausgeführten Arbeiten wurden die Untersuchungen über die Wirkung der fluoreszierenden Stoffe im Licht in neue Bahnen geleitet. Schon im Jahre 1897 fand Green<sup>3)</sup>, daß Diastase zerstört wurde, falls man sie der Einwirkung des Sonnenlichtes aussetzte. Spätere Untersuchungen lassen es wahrscheinlich erscheinen, daß alle Enzyme und Toxine — jedenfalls die thermolabilen — die Fähigkeit verlieren, ihre spezifischen Wirkungen zu entfalten, wenn sie einer intensiven Belichtung ausgesetzt werden. Die Vernichtung ist vorzugsweise auf die am stärksten brechbaren Strahlen des Lichtes zurückzuführen. Von Schmidt-Nielsen<sup>4)</sup> sind betreff Labferment eingehende Untersuchungen in dieser Richtung angestellt. — v. Tappeiner<sup>5)</sup> und seine Schüler haben indessen gezeigt, daß mehrere Fermente und Toxine

---

Dreyer. Zur Theorie der Sensibilisierung und Prüfung einiger Sensibilisatoren. Münch. med. Wochenschr. Nr. 14. 1904.

<sup>1)</sup> Halberstaedter, L. und A. Neisser, Zur Kenntnis der Sensibilisierung. Deutsch. med. Wochenschr., Jahrg. 30, Nr. 21. 1904.

<sup>2)</sup> Tappeiner, H. v. und A. Jodlbauer, Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme. Deutsch. Arch. f. klin. Medizin **80**, 432 und 447. 1904.

<sup>3)</sup> Green, J. R., On the Action of Light on Diastase, and its biological Significance. Philos. Transactions of the Royal Society of London. Vol. 188, S. 167. 1897.

<sup>4)</sup> Schmidt-Nielsen, S., Über die Wirkung von elektrischem Bogenlicht auf Chymosin, Chymosinogen und Antichymosin. Mitteilungen aus Finsens med. Lichtinstitut, Heft IX. 1904.

<sup>5)</sup> Tappeiner, H. v., Über die Wirkung fluoreszierender Substanzen auf Fermente und Toxine. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellschaft. Jahrg. 36 H. 12. 1903.

(auch Labferment) sich gegenüber Strahlen von geringerer Brechbarkeit sensibilisieren lassen.

Die einzelnen Untersuchungsreihen sind von Stark<sup>1)</sup> und Liebel<sup>2)</sup> (Diastase), Tillmetz<sup>3)</sup> (Invertin), Rehm<sup>4)</sup> (Papayotin), sowie Riegner<sup>5)</sup> und Quiring<sup>6)</sup> (Labferment) und Locher<sup>7)</sup> (Zymase) ausgeführt. Außerdem hat v. Tappeiner und Jodlbauer<sup>8)</sup> Untersuchungen bezüglich einer Reihe Toxine angestellt (Diphtherie- und Tetanustoxin, Ricin u. a.).

Es geht indessen aus obenerwähnten Arbeiten hervor, daß sich ein großer Teil der gegenüber Paramácien wirksamen Stoffe indifferent gegenüber Enzymen verhält — und selbst gegenüber den verschiedenen Enzymen erwies sich ein und derselbe Stoff bald wirksam, bald unwirksam.

Nach v. Tappeiners und Jodlbauers zusammengefaßter Darstellung<sup>9)</sup> erweisen sich folgende Substanzen photodynamisch wirksam gegenüber Invertin: Die Fluoreszeingruppe (mit Ausnahme des Fluoreszeins und dessen Chlorverbindungen), die Anthracengruppe, die Thiazingruppe sowie die Chinolinfarbstoffe. Unwirksam sind hingegen: Derivate des Phenazins (mit Ausnahme von Phenazin und Phenosafranin), die Phenoxazine, die Naphthalingruppe, die Alkaloide Chinin, Harmalin und Hydrastinin sowie das Glykosid Äsculin. Spätere Versuche

<sup>1)</sup> Stark, E., Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Diastase. Diss. München, 1903.

<sup>2)</sup> Liebel, F., Weitere Untersuchungen über die Wirkung photodynamischer Stoffe auf Diastase. Diss. München, 1905.

<sup>3)</sup> Tillmetz, O., Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf den Invertierungsprozeß. Diss. München. 1903.

<sup>4)</sup> Rehm, F., Über die Einwirkung fluoreszierender Stoffe auf das Eiweiß spaltende Ferment Papain (Papayotin). Diss. München, 1903.

<sup>5)</sup> Riegner, H., Über die Wirkung photodynamischer (fluoreszierender) Substanzen auf Labferment. Diss. München, 1904.

<sup>6)</sup> Quiring, W., Weitere Untersuchungen über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Labferment. Diss. München, 1905.

<sup>7)</sup> L. Locher, Über die Wirkung einiger photodynamischer Substanzen auf Hefe, Acetondauerhefe und Hefepreßsaft. Diss. München, 1906.

<sup>8)</sup> v. Tappeiner, H. und A. Jodlbauer, Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Diphtherietoxin und Tetanustoxin. Münchener med. Wochenschr. Nr. 17. 1904.

<sup>9)</sup> Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme. Deutsch. Arch. f. klin. Medizin 80. 1904.

ergaben jedoch, daß einzelne dieser Stoffe (z. B. Fluoreszeïn, Akridin, Chinin und Harmalin) eine deutliche Wirkung gegenüber Invertin haben, sobald man während der Belichtung für eine reichliche Sauerstoffzufuhr sorgt.

Diese Untersuchungen veranlaßten die Münchener Schule die alte Hypothese aufzugeben, daß die betreffenden Stoffe im Lichte eine erhöhte Giftwirkung besitzen, indem man meinte, den Begriff Giftwirkung nicht gegenüber nichtorganisierten Körpern aufrecht erhalten zu können, um so weniger da man sich das Zustandekommen der erhöhten Wirkung dadurch hervorgerufen gedacht hatte, daß die Belichtung eine Veränderung der osmotischen Permeabilität der Zellenwand hervorrief (Jacobsen a. a. O.). In der zuletzt zitierten Arbeit, in welcher v. Tappeiner und Jodlbauer die theoretische Seite der Sache zum Gegenstand einer ausführlichen Untersuchung machen, werden auch verschiedene andere Umstände vorgebracht, welche gegen die erwähnte Hypothese sprechen: Bestände die photodynamische Wirkung in einer Erhöhung der Giftigkeit, so wäre zu erwarten, daß diese Zunahme betreff der verschiedenen Stoffe einigermaßen gleichartig sei; die Wirkung im Licht ist indessen bald doppelt, bald 100 bis 1000 Male größer als im Dunkel (nach der Verdünnung berechnet, in welcher der betreffende Stoff noch Wirkung im Dunkel resp. Licht aufweist).

Die Frage, inwiefern die hier besprochene Wirkung der Stoffe auf eine Sensibilisierung in Analogie mit der photographischen beruht, beantworten v. Tappeiner und Jodlbauer — sowohl in dieser wie auch in verschiedenen anderen Abhandlungen — dahin, daß die zwei Prozesse nicht identisch sind. Die Führung des Beweises hierfür wird auf folgende Weise versucht:

1. Eine Reihe der am kräftigsten wirkenden photographischen Sensibilisatoren fluoresziert nicht, wenigstens läßt sich mit konzentriertem Sonnenlicht keine Fluoreszenz nachweisen. Derartige Stoffe (Methylviolett, Fuchsin, Alizarinblau, diazoschwarzes Glyzinrot, Nigrosin, Äthylrot) weisen keine photodynamische Wirkung gegenüber Paramäcien oder Enzymen auf.

2. Andererseits lassen sich Bromsilbergelatineplatten nicht mit dem so stark photodynamisch wirkenden Natronsatz der Dichloranthracendisulfosäure sensibilisieren.

3. Ist Tötung der Paramäcien in z. B. Eosin + Licht einer »erhöhten« Lichtwirkung zuzuschreiben, so müssen die wirk-samen Strahlen — in diesem Fall die grünen — auch bei länger dauernder Einwirkung imstande sein, ungefärbte Para-mäcien zu destruieren. Das Sonnenlicht erwies sich indessen gegenüber Paramäcien als vollständig unschädlich, wenn es durch eine Lösung von Kupfersulfat und Pikrinsäure filtriert wurde<sup>1)</sup>.

v. Tappeiner schlägt für die kombinierte Farbstoff-Licht-wirkung die Bezeichnung „Photodynamie“ vor, eine Bezeich-nung, welche, wie er schreibt, nichts präjudiziert und die man in dem Augenblick fallen lassen kann, wo weitere Unter-suchungen unzweifelhafte Berechtigung zur Bezeichnung Fluoreszenzwirkung oder ähnlichem ergeben sollten.

In Übereinstimmung mit Raabs und Dreyers Versuchen fanden v. Tappeiner und Jodlbauer, daß die Wirkung den Strahlen zuzuschreiben sei, welche den photodynamischen Stoff absorbieren, daß aber anderseits die Absorption nicht das allein entscheidende Moment ist, indem zahlreiche stark absorbierende, jedoch nicht fluoreszierende Farbstoffe keine photodynamische Fähigkeit besitzen.

Es wird ferner stark hervorgehoben, daß bisher nur bei fluoreszierenden Stoffen photodynamische Eigenschaften gefunden sind, und da schon 53 fluoreszierende und 32 nicht-fluores-zierende Substanzen einer Untersuchung unterzogen gewesen sind, so besteht eine große Wahrscheinlichkeit für einen gewissen Zusammenhang zwischen diesen zwei Eigenschaften. Jedoch spielt das ausgesendete Fluoreszenzlicht als solches keine Rolle und von der geringeren oder stärkeren Fluoreszenz eines Stoffes kann man im großen und ganzen nicht auf die Intensität der photodynamischen Wirkungen des Stoffes schließen. Innerhalb

<sup>1)</sup> Das negative Resultat ist auf die Anwendung von zu schwachem Licht zurückzuführen. — Ich habe in konzentriertem elektrischem Licht von einer Lampe von 50 Amp. 45 Volt, — und hinter einem Filter mit ammoniakalischer Kupfersulfat-Pikrinsäurelösung\*) Tötung ungefärbter Paramäcien nach 1½-stündiger Belichtung erzielt.

\*) Siehe G. Busck, Über farbige Lichtfilter. Mitteilungen aus Finsens med. Lichtinstitut, Heft X, 1906 und Zeitschr. für Psychologie u. Physiologie der Sinnesorgane **37**. 1905.

einzelner Gruppen chemisch verwandter Stoffe ergab es sich indessen, daß die photodynamische Wirkung gegenüber Mikroorganismen und Invertin in der Regel größer ist, je weniger ausgeprägt die Fluoreszenz ist. Dieses eigentümliche Verhältnis tritt am deutlichsten zwischen den Stoffen innerhalb der Fluoreszeinreihe hervor<sup>1)</sup>. Schließlich erwähnen v. Tappeiner und Jodlbauer, daß die photodynamische Wirkung bei einem und demselben Stoff mit der Fluoreszenz des Stoffes zuzunehmen, resp. abzunehmen scheint, so daß z. B. sowohl die Fluoreszenz wie auch die photodynamische Fähigkeit bei  $\beta$ -Naphtholtrisulfosäure mit der Zusetzung von Soda zunimmt, während die beiden Eigenschaften in Chininsulfatlösungen mit Zusetzung von NaCl verringert werden. Als Gegensatz hierzu lassen sich einige Untersuchungen von Pinnow<sup>2)</sup> nennen, welcher fand, daß Akridin als optischer Sensibilisator gegenüber Jodwasserstoff wirkt, und daß diese Wirkung durch Hinzusetzung von Schwefelsäure verringert wird, »denn nun wird eine größere Lichtmenge als Fluoreszenzlicht reflektiert und geht daher für die Zerteilung des Jodwasserstoffes verloren«. Derselbe Verfasser stellt übrigens als allgemein geltende Regel auf, daß Substanzen, die in Licht zerteilt werden, die Fluoreszenz in den fluoreszierenden Lösungen, welchen sie zugesetzt werden, schwächen, und umgekehrt, daß Körper, welche die Fluoreszenz fluoreszierender Lösungen schwächen, sich auch als lichtempfindlich erweisen werden.

Die Frage über die Notwendigkeit des Sauerstoffes für die Wirkung des Lichtes auf die sensibilisierten Organismen wurde schon von Raab (a. a. O.) aufgeworfen. Seine mit Jodkalium und Akridin unternommenen Versuche führten aber zu keinem

---

<sup>1)</sup> Ich habe Gelegenheit gehabt, einen in photodynamischer Beziehung nicht früher untersuchten Stoff innerhalb dieser Gruppe zu untersuchen, nämlich Tetrachlortetrabromfluoreszein-Kalium. Dieser Stoff, dessen starke, grüne Fluoreszenz ich in konz. Sonnenlicht noch in Verdünnungen von 1:20000000 beobachten konnte, schien von obenstehender Regel abzuweichen, indem ich fand, daß dessen sensibilisierende Fähigkeit größer war, als die des sehr schwach fluoreszierenden Tetrajodfluoreszein-Na. (Erythrosin).

<sup>2)</sup> Pinnow, J., Die photochemische Zersetzung der Jodwasserstoffsäure. Ein Beitrag zur Kenntnis der Sensibilisatorwirkung. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **34**, S. 2528. 1901.

positiven Ergebnisse. Hingegen fand Ledoux-Lebard<sup>1)</sup>, daß die Eosin-Lichtwirkung bedeutend stärker gegenüber Paramäcien ist, wenn diese in offener Schale belichtet werden, als wenn der Zutritt des Sauerstoffs der Luft dadurch verhindert wird, daß die Paramäcienkulturen in ganz gefüllte, verschlossene Glasrohre eingeschlossen werden. Straub<sup>2)</sup> stellte bezüglich dieser Frage Untersuchungen an und wies betreff einer einzelnen Reaktion die Notwendigkeit des Sauerstoffs für das Zustandekommen des Prozesses nach. Er fand, daß in einer Jodkaliumlösung, welcher Eosin oder Chininsulfat zugesetzt wird, bei Belichtung der Lösung freies Jod abgespaltet wird. Bei Hinzusetzung von Stärke zur Lösung kann man während der Belichtung dem Verlauf der Reaktion folgen. Belichtet man dahingegen die Eosin-Jodkaliumlösung im Vakuum, so tritt die Reaktion nicht ein.

Zufolge kürzlich veröffentlichter Versuche von Jodlbauer<sup>3)</sup> kann die Reaktion indessen überhaupt nicht in absolut neutraler, sondern nur in saurer Lösung hervorgerufen werden; jedoch genügt ein sehr geringer Säuregrad (Anwendung eines unreinen Handelspräparates). Die Reaktion darf daher anscheinend mit der oben erwähnten Jodwasserstoffreaktion identifiziert werden. Straub nimmt an, daß sämtliche photodynamischen Prozesse auf einer Oxydation — obendrein in Form einer Verbrennung — beruhen, und er versucht deren Zustandekommen durch die von Bach und Engler aufgestellte Autoxydationstheorie zu erklären.

Der experimentelle Beweis dafür, daß das Vorhandensein des Sauerstoffs eine Bedingung für das Entstehen gewisser photodynamischer Prozesse ist, wurde von v. Tappeiner und

---

<sup>1)</sup> Ledoux-Lebard, Action de la lumière sur la toxicité de l'éosine. *Ann. de l'Institut Pasteur* **16**. 1902.

<sup>2)</sup> Straub, W., Über chemische Vorgänge bei der Einwirkung von Licht auf fluoreszierende Substanzen und die Bedeutung dieser Vorgänge für die Giftwirkung. *Münch. med. Wochenschr.* Nr. 25. 1904.

Über den Chemismus der Wirkung belichteter Eosinlösungen auf oxydable Substanzen. *Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol.* **51**. 1904.

<sup>3)</sup> Jodlbauer, A., Weitere Untersuchungen, ob eine „Dunkelwirkung“ der fluoreszierenden Stoffe statthat. *Deutsch. Arch. f. klin. Medizin* **85**, 395. 1905.



Jodlbauer<sup>1)</sup> sowohl betreff der Bakterien wie der Enzyme und Toxine erbracht. Die Versuche zeigen zugleich, daß die Wirkung entsteht, sobald nur eine Spur von Sauerstoff vorhanden ist.

Zahlreiche früheren Untersuchungen haben ergeben, daß nicht-sensibilisierte Bakterien schneller unter Lichteinwirkung in dem Augenblicke getötet werden, wenn der Sauerstoff der Luft Zutritt hat, als wenn der Sauerstoff entfernt ist. Die Anschauungen sind überdies bezüglich der Frage geteilt, ob Bakterien überhaupt von Licht zu destruieren sind, wenn jede Spur von Sauerstoff entfernt ist. Bie<sup>2)</sup>, welcher sich mit diesem Thema viel beschäftigt hat, fand, daß Bakterientötung — besonders in ultra-violettem Licht — in sauerstofffreien Umgebungen stattfinden kann, jedoch schwieriger, als wenn der Sauerstoff freien Zutritt zum Präparat hat. Nach Pfeffer<sup>3)</sup> vermögen indessen viele Bakterienarten Sauerstoff zu binden, so daß sie denselben im sauerstofffreien Raum erst nach und nach abgeben, und es ist vielleicht nicht ganz die Möglichkeit auszuschließen, daß es in Bies Versuchen nicht gelungen ist, jegliche Spur von Sauerstoff zu entfernen. Ich erinnere in dieser Verbindung an einen Versuch von Pringsheim<sup>4)</sup>, nach welchem mit konzentriertem Sonnenlicht belichtete chlorophyllhaltige Pflanzenzellen nur in dem Augenblick entfärbt werden, wo freier Sauerstoff zugegen ist. Dasselbe ist nach meinen Versuchen der Fall, selbst wenn die Zellen mit konzentriertem, elektrischem Licht durch Quarz belichtet werden. —

---

<sup>1)</sup> Jodlbauer, A. und H. v. Tappeiner, Über die Beteiligung des Sauerstoffes bei der photodynamischen Wirkung fluoreszierender Stoffe. Münch. med. Wochenschr. Nr. 26. 1904.

Die Beteiligung des Sauerstoffes bei der Wirkung fluoreszierender Stoffe. Deutsch. Arch. f. klin. Medizin 82. 1905.

<sup>2)</sup> Bie, V., Om Lysets Virkning paa Bakterier. Köbenhavn, 1903.

<sup>3)</sup> Zit. nach: A. Jodlbauer und H. v. Tappeiner, Über die Wirkung des Lichtes auf Enzyme in Sauerstoff- und Wasserstoffatmosphäre, verglichen mit der Wirkung der photodynamischen Stoffe. Deutsch. Arch. f. klin. Medizin 85, 386. 1905.

<sup>4)</sup> Pringsheim, Monatsber. d. kgl. Preuß. Akad. d. Wissensch. zu Berlin, S. 504. 1881.

Hertel<sup>1)</sup> hat vor kurzem die Theorie aufgestellt, daß die Lichtwirkung stets in erster Instanz auf einer Sauerstoffspaltung beruht, indem sich diese jedoch sekundär entweder als eine Oxydation oder als eine Reduktion manifestieren kann, abhängig davon, ob der freigemachte Sauerstoff in dem einzelnen Fall Moleküle findet, mit welchen er in statu nascendi Verbindungen eingehen kann oder nicht. Es lassen sich mittels Hertels Hypothese ganz gewiß eine Reihe photobiologischer Phänomene erklären; jedoch ruht sie auf allzu enger Basis, um allgemeine Bedeutung erlangen zu können, u. a. weil die photochemischen Umlagerungen keineswegs ausschließlich an Oxydations- oder Reduktionsprozesse geknüpft sind.

In der obenerwähnten Arbeit zeigen Jodlbauer und v. Tappeiner, daß die Bildung von „aktivem“ Sauerstoff in einer Reihe von Fällen das Entstehen der photodynamischen Prozesse bedingt<sup>2)</sup>. Dies wird mittels verschiedener Ozon-Reaktionen nachgewiesen; z. B. wird metallisches Silber unter der Bildung von Silberoxyd geschwärzt, wenn ein Tropfen Eosinlösung auf das Metall gebracht und dies dem Sonnenlicht ausgesetzt wird. Es werden außerdem eine Reihe Umstände angeführt, welche gegen die Anwendbarkeit der Autoxydationstheorie auf diesem Gebiete sprechen, und es wird schließlich nachgewiesen, daß die Oxydation nicht in Form einer totalen Verbrennung vor sich geht; jedenfalls war es in Versuchen mit Diastase nicht möglich, die Bildung von Kohlensäure nachzuweisen.

Während demnach die Lichtwirkung gegenüber normalen sowohl wie oben sensibilisierten tierischen Zellen, Enzymen,

---

<sup>1)</sup> Hertel, E., Über Beeinflussung des Organismus durch Licht, speziell durch die chemisch wirksamen Strahlen. Zeitschr. f. allgem. Physiologie IV. 1904.

Über physiologische Wirkung von Strahlen verschiedener Wellenlänge. Zeitschr. f. allgem. Physiologie V. 1905.

<sup>2)</sup> Siehe auch: Edlfsen, Experimenteller Beitrag zum Studium der oxydierenden Wirkung fluoreszierender Stoffe. Münch. med. Wochenschr. Nr. 36. 1904.

Ibid., Weitere Untersuchungen über die Einwirkung des Sonnenlichtes auf fluoreszierende Substanzen. Münch. med. Wochenschr. Nr. 41. 1905.

Tappeiner, H. v., Über die Oxydation durch fluoreszierende Stoffe im Lichte und die Veränderungen derselben durch die Bleichung. Münchener med. Wochenschrift. Nr. 44. 1905.

Toxinen usw. auf einer Oxydation zu beruhen scheint, kennt man eine Reihe anderer photochemischer Prozesse, für deren Entstehen das Vorhandensein des Sauerstoffs ohne Bedeutung ist, und vor kurzem gelang es Jodlbauer und v. Tappeiner<sup>1)</sup>, eine von der Belichtung abhängige Reaktion zu finden, deren Verlauf durch das Vorhandensein des Sauerstoffs gehemmt wurde. Es dreht sich um die Edersche Reaktion zwischen Quecksilberchlorid und Ammoniumoxalat:  $2 \text{HgCl}_2 + 2 (\text{NH}_4) \text{C}_2\text{O}_4 = \text{Hg}_2\text{Cl}_2 + 2 \text{NH}_4\text{Cl} + 2 \text{CO}_2$ . — Eder hat diese Reagenz zur Konstruktion eines Photometers angewendet, und Gros<sup>2)</sup> fand, daß die Reaktionsgeschwindigkeit durch Zusatz verschiedener Fluoreszeinderivate erhöht wird. Diese Reaktion zeigte das eigentümliche Verhältnis, daß sie langsamer in Sauerstoff als in atmosphärischer Luft vor sich geht, und daß sie sowohl im Vakuum wie auch unter Kohlensäure und Wasserstoff enorm beschleunigt wird. Das Ausfallen von Kalomel wird im Licht unter übrigens gleichen Bedingungen außerdem durch Hinzusetzung sensibilisierender Stoffe beschleunigt. Ein Teil der gegenüber Paramäcien wirksamen Substanzen erwies sich jedoch unwirksam gegenüber Quecksilberchlorid-Ammoniumoxalat. Daß nichtfluoreszierende Stoffe die Kalomelbildung nicht beeinflussen, geht auch aus den Untersuchungen von Jodlbauer und v. Tappeiner hervor.

Jodlbauer und v. Tappeiner schließen ihre letztgenannte Abhandlung mit der Vermutung, daß eine — von der absorbierten Lichtenergie hervorgerufene — Ionenbildung der Wirkung der fluoreszierenden Stoffe zugrunde liegt.

Die Anzahl der photobiologischen Prozesse, welche sich bisher für eine Sensibilisierung als zugänglich erwiesen haben, hat in dem letzten Jahr weiter zugenommen. Fleischmann<sup>3)</sup>

---

<sup>1)</sup> Jodlbauer, A. und H. v. Tappeiner, Die Beteiligung des Sauerstoffes bei der Wirkung fluoreszierender Stoffe. *Deutsch. Arch. f. klin. Medizin* **82**. 1905.

<sup>2)</sup> Gros, O., Über die Lichtempfindlichkeit des Fluoreszeins, seiner substituierten Derivate sowie der Leukobasen derselben. *Zeitschr. f. physikalische Chemie* **37**. 1901.

<sup>3)</sup> Fleischmann, Die bei Präzipitation beteiligten Substanzen in ihrem Verhalten gegenüber photodynamischen Stoffen. *Münch. med. Wochenschr.* Nr. 15. 1905.

hat z. B. nachgewiesen, daß Präzipitine und präzipitable Substanzen, welchen Lösungen photodynamischer Stoffe zugesetzt sind, ihre präzipitierenden resp. präzipitablen Eigenschaften bei Belichtung verlieren.

Sacharoff und Sachs<sup>1)</sup> fanden, daß rote Blutkörperchen destruiert werden, wenn man sie in einer Eosinlösung Sonnenlicht aussetzt. Der Zeitpunkt für die vollbrachte Destruktion wird durch die eintretende Hämolyse gekennzeichnet. Pfeiffer<sup>2)</sup> hat gleichzeitig ähnliche Versuche ausgeführt und dasselbe positive Resultat erzielt. Er fand keinen Unterschied in der Eosin-Lichtwirkung, gleichviel ob er mit ungewaschenen, in physiologischer NaCl-Lösung aufgeschlemmten Erythrocyten arbeitete, oder Blut benutzte. Die Ursache hierzu ist darin zu suchen, daß das Blut mit 0,85 % NaCl stark verdünnt wurde, so daß die vorhandene Serummenge im Verhältnis zur zugesetzten Eosinmenge sehr gering war. Wie es aus meinen Untersuchungen hervorgehen wird (siehe Seite 492), hat nämlich das Vorhandensein des Serums einen sehr bedeutenden, in vielen Fällen entscheidenden Einfluß auf den Verlauf der Reaktion. — In elektrischem Licht — mit erforderlicher Abkühlung des Präparates — konnte Pfeiffer nicht Hämolyse normaler Blutkörperchen erzielen also ohne Eosinhinzusetzung<sup>3)</sup>.

Schließlich geht es aus einigen von Lichtwitz<sup>4)</sup> gemachten Versuchen hervor, daß sowohl die Komplemente normalen, wie auch hämolytischen Serums destruiert werden, falls das betreffende Serum mit einer Eosinlösung vermischt und 8—16 Stunden direktem Sonnenlicht ausgesetzt wird. Die Amboceptoren des hämolytischen Serums werden dahingegen von der Belichtung nicht beeinflußt. Charakteristisch für diese Ursache ist die zur Erlangung der Inaktivierung erforderliche

<sup>1)</sup> Sacharoff und Sachs, Über die hämolytische Wirkung der photodynamischen Stoffe. Münch. med. Wochenschr. Nr. 7. 1905.

<sup>2)</sup> Pfeiffer, Über die Wirkung des Lichtes auf Eosin-Blutgemische. Wiener klin. Wochenschr. Nr. 9. 1905.

Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf normales Serum und rote Blutkörperchen. Wiener klin. Wochenschr. Nr. 13. 1905.

<sup>3)</sup> Die Ursache dieses negativen Resultates ist der Anwendung nicht genügend starken Lichtes zuzuschreiben.

<sup>4)</sup> Lichtwitz, Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf normale und hämolytische Sera. Münch. med. Wochenschr. Nr. 36. 1904.

lange und intensive Belichtung, ein Verhältnis, das eigentümlicherweise nicht Lichtwitz aufgefallen ist, das jedoch eine Erklärung in den nachfolgenden Untersuchungen finden wird.

Es kann hinzugefügt werden, daß sowohl Jodlbauer<sup>1)</sup> wie auch der Verf.<sup>2)</sup> mit negativem Resultat versucht haben, eine biologische Sensibilisierung gegenüber Röntgen- und Becquerelstrahlen zu erlangen. Zu den Versuchen sind indessen nur einzelne der Farbstoffe angewendet, welche dem Licht gegenüber gute sensibilisierende Eigenschaften besaßen, und es ist a priori gar kein Grund zu der Annahme vorhanden, daß sich auch gerade diese Stoffe gegenüber Strahlen einer ganz anderen Art als wirksam erweisen sollten, um so weniger, da die Lösungen der betreffenden Stoffe (z. B. Eosin) unter der Einwirkung der Röntgen- oder Radiumstrahlen nicht fluoreszieren<sup>3)</sup>.

Über die Ursache resp. über die Gesetze der ungleich starken Wirkungen von verschiedenen photobiologischen Sensibilisatoren weiß man auch jetzt äußerst wenig. v. Tappeiner<sup>4)</sup> hat hervorgehoben, daß die sensibilisierende Fähigkeit in der Regel in derselben chemischen Gruppe bei den am schwächsten fluoreszierenden Stoffen am stärksten ist — und umgekehrt. Betreff der Fluoreszeinreihe habe ich mit Jodlbauer<sup>5)</sup> zusammen nach-

---

<sup>1)</sup> Jodlbauer, A., Über die Wirkung photodynamischer (fluoreszierender) Substanzen auf Paramäcien und Enzyme bei Röntgen- und Radiumbestrahlung. *Deutsch. Arch. f. klin. Medizin* **80**. 1904.

<sup>2)</sup> Busck, G., *Lichtbiologie. Eine Darstellung der Wirkung des Lichtes auf lebende Organismen*, I. Teil. *Mitteilungen aus Finsens med. Lichtinstitut*, Heft VIII. 1904.

<sup>3)</sup> Ich führe hier an, daß ein amerikanischer Arzt, Dr. Morton (*Recent Advances in Electrotherapeutics. New York Medical Journal*. April 1905) angibt, gute therapeutische Resultate bei Röntgenbehandlung tiefsitzenden Cancers erzielt zu haben, wenn die Patienten kleine Dosen Eosin per os erhielten. Die Mitteilung ist jedoch nicht von Daten begleitet, welche Zutrauen zu den günstigen Wirkungen der Behandlung erwecken können.

<sup>4)</sup> Tappeiner, H. v., Über die Beziehung der photochemischen Wirkung der Stoffe der Fluoreszeinreihe zu ihrer Fluoreszenzhelligkeit und ihrer Lichtempfindlichkeit. *Deutsch. Arch. f. klin. Medizin* **86**, 479. 1906.

<sup>5)</sup> Jodlbauer, A. und G. Busck, Über die Wirkungen von Fluoreszein und Fluoreszein-Derivaten im Lichte und im Dunkeln. *Arch. internat. de Pharmacodynamie et de Thérapie*. Vol. XV, S. 263—278. 1905.

gewiesen, daß sowohl die sensibilisierende Fähigkeit der Stoffe, wie auch deren Toxizität mit der Anzahl der substituierten Wasserstoffatome zunimmt, indem sich gleichzeitig eine Steigerung in der Wirkung von Chlor — durch Brom — zu den Jodderivaten nachweisen läßt.

In einigen vor kurzer Zeit erschienenen Arbeiten haben sich v. Tappeiner<sup>1)</sup> und Jodlbauer<sup>2)</sup> wiederum der Auffassung angeschlossen, daß zwischen der Wirkung der „photodynamischen“ Stoffe und der Wirkung der photographischen Sensibilisatoren kein prinzipieller Unterschied existiert. Sie bringen für das Invertin den Nachweis, daß dieses auch von ultraviolettfreiem Lichte geschädigt werden kann, in sicher bestimmbarem Maße jedoch nur dann, wenn Sauerstoff zugegen ist<sup>3)</sup>. Bei Hinzunahme der brechbareren Strahlen aber fanden sie weiter, daß eine bedeutende Schädigung auch dann eintritt, wenn sie die Anwesenheit durch sorgfältige und in verschiedener Weise variierte Anordnungen auszuschließen suchten<sup>4)</sup>. Eine Sensibilisierung in letzteren Fällen war nicht zu erreichen. Sie sehen sich daher zu der Annahme gedrängt, daß das Invertin sowohl bei Sauerstoffanwesenheit wie Abwesenheit photochemisch geschädigt werden könne, einer Sensibilisierung, wenigstens durch die bisher angewandten Substanzen, aber nur der erstere Fall zugänglich sei.

Obleich demnach nun augenscheinlich allgemeine Einigkeit darüber herrscht, daß das Prinzip für die Umsetzung der Lichtenergie dasselbe ist, gleichviel ob von der Wirkung des Lichtes auf die sensibilisierte photographische Platte die Rede ist, oder

---

<sup>1)</sup> Tappeiner, H. v., Bemerkungen zur Abhandlung von E. Mettler über die bakterizide Wirkung des Lichtes auf gefärbte Nährböden. Arch. f. Hygiene. 54. 1905.

<sup>2)</sup> Jodlbauer, A. und H. v. Tappeiner, Über die Wirkung des Lichtes auf Enzyme in Sauerstoff- und Wasserstoffatmosphäre, verglichen mit der Wirkung der photodynamischen Stoffe. Deutsch. Arch. f. klin. Medizin 85, 386. 1905.

<sup>3)</sup> Jodlbauer, A. und H. v. Tappeiner, Über die Wirkung des Lichtes auf Fermente (Invertin) bei Sauerstoffabwesenheit. Münch. med. Wochenschr. Nr. 14. 1906.

<sup>4)</sup> Jodlbauer, A. und H. v. Tappeiner, Über die Wirkung des ultravioletten Lichtes auf Enzyme (Invertin). Deutsch. Arch. f. klin. Medizin 87, 373. 1906.

ob es sich um die Wirkung gegenüber diesem oder jenem sensibilisierten biologischen Objekt handelt, wird es doch vielleicht aus rein praktischen Gründen gut sein, zwischen photographischen, photochemischen und photobiologischen Sensibilisatoren zu unterscheiden, eine Einteilung, welche natürlich nicht für die Stoffe als solche gilt, sondern nur auf die in jedem einzelnen Fall beabsichtigte Anwendung hindeutet. Es verdient doch hervorgehoben zu werden, daß man kaum auf die Dauer die Bezeichnung sensibilisierend oder nichtsensibilisierend für einen Stoff beibehalten kann; denn es kann kaum darüber Zweifel herrschen, daß die sensibilisierenden Eigenschaften eines Stoffes nicht allein von dessen Konstitution bestimmt werden, sondern daß in dieser Beziehung das Lösungsmittel, der Dissoziationsgrad und andere, auf die optischen und physikalischen Eigentümlichkeiten des Stoffes influierende Verhältnisse ebenfalls mitbestimmend sind. Experimentelle Untersuchungen auf diesem Gebiet werden von großem Interesse sein, und ich erachte es als wahrscheinlich, daß man durch derartige Untersuchungen auch ein Verständnis bezüglich der Frage erreichen kann, weshalb ein Stoff, z. B. gegenüber der photographischen Platte vorzügliche sensibilisierende Eigenschaften besitzen kann, während er gegenüber Mikroorganismen vielleicht unwirksam ist. Auch der noch hypothetische Parallelismus zwischen der Fähigkeit der Stoffe zu sensibilisieren und deren Fähigkeit zu fluoreszieren läßt sich vielleicht auf diese Weise experimentell untersuchen. Eine zweite naheliegende, bisher gar nicht untersuchte Frage ist die, ob man nicht in der Reihe der photobiologischen Phänomene Analogien zu der Wirkung der Stoffe zu finden vermag, welche in der photographischen Terminologie den Namen „chemische“ Sensibilisatoren erhalten haben.

Wie es aus der kurzen Übersicht hervorgeht, die ich hier über die bisherigen Resultate der Sensibilisierungsuntersuchungen gegeben habe, ist der Stoff der vorliegenden Arbeit noch nicht zum Gegenstand direkter Untersuchungen gemacht. Indessen berühren eine Reihe Arbeiten dieses Thema indirekt, insofern die erreichten Resultate ihre Erklärung erst durch die hier vorliegenden Versuche erhalten. Ich denke an die Untersuchungen über Totalsensibilisierung warmblütiger Tiere.

Raab<sup>1)</sup> konnte, wie schon früher erwähnt, bei Belichtung Eosin-injizierter weißer Mäuse Nekrosen der Ohren derselben hervorrufen. Es gelang ihm nicht, entsprechende Phänomene bei anderen Tieren zu erzielen, und die Nekrosen bei Mäusen ließen sich ebenfalls nicht bei Mäusen nach Injektion anderer sensibilisierender Lösungen hervorrufen. Raab betrachtete daher die erwähnten Ohrennekrosen als das Resultat einer Verbrennung, infolge einer starken Absorption der Wärmestrahlen des Lichtes in dem gefärbten Gewebe.

Neisser und Halberstaedter<sup>2)</sup> versuchten, ebenfalls mit negativem Resultat, eine Totalsensibilisierung des Meer-schweinchens durch intravenöse oder subkutane Erythrosin-Injektionen hervorzurufen.

Jodlbauer und ich<sup>3)</sup> wiederholten diese Untersuchungen. Wir konstatierten, daß sich die von Raab zuerst beobachteten Ohrennekrosen bei Mäusen hervorrufen ließen, selbst wenn jegliche Möglichkeit einer schädlichen Wärmewirkung des Lichtes ausgeschlossen war. Die belichteten Ohren haben überdies ein vollkommen normales Aussehen am ersten Tage nach der Belichtung, und erst am zweiten oder am häufigsten am dritten Tage tritt eine trockene Nekrose ein, welche zu einer Totalabstoßung des Ohres führt; diese spät eintretende Reaktion stimmt nicht mit der Hypothese über eine Wärmewirkung überein, aber sie hat ihre Analogie in der gewöhnlichen Lichtreaktion. Außer den Ohrennekrosen beobachteten wir Haar-ausfall auf Kopf und Rücken der Mäuse, häufig von Nekrosen der entsprechenden Hautpartien begleitet.

Die erwähnten Veränderungen ließen sich ferner nicht nur nach subkutanen oder intraperitonealen Injektionen von Eosin-Na, sondern auch nach Injektion anderer Sensibilisatoren z. B. Erythrosin hervorrufen, und hiermit war die Möglichkeit ausgeschlossen, daß man den Erscheinungen einer spezifischen Bromwirkung gegenüber stand.

---

<sup>1)</sup> Raab, O., Weitere Untersuchungen über die Wirkung fluoreszierender Stoffe. Zeitschr. f. Biologie **44**. 1902.

<sup>2)</sup> Neisser, A. und L. Halberstaedter, Mitteilungen über Lichtbehandlung nach Dreyer. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 8. 1904.

<sup>3)</sup> Jodlbauer, A. und G. Busck, Über die Wirkungen von Fluoreszein und Fluoreszein-Derivaten im Lichte und im Dunkeln. Arch. internat. de Pharmacodynamie et de Thérapie. Vol. XV, S. 263—278. 1905.



Wir vermochten auch bei Kaninchen nach intravenösen Eosin-Na-Injektionen durch Belichtung ausgedehnte Nekrosen der im voraus enthaarten Haut, sowie starke Ödeme besonders in den Ohren und Augenlidern der Tiere hervorzurufen. Zu den am häufigsten beobachteten Folgen der Belichtung gehörten auch Konjunktivitis und Tränenfluß. Schließlich beobachteten wir zu wiederholten Malen, daß die Belichtung Rose-Bengal-injizierter Tiere (Ratten, Kaninchen) einen vorübergehenden, jedoch sehr bedeutenden Exophthalmos hervorrief<sup>1)</sup>.

Es war in allen Versuchen notwendig, große Dosen der betreffenden Sensibilisatoren anzuwenden, um die erwähnten Resultate zu erzielen — und es zeigte sich ferner, daß die Hautnekrosen am leichtesten an derartigen Stellen auftraten, wo die Haut, z. B. durch den Enthaarungsprozeß leicht beschädigt worden war. Auf derartigen Partien tritt nämlich eine wirkliche Gewebsfärbung ein — ebenso wie bei lokalen

---

<sup>1)</sup> Im Anschluß an obenstehende Beschreibung des Symptomkomplexes, welchen die Belichtung der total-sensibilisierten Tiere hervorrief, führe ich einen Versuch an, den ich auf dem Laboratorium des Lichtinstitutes in Kopenhagen ausgeführt habe.

Einem weißen Kaninchen wurden 0,25 g Eosin-Na pro Kilo Körpergewicht intravenös injiziert. Drei Stunden nach Schluß der Injektion wurde ein barbiertes Fleck auf Femur 1 Stunde lang mit konzentriertem Licht einer elektrischen Bogenlampe von 50 Amp. und 45 Volt belichtet. Das Licht wurde durch eine 4% monochromsaure Kaliumlösung filtriert. Während der Belichtung wurde der Fleck mit kaltem Wasser überrieselt. Der Fleck erwies sich beim Schluß der Belichtung als gelbgefärbt im Gegensatz zu der umgebenden roten, Eosin-gefärbten Haut. In den ersten Tagen nach der Belichtung ließ sich eine Lichtreaktion im Flecken weder sehen noch fühlen; jedoch bildete sich später auf demselben ein trockener Schorf, der, da er nach einer Woche abgestoßen wurde, einen Fleck mit natürlicher Haut ohne Haarbekleidung hinterließ. Auf der umgebenden — gleichzeitig barbierten — Haut hatten die Haare schon begonnen zu wachsen. In den folgenden 3 Wochen wuchs das Haar dahingegen bedeutend schneller auf dem belichteten Fleck, als auf der umgebenden Haut, so daß der Fleck nach Verlauf dieser Zeit mit 2 cm langem Haar bedeckt war, während die Haare der umgebenden Partie nur eine Länge von ca. 0,5 cm hatten.

Der Grund zu dem starken Haarwachstum ist in einer durch die Belichtung hervorgerufenen langdauernden Hyperämie zu suchen, und die von den langwelligen Strahlen hervorgerufene Reaktion in dem sensibilisierten Gewebe verhält sich also hier ähnlich wie die gewöhnliche Licht-Reaktion.

Farbstoffinjektionen — während die übrige Totalfärbung der Haut nur anscheinend ist, indem sie der vorübergehenden Färbung von Blut und Lymphe des Tieres zuzuschreiben ist.

In der erwähnten Abhandlung heben wir ferner ein der medizinischen Fachliteratur entlehntes interessantes Beispiel der Möglichkeit hervor, auch Menschen gegenüber Licht in toto zu sensibilisieren. Prieme<sup>1)</sup> erwähnt nämlich 26 Epilepsiefälle, die er versuchsweise mit Eosin-Na behandelte, das bekanntlich eine große Menge Brom enthält (47 %). Die Anfangsdosis betrug 0,25 g pro die, jedoch wurde sie vergrößert, so daß in der neunten Woche 3,5 g Eosin täglich per os verabfolgt wurden. Prieme vermochte keinen günstigen Einfluß dieser Kur auf den Verlauf der Krankheit zu beobachten; er beschreibt dahingegen eine Reihe eigentümlicher Vergiftungssymptome, welche regelmäßig eintraten, wenn die Dosierung 2,5 bis 3 g täglich erreicht hatte. Die Symptome waren ausschließlich lokal: Es stellte sich eine, von Ödemen begleitete leichte Eosinfärbung der Gesichtshaut und der Hände ein; hieran schlossen sich recht ausgebreitete, jedoch oberflächliche Ulcerationen auf denselben Körperteilen, sowie Abfall der Nägel, am häufigsten auf den Daumen. Die erwähnten Veränderungen traten nur an den unbedeckt gewesenen Körperteilen auf, und Prieme schließt hieraus, daß sie mit dem freien Zutritt der Luft zu diesen Partien in Verbindung stehen müssen. Es kann indessen kein Zweifel darüber herrschen, daß hier das Licht und nicht die Luft der entscheidende Faktor gewesen ist; schon die Details in Priemes sorgfältiger Beschreibung wirken überzeugend, um so mehr, da er sich diese Möglichkeit nicht selbst gedacht hat.

Das sogenannte Buchweizenexanthem, das oft bei Tieren zu beobachten ist, welche mit Buchweizen gefüttert werden, ist auch als ein Lichterythem bei den durch dieses Füttern total-sensibilisierten Tieren aufzufassen<sup>2)</sup>.

Die zahlreichen Untersuchungen der späteren Jahre über die mikrobiziden Wirkungen des Lichtes, welche mit Downes

---

<sup>1)</sup> Prieme, J., Des accidents toxiques produits par l'éosinate de sodium. Thèse. Paris, 1900.

<sup>2)</sup> Busck, G., Über die Pathogenese des Buchweizenexanthems. Mitteilungen aus Finsens med. Lichtinstitut, Heft IX. 1904.

and Blunts grundlegenden Versuchen im Jahre 1877 eingeleitet wurden, haben u. a. gezeigt, daß Bakterien und andere Mikroorganismen im allgemeinen weniger widerstandsfähig, als tierische Gewebezellen, gegenüber der Einwirkung des Lichtes sind. Schon hiermit ist die Bedingung für die Möglichkeit gegeben, mit intensivem Licht im Gewebe des Körpers eingelagerte Bakterien zu töten, ohne gleichzeitig dieses Gewebe zu destruieren, und in dieser Richtung angestellte experimentelle Versuche ergaben auch positiven Ausschlag<sup>1)</sup>. Die Versuche gelingen jedoch nur, wenn die Bakterien sehr oberflächlich liegen, indem die geringe Penetrationsfähigkeit der bakteriziden Strahlen eine direkte Beeinflussung der tiefer im Gewebe liegenden Bakterien verhindert. Dieses prinzipielle Hindernis zur Erreichung einer Tiefewirkung fiel indessen fort, da es sich zeigte, daß sich Mikroorganismen gegenüber verhältnismäßig langwelligen Strahlen sensibilisieren ließen, denn die Penetrationsfähigkeit der Lichtstrahlen gegenüber blutgefüllten tierischen Geweben nimmt im großen und ganzen mit der Wellenlänge zu, wie ich es in einer früheren Arbeit<sup>2)</sup> nachgewiesen habe. Es war daher bei der kombinierten Anwendung langwelliger Strahlen und sensibilisierender Stoffe denkbar, daß eine bedeutende mikrobizide Tiefewirkung zu erreichen war. Ein derartiges Raisonement hat daher auch sowohl v. Tappeiner<sup>3)</sup> wie mich<sup>4)</sup> dazu veranlaßt, hypothetisch die Möglichkeit aufzustellen, auf diesem Wege zu einer wirksamen phototherapeutischen Behandlung blutparasitärer Krankheiten zu gelangen, und wir haben diese Möglichkeit später in Gemeinschaft zum Gegenstand einer Reihe experi-

<sup>1)</sup> Busck, G., Lichtbiologie. Eine Darstellung der Wirkung des Lichtes auf lebende Organismen, I. Teil. Mitteilungen aus Finsens med. Lichtinstitut, Heft VIII. 1904.

<sup>2)</sup> Busck, G., Über die relative Penetrationsfähigkeit der verschiedenen Spektralstrahlen gegenüber tierischem Gewebe. Mitteilungen aus Finsens med. Lichtinstitut, Heft IV. 1903. Vergl. auch Jodlbauer und Tappeiner, Über die Wirkung fluoresz. Stoffe auf Toxine, Abschn. VIII. Deutsch. Arch. f. klin. Medizin 85.

<sup>3)</sup> Tappeiner, H. v., Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Substanzen. Verhandl. d. XXI. Congr. f. innere Medizin zu Leipzig. 1904.

<sup>4)</sup> Busck, G., Om Dagslysets Indflydelse paa Forløbet af Malaria — med særlig Henblik paa Kininbehandlingene. Hospitalstidende Nr. 16. 1904. (The American Journal of Medical Sciences. July 1904.) •

menteller Versuche gemacht<sup>1)</sup>. Weiße Kaninchen, Ratten und Mäuse, welche mit *Trypanosoma Brucei* infiziert waren, wurden mit Calciumsulphhydrat enthaart und nach maximalen intravenösen oder subkutanen Eosin- oder Erythrosin-Injektionen der Einwirkung des Sonnenlichtes ausgesetzt. Eine Heilung der injizierten Tiere gelang indessen nur, wenn die Behandlung unmittelbar nach der Impfung eingeleitet wurde, und es ist anzunehmen, daß die Trypanosomen in diesen Versuchen getötet wurden, bevor sie in die Blutbahnen der Tiere gelangen, — also im subkutanen Gewebe liegend. Leiteten wir die Behandlung erst einen Tag nach der Injektion ein, so erzielten wir kein günstiges Resultat. Der Grund hierzu ist erstens darin zu suchen, daß die Tiere so stark unter der Behandlung leiden, daß sie sich nicht mit erforderlicher Energie durchführen läßt. (Unter den schädlichen Potenzen der Behandlung sind besonders hervorzuheben:

- a) die Enthaarung der Tiere, welche Störungen in ihrer Wärmeregulation zur Folge hat;
- b) die toxische Wirkung der injizierten Sensibilisatoren;
- c) die primären und sekundären schädlichen Wirkungen des Lichtes auf den total-sensibilisierten Organismus).

Zweitens legt der injizierte Farbstoff Hindernisse für die Tiefewirkung des Lichtes in den Weg, indem er die Absorptionsverhältnisse des Gewebes gerade gegenüber den im betreffenden Fall wirksamen Strahlen verändert. Schließlich erwies sich die Anwendung von Dosen erforderlich, welche nahe an die schon im Dunkel toxischen heranreichten, um überhaupt dem Blut der Tiere die notwendigen sensibilisierenden Eigenschaften mitzuteilen. Es machte sich eine eigentümliche Abweichung zwischen den spezifischen Wirkungen der sensibilisierenden Stoffe in ihren wässrigen Lösungen und der Wirkung derselben Stoffe nach ihrer Injektion in den Blutbahnen bemerkbar, eine Abweichung, welche übrigens schon durch die von Neißer und Halberstädter in ihren früher erwähnten Versuchen über Total-Sensibilisierung warmblütiger Tiere erhaltenen, negativen Resultate angedeutet war. Die vorliegende Arbeit verfolgt u. a. den Zweck, die Ursache dieser Verhältnisse zu erklären.

<sup>1)</sup> Busck, G. und H. v. Tappeiner, Über Lichtbehandlung blutparasitärer Krankheiten. Deutsch. Archiv für klin. Medizin **87**. 1906.

## II.

## Versuchsordnung, sowie Untersuchungen über die Einwirkung der photobiologischen Sensibilisatoren auf das Blut.

Ich schicke einige Bemerkungen über die Versuchsordnung voraus, die ich bei den Versuchen über den Einfluß des Serums auf die spezifischen Wirkungen der photobiologischen Sensibilisatoren gegenüber Paramácien zur Anwendung gebracht habe, da die Kenntnis verschiedener Verhältnisse, die ich dabei zu besprechen Gelegenheit finde, zum Verständnis späterer Versuche notwendig ist.

Unter der bedeutenden Menge von Stoffen, welche sensibilisierende Eigenschaften gegenüber biologischen Reagenzien besitzen, habe ich Typen verschiedener chemischer Gruppen zu meinen Arbeiten ausgewählt. Aus diesen Gruppen suchte ich ferner derartige Stoffe aus, welche wegen ihrer besonders stark ausgeprägten sensibilisierenden Fähigkeit, ihrer eigentümlichen optischen Verhältnisse oder ihrer günstigen Löslichkeitsverhältnisse von vorneherein als für die Versuche besonders geeignet erschienen. Diese Versuche wurden in der Regel mit Kaninchenserum angestellt, indem mit im ganzen 9 verschiedenen Seris vergleichende Untersuchungen angestellt wurden.

Bei Untersuchungen dieser Art, wo das Resultat jedes einzelnen Versuches in erster Linie von den 2 Faktoren: Sensibilisator und Licht bestimmt wird, und wo das Interesse an die Veränderungen im Resultat geknüpft ist, welche durch eine Änderung des ersten Faktors hervorgerufen sind, wird es zweifellos vorteilhaft sein, den zweiten Faktor, das Licht, während aller Versuche konstant sein zu lassen, d. h. beständig mit qualitativ und quantitativ gleichartigem Licht zu arbeiten.

Künstliches Licht von genügender Intensität und Konstanz stand indessen nicht zu meiner Verfügung, und ich war daher gezwungen mit diffusem Tageslicht zu arbeiten. Dies hatte erstens den Nachteil, daß vergleichende Versuche immer gleichzeitig ausgeführt werden mußten, was eine Anzahl zeitraubender Wiederholungen erforderte; außerdem darf man nur mit einem gewissen Vorbehalt die Resultate von gleichzeitig angefangenen Versuchen vergleichen; werden nämlich die Belichtungen nicht auch gleichzeitig abgebrochen, so wird das Verhältnis zwischen

den Belichtungszeiten — wegen der ununterbrochenen wechselnden Intensität und Qualität des Tageslichtes — nur annähernd ein Ausdruck für das Verhältnis zwischen den verschiedenen Präparaten zugeführten Lichtmengen sein<sup>1)</sup>.

Die Belichtungsversuche wurden indessen in der Regel in der Zeit zwischen 10 und 2 Uhr angestellt, also in den Stunden, während welchen die Veränderung der Stärke und Zusammensetzung des Tageslichtes mit der größten Langsamkeit vor sich geht. Es ist übrigens hervorzuheben, daß die hier erwähnten Verhältnisse absolut keine Bedeutung für die aus meinen Versuchen gezogenen Schlußfolgerungen haben.

Als Reagens bei den Sensibilisierungsuntersuchungen habe ich gewöhnlich *Paramaecium caudatum*-Kulturen benutzt; häufig sind jedoch auch Reinkulturen von *Trypanosoma Brucei* zur Anwendung gelangt, und vergleichende Versuchsreihen sind mit Flimmerzellen der Frösche, mit roten Blutkörperchen, mit Fermenten, Toxinen und Alexinen ausgeführt.

Die Paramäcienversuche wurden folgendermaßen geordnet: Erst wurden Mischungen von Serum mit der sensibilisierenden Lösung verfertigt. Danach wurde in stark gedämpfter Beleuchtung eine abgemessene Menge dieser Mischung in eine

---

<sup>1)</sup> Der Nutzen der Anwendung photometrischer Messungen bei Versuchen dieser Art ist ziemlich illusorisch, da kein bisher konstruiertes Photometer die Verschiebungen in der qualitativen Zusammensetzung des Lichtes angibt. Um möglicherweise diese Schwierigkeit zu überwinden machte ich u. a. eine Reihe Versuche mit dem Ederschen Photometer (siehe Seite 443), indem ich der Ederschen Flüssigkeit eine bestimmte Menge der sensibilisierenden Lösung zusetzte, mit welcher der betreffende biologische Versuch ausgeführt werden sollte. Die Reaktion erwies sich auch als geeignet für eine Sensibilisierung mit einem großen Teil der photobiologischen Sensibilisatoren, und da die Belichtung durch Glas vorgenommen wurde, wodurch die sonst besonders wirksamen ultravioletten Strahlen ferngehalten wurden, hatte ich mir gedacht auf diesem Wege eine genauere Schätzung der Intensität der bestimmten Spektralstrahlen, welche für den betreffenden Versuch Bedeutung hatten, erzielen zu können. v. Tappeiners und Jodlbauers gleichzeitiger Nachweis der Bedeutung der Sauerstoffspannung für die Reaktionsgeschwindigkeit in der Ederschen Flüssigkeit, veranlaßte mich indessen — bei diesen Untersuchungen — die photometrischen Bestimmungen als allzu ungenau und allzu zeitraubend aufzugeben.

abgemessene Menge Paramäcien-Kultur überführt und nach dem Schütteln brachte ich Tropfen dieses Präparates unter dem Deckglas in Böttgerschen feuchten Kammern an. In Versuchen mit starken Farbstofflösungen ist die Größe der Tropfen von großer Bedeutung, und es wurde daher Gewicht darauf gelegt, sie so gleichmäßig groß wie möglich zu machen; jeder dieser Tropfen enthielt in der Regel acht bis zehn Paramäcien. Aus jeder Mischung wurden beständig wenigstens acht Deckglaspräparate hergestellt, von denen ich drei der Einwirkung des Tageslichtes aussetzte, während das vierte als Kontrolle im Dunkeln angebracht wurde. Zur weiteren Kontrolle stellte ich außerdem beständig neben den übrigen Licht-Präparaten ein Präparat mit normaler Paramäcien-Kultur ohne jeglichen Zusatz. Es passiert nämlich im Sommer nicht selten, daß selbst diffuses Tageslicht, vielleicht in Verbindung mit einer hohen Lufttemperatur, auf nicht sensibilisierte Paramäcien tödend wirkt. Aus demselben Grund wurden die Präparate gewöhnlich in einem Fenster gegen Osten angebracht. Zum Vergleich mit den Serumpräparaten wurden gleichzeitig eine ähnliche Reihe Präparate exponiert, in welchen das Serum durch ein gleiches Volumen Wasser ersetzt war. Die angegebenen Tötungszeiten bezeichnen die Zeit von dem Augenblick, wo die Präparate dem Licht ausgesetzt wurden, bis zu dem Augenblick, wo sämtliche Paramäcien in der betreffenden Präparat-Serie tot (d. h. im Auflösungs-zustand) vorgefunden wurden.

Paramäcien eignen sich vorzüglich zu Versuchen dieser Art, und sie sind daher auch häufig von früheren Untersuchern bei Sensibilisierungsversuchen benutzt worden. Es wird indessen notwendig in dem Augenblick besondere Maßregeln zu ergreifen, wo die Versuche mit serumbeigemischten Flüssigkeiten angestellt werden. Erstens das Serum zu verdünnen, da die Paramäcien widrigenfalls infolge der Salzwirkung zugrunde gehen, der gegenüber sie äußerst empfindlich sind. Goldberger<sup>1)</sup> bezeichnet eine 0,3 % Na-Cl-Lösung als unschädlich für *Paramaecium caudatum*, und ich machte es mir zur Regel die Mischungen von Serum, Farb-

---

<sup>1)</sup> Goldberger, H., Die Wirkung von anorganischen Substanzen auf Protisten. Zeitschr. f. Biologie 48. 1902.

stofflösung und Kulturflüssigkeit derart herzustellen, daß das Serum im Verhältnis 1:4 verdünnt wurde. Es hat sich indessen gezeigt, daß Serum selbst in diesen oder in noch größeren Verdünnungen gegenüber Paramäcien giftige Eigenschaften besitzt. Dieses Verhalten wurde zuerst von Raab (a. a. O.) beobachtet. Ledoux-Lebard<sup>1)</sup> untersuchte das Verhältnis eingehender. Werden Paramäcien in verdünntes Serum gebracht, so hören deren Stellenbewegungen nach einigen Minuten auf (Immobilisierung); Formveränderung tritt vorläufig nicht ein, und Kornströmungen, sowie ebenfalls ein leichtes Flimmern lassen sich noch mehrere Stunden lang wahrnehmen. Nach einiger Zeit tritt in der Regel eine Agglutination ein, indem die Paramäcien häufig zwei und zwei mit den hintersten Polen gegeneinander stoßend vereint werden. Hebt man nun zu diesem Zeitpunkt die Giftwirkung durch z. B. starke Verdünnung mit Wasser auf, so läßt sich beobachten, wie die Paramäcien ihre aktiven Bewegungen allmählich wieder aufnehmen, und wie es den agglutinierten Tieren durch plötzliche schnelle Bewegungen gelingen kann, sich voneinander frei zu machen. Wird die Giftwirkung dahingegen nicht aufgehoben, so sterben die Paramäcien nach kürzerer oder längerer Zeit; die Zeit ist teils von dem Verdünnungsgrad des Serums, teils von der Art des Serums abhängig. Ochsen Serum ist besonders stark giftig, Menschen Serum z. B. in verhältnismäßig geringem Grad giftig. Ledoux-Lebard fand, daß der hier besprochene Giftstoff (das Serum-Alexin) bei 30 Minuten langer Erwärmung des betreffenden Serums auf 55° destruiert wird. Ich fand jedoch eine derartige Erwärmung betreffs einzelner Seren (z. B. Ochsen Serum) unzureichend, und ich benutzte daher zu den Paramäcienversuchen Serum, das 45 Minuten auf 56° erwärmt gewesen war<sup>2)</sup>. Bei Versuchen mit Trypanosomen war mir der Nachweis eines Unterschieds zwischen der Wirkung derart behandelten Serums und der Wirkung normalen Serums gegenüber den sensibilisierenden Lösungen nicht möglich.

---

<sup>1)</sup> Ledoux-Lebard, Action du Serum Sanguine sur les Paramécies. Ann. de l'Institut Pasteur **16**, 510. 1902.

<sup>2)</sup> Das derart behandelte Serum wird im folgenden als O-Serum im Gegensatz zu dem normalen N-Serum bezeichnet.



Röbkle<sup>1)</sup> hat in einer vor kurzem erschienenen Arbeit, ohne die früheren Untersuchungen auf diesem Gebiete zu kennen, eine detaillierte Beschreibung der oben erwähnten Alexinwirkung des Serums gegenüber Paramäcien gegeben. Die Beschreibung deckt sich in allem wesentlich mit dem oben Ausgeführten; Röbkle hebt nur bezüglich der Agglutination hervor, daß diese nicht unter den Paramäcien gegenseitig, sondern zwischen den Paramäcien und zufälligen Verunreinigungen, Bakterienhaufen und ähnlichem, vor sich geht. Der Grund hierzu ist vielleicht darin zu suchen, daß Röbkle gewöhnlich mit stark verdünnten Seren arbeitete; allenfalls habe ich in Verdünnungen 1 Teil Serum: 3 Teilen Wasser häufig Agglutination zwischen Paramäcien untereinander beobachtet. Von größerem Interesse ist für die vorliegende Arbeit folgende Beobachtung. Röbkle fand, daß die Vitalfärbung der spezifisch gelähmten Paramäcien mit dünnen Neutralrot-Lösungen bedeutend langsamer vor sich ging, als die Vitalfärbung normaler Paramäcien, und daß die ersten in Übereinstimmung hiermit auch bedeutend widerstandsfähiger gegenüber konzentrierten Neutralrot-Lösungen als die letzten waren. Röbkle ist nicht imstande, eine Erklärung dieses merkwürdigen Verhältnisses zu geben. Es klingt von vorne herein ganz unwahrscheinlich, daß gelähmte, schon moribunde Paramäcien weniger empfänglich als die normalen gesunden Paramäcien für eine Vitalfärbung oder für die Einwirkung eines neuen Giftes sein sollten, und dies ist in Wirklichkeit auch nicht der Fall. Das von Röbkle beobachtete Phänomen ist ausschließlich darauf begründet, daß das vorhandene Serum die Diffusionsgeschwindigkeit des Neutralrot herabsetzt, ein Verhältnis, welches später (Absch. 7) näher besprochen werden soll.

Ich teile im Anschluß an das Obenstehende einige Untersuchungen über die Wirkung des Lichtes auf die erwähnten Alexine mit — Untersuchungen, welche für einige der späteren Versuchsreihen Bedeutung haben. Es erschien mir schon a priori wahrscheinlich, daß ein so thermolabiler Stoff auch destruiert werden mußte, wenn er der Einwirkung strahlender Energie ausgesetzt wurde, und meine Versuche bekräftigen auch diese Annahme.

---

<sup>1)</sup> Röbkle, R., Spezifische Sera gegen Infusorien. Archiv für Hygiene 54. 1905.

## Versuch 1.

N-Kaninchenserum wird in zwei Schmidt-Nielsenschen Kammern<sup>1)</sup> angebracht, von denen die eine Glas-, die andere Quarzwände hat. Die Dicke der Serumschicht beträgt 4 mm. Die zwei Präparate werden unter möglichst gleichartigen Verhältnissen dem ad. mod. Finsen konzentrierten Licht einer elektrischen Kohlenbogenlampe von 35 Amp. und 45 Volt ausgesetzt, und sie werden beide während der Belichtung mit kaltem Wasser überrieselt, wodurch die Wärmewirkung des Lichtes neutralisiert wird. Die Belichtungszeit beträgt 30 Min.

Danach wird die Giftigkeit der zwei belichteten Seren, sowie die eines unbelichteten Kontrollserums gegenüber Paramäcien geprüft.

Durch Glas belichtetes Serum	— 1 Teil	} Param. nach 15 Min. immobilisiert; Param. † 4 Stunden.
Leitungswasser	— 1 Teil	
Paramäcienkultur	— 2 Teile	
Durch Quarz belichtetes Serum	— 1 Teil	} Param. leben 24 Std. beständig mit nor- malen Bewegungen.
Leitungswasser	— 1 Teil	
Par. Kultur	— 2 Teile	
Nicht belichtetes Serum	— 1 Teil	} Param. nach 15 Min. immobilisiert; Param. † 4 Stunden.
Leitungswasser	— 1 Teil	
Par. Kultur	— 2 Teile	

Der Versuch zeigt, daß das Licht imstande ist, den für Paramäcien giftigen Stoff im Serum zu destruieren, sowie daß die Wirkung den ultra-violetten Strahlen zuzuschreiben ist, welche Quarz passieren, jedoch von Glas absorbiert werden. In einem anderen Versuch konnte ich selbst nach einer 45 Min. langen Belichtung mit konzentriertem Licht einer 50 Amp. und 45 Volt-Lampe keine deutliche Wirkung der Glas passierenden Strahlen nachweisen. Das Alexin erwies sich indessen als geeignet für eine Sensibilisierung gegenüber diesen langwelligen Strahlen, wie es aus folgenden Versuchen hervorgeht.

<sup>1)</sup> Eine Beschreibung derselben ist in „Mitteilungen aus Finsens med. Lichtinstitut“ Heft IX zu finden.

## Versuch 2.

Untenstehende Mischungen wurden im Dunkelzimmer hergestellt:

a.	}	N-Kaninchenserum — 1 Teil
		Eosinlösung (1 — 800) — 1 Teil
b.	}	N-Kaninchenserum — 1 Teil
		Methylenblaulösung (1 — 65 000) — 1 Teil
c.	}	N-Kaninchenserum — 1 Teil
		Dichloranthracendisulfosaures Na (1 — 500) — 1 Teil
Kontrolle	}	N-Kaninchenserum — 1 Teil
		Leitungswasser — 1 Teil.

Von jeder dieser Mischungen wurde ein Teil ins Dunkel gestellt, während ein zweiter Teil in Schmidt-Nielsenschen Kammern mit Glaswänden gebracht wurde, um danach der Einwirkung des Tageslichts ausgesetzt zu werden. Die Dicke der Flüssigkeitsschicht betrug 7 mm, die Expositionszeit 4 Stunden. Der Versuch wurde am kürzesten Tage des Jahres ausgeführt und zur Sicherung einer genügenden Belichtung setzte ich die Präparate in einer der 4 Stunden direktem Sonnenlicht aus. Die Belichtung wurde bei Frostwetter am offenem Fenster vorgenommen, was eine künstliche Abkühlung der Präparate unnötig machte, indem die Temperatur im Methylenblau-Präparat, wo die Wärmesteigerung natürlich am größten war, 23° nicht überschritt.

Darauf bereitete ich im Dunkelzimmer sowohl Präparate aus den belichteten wie auch aus den unbelichteten Mischungen, indem ich jeder derselben gleich große Mengen einer und derselben Paramäcienkultur zusetzte. Die Präparate wurden gegen Licht geschützt.

a. belichtet	— 1 Teil	}	Par. (im Dunkel) leb. 24 Std. mit normalen Bewegungen.
Par. Kultur	— 1 Teil		
a. unbelichtet	— 1 Teil	}	Par. (im Dunkel) nach 30 Min. im- mobilisiert; leb. 7 Std. † 18 Std.
Par. Kultur	— 1 Teil		
b. belichtet	— 1 Teil	}	Par. (im Dunkel) leb. 24 Std. mit normalen Bewegungen.
Par. Kultur	— 1 Teil		
b. unbelichtet	— 1 Teil	}	Par. (im Dunkel) nach 40 Min. im- mobilisiert; leb. 7 Std. † 18 Std.
Par. Kultur	— 1 Teil		

c. belichtet	— 1 Teil	} Par. (im Dunkel) leb. 24 Std. mit normalen Bewegungen.
Par. Kultur	— 1 Teil	
c. unbelichtet	— 1 Teil	} Par. (im Dunkel) nach 30 Min. imobilisiert; leb. 7 Std. † 18 Std.
Par. Kultur	— 1 Teil	
Kontrolle belichtet	— 1 Teil	} Par. (im Dunkel) nach 20 Min. imobilisiert; † 4 Std.
Par. Kultur	— 1 Teil	
Kontrolle unbelichtet	— 1 Teil	} Par. (im Dunkel) nach 20 Min. imobilisiert; † 4 Stunden.
Par. Kultur	— 1 Teil	

Ich muß hinsichtlich der in obenstehenden sowohl wie in den späteren Versuchen angeführten Zeiten folgendes bemerken: Die Bezeichnung „Par. leb. 24 Std.“ bedeutet, daß sämtliche Paramäcien der zusammengehörenden Präparate lebend und anscheinend unbeschädigt 24 Stunden nach Beginn der Versuche befunden wurden. Betreff der belichteten Präparate gilt, daß die Exposition meist gegen 10 Uhr vormittags begann; waren die Paramäcien bis um 7 Uhr abends nicht tot, wurde die Belichtung am nächsten Morgen bis um 10 Uhr fortgesetzt, und wurden sie alsdann unbeschädigt befunden, so wurden sie als „24 Stunden leb.“ bezeichnet. Ich erachtete eine weitere Belichtung als überflüssig, da mich zahlreiche Versuche überzeugt hatten, daß sich eine weitere schädliche Wirkung des Lichtes auf Paramäcien so gut wie immer innerhalb der ersten 24 Stunden zu erkennen geben wird.

Bezüglich Paramäcien, die am Abend lebten, dahingegen am folgenden Morgen tot waren, habe ich die Bezeichnung „Par. † 24 Stunden“ gebraucht; dies bedeutet also, daß die Tötungszeit zwischen 9 und 24 Stunden liegt.

Vergleicht man die Resultate des oben beschriebenen Versuchs 2, so wird eine anscheinende Abweichung auffallend sein, indem auch die Giftigkeit der unbelichteten Seren recht variierenden Ausschlag gibt. Die Immobilisierung der Paramäcien tritt bald nach 20, bald nach 30 und bald nach 40 Min. ein; die Tötungszeiten variieren ebenfalls von 4 Stunden zuzeiten zwischen 7 und 18 Stunden. Die Ursache muß, da alle anderen Verhältnisse gleich waren, im Zusatz der sensibilisierenden Lösungen gesucht werden, welche also selbst im Dunkel einen hemmenden Einfluß auf die Alexinwirkung des Serums haben müssen. Ich machte folgende Versuche zur eingehenderen Untersuchung dieses Verhältnisses.

## Versuch 3.

Verschieden starke dichloranthracendisulfosaure Natronlösungen ( $M. = 451$ )<sup>1)</sup> werden mit gleichen Teilen normalen Kaninchenserums vermischt. Zu diesen Mischungen setzte ich gleiche Teile einer Paramäcien-Kultur, und in gedämpfter Belichtung verfertigte ich hieraus so schnell wie möglich Präparate (hängende Tropfen in feuchten Kammern), die in diffuses Tageslicht resp. ins Dunkel gebracht wurden. In den Kontrollpräparaten wird die dichloranthracendisulfosaure Natronlösung durch ein entsprechendes Volumen Paramäcien-Kultur ersetzt, so daß der Verdünnungsgrad in allen Präparaten gleichmäßig war.

In der Tabelle werden folgende Bezeichnungen benutzt.

○ — Die Immobilisation eingetreten.

⊕ — Die eingetretene Immobilisation wieder aufgehoben.

† — Tod eingetreten.

L. — Par. starben infolge der Lichtwirkung.

A. — Par. starben infolge der Alexinwirkung.

÷A. — Die Alexinwirkung ganz ausgeblieben.

Dichloranthracendisulfosaures Na		N-Kaninchenserum	Paramäcien-Kultur	Paramäcien im Licht	Paramäcien im Dunkel
$\frac{1}{25}$	Mol. — 1	1	2	(÷A.) † 50 Min. (L.)	(÷A.) Leb. 24 Tim.
$\frac{1}{50}$	Mol. — 1	1	2	(÷A.) † 1 Stunde (L.)	(÷A.) Leb. 24 Tim.
$\frac{1}{100}$	Mol. — 1	1	2	(÷A.) † 2 Stunden (L.)	○ 40 Min. — ⊕ 6 Stunden — Hälfte † 24 Stunden (A.)
$\frac{1}{500}$	Mol. — 1	1	2	○ 35 Min. — ⊕ 1½ Stunde — Leb. 24 Stunden	○ 30 Min. † 24 Stunden (A.)
$\frac{1}{1000}$	Mol. — 1	1	2	○ 30 Min. — ⊕ 2½ Stunden — Leb. 24 Stunden	○ 30 Min. † 10 Stunden (A.)
$\frac{1}{5000}$	Mol. — 1	1	2	○ 20 Min. — ⊕ 4 Stunden — Leb. 24 Stunden	○ 20 Min. † 9 Stunden (A.)
$\frac{1}{10000}$	Mol. — 1	1	2	○ 20 Min. — ⊕ 5 Stunden — Leb. 24 Stunden	○ 20 Min. † 9 Stunden (A.)
$\frac{1}{50000}$	Mol. — 1	1	2	○ 20 Min. † 7 Stunden (A.)	○ 20 Min. † 7 Stunden (A.)
$\frac{1}{100000}$	Mol. — 1	1	2	○ 20 Min. † 4 Stunden (A.)	○ 20 Min. † 4 Stunden (A.)
	Kontrolle	1	3	○ 20 Min. † 4 Stunden (A.)	○ 20 Min. † 4 Stunden (A.)

<sup>1)</sup> In der Regel habe ich zu meinen Versuchen grammolekulare Lösungen benutzt, und ich benutzte die Bezeichnung:  $\frac{1}{25}$  Mol.,  $\frac{1}{50}$  Mol. usw. für Lösungen von  $\frac{1}{25}$ ,  $\frac{1}{50}$  usw. Grammoleküle des betreffenden Stoffes in 1 Liter Wasser.

Es geht mit größter Deutlichkeit aus vorstehender Versuchsreihe hervor, daß eine Hinzusetzung von dichloranthracendisulfosaurem Natron zum Serum die Alexinwirkung desselben gegenüber Paramäcien aufhebt resp. hemmt. Die Zahlen in den Rubriken rechts zeigen, daß die Stärke der dichloranthracendisulfosauren Natronlösung, welche im Dunkel imstande ist, vollständig die Alexinwirkung ihres gleichen Kubikinhalts Kaninchenserum aufzuheben, zwischen  $\frac{1}{50}$  und  $\frac{1}{100}$  Mol. liegt, während sich ein hemmender Einfluß noch bei bis zu  $\frac{1}{50000}$  Mol. Lösungen nachweisen läßt. Betreff der belichteten Präparate werden die Verhältnisse komplizierter, indem die Tötungszeiten der Paramäcien von vier einander entgegenwirkenden Faktoren abhängig werden. Letztere sind:

- a) Das Alexin — in dessen Wirkung den Paramäcien gegenüber.
- b) Der Farbstoff — in dessen Wirkung dem Alexin gegenüber.
- c) Das Licht — in dessen Wirkung gegenüber dem sensibilisierten Alexin.
- d) Das Licht — in dessen Wirkung gegenüber den sensibilisierten Paramäcien.

Ferner wäre es denkbar, daß die Toxizität der Farbstofflösungen gegenüber den Paramäcien eine Rolle spielen könnte, und dies ist auch in Versuchen mit mehr giftigen Sensibilisatoren der Fall; in obenstehendem Versuch ergibt sich für die Toxizität aber kein Ausschlag. Bei Vergleich mit den Dunkelpräparaten kann man aber leicht die Wirkungen der oben genannten Faktoren auseinander halten. In den Präparaten mit den konzentrierten Farbstofflösungen ( $\frac{1}{25}$  und  $\frac{1}{50}$  Mol.) bleibt die Alexinwirkung infolge b) ganz aus. In der nun folgenden Lösung ( $\frac{1}{100}$  Mol.) trägt c) zur Aufhebung der Alexinwirkung mit bei, indem diese betreffs der Dunkelpräparate einen deutlichen Ausschlag aufweist. Die Paramäcien werden noch in dieser Konzentration von d) getötet. In den stärkeren Verdünnungen wird dahingegen keine Wirkung von d) verspürt, wohingegen c) sich deutlich bis zu  $\frac{1}{50000}$  Mol. Lösungen erkennen läßt, wo das Resultat in Licht und Dunkel dasselbe ist und wo die geringe Hemmung der Alexinwirkung augenscheinlich auf b) zurückzuführen ist. Erst  $\frac{1}{100000}$  Mol. dichloranthracendisulfosaure Na-Lösungen erweisen sich sowohl im Licht wie

auch im Dunkel ohne Einfluß auf die Alexinwirkung des Serums.

Man wird in untenstehender Tabelle, in welcher ich die Resultate eines Versuches mit Rose Bengal zusammengestellt habe, ganz analoge Verhältnisse finden. Dieser Stoff ist gegenüber Paramäcien bedeutend giftiger als das dichloranthracendisulfosaure Natron und die Toxizität gibt sich daher auch betreff der konzentriertesten Lösungen zu erkennen, wo diese Ursache zum Tod der Paramäcien mit einem T. angedeutet ist.

## Versuch 4.

Rose Bengal. (Tetrachlortetraiodfluoreszein-Na.)

M. = 1018.

Rose Bengal		N-Kaninchen- serum	Param.-Kultur	Paramäcien im Licht	Paramäcien im Dunkel
$\frac{1}{50}$	Mol. — 1	1	2	(÷A.) † 2 Min. (L.)	(÷A.) † 5 Min. (T.)
$\frac{1}{100}$	Mol. — 1	1	2	(÷A.) † 6 Min. (L.)	(÷A.) Hälfte † 24 Std. (T.)
$\frac{1}{200}$	Mol. — 1	1	2	(÷A.) † 20 Min. (L.)	(÷A.) Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{500}$	Mol. — 1	1	2	(÷A.) † 45 Min. (L.)	○ 30 Min. — ⊕ 4 Stunden Hälfte † 24 Stunden (A.)
$\frac{1}{1000}$	Mol. — 1	1	2	(÷A.) † 1½ Stunden (L.)	○ 20 Min. Größter Teil † 24 Stunden (A.)
$\frac{1}{2000}$	Mol. — 1	1	2	(÷A.) † 5 Stunden (L.)	○ 15 Min. † 24 Stunden (A.)
$\frac{1}{5000}$	Mol. — 1	1	2	(÷A.) Hälfte † 24 Tim. (L.)	○ 15 Min. † 24 Stunden (A.)
$\frac{1}{10000}$	Mol. — 1	1	2	(÷A.) Leb. 24 Stunden	○ 15 Min. † 24 Stunden (A.)
$\frac{1}{50000}$	Mol. — 1	1	2	○ 35 Min. — ⊕ 2 Stunden — Leb. 24 Stunden	○ 15 Min. † 24 Stunden (A.)
$\frac{1}{100000}$	Mol. — 1	1	2	○ 25 Min. — ⊕ 3 Stunden — Leb. 24 Stunden	○ 15 Min. † 24 Stunden (A.)
$\frac{1}{500000}$	Mol. — 1	1	2	○ 15 Min. — ⊕ 5 Stunden — Leb. 24 Stunden	○ 15 Min. † 7 Stunden (A.)
$\frac{1}{1000000}$	Mol. — 1	1	2	○ 15 Min. — ⊕ 10 Stunden — Leb. 24 Stunden	○ 15 Min. † 5 Stunden (A.)
$\frac{1}{3000000}$	Mol. — 1	1	2	○ 15 Min. † 7 Stunden (A.)	○ 15 Min. † 4½ Stunden (A.)
$\frac{1}{5000000}$	Mol. — 1	1	2	○ 15 Min. † 4½ Stunden (A.)	○ 15 Min. † 4½ Stunden (A.)
Kontrolle		1	3	○ 15 Min. † 4½ Stunden (A.)	○ 15 Min. † 4½ Stunden (A.)

Die Tabelle zeigt, daß bei Mischung eines Teiles Rose Bengal-Lösung von ungefähr  $\frac{1}{200}$  Mol. mit einem Teil Kaninchen-serum und zwei Teilen Paramäcienkultur — wenn die Präparate in Dunkel gehalten werden —, absolut keine Giftwirkung gegenüber den Paramäcien weder seitens des Farbstoffes noch

seitens des Serumalexins zu beobachten ist. Benutzt man dagegen entweder eine stärkere oder eine schwächere Rose Bengal-Lösung, so gehen die Paramäcien zugrunde — im ersten Fall wegen der Toxizität des Farbstoffes, im letzten wegen der Alexinwirkung. Setzt man die Präparate der Einwirkung des Tageslichtes aus, so wird das Verhältnis ein ganz anderes. In diesem Fall werden sich die Paramäcien vollständig unbeeinflusst seitens der verschiedenen schädlichen Agenzien in den Präparaten erweisen, zu deren Herstellung Rose Bengal-Lösungen von ca.  $\frac{1}{10000}$  Mol. verwendet sind. In den konzentrierteren Lösungen werden die Paramäcien vom Lichte getötet, und in mehr verdünnten Lösungen wird die Alexinwirkung stärker und stärker hervortreten.

In den obenstehenden Versuchen haben wir noch ein Verhältnis, das betont zu werden verdient, da es für die Auffassung des photobiologischen Sensibilisationsprozesses von theoretischem Interesse ist. Es wird betreff beider Tabellen auffallend sein, daß die sensibilisierende Fähigkeit der Serumfarbstoffmischungen gegenüber dem Alexin noch deutlich in einer Reihe Verdünnungen zutage tritt, in welchen jegliche Spur einer sensibilisierenden Wirkung gegenüber Paramäcien aufgehört hat. Die Ursache ist nach meiner Ansicht darin zu suchen, daß die Lichtwirkung gegenüber dem Paramäcienrest in dem Augenblick zustande kommt, wo etwas des Farbstoffes in deren Körper diffundiert ist, während ein derartiges Hindernis der sensibilisierenden Wirkung der Farbstoffe gegenüber Lösungen nicht organisierter Stoffe wegfällt. Hierzu kommt, daß die Diffusionsfähigkeit der Farbstoffe durch die Serumbeimischung ganz bedeutend herabgesetzt wird und daß sie, betreffs der Serum-Farbstoffmischungen, in denen sich eine sensibilisierende Fähigkeit gegenüber Paramäcien nicht länger nachweisen läßt, praktisch gleich Null ist. (Vergleiche die Diffusionsversuche in VII.)

Die hier erwähnte Fähigkeit, die spezifische Giftwirkung des Serums gegenüber Paramäcien im Dunkel zu verringern resp. aufzuheben, habe ich bei allen den Stoffen in der Fluoreszeinreihe gefunden, deren Wirkung ich bezüglich dieses Punktes zur Untersuchung heranzog: Tetrabromfluoreszein-Na, und Tetra-



jodfluoreszein-Na, Tetrachlortetraiodfluoreszein-Na, und Tetrachlortetrabromfluoreszein-Na. Dieselbe Wirkung wurde mit mehreren Farbstoffen anderer chemischen Gruppen erzielt, z. B. mit dichloranthracendisulfosaurem Na und Phenosafraninchlorid.

Alle die genannten Stoffe wirken außerdem im Licht als kräftige Sensibilisatoren gegenüber dem Serum-Alexin.

Eine Beimischung der oben erwähnten sensibilisierenden Stoffe zum Blut hat auch einen anderen Ausschlag zur Folge, sie heben nämlich die Koagulationsfähigkeit des Blutes auf oder verringern dieselbe, gleichviel ob die Beimischung in corpore oder in vitro geschieht.

#### Versuch 5.

Graues Kaninchen; Gewicht 2650 g. — 48 ccm einer 2%igen Eosinlösung (in 0,4% NaCl) werden innerhalb 11 Minuten durch die vena jugularis dem Kaninchen beigebracht, — also 0,36 g Eosin-Na pro Kilo Kaninchen. — 10 resp. 30 Minuten nach Schluß der Injektion werden von Art. carotis Blutproben genommen. In den in den Eisschrank gestellten Blutproben tritt keine Koagulation ein; nach 24 Stunden findet man in beiden Präparaten unten die sich als Bodensatz abgesetzten Blutkörperchen und oben eine Schicht stark eosin gefärbtes, jedoch klares nicht geronnenes Plasma.

#### Versuch 6.

Graues Kaninchen; Gewicht 2850 g. Es werden 28 ccm einer 2%igen Eosinlösung (in 0,4% NaCl) intravenös injiziert, also 0,2 g Eosin-Na pro Kilo Körpergewicht. 10 Minuten nach Schluß der Injektion werden 20 ccm Blut aus der Art. carotis genommen.

Nach 14-stündigem Stehen im Eisschrank findet man in der Blutprobe ein Koagulum von ca. 4 ccm Größe. Der Rest wird zentrifugiert und zeigt sich nach der Zentrifugierung als in zwei Schichten koaguliert, indem die Blutkörperchen vor dem Eintreten der Koagulation Zeit erhalten haben, sich abzusetzen.

Um einen Überblick zu erhalten, eine wie große Menge des betreffenden Farbstoffes erforderlich ist, um die Koagulation einer bestimmten Menge Blutes zu verhindern, machte ich folgende Versuche in vitro.

#### Versuch 7.

Kaninchenblut wird aus der Art. carotis direkt in eine Reihe Eosinlösungen verschiedener Stärke geleitet. Einem Teil Eosinlösung werden 2 Teile Blut zugesetzt. Da die Eosinlösungen nicht mit einer physiologischen Kochsalzlösung isotonisch sind, werden Kontrollversuche mit destilliertem Wasser resp. mit einer 0,85%igen NaCl-Lösung vorgenommen.

6 ccm Blut + 3 ccm dest. Wasser	— nach 5 Min. koaguliert
6 „ „ + 3 „ 0,85%iges NaCl	— „ 5 „ „
6 „ „ + 3 „ Eosin-Na(1:25)	— ÷ Koagulation
6 „ „ + 3 „ „ (1:50)	— ÷ „
6 „ „ + 3 „ „ (1:100)	— unvollständ. Koagulation
6 „ „ + 3 „ „ (1:200)	— „ „
6 „ „ + 3 „ „ (1:400)	— „ „
6 „ „ + 3 „ „ (1:800)	— „ „
6 „ „ + 3 „ „ (1:1600)	— nach 5 Min. koaguliert.

In den mit „unvollständige Koagulation“ bezeichneten Präparaten nimmt die Größe des Koagulums mit dem Verdünnungsgrad der Eosinlösung zu. Im letzten Präparat ist die Koagulation ungefähr vollständig, jedoch ist das Koagulum weniger fest als in den Kontrollmischungen.

Die übrigen Stoffe in der Fluoreszeinreihe sowie das Methylenblau haben eine ähnliche Wirkung.

#### Versuch 8.

6 ccm Blut + 3 ccm Methylenblau(1:50)	— ÷ Koagulation
6 „ „ + 3 „ „ (1:100)	— unvollst. Koagulation
6 „ „ + 3 „ „ (1:200)	— „ „

Ich will im Anschluß an obenstehendes noch anführen, daß koaguliertes Blut Rose Bengal-injizierter Kaninchen auffallend häufig fehlende Tendenz zur Zusammenziehung und Serumausscheidung aufweist.

## III.

## Über den Einfluß des Serums auf die toxischen Eigenschaften photobiologischer Sensibilisatoren.

Nachdem ich im vorhergehenden nachgewiesen habe, wie eine Reihe — in ihrer chemischen Konstitution recht verschiedenartige Sensibilisatoren sowohl direkt (im Dunkel) wie auch indirekt (im Licht) imstande sind, die toxischen Wirkungen des Serums zu verringern oder gänzlich aufzuheben, will ich in diesem Abschnitt einige Versuche besprechen, aus welchen hervorgeht, daß die Einwirkung in dieser Beziehung insofern gegenseitig ist, als die Serumbeimischung ebenfalls die Toxizität der betreffenden Sensibilisatoren verringert resp. aufhebt.

Die Versuchsanordnung war folgende: Aus dem zur Untersuchung vorliegenden Stoff wurden eine Reihe Lösungen abnehmender Konzentration hergestellt; aus jeder dieser Lösungen machte ich danach Mischungen zu gleichen Teilen mit Serum resp. mit Leitungswasser. Das benutzte Serum war vorher 45 Minuten lang auf 56° erhitzt worden. Sämtlichen Mischungen wurde danach das gleiche Volumen einer Paramäcienkultur zugesetzt, so daß jedes Präparat 1 Teil Farbstofflösung, 1 Teil Serum — resp. Leitungswasser — und 2 Teile Paramäcienkultur enthielt.

Versuche dieser Art müssen natürlich am besten in absolutem Dunkel ausgeführt werden, da die Wirkung des Lichtes auf die sensibilisierten Paramäcien sonst leicht die Richtigkeit der Resultate kompromittieren wird. Namentlich in Versuchen mit stark wirkenden Sensibilisatoren wie z. B. Rose Bengal, kann selbst eine geringe Lichtmenge außerordentlich störend wirken. Die Mischungen wurden daher in Reagenzgläsern vorgenommen, die im voraus in Gehäusen lichtdichten schwarzen Papiers angebracht waren, und die augenblicklich zugepfropft wurden. Zur weiteren Sicherheit arbeitete ich beständig bei so stark gedämpfter Belichtung, daß sich die Einteilung der Pipetten gerade ablesen ließ. Bei der Untersuchung der Präparate war die Anwendung von Licht ja indessen nicht zu vermeiden, jedoch sicherte ich mich gegen dessen Einfluß auf die Tötungszeiten der Paramäcien durch folgendes Verfahren:

Ich goß im Dunkelzimmer in bestimmten Zwischenräumen Proben der Präparate in Uhrgläser über, und die Proben untersuchte ich danach beim Schein eines Stearinlichtes unter einem im voraus eingestellten Mikroskop. Ist alles wohl vorbereitet, so erfordert die Entscheidung dessen, ob die Paramäcien noch leben oder tot sind, nur einige wenige Sekunden lange Beobachtung, so daß die schwache Beleuchtung keine Zeit zur Beeinflussung des Bildes erhält, und durch beständiges Untersuchen neuer Proben von den in absolutem Dunkel aufbewahrten Präparaten vermied ich eine Summierung wiederholter Lichtwirkungen.

## Versuch 9.

Tetrabromfluoreszein-Na (Eosin-Na).

(M. = 692.)

Tetrabromfluoreszein-Na	Leitungswasser	O-Kaninchen-Serum	Param.-Kultur	Paramäcien im Dunkel
$\frac{1}{25}$ Mol. $\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right.$	1 0	0 1	2 2	† 25 Min. Größtenteils † 24 Stunden
$\frac{1}{50}$ Mol. $\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right.$	1 0	0 1	2 2	† 1 Stunde Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{100}$ Mol. $\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right.$	1 0	0 1	2 2	Hälfte † 24 Stunden Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{200}$ Mol. $\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right.$	1 0	0 1	2 2	Leb. 24 Stunden Leb. 24 Stunden

Die Toxizitätsherabsetzung ist schon in diesem Versuch unverkennbar — tritt aber im folgenden Versuch mit dem in wässrigen Lösungen stark toxischen Rose Bengal viel stärker hervor.

Versuch 10.  
Tetrachlortetraiodfluoreszein-Na (Rose Bengal)<sup>1)</sup>.  
(M. = 1018.)

Tetrachlor- tetraiod- fluoreszein- Na	Lei- tungs- wasser	O- Kanin- chen- Serum	Param.- Kultur	Paramäcien im Dunkel
$\frac{1}{50}$ Mol. {	1	0	2	† Momentan
	0	1	2	† 5 Min.
$\frac{1}{75}$ Mol. {	1	0	2	† Momentan
	0	1	2	† 30 Min.
$\frac{1}{100}$ Mol. {	1	0	2	† Momentan
	0	1	2	Hälfte † 24 Stunden
$\frac{1}{200}$ Mol. {	1	0	2	† Momentan
	0	1	2	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{500}$ Mol. {	1	0	2	† Momentan
	0	1	2	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{1000}$ Mol. {	1	0	2	† 1 Min.
	0	1	2	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{2000}$ Mol. {	1	0	2	† 5 Min.
	0	1	2	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{5000}$ Mol. {	1	0	2	† 35 Min.
	0	1	2	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{10000}$ Mol. {	1	0	2	Hälfte † 24 Stunden
	0	1	2	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{50000}$ Mol. {	1	0	2	Leb. 24 Stunden
	0	1	2	Leb. 24 Stunden

<sup>1)</sup> Rose Bengal ist schwer löslich in Leitungswasser, und klare Lösungen erhält man erst in Verdünnungen von 1 : 15000 bis 1 : 20000. — In destilliertem Wasser ist Rose Bengal dahingegen sehr leicht löslich, und wird eine derartig hergestellte konzentrierte Rose Bengal-Lösung durch Beimischung von Leitungswasser verdünnt, so hält sie sich klar.

## Versuch 11.

Tetrachlortetrabromfluoreszein-Kalium<sup>1)</sup> (M. = 830).

Tetrachlor- tetrabrom- fluoreszein- Ka	Lei- tungs- wasser	O- Kanin- chen- Serum	Param- Kultur	Paramäcien im Dunkel
$\frac{1}{50}$ Mol. $\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right.$	1	0	2	† Momentan
	0	1	2	† 15 Min.
$\frac{1}{75}$ Mol. $\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right.$	1	0	2	† Momentan
	0	1	2	† 30 Min.
$\frac{1}{100}$ Mol. $\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right.$	1	0	2	† Momentan
	0	1	2	Hälfte † 24 Stunden
$\frac{1}{200}$ Mol. $\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right.$	1	0	2	† 2 Min.
	0	1	2	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{500}$ Mol. $\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right.$	1	0	2	† 10 Min.
	0	1	2	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{1000}$ Mol. $\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right.$	1	0	2	† 10 Min.
	0	1	2	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{2000}$ Mol. $\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right.$	1	0	2	† 25 Min.
	0	1	2	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{5000}$ Mol. $\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right.$	1	0	2	† 4 Stunden
	0	1	2	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{10000}$ Mol. $\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right.$	1	0	2	Leb. 24 Stunden
	0	1	2	Leb. 24 Stunden

<sup>1)</sup> Mit diesem Stoff, dessen sensibilisierenden Eigenschaften früher nicht untersucht sind, habe ich eine Reihe Untersuchungen angestellt, welche folgende Resultate ergaben: Tetrachlortetrabromfluoreszein-Kalium ist leicht löslich in Wasser mit einer prachtvoll grünen Fluoreszenz, welche sich mit konzentriertem Sonnenlicht noch in Lösungen von 1 : 200 000 000 hervorrufen läßt. Lösungen in Methylalkohol geben eine mehr gelbliche Fluoreszenz in Übereinstimmung mit der Verschiebung der Absorptionslinien im Spektrum nach rot. Die wässrigen Lösungen besitzen eine sehr kräftige sensibilisierende Fähigkeit, welche in Versuchen mit Paramäcien noch in Verdünnungen 1 : 10 000 000 sich zeigt. Die Toxizität ist in obenstehender Tabelle angedeutet.

Wie in der Einleitung erwähnt, haben v. Tappeiner und Jodlbauer die Aufmerksamkeit auf das eigentümliche Verhältnis gelenkt, daß die sensibilisierende Fähigkeit bei Stoffen derselben chemischen Gruppen gegenüber Paramäcien am schwächsten bei den am kräftigsten fluoreszierenden und am stärksten bei den am schwächsten fluoreszierenden Stoffen ist. Dies tritt bei der Fluoreszeingruppe am deutlichsten hervor. Tetrachlortetrabromfluoreszein scheint indessen eine Ausnahme von dieser Regel zu bilden, da sowohl dessen sensibilisierende Fähigkeit, wie auch dessen Fluoreszenz stärker als die des Erythrosins (Tetraiodfluoreszein-Na) ist.

Versuche mit anderen Stoffen der Fluoreszeinreihe (z. B. Erythrosin) ergaben bezüglich der Toxizitätsherabsetzung durch Serumbeimischung entsprechende Resultate, und es ist daher wohl anzunehmen, daß sich alle Derivate des Fluoreszeins in gleicher Weise verhalten. — Dasselbe gilt für das relativ wenig giftige dichloranthracendisulfosaure Na und das stark toxische Cyanin:

## Versuch 12.

## Dichloranthracendisulfosaures Na (M. = 451).

Dichloranthracendisulfosaures Na	Leitungswasser	O-Kaninchenserum	Param.-Kultur	Paramäcien im Dunkel
$\frac{1}{25}$ Mol. $\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 1 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 2 \\ 2 \end{array} \right.$	$\left. \begin{array}{l} \dagger 6 \text{ Stunden} \\ \text{Leb. 24 Stunden} \end{array} \right\}$
$\frac{1}{50}$ Mol. $\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 1 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 2 \\ 2 \end{array} \right.$	$\left. \begin{array}{l} \dagger 24 \text{ Stunden} \\ \text{Leb. 24 Stunden} \end{array} \right\}$
$\frac{1}{100}$ Mol. $\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 1 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 2 \\ 2 \end{array} \right.$	$\left. \begin{array}{l} \text{Größter Teil } \dagger 24 \text{ Stunden} \\ \text{Leb. 24 Stunden} \end{array} \right\}$
$\frac{1}{500}$ Mol. $\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 1 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 2 \\ 2 \end{array} \right.$	$\left. \begin{array}{l} \text{Hälfte } \dagger 24 \text{ Stunden} \\ \text{Leb. 24 Stunden} \end{array} \right\}$
$\frac{1}{1000}$ Mol. $\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 1 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 1 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 2 \\ 2 \end{array} \right.$	$\left. \begin{array}{l} \text{Leb. 24 Stunden} \\ \text{Leb. 24 Stunden} \end{array} \right\}$

## Versuch 13.

## Chinolinblau (Cyanin. purissim. Merck) (M. = 538).

Cyanin (1 : 30,000) — 1 Teil	} Par. im Dunkel $\dagger$ 30 Min.
Destilliertes Wasser — 1 Teil	
Par.-Kultur — 2 Teile	
Cyanin (1 : 30,000) — 1 Teil	} Par. im Dunkel leb. 48 Stunden.
O-Kaninchenserum — 1 Teil	
Par.-Kultur — 2 Teile	

Cyanin ist schwer löslich in Wasser und es ist selbst in bedeutenden Verdünnungen schwer, klare Flüssigkeiten zu erhalten. Der Stoff ist als ein vorzüglicher photographischer Sensibilisator bekannt, während dessen sensibilisierende Fähigkeit gegenüber photobiologischen Prozessen zweifelhaft oder mindestens wenig ausgeprägt ist.

Die Ursache zur sensibilisierenden Fähigkeit einer Lösung ist, wie ich im ersten Abschnitt geltend zu machen suchte, wahrscheinlich in gewissen optischen Eigentümlichkeiten zu suchen, welche nicht nur von der chemischen Konstitution des aufgelösten Stoffes bestimmt werden, sondern für welche auch andere Faktoren (das Lösungsmittel, die Dissoziationsgrade usw.) eine Rolle spielen. Es ist daher a priori kein Grund zu der Annahme vorhanden, daß die durch Serumhinzusetzung hervorgerufene Toxizitätsherabsetzung für Stoffe mit sensibilisierenden Eigenschaften eigentümlich sein sollte. Mit großer Deutlichkeit geht daher auch das Gegenteil aus folgenden Versuchen mit den zwei, einander in chemischer Beziehung so nahestehenden Stoffen: Hydrastininchlorid und Cotarnin (Oxymethylhydrastinin) hervor, von denen der erste fluoreszierend und stark sensibilisierend ist, während der letzte (nach meinen eigenen Versuchen) keine dieser Eigenschaften besitzt.

## Versuch 14.

## Hydrastininumhydrochloricum (Merck).

Hydrastininumhydrochloricum	Leitungswasser	O-Kaninchenserum	Param.-Kultur	Paramäcien im Dunkel
1—200 { 1	1	0	2	† 1 Stunde
{ 1	0	1	2	† 2 Stunden
1—250 { 1	1	0	2	† 1 Stunde
{ 1	0	1	2	† 3½ Stunden
1—333 { 1	1	0	2	† 2 Stunden
{ 1	0	1	2	† 6 Stunden
1—500 { 1	1	0	2	† 4½ Stunden
{ 1	0	1	2	† 24 Stunden
1—1000 { 1	1	0	2	† 24 Stunden
{ 1	0	1	2	† 24 Stunden
1—2000 { 1	1	0	2	Leb. 24 Stunden
{ 1	0	1	2	Leb. 24 Stunden



## Versuch 15. Cotarnin (Stypticin) (Merck).

Cotarnin	Leitungswasser	O-Kaninchenserum	Param-Kultur	Paramácien im Dunkel	
1—200	{ 1 1	1 0	0 1	2 2	† 30 Min. † 4½ Stunden
1—250	{ 1 1	1 0	0 1	2 2	† 45 Min. Größter Teil † 24 Stunden
1—333	{ 1 1	1 0	0 1	2 2	† 1 Stunde Einzelne † 24 Stunden
1—500	{ 1 1	1 0	0 1	2 2	† 1½ Stunde Leb. 24 Stunden
1—1000	{ 1 1	1 0	0 1	2 2	† 24 Stunden Leb. 24 Stunden
1—2000	{ 1 1	1 0	0 1	2 2	Leb. 24 Stunden Leb. 24 Stunden

Ein Vergleich zwischen diesen zwei Tabellen ergibt, daß die Toxizitätsherabsetzung bei dem nicht sensibilisierenden Cotarnin bedeutend ausgeprägter als bei dem stark sensibilisierenden Hydrastininchlorids ist.

Binz<sup>1)</sup> wies schon im Jahre 1867 nach, daß die Giftwirkung der Chininsalze gegenüber Infusorien außerordentlich groß ist, und bezüglich des therapeutischen Wertes des Chinins bei der Behandlung der Malaria sind Versuche über den Einfluß der Serumzussetzung auf die Toxizität der Chininlösungen von besonderem Interesse.

## Versuch 16. Chininum sulfuricum.

I. Chininsulfat (1 : 5000) — 1 Teil	}	Par. (im Dunkel)
Destilliertes Wasser — 1 Teil		
Par.-Kultur — 2 Teile		
Chininsulfat (1 : 5000) — 1 Teil	}	Par. (im Dunkel)
O.-Kaninchenserum — 1 Teil		
Par.-Kultur — 2 Teile		

<sup>1)</sup> Binz, Wirkung antiseptischer Stoffe auf Infusorien von Pflanzenjauche. Centralbl. f. med. Wissensch. Nr. 20. 1867.

II. Chininsulfat (1:10000) — 1 Teil	}	Par. (im Dunkel) † 5 Stunden.
Destilliertes Wasser — 1 Teil		
Par.-Kultur — 2 Teile		
Chininsulfat (1:10000) — 1 Teil	}	Par. (im Dunkel) leb. 24 Stunden.
O.-Kaninchenserum — 1 Teil		
Par.-Kultur — 2 Teile		

Der Versuch zeigt eine deutliche Hemmung der Giftwirkung in den Serumpräparaten, und selbst wenn die Toxizitätsherabsetzung bei weitem nicht so ausgeprägt wie z. B. in den Versuchen mit den Derivaten des Fluoreszein ist, so spricht sie doch gegen die Auffassung, daß das Chinin bei der Malaria-behandlung als ein direktes Blut-Desinfizenz wirkt.

Das Ehrlichsche „Trypanrot“, daß schon in wässerigen Lösungen eine auffallend geringe Toxizität sowohl gegenüber Trypanosomen wie auch Paramäcien aufweist, wird durch Serumzusatz so gut wie vollständig ungiftig. Meine Versuche zeigten indessen, daß die Paramäcien wohl wochenlang in selbst starken Trypanrot-Lösungen zu leben vermochten, daß sie jedoch ihre Fortpflanzungsfähigkeit einbüßen, und daß sich diese Hemmung der Fortpflanzungsfähigkeit noch in so dünnen Lösungen wie 1:5000 geltend macht selbst nach Serumzusatz. Vielleicht kann diese Beobachtung zum Verständnis des bisher unbekanntem Prinzips der Chromotherapie beitragen.

Ich führe noch einige Versuche mit nichtsensibilisierenden Giftstoffen an<sup>1)</sup>.

#### Versuch 17. Fuchsin (Salzsaures Rosanilin).

Fuchsin (1:1000) — 1 Teil	}	Par. (im Dunkel) † 10 Min.
Leitungswasser — 1 Teil		
Par.-Kultur — 2 Teile		

<sup>1)</sup> In einer Arbeit (Zeitschr. f. physiolog. Chemie **47**, 173. 1906), die erst, nachdem diese Abhandlung im Manuskript vorlag, erschienen ist, erwähnten Bechhold und Ehrlich, daß verschiedene stark giftige Stoffe (Tetrabrom-o-Kresol, Hexabromdioxydiphenylkarbinol, Tetrachloro-biphenol) im Serum ihre Toxizität gegenüber Bakterien einbüßen. — B. u. E. nehmen als wahrscheinlich an, daß die betreffenden Stoffe mit dem Serum-Eiweiß Verbindungen eingehen, obgleich sie es nicht fällen — eine Hypothese, deren Richtigkeit ihre Bekräftigung in meinen Untersuchungen findet.

Fuchsin (1 : 1000) — 1 Teil	} Par. (im Dunkel) † 3 Stunden.
O.-Kaninchenserum — 1 Teil	
Par.-Kultur — 2 Teile	

## Versuch 18. Strychnin. nitric.

Strychnin. nitric. (1 : 500) — 1 Teil	} Par. (im Dunkel)
Leitungswasser — 1 Teil	
Par.-Kultur — 2 Teile	
	† 10 Min.
Strychnin. nitric. (1 : 500) — 1 Teil	} Par. (im Dunkel)
O.-Kaninchenserum — 1 Teil	
Par.-Kultur — 2 Teile	
	† 10 Min.

Die Versuche ergeben eine bedeutende Toxizitätsherabsetzung betreff des Fuchsins; die Giftigkeit des Strychnins scheint dagegen von dem Serumzusatz ganz unbeeinflusst zu sein.

Die angeführten Versuchsergebnisse werden genügen um festzustellen, daß eine Hinzusetzung von Serum die toxischen Wirkungen einer großen Menge sensibilisierender (wie auch nichtsensibilisierender), verschiedenen chemischen Gruppen entnommener Stoffe gegenüber Paramäcien verringert resp. aufhebt, und obwohl fortgesetzte Untersuchungen auf diesem Gebiet von bedeutendem Interesse in toxikologischer Beziehung sein würden, so will ich mich doch hier, mit Rücksicht auf die Begrenzung des Themas, mit dem oben Mitgeteilten begnügen.

Die Ursache der herabgesetzten Giftigkeit bespreche ich in einem der folgenden Abschnitte.

## IV.

## Über den Einfluß des Serums auf die spezifischen Eigenschaften der photobiologischen Sensibilisatoren.

Die Hauptzüge der von mir bei den folgenden Untersuchungen angestellten Versuchsanordnung sind betreff der Paramäcien-Versuche schon in II. beschrieben, und ich gehe daher gleich dazu über, die Resultate der Versuche zu besprechen.

## Versuch 19.

## Eosin-Na (Tetrabromfluoreszein-Na) (M. = 692).

Tetrabromfluoreszein-Na		Leitungswasser	O-Kaninchen-serum	Param.-Kultur	Paramäcien im Licht	Paramäcien im Dunkel
$\frac{1}{25}$ Mol.	1	1	0	2	† 5 Min.	† 25 Min. (T.)
	0	1	0	2	† 30 Min.	Größter Teil † 24 Std. (T.)
$\frac{1}{50}$ Mol.	1	1	0	2	† 10 Min.	† 1 Stunde (T.)
	0	1	0	2	† 45 Min.	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{100}$ Mol.	1	1	0	2	† 10 Min.	Hälfte † 24 Stunden (T.)
	0	1	0	2	† 1 Stunde	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{200}$ Mol.	1	1	0	2	† 15 Min.	Leb. 24 Stunden
	0	1	0	2	† 1½ Stunden	" 24 "
$\frac{1}{500}$ Mol.	1	1	0	2	† 20 Min.	" 24 "
	0	1	0	2	† 4 Stunden	" 24 "
$\frac{1}{1000}$ Mol.	1	1	0	2	† 35 Min.	" 24 "
	0	1	0	2	Größter Teil † 24 Std.	" 24 "
$\frac{1}{2000}$ Mol.	1	1	0	2	† 1 Stunde	" 24 "
	0	1	0	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
$\frac{1}{5000}$ Mol.	1	1	0	2	† 1½ Stunden	" 24 "
	0	1	0	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
$\frac{1}{10000}$ Mol.	1	1	0	2	† 6 Stunden	" 24 "
	0	1	0	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
$\frac{1}{50000}$ Mol.	1	1	0	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
	0	1	0	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
Kontrolle	1	1	1	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "

Es geht aus der Tabelle hervor, daß die Tötungszeiten in den Serumpräparaten bei allen konzentrierten Eosinlösungen bedeutend verlängert sind, und daß die sensibilisierenden Wirkungen des Eosins in Lösungen von  $\frac{1}{2000}$  Mol. und darunter vollständig durch Hinzusetzung gleicher Teile Serum aufgehoben werden.

Dieser hemmende Einfluß der Serumhinzusetzung auf die spezifischen Wirkungen der sensibilisierenden Stoffe tritt noch schöner in dem folgenden Versuch mit Rose Bengal hervor, gerade weil die sensibilisierende Fähigkeit dieses Stoffes so außerordentlich stark in wässrigen Lösungen ist<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Durch besondere Versuchsanordnungen konnte ich die sensibilisierende Wirkungen von Rose Bengal gegenüber Paramäcien in Lösungen bis zu 1:20000000 nachweisen.

## Versuch 20.

Rose Bengal (Tetrachlortetraiodfluoreszein-Na)  
(M. = 1018).

Rose Bengal		Leitungswasser	O-Kaninchen-serum	Param.-Kultur	Paramäcien im Licht	Paramäcien im Dunkel
$\frac{1}{50}$	Mol.	1	0	2	† momentan	† momentan (T.)
		1	0	2	† 2 Min.	† 5 Min. (T.)
$\frac{1}{100}$	Mol.	1	0	2	† momentan	† momentan (T.)
		1	0	2	† 6 Min.	Hälfte † 24 Stunden (T.)
$\frac{1}{200}$	Mol.	1	0	2	† momentan	† momentan (T.)
		1	0	2	† 20 Min.	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{500}$	Mol.	1	0	2	† momentan	† momentan (T.)
		1	0	2	† 50 Min.	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{1000}$	Mol.	1	0	2	† momentan	† 1 Min. (T.)
		1	0	2	† 1½ Stunden	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{2000}$	Mol.	1	0	2	† 1 Min.	† 5 Min. (T.)
		1	0	2	† 5 Stunden	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{5000}$	Mol.	1	0	2	† 2 Min.	† 35 Min. (T.)
		1	0	2	Größter Teil leb. 24 Std.	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{10000}$	Mol.	1	0	2	† 2 Min.	Größter Teil leb. 24 Std.
		1	0	2	Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{50000}$	Mol.	1	0	2	† 5 Min.	Leb. 24 Stunden
		1	0	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
$\frac{1}{100000}$	Mol.	1	0	2	† 10 Min.	" 24 "
		1	0	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
$\frac{1}{500000}$	Mol.	1	0	2	† 2 Stunden	" 24 "
		1	0	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
$\frac{1}{1000000}$	Mol.	1	0	2	† 4 Stunden	" 24 "
		1	0	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
$\frac{1}{5000000}$	Mol.	1	0	2	Größter Teil leb. 24 Std.	" 24 "
		1	0	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
Kontrolle		1	1	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "

Die Beimischung eines gleichen Volumens Serum hebt also die sensibilisierende Wirkung der Rose Bengal-Lösungen von ca.  $\frac{1}{5000}$  Mol. und darunter auf. Bei den Eosinlösungen lag die Grenze schon bei  $\frac{1}{2000}$  Mol. Der Unterschied kann seine Ursache darin haben, daß die sensibilisierende Wirkung äquimolekularer Rose Bengal- und Eosin-Na-Lösungen in diffussem Tageslicht ungefähr 1000mal größer bei dem ersten als bei

dem letzten Stoffe ist, so daß ein eventueller minimaler Überschuß wirksamen Rose Bengals deutlichen Ausschlag zu geben vermöchte, wo ein ebenso großer Überschuß wirksamen Eosins in Versuchen mit Paramäcien keine zu beobachtende Wirkung besitzt. Es ist möglich, daß der Unterschied wegfallen würde, falls man die Versuche mit dieser oder jener nicht organisierten Reagens z. B. Invertin anstellte.

Die übrigen Stoffe der Fluoreszeingruppe, deren diesbezügliches Verhältnis ich untersucht habe, wiesen eine ähnliche herabgesetzte sensibilisierende Fähigkeit nach Serumzusatz wie Eosin-Na und Rose Bengal auf. Ich führe folgende Versuche als Beispiele an:

#### Versuch 21. Dichlortetrabromfluoreszein-Na.

Dichl.-Na (1 : 10000)	— 1 Teil	} Par. {	im Licht † 30 Min. im Dunkel leb. 24 Std.
Leitungswasser	— 1 Teil		
Param.-Kultur	— 2 Teile		
Dichl.-Na (1 : 10000)	— 1 Teil	} Par. {	im Licht leb. 24 Std. im Dunkel leb. 24 Std.
O-Kaninchen-Serum	— 1 Teil		
Param.-Kultur	— 2 Teile		

#### Versuch 22. Tetrachlortetrabromfluoreszein-Na.

Tetrachl.-Na (1 : 10000)	— 1 Teil	} Par. {	im Licht † 3 Min. im Dunkel leb. 24 Std.
Leitungswasser	— 1 Teil		
Param.-Kultur	— 2 Teile		
Tetrachl.-Na (1 : 10000)	— 1 Teil	} Par. {	im Licht leb. 24 Std. im Dunkel leb. 24 Std.
O-Kaninchen-Serum	— 1 Teil		
Param.-Kultur	— 2 Teile		

Unter den sensibilisierenden Stoffen der Anthracengruppe habe ich hauptsächlich das Natronsalz der Dichloranthracendisulfosäure untersucht, das einen besonders niedrigen Toxizitätsgrad mit hervorragenden sensibilisierenden Eigenschaften vereint. Diese letzten sind noch in Verdünnungen von 1 : 2000000 zu erkennen. Eine Hinzusetzung von Serum zu Lösungen dieses Stoffes haben bezüglich dessen sensibilisierender Fähigkeit ganz ähnliche Veränderungen wie die oben erwähnten zur Folge.

## Versuch 23.

## Dichloranthracendisulfo-saures Na (M. = 451).

Dichloranthracendisulfo-saures Na		Leitungswasser	O-Kaninchen-serum	Param.-Kultur	Paramäcien im Licht	Paramäcien im Dunkel
$1/25$	Mol.	1	0	2	† 8 Min.	† 6 Stunden (T.)
		1	0	2	† 1 Stunde	Leb. 24 Stunden
$1/50$	Mol.	1	0	2	† 5 Min.	† 24 Stunden (T.)
		1	0	2	† 1 1/4 Stunden	Leb. 24 Stunden
$1/100$	Mol.	1	0	2	† 5 Min.	Größter Teil † 24 Std. (T.)
		1	0	2	† 2 Stunden	Leb. 24 Stunden
$1/500$	Mol.	1	0	2	† 5 Min.	Hälfte † 24 Stunden (T.)
		1	0	2	Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
$1/1000$	Mol.	1	0	2	† 5 Min.	Leb. 24 Stunden
		1	0	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
$1/5000$	Mol.	1	0	2	† 10 Min.	" 24 "
		1	0	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
$1/10000$	Mol.	1	0	2	† 20 Min.	" 24 "
		1	0	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
$1/50000$	Mol.	1	0	2	† 1 Stunde	" 24 "
		1	0	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
$1/100000$	Mol.	1	0	2	† 3 Stunden	" 24 "
		1	0	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
$1/500000$	Mol.	1	0	2	† 24 Stunden	" 24 "
		1	0	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
$1/1000000$	Mol.	1	0	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
		1	0	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
Kontrolle		1	1	2	Leb. 24 Stunden	" 24 "

In obenstehender Tabelle wird der außerordentlich große Einfluß auffallen, den die Serumbeimischung auf die Versuchsergebnisse hat; selbst eine  $1/500$  Mol. dichloranthracendisulfo-saure Na-Lösung verliert bei Hinzusetzung eines gleichen Teiles Serum vollständig ihre sensibilisierende Wirkung.

Betrachtet man die Tötungszeiten der nicht mit Serum vermischten Präparate, so wird es ferner auffallen, daß die Paramäcien in Licht ungefähr ebenso schnell in  $1/5000$  Mol. Lösungen wie in  $1/25$  Mol. Lösungen zugrunde gehen; bei dieser letzten weist die Tabelle sogar eine etwas längere Tötungszeit als in den Versuchen mit den folgenden, weniger konzentrierten Lösungen auf. Der Unterschied ist so gering, daß er als

zufällig betrachtet werden könnte; er ist es jedoch kaum, denn ich habe in den zahlreichen mit dichloranthracendisulfosaurem Na angestellten Versuchen wiederholt ein ähnliches Verhältnis beobachtet, während es in Versuchen mit z. B. Eosin oder Rose Bengal nicht der Fall war (vergl. die Tabellen in den Versuchen 19 und 20). Ich nehme an, daß die Ursache in folgenden Verhältnissen zu suchen ist: Selbst die stark konzentrierten dichloranthracendisulfonsauren Na-Lösungen haben Paramäcien gegenüber eine so geringe toxische Wirkung, daß diese innerhalb des kurzen Zeitraums, um den es sich hier handelt, ganz bedeutungslos wird. Die Tötungszeiten werden daher ausschließlich von der Konzentration der Lösung und der Belichtung abhängig, und wäre die letzte konstant, so würden die Zeiten wahrscheinlich gemäß dem Verdünnungsgrad gleichmäßig zunehmen<sup>1)</sup>.

Nun ist es aber nicht die Belichtung der Präparate, sondern die Belichtung der einzelnen Paramäcien in den Präparaten, die für die Tötungszeiten ausschlaggebend sein wird, und selbst wenn die erste konstant ist, wird die zweite bis zu einem gewissen Grad mit der Konzentration der Lösungen variieren, infolge der ungleich starken Absorption der wirksamen Strahlen in dem Teil der Tropfen, welchen das Licht passieren muß, bevor es die Paramäcien trifft. Diese werden gewissermaßen besser in den konzentrierten als in den dünnen Lösungen gegen die schädlichen Strahlen geschützt sein; ebensowohl wie sie in großen Tropfen besser als in kleinen Tropfen derselben Konzentration geschützt sein werden. Man kann sich mit anderen Worten die von der steigenden Konzentration bedingte steigende Lichtwirkung dadurch neutralisiert denken, daß die steigende Konzentration in diesen Versuchen gleichzeitig eine gleichmäßig zunehmende Schwächung der wirksamen Lichtstrahlen bedingt, bevor diese die Paramäcien erreichen.

---

<sup>1)</sup> Diese Anschauung wird von einigen Untersuchungen bekräftigt, die Jodlbauer und v. Tappeiner vor kurzem veröffentlicht haben (Über die Abhängigkeit der Wirkung der fluoreszierenden Stoffe von ihrer Konzentration. *Deutsch. Arch. f. klin. Medizin* **86**, 468. 1906). Betreffs der Fluoreszeinreihe finden die beiden Verff., daß die sensibilisierende Wirkung mit dem Verdünnungsgrad der Lösungen bis zu einem gewissen Maximum zunimmt (ca.  $\frac{1}{2000}$ -normal. Lös.), um danach wiederum abzunehmen.



Ich habe diese Untersuchungen auf verschiedene andere photobiologische Sensibilisatoren<sup>1)</sup> ausgedehnt, und in allen Versuchen eine ähnliche, mehr oder weniger stark ausgeprägte Herabsetzung der sensibilisierenden Fähigkeit der betreffenden Stoffe nach der Serumbeimischung gefunden. Es ist indessen kaum wahrscheinlich, daß man auf rein empirischem Wege dazu gelangen kann, diese Phänomene unter ein allgemein geltendes Gesetz zu bringen; die Arbeit würde jedenfalls unverhältnismäßig groß werden und ich betrachte es daher als unangebracht, die Reihe der angeführten Beispiele zu erweitern. Diese sind zwischen den am stärksten sensibilisierenden Stoffen innerhalb der verschiedenen chemischen Gruppen gewählt, und werden mit genügender Deutlichkeit den Einfluß des Serumzusatzes illustrieren.

Im Anschluß an die früher besprochenen Versuche, in welchen die Serumbeimischung zu den sensibilisierenden Lösungen *in vitro* vorgenommen ist, habe ich bei einer Reihe derselben Sensibilisatoren die Veränderungen untersucht, die ihre spezifischen sensibilisierenden Eigenschaften in dem Augenblick erleiden, in welchem die betreffenden Stoffe in die Blutbahnen der Kaninchen injiziert werden. Die Versuche wurden auf folgende Weise ausgeführt. Ich injizierte Lösungen der sensibilisierenden Stoffe intravenös den Kaninchen und nahm darauf nach kürzerer oder längerer Zeit Blutproben von den injizierten Tieren. Im Serum dieser Blutproben wurde in den Fällen, wo sich eine derartige Untersuchung überhaupt ausführen ließ, der Farbstoffgehalt auf kolorimetrischem Wege bestimmt und es wurden darauf wie gewöhnlich Untersuchungen über die sensibilisierende Wirkung der gefärbten Seren angestellt. Ich führe folgende Versuche als Beispiele an.

#### Versuch 24.

48 ccm einer 2%igen Eosinlösung (in 0,4% NaCl) werden einem Kaninchen mit einem Körpergewicht von 2600 g intravenös injiziert. 10 resp. 30 Minuten nach Schluß der Injektion werden Blutproben aus der Art. carotis genommen, und

---

<sup>1)</sup> U. a.: Salzsäures Akridin, Phenosafraninchlorid, Methyleneblau, Methylenviolett,  $\gamma$ -Phenylchinaldinchlorid, Hydrastininchlorid.

mit den 2 Seren (A und B) werden untenstehende Versuche nach vorausgehender 45 Minuten langer Erwärmung auf  $56^{\circ}$  angestellt. Serum A entspricht kolorimetrisch bestimmt einer Eosinlösung von  $\frac{1}{175}$  Mol., während Serum B einer  $\frac{1}{200}$  Mol. Lösung entspricht.

Serum A	— 1 Teil	}	Par. im	{	Licht † 2 Stunden
Par.-Kultur	— 3 Teile				Dunkel leb. 24 Stunden.
Serum B	— 1 Teil	}	Par. im	{	Licht † $2\frac{1}{2}$ Stunden
Par.-Kultur	— 3 Teile				Dunkel leb. 24 Stunden.

Folgender gleichzeitiger Versuch, in welchem die Eosin-Serummischung *in vitro* vorgenommen ist, dient zum Vergleich.

Eosin ( $\frac{1}{175}$ Mol.)	— 1 Teil	}	Par. im	{	Licht † $1\frac{3}{4}$ Std.
O-Kaninchen-Serum	— 1 Teil				Dunkel leb. 24 Std.
Par.-Kultur	— 2 Teile				
Eosin ( $\frac{1}{200}$ Mol.)	— 1 Teil	}	Par. im	{	Licht † 2 Std.
O-Kaninchen-Serum	— 1 Teil				Dunkel leb. 24 Std.
Par.-Kultur	— 2 Teile				
Eosin ( $\frac{1}{200}$ Mol.)	— 1 Teil	}	Par. im	{	Licht † 20 Min.
Leitungswasser	— 1 Teil				Dunkel leb. 24 Std.
Par.-Kultur	— 2 Teile				

Die Herabsetzung der sensibilisierenden Fähigkeit des Eosin erweist sich also als ungefähr dieselbe, gleichviel ob die Mischung mit Serum *in corpore* oder *in vitro* vor sich geht. Dasselbe gilt für eine Reihe der anderen Sensibilisatoren, u. a. für alle Derivate des Fluoreszeins<sup>1)</sup>. Bei einem Teile der Farbstoffe wird das Verhältnis indessen dadurch kompliziert, daß sie schnell nach der Injektion in die Blutbahnen zu Leuko-Stoffen reduziert werden, welche nicht im Besitze sensibilisierender Eigenschaften sind. Eine derartige Umbildung ist z. B. bei dem Methylenblau lange bekannt gewesen, und von den im vorhergehenden erwähnten Sensibilisatoren verhält sich das Methylenviolett ähnlich.

<sup>1)</sup> Eine ausführliche Besprechung der Verhältnisse dieser Stoffe nach ihrer Injektion auf warmblütige Tiere findet sich in A. Jodlbauer und G. Busck: Über die Wirkungen von Fluoreszein und Fluoreszein-Derivaten im Lichte und im Dunkeln. Arch. internat. de Pharmacodynamie et de Thérapie. Vol. XV, S. 263. 1905.

Es geht aus den in diesem Abschnitt erwähnten Versuchen hervor, daß eine Serumbeimischung zu Lösungen photobiologischer Sensibilisatoren eine Herabsetzung resp. Aufhebung der sensibilisierenden Fähigkeit dieser Stoffe gegenüber Paramäcien bewirkt.

Vor dem Abschluß der Besprechung meiner Paramäcienversuche will ich in ein paar Tabellen ein Gesamtbild aller der von mir im vorhergehenden besprochenen Verhältnisse geben. Diese Tabellen sind insofern als konstruierte Typen zu betrachten, als die einzelnen Versuche nicht in genau gleichzeitigem Licht ausgeführt sind. Durch zahlreiche vergleichende Versuche habe ich indessen versucht, die Bedeutung dieser Fehlerquelle so weit wie möglich zu reduzieren, und selbst wenn sie vielleicht einen geringen Einfluß auf die einzelnen Zahlen haben kann, so bleiben doch die Relationen unter den Zahlen und damit auch das Totalbild, welches die Tabellen gibt, im großen und ganzen davon unbeeinflusst.

Die Versuche, auf deren Resultaten die zwei Tabellen basiert sind, wurden in starkem, diffusem Tageslicht ausgeführt (in München, mitten am Tage, im Juni, an einem Fenster gegen Osten bei klarem Himmel).

Um das Verständnis der Tabellen zu erleichtern, habe ich in jeder einzelnen Rubrik die Ursache des Todes der Paramäcien durch folgende Bezeichnungen angedeutet:

- A. = Alexinwirkung,  
L. = Lichtwirkung,  
T. = Toxische Wirkung.

Außerdem werden die Phasen der Alexinwirkung bezeichnet durch:

- = die Stellenbewegungen der Paramäcien aufgehört,  
⊕ = die Stellenbewegungen der Paramäcien wieder aufgenommen.

Rose Bengal	N-Kaninchen-serum	O-Kaninchen-serum	Param.-Kultur	Paramäcien im Licht	Paramäcien im Dunkel
0	0	0	4	Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
0	1	0	3	○ 15 Min. + 4 1/2 Stunden (A.)	○ 15 Min. + 4 1/2 Stunden (A.)
0	0	1	3	Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden

Rose Bengal		N-Kaninchen- serum	O-Kaninchen- serum	Param- Kultur	Paramäcien im Licht	Paramäcien im Dunkel	
$\frac{1}{50}$	Mol.	1	0	0	3	† momentan (T.)	† momentan (T.)
		1	1	0	2	† 2 Min. (L.)	† 5 Min. (T.)
		1	0	1	2	† 2 Min. (L.)	† 5 Min. (T.)
$\frac{1}{100}$	Mol.	1	0	0	3	† momentan (T.)	† momentan (T.)
		1	1	0	2	† 6 Min. (L.)	(-÷A.) Hälfte † 24 Std. (T.)
		1	0	1	2	† 6 Min. (L.)	Hälfte † 24 Std. (T.)
$\frac{1}{200}$	Mol.	1	0	0	3	† momentan (T.)	† momentan (T.)
		1	1	0	2	(-÷A.) † 20 Min. (L.)	(-÷A.) Leb. 24 Stunden
		1	0	1	2	† 20 Min. (L.)	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{500}$	Mol.	1	0	0	3	† momentan (T.)	† momentan (T.)
		1	1	0	2	(-÷A.) † 45 Min. (L.)	○ 30 Min. — ⊕ 4 Stunden
		1	0	1	2	† 50 Min. (L.)	Hälfte † 24 Std. (A.) Leb. 24. Stunden
$\frac{1}{1000}$	Mol.	1	0	0	3	† momentan (L.)	† 1 Min. (T.)
		1	1	0	2	(-÷A.) † 1½ Stunde (L.)	○ 20 Min. — Größter Teil † 24 Stunden (A.)
		1	0	1	2	† 1½ Stunde (L.)	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{2000}$	Mol.	1	0	0	3	† 1 Min. (L.)	† 5 Min. (T.)
		1	1	0	2	(-÷A.) † 5 Stunden (L.)	○ 15. Min. † 24 Stunden (A.)
		1	0	1	2	† 5 Stunden (L.)	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{5000}$	Mol.	1	0	0	3	† 2 Min. (L.)	† 35 Min. (T.)
		1	1	0	2	(-÷A.) Hälfte † 24 Std. (L.)	○ 15 Min. † 24 Stunden (A.)
		1	0	1	2	Hälfte † 24 Std. (L.)	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{10000}$	Mol.	1	0	0	3	† 2 Min. (L.)	Hälfte † 24 Std. (T.)
		1	1	0	2	(-÷A.) Leb. 24 Stunden (L.)	○ 15 Min. † 24 Stunden (A.)
		1	0	1	2	Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{50000}$	Mol.	1	0	0	3	† 5 Min. (L.)	Leb. 24 Stunden
		1	1	0	2	○ 35 Min. — ⊕ 2 Stunden (L.)	○ 15 Min. † 24 Stunden (A.)
		1	0	1	2	Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{100000}$	Mol.	1	0	0	3	† 10 Min. (L.)	Leb. 24 Stunden
		1	1	0	2	○ 25 Min. — ⊕ 3 Stunden (L.)	○ 15 Min. † 24 Stunden (A.)
		1	0	1	2	Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{500000}$	Mol.	1	0	0	3	† 2 Stunden (L.)	Leb. 24 Stunden
		1	1	0	2	○ 15 Min. — ⊕ 5 Stunden (L.)	○ 15 Min. † 7 Stunden (A.)
		1	0	1	2	Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{1000000}$	Mol.	1	0	0	3	† 4 Stunden (L.)	Leb. 24 Stunden
		1	1	0	2	○ 15 Min. — ⊕ 10 Stunden (L.)	○ 15 Min. † 5 Stunden (A.)
		1	0	1	2	Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{5000000}$	Mol.	1	0	0	3	Größter Teil leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
		1	1	0	2	○ 15 Min. † 5 Stunden (A.)	○ 15 Min. † 4½ Stunden (A.)
		1	0	1	2	Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden

Dichloranthracendisulfo-saures Na	N-Kaninchen-serum	O-Kaninchen-serum	Param.-Kultur	Paramäcien im Licht	Paramäcien im Dunkel
0	0	0	4	Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
0	1	0	3	○ 15 Min. † 4 Stunden (A.)	○ 15 Min. † 4 Stunden (A.)
0	0	1	3	Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{35}$ Mol.	1	0	3	† 8 Min. (L.)	† 6 Stunden (T.)
	1	1	2	(÷A.) † 50 Min. (L.)	(÷A.) Leb. 24 Stunden
	1	0	2	† 1 Stunde (L.)	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{50}$ Mol.	1	0	3	† 5 Min. (L.)	† 24 Stunden (T.)
	1	1	2	(÷A.) † 1 Stunde (L.)	(÷A.) Leb. 24 Stunden
	1	0	2	† 1 $\frac{1}{4}$ Stunde (L.)	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{100}$ Mol.	1	0	3	† 5 Min. (L.)	Größter Teil † 24 Std. (T.)
	1	1	2	(÷A.) † 2 Stunden (L.)	○ 40 Min. — ⊕ 6 Stunden
	1	0	2	† 2 Stunden (L.)	Hälfte † 24 Stunden (A.) Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{500}$ Mol.	1	0	3	† 5 Min. (L.)	Hälfte † 24 Stunden (T.)
	1	1	2	○ 35 Min. — ⊕ 1 $\frac{1}{2}$ Stunde	○ 30 Min. † 24 Stunden (A.)
	1	0	2	Leb. 24 Stunden Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{1000}$ Mol.	1	0	3	† 5 Min. (L.)	Leb. 24 Stunden
	1	1	2	○ 30 Min. — ⊕ 2 $\frac{1}{2}$ Stunden	○ 30 Min. † 10 Stunden (A.)
	1	0	2	Leb. 24 Stunden Leb. 24 Stunden.	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{5000}$ Mol.	1	0	3	† 10 Min. (L.)	Leb. 24 Stunden
	1	1	2	○ 20 Min. — ⊕ 4 Stunden	○ 20 Min. † 9 Stunden (A.)
	1	0	2	Leb. 24 Stunden Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{10000}$ Mol.	1	0	3	† 20 Min. (L.)	Leb. 24 Stunden
	1	1	2	○ 20 Min. — ⊕ 5 Stunden	○ 20 Min. † 9 Stunden (A.)
	1	0	2	Leb. 24 Stunden Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{50000}$ Mol.	1	0	3	† 1 Stunde (L.)	Leb. 24 Stunden
	1	1	2	○ 20 Min. † 7 Stunden (A.)	○ 20 Min. † 6 Stunden (A.)
	1	0	2	Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{100000}$ Mol.	1	0	3	† 3 Stunden (L.)	Leb. 24 Stunden
	1	1	2	○ 20 Min. † 4 Stunden (A.)	○ 15 Min. † 4 Stunden (A.)
	1	0	2	Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{500000}$ Mol.	1	0	3	† 24 Stunden (L.)	Leb. 24 Stunden
	1	1	2	○ 15 Min. † 4 Stunden (A.)	○ 15 Min. † 4 Stunden (A.)
	1	0	2	Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
$\frac{1}{1000000}$ Mol.	1	0	3	Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
	1	1	2	○ 15 Min. † 4 Stunden (A.)	○ 15 Min. † 4 Stunden (A.)
	1	0	2	Leb. 24 Stunden	Leb. 24 Stunden

Läßt man den Blick über das anscheinende Wirrwarr schweifen, das das Verhältnis der Paramäcien in den zwei

Tabellen darbietet, und sucht man gleichzeitig von den Detailuntersuchungen zu abstrahieren, mit denen ich diese Arbeit eingeleitet habe, so wird man sich einen Begriff davon machen können, wie überraschend die Versuchsergebnisse im Anfang wirkten: In einer Verdünnung des Farbstoffes starben die Paramäcien, sobald sie dem Licht ausgesetzt wurden; in einer zweiten Verdünnung starben sie, falls sie nicht belichtet wurden; im Dunkel konnten die Paramäcien bald in konzentrierten Lösungen leben, während sie in verdünnteren zugrunde gingen, bald war das Entgegengesetzte der Fall. — Zieht man die früher besprochenen Versuchsergebnisse in Betracht, so wird eine Analyse der Tabellen keine Schwierigkeiten aufweisen, und es lassen sich leicht die Wirkungen der vielen verschiedenen Faktoren auseinander halten, die sich in den Tabellen abspiegeln. Ich erwähne sie in Kürze:

1. Die toxischen Wirkungen der sensibilisierenden Stoffe gegenüber den Paramäcien.
2. Die Wirkung des Serum-Alexins auf die Paramäcien.
3. Die Wirkung des Lichtes auf die sensibilisierten Paramäcien.
4. Die Wirkung des Lichtes auf das sensibilisierte Alexin.
5. Der Einfluß des Serums auf die Toxizität der sensibilisierenden Stoffe.
6. Der Einfluß des Serums auf die spezifischen Eigenschaften der sensibilisierenden Stoffe.
7. Der Einfluß der sensibilisierenden Stoffe auf die Alexinwirkung (im Dunkeln).

Außer den hier erwähnten Faktoren, welche sich alle deutlich in den Zahlen der Tabellen zu erkennen geben, werden noch folgende zwei in dem Augenblick Bedeutung erhalten, wo Versuche dieser Art in stärkerem Licht, und vor allem in Licht mit größerem Gehalt kurzweiliger Strahlen gemacht werden.

8. Die Wirkung des Lichtes auf die nicht sensibilisierten Paramäcien.
9. Die Wirkung des Lichtes auf das nicht sensibilisierte Alexin.

Ich glaube hiermit alle die für das Verständnis der Tabellen bedeutungsvollen Momente genannt zu haben. — Die Resultate von Versuchen dieser Art können übrigens in zweiter Linie

von vielen verschiedenen Verhältnissen beeinflusst werden. Ich erwähne einzelne: Die Intensität und Qualität des Lichtes; die Größe der Tropfen in den Präparaten und die Konzentration der Farbstofflösungen (insofern diese zwei letztgenannten Faktoren auf die den einzelnen Paramäcien zugeführte Lichtmenge einwirken; außerdem die Art und Vitalität der Paramäcien, sowie die größere oder geringere chemische Reinheit der Farbstoffe; schließlich hat die Serum-Alkaleszenz<sup>1)</sup>, — falls man diese Bezeichnung noch anwenden darf — sowie vielleicht auch die Art und Weise, auf welche die Mischung des Serums mit der sensibilisierenden Lösung vorgenommen wird<sup>2)</sup>, einen gewissen Einfluß auf das erzielte Resultat.

Nachdem nachgewiesen ist, daß ein Serumzusatz die spezifischen Wirkungen der sensibilisierenden Stoffe gegenüber Paramäcien verringert oder aufhebt, drängt sich die Frage auf: gilt die Herabsetzung nur der Wirkung gegenüber Paramäcien, oder dreht es sich um eine tiefergehende Veränderung dieser Stoffe, welche eine Herabsetzung oder Aufhebung der sensibilisierenden Fähigkeit derselben im allgemeinen zur Folge hat. Es wäre ja nämlich denkbar, daß die Ursache zu der verringerten Wirkung, solange die Rede nur von Paramäcienversuchen ist, z. B. allein den veränderten osmotischen Verhältnissen in den Präparaten oder der erhöhten Viskosität, welche die Serumbeimischung bedingt, zuzuschreiben sei. Die auf Seite 464 betonte Beobachtung, daß die sensibilisierende Fähigkeit der Serum-Farbstoffmischungen gegenüber Alexin sich noch deutlich in einer Reihe Verdünnungen zu erkennen gibt, in welchen jegliches Zeichen einer sensibilisierenden Wirkung auf Paramäcien verschwunden ist (Versuch drei und vier), läßt auch eine nähere Untersuchung der oben aufgestellten Frage wünschenswert erscheinen. Fortgesetzte Versuche mit Alexin werden indessen zu

---

<sup>1)</sup> Siehe S. 515.

<sup>2)</sup> Einzelne Beobachtungen, auf die ich hier nicht näher eingehen will, da ich bisher keine Gelegenheit zu ihrer näheren Verfolgung gehabt habe, lassen es nämlich wahrscheinlich erscheinen, daß die Mischungsweise nicht ganz gleichgültig ist, ein Verhältnis, das nicht ohne Analogien unter den Reaktionen der Kolloid-Chemie ist. In allen den besprochenen Versuchen ist die Mischung unmittelbar vor Beginn des Versuches vorgenommen und stets auf möglichst gleichartige Weise.

nichts führen, da sich das Alexin vom Serum nicht isolieren läßt, und ich habe daher zu meinen Untersuchungen verschiedene photobiochemische Reaktionen benutzt, die für eine Sensibilisation zugänglich sind, z. B. die Destruktion von Enzymen und Toxinen, welche eine Belichtung hervorzurufen vermag. Bevor ich zur Besprechung dieser Versuche mit nichtorganisierten Stoffen übergehe, will ich doch einige andere besprechen, welche den Paramäcienversuchen näher stehen.

Ich habe den Einfluß des Serumzusatzes auf die spezifischen Wirkungen der sensibilisierenden Stoffe gegenüber anderen Mikroorganismen (*Trypanosoma Brucei*), gegenüber tierischen Gewebezellen (Flimmerzellen von Fröschen), sowie gegenüber roten Blutkörperchen untersucht.

Die Trypanosomen wurden direkt von infizierten Ratten oder Mäusen genommen. Die Krankheit dauert bei diesen Tieren nach subkutaner Injektion einer virulenten Kultur in der Regel vier Tage für Mäuse, sechs Tage für Ratten. Am letzten Krankheitstag ist das Blut der Tiere derart mit Trypanosomen überfüllt, daß einige wenige Tropfen — z. B. mittels Schnitt aus der Schwanzspitze genommen — genügend Material zu einer Reihe Versuche geben. Ich habe gewöhnlich das Blut mit mehreren Teilen physiologischer NaCl-Lösung verdünnt, sowie durch leichtes Umrühren eine Koagulation verhindert, die — falls sie einträte — schnell den Tod der Trypanosomen zur Folge haben würde. In Tropfen in feuchten Kammern angebracht, können die Trypanosomen 24 bis 48 Stunden leben<sup>1)</sup>.

Trypanosomen sind gegenüber Licht bedeutend weniger widerstandsfähig als *Paramaecium Caudatum*; sie gehen unter gleichen Bedingungen ungefähr zwei bis dreimal schneller zugrunde. Der Einfluß der Serumbeimischung auf die Resultate der Sensibilisierungsversuche gab sich, wie es zu erwarten war, durch einen ebenso deutlichen Ausschlag gegenüber den Trypanosomen wie gegenüber den Paramäcien zu erkennen, und das geringe Quantum Ratten-, resp. Mäuse-Serum, welches

---

<sup>1)</sup> Ehrlich u. Shiga (Farbentherapeutische Versuche bei Trypanosomenerkrankung. Berl. klin. Wochenschrift Jahrg. 41, Nr. 13 und 14. 1904) erwähnen, daß Trypan.-Kulturen „Mal de Caderas“ im Eisschrank aufbewahrt werden müssen, um ein schnelles Zugrundegehen zu vermeiden. Diese Maßregel ist bei Trypan. *Brucei* unnötig.



den Präparaten mit der Kultur zugeführt wurde, vermochte die Wirkung nicht zu verwischen. Von meinen recht zahlreichen Versuchen führe ich nur einen einzelnen als Beispiel an. Die sensibilisierenden Stoffe wurden in 0,85% NaCl aufgelöst und es wurde normales Kaninchenserum angewendet.

## Versuch 25.

Rose Bengal (1:15,000) — 1 Teil	} Trypan.	} Licht † 10 Min.		
0,85% NaCl — 1 Teil			} im	} Dunkel leb.
Trypanosom-Kultur — 1 Teil				
Rose Bengal (1:15,000) — 1 Teil	} Trypan.	} Licht leb. 24 Std.		
N.-Kaninchenserum — 1 Teil			} im	} Dunkel
Trypanosom-Kultur — 1 Teil				

In den Versuchen mit Flimmerzellen von Fröschen benutzte ich die Zeit bis zum Aufhören der Flimmerbewegungen als Maß für die Lichtwirkung. Die Versuchsanordnung war übrigens eine ähnliche wie bei den Paramäcien- und Trypanosomversuchen. Die sensibilisierenden Stoffe wurden in 0,7% NaCl aufgelöst, und nachdem sie mit Serum- resp. 0,7% NaCl gemischt waren, wurden kleine Tropfen dieser Mischung auf Deckgläser gebracht. Den Tropfen wurden danach einige Flimmerzellen zugesetzt, und die Belichtung wie gewöhnlich in kleinen feuchten Kammern vorgenommen.

## Versuch 26.

$\frac{1}{3000}$ Mol. Eosin-Na. — 3 Teile	} Flimmerz.	} Licht nach 2 Std.		
(in 0,7% NaCl)			} im	} ÷ Bew.
0,7% NaCl-Lösung — 1 Teil				
Flimmerzellen — q. s.	} + Bew.			
$\frac{1}{3000}$ Mol. Eosin-Na. — 3 Teile		} Flimmerz.	} Licht nach 4 Std.	
(in 0,7% NaCl)				} im
N-Kaninchenserum — 1 Teil	} Dunkel nach 4 Std.			
Flimmerzellen — q. s.		} + Bew.		

Ungefähr gleichzeitig mit dem Aufhören der Flimmerbewegungen trat eine deutliche Eosinfärbung der betreffenden Zellen ein.

Wie schon in Abschnitt I besprochen, fanden Sacharoff und Sachs<sup>1)</sup>, daß in einer Aufschlemmung roter Blutkörperchen, der ein sensibilisierender Stoff (Eosin) zugesetzt ist, Hämolyse eintritt, falls das Präparat dem Sonnenlicht ausgesetzt wird, während die Hämolyse im Dunkel ausbleibt. Pfeiffer<sup>2)</sup> machte ungefähr gleichzeitig dieselbe Beobachtung. Pfeiffer erwähnt, daß in seinen Versuchen die Eosin-Lichtwirkung dieselbe war — gleichgiltig ob er mit ausgewaschenen Erythrocyten oder mit Blut (5 %) arbeitete. Die verhältnismäßig geringe Serummenge, die den Präparaten mit dem verdünnten Blut zugeführt wurde, hat also in Pfeiffers Versuchen keinen augenfälligen Einfluß auf das Versuchsergebnis gehabt. Die hemmende Wirkung der Serumbeimischung läßt sich indessen mit einer anderen Versuchsanordnung ohne Schwierigkeit demonstrieren.

Bevor ich die von mir bezüglich dieses Punktes angestellten Versuche bespreche, will ich doch ein anderes Verhältnis berühren.

Pfeiffer versuchte Hämolyse normaler (nicht sensibilisierter) roter Blutkörperchen hervorzurufen, indem er diese unter erforderlicher Abkühlung — der Einwirkung starken elektrischen Lichtes aussetzte. Die Versuche ergaben negatives Resultat. Die Ursache ist indessen darin zu suchen, daß das angewendete Licht von zu geringer Intensität war.

Da die Destruktion der Blutkörperchen — so wie es auch fast immer bei Lichttötung nicht sensibilisierter Mikroorganismen oder tierischer Gewebezellen der Fall ist — vorzugsweise von den kurzwelligen Strahlen des Lichtes herrührt, ist in der Versuchsanordnung hierauf Rücksicht zu nehmen. Ich habe in den früher erwähnten Schmidt-Nielsenschen Kammern mit Quarzwänden defibriniertes Kaninchenblut, das mit 0,85 %ige NaCl-Lösung im Verhältnis 1 : 20 verdünnt war, der Einwirkung des ad. mod. Finsen konzentrierten Lichtes einer Bogenlampe von 50 Amp. 45 Volt ausgesetzt. Ich erzielte indessen bei dieser

---

<sup>1)</sup> Sacharoff und Sachs, Über die hämolytische Wirkung der photodynamischen Stoffe. Münch. med. Wochenschr. Nr. 7. 1905.

<sup>2)</sup> Pfeiffer, Über die Wirkung des Lichtes auf Eosin-Blutgemische. Wiener. klin. Wochenschr. Nr. 9. 1905.

Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf normales Serum und rote Blutkörperchen. Wiener klin. Wochenschr. Nr. 13. 1905.

Versuchsordnung kein deutliches Resultat, teils weil sich die Blutkörperchen recht schnell senken und dadurch der direkten starken Bestrahlung entzogen werden, teils weil sich eine schwache Hämolyse schwer in einer so dünnen Schicht feststellen läßt, um so schwerer, da der Vergleich mit nicht belichteten Präparaten durch die während der Belichtung schnell eintretenden Methämoglobinbildung beeinträchtigt wird. Vielleicht spielt auch der geringe Zutritt freien Sauerstoffes der Luft eine gewisse Rolle für den negativen Ausfall des Versuchs. Ich ging deshalb dazu über, ganz kleine Tropfen der Blutaufschwemmung zu belichten. Die Tropfen wurden zwischen Quarzdeckglas und hohlgeschliffenen Objektgläsern und in Berührung mit beiden angebracht. Das letzte trägt dazu bei, den Tropfen trotz der Neigung, welche die Belichtung mit dem konzentrierten Licht erfordert, in der Mitte der Höhlung des Objektglases zu fixieren.

Die eventuell eingetretene Hämolyse ließ sich natürlich bei dieser Versuchsordnung noch schwieriger als bei der vorigen erkennen, jedoch ließ sich anderseits die Destruktion der Blutkörperchen direkt unter dem Mikroskop beobachten.

#### Versuch 27.

Blutaufschwemmung, belichtet durch Quarz mit konz. elektr. Bogenlicht einer 50 Amp. 45 Volt-Lampe.

Nach 5 Min. Belichtung: Die roten Blutkörperchen anscheinend normal.  
 „ 10 „ „ Ein Teil normale Blutkörperchen; ein Teil Schatten.  
 „ 15 „ „ Alle roten Blutkörperchen zerfallen; die Leukocyten anscheinend unverändert<sup>1)</sup>.

Eine erforderliche Abkühlung der Präparate wurde durch Überrieselung mit kaltem Wasser erreicht. Die Hinlänglichkeit der Abkühlung wurde durch Kontrollversuche bekräftigt, indem ähnliche Präparate von der entgegengesetzten Seite, also durch das Objektglas belichtet wurden.

<sup>1)</sup> H. Salvendi (Über die Wirkung der photodynamischen Substanzen auf weiße Blutkörperchen. Deutsch. Arch. f. klin. Medizin **87**, 356. 1906) hat gezeigt, daß auch weiße Blutkörperchen sich sensibilisieren lassen.

Kontrolle (durch Glas belichtet) nach 20 Min. Belichtung: die Blutkörperchen normal.

Die Kontrollversuche zeigen ferner die Bedeutung der kurzwelligen Lichtstrahlen für die Destruktion der roten Blutkörperchen.

Eine Belichtung mit intensivem Licht — reich an kurzwelligen Strahlen — ist also imstande, Hämolyse und Destruktion normaler (nicht sensibilisierter) roter Blutkörperchen hervorzurufen.

Ich kehre zu der Frage zurück über den Einfluß des Serumzusatzes auf die spezifische Wirkung der sensibilisierenden Stoffe gegenüber roten Blutkörperchen.

Die Versuche wurden in sehr starkem, diffusen Tageslicht angestellt (mitten am Tage im Juli, an einem Fenster nach Süden, wobei aber die Präparate gegen das direkte Sonnenlicht geschützt wurden). Lösungen der sensibilisierenden Stoffe in 0,9 % NaCl wurden in Reagensgläser mit Serum resp. 0,9 % NaCl-Lösung gemischt, und man setzte darauf jedem Glas einige Tropfen defibriertes Kaninchenblut zu.

#### Versuch 28.

Eosin-Na ( $1/5000$ ) — 5 ccm	} {	Im Licht nach 3 Stunden
0,9 % NaCl-Lösung — 5 ccm		+ kräftige Hämolyse.
Defibriertes Blut — 5 Tropfen		Im Dunkel nach 4 Stunden ÷ Hämolyse.
Eosin-Na ( $1/5000$ ) — 5 ccm	} {	Im Licht nach 4 Stunden
N-Kaninchen-Serum — 5 ccm		÷ Hämolyse.
Defibriertes Blut — 5 Tropfen		Im Dunkel nach 4 Stunden ÷ Hämolyse.

#### Versuch 29.

Dichloranthracendisulf. Na ( $1/5000$ ) — 5 ccm	} {	Im Licht nach 3 Std.
0,9 % NaCl-Lösung — 5 ccm		+ Hämolyse.
Defibriertes Blut — 5 Tropfen		Im Dunkel nach 4 Std. ÷ Hämolyse.
Dichloranthracendisulf. Na ( $1/5000$ ) — 5 ccm	} {	Im Licht nach 4 Std.
N-Kaninchen-Serum — 5 ccm		÷ Hämolyse.
Defibriertes Blut — 5 Tropfen		Im Dunkel nach 4 Std. ÷ Hämolyse.

Aus diesen Versuchen, welche ich übrigens mit mehreren anderen der in den übrigen Versuchsreihen besprochenen Sensibilisatoren wiederholt habe, geht die aufgehobene Wirkung der Sensibilisatoren mit genügender Deutlichkeit hervor. In einem Teil der Versuche trat die Hämolyse erst ein, wenn die Präparate direktem Sonnenlicht ausgesetzt wurden, es war jedoch beständig derselbe Unterschied zwischen den Präparaten ohne Serum und den Präparaten mit Serum vorhanden.

Nachdem ich im vorhergehenden den hemmenden Einfluß des Serumzusatzes auf die spezifischen Wirkungen der Sensibilisatoren gegenüber einer Reihe verschiedenartiger organisierter Elemente nachgewiesen habe, gehe ich dazu über, meine Versuche mit nichtorganisierten Objekten (Diastase, Invertin und Rizin) zu besprechen.

Die Diastase-Versuche wurden auf folgende Weise ausgeführt: Lösungen der sensibilisierenden Stoffe (in destilliertem Wasser) wurden mit gleichen Teilen destilliertem Wasser resp. norm. Kaninchen-Serum gemischt, darauf wurden den verschiedenen Mischungen 0,4 %ige Lösungen der Diastase zugesetzt. Die Präparate wurden in gleich große Erlenmeyersche Kolben gebracht und danach der Einwirkung starken, diffusen Tageslichtes während so langer Zeit ausgesetzt, daß die Diastase in den Präparaten ohne Serumbeimischung ganz oder ungefähr ganz destruiert wurde (die ungefähre Expositionszeit wurde durch vorausgehende orientierende Versuche festgestellt). Nach der Belichtung wurden 5 ccm jeden Präparates mit 45 ccm Stärke (1 %) gemischt und danach bei Stubentemperatur ins Dunkel gestellt. Die nicht belichteten Kontrollpräparate wurden gleichzeitig auf entsprechende Weise behandelt. Es wurden darauf mit bestimmten Zwischenräumen Stichproben von sämtlichen Mischungen genommen und den Stärkegehalt bestimmte ich qualitativ mit Jod in Jodkalium mittels der Tropfenmethode.

Es ergab sich, daß der Verlauf des diastatischen Prozesses durch den Serumzusatz etwas gehemmt wurde, und daß sich eine ähnliche Hemmung durch Zusatz einer geringen  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Menge hervorrufen ließ.

## Versuch 30.

- A. { Eosin Na ( $1/4000$  Mol.) — 1 Teil  
 Destilliertes Wasser — 1 Teil  
 0,4 % Diastase — 2 Teile.
- B. { Eosin Na ( $1/4000$  Mol.) — 1 Teil  
 N-Kaninchen-Serum — 1 Teil  
 0,4 % Diastase — 2 Teile.
- C. { Eosin Na ( $1/4000$  Mol.) — 1 Teil  
 $1/100$  norm.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  — 1 Teil  
 0,4 % Diastase — 2 Teile.

Von jeder der drei Mischungen A, B und C wurde ein Teil ins Dunkel gestellt, während ein zweiter Teil 6 Stunden lang belichtet wurde.

Nach Hinzusetzung von Stärke (1 %) und Stehen im Dunkel wurden mit der Jod-Probe die in der Tabelle angegebenen Resultate erzielt.

Reaktionszeit	1 Stunde	4 Stunden	6 Stunden	20 Stunden	
A. {	Licht	stark blaue Farbe	stark blaue Farbe	stark blaue Farbe	stark blaue Farbe
	Dunkel	schwach blaue Farbe	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt
B. {	Licht	stark blaue Farbe	schwach blaue Farbe	fast ungefärbt	ungefärbt
	Dunkel	schwach blaue Farbe	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt
C. {	Licht	stark blaue Farbe	stark blaue Farbe	stark blaue Farbe	stark blaue Farbe
	Dunkel	stark blaue Farbe	schwach blaue Farbe	fast ungefärbt	ungefärbt

Gleichzeitig mit der letzten Jodprobe, also nach 20 Stunden langem Stehen, wurden die verschiedenen Präparate mit Hilfe der Trommerschen Probe auf Zucker untersucht. In „A-Licht“ und „C-Licht“ ließ sich kein Zucker nachweisen, während in allen übrigen Präparaten natürlich reichlich Zucker vorhanden war.

Sechsstündige Belichtung hatte also die sensibilisierte Diastase-Lösung in den Präparaten A und C vollständig wirkungslos gemacht, während sie in dem

serumhaltigen Präparat B nur eine geringe Abschwächung hervorgerufen hatte.

Bei den Invertinversuchen benutzte ich folgendes Verfahren: 0,5 g Invertin wurden mit 25 g dest. Wasser in Porzellanmörsern ausgerührt. Die Aufschwemmung wurde zentrifugiert und die klare Lösung zu den Versuchen benutzt. Die Präparate wurden in gleich großen Erlenmeyerschen Kolben der Einwirkung des diffusen Tageslichtes ausgesetzt und nach kürzerer resp. längerer Zeit wurden sowohl von diesen belichteten Präparaten wie auch von nicht belichteten Kontrollpräparaten Stichproben genommen, deren invertierende Fähigkeit gegenüber 5 % Rohrzuckerlösungen danach polarimetrisch bestimmt wurde.

## Versuch 31.

A.	Eosin-Na ( $\frac{1}{5000}$ Mol.) — 1 Teil Dest. Wasser — 1 Teil Invertinlösung — 2 Teile.	} Licht } Dunkel.
B.	Eosin-Na ( $\frac{1}{5000}$ Mol.) — 1 Teil Kaninchenserum — 1 Teil Invertinlösung — 2 Teile.	} Licht } Dunkel.

Nach einer Stunde wurden von jedem der vier Präparate eine Probe von 5 ccm genommen. Jede der Proben wurde mit 95 ccm einer 5 % Rohrzuckerlösung gemischt, welche bei Stubentemperatur ins Dunkel gestellt und deren invertierende Zuckermenge nach 7 resp. 20stündigem Stehen bestimmt wurde (I).

Nach im ganzen  $2\frac{1}{2}$ stündiger Belichtung wurden wiederum 5 ccm jeden Präparates 95 ccm einer 5 %igen Rohrzuckerlösung zugesetzt, welche ebenfalls nach 6 resp. 20stündigem Stehen polarimetrisch untersucht wurde (II).

Die polarimetrischen Ablesungen ergaben folgende Resultate:

## I. Präp. 1 Stunde belichtet.

	Nach 7 Stunden	Nach 20 Stunden
A. Licht . . .	+ 2° 45'	+ 2° 27'
A. Dunkel . . .	+ 0° 25'	÷ 1° 06'
B. Licht . . .	+ 1° 50'	+ 0° 06'
B. Dunkel . . .	+ 0° 40'	÷ 1° 02'

II. Präp.  $2\frac{1}{2}$  Stunden belichtet.

	Nach 6 Stunden	Nach 20 Stunden
A. Licht . . .	+ 2° 53'	+ 2° 41'
A. Dunkel . .	+ 0° 54'	÷ 1° 04'
B. Licht . . .	+ 2° 38'	+ 2° 16'
B. Dunkel . .	+ 1° 06'	÷ 0° 58'

Infolge des Eiweißgehalts des Serums verursacht der Serumzusatz indessen eine Drehung der Polarisationssebene nach links; die Drehung betrug in diesem Fall 0° 08', indem die Bestimmung der Richtung der Polarisationssebene bei Versuchen mit Rohrzuckerlösungen mit und ohne Serumbeimischung folgendes Resultat ergab.

5 % Rohrzuckerlösung — 95 Teile	} + 3° 09'
Dest. Wasser — 5 Teile	
5 % Rohrzuckerlösung — 95 Teile	} + 3° 01'
Kaninchenserum — 2,5 Teile	
Dest. Wasser — 2,5 Teile	

Diese Korrektur muß also in den 2 obenstehenden Tabellen eingeführt werden, und diese bekommen dann folgendes Aussehen.

## I. Präp. 1 Stunde belichtet.

	Nach 7 Stunden	Nach 20 Stunden
A. Licht . . .	+ 2° 45'	+ 2° 27'
A. Dunkel . .	+ 0° 25'	÷ 1° 06'
B. Licht . . .	+ 1° 42'	÷ 0° 02'
B. Dunkel . .	+ 0° 32'	÷ 1° 10'

II. Präp.  $2\frac{1}{2}$  Stunden belichtet.

	Nach 6 Stunden	Nach 20 Stunden
A. Licht . . .	+ 2° 53'	+ 2° 41'
A. Dunkel . .	+ 0° 54'	÷ 1° 04'
B. Licht . . .	+ 2° 30'	+ 2° 08'
B. Dunkel . .	+ 0° 58'	÷ 1° 06'

Der hemmende Einfluß des Serums auf die sensibilisierende Wirkung des Eosin gegenüber dem Invertin



ist deutlich in Tabelle I zu sehen. Nach einstündiger Belichtung hat das Serumpräparat (B. Licht) noch eine kräftig invertierende Fähigkeit, während diese in dem Präparat ohne Serum (A. Licht) fast vollständig aufgehoben ist. Aus Tabelle II geht hervor, daß der Serumzusatz in diesem Fall doch nur eine Hemmung und bei weitem keine vollständige Aufhebung der Eosinwirkung erzielt hat, denn schon nach  $2\frac{1}{2}$  stündiger Belichtung ist die vom Licht hervorgerufene Destruktion des Invertins auch im Serumpräparat weit vorgeschritten (B. Licht).

In Analogie mit dem, was bei den früher besprochenen Alexinversuchen der Fall war, finden wir also hier, daß Lösungen der sensibilisierenden Stoffe nach Hinzufügung gleicher Teile Serum noch deutliche sensibilisierende Wirkungen gegenüber Invertin in Verdünnungen besitzen, in welchen die Wirkung gegenüber Paramäcien vollständig aufgehoben ist.

Die Ursache zu diesem Unterschied darf wohl teils in der Veränderung der osmotischen Verhältnisse gesucht werden, welche der Serumzusatz in den sensibilisierenden Lösungen hervorruft (siehe später) — eine Veränderung, welche zweifellos großen Einfluß auf die Resultate in den Paramäcienversuchen hat, während es nicht anzunehmen ist, daß sie eine entscheidende Rolle in Versuchen mit aufgelösten, nicht organisierten Stoffen spielt — teils in dem Umstande daß, während die Paramäcien überhaupt nicht auf die Lichtwirkung reagieren wollen, sobald dieselbe unter ein gewisses Minimum sinkt, die photo-chemischen Reaktionen unter denselben Bedingungen durch beständige Addition kleiner Lichtwirkungen einen deutlichen Ausschlag geben können.

In Versuchen mit Rizin zeigte es sich ebenfalls, daß der Serumzusatz einen hemmenden Einfluß auf die spezifischen Wirkungen der sensibilisierenden Stoffe hatte.

Die Versuchsanordnung war folgende: 1 Teil Rizin wurde in einem Porzellanmörser mit 100 Teilen einer 0,9 %igen NaCl-Lösung angerührt und das Präparat durch Glaswolle filtriert. Die sensibilisierenden Stoffe werden ebenfalls in 0,9 % NaCl aufgelöst. Die Belichtung wurde auch in diesen Versuchen in Erlenmeyerschen Kolben vorgenommen und als Maß für die Lichtwirkung auf das Rizin benutzte ich die agglutinierende Wirkung der belichteten Präparate auf rote Blutkörperchen.

Da die Kontrollversuche ergaben, daß die Agglutination bedeutend langsamer in Präparaten mit Serum als in Präparaten ohne Serum vor sich ging, so versuchte ich diesen Unterschied dadurch auszugleichen, daß ich, anstatt wie im Anfang ausgewaschene, in 0,9 % NaCl. aufgeschlemmte Blutkörperchen, defibriniertes, mit Serum von demselben Kaninchen verdünntes Blut anwendete.

Ich führe einen einzelnen Versuch als Beispiel an:

Versuch 32.

A.	Eosin Na ( $\frac{1}{3000}$ Mol.) — 1 Teil 0,9 % NaCl — 1 Teil Rizin (1 %) — 2 Teile	} Licht } Dunkel.
B.	Eosin Na ( $\frac{1}{3000}$ Mol.) — 1 Teil Kaninchenserum — 1 Teil Rizin — 2 Teile	} Licht } Dunkel.

Die agglutinierende Fähigkeit der Präparate wurde nach 15 Min., 30 Min. und 45 Min. langer Belichtung untersucht. Ich habe in der unten angeführten Tabelle diejenigen Mengen Blut angegeben, in welchen 1 Vol. der verschiedenen Präparate noch totale Agglutination (das Filtrat klar!) hervorzurufen vermochte.

Nach 15 Min. langer Belichtung:

A. Licht	— 4 Teile Blut
A. Dunkel	— 8 „ „
B. Licht	— 6 „ „
B. Dunkel	— 8 „ „

Nach 30 Min. langer Belichtung:

A. Licht	— ca. $\frac{1}{2}$ Teil Blut
A. Dunkel	— 8 Teile „
B. Licht	— 2 „ „
B. Dunkel	— 8 „ „

Nach 45 Min. langer Belichtung:

A. Licht	— ÷ agglutinierende Wirkung
A. Dunkel	— 8 Teile Blut
B. Licht	— ca. 1 Teil „
B. Dunkel	— 8 Teile „

In dem Serumpräparat (B. Licht) ist die sensibilisierende Wirkung des Eosins also bedeutend geringer als in dem Präparat ohne Serumzusatz (A. Licht) gewesen, indem die vom Licht hervorgerufene Destruktion des Rizins viel langsamer in dem ersten als in dem letzten vor sich gegangen ist; jedoch stoßen wir übrigens hier auf dieselben Verhältnisse, die auf Seite 497 besprochen sind, indem das hinzugesetzte Serum nicht wie in den Paramäcienversuchen die sensibilisierende Wirkung eines gleichen Volumens einer  $\frac{1}{3000}$  Mol. Eosinlösung aufgehoben, sondern nur verringert hat.

Die Resultate der im letzten Abschnitt besprochenen Versuchsreihen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Ein Zusatz von Serum zu Lösungen sämtlicher hier untersuchten photobiologischen Sensibilisatoren bewirkt Herabsetzung resp. Aufhebung der spezifischen Wirkungen dieser Stoffe sowohl gegenüber Mikroorganismen (*Paramecium caudatum*, *Trypanosoma Brucei*), tierischen Gewebezellen (Flimmerzellen der Frösche) und roten Blutkörperchen, sowie gegenüber Enzymen (Diastase, Invertin) und Toxinen (Rizin). Der hemmende Einfluß des Serums tritt stärker in Versuchen hervor, wo die Sensibilisationsfähigkeit gegenüber Mikroorganismen oder Gewebezellen untersucht wird, als in Versuchen mit Lösungen nicht organisierter Körper.

## V.

Über die Wirkung verschiedener Seren und anderer Kolloide gegenüber den photobiologischen Sensibilisatoren — mit Rücksicht auf deren Toxizität und sensibilisierende Eigenschaften.

Alle die in dem vorhergehenden Abschnitt besprochenen Versuche sind mit Kaninchen-Serum angestellt, und es erhebt sich jetzt die Frage, inwiefern sich Seren anderer Tierarten ähnlich verhalten oder ob sich zwischen den Wirkungen der verschiedenen Seren Unterschiede geltend machen.

Die zu den folgenden Versuchen angewendeten Seren wurden bis zur Anwendung ca. 24 Stunden nach dem Aderlaß

der betreffenden Tiere im Eisschrank aufbewahrt. Vor dem Gebrauch wurden sie — im Hinblick auf die Alexinwirkung — eine Stunde lang im Thermostat auf 56° erwärmt; nur bei dem Ochsen Serum erwies es sich als notwendig, die Erwärmung zwei Stunden lang fortzusetzen. Die Exponierung der einzelnen Präparate innerhalb jeder Versuchsreihe wurde gleichzeitig und unter gleichartigen Verhältnissen begonnen bei diffusum Tageslicht an einem Fenster nach Osten.

## Versuch 33. Eosin-Na.

$\frac{1}{1000}$ Mol. Eosin-Na	Kaninchenserum	Hundeserum	Pferdeserum	Schweineserum	Ochsen Serum	Menschenserum	Hühnerserum	Rattenserum	Paramäcien- Kultur	Paramäcien im Licht	Paramäcien im Dunkel
1	1								2	+ 10 Stunden	Leb. 24 Stunden
1		1							2	+ 3 Stunden	" 24 "
1			1						2	+ 5 Stunden	" 24 "
1				1					2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
1					1				2	+ 5 Stunden	" 24 "
1						1			2	+ 24 Stunden	" 24 "
1							1		2	+ 2½ Stunden	" 24 "
1								1	2	+ 3 Stunden	" 24 "
1									3	+ 30 Min.	" 24 "

## Versuch 34. Dichloranthracendisulfosaures Na.

$\frac{1}{500}$ Mol. dichl. Na	Kaninchenserum	Hundeserum	Pferdeserum	Schweineserum	Ochsen Serum	Menschenserum	Hühnerserum	Rattenserum	Paramäcien- Kultur	Paramäcien im Licht	Paramäcien im Dunkel
1	1								2	+ 24 Stunden	Leb. 24 Stunden
1		1							2	+ 5½ Stunden	" 24 "
1			1						2	+ 6 Stunden	" 24 "
1				1					2	Leb. 24 Stunden	" 24 "
1					1				2	+ 5 Stunden	" 24 "
1						1			2	+ 24 Stunden	" 24 "
1							1		2	+ 4 Stunden	" 24 "
1								1	2	+ 6 Stunden	" 24 "
1									3	+ 5 Min.	" 24 "

In  $\frac{1}{500}$  Mol. dichl. Na-Lösungen wurde die sensibilisierende Wirkung vollständig durch Hinzufügung gleicher Teile der verschiedenen Seren aufgehoben, — nur in den Präparaten mit Hunde-Serum wurden die Paramäcien 24 Stunden nach Beginn der Exponierung tot gefunden.

Wie es aus den Tabellen hervorgeht, ergaben die Versuche eine außerordentlich große Verschiedenheit in der Wirkung der Seren von verschiedenen Tierarten. Es ließ sich indessen bei vergleichenden Versuchen mit einer Reihe Seren von Tieren derselben Art eine ähnliche Abweichung in der Wirkung nachweisen.

#### Versuch 35.

Serum von 4 verschiedenen Pferden: A, B, C und D.

Rose Bengal ( $\frac{1}{1000}$ Mol.)	— 1	} Par. im	{	Licht: † 4 Std.	
Pferde-Serum A	— 1				
Par. Kultur	— 2				Dunkel: leb. 24 Std.
Rose Bengal ( $\frac{1}{1000}$ Mol.)	— 1	} Par. im	{	Licht: † $2\frac{1}{2}$ Std.	
Pferde-Serum B	— 1				
Par. Kultur	— 2				Dunkel: leb. 24 Std.
Rose Bengal ( $\frac{1}{1000}$ Mol.)	— 1	} Par. im	{	Licht: † 4 Std.	
Pferde-Serum C	— 1				
Par. Kultur	— 2				Dunkel: leb. 24 Std.
Rose Bengal ( $\frac{1}{1000}$ Mol.)	— 1	} Par. im	{	Licht: † $3\frac{1}{2}$ Std.	
Pferde-Serum D	— 1				
Par. Kultur	— 2				Dunkel: leb. 24 Std.
Rose Bengal ( $\frac{1}{1000}$ Mol.)	— 1	} Par. im	{	Licht: † momentan	
Dest. Wasser	— 1				
Par. Kultur	— 2				Dunkel: † 2 Min.

Der Grund dafür, daß ein ähnlicher Unterschied in der Wirkung der vielen verschiedenen Kaninchenserum, mit denen ich früher gearbeitet habe, nicht augenfällig gewesen ist, muß darin gesucht werden, daß die regelmäßige und gleichartige Fütterung der Kaninchen eine große Gleichartigkeit ihrer „Blutalkaleszenz“ zur Folge hat. Es ergab sich nämlich, daß ich durch Variation der Diät der Kaninchen Seren erhalten konnte, welche die sensibilisierenden Eigenschaften des Eosin-Na in ungleichem Grad herabsetzten.

## Versuch 36.

Zwei Kaninchen desselben Wurfs, welche beständig zusammen in einem Käfig gelebt hatten, wurden auf verschiedene Diät gesetzt, indem das eine (A) ausschließlich mit in Wasser aufgeweichtem Brot und Hafer gefüttert wurde, während das andere (B) nur Kohlblätter erhielt. Die Diät bewirkte, daß Kaninchen A eine sparsame Diuresis mit saurem, konzentriertem Urin bekam, während derselbe bei Kaninchen B reichlich und alkalisch reagierend war. Nach 10 Tagen wurden von den zwei Kaninchen Blutproben genommen und mit den dadurch gewonnenen Seren folgende Versuche angestellt.

## I. Eosin-Na.

Eosin-Na ( $1/200$ Mol.) — 1 Teil	} Par. im	{	Licht: † $3\frac{1}{2}$ Std.
O-Kaninchenserum A — 1 Teil			Dunkel: leb. 24 Std.
Par.-Kultur — 2 Teile			
Eosin-Na ( $1/200$ Mol.) — 1 Teil	} Par. im	{	Licht: † 2 Std.
O-Kaninchenserum B — 1 Teil			Dunkel: leb. 24 Std.
Par.-Kultur — 2 Teile			

## II. Dichloranthracendisulfosaures Na.

Dichl. Na ( $1/100$ Mol.) — 1 Teil	} Par. im	{	Licht: † 4 Std.
O-Kaninchenserum A — 1 Teil			Dunkel: leb. 24 Std.
Par.-Kultur — 2 Teile			
Dichl. Na ( $1/100$ Mol.) — 1 Teil	} Par. im	{	Licht: † 3 Std.
O-Kaninchenserum B — 1 Teil			Dunkel: leb. 24 Std.
Par.-Kultur — 2 Teile			

Der Unterschied zwischen den Wirkungen der zwei Seren A und B ist in dem obenstehenden Versuch ganz gewiß nicht groß, gewinnt jedoch an Bedeutung, wenn er mit der Verschiedenheit verglichen wird, welche Seren verschieden gefütterter Kaninchen in anderen Beziehungen in ihrem Verhältnis gegenüber Lösungen photobiologischer Sensibilisatoren aufwiesen (siehe Abschnitt VI und VII).

Im Anschluß an die oben besprochenen Versuche lag es nahe zu untersuchen, inwiefern eine Hinzufügung kleiner Mengen von Säure oder Alkali einen Einfluß auf die Fähigkeit des Serums hat, die spezifischen Wirkungen der Sensibilisatoren zu vermindern. Versuche dieser Art stoßen indessen auf recht bedeutende

Schwierigkeiten, indem die Versuchsobjekte, welche das Maß für die Intensität der Lichtwirkung abgeben sollen, selbst so außerordentlich stark von Säure oder Alkali beeinflusst werden. Bekanntlich sind die Paramäcien besonders empfindlich sogar gegen die geringsten Mengen von Säuren und sie vertragen auch nur eine sehr geringe Beimischung von Na OH oder Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; ähnliches gilt für die roten Blutkörperchen, und Enzyme werden ja vielleicht in noch höherem Grad von Differenzen in der Alkaleszenz beeinflusst. Von mir, mit Erythrocyten ausgeführte Versuche ergaben daher auch vollständig negative Resultate. Die Paramäcienversuche glückten etwas besser; ich führe ein einzelnes Beispiel an:

## Versuch 39.

Das benutzte Serum stammt von einem Kaninchen, das zehn Tage ausschließlich von Hafer und Brot gelebt hatte. Die Mischungen wurden in einer Reihe Reagensgläsern vorgenommen, welche mit Schutzhüllen aus schwarzem Papier gegen das Licht geschirmt waren. Erst wurden in jedes Glas 10 Teile Serum abpipettiert; danach wurde Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in steigenden Mengen, sowie 10 Teile einer  $\frac{1}{500}$  Mol. Eosin Na-Lösung zugesetzt. Nach dem Schütteln wurden schließlich jedem Glas 20 Teile Paramäcienkultur zugesetzt und es wurde durch Beimischung von destilliertem Wasser dafür Sorge getragen, daß die Verdünnung überall dieselbe war. Von diesen Mischungen wurden Tropfen in feuchten Kammern angebracht, die danach auf einmal diffusem Tageslicht ausgesetzt wurden.

$\frac{1}{500}$ Mol. Eosin - Na	Destilliertes Wasser	$\frac{1}{50}$ Normal-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	$\frac{1}{10}$ Normal-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	$\frac{1}{10}$ Normal-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	$\frac{1}{10}$ Normal-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	$\frac{1}{1}$ Normal-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	$\frac{1}{1}$ Normal-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	$\frac{1}{1}$ Normal-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	O-Kaninchenserum	Param.-Kultur	Paramäcien im Licht	Paramäcien im Dunkel
10	3								10	20	+ 5 $\frac{1}{2}$ Stunden	Leb. 24 Stund.
10	2	1							10	20	+ 4 $\frac{1}{2}$ "	" 24 "
10	2		1						10	20	+ 4 $\frac{1}{2}$ "	" 24 "
10	1			2					10	20	+ 5 "	" 24 "
10					3				10	20	+ 5 "	" 24 "
10	2					1			10	20	+ 3 $\frac{1}{2}$ "	" 24 "
10	1						2		10	20	+ 2 $\frac{1}{2}$ "	" 24 "
10								3	10	20	+ 1 Stunde	+ 7 Stunden

Selbst wenn die Tötungszeiten der Paramäcien in dem obenstehenden Versuch deutlich mit dem steigenden  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Gehalt verkürzt sind, so läßt es sich doch nicht mit Sicherheit entscheiden, inwiefern dies auf eine erhöhte Lichtwirkung zurückzuführen ist oder ob es ausschließlich der zunehmenden toxischen Wirkung des kohlensauren Natrons zugeschrieben werden muß; denn dieser letzten Annahme wird ja nicht von dem Umstand widersprochen, daß die Paramäcien in allen Dunkelpräparaten mit Ausnahme des letzten am Leben blieben. Später zu besprechende Versuche über den Einfluß der Alkali-Beimischung auf die Fluoreszenz- und Diffusionsverhältnisse der Serumfarbstoffmischungen erhöhen indessen die Wahrscheinlichkeit der Annahme, daß eine  $\text{NaOH}$ - oder  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Beimischung auch die sensibilisierende Fähigkeit der besprochenen Mischungen steigert. In diesem Zusammenhang ist untenstehender Versuch auch nicht ohne Interesse.

#### Versuch 40.

Serum von einem Kaninchen, das einige Zeit mit Kohlblättern gefüttert war, wurde in zwei gleiche Portionen geteilt, von denen die eine in einem Dialysator angebracht wurde, um 24 Stunden gegen eine reichliche Menge destillierten Wassers zu dialysieren. Der Dialysator mit Inhalt wurde vor und nach der Dialyse gewogen und eine der Gewichtserhöhung entsprechende Wassermenge wurde der zweiten Serumportion beigemischt. Danach wurden die zwei Seren wie gewöhnlich 45 Minuten auf  $56^\circ$  erwärmt.

$\frac{1}{500}$ mol. Eosin-Na	— 1 Teil	}	Par. im	{	Licht: † 2 Std.
Nichtdialys. Kaninchenserum	— 1 Teil				Dunkel:
Par.-Kultur	— 2 Teile				leb. 24 Std.
$\frac{1}{500}$ mol. Eosin-Na	— 1 Teil	}	Par. im	{	Licht: † $3\frac{1}{2}$ Std.
Dialys. Kaninchenserum	— 1 Teil				Dunkel:
Par.-Kultur	— 2 Teile				leb. 24 Std.

Ebenso wie die spezifischen Wirkungen der sensibilisierenden Stoffe in verschiedenem Grad von verschiedenen Seren beeinflußt werden, so haben letztere auch einen ungleich starken Einfluß auf die Toxizität der Stoffe, und es ließ sich insofern ein deutlicher



Parallelismus nachweisen, als die auf die Sensibilisation am stärksten hemmenden Seren auch die Toxizität am stärksten herabsetzen.

Es ließe sich denken, daß der im vorhergehenden nachgewiesene hemmende Einfluß auf die toxischen und sensibilisierenden Wirkungen der hier besprochenen Stoffe in der erhöhten Viskosität läge, die die Serumbeimischung den Lösungen beibringt. Eine derartige Erklärung würde wenigstens bei den Paramäcienversuchen nicht von vornherein als unwahrscheinlich erscheinen. Die Frage ließ sich indessen leicht durch vergleichende Versuche mit anderen kolloidalen Lösungen lösen. Ich benutzte Leim, Gelatine, Gummi Arabicum<sup>1)</sup>, Stärke in Lösungen, welche, nach Untersuchung mit Ostwalds Viskosimeter<sup>2)</sup>, ungefähr dieselbe Viskosität wie Serum hatten.

#### I. Toxizitätsuntersuchungen:

##### Versuch 41. Rose Bengal.

$\frac{1}{1000}$ Mol. Rose Bengal	— 1 Teil	} Par. im Dunkel: † 5 Min.
Leitungswasser	— 1 Teil	
Par.-Kultur	— 2 Teile	
$\frac{1}{1000}$ Mol. Rose Bengal	— 1 Teil	} Par. im Dunkel: leb. 24 Stunden.
O.-Kaninchenserum	— 1 Teil	
Par.-Kultur	— 2 Teile	
$\frac{1}{2000}$ Mol. Rose Bengal	— 1 Teil	} Par. im Dunkel: † 15 Min.
Gummi Arabicum (2%)	— 1 Teil	
Par.-Kultur	— 2 Teile	
$\frac{1}{1000}$ Mol. Rose Bengal	— 1 Teil	} Par. im Dunkel: † 10 Min.
Leimlösung (2%)	— 1 Teil	
Par.-Kultur	— 2 Teile	

Versuche mit anderen Stoffen der Fluoreszeinreihe ergaben in dieser Beziehung dasselbe Resultat. Ebenfalls eine Reihe der anderen, früher besprochenen Stoffe. Als Beispiel führe ich an:

<sup>1)</sup> Gummi Arabicum-Lösungen reagieren in der Regel schwach sauer, und müssen vor dem Gebrauch zu Versuchen mit Paramäcien sorgfältig mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  neutralisiert werden.

<sup>2)</sup> Ostwald und Luther: Physiko-Chemische Messungen, 2. Aufl., S. 260.

## Versuche 42. Cyanin (Chinolinblau).

Cyanin (1 : 30000) — 1 Teil	}	Par. im Dunkel: † 30 Min.
Destilliertes Wasser — 1 Teil		
Par.-Kultur — 2 Teile		
Cyanin (1 : 30000) — 1 Teil	}	Par. im Dunkel: leb. 24 Std.
O.-Kaninchenserum — 1 Teil		
Par.-Kultur — 2 Teile		
Cyanin (1 : 30000) — 1 Teil	}	Par. im Dunkel: † 35 Min.
Gelatine (1%) — 1 Teil		
Par.-Kultur — 2 Teile		

## II. Sensibilisationsuntersuchungen.

## Versuch 43. Eosin-Na.

$\frac{1}{5000}$ Mol. Eosin-Na — 1 Teil	}	Par. im	Licht: † 1½ Std. Dunkel: leb. 24 Std.
Leitungswasser — 1 Teil			
Par.-Kultur — 2 Teile			
$\frac{1}{5000}$ Mol. Eosin-Na — 1 Teil	}	Par. im	Licht: leb. 24 Std. Dunkel: leb. 24 Std.
N.-Kaninchenserum — 1 Teil			
Par.-Kultur — 2 Teile			
$\frac{1}{2000}$ Mol. Eosin-Na — 1 Teil	}	Par. im	Licht: † 1½ Std. Dunkel: leb. 24 Std.
Gummi Arabicum (2%) — 1 Teil			
Par.-Kultur — 2 Teile			
$\frac{1}{2000}$ Mol. Eosin-Na — 1 Teil	}	Par. im	Licht: † 2 Std. Dunkel: leb. 24 Std.
Leimlösung (2%) — 1 Teil			
Par.-Kultur — 2 Teile			

## Versuch 44. Dichloranthracendisulfosaures Na.

$\frac{1}{1000}$ Mol. dichl. Na — 1 Teil	}	Par. im	Licht: † 5 Min. Dunkel: leb. 24 Std.
Destilliertes Wasser — 1 Teil			
Par.-Kultur — 2 Teile			
$\frac{1}{1000}$ Mol. dichl. Na — 1 Teil	}	Par. im	Licht: leb. 24 Std. Dunkel: leb. 24 Std.
O.-Kaninchenserum — 1 Teil			
Par.-Kultur — 2 Teile			
$\frac{1}{1000}$ Mol. dichl. Na — 1 Teil	}	Par. im	Licht: † 10 Min. Dunkel: leb. 24 Std.
Leimlösung (2%) — 1 Teil			
Par.-Kultur — 2 Teile			

Die angeführten Versuche werden genügen, um zu beweisen, daß die Erhöhung der Viskosität vielleicht

einen geringen Einfluß auf die toxischen und sensibilisierenden Wirkungen der Farbstoffe besitzt, daß dieser Einfluß jedoch keineswegs zur Erklärung der Folgen des Serumzusatzes genügt. — Die Versuche zeigen ferner, daß die hier besprochenen Wirkungen gegenüber den photobiologischen Sensibilisatoren insofern dem Serum eigen sind, da sie nicht von Kolloiden im allgemeinen hervorgerufen werden können. Es muß daher angenommen werden, daß die Wirkung von einem bestimmten Stoff herrührt, den das Serum enthält, und es liegt nahe die Aufmerksamkeit in erster Linie auf die Eiweißstoffe des Serums zu richten.

## Versuch 45.

Kaninchenserum wird mit vier Teilen dest. Wasser verdünnt, worauf die Eiweißstoffe mit Essigsäure gefällt werden. Nach Filtration durch aschenfreien Filter und sorgfältiger Neutralisation mit Natriumkarbonat wird das Filtrat auf Wasserbad zu dem ursprünglichen Volumen eingedampft, um danach zu folgenden Versuchen benutzt zu werden:

$\frac{1}{2000}$ Mol. Eosin-Na	— 1 Teil	} Par. im	{	Licht: † 2 Std.
Dest. Wasser	— 1 Teil			Dunkel: leb. 24 Std.
Par.-Kultur	— 2 Teile			
$\frac{1}{2000}$ Mol. Eosin-Na	— 1 Teil	} Par. im	{	Licht: leb. 24 Std.
O-Kaninchenserum	— 1 Teil			Dunkel: leb. 24 Std.
Par.-Kultur	— 2 Teile			
$\frac{1}{2000}$ Mol. Eosin-Na	— 1 Teil	} Par. im	{	Licht: † $2\frac{1}{2}$ Std.
Kaninchenserum ÷ Eiweiß-				Dunkel: leb. 24 Std.
stoffe	— 1 Teil			
Par.-Kultur	— 2 Teile			

Der Versuch zeigt, daß der hemmende Einfluß des Serumzusatzes auf die sensibilisierende Wirkung der Eosinlösungen entweder den Eiweißstoffen des Serums oder Stoffen zuzuschreiben ist, welche mit diesen gefällt werden. Ich ging daher dazu über zu untersuchen, inwiefern sich eine ähnliche Wirkung durch Hinzufügung anderer Eiweißstoffe oder von Stoffen hervorrufen ließ, die diesen nahe stehen.

**Toxizitätsuntersuchungen.****Versuch 46. Eosin-Na-Hühnereiweiß.**

Hühnereiweiß wurde geschlagen, filtriert und mit dest. Wasser verdünnt, bis es dieselbe Viskosität wie Serum hatte.

Eosin-Na (1 : 50)	— 1 Teil	} Par. im Dunkel: † 30 Min.
Leitungswasser	— 1 Teil	
Par.-Kultur	— 2 Teile	
Eosin-Na (1 : 50)	— 1 Teil	} Par. im Dunkel: Hälfte † 24 Std.
O-Kaninchenserum	— 1 Teil	
Par.-Kultur	— 2 Teile	
Eosin-Na (1 : 50)	— 1 Teil	} Par. im Dunkel: leb. 8 Std.; † 24 Std.
Verd. Hühnereiweiß	— 1 Teil	
Par.-Kultur	— 2 Teile	

**Versuch 47. Rose-Bengal-Hühnereiweiß.**

Rose-Bengal (1:1000)	— 1 Teil	} Par. im Dunkel: † 10 Min.
Leitungswasser	— 1 Teil	
Par.-Kultur	— 2 Teile	
Rose-Bengal (1:1000)	— 1 Teil	} Par. im Dunkel: leb. 24 Std.
O-Kaninchenserum	— 1 Teil	
Par.-Kultur	— 2 Teile	
Rose-Bengal (1:1000)	— 1 Teil	} Par. im Dunkel: Hälfte † 24 Std.
Verd. Hühnereiweiß	— 1 Teil	
Par.-Kultur	— 2 Teile	

**Versuch 48. Tetrachlortetrabromfluoreszein K. — Hühnereiweiß.**

Tetrachl.-K. (1:2000)	— 1 Teil	} Par. im Dunkel: † 20 Min.
Leitungswasser	— 1 Teil	
Par.-Kultur	— 2 Teile	
Tetrachl.-K. (1:2000)	— 1 Teil	} Par. im Dunkel: leb. 24 Std.
O-Kaninchenserum	— 1 Teil	
Par.-Kultur	— 2 Teile	
Tetrachl.-K. (1:2000)	— 1 Teil	} Par. im Dunkel: leb. 24 Std.
Verd. Hühnereiweiß	— 1 Teil	
Par.-Kultur	— 2 Teile	

**Versuch 49. Eosin-Na — Pepton purissim. (Grübler).**

Das Pepton wurde in 5%igen oder 10%igen wässrigen Lösungen benutzt. Es erwies sich eine Neutralisierung mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  als notwendig.

$\frac{1}{25}$ Mol. Eosin-Na	— 1 Teil	} Par. im Dunkel: † 30 Min.
Dest. Wasser	— 1 Teil	
Par.-Kultur	— 2 Teile	
$\frac{1}{25}$ Mol. Eosin-Na	— 1 Teil	} Par. im Dunkel: Hälfte † 24 Std.
O-Kaninchenserum	— 1 Teil	
Par.-Kultur	— 2 Teile	
$\frac{1}{25}$ Mol. Eosin-Na	— 1 Teil	} Par. im Dunkel: † 30 Min.
Peptonlösung (5%)	— 1 Teil	
Par.-Kultur	— 2 Teile	

**Sensibilisationsuntersuchungen.****Versuch 50. Rose-Bengal. — Hühnereiweiß. — Pepton.**

Rose-Bengal (1:15 000)	— 1 Teil	} Par. im {	Licht: † 5 Min.
Leitungswasser	— 1 Teil		Dunkel: leb. 24 Std.
Par.-Kultur	— 2 Teile		
Rose-Bengal (1:15 000)	— 1 Teil	} Par. im {	Licht: leb. 24 Std.
O-Kaninchenserum	— 1 Teil		Dunkel: leb. 24 Std.
Par.-Kultur	— 2 Teile		
Rose-Bengal (1:15 000)	— 1 Teil	} Par. im {	Licht: † 8 Std.
Verd. Hühnereiweiß	— 1 Teil		Dunkel: leb. 24 Std.
Par.-Kultur	— 2 Teile		
Rose-Bengal (1:15 000)	— 1 Teil	} Par. im {	Licht: † 10 Min.
Peptonlösung 10%	— 1 Teil		Dunkel: Größter Teil
Par.-Kultur	— 2 Teile		leb. 24 Std.

**Versuch 51. Dichloranthracendisulfosaures Na —  
Pepton puriss.**

$\frac{1}{500}$ Mol. dichl. Na	— 1 Teil	} Par. im {	Licht: † 5 Min.
Dest. Wasser	— 1 Teil		Dunkel: Einzelne
Par.-Kultur	— 2 Teile		leb. 24 Std.

$\frac{1}{500}$ Mol. dichl. Na	— 1 Teil	} Par. im	{	Licht: leb. 24 Min.
O-Kaninchenserum	— 1 Teil			Dunkel: leb. 24 Std.
Par.-Kultur	— 2 Teile			
$\frac{1}{500}$ Mol. dichl. Na	— 1 Teil	} Par. im	{	Licht: † 15 Min.
Peptonlösung 10%	— 1 Teil			Dunkel: † 24 Std.
Par.-Kultur	2 Teile			

Es geht aus den angeführten Versuchsergebnissen mit großer Deutlichkeit hervor, daß Hühnereiweiß einen ähnlichen<sup>1)</sup> hemmenden Einfluß gegenüber den toxischen und spezifischen Wirkungen der photobiologischen Sensibilisatoren wie das Serum besitzt, während sich ein derartiger Einfluß in Versuchen mit Pepton überhaupt nicht geltend macht.

Schon aus diesen Versuchen darf man wohl den Schluß ziehen, daß die Eiweißstoffe des Serums die bei dem Serumzusatz hervorgerufenen Veränderungen der photobiologischen Sensibilisatoren verursachen.

## VI.

### Über den Einfluß des Serums auf die optischen Eigentümlichkeiten der photobiologischen Sensibilisatoren.

Ein Teil der photobiologischen Sensibilisatoren wird bei Serumzusatz aus ihren wässrigen Lösungen gefällt, und von derartigen Stoffen ist in folgendem nicht die Rede. Ich bespreche außerdem nur in vitro vorgenommene Versuche; ein großer Teil der Farbstoffe wird ja bekanntlich im Organismus zu Leukostoffen mit ganz anderen optischen Eigenschaften reduziert.

Das optische Phänomen, das in diesen Untersuchungen besonderes Interesse besitzt, ist die Fluoreszenz. Wie in der

<sup>1)</sup> Manchmal war der hemmende Einfluß des Hühnereiweiß bedeutend weniger ausgeprägt als in den hier angeführten Versuchen. Ich habe den Grund zu dieser variierenden Wirkung nicht eingehender untersucht. Sie ist vielleicht auf ähnliche Variationen zwischen den verschiedenen Eiweißen zurückzuführen, wie diejenigen, welche vorher zwischen verschiedenen Seren nachgewiesen sind; es ist jedoch auch möglich, sie auf die Verschiedenheit in der Zubereitung zurückzuführen (Filtration, Verdünnung usw.).

Einleitung erwähnt, hat man versucht, die Fähigkeit der Sensibilisatoren zu fluoreszieren mit ihrer Fähigkeit zu sensibilisieren in Verbindung zu bringen, und ich hielt es nicht für unmöglich durch Versuche mit Serum gewisse Relationen zwischen diesen zwei Eigenschaften zu finden, die in dieser Beziehung eventuell von theoretischem Interesse sein könnten.

Die Fluoreszenz der Lösungen habe ich einfach in Reagenzgläsern auf dunklem Hintergrund untersucht, — entweder in diffusem Tageslicht, oder in direktem Sonnenlicht oder in dem mit einer Linse konzentrierten Sonnenlicht. Nur wenn eine genauere vergleichende Untersuchung wünschenswert war, wurden die Lösungen in Gläser mit geschliffenen, planparallelen Wänden gebracht und im Dunkelmzimmer mit Hilfe des Spektroskops im Licht einer Nernst-Lampe untersucht.

Serum ist bekanntlich selbst fluoreszierend; dies beeinflusst jedoch nicht die Untersuchungen in wesentlichem Grade, denn teils ist die Fluoreszenz verhältnismäßig sehr schwach, teils wird sie hauptsächlich von Strahlen hervorgerufen, welche Glas nicht passieren. Recht störend wirkt dahingegen manchmal die Opaleszenz, jedoch besitzt man im Nicol-Prisma bekanntlich ein gutes Hilfsmittel, um zwischen dem diffus reflektierten — teilweise polarisierten — Licht und dem nicht polarisierten Fluoreszenzlicht zu unterscheiden.

Ich bespreche zuerst den Einfluß des Serumzusatzes auf die Fluoreszenz in dichloranthracendisulfosauren Natron-Lösungen. Wie es beständig mit Lösungen fluoreszierender Stoffe der Fall ist, nimmt auch die Fluoreszenz dieses Stoffes bis zu einem gewissen Punkt mit der steigenden Verdünnung zu, um darauf wiederum langsam zu fallen. Die konzentrierten dichloranthracendisulfosauren Natron-Lösungen sind in durchfallendem Licht leicht gelblich, und in auffallendem Licht (diffusem Tageslicht oder Sonnenlicht) ohne sichtbare Fluoreszenz; diese fängt erst an, sich in Verdünnungen von ca.  $\frac{1}{200}$  Mol. zu zeigen und sie nimmt mit der steigenden Verdünnung zu, bis sie ihr Maximum in Verdünnungen von ca.  $\frac{1}{10000}$  Mol. erreicht. Derartige Lösungen sind in durchfallendem Licht vollständig farblos, während sie in auffallendem Licht prachtvolle, bläuliche Fluoreszenz aufweisen. Diese nimmt bei weiterer Verdünnung sehr langsam ab und läßt sich

in diffusem Tageslicht noch in  $1/500\,000$  Mol.-Lösungen beobachten. In konzentriertem Sonnenlicht ist sie noch in  $1/5\,000\,000$  Mol.-Verdünnungen nachzuweisen.

Stellt man eine Reihe wässriger dichloranthracendisulfosaurer Natron-Lösungen von  $1/50$ ,  $1/100$ ,  $1/200$  Mol. usw. her und mischt jeder dieser Lösungen gleiche Teile Kaninchenserum bei, so verschwindet die Fluoreszenz in allen Präparaten so gut wie vollständig. Die konzentrierten Lösungen — bis zu  $1/1000$  Mol. dichl. Na + Serum *aa partes* — geben indessen bei Verdünnung mit Wasser wiederum kräftige Fluoreszenz, während sich diese nicht auf diesem Wege in Mischungen mit  $1/2000$  Mol. dichl. Na und darunter hervorrufen läßt.

Bei den konzentrierten Lösungen hat der Serumzusatz also nur eine geringe Herabsetzung der im voraus schwachen Fluoreszenz bewirkt, und diese tritt auch in dem Augenblick wieder ein, wo man die allgemeinen Bedingungen für das Entstehen der Fluoreszenz durch Verdünnung mit Wasser günstiger gestaltet. Bei den dünneren Lösungen handelt es sich dagegen um eine wirkliche Aufhebung der Fluoreszenzfähigkeit<sup>1)</sup> und meine Versuche zeigen, daß eine bestimmte Menge dichloranthracendisulfosaures Na von einer bestimmten Menge Serum gebunden wird. 1 ccm Serum hebt die Fluoreszenz

---

<sup>1)</sup> Kauffmann und Reißwenger (Über Fluoreszenz. Untersuchungen über das Ringsystem des Benzols. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jahrg. 37. 1904) haben gezeigt, daß eine anscheinende Aufhebung der Fluoreszenz einer Flüssigkeit von einer Änderung der Qualität des Fluoreszenzlichtes verursacht werden kann. Bei Erhitzung fluoreszierender Lösungen wird die Farbe des Fluoreszenzlichtes häufig gegen das violette Ende des Spektrums verschoben, und die beiden Verf. suchen hierin die Ursache dessen, daß die recht kräftige violette Fluoreszenz bei dem in Pyridin aufgelösten Akridon bei Erwärmung fast vollständig verschwindet; die Lösung sollte also in diesem Zustand „ultraviolett“ fluoreszieren. Ich habe in Lösungen schwefelsauren Chinins ein zweites Beispiel dieses eigentümlichen Verhältnisses gefunden; die Fluoreszenz verschwindet während der Erwärmung, um sich nach der Abkühlung wiederum in ihrer vollen ursprünglichen Stärke einzustellen. Dichloranthracensulfos. Na-Lösungen verhalten sich nicht in ähnliche Weise, und es ließ sich in den Serum-beigemischten Präparaten keine Fluoreszenz nach Erwärmung auf  $57^{\circ}$  nachweisen. Übrigens spricht nichts dafür, daß eine derartige Änderung der Qualität der Fluoreszenz den durch den Serumzusatz hervorgerufenen Veränderungen zugrunde liegen sollte.



in 1 ccm einer  $\frac{1}{2000}$  Mol. dichloranthracensulfos. Na-Lösung auf, und in Übereinstimmung hiermit wird die Fluoreszenz z. B. in 1 ccm einer  $\frac{1}{10000}$  Mol.-Lösung durch Zusatz von 0,2 ccm Serum aufgehoben. Alle die verschiedenen Seren, deren diesbezügliches Verhältnis ich untersucht habe (Serum von Menschen, Pferd, Ochsen, Schwein, Kaninchen, Ratte), riefen ähnliche Veränderungen der Fluoreszenz in dichl. Na-Lösungen hervor; jedoch machten sich gewisse Unterschiede geltend. Eine derartig verschiedene Wirkung der verschiedenen Seren trat indessen bedeutend kräftiger in Versuchen mit Stoffen der Fluoreszeinreihe hervor, und ich komme deshalb erst bei Beschreibung dieser Versuche zu einer Besprechung derselben. Ein Zusatz anderer kolloider Lösungen (Gummi arabicum, Leim, Stärke) hatte keine Aufhebung der Fluoreszenz der dichl. Na-Lösungen zur Folge.

Die wässerigen dichl. Na-Lösungen verändern nicht in wesentlichem Grade ihre Fluoreszenz durch Zugabe von Alkalien oder Säuren. Dagegen haben Schwankungen in der Alkaleszenz einen außerordentlich großen Einfluß auf die Fluoreszenz in Mischungen von Serum und dichl. Na. Mischt man z. B. eine  $\frac{1}{10000}$  Mol. dichl. Na-Lösung mit ihrem gleichen Volumen Serum, so verliert, wie gesagt, die Lösung vollständig ihre Fähigkeit zu fluoreszieren. Setzt man zu dieser Lösung NaOH oder  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , tritt indessen wiederum eine prachtvolle Fluoreszenz auf. Wird der Lösung bis zum Überschuß freie Säure HCl zugesetzt (positive Reaktion mit Phlorogluzin-Vanillin) so tritt ebenfalls eine kräftige, wenn auch etwas schwächere Fluoreszenz ein.

Ich gehe zur Besprechung der Stoffe der Fluoreszein-gruppe über. Einzelne derselben (z. B. Rose Bengal und Erythrosin) fluoreszieren so schwach, daß sie sich nicht zu Untersuchungen der hier besprochenen Art eignen. Ein großer Teil der übrigen Fluoreszein-Derivate zeichnet sich dagegen durch ihre ungewöhnlich starke Fluoreszenz aus, die sich bei einigen selbst in extremen Verdünnungen hält. In Tetrachlortetrabromfluoreszein-Kalium konnte ich u. a. mit konzentriertem Sonnenlicht noch in Verdünnungen von 1 : 200 000 000 eine deutlich grüne Fluoreszenz hervorrufen.

Der Einfluß der Serumanwesenheit auf die Fluoreszenz erwies sich bei meinen Versuchen als in allem wesentlich gleich-

mäßig gegenüber den verschiedenen Stoffen dieser Gruppe, und ich brauche daher nur die Verhältnisse betreff eines Stoffes z. B. des Eosin-Na (Tetrabromfluoreszein-Na) zu besprechen.

Eosin-Na ist leicht löslich in Wasser, mit roter Farbe und grünlich-gelber Fluoreszenz. Diese ist in Lösungen  $\frac{1}{10\,000}$  bis  $\frac{1}{20\,000}$  Mol. am stärksten, sie läßt sich in diffusem Licht noch in  $\frac{1}{1\,500\,000}$  Mol.-Verdünnungen beobachten, in Sonnenlicht in  $\frac{1}{10\,000\,000}$  Mol.-Verdünnungen und in konzentriertem Sonnenlicht sogar in  $\frac{1}{100\,000\,000}$  Mol.-Verdünnungen.  $\frac{1}{1\,000\,000}$  Mol.-Lösungen sind in durchfallendem Licht vollständig farblos (Reagenzglasversuch).

Beim Vergleich einer Reihe wässriger Eosin-Na-Lösungen (z. B.  $\frac{1}{25}$ ,  $\frac{1}{50}$ ,  $\frac{1}{100}$  Mol. usw.) mit einer entsprechenden Reihe Eosin-Serum-Mischungen, die aus den wässrigen Eosinlösungen durch Beimischung gleicher Teile Pferdeserum hergestellt sind, wird man im Hinblick auf die Fluoreszenzverhältnisse folgendes beobachten können: Die Fluoreszenz ist in allen Serumpräparaten im Verhältnis zu den entsprechenden wässrigen Eosinlösungen bedeutend herabgesetzt. Die Herabsetzung ist jedoch weit stärker in den verdünnten als in den mehr konzentrierten Lösungen ausgeprägt, und in diesen letzten tritt wiederum eine schöne Fluoreszenz ein, sobald sie mit Wasser verdünnt werden. In Verdünnungen von  $\frac{1}{3200}$  Mol.-Eosin-Na und darunter wird die Fluoreszenz in diffusem Tageslicht vollständig durch Zusatz gleicher Teile Serums aufgehoben, und eine Verdünnung mit Wasser ist nicht imstande, sie wiederum hervorzurufen. In konzentriertem Sonnenlicht untersucht, weisen derartige Präparate doch noch eine schwache grünliche Fluoreszenz auf, und diese läßt sich sogar in Mischungen von Serum mit gleichen Teilen einer  $\frac{1}{10\,000}$  Mol. Eosin-Na noch wahrnehmen.

Wiederholt man diese Untersuchungen z. B. mit Schweineserum, so wird sich das Resultat indessen ganz anders gestalten. Der Zusatz des Serums wird auch jetzt eine Schwächung der Fluoreszenz der Eosinlösungen verursachen, jedoch wird diese in keinem der Präparate ganz aufgehoben. Die Fluoreszenzherabsetzung braucht außerdem nicht besonders stark zu sein. Die verschiedenen, von mir zu meinen Versuchen benutzten Seren verhielten sich in dieser Beziehung weit

verschieden, und sogar Versuche mit Seren derselben Tierart konnten recht abweichende Resultate ergeben.

Die Ursache der inkonstanten Wirkungen der verschiedenen Seren muß in den Variationen der „Serum-Alkaleszenz“ gesucht werden. Dies geht erstens aus vergleichenden Versuchen hervor; welche ich mit den Seren von zwei Kaninchen angestellt habe, von denen das eine in den letzten drei Wochen vor dem Aderlaß mit in Wasser aufgeweichtem Brot und Hafer gefüttert war, während das zweite in demselben Zeitraum ausschließlich Grünfutter (Kohlblätter) bekommen hatte. In äquimolekularen Eosin-Lösungen rief das Serum von dem ersten Kaninchen eine bedeutend stärkere Herabsetzung der Fluoreszenz als das Serum von dem zweiten hervor. Zweitens stütze ich meine Auffassung auf folgende Verhältnisse. In einer wässrigen Eosin-Na-Lösung ruft Alkali keine wesentliche Veränderung der Fluoreszenz hervor. Bei Zusatz von Säuren — z. B. HCl — spaltet sich Eosin-Na sofort und die in Wasser unlösliche Eosin-Säure wird als ein rötlicher Bodensatz gefällt; gleichzeitig verschwindet die Fluoreszenz vollständig. Eosinlösungen, zu denen Serum gesetzt ist, verhalten sich ganz anders. Wird einer Mischung von Serum mit gleichen Teilen einer dünnen Eosin-Lösung (z. B.  $\frac{1}{20000}$  Mol.) NaOH oder  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  zugesetzt, so wird die Fluoreszenz wiederum in ihrer vollen Stärke auftreten, gleichviel, ob das betreffende Serum sie im voraus ganz zum Verschwinden gebracht oder ob es sie nur herabgesetzt hatte. Setzt man zu einer ähnlichen Eosin-Serum-Mischung, in welcher die Fluoreszenz nicht aufgehoben ist, tropfenweise eine dünne HCl-Lösung, so wird die Fluoreszenz allmählich abnehmen, um schließlich ganz zu verschwinden. Das Präparat enthält zu diesem Zeitpunkt keinen Überschuß freier Salzsäure. Fährt man mit Tropfenzusatz der HCl fort, so geschieht indessen das merkwürdige, daß die Fluoreszenz wiederum eintritt und daß kein Fällen der Eosinsäure entsteht<sup>1)</sup>. Das Verhältnis ist um so merkwürdiger, da chemisch

---

<sup>1)</sup> Die Rede ist hier nur von Eosinlösungen von weniger als ca.  $\frac{1}{3000}$  Mol. mit gleichen Teilen Serum gemischt. Die Verhältnisse werden betreff der mehr konzentrierten Lösungen in Abschnitt VIII besprochen werden.

reine Eosinsäure in Serum, zu welchem ein Überschuß freier HCl gesetzt ist, unauflöslich ist.

Da eine Zugabe von NaCl zu Lösungen verschiedener fluorezierender Stoffe (schwefelsaures Chinin,  $\gamma$ -Phenylchinaldinchlorid u. a.) die Fluoreszenz in diesen herabsetzt oder aufhebt, so wäre es denkbar, daß die im vorhergehenden erwähnte Fluoreszenzherabsetzung vom Salzgehalt des Serums abhängig sei. Indessen ist dies nicht der Fall, denn selbst starke Salzlösungen lassen die Fluoreszenz unbeeinflusst, sowohl in Lösungen der Derivate des Fluoreszeins wie auch in dichloranthracendisulfosauren Natron-Lösungen.

Daß die Ursache zu den oben geschilderten Phänomenen ebenfalls nicht in den amphoterer Eigenschaften des Serums zu suchen ist, geht aus Versuchen mit anderen amphoterer Elektrolyten (Theobromin, Glykokoll) hervor, mit denen sich keine entsprechenden Reaktionen hervorrufen ließen.

Eine Zufügung verschiedener Kolloide (Lösungen aus Gummi Arabicum, Leim oder Stärke) bewirkt in Eosin-Na-Lösungen nur eine geringe Herabsetzung der Fluoreszenz, und bei Zugabe von Salzsäure zu derartigen Mischungen wird die Eosinsäure ebenso wie in rein wässerigen Lösungen gefällt, indem die Fluoreszenz natürlich gleichzeitig wegfällt.

Hühnereiweiß reagiert dagegen im großen und ganzen in derselben Weise wie Serum gegenüber den erwähnten Farbstoffen; man erzielt jedoch beständig in Versuchen mit Serum bedeutend schönere Resultate als in Versuchen mit Hühnereiweiß.

Neben den oben besprochenen Veränderungen in der Fluoreszenz der Fluoreszeinderivate hat eine Serumhinzusetzung auch leichte Farbenveränderungen in Lösungen dieser Stoffe zur Folge.

Der Farbenveränderung entsprechend ruft der Serumzusatz eine im Spektroskop leicht zu beobachtende Verschiebung der Absorptionslinien der Lösungen gegen den roten Teil des Spektrums hervor. Z. B. haben wässrige Rose Bengal-Lösungen zwei Absorptionsstreifen im gelb-grünen Teil des Spektrums, der eine entspricht einer Wellenbreite von  $548 \mu\mu$ , der andere einer Wellenbreite von  $511 \mu\mu$ . Nach Zusatz von Serum fand ich, daß die Absorptionslinie nach  $562 \mu\mu$  resp.  $525 \mu\mu$  verschoben war.

Bei Hinzusetzung von Serum konnte ich in Tetrachlor-tetrabromfluoreszein-Na- und Eosin-Na-Lösungen ähnliche Verschiebungen der Absorptionsspektren beobachten. Dahingegen veränderte eine Hinzusetzung von Gummi Arabicum nicht das Aussehen der Spektren.

Bei Zusatz von NaOH zu einer Mischung von Eosin-Na und Serum wanderten die Absorptionslinien wiederum auf den Platz zurück, der für das Absorptionsspektrum der wässrigen Eosin-Lösung charakteristisch ist. Bei Hinzusetzung von HCl zeigten die Linien Tendenz zu einer Bewegung in derselben Richtung, sie kehrten jedoch bei weitem nicht zu dem normalen Platz zurück.

Die Resultate der obenstehenden Versuche lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Ein Zusatz von Serum zu Lösungen der hier besprochenen photobiologischen Sensibilisatoren hat eine mehr oder weniger ausgeprägte Herabsetzung der Fluoreszenz derselben zur Folge. Der Grund der Fluoreszenzherabsetzung hängt teilweise von der größeren oder geringeren „Alkaleszenz“ des betreffenden Serums ab, teilweise vom Verdünnungsgrad der Lösungen, teilweise von deren Qualität (in Fluoreszein-Na-Lösungen wird die Fluoreszenz z. B. verhältnismäßig wenig beeinflußt). Das Charakteristische für diese Serum-Farbstoffmischungen ist indessen, daß die Fluoreszenz immer vollständig verschwindet, wenn sie mit HCl neutralisiert werden, und daß ein weiterer Zusatz schwacher Salzsäure wiederum eine Fluoreszenz hervorruft. Besonders merkwürdig ist dieses Verhältnis betreffs der Fluoreszein-Derivate, da diese sonst von starken Säuren augenblicklich gespalten werden. Bei Zusatz von NaOH zu Serum-Farbstoffmischungen kommt die Fluoreszenz beständig wieder in ihrer vollen Stärke zum Vorschein.

Die Serumhinzusetzung ruft außerdem eine geringe Farbenveränderung in den erwähnten Lösungen hervor, und gleichzeitig werden die Absorptionsspektren auf charakteristische Weise verändert.

Bei Zugabe anderer Kolloide (Leim, Gummi Arabicum, Stärke), anderer amphoterer Elektrolyte (Theobromin, Glykokoll) oder NaCl können entsprechende Reaktionen in den fluoreszierenden Lösungen nicht hervorgerufen werden. Dagegen verhält sich das Hühnereiweiß in dieser Beziehung ähnlich wie Serum, wenn auch die Reaktionen bei weitem nicht so schön verlaufen wie in den Versuchen mit Serum.

## VII.

### Über den Einfluß des Serums auf die Diffusionsverhältnisse der photobiologischen Sensibilisatoren.

Ich habe früher (S. 497) hervorgehoben, daß Lösungen der photobiologischen Sensibilisatoren, deren sensibilisierende Fähigkeit gegenüber Paramäcien infolge eines Serumzusatzes gänzlich aufgehoben ist, noch deutliche sensibilisierende Wirkungen in Versuchen mit Lösungen nicht organisierter Stoffe besitzen können, und daß die Ursache wenigstens teilweise darin zu suchen ist, daß in den ersten Versuchen osmotische Verhältnisse große Bedeutung haben, während sie für den Ausfall der letzten Versuche kaum eine Rolle spielen. Um u. a. dieser Hypothese eine experimentelle Basis zu geben, habe ich die untenstehenden Untersuchungen über den Einfluß der Serum-anwesenheit auf die Diffusionsgeschwindigkeit der Sensibilisatoren angestellt. Diese Untersuchungen waren indessen auch in anderer Beziehung von bedeutendem Interesse: Ich habe im vorhergehenden biologisch den Beweis geführt, daß die eingreifenden Wirkungen der Serumhinzusetzung ihre Ursache darin haben müssen, daß die betreffenden photobiologischen Sensibilisatoren mit den Eiweißstoffen des Serums Verbindungen dieser oder jener Art eingehen, und es war schon im voraus eine gewisse Wahrscheinlichkeit dafür vorhanden, daß die Diffusionsuntersuchungen dazu beitragen würden, Klarheit über die Natur dieser Verbindungen zu schaffen.

Zu den Versuchen verwendete ich teilweise selbstverfertigte Dialysatoren mit Membranen aus Hausenblase oder aus Pergament, teilweise fabrikmäßig hergestellte Dialysatoren von

Schleicher und Schüll. Bei den ersten kommt es nicht selten vor, daß — selbst nach einer noch so sorgfältigen Anlegung der Membran und einer anscheinend glücklich gelungenen Umbindung — die Haarrohrkraft doch auf dieser oder jener Stelle Spuren der Lösung zwischen dem Glas und der Membran hinauszwingen wird, ein Fehler, der doch leicht zu kontrollieren ist, wenn man mit gefärbten Lösungen arbeitet. Er ist zu beseitigen, wenn man den Rand des Glases vor Anlegung der Membran z. B. mit Vaseline einfettet, oder indem man die Membran unmittelbar über der Umbindungsstelle abschneidet und hierauf diese ganze Partie z. B. mit Lackfirnis (wenn mit wässrigen Lösungen gearbeitet wird) überpinselt. Um die Dichtigkeit der Dialysatoren zu untersuchen, füllte ich sie bis zum Rand mit Wasser und stellte sie auf ein Stück Filtrierpapier. War innerhalb einer Stunde an keiner Stelle ein Tropfen durchgedrungen, so betrachtete ich den Dialysator als brauchbar.

Die Serum-Beimischung zu den Lösungen der sensibilisierenden Stoffe wurde beständig vor deren Anbringung im Dialysator vorgenommen. Die Flüssigkeitsmenge in den Dialysatoren war in allen Versuchen dieselbe, und sie wurde in der Regel gegen 1,5 Mal größeres Volumen dest. Wasser dialysiert. Die Menge der dialysierten Farbstoffe wurde teils kolorimetrisch, teils — bei den dünnen, farblosen Lösungen — durch Vergleich ihrer Fluoreszenz mit der Fluoreszenz in bekannten wässrigen Lösungen des betreffenden Stoffes bestimmt.

#### Versuch 52.

Eosin-Na. Dialyse durch Hausenblase in 24 Stunden.

$\frac{1}{500}$ Mol. Eosin-Na — 1 Teil	}	$\frac{1}{30000}$ Mol. <sup>1)</sup>
Kaninchen-Serum — 1 Teil		
$\frac{1}{1000}$ Mol. Eosin-Na — 1 Teil	}	$\frac{1}{300000}$ Mol.
Kaninchen-Serum — 1 Teil		
$\frac{1}{2000}$ Mol. Eosin-Na — 1 Teil	}	$\frac{1}{1000000}$ Mol.
Kaninchen-Serum — 1 Teil		

<sup>1)</sup> Die Stärke der wässrigen Lösung des Farbstoffes, der — kolorimetrisch bestimmt — dem Farbstoff außerhalb des Dialysators bei Schluß des Versuchs entspricht.

$\frac{1}{5000}$ Mol. Eosin-Na — 1 Teil	}	$\frac{1}{20000000}$ Mol. (Spur von Fluoreszenz in konzent. Sonnenlicht.
Kaninchen-Serum — 1 Teil		
$\frac{1}{5000}$ Mol. Eosin-Na — 1 Teil	}	$\frac{1}{30000}$ Mol.
Dest. Wasser — 1 Teil		

Der Versuch ergibt, daß der Serumzusatz eine hochgradige Hemmung der Dialyse verursacht, und daß die Dialyse praktisch betrachtet in Eosinlösungen von weniger als  $\frac{1}{2000}$  Mol., zu welchen gleiche Volumina Serums gesetzt sind, gleich Null ist; jedenfalls nähert sich die Langsamkeit, mit welcher das Eosin in diesen Mischungen dialysiert, stark der den Kolloiden eigenen.

Ähnliche Resultate erreichte ich bei Versuchen mit anderen Derivaten des Fluoreszein (Rose Bengal und Tetrachlortetrabromfluoreszein-Na).

#### Versuch 53.

Dichloranthracendisulfosaures Natron. — Dialyse durch Hausenblase in 18 Stunden.

$\frac{1}{300}$ Mol. dichl. Na — 1 Teil	}	$\frac{1}{16000}$ Mol.
Ochsen-Serum — 1 Teil		
$\frac{1}{3000}$ Mol. dichl. Na — 1 Teil	}	$\frac{1}{5000000}$ Mol. (Spur von Fluoreszenz in konz. Sonnenlicht).
Ochsen-Serum — 1 Teil		
$\frac{1}{2000}$ Mol. dichl. Na — 1 Teil	}	$\frac{1}{10000}$ Mol.
Destilliertes Wasser — 1 Teil		

Das dichloranthracendisulfosaure Natron verhält sich also auch in dieser Beziehung ähnlich wie die Stoffe in der Fluoreszeinreihe.

Man achte auf die Übereinstimmung, die sich zwischen den Konzentrationen der Farbstofflösungen findet, welche durch Hinzusetzung gleicher Teile Serums ihre sensibilisierende Fähigkeit gegenüber *Paramaecium caudatum* einbüßen, und der Konzentration der Lösungen, deren osmotischer Druck durch die Serumhinzusetzung auf ein Minimum verringert wird. Es scheint mir, daß diese Übereinstimmung in hohem Grade zum Beweis für die Richtigkeit der oben besprochenen Hypothese spricht.

Vergleichende Versuche mit Seren verschiedener Tierarten ergaben in Analogie mit Sensibilisations- und Fluoreszenzversuchen eine höchst verschiedene Wirkung der verschiedenen Seren.



## Versuch 54.

Eosin-Na. Dialyse durch Pergament in 15 Stunden.

I.	$\frac{1}{1000}$ Mol. Eosin-Na	— 1 Teil	} $\frac{1}{2000000}$ Mol.
	Menschen-Serum	— 1 Teil	
II.	$\frac{1}{1000}$ Mol. Eosin-Na	— 1 Teil	} $\frac{1}{90000}$ Mol.
	Hühner-Serum	— 1 Teil	
III.	$\frac{1}{1000}$ Mol. Eosin-Na	— 1 Teil	} $\frac{1}{300000}$ Mol.
	Kaninchen-Serum	— 1 Teil	
IV.	$\frac{1}{1000}$ Mol. Eosin-Na	— 1 Teil	} $\frac{1}{600000}$ Mol.
	Schweine-Serum	— 1 Teil	
V.	$\frac{1}{1000}$ Mol. Eosin-Na	— 1 Teil	} $\frac{1}{150000}$ Mol.
	Ochsen-Serum	— 1 Teil	

Zur Kontrolle wurde der Versuch mit ganz entsprechenden Mischungen und mit denselben — wohl gereinigten — Dialysatoren wiederholt, indem diese umgetauscht wurden, so daß in jede derselben ein anderes Serum als in dem ersten Versuch kam. Die Resultate stellten sich dieses Mal nach 20 stündiger Dialyse folgendermaßen:

I.	$\frac{1}{1000}$ Mol. Eosin-Na	— 1 Teil	} $\frac{1}{2000000}$ Mol.
	Menschen-Serum	— 1 Teil	
II.	$\frac{1}{1000}$ Mol. Eosin-Na	— 1 Teil	} $\frac{1}{80000}$ Mol.
	Hühner-Serum	— 1 Teil	
III.	$\frac{1}{1000}$ Mol. Eosin-Na	— 1 Teil	} $\frac{1}{350000}$ Mol.
	Kaninchen-Serum	— 1 Teil	
IV.	$\frac{1}{1000}$ Mol. Eosin-Na	— 1 Teil	} $\frac{1}{450000}$ Mol.
	Schweine-Serum	— 1 Teil	
V.	$\frac{1}{1000}$ Mol. Eosin-Na	— 1 Teil	} $\frac{1}{100000}$ Mol.
	Ochsen-Serum	— 1 Teil	

Die Resultate der beiden Versuche stimmen allenfalls genügend gut überein, um die ungleich starken Wirkungen der verschiedenen Seren zu beweisen. Die Unterschiede sind wahrscheinlich auf deren ungleiche „Alkaleszenz“ zurückzuführen; denn ich konnte auch mit Seren derselben Tierart verschiedene Resultate in diesen Diffusionsversuchen erzielen, indem ich vorher durch das Futter die Zusammensetzung des Blutes bei den betreffenden Tieren in verschiedener Weise beeinflußte.

## Versuch 55.

Eosin-Na. Dialyse in 15 Stunden durch Pergament.

Serum A von mit Kohlblättern gefütterten Kaninchen.

Serum B von mit Brot und Hafer gefütterten Kaninchen.

$$\begin{array}{l} \frac{1}{1000} \text{ Mol. Eosin-Na} - 1 \text{ Teil} \\ \text{Kaninchen-Serum A} - 1 \text{ Teil} \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \frac{1}{1000} \text{ Mol. Eosin-Na} - 1 \text{ Teil} \\ \text{Kaninchen-Serum A} - 1 \text{ Teil} \end{array}} \right\} \frac{1}{100000} \text{ Mol.}$$

$$\begin{array}{l} \frac{1}{1000} \text{ Mol. Eosin-Na} - 1 \text{ Teil} \\ \text{Kaninchen-Serum B} - 1 \text{ Teil} \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \frac{1}{1000} \text{ Mol. Eosin-Na} - 1 \text{ Teil} \\ \text{Kaninchen-Serum B} - 1 \text{ Teil} \end{array}} \right\} \frac{1}{350000} \text{ Mol.}$$

Der Versuch wurde mit denselben, jedoch jetzt umgetauschten Dialysatoren wiederholt, und das Resultat wurde dadurch nicht verändert.

Im Anschluß an die obenstehenden Versuche stellte ich folgende Versuchsreihe an.

## Versuch 56.

Eosin-Na. Dialyse in 15 Stunden durch Pergament.

I. Außerhalb des Dialysators: Dest. Wasser —

$$\text{Im Dialysator} \left\{ \begin{array}{l} 4,5 \text{ Teile} \\ \frac{1}{1000} \text{ Mol. Eosin-Na} - 1 \text{ Teil} \\ \text{Dest. Wasser} - 2 \text{ Teile} \end{array} \right\} \frac{1}{10000} \text{ Mol.}$$

II. Außerhalb des Dialysators: Dest. Wasser

$$\text{Im Dialysator} \left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{1000} \text{ Mol. Eosin-Na} - 1 \text{ Teil} \\ \text{Kaninchen-Serum} - 1 \text{ Teil} \\ \text{Dest. Wasser} - 1 \text{ Teil} \end{array} \right\} \frac{1}{350000} \text{ Mol.}$$

III. Außerhalb des Dialysators: Dest. Wasser

$$\text{Im Dialysator} \left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{1000} \text{ Mol. Eosin-Na} - 1 \text{ Teil} \\ \text{Kaninchen-Serum} - 1 \text{ Teil} \\ \text{Na}_2\text{CO}_3 (2\%) - 1 \text{ Teil} \end{array} \right\} \frac{1}{50000} \text{ Mol.}$$

IV. Außerhalb des Dialysators:  $\text{Na}_2\text{CO}_3 (2\%)$

$$\text{Im Dialysator} \left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{1000} \text{ Mol. Eosin-Na} - 1 \text{ Teil} \\ \text{Kaninchen-Serum} - 1 \text{ Teil} \\ \text{Dest. Wasser} - 1 \text{ Teil} \end{array} \right\} \frac{1}{40000} \text{ Mol.}$$

V. Außerhalb des Dialysators: Dest. Wasser

$$\text{Im Dialysator} \left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{1000} \text{ Mol. Eosin-Na} - 1 \text{ Teil} \\ \text{Kaninchen-Serum} - 1 \text{ Teil} \\ \text{HCl} - \text{bis zur Fluoreszenz bei} \\ \text{schwach saurer Reaktion} \end{array} \right\} \div \text{Dialyse.}$$

Der Versuch zeigt, daß ein Zusatz von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  zur Serum-Eosinmischung die Diffusionsgeschwindigkeit des Eosins in hohem Grade fördert, oder vielleicht besser ausgedrückt, daß ein Zusatz von Serum zu Eosin-Na-Lösungen nur in geringem Grad deren Diffusionsfähigkeit beeinflusst, wenn gleichzeitig  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (oder KOH) zugegeben wird.

Da eine Hinzusetzung von HCl in Überschuß — ebenso wohl wie die Hinzusetzung von Alkalien — den Serum-Farbstoffmischungen wiederum ihre Fluoreszenz-Fähigkeit zurückgibt, könnte es von Interesse sein zu untersuchen, ob ein ähnlicher Parallelismus in den Wirkungen mit Rücksicht auf die Diffusionsfähigkeit existiert. Versuch 56 sagt doch nichts Sicheres, denn das Wasser außerhalb des Dialysators wird schnell einen HCl-Gehalt bekommen, welcher bewirken muß, daß das eventuell diffundierende Eosin-Na — vielleicht schon in der Membran — unter Fällen des in Wasser unlöslichen Tetrabromfluoreszein gespalten wird. Ich wiederholte daher die obenstehenden Versuche mit der Änderung, daß die Serumfarbstoffmischungen nicht gegen Wasser sondern gegen Serum derselben Verdünnung wie in der Mischung im Dialysator diffundiert wurden. Außerdem wurden gleich große Mengen HCl resp. KOH zum Serum in und außerhalb der Dialysatoren hinzugefügt. Durch dieses Verfahren wurde das eventuelle Fällen des Eosins verhindert; denn im Überschuß des Serum wird, wie früher erwähnt, das Eosin nicht durch Hinzusetzung von HCl zu schwach saurer Reaktion gefällt.

#### Versuch 57.

Eosin-Na. — Dialyse in 48 Stunden durch Dialysatoren von Schleicher und Schüll.

I. Im Dialys.  $\left\{ \begin{array}{l} \text{Eosin-Na (1 : 5000)} \text{ — 5 ccm} \\ \text{Kaninchenserum} \text{ — 5 ccm} \end{array} \right\} \left\{ \begin{array}{l} \text{schwach fluo-} \\ \text{reszierend} \end{array} \right.$

Außerhalb des Dialysators  $\left\{ \begin{array}{l} \text{Dest. Wasser} \text{ — 5 ccm} \\ \text{Kaninchenserum} \text{ — 5 ccm} \end{array} \right.$

÷ Dialyse.

II. Im Dialys.  $\left\{ \begin{array}{l} \text{Eosin-Na(1:5000)} \text{ — 5 ccm} \\ \text{Kaninchenserum} \text{ — 5 ccm} \\ \text{Kalilauge} \text{ — 5 Tropfen} \end{array} \right\} \left\{ \begin{array}{l} \text{stark fluo-} \\ \text{reszierend} \end{array} \right.$

Außerhalb des Dialys.  $\left\{ \begin{array}{l} \text{Dest. Wasser} \quad \text{— 5 ccm} \\ \text{Kaninchenserum} \quad \text{— 5 ccm} \\ \text{Kalilauge} \quad \text{— 5 Tropfen} \end{array} \right.$   
 Dialyse 1 : 25 000 (stark fluoreszierend).

III. Diesem Präparat wurde gerade soviel Salzsäure zugesetzt, daß die Fluoreszenz in der Serum-Eosinmischung verschwand.

Im Dialys.  $\left\{ \begin{array}{l} \text{Eosin-Na (1 : 5000)} \quad \text{— 5 ccm} \\ \text{Kaninchenserum} \quad \text{— 5 ccm} \\ \text{1/10 norm. HCl} \quad \text{— 3 ccm} \end{array} \right\} \div \text{Fluoreszenz}$   
 Außerhalb des Dialysators  $\left\{ \begin{array}{l} \text{Dest. Wasser} \quad \text{— 5 ccm} \\ \text{Kaninchenserum} \quad \text{— 5 ccm} \\ \text{1/10 norm. HCl.} \quad \text{— 3 ccm} \end{array} \right.$   
 $\div$  Dialyse.

IV. Hinzusetzung von HCl im Überschuß bis zu kräftiger Fluoreszenz bei saurer Reaktion der Serum-Eosinmischung.

Im Dialys.  $\left\{ \begin{array}{l} \text{Eosin-Na (1 : 5000)} \quad \text{— 5 ccm} \\ \text{Kaninchenserum} \quad \text{— 5 ccm} \\ \text{1/10 norm. HCl} \quad \text{— 6 ccm} \end{array} \right\} \text{kräftige Fluoreszenz}$   
 Außerhalb des Dialysators  $\left\{ \begin{array}{l} \text{Dest. Wasser} \quad \text{— 5 ccm} \\ \text{Kaninchenserum} \quad \text{— 5 ccm} \\ \text{1/10 norm. HCl} \quad \text{— 6 ccm} \end{array} \right.$   
 $\div$  Dialyse.

Die Versuche zeigen, daß, während eine Hinzusetzung sowohl von Alkalien wie auch von Säuren (im Überschuß) die Fluoreszenz der Serum-Farbstofflösungen erhöht, die Diffusionsfähigkeit der Farbstoffe in diesen Lösungen nur durch Hinzusetzung von Alkalien erhöht wird.

Daß Eosin-Na in wässrigen Lösungen eben sowohl gegen Serum wie gegen Wasser zu diffundieren vermag, geht aus folgenden Versuchen hervor.

#### Versuch 58.

Eosin-Na. Dialyse in 20 Stunden durch Dialysatoren von Schleicher und Schüll.

Im Dialysator: Eosin-Na (1 : 10000) — 1 Teil.

Außerhalb des Dialysators: Kaninchenserum — 1 Teil.

Dialyse: 1 : 20000 (+ Fluoreszenz).

In einer Abhandlung über Einträufelung von Fluoreszeinkaliumlösungen in den Konjunktivalsack als diagnostisches

Hilfsmittel bei Kornealeiden erwähnt Bihler<sup>1)</sup>, daß ein Zusatz von Soda zu wässerigen Fluoreszein-Kaliumlösungen deren Färbkraft und Diffusionsfähigkeit erhöht — und bei vergleichenden Diffusionsversuchen mit wässerigen Eosin-Na-Lösungen mit und ohne Hinzusetzung von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  konnte ich ebenfalls betreff dieses Stoffes einen deutlichen Unterschied der Diffusionsgeschwindigkeit in der angegebenen Richtung konstatieren. Inwiefern angenommen werden muß, daß für die Resultate dieser Versuche und der Resultate von Versuch 56: III und IV sowie Versuch 57: II ein und dieselbe Ursache zugrunde liegt, möchte ich mich nicht näher aussprechen; jedoch verdient es hervorgehoben zu werden, daß die Erhöhung der Diffusionsgeschwindigkeit, welche die Hinzusetzung von Alkali (besonders Kali- oder Natronlauge) in den Serum-Farbstoffmischungen hervorruft, erstens viele Male größer als diejenige ist, welche die Sodahinzusetzung in den wässerigen Lösungen der Farbstoffe erzeugt, und daß sie zweitens nur als ein einzelnes Glied in der Reihe von Veränderungen zu betrachten ist, welche die Alkali-Hinzusetzung infolge des vorher mitgeteilten in den Eigenschaften der Serumfarbstoffmischungen hervorruft.

Daß sich die geringe Dialyse in den Serumpräparaten keineswegs allein durch die höhere Viskosität in diesen Präparaten, oder durch die kolloiden Eigenschaften des Serums erklären läßt, geht mit größter Deutlichkeit aus untenstehenden Versuchen mit Gummi arabicum und Leim in Lösungen von ungefähr gleicher Viskosität wie die des Serums (mit Hilfe von Ostwalds Apparat bestimmt) hervor.

#### Versuch 59.

Tetrachlortetrabromfluoreszein-Na. ÷ Dialyse durch  
Hausenblase in 24 Stunden.

I.	$\frac{1}{2000}$ Mol Tetrchl. Na	— 1 Teil	}	$\frac{1}{10000}$ Mol.
	Dest. Wasser	— 1 Teil		
II.	$\frac{1}{2000}$ Mol. Tetrchl. Na	— 1 Teil	}	$\frac{1}{500000}$ Mol.
	Dest. Wasser	— 1 Teil		

---

<sup>1)</sup> Bihler, W., Zur Diagnose von Endothelerkrankungen der Hornhaut mittels Fluoreszein, insbesondere sympathischer Ophthalmie. Münchener med. Wochenschr. Nr. 32. 1899.

- III.  $\frac{1}{2000}$  Mol. Tetrachl. Na — 1 Teil }  $\frac{1}{15000}$  Mol.  
 Gummi arabicum (2 %) — 1 Teil }
- IV.  $\frac{1}{2000}$  Mol. Tetrachl. Na — 1 Teil }  $\frac{1}{12000}$  Mol.  
 Leimlösung (2 %) — 1 Teil }

In dieser, ebenso wie in den im vorhergehenden besprochenen Versuchsreihen zeigt es sich hingegen, daß Hühnereiweiß eine ähnliche Wirkung wie Serum besitzt. Die Wirkung ist jedoch bei dem Hühnereiweiß bedeutend schwächer und weniger konstant als bei dem Serum.

#### Versuch 60.

Eosin-Na — Hühnereiweiß (geschlagen und filtriert). —  
 Dialyse in 24 Stunden durch Dialysatoren von Schleicher  
 und Schüll.

- I.  $\frac{1}{1000}$  Mol. Eosin-Na — 1 Teil }  $\frac{1}{8000}$  Mol.  
 Dest. Wasser — 1 Teil }
- II.  $\frac{1}{1000}$  Mol. Eosin-Na — 1 Teil }  $\frac{1}{200000}$  Mol.  
 Kaninchenserum — 1 Teil }
- III.  $\frac{1}{1000}$  Mol. Eosin-Na — 1 Teil }  $\frac{1}{40000}$  Mol.  
 Hühnereiweiß — 1 Teil }

Die Resultate der Diffusionsuntersuchungen lassen sich derart zusammenfassen:

Die Diffusionsgeschwindigkeit der hier besprochenen sensibilisierenden Stoffe wird in dem Augenblick außerordentlich herabgesetzt, wo ihre wässrigen Lösungen mit Serum gemischt werden. — Die durch den Serum-Zusatz bedingte Herabsetzung der Diffusionsgeschwindigkeit ist geringer, je größer die „Alkalieszenz“ des betreffenden Serums ist, gleichviel ob diese auf den natürlichen  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Gehalt des Serums zurückzuführen, oder in vitro durch Hinzusetzung von Alkali erhöht ist.

Hühnereiweiß verhält sich, was dies anbetrifft, ähnlich wie Serum, wirkt jedoch bedeutend schwächer. Andere Kolloide (Leim, Gummi arabicum) haben keinen Einfluß auf die Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoffe außer demjenigen, den die erhöhte Viskosität zur Folge hat.

## VIII.

**Chemische Reaktionen zwischen photobiologische Sensibilisatoren und den Eiweißstoffen des Serums.**

In den vorhergehenden Abschnitten ist gezeigt worden, wie ein Serumzusatz zu Lösungen einer Reihe verschiedenen chemischen Gruppen angehörenden sensibilisierenden Stoffen sowohl betreffs der Eigentümlichkeiten des Serums wie auch die der betreffenden Sensibilisatoren eingreifend verändern kann. Was das Serum anbelangt, so wird dessen Koagulationsfähigkeit verändert, und dessen Giftigkeit gegenüber Paramäcien (die Alexinwirkung) wird verringert oder aufgehoben. Was die Sensibilisatoren anbetrifft, so werden deren Toxizität und Sensibilisationsfähigkeit verringert oder aufgehoben und bezüglich deren Fluoreszenz, spektralen Absorption und Diffusionsverhältnisse treten bedeutende Veränderungen ein. Es geht ferner aus meinen Untersuchungen hervor, daß diese gegenseitigen Einwirkungen vom Eiweißgehalt des Serums bedingt werden. Erstens ist es nämlich nur denkbar, daß Veränderungen der Eiweißstoffe des Serums den Veränderungen der Koagulationsfähigkeit und Alexinwirkung des Blutes zugrunde liegen; zweitens ruft Serum nach Fällen und Abfiltration seiner Albuminstoffe nicht die früher erwähnten Veränderungen in Lösungen sensibilisierender Stoffe hervor, und drittens lassen sich diese Veränderungen nicht allein durch Serumbeimischung sondern auch durch Hinzusetzung anderer eiweißhaltiger Lösungen (Hühnereiweiß) hervorrufen.

Zwischen allen den erwähnten Reaktionen ist ein so ausgeprägter Parallelismus, daß sie wahrscheinlich ein und dieselbe Ursache haben müssen, und diese ist darin zu suchen, daß die Eiweißstoffe mit den betreffenden Sensibilisatoren Verbindungen mit ganz anderen Eigenschaften als die der zwei Komponenten eingehen.

Es sind in den letzten Jahren — besonders seitens der histologischen Farbentechniker — eine Anzahl interessanter Untersuchungen über die Eiweißverbindungen der Anilinfarbstoffe erschienen. Ich verweise, ohne auf eine ausführliche

Erörterung dieser Literatur einzugehen, auf Mathews<sup>1)</sup> und Heidenhains<sup>2)</sup> grundlegende Arbeiten. Der erste Verf. wies nach, daß Eiweiß sowohl mit Farbsäuren wie auch mit Farbbasen Salze bildet, und Heidenhain erweiterte später unsere Kenntnis bezüglich dieser Verbindungen durch umfassende Untersuchungen; gleichfalls wies er ihre theoretische und praktische Bedeutung für die histologische Färbetechnik nach, ein Gebiet, das Bethe<sup>3)</sup> in einer vor kurzem erschienenen Arbeit weiter bearbeitet hat.

Die Eiweißverbindungen mit Farbsäuren resp. Farbbasen illustriert Heidenhain besonders schön, indem er Beispiele solcher Fälle vorführt in denen die freien Farbsäuren resp. Farbbasen eine andere Farbe als ihre Salze besitzen. Die freie Nilblaubase ist z. B. rot, während deren Salze blaugefärbt sind, und wird der Base Eiweiß zugesetzt so tritt die blaue Farbe ebenso wie bei Hinzusetzung von Säuren ein. Mit Kongorot verhält es sich umgekehrt, indem die blaue Kongosäure durch Hinzusetzung von Eiweiß rot gefärbt wird.

Bezüglich der Auffassung der Natur dieser Verbindungen herrscht Uneinigkeit unter denen, die sich mit derartigen Untersuchungen beschäftigt haben. Einige fassen sie als echte chemische Verbindungen auf, während von anderer Seite behauptet wird, daß wir hier Phänomenen rein adsorptiver Natur gegenüberstehen. Raehlmann<sup>4)</sup>, der vor kurzem die Frage

<sup>1)</sup> Mathews, A., A contribution to the chemistry of cytological staining. American Journal of Physiology. 1898.

<sup>2)</sup> Heidenhain, M., Über chemische Umsetzungen zwischen Eiweißkörpern und Anilinfarben. Arch. f. d. ges. Physiologie **90**. 1902.

Neue Versuche über die chemischen Umsetzungen zwischen Eiweißkörpern und Anilinfarben, insbesondere unter Benutzung der Dialyse. Arch. f. d. ges. Physiologie **96**. 1903.

Über chemische Anfärbung mikroskopischer Schnitte und fester Eiweißkörper. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie u. mikroskop. Technik **19**. 1902.

<sup>3)</sup> Bethe, A., Die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf die Färbung und Färbbarkeit tierischer Gewebe. Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie **6**, 399. 1905.

<sup>4)</sup> Raehlmann, E., Neue ultramikroskopische Untersuchungen über Eiweiß, organische Farbstoffe, über deren Verbindungen und über die Färbung organischer Gewebe. Arch. f. die ges. Physiologie **112**. 1906.



durch ultra-mikroskopische Untersuchungen zu lösen suchte, nimmt eine Zwischenstellung ein.

Ich beschreibe in folgendem einige Reaktionen, welche neue Tatsachen in betreff der chemischen und optischen Eigentümlichkeiten dieser Verbindungen geben.

Stellt man eine Reihe Eosin-Na-Lösungen von  $\frac{1}{25}$ ,  $\frac{1}{50}$ ,  $\frac{1}{100}$  Mol. usw. her, und mischt jede dieser Lösungen mit ihrem gleichen Kubikinhalte Serum, so wird eine Hinzusetzung von Säure folgende Reaktionen in den verschiedenen Präparaten hervorrufen.

$\frac{1}{25}$  Mol. Eosin-Na + Serum  $\bar{a}\bar{a}$  partes gibt bei Zuträufelung verdünnter Salzsäure eine Fällung einer voluminösen Masse, die, wenn die Fällung ihr Maximum erreicht hat, die ganze Flüssigkeitsmenge gelatiniert, so daß man das Reagenzglas wenden kann, ohne daß der Inhalt ausfließt. Eine ähnliche Fällung erzielt man indessen durch Hinzusetzung von Säure zu konzentrierten wässerigen Eosin-Natrium-Lösungen, indem diese gespalten werden und die in Wasser unlösliche Eosinsäure gefällt wird. Der Unterschied tritt erst bei weiterer Hinzusetzung von HCl zum Vorschein. Während die Eosinsäure hiervon nicht beeinflusst wird, löst sich der Bodensatz im Serumpräparat wiederum klar auf. Die entstandene Lösung ist nicht fluoreszierend, selbst nicht nach Verdünnung mit Wasser. Setzt man dahingegen Serum hinzu, so entsteht die Eosinfluoreszenz, selbst bei saurer Reaktion.

Lösungen von  $\frac{1}{50}$  und  $\frac{1}{100}$  Mol. Eosin-Na + Serum  $\bar{a}\bar{a}$  partes geben bei HCl Hinzuträufelung ebenfalls Fällungen, die jedoch weniger stark als die oben erwähnten sind. Bei Hinzusetzung eines Überschusses von Salzsäure werden auch diese Bodensätze aufgelöst, jedoch mit Fluoreszenz, und diese ist alsdann in dem dünnsten Eosinpräparat am stärksten, selbst wenn beide Lösungen derartig mit Wasser verdünnt werden, daß der prozentische Eosin Gehalt derselbe wird.

Die dünneren Eosin-Serumpräparate geben bei Hinzusetzung von HCl geringere und geringere Fällungen, und in Lösungen von ca.  $\frac{1}{3000}$  Mol. Eosin-Na + Serum  $\bar{a}\bar{a}$  partes ruft die Säurebeimischung überhaupt keine sichtbare Fällung hervor. Dahingegen verschwindet die Fluoreszenz auch hier vollständig, jedoch kehrt sie in diesen Präparaten bei Hinzusetzung von HCl in

Überschuß wieder in ihrer vollen Stärke zurück. Die Fähigkeit der Eosin-Serummischungen zu fluoreszieren hängt also von dem Mengenverhältnis zwischen Eosin und Serum ab, indem ein Überschuß des letzteren für das Eintreten der Fluoreszenz notwendig ist.

Es wird von demselben Mengenverhältnis abhängen, inwiefern sich der gefällte Bodensatz wiederum bei weiterer HCl-Hinzusetzung vollständig auflösen wird oder nicht. Derart erfordern 5 ccm einer  $\frac{1}{1000}$  Mol. Eosin-Na-Lösung ca. zwei Tropfen Serum, damit sich der durch HCl-Hinzusetzung entstandene Bodensatz wiederum in HCl-Überschuß klar auflösen soll. — 5 ccm einer  $\frac{1}{25}$  Mol. Eosin-Na-Lösung erfordern ungefähr 3 ccm Serum. Bei Hinzusetzung geringerer Mengen wird sich der Bodensatz nur partiell auflösen.

Ich erwähnte, daß die von der HCl-Hinzusetzung in Eosin-Serummischungen hervorgerufenen Fällungen stark mit dem Verdünnungsgrad des Eosins abnehmen; dies ist nicht nur auf die absolute Verminderung des Eosingehalts der Präparate zurückzuführen, sondern auch auf den Umstand, daß der Bodensatz in Überschuß von Serum selbst bei neutraler Reaktion löslich ist. Dies geht erstens daraus hervor, daß die HCl-Hinzusetzung überhaupt keine Fällungen in Eosin-Serummischungen mit einem verhältnismäßig geringen Eosingehalt z. B.  $\frac{1}{3000}$  Mol. Eosin-Na + Serum  $\bar{a}\bar{a}$  partes hervorruft. Es geht zweitens daraus hervor, daß bei Hinzusetzung steigender Mengen Serums zu gleich großen Mengen Eosin-Na-Lösung derselben Konzentration, die durch HCl Hinzusetzung erzeugte Fällung mit der steigenden Serummenge stark abnehmen wird, um schließlich gänzlich auszubleiben.

Folgender Versuch ist auch in diesem Zusammenhang von Interesse:

Es werden folgende Mischungen von Serum mit gleichem Volumen Eosin-Na-Lösungen abnehmender Konzentration hergestellt.

I.	25 ccm Pferdeserum	+	25 ccm einer	$\frac{1}{25}$ Mol. Eosin Na
II.	25 "	"	+	25 " " $\frac{1}{50}$ " "
III.	25 "	"	+	25 " " $\frac{1}{100}$ " "
IV.	25 "	"	+	25 " " $\frac{1}{200}$ " "

Den vier Präparaten werden HCl zugesetzt bis zur maximalen Fällung.

I.	gibt	maximale	Fällung	mit	2,6	ccm	normal.	HCl
II.	"	"	"	"	2,0	"	"	"
III.	"	"	"	"	1,3	"	"	"
IV.	"	"	"	"	0,9	"	"	"

Die Präparate wurden darauf in zylindrischen Gläsern zentrifugiert.

- In I. nimmt der Bodensatz einen ebenso großen Kubikinhalte wie die Flüssigkeitssäule ein.  
 " II. " " " " einen halb so großen Kubikinhalte wie die Flüssigkeitssäule ein.  
 " III. nimmt der Bodensatz  $\frac{1}{6}$  der Höhe der Flüssigkeitssäule ein.  
 " IV. " " " "  $\frac{1}{30}$  " " " " " "

In I. ist die obenstehende Flüssigkeit klar, leicht gelblich und sehr schwach fluoreszierend. Albumin ließ sich weder durch Hellers Probe mit absolutem Alkohol noch mit Essigsäure-Ferrocyankalium nachweisen. Bei Verdünnung mit Wasser entsteht keine Fällung.

In II. ist die zentrifugierte Flüssigkeit klar, schwach rötlich eosingefärbt, und sie enthält Albumen, jedoch in geringer Menge.

In III und IV ist die zentrifugierte Flüssigkeit klar, intensiv rot und gibt eine sehr kräftige Albuminreaktion.

Die klaren eosingefärbten, nicht fluoreszierenden Flüssigkeiten von II, III und IV geben bei Verdünnung mit destilliertem Wasser eine Fällung, jedoch wird der gefällte Bodensatz bei Hinzusetzung von dünner HCl sowie bei Hinzusetzung von Alkali wiederum aufgelöst, in beiden Fällen mit Fluoreszenz.

Die zur Hervorrufung einer Maximal-Fällung in einer Eosin-Serummischung erforderliche Säuremenge, sowie die Menge, welche erforderlich ist, um das Gefällte wiederum in Lösung zu bringen, hängt teils von dem Serumgehalt, teils von dem Eosin-Na-Gehalt der Mischung ab. Derart verbrauchte ich — um eine Maximal-Fällung hervorzurufen — in

2 ccm	$\frac{1}{100}$ Mol. Eosin-Na	+ 0,25 ccm Serum	- 7 Tropf.	$\frac{1}{10}$ norm. HCl			
2 "	" "	+ 0,5 "	" "	- 10 "	" "	" "	" "
2 "	" "	+ 1,0 "	" "	- 15 "	" "	" "	" "
2 "	" "	+ 2,0 "	" "	- 30 "	" "	" "	" "
2 "	" "	+ 3,0 "	" "	- 45 "	" "	" "	" "

Umgekehrt brauchte ich zu

2 ccm	$\frac{1}{3200}$ Mol. Eosin-Na	+ 2 ccm Serum	- 16 Tropfen	norm. HCl			
2 "	$\frac{1}{1600}$ "	+ 2 "	" "	- 18 "	" "	" "	" "
2 "	$\frac{1}{800}$ "	+ 2 "	" "	- 21 "	" "	" "	" "
2 "	$\frac{1}{400}$ "	+ 2 "	" "	- 23 "	" "	" "	" "
2 "	$\frac{1}{200}$ "	+ 2 "	" "	- 26 "	" "	" "	" "
2 "	$\frac{1}{100}$ "	+ 2 "	" "	- 30 "	" "	" "	" "

Der Versuch deutet an, daß die Fällung erst allmählich mit der Spaltung des Eosinsalzes durch die hinzugesetzte Salzsäure eintritt.

Die früher erwähnten Mischungen von Serum mit gleichem Volumen Eosin-Na-Lösungen abnehmender Konzentration ergeben beim Kochen keine Koagulation in den Präparaten mit großem Eosin-Na-Gehalt, eine leichte Trübung entsteht erst in der Mischung: Serum +  $\frac{1}{200}$  Mol. Eosin-Na ää. In den nachfolgenden Mischungen erhält man beim Kochen eine stärkere und stärkere Fällung.

Das in konzentrierten Eosin-Serummischungen bei HCl-Hinzusetzung gefällte Eosin-Albumin ist infolge der oben beschriebenen Reaktionen in Serum löslich — sowohl bei alkalischer Reaktion (+ Fluoreszenz) wie bei neutraler ( $\div$  Fluoreszenz) und saurer Reaktion (+ Fluoreszenz); es ist ferner unlöslich in Wasser, jedoch löslich in Alkali (+ Fluoreszenz) und in dünner Salzsäure ( $\div$  Fluoreszenz). Es wird durch Auswässerung mit schwefelsaurem Ammoniak aus seinen Lösungen gefällt.

Ich fällte, um die Eigenschaften des Eosin-Albumins näher zu untersuchen, eine Mischung von Serum +  $\frac{1}{25}$  Mol. Eosin-Na ää partes, durch Hinzusetzung von HCl; nach Zentrifugierung wurde die obenstehende Flüssigkeit abgegossen, und danach der rote, pastöse Bodensatz mit destilliertem Wasser angerührt, wiederum zentrifugiert, ausgewaschen usw. Es zeigte sich, daß

das Auswaschungswasser beständig, selbst nach zehnmal wiederholter Auswaschung, ganz schwach eosingefärbt und fluoreszierend war. Die Masse ließ sich nach Eintrocknung im Exsikkator, im Porzellanmörser zu einem feinen, scharlachroten, amorphen Pulver verreiben.

Dies ausgewaschene, getrocknete und pulverisierte Eosin-Albumin ist etwas schwerer löslich als das frischgefällte Präparat; jedoch löst es sich mit großer Leichtigkeit in Alkali auf. Wird das Präparat mit Äther behandelt, so geht nur eine geringe Menge Eosinsäure in diesen über; denn beim Schütteln des abgehobenen Äthers mit NaOH-Lösung zeigte es sich, daß diese nur schwach eosingefärbt und fluoreszierend war. Das Eosin-Albumin wird von starker Salzsäure — schon von normaler HCl-Lösung — gespalten, indem sich Eosinsäure bildet, die sowohl in Wasser wie auch in Serum unlöslich ist.

Ich schließe mit der Besprechung einiger quantitativer N-Bestimmungen fraktionierter Fällungen des Eosin-Albumins.

Einer Mischung von 40 ccm Schweineserum + 50 ccm  $\frac{1}{25}$  Mol. Eosin-Na werden 4,4 ccm normaler HCl-Lösung zugesetzt, wodurch eine kräftige, jedoch unvollkommene Fällung entsteht. Nach Zentrifugierung wird die über dem Bodensatz stehende Flüssigkeit abgegossen und zu dieser wird wiederum Salzsäure bis zu maximaler Fällung gesetzt. Die Bodensätze der zwei Fraktionen: I und II werden wiederholt mit destilliertem Wasser ausgewaschen und danach im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Die eingetrockneten Krusten werden in Porzellanmörsern pulverisiert, wonach der Trockenprozeß bis zur Gewichtskonstanz fortgesetzt wurde.

Von jedem der zwei Präparate wurden darauf zwei N-Analysen nach Kjeldahl mit folgendem Resultat vorgenommen:

	I. Kjeldahl-Bestimmung	II. Kjeldahl-Bestimmung	Mittelwert
Fraktion I . .	12,26 %	12,35 %	12,31 %
Fraktion II . .	11,71 %	11,54 %	11,63 %
Differenz . . .	0,55 %	0,81 %	0,68 %

In diesem Versuch enthält also Fraktion I ca. 0,68% N mehr als Fraktion II. Hieraus darf man doch kaum auf den

nichtchemischen Charakter der Verbindung schließen, denn der Versuch hat den Fehler, daß das Verhältnis zwischen Eosin-Na-Gehalt und Serum-Gehalt in der Mischung, in welcher die fraktionierten Fällungen vorgenommen wurden, willkürlich gewählt ist, und ist z. B. die Menge des Eosin-Na größer als die gewesen, welche der Eiweißstoff der Mischung zu binden vermag, so wird in Fraktion II wahrscheinlich eine Beimischung stickstofffreier Eosinsäure entstanden sein, wodurch ein geringerer N-Gehalt in dem zuletzt gefällten Eosin-Albumin vorgetäuscht werden wird. Der Fehler wäre vielleicht zu vermeiden, falls man vor der N-Analyse die getrockneten Präparate mit Äther behandelt hätte, um dadurch die eventuell vorhandene Eosinsäure zu entfernen.

1,083 g des im Vakuum über  $H_2SO_4$  zur Gewichtskonstanz getrockneten Eosin-Albumins wird auf  $105^\circ$  Celsius erwärmt, bis wiederum Gewichtskonstanz eintritt. Das Gewicht war dann 1,059 g, die Differenz beträgt 0,024 g. Für 1 g Substanz berechnet, wird die Differenz 0,0222 g.

Ganz entsprechende Reaktionen, wie die, welche ich im vorhergehenden betreff des Eosin-Natriums beschrieben habe, geben sämtliche Salze der Fluoreszeinreihe, sowie verschiedene andere der im vorhergehenden besprochenen Sensibilisatoren. Ganz entsprechend verhalten sich eine Reihe Anilinfarbstoffe, welche keine photobiologisch sensibilisierenden Eigenschaften besitzen (z. B. Fuchsin und das Ehrlichsche Trypanrot). Die Albuminverbindungen haben ungefähr dieselbe Farbe wie die betreffenden Salze, z. B. ist das dichloranthracendisulfosaure Albumin ein gelbes amorphes Pulver, welches einen ca. 9,27% N-Gehalt besitzt.

Es ist wahrscheinlich, daß alle Farbsäuren ähnliche Verbindungen mit den Albuminstoffen des Blutes eingehen. Man wird sich in jedem einzelnen Falle leicht davon überzeugen können, indem man z. B. eine 1%ige wässrige Lösung des betreffenden Farbstoffes mit seinem gleichen Volumen Serum mischt. Ruft eine Hinzuträufelung verdünnter HCl einen voluminösen Bodensatz hervor, der bei weiterer HCl-Hinzusetzung wiederum aufgelöst wird, so ist die Sache damit entschieden. Handelt es sich um einen in wässriger Lösung fluoreszierenden Stoff, so kann man auch eine dünne, stark fluoreszierende

Lösung wählen; bei Serumbeimischung zu derselben wird die Fluoreszenz geschwächt werden, und sie soll bei Hinzuträufelung von verdünnter HCl vollständig verschwinden; bei fortgesetzter Hinzuträufelung von HCl — oder Hinzusetzung von Alkali — soll die Fluoreszenz wiederum eintreten.

Wie es aus den speziellen Untersuchungen in den vorhergehenden Abschnitten hervorgeht, besitzen die Anilin-Albumine Eigenschaften, welche in vielen Beziehungen weit von denen verschieden sind, die die zwei Komponenten auszeichnen, — ein Umstand, der nicht allein für die histologische Färbungstechnik eine bedeutende Rolle spielt — was Heidenhain schon gezeigt hat — der aber auch jedesmal in Betracht zu ziehen ist, wenn diese Farbstoffe aus experimentellen oder therapeutischen Gründen gegenüber warmblütigen — möglicherweise auch kaltblütigen — Tieren in Anwendung gebracht werden. Es ist indessen daran zu denken, daß die Farbstoff-Albumine besonders lose Verbindungen sind, welche von der alkalischen, neutralen oder sauren Reaktion des Milieus ausschlaggebend beeinflusst werden, und welche sich im Organismus recht schnell spalten, indem der Farbstoff als solcher durch Nieren und Leber ausgeschieden wird.

Man findet in der Literatur des letzten Jahres einige Untersuchungsreihen, für deren Resultate die hier erwähnten Verhältnisse zweifellos entscheidend gewesen sind:

Beim Studium der Wirkung der fluoreszierenden Stoffe auf Toxine fanden Jodlbauer und v. Tappeiner<sup>1)</sup>, daß eine Eosin- oder dichloranthracendisulfosaure Na-Beimischung zu Diphtherie- und Tetanustoxin deren toxischen Eigenschaften herabsetzt, selbst wenn die betreffenden Mischungen vor der Injektion in die Versuchstiere gegen die Einwirkung des Lichtes geschützt werden. — Die Verff. nehmen an, daß die verhältnismäßig geringe Beschädigung der betreffenden Toxine in den Tieren nach der Injektion eingetreten ist, da sie in Käfigen

---

<sup>1)</sup> A. Jodlbauer und H. v. Tappeiner, Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Toxine. Deutsch. Arch. f. klin. Medizin **85**, 399. 1905.

Jodlbauer, A., Weitere Untersuchungen, ob eine „Dunkelwirkung“ der fluoreszierenden Stoffe statthat. Deutsch. Arch. f. klin. Medizin **85**, 395. 1905.

gehalten waren, zu denen mäßiges zerstreutes Licht gelangen konnte. Es sollte sich also hier um eine schwache Lichtwirkung gegenüber dem sensibilisierten Toxin handeln. Diese naheliegende Erklärung verliert doch etwas an Wahrscheinlichkeit, wenn man bedenkt, daß die Meerschweinchen nur verhältnismäßig sehr schwachem Licht ausgesetzt waren, daß die Tiere außerdem nicht enthaart waren, und daß die Toxizitäts-herabsetzung selbst unter den für die Lichtwirkung günstigsten Bedingungen (direktes Sonnenlicht, Enthaarung der Tiere), nach den Untersuchungen derselben Verfasser nicht sonderlich groß ist. — Außerdem haben Flexner und Noguchi<sup>1)</sup> später nachgewiesen — jedoch unabhängig von den oben erwähnten Untersuchungen —, daß starke Eosinlösungen auch im Dunkeln eine schwächende Einwirkung auf Tetanustoxin besitzen.

Ich habe selbst eine Reihe Versuche teils mit Rizin, teils mit Diphtherietoxin<sup>2)</sup> gemacht. Nach vorausgehender, im Dunkeln vorgenommener Beimischung starker Eosinlösungen wurden die Toxine subkutan auf Meerschweinchen in Mengen von 1, 2, 3, 4 und 5mal tödlicher Dosis injiziert. Obwohl die Versuchstiere in Dunkel gehalten wurden, erwies sich eine deutliche — wenn auch nicht bedeutende — Herabsetzung der toxischen Wirkung im Vergleich mit der Wirkung der nicht-Eosinbeigemischten Toxine auf die Kontrolltiere.

Die Ursache zur Toxizitätsherabsetzung ist wahrscheinlich (vergleiche die Alexinversuche in Abschnitt II) darin zu suchen, daß die Toxine mit Farbsäuren (in casu Eosinsäure) relativ ungiftige Verbindungen eingehen. Ist die Toxizitätsherabsetzung jedoch — trotz einer Farbsäure-Beimischung in Überschuß zu dem betreffenden Toxin — nur verhältnismäßig gering, so läßt sich dies durch die geringe Stabilität der Verbindungen erklären, indem der Organismus das Eosin als solches ausscheidet, während das allmählich freigemachte Toxin im Organismus zurückgehalten wird, wo es alsdann seine deletäre Wirkung ausüben kann.

---

<sup>1)</sup> Flexner and Noguchi, The effect of eosin upon tetanus toxin and upon tetanus in rats and guineapigs. *Journal of experimental Medicine*. Vol. VIII. Jan. 1906.

<sup>2)</sup> Mir vom „Statens Seruminstitut“ in Kopenhagen gütigst überlassen.



### Résumé.

1. Rote Blutkörperchen werden zerstört, wenn man sie mit intensivem Licht belichtet, das reich an kurzwelligem Strahlen ist. Die Ursache dessen, daß die früheren Untersucher negative Resultate erzielt haben, ist vor allem auf die Anwendung ungenügend starken Lichtes zurückzuführen.

2. Der für Paramäcien giftige Stoff (Alexin), der in gewöhnlichem Blutserum enthalten ist, wird vernichtet, wenn er der Einwirkung ultra-violetten Lichtes ausgesetzt wird. Er läßt sich außerdem gegenüber mehr langwelligem Strahlen sensibilisieren.

3. Ein Zusatz verschiedener photobiologischer Sensibilisatoren (Derivate des Fluoreszeins, dichloranthracendisulfosaures Natron usw.) zum Blut warmblütiger Tiere zieht folgende Veränderungen der Eigenschaften des Blutes und der betreffenden Sensibilisatoren nach sich:

- a) Die Koagulationsfähigkeit des Blutes wird aufgehoben resp. herabgesetzt, gleichviel, ob die Hinzusetzung in corpore oder in vitro geschieht.
- b) Die Alexinwirkung des Serums gegenüber Paramäcien wird aufgehoben resp. herabgesetzt, selbst wenn die Präparate gegen die Einwirkung des Lichtes geschützt werden.
- c) Die Toxizität der sensibilisierenden Stoffe wird aufgehoben resp. herabgesetzt.
- d) Die spezifische Wirkung der sensibilisierenden Stoffe wird sowohl gegenüber Mikroorganismen und tierischen Gewebezellen, wie auch gegenüber Fermenten, Toxinen und Alexinen aufgehoben resp. herabgesetzt. In Versuchen mit zellulären Reagenzien tritt die Herabsetzung bedeutend kräftiger hervor als in Versuchen mit Lösungen nicht organisierter Stoffe. Die diesbezügliche Ursache ist darin zu suchen, daß die Diffusionsgeschwindigkeit der sensibilisierenden Stoffe für den Ausfall der erstgenannten Versuche große Bedeutung besitzt, während sie keine Rolle für den

Ausfall der letztgenannten spielt — in Verbindung damit, daß:

- e) Die physikalischen Eigenschaften der sensibilisierenden Stoffe (die Diffusionsfähigkeit) verändert werden. —
- f) In den optischen Eigentümlichkeiten (Fluoreszenz- und Absorptionsverhältnisse) der sensibilisierenden Stoffe treten Veränderungen ein.
- g) Die chemischen Eigenschaften der sensibilisierenden Stoffe werden verändert (Lösungsverhältnisse usw.).

4. Seren verschiedener Tiere besitzen, selbst wenn sie von derselben Art sind, bezüglich der unter c—g genannten Verhältnisse eine ungleich starke Wirkung. Die Wirkung ist am stärksten, je geringer die „Alkaleszenz“ des betreffenden Serums ist, und durch künstliche Veränderung derselben — in vivo oder in vitro — ist man imstande, die Versuchsergebnisse in der angegebenen Richtung zu beeinflussen.

5. Die unter Punkt 3 genannten Veränderungen der Eigentümlichkeiten der sensibilisierenden Stoffe sind nicht auf kolloide Eigenschaften des Serums als solche und auch nicht auf dessen amphotere Reaktion zurückzuführen; denn sie lassen sich nicht durch Hinzusetzung von Leim, Gummi arabicum, Stärke, Pepton oder Theobromin und Glykokoll hervorrufen. Hühnereiweiß verhält sich dagegen ähnlich wie Serum, wenn auch dessen Wirkungen bedeutend ausgeprägter sind.

6. Die Ursache zu den unter Punkt 3 genannten Veränderungen ist darin zu suchen, daß die betreffenden Sensibilisatoren mit den Eiweißstoffen des Serums Verbindungen mit ganz anderen Eigenschaften als denen der beiden Komponenten eingehen. Diese Verbindungen zwischen Serum-Albumin und Farbsäuren zeichnen sich durch folgende Reaktionen aus: Sie sind löslich in Serum — sowohl bei alkalischer Reaktion (+ Fluoreszenz<sup>1</sup>) wie bei neutraler (÷ Fluoreszenz) und saurer Reaktion (+ Fluoreszenz), sie sind außerdem unlöslich in Wasser, jedoch löslich in Alkali (+ Fluoreszenz) und in dünner Salzsäure (÷ Fluoreszenz). Sie werden von starker HCl gespalten. Sie werden durch Entwässerung mit schwefelsaurem Ammoniak

---

<sup>1</sup>) Wenn die Farbstoffsalze überhaupt fluoreszierend sind.

aus ihren alkalischen Lösungen gefällt. Durch Kochen werden sie nicht gefällt.

7. Die Schwierigkeit, eine Total-Sensibilisation warmblütiger Tiere mittels den bisher in dieser Richtung untersuchten photobiologischen Sensibilisatoren zu erlangen, ist in folgenden Umständen zu suchen: Ein Teil dieser Stoffe wird aus ihren wässrigen Lösungen durch Serum-Hinzusetzung gefällt, und sie lassen sich daher überhaupt nicht benutzen; andere werden im Organismus zu Leukoverbindungen reduziert, die keine sensibilisierenden Eigenschaften besitzen, und schließlich gehen eine Reihe der am stärksten wirkenden Sensibilisatoren direkte Verbindungen mit den Eiweißstoffen des Serums ein (obgleich sie Eiweiß in alkalischer Lösung nicht fällen); die sensibilisierende Fähigkeit wird hierdurch so stark herabgesetzt, das man die Farbstoffe zur Erzielung des gewünschten Resultats im Überschuß injizieren muß, wodurch man Dosen erhält, die sich den toxischen nähern.

Hierzu kommt, daß die intravenöse Injektion dieser Farbstoffe keine reelle Gewebefärbung zur Folge hat, da die Stoffe nur äußerst langsam in die normalen Gewebezellen hineindiffundieren, während sie anderseits schnell, teils mit den Fäces, teils durch die Nieren ausgeschieden werden. Meine Versuche deuten jedoch an, daß die Diffusionsgeschwindigkeit mit der „Alkaleszenz“ des Blutes variiert.

8. Nicht nur bei Untersuchungen über Totalsensibilisierung, sondern auch z. B. bei chromotherapeutischen Versuchen (die Anwendung von „Blut-Desinfizientia“) muß man mit den oben erwähnten Eiweißverbindungen der Anilinfarbstoffe und mit deren relativen Nicht-Giftigkeit gegenüber Mikroorganismen rechnen. — Die günstigen Resultate der Chromotherapie sind wahrscheinlich einer die Phagocytose begünstigenden, entwicklungshemmenden Einwirkung des betreffenden Farbstoffes auf die Mikroorganismen zuzuschreiben.

---

Die obenstehenden Untersuchungen sind im Frühling und Sommer 1905 in dem pharmakologischen Institut in München ausgeführt. Ich bin dem Vorstande Herrn Prof. H. v. Tappeiner

zum besten Dank verpflichtet für die liebenswürdige Gastfreundlichkeit, mit welcher ich im Laboratorium empfangen wurde — und für das lebendige und befruchtende Interesse, das er immer meiner Arbeit schenkte.

Ich bitte auch Herrn Privatdozent Dr. A. Jodlbauer, meinen herzlichsten Dank für seine ausgezeichnete Hilfe entgegenzunehmen.

---

**Chemisches zur Carcinomfrage IV.  
Über ein Vorkommen von Indol im Mageninhalt  
bei Carcinom.**

Von  
**Albert Albu und Carl Neuberg.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts  
der Universität zu Berlin.)

*(Eingegangen am 1. August 1906.)*

Indol findet sich, abgesehen von den Fäces und als Indoxyl im Harn, in der Norm nicht im Organismus; auch unter pathologischen Bedingungen ist es an anderer Stelle bisher kaum beobachtet. Nur L. Brieger<sup>1)</sup> gibt an, daß es im gefaulten Eiter vorkomme.

Daher ist der im folgenden beschriebene Fall bemerkenswert, in dem Indol sich unter eigentümlichen Verhältnissen im Mageninhalt bei Carcinom fand.

Es handelt sich um einen in vivo diagnostizierten Fall von *Fistula gastrocolica carcinomatosa*, d. h. einen Magenkrebs, welcher bei seinem geschwürigen Zerfall in den benachbarten Querdickdarm durchgebrochen war. Die Sektion hat die Richtigkeit der Diagnose bestätigt. Die Ausheberung des Mageninhalts bei dem Kranken hatte anfangs das Fehlen freier Salzsäure ergeben, später fand sich im Inhalt des nüchternen Magens regelmäßig Milchsäure und gleichzeitig Schwefelwasserstoff, dessen Anwesenheit sich schon durch den Geruch verriet. Während sich der Schwefelwasserstoff allmählich verringerte, fiel an dem Mageninhalt ein von Tag zu Tag zunehmender fäkulenter Geruch auf,

---

<sup>1)</sup> Ztschr. f. physiolog. Chem. **5**, 366. 1881.

der den Verdacht auf einen Gehalt an Darmfäulnisprodukten erregte. Aber Fäces selbst waren in dem Mageninhalt sowie in dem zeitweilig Erbrochenen niemals zu entdecken. Die von A. Schmidt angegebene Sublimatprobe zum Nachweis des Bilirubins, bezw. Urobilins der Fäces war stets negativ. Der Mageninhalt war schlecht chymifiziert, mißfarbig, zuweilen schmutziggrünlich oder bräunlich gefärbt, reagierte schwach sauer und bestand mikroskopisch fast nur aus Detritusmassen. Der positive Ausfall der Guajak- und Aloinprobe wies auf den Blutgehalt hin.

Zur Untersuchung auf flüchtige Fäulnisprodukte wurden 4 Portionen von zusammen 320 ccm nach dem Verfahren von E. und H. Salkowski<sup>1)</sup> verarbeitet. Die einzelnen Portionen waren kurz nach der Entnahme aus dem Magen am Rückflußkühler gekocht, um nachträglich Bakterienwirkung auszuschließen, und darauf mit Fluorammonium konserviert.

Zur Bindung des Schwefelwasserstoffes wurde sodann Kupfersulfat zugefügt und das Filtrat vom Schwefelkupfer im Dampfstrom destilliert. Das Destillat besaß in der Verdünnung den typischen, zugleich jasmin- und fäkalartigen Indolgeruch.

Die Prüfung auf Phenol und Kresol mittels Eisenchlorid oder Chlorkalk hatte ein negatives Resultat, Millons Reagens ergab keine Rotfärbung, aber einen weißen Niederschlag.

Die Reaktionen auf Indol fielen dagegen stark positiv aus, sowohl die Nitrit-, die Fichtenspan- wie die Glyoxylsäureprobe. Diese letzte von Hopkins angegebene Reaktion ergab einen rein rotvioletten Farbenton; ein grüner Ring, wie er für Skatol charakteristisch ist, trat nie auf, so daß in diesem Falle das Indol nicht in nennenswerter Menge von seinem Homologen begleitet war.

Zur weiteren Identifizierung des Indols wurde das ca. 400 ccm betragende Destillat mit Benzol ausgeschüttelt, die Benzolschicht abgehoben, über ein wenig frisch geglühtem Natriumsulfat getrocknet und nach der Filtration auf etwa 10 ccm eingengt. Auf Zusatz einer benzolischen Pikrinsäurelösung schied sich das Indolpikrat bald in den charakteristischen roten Nadeln aus. Zu einer Analyse war die Menge zu gering.

---

<sup>1)</sup> E. Salkowski. Practicum, 3. Auflage, S. 227. 1906.

Bemerkenswert ist, daß von den flüchtigen Fäulnisprodukten im vorliegenden Falle allein oder zum mindestens überwiegend das Indol auftrat, eine Erscheinung, die auf die Art der Fäulnis im Magen ein Licht zu werfen geeignet sein kann.

Wie schon hervorgehoben ist, konnten im Mageninhalt Fäces niemals nachgewiesen werden; aus diesem Grunde ist ein einfacher Übertritt des Indols selbst aus dem Darm höchst unwahrscheinlich, zumal da das im Kot reichlich vorhandene Skatol fehlte. Denkbar wäre immerhin eine langsame Diffusion des Indols durch die Fistel; noch näher aber liegt die Möglichkeit einer Einwanderung von indolbildenden Bakterien aus dem Darmkanal auf diesem Wege.

Das Fehlen der Phenole macht es wahrscheinlich, daß die Fäulnis keine sehr intensive und lange gewesen sein kann; für das Indol haben aber E. und H. Salkowski gezeigt, daß es bereits am 2. Tage der Fäulnis reichlich vorhanden ist. Überdies hängt die Natur der entstehenden Zersetzungsprodukte bekanntlich eng von der Art der Bakterien ab. Gerade für das Indol liegen bezügl. seiner Bildung mannigfache Erfahrungen der Bakteriologie vor<sup>1)</sup>, und ähnliches gilt für die Frage, ob bei der Fäulnis Indol oder Skatol auftritt, die beide aus einer gemeinsamen Muttersubstanz, dem Tryptophan (= Indolamino-propionsäure), hervorgehen [Hopkins und Cole]<sup>2)</sup>.

Es muß aber auch der Möglichkeit gedacht werden, daß einige Besonderheiten der Magenverdauung die Bildung des Indols begünstigt haben.

H. Winternitz<sup>3)</sup> und H. Malfatti<sup>4)</sup> haben zuerst beobachtet, daß bei der Magenverdauung des Eiweißes Tryptophanreaktion auftritt, die man früher nur bei der Pankreasverdauung konstatiert hatte; K. Gläßner<sup>5)</sup> bezog dann die Bildung dieses Indolderivates auf die Wirkung eines besonderen Enzyms, des sogenannten Pseudopepsins, das im Gegensatz zum typischen Pepsin auch bei neutraler und alkalischer Reaktion tätig sein

---

<sup>1)</sup> W. Kühne, Ztschr. f. Biolog. **30**, 221. 1894. O. Emmerling, Ber. d. dtsh. chem. Ges. **30**. 1863, 1897.

<sup>2)</sup> Journal of Physiology **29**, 456. 1903.

<sup>3)</sup> Ztschr. f. physiolog. Chem. **16**, 464. 1892.

<sup>4)</sup> Ztschr. f. Physiolog. **31**, 43. 1900.

<sup>5)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **1**, 28. 1901.

soll. Zwar ist die Existenz dieses Fermentes nicht unbestritten geblieben [F. Klug<sup>1)</sup>, vergl. auch F. Reach<sup>2)</sup>], aber die Tatsache, daß Tryptophan auch normalerweise im Mageninhalt auftreten kann, ist wohl sicher, wenn auch die Natur des betreffenden Fermentes dahingestellt bleiben muß.

Im vorliegenden Falle ist ferner zu beachten, daß beim Carcinomgewebe ein beschleunigter autolytischer Eiweißzerfall stattfindet, bei dem K. Gläßner<sup>3)</sup> gleichfalls reichliche Tryptophanbildung beobachtete. Die Produkte der Autolyse sind an sich für Bakterien ein ausgezeichneter Nährboden, und sein besonderer Reichtum an Tryptophan begünstigt natürlich die Entstehung von Indol.

Jedenfalls liegt es nahe, das auf einem oder anderem Wege erzeugte Tryptophan für die Erklärung einer alleinigen Entstehung von Indol bei der Magenfäulnis heranzuziehen.

---

<sup>1)</sup> Pflügers Archiv 85. 1902.

<sup>2)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Patholog. 4, 139, 1903.

<sup>3)</sup> K. Gläßner, Berl. klin. Wochenschr. Nr. 26, S. 599. 1903.

---

### Berichtigung

zu:

1. A. v. Drjewezki: Beeinflussung der Autolyse durch Alkali.  
(Diese Zeitschrift 1, S. 229.)
  - S. 234. 5 Zeilen von unten muß vor Versuch I als Überschrift gesetzt werden:  
Untersuchungen mit einer 0,2%igen Sodalösung.
  - S. 236. In der Überschrift vor Versuch IV muß es heißen:  
Untersuchungen mit einer 0,3%igen Sodalösung (statt 3%igen).
  - S. 237. In der Tabelle des Versuches VI muß es heißen für  
Albumosen in Kolumne C 25,08% (statt 28,08%) in % des Gesamt-N.
  2. D. Jonescu, Über das Schicksal der Kresole im Organismus usw.  
(Diese Zeitschrift 1, S. 399.)
  - S. 399, Zeile 14 von unten  
lies: „bespricht“ statt: „beschreibt“.
  - S. 404, Zeile 17 von unten  
lies: „Indigomenge anscheinend vermehrt“ statt: „Indigomenge vermehrt“.
  - S. 406, Zeile 8 von oben  
lies: „Keiner“ statt „Keines“ und: „Kresolharnen“ statt: „Kresolen“.
  - S. 406. In Anmerkung 2 und 3  
lies: „Zitiert nach“ statt: vgl. noch“.
-



## Autorenverzeichnis.

- Albu, A. und C. Neuberg. Chemisches zur Carcinomfrage IV. S. 541.
- Ascher, E. siehe Neuberg und Ascher.
- Bickel, A. Die Chemie der Superazidität und ihre pathologisch-physiologische Erklärung. S. 153.
- Blumenthal, F. Biochemische Untersuchungen über Vergiftung und Entgiftung bei der Lysolvergiftung. S. 135.
- Busck, G. Die photobiologischen Sensibilisatoren und ihre Eiweißverbindungen. S. 425.
- v. Drjewecki, A. Über den Einfluß der alkalischen Reaktion auf die autolytischen Vorgänge im in der Leber. S. 229.
- — Berichtigung. S. 544.
- Ehrlich, F. Über eine Methode zur Spaltung racemischer Aminosäuren mittels Hefe. S. 8.
- Feigl, J. und H. Meier. Biologisch-chemische Untersuchungen über das Chloroform. S. 317.
- Großmann, H. Über die Bedeutung von Bleisalzen für die polarimetrische Untersuchung des Harns und der Gewebssäfte. S. 339.
- Hamburger, H. J. Eine Methode zur Bestimmung des osmotischen Druckes sehr geringer Flüssigkeitsmengen. S. 259.
- Jacoby, M. Über die Beziehungen der Verdauungswirkung und der Labwirkung. S. 53.
- Jonescu, D. Über das Schicksal der Kresole im Organismus usw. S. 399.
- Berichtigung S. 544.
- Langstein, L. siehe Rietschel und Langstein.
- Liefmann, E. und R. Stern. Über Glykaemie und Glykosurie. S. 299.
- Loeb, J. Versuche über den chemischen Charakter des Befruchtungsvorganges. S. 183.
- Manasse, A. Über den Gehalt des Eidotters an Lecithin. S. 246.
- Mayer, P. Über die Spaltung der lipoiden Substanzen durch Lipase und über die optischen Antipoden des natürlichen Lecithins. S. 39.
- — Über Lecithinzucker und Jekorin sowie über das physikalisch-chemische Verhalten des Zuckers im Blut. S. 81.
- Meier, H. siehe Feigl und Meier.
- Metalnikoff, S. Über die Ursachen der Immunität gegen Tuberkulose bei der Bienenmotte (*Galeria mellonella*). S. 309.

- Morgenroth, J. und D. Pane. Über Beobachtungen reversibler Veränderungen an Toxinen. S. 354.
- Neimann, E. siehe Neuberg und Neimann.
- Neuberg, C. Synthese von Oxy- und Di-aminosäuren. III. S. 282.
- — Über die Entstehung optisch-aktiver Fettsäuren in der Natur. S. 368.
- — und E. Ascher. Über optisch-aktive  $\alpha$ - $\beta$ -Diaminopropionsäure und  $\beta$ -Thioglyzerinsäure. S. 380.
- — und E. Neimann. Über gelatinöse anorganische Erdalkalisalze. S. 166.
- — siehe auch Albu und Neuberg.
- Oppenheimer, C. Über die Anteilnahme des elementaren Stickstoffes am Stoffwechsel der Tiere. S. 177.
- Pane, D. siehe Morgenroth und Pane.
- Plesch, J. Über objektive Hämoglobinometrie. S. 32.
- Pribram, H. Beitrag zur Kenntnis des Schicksals des Cholesterins und der Cholesterinester im tierischen Organismus. S. 413.
- Rietschel, H. und L. Langstein. Über das Vorkommen von Aminosäuren im Harn der Kinder. S. 75.
- Rogozinsky, F. Über den Einfluß der Muskelarbeit auf Gewicht, Zusammensetzung und Wassergehalt der Organe des Tierkörpers. S. 207.
- Sachs, Fr. Über den Wert der verschiedenen Farbenreaktionen zum Nachweis der Pentosen. S. 383.
- Scott, L. Über Jodospongine. S. 367.
- Stern, R. siehe Liefmann und Stern.
- Vandevelde, A. J. J. Über die Anwendung von biologischen Methoden zur Analyse von Nahrungstoffen. S. 1.
- — Über Diffusion von Enzymen durch Cellulosemembrane. S. 408.
- Willanen, K. Über das Verhalten des Ovomukoids im Organismus. S. 108.
- — Zur Frage über die Entstehung des Rhodans im Organismus. S. 129.
- Wohlgemuth, J. Zur Chemie der Phosphorleber. S. 161.
- — Über den Aminosäurenstoffwechsel des Gichtikers. S. 332.
- — Berichtigung. S. 298.
- Zelmanowitz, C. Über einen neuen Apparat zur Extraktion wässriger Flüssigkeiten mittels Äther, Ligroin usw. S. 253.



Fig. 3.

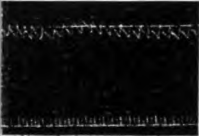


Fig. 7.

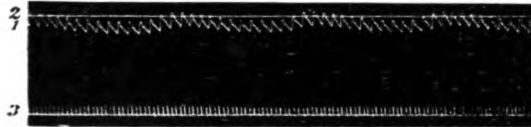


Fig. 8.

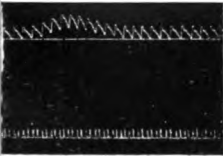


Fig. 12.



16.



Fig. 17.



g. 21.



Fig. 22.

le des Versuchs.

- Morgenroth, J. und D. Pane. Über Beobachtungen reversibler Veränderungen an Toxinen. S. 354.
- Neimann, E. siehe Neuberg und Neimann.
- Neuberg, C. Synthese von Oxy- und Di-aminosäuren. III. S. 282.
- — Über die Entstehung optisch-aktiver Fettsäuren in der Natur. S. 368.
- — und E. Ascher. Über optisch-aktive  $\alpha$ - $\beta$ -Diaminopropionsäure und  $\beta$ -Thioglyzerinsäure. S. 380.
- — und E. Neimann. Über gelatinöse anorganische Erdalkalisalze. S. 166.
- — siehe auch Albu und Neuberg.
- Oppenheimer, C. Über die Anteilnahme des elementaren Stickstoffes am Stoffwechsel der Tiere. S. 177.
- Pane, D. siehe Morgenroth und Pane.
- Plesch, J. Über objektive Hämoglobinometrie. S. 32.
- Pribram, H. Beitrag zur Kenntnis des Schicksals des Cholesterins und der Cholesterinester im tierischen Organismus. S. 413.
- Rietschel, H. und L. Langstein. Über das Vorkommen von Aminosäuren im Harn der Kinder. S. 75.
- Rogozinsky, F. Über den Einfluß der Muskelarbeit auf Gewicht, Zusammensetzung und Wassergehalt der Organe des Tierkörpers. S. 207.
- Sachs, Fr. Über den Wert der verschiedenen Farbenreaktionen zum Nachweis der Pentosen. S. 383.
- Scott, L. Über Jodospongine. S. 367.
- Stern, R. siehe Liefmann und Stern.
- Vandevelde, A. J. J. Über die Anwendung von biologischen Methoden zur Analyse von Nahrungstoffen. S. 1.
- — Über Diffusion von Enzymen durch Cellulosemembrane. S. 408.
- Willanen, K. Über das Verhalten des Ovomukoids im Organismus. S. 108.
- — Zur Frage über die Entstehung des Rhodans im Organismus. S. 129.
- Wohlgemuth, J. Zur Chemie der Phosphorleber. S. 161.
- — Über den Aminosäurenstoffwechsel des Gichtikers. S. 332.
- — Berichtung. S. 298.
- Zelmanowitz, C. Über einen neuen Apparat zur Extraktion wässriger Flüssigkeiten mittels Äther, Ligroin usw. S. 253.



Fig. 3.



Fig. 7.



Fig. 8.

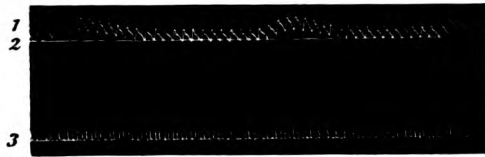
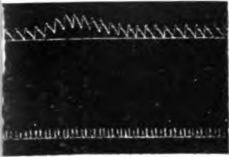


Fig. 12.



16.

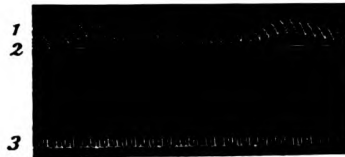
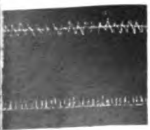


Fig. 17.



g. 21.



Fig. 22.

e des Versuchs.





Fig. 25.

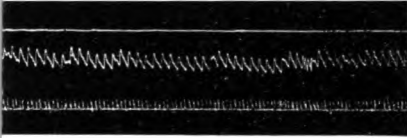


Fig. 30.

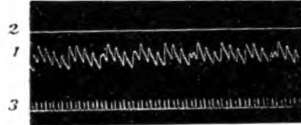
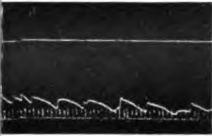


Fig. 31.



g. 34.

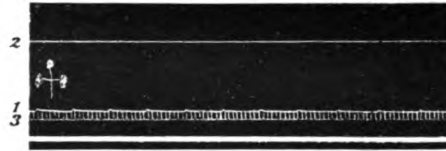


Fig. 35.

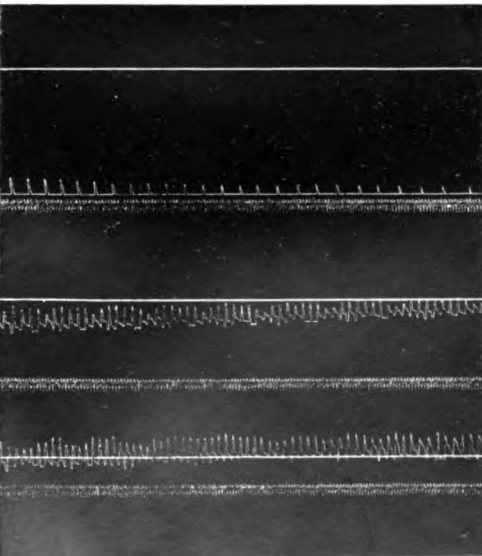
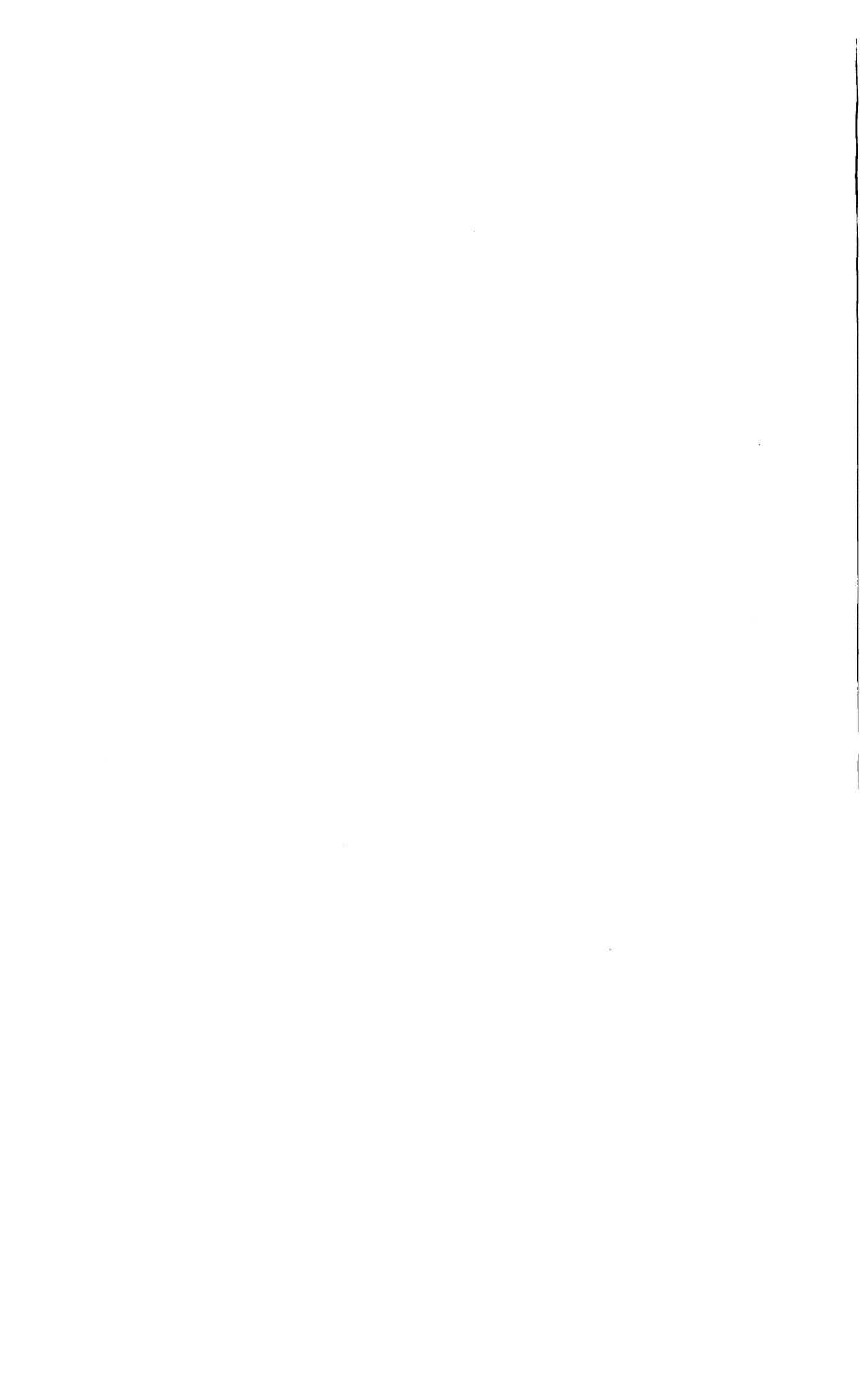


Fig. 38.

Fig. 37.

Fig. 36.





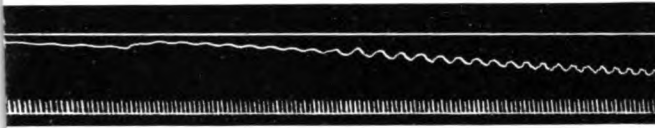
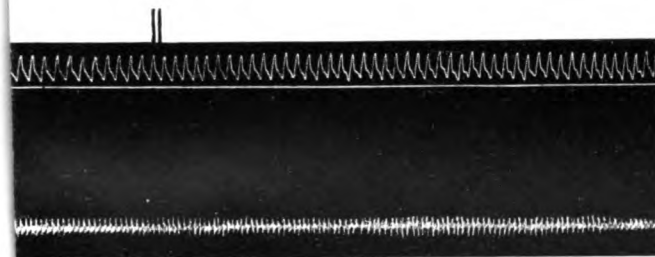
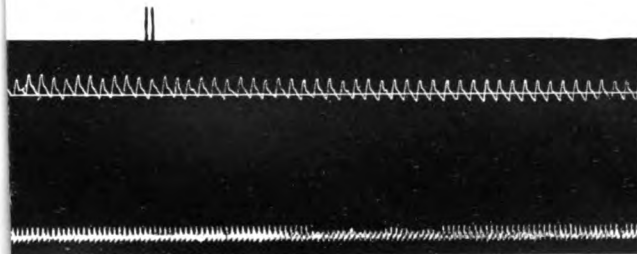


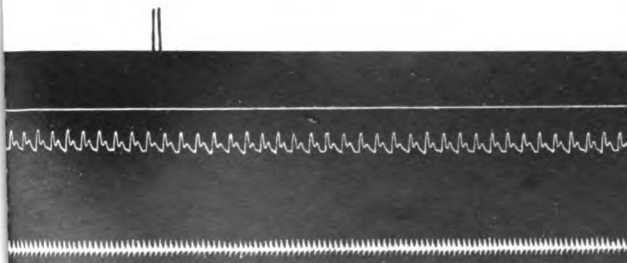
Fig. 42.



Chloroform Anschütz  
(frisch).



Chloroform Duncan  
(frisch).



Chloroform Kahlbaum  
(frisch).

e des Versuchs.



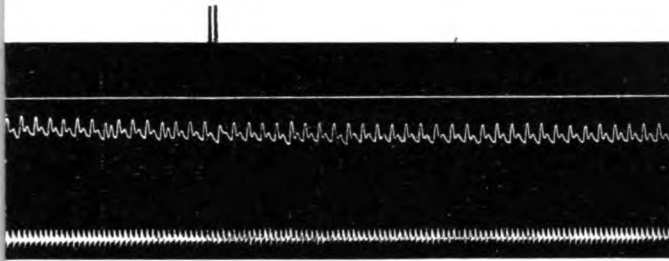


Fig. 47.

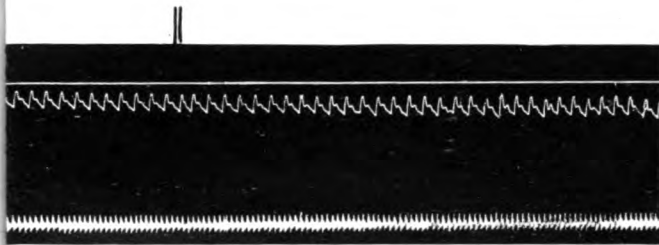


Fig. 48.

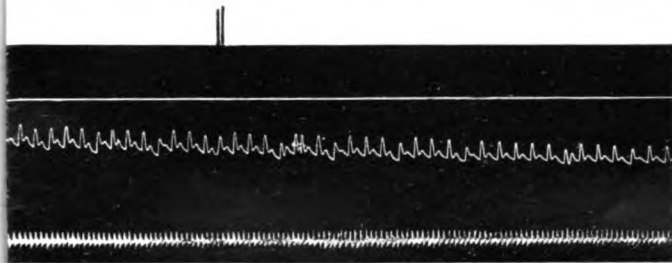


Fig. 49.

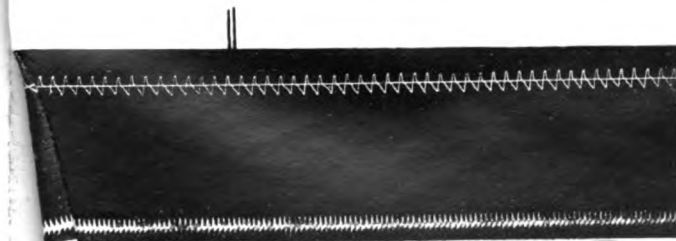


Fig. 50.

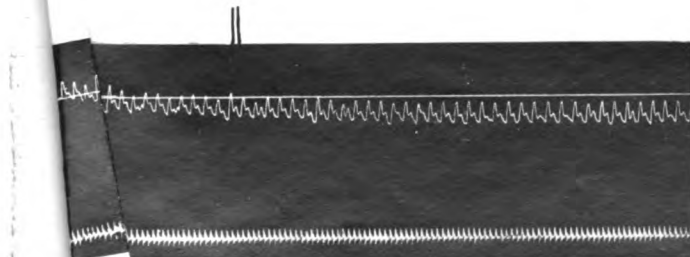


Fig. 51.

End<sup>t</sup>hs.





# PERIODICAL

THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE  
STAMPED BELOW

RENEWED BOOKS ARE SUBJECT TO  
IMMEDIATE RECALL

Library, University of California, Davis

Series 458A

61852

QP501

Biochemische zeitschrift.

B54

MR 17 '80

v.1

*Biochemische Zeitschrift*

QP501

B54

v.1

PERIODICAL ✓

61852

**PAGE NOT  
AVAILABLE**