

Biochemische Zeitschrift.

Beiträge
zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

F. Hofmeister - Würzburg, C. von Noorden - Frankfurt a. M.,
E. Salkowski - Berlin, A. von Wassermann - Berlin, N. Zuntz - Berlin

unter Mitwirkung von

B. Ascoli - Catania, L. Asher - Bern, G. Bertrand - Paris, A. Bickel - Berlin, F. Blumenthal - Berlin, A. Bonanni - Rom, F. Bottazzi - Neapel, G. Bredig - Karlsruhe i. B., A. Durig - Wien, F. Ehrlich - Breslau, H. v. Euler - Stockholm, J. Feigl - Hamburg, S. Flexner - New York, J. Forsman - Lund, S. Fränkel - Wien, E. Freund - Wien, H. Freundlich - Berlin-Dahlem, E. Friedberger - Greifswald, E. Friedmann - Berlin, O. v. Fürth - Wien, G. Galeotti - Neapel, F. Haber - Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger - Groningen, P. Hári - Budapest, A. Heffter - Berlin, V. Henri - Paris, V. Henriques - Kopenhagen, W. Heubner - Göttingen, R. Höber - Kiel, M. Jacoby - Berlin, A. Koch - Göttingen, M. Kumagawa - Tokio, F. Landolf - Buenos Aires, L. Langstein - Berlin, P. A. Levene - New York, L. v. Liebermann - Budapest, J. Loeb - New York, A. Loewy - Berlin, A. Magnus - Levy - Berlin, J. A. Mandel - New York, L. Marchlewski - Krakau, P. Mayer - Karlsbad, J. Meisenheimer - Greifswald, L. Michaelis - Berlin, H. Mollisch - Wien, J. Morgenroth - Berlin, E. Münzer - Prag, W. Nernst - Berlin, W. Ostwald - Leipzig, W. Palladin - St. Petersburg, W. Pauli - Wien, R. Pfeiffer - Breslau, E. P. Pick - Wien, J. Pohl - Breslau, Ch. Porcher - Lyon, P. Rous - Berlin, S. Sarskian - St. Petersburg, N. Sieber - St. Petersburg, M. Siegfried - Leipzig, S. P. L. Sörensen - Kopenhagen, K. Spiro - Straßburg, E. H. Starling - London, J. Stoklasa - Prag, W. Straub - Freiburg i. B., A. Stutzer - Königsberg i. Pr., H. v. Tappelner - München, H. Thoms - Berlin, P. Trendelenburg - Rostock, A. J. J. Van der Veide - Gent, O. Warburg - Berlin, W. Wiechowski - Prag, A. Wohl - Danzig, J. Wohlgemuth - Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg - Berlin.

Hundertster Band.



Berlin.

Verlag von Julius Springer.

1919.

(RECAP)

8617

,181

(1919)

100. Bd.

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
100 Bände „Biochemische Zeitschrift“	1
Kerb, Johannes. Über eine Verbindung der Stärke mit Phosphorsäure	3
Röhmnn, F. †. Zur Frage nach der Entstehung und Spezifität bakteriolytischer Immunkörper	15
Fürth, Otto, Hans Bauer und Hansi Piesch. Untersuchungen über Diffusionsvorgänge in Gallerten. III.	29
Herzfeld, E. und R. Klinger. Zur Chemie des Blutfarbstoffes . . .	64
Winterstein, Hans. Über den Einfluß der Temperatur auf die Oberflächenspannung narkotischer Stoffe. (Nach Versuchen von Fr. Else Hirschberg)	81
Hueck, W. und L. Wacker. Über die Beziehungen des Cholesterins zum intermediären Fettstoffwechsel	84
Bokorny, Th. Beitrag zur Kenntnis der chemischen Natur der Enzyme	100
Huehn, Hugo. Die Melaninbildung im autolysierenden Kartoffelpreßsaft	114
Windisch, Wilhelm und Walther Dietrich. Titrationsen mit oberflächenaktiven Stoffen als Indicator. II.	130
Falta, W. und M. Richter-Quittner. Über die Verteilung des Zuckers, der Chloride und der Reststickstoffkörper auf Plasma und Körperchen im strömenden Blute	148
Jacoby, Martin. Über den geringen Katalasegehalt der Weil-Felix (X)-Stämme im Gegensatz zu normalen Proteusstämmen	191
Atzler, Edgar und Fritz Richter. Die spezifische Wärme des Blutes und des Serums unter besonderer Berücksichtigung der Methodik	198
Sieburg, Ernst und Gustav Mordhorst. Über die Verbreitung von Fermenten im tierischen Organismus, die Gerbsäure und verwandte Stoffe spalten	204

	Seite
Warburg, Otto. Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlen- säurezersetzung in lebenden Zellen	230
Euler, Hans von und Olof Svanberg. Zur Kenntnis der Pektase-Wirkung	271
Ostwald, Wolfgang. Physikalisch-chemische Bemerkungen zu Neubergs Gärungstheorie	279
Neuberg, Carl. Die physikalisch-chemische Betrachtung der Gärungs- vorgänge. Zugleich Äußerungen zu Wo. Ostwalds Bemerkungen über die Neubergsche Gärungstheorie	289
Neuberg, Carl und Julius Hirsch. Die dritte Vergärungsform des Zuckers	304
Autorenverzeichnis	323

100 Bände „Biochemische Zeitschrift“.

Die Begründung der „Biochemischen Zeitschrift“ im Jahre 1906 ist in eine Periode des Aufblühens dieser Wissenschaft in sämtlichen Kulturstaaten gefallen. Der Aufschwung spiegelt sich in der ansehnlichen Zahl von Bänden, die der Veröffentlichung gewonnener Erkenntnisse dienen. Diese Entwicklung ist, wenn nicht alle Zeichen trügen, keineswegs abgeschlossen. Es hat eine Durchdringung der meisten Zweige biologischer Forschung mit chemischen Betrachtungen und ihre Bearbeitung mit chemischen Verfahren eingesetzt.

Die Heroen, die vor ungefähr einem Jahrhundert die Grundlagen der modernen Chemie in den verschiedenen Ländern schufen, sind vielfach Chemiker und Biologen gewesen. Im Zeitalter Liebig's etwa ist dann eine Trennung der Richtungen erfolgt. Beide Wissenszweige wandelten eigene Wege; sie erfuhren methodischen Ausbau und empfingen den Inhalt, der sie zu großen Erfolgen befähigte. In den romanischen Ländern, insbesondere in Frankreich, wo Lavoisier an der Wiege der Stoffwechselforschung gestanden und wo Gay-Lussac die Chemie der Gärungserscheinungen mitbegründet hat, ist wohl unter dem überragenden Einflusse Pasteurs diese Spaltung nicht so weit gegangen. Überall aber macht sich seit einiger Zeit das zwingende Bedürfnis zu einer Annäherung in dem Sinne geltend, daß das Rüstzeug einer jeden dieser beiden Disziplinen so weit vorbereitet erscheint, daß eine nützliche Anwendung auf die Probleme der Schwesterwissenschaft versucht werden kann. Wenige Namen beleuchten die Lage: Die bakteriologische Ära, die Robert Koch schuf, kann neben der morphologischen Einteilung der chemischen Differenzierung nicht entraten. Ein nicht unwesentlicher Teil der Entwicklung, den die Histologie nahm, beruht seit Weigerts und Heidenhains Tagen in der Anwendung der chemischen Färbelehre. Die kühne und zielsichere Übertragung stereochemischer Begriffe auf biologische Grunderscheinungen machte Paul Ehrlich zum Schöpfer der Immunochemie und Chemotherapie. Mit chemischen Methoden drang Jacques Loeb in die Probleme der Fortpflanzung ein. Eine fortlaufende Linie biochemischer Errungenschaften führte Bau-

mann, Hopkins, Schäfer, Starling und Takamine zur Auffindung der Hormone und Vitamine, jener unentbehrlichen Materialien, deren Bedeutung der klassischen Stoffwechsellhre verborgen geblieben war. Pawlow deckte die grundlegenden Beziehungen zwischen nervöser und chemischer Regulation der Verdauungsvorgänge auf. Zu immer größeren Vollkommenheit entwickelten Rubner sowie Zuntz, Atwater und Benedict die Erkenntnis des Wärmehaushaltes und Gaswechsels der Organismen durch die Fortbildung und erweiterte Anwendung der Methoden, die Dulong, Regnault und Reiset sowie Pettenkofer geschaffen hatten. Auf der anderen Seite ist zum guten Teile das glanzvolle Wirken Emil Fischers der Aufklärung der lebenswichtigen Naturprodukte gewidmet gewesen; er lehrte den Ernährungsphysiologen, den Arzt, den Agrikulturforscher das materielle Substrat der biologischen Agenzien kennen. Er führte zu höchster Blüte eine Periode, die mit Mieschers Entdeckung neuer Klassen von Eiweißkörpern, der Nucleine und Protamine, eingesetzt hatte und von Abderhalden zu einem vorläufigen Abschluß gebracht ist. Gleichzeitig begann die allgemeine physiologische und pathologische Chemie, deren Aufstieg mit den Namen Hoppe-Seyler, Mörner, Nencki und der Altmeister Hammarsten, Hofmeister, Kossel und Salkowski innig verknüpft ist, auf viele biologische Gebiete den Einfluß zu entfalten, den wir jetzt verspüren. In Jahren werden erst die Impulse auswirken, die durch Errungenschaften der physikalischen Chemie Arrhenius, Gibbs, vant'Hoff, Nernst, Ostwald und Sörensen sowie ihre Vorläufer de Vries, Pfeffer, Schönbein und M. Traube der Biologie erteilt haben. Die Arbeiten Ciamicians über die chemischen Leistungen des Lichtes stärkten das Interesse für die biologische Rolle der Strahlenarten und ihre überraschenden Wirkungen. Erst kürzlich ist der Mahnruf Willstätters, des Ergründers der Pflanzenfarbstoffe und der damit zusammenhängenden Fragen der Assimilation, an die Chemiker von Fach ergangen, die bisher plumpen Mittel des Laboratoriums durch Methoden zu ersetzen, für welche die Arbeitsweise der Vegetabilien das Vorbild gewährt.

So steht in einer Zeit, in der durch chemische Errungenschaften Birkeland und Eyde, Frank und Caro sowie Fritz Haber die Möglichkeiten des Lebens auf Erden theoretisch ins Ungemessene gesteigert haben, ein friedlicher Wettstreit der Nationen bevor auf allen Gebieten der Biochemie, der Lehre von den chemischen Grundlagen des Daseins. C. N.

Über eine Verbindung der Stärke mit Phosphorsäure.

Von
Johannes Kerb.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlen.)

(Eingegangen am 26. Juni 1919.)

Einzelne Elemente haben dadurch eine besondere biologische Bedeutung, daß sie in der Natur in organischer Bindungsform auftreten. Zu den wenigen Grundstoffen dieser Art gehört der Phosphor, der in Gestalt der Phosphorsäure sich am Aufbau zahlreicher wichtiger Bausteine der Lebewesen beteiligt. Phosphorhaltige Lipoide oder Phosphatide, wie das Lecithin und seine Verwandten, sind seit langem bekannt, und ebenso phosphorhaltige Eiweißkörper, wie Casein und Vitellin. Diesen schließen sich die Nucleoproteide an, Verbindungen von eigentlichen Eiweißkörpern mit den phosphorhaltigen Nucleinsäuren, in welchen letzteren eine Kohlenhydrat-Phosphorsäure als Skelett vorhanden ist. Aus den Untersuchungen von Bang, Kossel, Levene, Neuberg und Steudel geht hervor, daß die Nucleinsäuren teils Verbindungen von Hexose, teils von Pentose mit Phosphorsäure enthalten und daß in ihnen dieser Kohlenhydratphosphorsäurerest mit stickstoffhaltigen Gruppen in ähnlicher Weise zu komplizierten Gebilden vereinigt ist, wie etwa die Glycerinphosphorsäure im Lecithin mit Cholin und Fettsäureradikalen. Bestimmten Gehirn- und Organlipoiden liegt ebenfalls eine Kohlenhydratphosphorsäure zugrunde, so dem Sphingomyelin von Thudichum, der Cerebrinphosphorsäure von A. Bethe und dem Carnaubon der Niere von E. K. Dunham und A. C. Jacobson¹⁾. Es

¹⁾ E. K. Dunham und A. C. Jacobson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 302, 1910

handelt sich in den letztgenannten Fällen um die d-Galaktosephosphorsäure. Während die bisher erwähnten Substanzen komplizierte Verbindungen der Phosphorsäure darstellen, liegt im Phytin ein einfaches Derivat vor. Diese früher als Formaldehyd-Phosphorsäureverbindung aufgefaßte Substanz ist vor einiger Zeit von C. Neuberg¹⁾ als Inositphosphorsäureester erkannt, der in zahlreichen Vegetabilien in Form seines Kalk- und Magnesiumsalzes recht verbreitet ist.

Seit vielen Jahren weiß man, daß dem in organischer Bindung vorhandenen Phosphor im intermediären Stoffwechsel der Tiere und Pflanzen eine bedeutsame Rolle zufällt. Erinneert sei nur an die phosphorhaltigen Albumosen und Peptone, z. B. an die Paranucleinsäure von E. Salkowski, die sogenannte Polypeptidphosphorsäure von F. A. Reh und die Caseonphosphorsäuren von M. Dietrich²⁾. Auch der eigentümliche Vorgang der Labgerinnung scheint nach den Untersuchungen von W. Oertel³⁾ mit dem Phosphorgehalt des Caseins im Zusammenhange zu stehen. Salze der einfachen Glycerinphosphorsäure treten im Stoffwechsel als Spaltungsprodukt des Lecithins und verwandter Phosphatide auf. Im Dasein der Hefe scheint die Phosphorsäure eine besondere, wenn auch im wesentlichen Punkte noch nicht durchsichtige Rolle zu spielen, wie in dem Umstande sich offenbart, daß die Hefe nach den Untersuchungen von Iwanow, Harden und Young, Lebedeff, Buchner und Altoni u. a. aus anorganischen Phosphaten und Zucker unter Umständen eine esterartige Verbindung zu synthetisieren vermag, die jetzt von C. Neuberg und Mitarbeitern mit Sicherheit als Fructosediphosphorsäure⁴⁾ erkannt worden ist und deren Konstitution sich besonders auch daraus ergibt, daß sie auf rein chemischem Wege zur Fructosemonophosphorsäure abgebaut werden kann.

Die biologische Bedeutung der organischen Phosphorsubstanzen offenbart sich darin ebenfalls, daß weit verbreitet Fer-

¹⁾ C. Neuberg, diese Zeitschr. 9, 557, 1908.

²⁾ M. Dietrich, diese Zeitschr. 22, 120, 1909.

³⁾ W. Oertel, Dissertation. Berlin 1914.

⁴⁾ C. Neuberg, E. Färber, A. Lewite und E. Schwenk, diese Zeitschr. 83, 244, 1917; 88, 432, 1918.

mente vorkommen, welche die Verarbeitung dieser Phosphorverbindungen besorgen, die sogenannten Phosphatasen. Eine solche ist ohne Zweifel tätig im Pankreassaft, da dieser aus den noch organische Phosphorsäureabkömmlinge enthaltenden peptischen Verdauungsprodukten anorganische Phosphorsäure frei macht: Diese Phosphatase — bzw. mehrere ähnliche Enzyme — sind wirksam sowohl gegen phosphorhaltige Albumosen und Peptone als gegen die Umwandlungsprodukte der Nucleoproteide; dementsprechend enthalten die Nucleasen gleichfalls eine Phosphatasekomponente. Überhaupt treten Phosphatasewirkungen bei vielen Abbauprozessen zutage, wie z. B. bei der Verdauung des Lecithins, wenn es auch nicht immer feststeht, ob es sich dabei um die Wirkung eines speziell Phosphorsäure ablösenden Fermentes handelt, oder ob die allgemeinen Esterasen die Hydrolyse von Phosphorsäureestern mit übernehmen. In pflanzlichen Organismen sind die dem Phosphorsäurestoffwechsel dienenden Fermente nicht weniger verbreitet, indem Glycerophosphatase¹⁾, Hefenphosphatase, Saccharophosphatase²⁾, Phytase, Nuclease usw. wichtige Aufgaben erfüllen. Auch bei den autolytischen Vorgängen in Tier- und Pflanzenzellen spielt die Abspaltung von Phosphorsäure aus hochmolekularen organischen Phosphorsäureverbindungen eine unzweifelhafte Rolle.

Es entbehrt nun nicht des Interesses, ist bisher aber wenig beachtet, daß ein für die Ernährung des Menschen und im Stoffwechsel der Vegetabilien ungemein wichtiges Material, nämlich die Stärke, gleichfalls phosphorhaltig ist. Während ältere Phosphorbefunde an der Stärke auf ungenügende Reinigung, d. h. auf Beimengung anorganischer Phosphate, bezogen werden konnten, haben meines Wissens zuerst M. Samec und F. v. Hoefft³⁾ auf Grund physikalisch-chemischer Methoden die Ansicht begründet, daß die Stärke eine esterartige Verbindung von Kohlenhydrat mit Phosphorsäure darstelle oder zum mindesten eine Amylophosphorsäure enthalte, indem von den Komponenten der Stärke das Amylopectin P-haltig, die Amylose phosphorfrei ist. Samecs Annahme

¹⁾ A. Nemeč, diese Zeitschr. 93, 94, 1919.

²⁾ K. Djenab und C. Neuberg, diese Zeitschr. 82, 391, 1917.

³⁾ M. Samec und F. v. Hoefft, Chem. Centralbl. 13, I, 632; 14, I, 37; 14, II, 719.

gründet sich im wesentlichen auf den Umstand, daß Stärkelösungen beim Stehen eine Zunahme der Leitfähigkeit aufweisen, was nach des Autors Meinung auf einer Hydrolyse von Stärkephosphorsäure beruht. Auch Änderungen der Viscosität und der kataphoretischen Eigenschaften, die Zunahme der Löslichkeit sowie des osmotischen Drucks würden mit einer solchen Voraussetzung sich in Übereinstimmung befinden. Die zugrunde liegende Amylophosphorsäure hat jedoch Samec nicht als solche dargestellt oder charakterisiert und ihre Existenz im wesentlichen auf indirektem Wege abgeleitet. Es muß noch hervorgehoben werden, daß frühere Versuche verschiedener Autoren (wie Ford, Fernbach, Malfitano, Fouard, Thomas, Gatin-Gruczewska) mit den Samecschen Auffassungen insofern im Einklange stehen, als es ihnen bei keiner der vielen angewendeten Reinigungsmethoden möglich war, wirklich phosphorsäurefreie Stärke zu gewinnen. Freilich ist der Phosphorsäuregehalt der natürlichen Stärke nur gering; immerhin ist er so groß, daß es in einer wichtigen Arbeit J. H. Northrop und J. M. Nelson¹⁾ gelungen ist, eine Kohlenhydratphosphorsäure durch gemäßigte Hydrolyse der Stärke zu gewinnen.

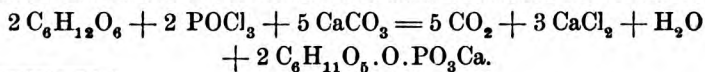
Das Verfahren der amerikanischen Autoren bestand darin, daß Stärke (10 kg) in Wasser (40 l) suspendiert und dann mit Salzsäure (2 l konz. HCl) versetzt wurde. Das Gemisch wurde dann kräftig gerührt und mit Dampf unter Druck bis zur Verflüssigung der zunächst gebildeten gelatinösen Masse behandelt. Die Lösung wurde alsdann im Vakuum eingengt, mit Barytwasser neutralisiert, von dem entstandenen Niederschlag (Bariumphosphat, Stärke usw.) abfiltriert und mit Alkohol gefällt, wobei 60 g eines hygroskopischen Bariumsalzes (Rohprodukt) gewonnen wurden. Durch Überführung in die Bleiverbindung konnte daraus das Bleisalz der Kohlenhydratphosphorsäure und aus diesem durch Behandlung mit Schwefelwasserstoff und Ausfällung mittels Eisessig auch die zugrunde liegende freie Säure selbst dargestellt werden. Letztere erhielt nach dem Auswaschen mit absolutem Alkohol 4,9% Phosphor ausschließlich in organischer Bindung. Sie war durch die Zusammensetzung und durch das fehlende Reduktionsvermögen gegenüber Fehlingscher Mischung noch als ein Derivat einer höheren Kohlenhydratmolekülverbindung gekennzeichnet. Durch wiederholte Reinigung über das Bleisalz und Ausfällung mit Alkohol wurde eine Säure gewonnen, die sogar 5,24 bis 5,55% Phosphor enthielt. Sie war vollkommen weiß, stark hygroskopisch und frei von verunreinigenden Aschebestandteilen sowie Stickstoff.

¹⁾ J. H. Northrop und J. M. Nelson, Journ. of the Americ. Chem. Soc. 38, 472, 1916.

An anderer Stelle ihrer Mitteilung geben jedoch die Verfasser an, daß die Substanz nach weitergetriebener Reinigung Fehlingsche Lösung reduziert habe. Die Verbindung zeigte eine spezifische Drehung, die mehr als doppelt so groß wie die von Traubenzucker war, nämlich $[\alpha]_D = + 108^\circ 30'$. Sie ergab bei der Hydrolyse mit verdünnten Säuren rund 65% eines Zuckers, der auf Grund des Drehungsvermögens seines Osazons im Pyridin-Alkohol-Gemisch nach Neuberg sich als Traubenzucker erwies. Die Analyse führte zu der Formel $C_{17}H_{31}O_{16} \cdot PO_3H_2$. Trotz mancher Ähnlichkeit mit einer Maltosephosphorsäure waren Eigenschaften und Zusammensetzung jedoch mit einer solchen Annahme nicht zu vereinen. Die Natur der Substanz ist noch nicht aufgekärt worden. Festgestellt ist nur, daß sie nicht durch ein Derivat des Inosits oder einer Pentose verunreinigt war; an letztere hätte man wegen der 17 C-Atome denken können.

Demnach steckt in der natürlichen Stärke offenbar ein Phosphorsäurekomplex. Aber die Aussicht erscheint bisher nicht groß, auf dem Wege des Abbaus zu einer reinen Kohlenhydratphosphorsäure zu gelangen, die einen Kern des Stärkemoleküls oder wenigstens eines Anteils desselben, des Amylopectins, bildet. Ich habe deshalb einen anderen Weg eingeschlagen, um eine Verbindung von Stärke mit Phosphorsäure kennen zu lernen, nämlich den der Steigerung des P-Gehaltes durch künstliche Einführung des Phosphorsäurerestes in die Stärke.

Zu diesem Zwecke benutzte ich die von Neuberg¹⁾ angegebene Methode der Phosphorylierung. Das Verfahren besteht darin, daß man die wäßrige Lösung des Kohlenhydrats bei Gegenwart eines säurebindenden Materials mit einer Lösung von Phosphoroxychlorid in alkoholfreiem Chloroform oder Äther schüttelt. Als Neutralisationsmittel wählt man zweckmäßig kohlen-sauren Kalk, weil dieser den Vorteil gewährt, den nicht in organische Bindung getretenen Teil des Phosphorylierungsmittels als unlösliches Calciumphosphat auszufällen, und die Möglichkeit bietet, das phosphorylierte Kohlenhydrat selbst mit Alkohol niederzuschlagen, wobei das gleichzeitig entstandene Chlorcalcium als in Alkohol leicht lösliche Verbindung entfernt wird. Bei einem einfachen Zucker vollzieht sich die Reaktion nach der Gleichung:



¹⁾ C. Neuberg und H. Pollak, diese Zeitschr. 23, 515; 26, 514 und 529, 1910; Ber. 43, 2060, 1910; vgl. auch C. Neuberg und Kretschmer, diese Zeitschr. 36, 5, 1911.

Die von E. Fischer¹⁾ vorgeschlagene Modifikation dieser Phosphorylierung gestattet eine bessere Ausnutzung des Phosphoroxychlorids durch Vornahme der Operation in wasserfreiem Pyridin; aber ihre Anwendbarkeit ist beschränkt auf die in Pyridin löslichen Zuckerarten, während die Stärke von diesem Solvens nicht aufgenommen wird. Das von K. Langheld²⁾ angegebene Verfahren der P-Einführung mittels Metaphosphorsäureäthylesters kam gleichfalls nicht in Betracht, da es die Löslichkeit des Zuckers in metaphosphorsaurem Äthyl oder die Umwandlung des Kohlenhydrats in einen Sirup durch Schmelzen zur Voraussetzung hat.

Außerdem steht nach einer Reihe von Erfahrungen für das Neubergsche Verfahren fest, daß es die Anbringung der Phosphorsäure an solchen Stellen der zu phosphorylierenden Substanzen bewirkt, daß die Reaktionsprodukte eine physiologische Dignität aufweisen, wie in ihrem Verhalten gegenüber Fermenten zum Ausdruck kommt. So sind die nach Neuberg phosphorylierten Zuckerarten noch von den natürlichen Agenzien, den Phosphatasen, spaltbar sowie infolgedessen auch vergärbar, und die phosphorylierten Proteine und Albumosen bzw. Peptone werden noch von den Verdauungsfermenten zerlegt.

Zur

Darstellung der phosphorylierten Stärke

verfuhr ich folgendermaßen:

Versuch 1. 6 g lösliche Stärke (Kahlbaum) wurden in 150 ccm heißen Wassers gelöst. Die nach dem Erkalten leicht getrübe Flüssigkeit wurde sodann mit 24 g CaCO_3 versetzt; unter Eiskühlung sowie starkem Turbinieren wurde nunmehr tropfenweise eine Lösung von 5 ccm Phosphoroxychlorid in 10 ccm reinem Chloroform hinzugegeben. Nach 6- bis 8stündigem Rühren blieb die Flüssigkeit noch über Nacht stehen und wurde am anderen Morgen mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, zentrifugiert, außerdem filtriert und bei 35 bis 40° auf 50 ccm eingeengt. Diese Lösung wurde mit 150 ccm absoluten Alkohols versetzt, wobei sofort eine reichliche Fällung eintrat. Nach 24stündigem Absitzenlassen wurde dekantiert,

¹⁾ E. Fischer, Sitzungsber. d. Preuß. Akad. d. Wiss. **34**, 905, 1914; Ber. **47**, 3193, 1914.

²⁾ K. Langheld, Ber. **43**, 1857, 1910; **45**, 3753, 1912.

mehrmals mit Alkohol gewaschen und abgeseugt. Da der Niederschlag sich noch als stark chlorhaltig erwies, wurde er in 50 ccm heißen Wassers wieder gelöst und abermals mit 150 ccm Alkohol gefällt. Die so erhaltene Substanz enthielt nur noch Spuren von Chlor (eingeschlossenes Chlorcalcium). Sie wurde über konzentrierter Schwefelsäure im Vakuum getrocknet.

Reaktionen der wäßrigen Lösung des Calciumsalzes von phosphorylierter Stärke: Die ganz leicht opalisierende wäßrige Lösung reagiert neutral gegen Phenolphthalein, schwach alkalisch gegen Lackmus; Magnesiamixtur gibt keine Fällung, ebensowenig Ammoniummolybdat, auch nicht beim Kochen der salpetersauren Lösung. Zerstört man jedoch die organische Bindungsform nach den Angaben von Neuberg und Mandel¹⁾ durch Abdampfen der Lösung mit einigen Kubikzentimetern Wasserstoffsuperoxyd sowie mehreren Tropfen starker Salpetersäure unter Zusatz einer Spur Eisennitrat, so erhält man kräftige Reaktionen auf anorganische Phosphorsäure. Das Vorliegen eines Calciumsalzes ergibt sich durch die Fällbarkeit mit Ammoniumoxalat in essigsaurer Lösung. Die Lösung zeigt die Jodreaktion wie reine Stärke²⁾. Fehlingsche Mischung wird in der Siedehitze spurenhafte reduziert.

Zu den folgenden Darstellungsversuchen stand mir das sehr reine Kahlbaumsche Stärkepräparat leider nicht mehr zur Verfügung; ich verwendete eine lösliche Stärke von Merck, die einen kleinen Gehalt an Dextrin aufwies, aber trotzdem mit dem gleichen Erfolge phosphoryliert werden konnte. Hierbei wurden dem kohlensauren Kalk noch 10% Ätzkalk zur beschleunigten Abstumpfung der sauren Reaktion zugesetzt.

Versuch 2. 30 g lösliche Stärke wurden in 750 ccm heißen Wassers gelöst und nach dem Erkalten in gleicher Weise, wie bei 1. beschrieben, mit 25 g Phosphoroxychlorid in 75 ccm Chloroform behandelt. Die Flüssigkeit wurde nach Zentrifugieren und Filtrieren bei ca. 35° auf 100 ccm konzentriert³⁾,

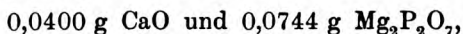
¹⁾ C. Neuberg und J. A. Mandel, diese Zeitschr. 71, 196, 1915.

²⁾ Letztere war auch noch beigemischt.

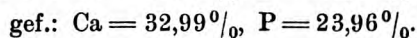
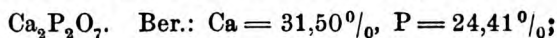
³⁾ Ein Einengen auf ein noch kleineres Volumen empfiehlt sich nicht, weil sonst unfiltrierbare schmierige Massen beim Zusatz des Alkohols ausfallen.

mit 300 cem absolutem Alkohol gefällt und mehrmals umgelöst. Auf diese Weise wurden 15 g fast völlig chlorfreie Stärkephosphorsäure-Calciumverbindung erhalten.

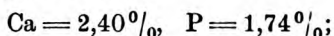
1,1905 g Substanz wurde bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und im Platintiegel verascht. Die resultierenden 0,0864 g Asche ergaben



entsprechend 0,0285 g Ca und 0,0207 g P.



Gefunden auf Ausgangssubstanz:



theoretisch würde 1,74% P einem Quantum von 2,24% Ca entsprechen. Der etwas größere Gehalt an Calcium erklärt sich durch die geringe Menge eingeschlossenen Calciumchlorids, die auch bei häufig wiederholter Umfällung sich nicht vollständig entfernen ließ. Im übrigen folgt aus der Analyse das Vorliegen eines Monocalciumsalzes einer substituierten Phosphorsäure.

Das Bleisalz der Stärkephosphorsäure: 2,4 g lufttrockenes Calcium-Amylophosphat wurden mit einem kleinen Überschuß von Ammoniumoxalat behandelt und nach 24stündigem Stehen abfiltriert. Die klare Lösung wurde mit Bleiacetat versetzt, von der dadurch hervorgerufenen Fällung durch Filtration befreit und bei niedrigerer Temperatur auf 10 cem eingengt, dann abermals filtriert und mit der 4fachen Menge abs. Alkohols gefällt. Nach 24stündigem Stehen wurde abgesaugt und mit Alkohol ausgewaschen. Die wäßrige Lösung der so erhaltenen Substanz gab positive Stärkereaktion und erwies sich als frei von anorganischer Phosphorsäure bei starkem Gehalte an organischem Phosphor. Zur weiteren Reinigung wurde das Salz nochmals in wenig heißem Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt. Auf diese Weise wurde 1 g exsiccator-trockene Bleiverbindung erhalten.

Analyse: Eine vollständige Zerstörung der organischen Substanz gelingt auch bei tagelangem Kochen mit rauchender Salpetersäure im Glasschliffkolben am Rückflußkühler schwer. Deshalb wurde der Körper unter Zusatz von Ammoniumnitrat

vorsichtig verascht. 0,3904 g der Bleiverbindung ergaben

0,0845 g PbSO_4 und 0,0305 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$,

entsprechend . . 0,0577 g Pb und 0,0085 g P;

= 14,77% Pb und 2,17% P.

Theoretisch sind 0,0577 g Pb und 0,0086 g P äquivalent.

Ein Wert der Erklärung bedarf noch die Menge des bei der Bereitung angewendeten Phosphoroxchlorids. Sie ist so berechnet, als ob die in Arbeit genommene Stärkemenge der einfachen Formel $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$, und nicht einem polymolekularen Werte entspräche. Eine Erhöhung der Phosphoroxchloridmenge auf das Doppelte führte zu schwer filtrierbaren gelatinösen Massen, die viel Chlorcalcium einschlossen und nicht von anorganischen Beimengungen zu befreien waren. Von der Wiedergabe der diesbezüglichen Ansätze nehme ich daher Abstand.

Die Anwendung des Verfahrens auf die Stärke ergibt nun nicht wie bei den einfachen Zuckerarten einen Phosphorsäureester, der frei vom Ausgangsmaterial ist; denn durch Alkohol wird unveränderte Stärke zusammen mit dem phosphorylierten Reaktionsprodukte ausgefällt. Daß jedoch ein nicht unerheblicher Teil einer wirklichen Amylophosphorsäure in meinem Produkt enthalten war, folgt aus dem Verhalten beim Abbau.

1. Versuche zum Abbau mit Mineralsäuren.

a) 1 g Calciumamylophosphat wurde in 18 ccm Wasser gelöst und mit 2 ccm 25%iger Salzsäure versetzt. Nach 20 Minuten langem Stehen im Wasserbade ergaben sich starke Reduktion von Fehlingscher Mischung, negativer Ausfall der blauen Jodprobe und positive Reaktionen auf freie Phosphorsäure. Die Substanz war also schon weitgehend abgebaut und gespalten.

b) 1 g Substanz, in 100 ccm Wasser gelöst, wurde mit 1 ccm 25%iger Salzsäure versetzt und 48 Stunden bei 37° belassen. Die Stärkereaktion war noch stark positiv. Nach 3stündigem Erwärmen auf dem Wasserbade blieb die Jodprobe aus. Es zeigte sich mäßig starke Reduktion von Fehlingscher Mischung und deutliche Reaktion auf freie Phosphorsäure.

c) 5 g Calciumsalz wurden in 500 ccm Wasser unter Zusatz von 5 ccm 25%iger Salzsäure gelöst und auf dem Wasserbade erwärmt.

Nach 30 Minuten Stärkereaktion positiv,
 „ 1 1/2 Stunden Stärkeabbau bis Dextrin,
 „ 2 „ Dextrinreaktion,
 „ 4 „ „

Die Flüssigkeit reduzierte Fehlingsche Mischung kaum. Sie wurde mit kohlen saurem Kalk neutralisiert, filtriert und bei 40° auf 10 ccm eingeengt, darauf mit Alkohol gefällt. Es schied sich ein schmieriges Produkt aus; auch Fällung in verdünnter Lösung lieferte kein besseres Resultat. Daher wurde der Alkohol im Vakuum abdestilliert und die übrig gebliebene Masse in Wasser gelöst. Mit Silberacetat wurde das Chlor quantitativ entfernt und die filtrierte Lösung bei niedriger Temperatur wieder auf 10 ccm konzentriert. Nach Fällung mit Bleiessig wurde abgesaugt und der gut ausgewaschene Niederschlag nach sorgfältigem Verreiben mit Schwefelwasserstoff behandelt. Das Filtrat war stark sauer, zeigte sich frei von anorganischer Phosphorsäure bei starkem Gehalte an organisch gebundenem Phosphor. Fehlingsche Lösung wurde nur in geringem Grade reduziert.

In diesen Versuchen ist es nicht befriedigend gelungen, durch Hydrolyse mit verdünnten Mineralsäuren das Amylophosphat zu einer einfachen Zucker-Phosphorsäure abzubauen. Stärkere Säuren spalteten Phosphorsäure in beträchtlichem Maße ab.

2. Abbau durch Diastase.

Im Gegensatz zu den Abbauprobieren mit Mineralsäuren führte die fermentative Hydrolyse mittels Taka-Diastase zu einem wohldefinierten Produkt. Das zur Verwendung gelangende Enzympräparat war außerordentlich wirksam. Die in ihm vorhandene kleine Menge anorganischen Phosphats sowie reduzierenden Zuckers konnte vernachlässigt werden, da durch die spätere Verarbeitung diese Beimengungen in Fortfall kamen. Die Einwirkung der Diastase auf die phosphorylierte Stärke gestaltete sich dann folgendermaßen:

10 g stärkephosphorsaures Calcium wurden in 1 l Wasser gelöst, mit 3 g Diastase versetzt und in einen Brutschrank von 37° gestellt. Nach 24 Stunden war die Jodstärkereaktion verschwunden, Os tsche Kupferbicarbonatlösung wurde schwach

reduziert. Es wurde jetzt noch 1 g Diastase hinzugefügt und zur Konservierung 10 ccm Toluol hinzugegeben. Nach weiteren 12 Tagen wurde das Gemisch mit 6 g kohlelsaurem Kalk 1 Stunde auf dem Wasserbade erwärmt, filtriert, bei 40° unter Zugabe von 0,3 g CaCO₃ auf 25 ccm eingengt und mit absolutem Alkohol ausgefällt. Nach mehrmaliger Umlösung wurde abgesaugt und im Exsiccator getrocknet. Ausbeute: 1,2 g.

Analyse: 0,3023 g ergaben 0,1225 g Asche (Calciumpyrophosphat), die 0,0569 g CaO und 0,1032 g Mg₂P₂O₇ lieferte, entsprechend 0,0406 g Ca und 0,0288 g P. Der Wassergehalt ließ sich nicht direkt ermitteln, da Bläunung der Verbindung eintrat.

Für reines Glucosemonophosphat berechnet sich:



$$Ca_2P_2O_7 = 40,19\%; \text{ Ca} = 12,66\%; \text{ P} = 9,81\%;$$

$$\text{gefunden: } Ca_2P_2O_7 = 40,52\%; \text{ Ca} = 13,43\%; \text{ P} = 9,54\%.$$

Die Übereinstimmung ist befriedigend.

Die so erhaltene Substanz ist in heißem Wasser leicht und klar löslich, reagiert gegen Lackmus deutlich alkalisch, gegen Phenolphthalein neutral. Bleiesig fällt aus der wäßrigen Lösung einen dicken weißen Niederschlag, der in Essigsäure löslich und durch Ammoniak aus dieser Lösung wieder ausfällbar ist. Bleizucker gibt keinen Niederschlag, ebenso wenig Kupfer- und Quecksilberacetat. Gesättigtes Barytwasser erzeugt eine weiße flockige Ausscheidung, entsprechend verhält sich Chlorbarium und Ammoniak. Chlorcalcium und Ammoniak geben eine unvollständigere Fällung. Die Substanz ist rechtsdrehend, die 25%ige Lösung dreht + 0,35° im 2-dm-Rohr. Mit Hefe (obergäriger, Rasse M) tritt langsam Gärung ein. Offenbar wird erst die Phosphorsäure losgelöst. 0,25 g Substanz in 20 ccm H₂O gaben mit 1 g Hefe nach 5 Stunden noch kein Gas, nach 22 Stunden aber 12 ccm CO₂ und nach 46 Stunden 17,5 ccm. Durch Selbstgärung von 1 g Hefe mit 20 ccm Wasser entstanden in der gleichen Zeit im ganzen 0,2 ccm CO₂. In 0,75%iger Zuckerlösung bewirkte die Hefe normale Gärung.

Es mag hervorgehoben werden, daß die beim diastatischen Abbau des Amylophosphats erhaltene einfache Kohlenhydratphosphorsäureverbindung als Hexosemonophosphat sich erwiesen hat und nicht als Maltoseabkömmling, obgleich doch die meisten Diastasesorten an sich aus Stärke vorwiegend Malzzucker, aber

weniger Glucose erzeugen. Es ist wohl anzunehmen, daß durch die Einführung des Phosphorsäurerestes Änderungen im Stärkemolekül eintreten, die diese Abweichung zur Folge haben können.

Zum Schlusse sei noch bemerkt, daß sich dasselbe Verfahren auf zwei wichtige, der Stärke nahestehende, natürlich vorkommende Polysaccharide anwenden läßt, auf das Inulin sowie auf das Glykogen. In beiden Fällen konnte der Phosphorsäureester dieser Kohlenhydrate auf dem gleichen Wege isoliert werden; beide Male gelang die Darstellung von Substanzen, die frei von Chlorcalcium und anderen anorganischen Begleitstoffen waren. Die genaue Untersuchung mußte jedoch wegen der schwierigen Materialbeschaffung während des Krieges unterbleiben; sie soll aber ebenso wie die Beschäftigung mit der synthetischen Stärkephosphorsäure fortgesetzt werden.

Zusammenfassung.

Es liegen Anhaltspunkte dafür vor, daß die im Haushalte der Natur so außerordentlich wichtige Stärke Phosphor in organischer Bindung enthält, und zwar in Gestalt eines Kohlenhydratphosphorsäureesters. Die Herausschälung einer einheitlichen Kohlenhydratphosphorsäure aus der natürlichen Stärke ist bisher nicht gelungen. Um die Eigenschaften einer solchen Amylophosphorsäure kennen zu lernen, habe ich die künstliche Anreicherung der Stärke an Phosphor durch Phosphorylierung nach dem Neubergschen Verfahren ausgeführt. Die in Form des Kalksalzes näher untersuchte Stärkephosphorsäureverbindung konnte durch diastatischen Abbau in Hexosemonophosphorsäure übergeführt werden, die ebenfalls als Kalksalz abgeschieden, in analysenreinem Zustande erhalten worden und durch Hefe vergärbar befunden ist.

Zur Frage nach der Entstehung und Spezifität bakteriolytischer Immunkörper¹⁾.

Von

F. Röhmann †.

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts
der Universität zu Breslau.)

(Eingegangen am 20. Juli 1919.)

Eine der rätselhaftesten Erscheinungen im Geschehen des lebenden, tierischen Organismus ist es, daß er auf Stoffe, die unter Umgehung des Darmkanals in die Blut- oder Lymphbahn gelangen, mit der Bildung von Substanzen antwortet, deren Eigenschaften in einer gewissen, engen Beziehung zu denen der eingeführten Stoffe stehen. Nach Einführung eines „Antigens“ entsteht ein spezifischer „Antikörper“. Der Vorgang erregt das Interesse ganz besonders deshalb, weil er in gewissen Fällen dazu führt, dem Organismus einen Schutz gegen Schädlichkeiten zu gewähren, die ihn von der Außenwelt her bedrohen. Die Schutzwirkung in den Vordergrund der wissenschaftlichen Betrachtung zu stellen, ist aber meiner Ansicht nach nicht berechtigt; denn die Reaktion, die im Körper auf die parenterale Injektion eines Stoffes erfolgt, führt nicht immer zur Bildung eines Schutzes, die Reaktion kann auch für den Organismus schädlich sein.

Und wäre letzteres auch nicht der Fall, so ist doch mit der Aussage, daß die Bildung der Antikörper eine Einrichtung sei zu dem Zwecke, den Organismus gegen die Wirkung „körper- oder blutfremder Stoffe“ zu schützen, für das Verständnis des Vorganges an sich nicht das Geringste gewonnen.

¹⁾ Vortrag, gehalten in der Schlesischen Gesellschaft für vaterländische Kultur zu Breslau am 9. Mai 1919.

Aufgabe der Forschung kann es nur sein, die Vorgänge, die nach der parenteralen Zufuhr von Antigenen im Körper stattfinden, bis in ihre Einzelheiten genau zu verfolgen und zu zeigen, in welcher Beziehung sie zu dem gewöhnlichen Geschehen in den Zellen der Organe stehen.

Eine Vorstellung, durch welche die Bildung der Antikörper mit physiologischen Vorgängen verknüpft wird, liefert uns die „Seitenkettentheorie“ P. Ehrlichs. Sie besagt: Die „Antigene“ treten in eine Beziehung zum „Protoplasma“ der Zelle. Sie besitzen „haptophore Gruppen“, durch die sie mit gewissen „Seitenketten“ des Protoplasmas, den „Receptoren“, verankert werden. Diese „Besetzung der Receptoren“ veranlaßt die Bildung neuer Receptoren, und zwar nicht in der Menge, wie sie durch die Bindung an das Antigen ausgeschaltet wurde, sondern eine Bildung im Übermaß. Diese neugebildeten Receptoren werden vom Protoplasma nicht festgehalten, sie werden abgestoßen und gelangen als Antikörper in das Blut. Durch die Annahme eines „Zellreceptors“ und der auf ihn passenden „haptophoren Gruppe“ des Antigens ist aber über das Wesen des Antikörpers nichts ausgesagt, und auch die Vorstellung, daß die Besetzung des Receptors durch eine „Überkompensation der ausgefallenen Protoplasma Wirkung“ zur Produktion einer übergroßen Menge von Zellreceptoren und deren Abstoßung in das Blut führe, kann auf die Dauer nicht befriedigen. In der Tat sind schon verschiedene Versuche gemacht worden, um die Ehrlichschen Anschauungen zu erweitern oder durch andere zu ersetzen. Es mag auch mir gestattet sein, eine Hypothese zu entwickeln, deren Aufgabe es sein soll, neue Gesichtspunkte für das Verständnis der Bildung und der Eigenschaften gewisser Antikörper zu gewinnen. Sie erstreckt sich zunächst nur auf die Bildung der bakteriologischen Immunkörper und ihre Spezifität.

Ich gehe aus von Beobachtungen, die ich zum Teil in Gemeinschaft mit Kumagai bei der parenteralen Zufuhr von Rohrzucker gemacht habe. Spritzt man nämlich einem trächtigen Kaninchen größere Mengen von Rohrzucker unter die Haut, so wirkt der Rohrzucker als Antigen. Nach Verlauf einiger Tage zeigt das Blut die Eigenschaft, auf den Rohrzucker in charakteristischer Weise einzuwirken. Der Rohrzucker

wird gespalten. Weiterhin werden die hierbei entstehende Dextrose sowie Lävulose in Milchzucker verwandelt. Gleichzeitig ist die Wirkung des Blutes auf Stärke gegenüber der Norm in ganz außerordentlich hohem Grade gesteigert. Es handelt sich um die Wirkung verschiedener Fermente, die für gewöhnlich nicht im Blut vorhanden sind, aber nach der parenteralen Einführung von Rohrzucker im Blute erscheinen. Da nun die Dünndarmschleimhaut zu allen Zeiten Auszüge liefert, die Rohrzucker kräftig spalten, da ferner Extrakte des Pankreas, der Dünndarmschleimhaut u. a. die Stärke diastasierend und die milchzuckerbildenden Fermente in den Extrakten der Milchdrüse während der letzten Zeit der Trächtigkeit und während der Säugungszeit nachweisbar sind, so kann man annehmen, daß der Rohrzucker als „Reiz“ auf diese Organe wirke, so daß die entsprechenden Fermente aus den Drüsen aus- und in das Blut übertreten. Die Wirkung dieses Reizes tritt nicht sofort in die Erscheinung, denn es dauert erst eine Reihe von Tagen, ehe die Fermente im Blute nachweisbar sind. Und wochenlang, nachdem der Reiz gewirkt hat, tritt immer noch neues Ferment in das Blut über. Wie kann man sich dies erklären?

Auf Grund von Versuchen, die ich als bekannt voraussetzen will, nimmt man an, daß das Ferment bei seiner Wirkung mit dem Substrat eine lockere Verbindung eingeht, die im weiteren Verlaufe der Reaktion unter Bildung der betreffenden Reaktionsprodukte zerfällt. Das Ferment bildet sich zurück und vermag neue Moleküle des Substrats zu zerlegen. Im Gegensatz zu anderen katalytischen Vorgängen führen aber die Fermentwirkungen zu einem „falschen Gleichgewicht“. Wenn nämlich die Fermentwirkung ihr Ende erreicht hat, so ist das Substrat nicht vollständig zersetzt, und der Katalysator, das Ferment, ist nicht mehr in derselben Menge vorhanden, wie zu Beginn der Reaktion. Die Flüssigkeit enthält vielmehr neben einer kleinen Menge unzersetzter Substanz noch eine Verbindung des Substrats bzw. einer seiner Zersetzungsprodukte mit dem Ferment. Das ist besonders für das Invertin bei seiner Einwirkung auf Rohrzucker mit einer an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit nachgewiesen worden.

Die Spaltung des Rohrzuckers durch Invertin ist eine notwendige Voraussetzung für die Verwertung des Rohrzuckers im Körper. Wenn Rohrzucker nach der Einführung vom Munde aus im Darmkanal aufgesaugt wird, so findet er in den Darmzellen eine gewisse Menge dieses Ferments. Er wird gespalten. Die Spaltungsprodukte verschwinden aus der Zelle, um vom Blutstromen den Organen des Verbrauchs zugeführt zu werden. In den Zellen der Darmschleimhaut bleibt eine wenn auch sehr kleine Menge von Rohrzucker bzw. seinen Spaltungsprodukten an Invertin gebunden zurück. Die Menge des Invertins, die zu Anfang der Zuckerresorption in den Darmzellen vorhanden war, ist also offenbar um eine gewisse kleine Menge vermindert. Dadurch ist aber das chemische Gleichgewicht in der Zelle gestört. Es muß alsbald wiederhergestellt werden, und dies geschieht, wie ich annehme, dadurch, daß die Verbindung von Invertin mit einem der Spaltungsprodukte des Rohrzuckers als Katalysator auf die invertinbildenden Elemente der Zelle wirkt und den Ersatz der unwirksam gewordenen Fermentmenge herbeiführt. Dieser Vorgang ist genau abgestimmt auf die Menge von Rohrzucker, die vom Darm aus resorbiert wird. Die Größe dieser Resorption ist geregelt und begrenzt durch die „Lebenstätigkeit“ der resorbierenden Zellen.

Die Ordnung dieser Vorgänge wird gestört, wenn Rohrzucker mit Umgehung des Darmkanals in den Körper eingeführt wird. Während hierbei die Hauptmenge des Rohrzuckers ungenutzt durch die Nieren ausgeschieden wird, gelangen gleichzeitig ungewöhnlich große Mengen von Rohrzucker auf ungewöhnlichem Wege in die Darmzellen. Der in die Zelle eingedrungene Rohrzucker trifft auch jetzt mit dem Invertin zusammen und tritt mit ihm in Wechselwirkung. Es erfolgt die Spaltung des Rohrzuckers und die Entfernung der Spaltungsprodukte. Zum Schluß bildet sich wieder die Verbindung von Invertin mit dem Rohrzucker bzw. seinen Spaltungsprodukten, es entsteht der invertinbildende Katalysator, diesmal aber in größerer Menge als bei der Resorption vom Darm aus. Das ist von besonderer Bedeutung. Denn nun führt der Katalysator allmählich zur Bildung größerer Mengen von Invertin, die nicht mehr in der Zelle bleiben,

sondern in das Blut gelangen. Einmal gebildet, wirkt der Katalysator noch lange weiter, nachdem der Rohrzucker, dem er seine Bildung verdankt, schon längst den Körper verlassen hat, bis er früher oder später durch irgendwelche Vorgänge in der Zelle auf seine normale Menge zurückgeführt wird. Vergleichen wir diese Hypothese mit der Seitenkettentheorie P. Ehrlichs. Die Bindung des Rohrzuckers an das Invertin entspricht etwa der Bindung des Antigens an den „Receptor“ der Zelle. Hier wie dort handelt es sich um einen ganz bestimmten Zellbestandteil, der nur mit einem ganz bestimmten der Zelle zugeführten Stoffe in Verbindung tritt. Der Receptorenschwund, in meinem Falle die Festlegung einer bestimmten Menge von Ferment, ist auch bei mir die Ursache für die Neubildung des „Receptors“. Für diese Neubildung ebenso wie für das Übermaß, mit dem sie erfolgt, gebe ich eine Erklärung, die sich auf bekannte Gesetze der Chemie stützt, während P. Ehrlich nur ganz allgemein von einer Kompensation und Überkompensation sprach.

In ähnlicher Weise könne man auch das Auftreten peptolytischer Fermente im Blut nach der parenteralen Zufuhr von Eiweißstoffen erklären. Schon vor längerer Zeit, bei seinen ersten Choleraarbeiten, nahm Richard Pfeiffer an, daß die Wirkung bakteriolytischer Immunsera sich in der Weise erkläre, daß die spezifischen Amboceptoren Zymogene seien, die durch das Komplement aktiviert werden und durch eine Art Verdauung die Bakterien zum Zerfall bringen. Die Verdauung von Bakterien und die Bildung giftiger Produkte durch die Immunsera spielt ferner eine große Rolle in der Anaphylaxiefrage. Später hat sich auch E. Abderhalden unter dem Gesichtspunkte seiner Abwehrtheorie nachzuweisen bemüht, daß der Organismus auf die Einführung „blut- oder körperfremder“ Eiweißstoffe mit der Bildung von eiweißabbauenden Fermenten reagiert. Nach seinen Angaben soll das Blutserum schon kurze Zeit nach der subcutanen oder intravenösen Injektion selbst geringer Mengen von Peptonen die Fähigkeit erlangen, Peptone zu spalten.

Was die Herkunft dieser Fermente betrifft, so hat man zeitweise daran gedacht, daß diese Fermente überwiegend oder gar ausschließlich von Leukocyten gebildet werden.

Aber die bakteriologischen Immunkörper scheinen im Knochenmark zu entstehen, und auch andere Organe können die Bildungsstätte der eiweißverdauenden Fermente des Blutserums sein.

Wissen wir doch seit den grundlegenden Beobachtungen von E. Salkowski, daß die Extrakte der Organe neben anderen Fermenten auch solche enthalten, die Eiweißstoffe in sehr ähnlicher, wenn auch vielleicht nicht in ganz gleicher Weise verdauen, wie dies im Darm durch das Trypsin des Pankreassekretes geschieht.

Nehmen wir nun an, daß ein parenteral zugeführter Eiweißkörper in ähnlicher Weise wirkt, wie der parenteral zugeführte Rohrzucker, so würde das Auftreten eiweißzersetzender Fermente im Blut sich in ähnlicher Weise erklären wie das der Fermente, die auf den Rohrzucker und seine Spaltungsprodukte einwirken, nämlich durch einen „Reiz“, den der betreffende Eiweißstoff innerhalb der entsprechenden Zellen auf die fermentbildenden Elemente ausübt. Ein Eiweißstoff gelangt von der Blutbahn aus in größerer Menge, als dies sonst der Fall ist, in eine Zelle; er findet dort das Ferment, durch das er gespalten wird. Die Eiweißspaltungsprodukte verlassen die Zelle fast vollständig. Nach Ablauf der Reaktion enthält die Zelle in kleiner Menge die Verbindung von Ferment mit einem Spaltungsprodukte des eingespritzten Eiweißkörpers. Sie wirkt als Katalysator auf die fermentbildenden Bestandteile der Zelle. Da der Katalysator sich in größerer Menge gebildet hat, als dies in der Norm zu geschehen pflegt, so entsteht auch eine größere Menge von Ferment, das nicht mehr in der Zelle bleibt, sondern in die Blutbahn hineingelangt. Daß in manchen Fällen, und zwar gerade bei den bakteriolytischen Immunkörpern, im Blut nicht ein fertiges Ferment, sondern ein Zymogen erscheint, sei als unwesentlich für die Beurteilung meiner Hypothese betrachtet. Auch das Pankreas scheidet nicht das fertige Ferment ab, sondern das Zymogen.

Bei den peptolytischen Fermenten spielt aber, besonders im Hinblick auf die bakterielle Immunität, neben der Frage nach der Herkunft und Entstehung der Fermente, eine vielleicht noch größere Rolle die Frage ihrer Spezifität. Was im

vorliegenden Falle Spezifität ist, macht man sich wieder am besten klar an den zuckerspaltenden Fermenten. Rohrzucker wird bekanntlich nur gespalten von Invertin (Saccharase), Milchsucker durch Laktase, Maltose durch Maltase. Jedem Disaccharid entspricht ein zugehöriges, ein spezifisches Ferment. Das Verständnis für diese Tatsache ist uns erschlossen worden, seitdem uns die Untersuchungen von E. Fischer gezeigt haben, daß das verschiedene Verhalten zu den Fermenten einem verschiedenen Bau der Zuckerarten entspricht. Nicht nur die Art, wie die in jedem Disaccharid enthaltenen Hexosenmoleküle miteinander verknüpft sind, ist entscheidend für die Spaltbarkeit durch das Ferment, sondern auch die räumliche Lagerung der im übrigen in gleicher Weise verbundenen Atome. Diese Beziehung zwischen Ferment und Substrat drückt E. Fischer durch das bekannt gewordene Bild aus: es passe das Ferment auf das Substrat wie der Schlüssel zum Schloß.

Haben wir es mit einem Trisaccharid zu tun, so gibt es zwei verschiedene Orte für den Angriff von Fermenten. Die Raffinose z. B., die aus einem Molekül d-Galaktose, d-Glucose und d-Fructose aufgebaut ist, wird durch Emulsin zwischen Galaktose und Glucose gespalten. Es entsteht dabei nach C. Neubergs wichtiger Feststellung Galaktose und Rohrzucker. Invertin dagegen spaltet die Raffinose in Fructose und Melibiose.

Galaktosido-Glykosido-Fructose (Raffinose):

durch Emulsin in Galaktose und Glucosido-Fructose (Rohrzucker),
durch Invertin in β -Galaktosido-Glucose (Melibiose) und Fructose.

Die Fermente können also auch dann zwischen zwei bestimmte, in besonderer Weise miteinander verbundene Atomgruppen eingreifen, wenn sich die entsprechende Gruppierung nicht in der einfachsten, sondern auch in zusammengesetzter Verbindung befindet.

Hieraus ergibt sich eine wichtige, praktische Folgerung: Wenn man von dem Bau des Rohrzuckers und der Raffinose nichts Näheres wüßte, so würde man aus der Tatsache, daß beide Zucker von Invertin gespalten werden, schließen, daß das Invertin nicht spezifisch wirke. Oder benutzte man zur Prüfung der Fermentwirkung nur Raffinose, so würde man unter Umständen, wenn man nur auf Reduktionsvermögen untersuchte.

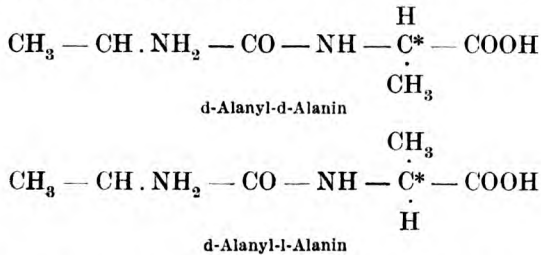
schließen, daß eine emulsin- und eine invertinhaltige Flüssigkeit dasselbe Ferment enthalten. Denn in beiden Fällen entstehen aus der nicht reduzierenden Raffinose reduzierende Zucker. Die Gefahr solcher Trugschlüsse wächst mit der Zahl der verschiedenen Atomgruppen, aus denen das Molekül aufgebaut ist, und den Fermenten, die sich in der zu untersuchenden Flüssigkeit befinden. Und das ist in höchstem Maße der Fall, wenn wir es mit Eiweiß und eiweißzerlegenden Fermenten zu tun haben.

Pepsin verdaut bei Gegenwart von Salzsäure die Eiweißstoffe unter Bildung von „Albumosen und Peptonen“ (Peptide). Trypsin greift die Eiweißstoffe in ganz anderer Weise an und spaltet Peptide unter Bildung einfacher krystallinischer Produkte (Aminosäuren). Beide sind voneinander unzweifelhaft verschieden insofern aber jedes von ihnen die verschiedensten Eiweißstoffe bzw. die verschiedensten Albumosen und Peptide zerlegt, scheinen Pepsin und Trypsin nicht spezifisch zu wirken. Das ist aber höchst wahrscheinlich ein solcher Trugschluß. Vermutlich sind nämlich Pepsin und Trypsin Gemische einer vielleicht überaus großen Zahl verschiedener Fermente und die Wirkung von Pepsin und Trypsin erscheint nur deswegen nicht spezifisch, weil jeder der verschiedenen Eiweißstoffe Bindungen enthält, welche die zu ihrer Lösung erforderlichen Fermente in den Fermentgemischen finden, die wir als Pepsin bzw. Trypsin bezeichnen. Es entstehen dann aus den verschiedenen Eiweißstoffen äußerlich sehr ähnliche, in Wirklichkeit aber höchst wahrscheinlich nicht gleiche Zersetzungsprodukte. Zu einer solchen Annahme werden wir gezwungen, wenn wir die bei den Sacchariden gemachten Erfahrungen folgerichtig auf die Eiweißkörper übertragen.

Sehen wir uns die Ergebnisse an, die E. Fischer und E. Abderhalden bezüglich der Einwirkung von Trypsin auf künstlich dargestellte Peptide erhalten haben. Da sehen wir, wie nur ganz bestimmte Peptide von dem Trypsin gespalten werden. Von Bedeutung ist, wie die Atome miteinander verknüpft sind: Alanyl-glycin $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO} \cdot \text{NHCH}_2\text{COOH}$ wird gespalten, Glycyl-a.-arin $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$ ist nicht spaltbar.

Von Bedeutung ist ferner, wie bei den Zuckerarten, die Konfiguration, d. h. die räumliche Lagerung der Atome inner-

halb des Moleküls. d-Alanyl-d-Alanin wird gespalten, d-Alanyl-l-Alanin wird nicht gespalten:



Andere Beobachtungen zeigen, daß auch die Art der in dem Peptid enthaltenen Atomgruppen nicht ohne Einfluß ist. Das Alanin-, Tyrosin-, Isoserinradikal, letztere besonders, wenn sie am Ende der Peptidkette stehen, begünstigen die Spaltung. Die Spaltbarkeit nimmt in gewissen Fällen mit der Länge der Kette zu usw. Kurz es finden sich eine Reihe von Beziehungen zwischen der Wirksamkeit des Trypsins und dem Aufbau der Peptidmoleküle. Aber sie zeigen sich nur darin, daß gewisse Peptide spaltbar sind, andere nicht.

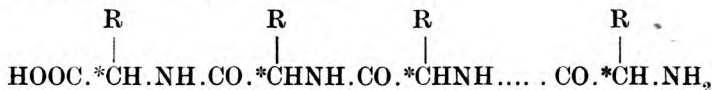
Nach Analogie mit der Erfahrung bei den Zuckerarten müssen wir jedoch eine sehr viel weitergehende Spezifität erwarten. Wir müssen erwarten, daß die verschiedenen Peptide, die der Spaltung unterliegen, auch von verschiedenen Fermenten gespalten werden, daß gewisse Dipeptide von einem und andere Dipeptide von einem anderen Fermente gespalten werden, also Alanylglycin und d-Alanyl-d-Alanin nicht von demselben, sondern von verschiedenen Fermenten. Der Nachweis einer solchen Spezifität hat sich bisher nicht erbringen lassen. Abderhalden hat auf eine ganze Reihe verschiedener Peptide außer Trypsin auch Extrakte verschiedener tierischer Organe, Geschwülste, Blut, Extrakte von pflanzlichen Samen, Keimlingen, Pilze und Hefen einwirken lassen, im großen ganzen aber nur feststellen können, daß dieselben Peptide von den verschiedensten tierischen und pflanzlichen Extrakten gespalten werden, eine engere Spezifität in obigem Sinne ist aber bisher nicht mit Sicherheit nachgewiesen, wenngleich sich gewisse Andeutungen einer solchen finden.

Letzteres war auch der Fall bei Versuchen mit Tripeptiden. Wenn z. B. d-Alanyl-Glycyl-l-Leucin fermentartig gespalten wird,

so könnten nach Analogie mit der Raffinose zwei verschiedene Fermente auf dieses Tripeptid einwirken; durch das eine könnten d-Alanin und Glycyl-l-Leucin entstehen, durch das andere d-Alanyl-glycin und l-Leucin. Tatsächlich fand Abderhalden, daß bei gewissen Versuchen in ersterem Sinne Pankreassekret, in letzterem die roten Blutkörperchen wirkten. Auch einige andere ähnliche Beispiele finden sich in seinen Versuchen. Aber E. Abderhalden zieht zwar die Möglichkeit einer strengen Spezifizität in Erwägung, hält es aber andererseits für möglich, daß gewisse Fermente verschiedene Bindungen lösen können, ebenso wie ein Dieterich imstande sei, verschiedene Schlösser zu öffnen. Mit einer solchen Annahme könnte man erklären, warum ein Ferment wie das Trypsin die allerverschiedensten Eiweißstoffe und ihre peptischen Spaltungsprodukte zu zerlegen vermag. Eine derartige Annahme ist sehr bequem, steht aber in einem Widerspruch mit den Erfahrungen bei den Zuckerarten und ist höchst unwahrscheinlich, wenn man die oben angedeuteten Einflüsse des Aufbaues der Peptide auf die Wirkung des Trypsins näher in Erwägung zieht. Ich glaube daher, daß man besonders auch mit Rücksicht auf die Fruchtbarkeit, welche die Annahme einer sehr weitgehenden Spezifizität eiweißspaltender Fermente besitzt, durchaus an ihr festhalten sollte.

Das gilt für die Dipeptide, weiter aber selbstverständlich auch für Peptide, die aus mehr als zwei Aminosäuren aufgebaut sind.

Im Darmkanal wirkt das Trypsin auf unverändertes Eiweiß oder auf die Spaltungsprodukte, die durch Pepsinsalzsäure aus ihm entstanden sind. Die letzteren, die „Albumosen“ oder „Peptone“, besitzen in ihrem ganzen Verhalten — auch in dem Verhalten zu Trypsin — eine so weitgehende Ähnlichkeit mit gewissen von E. Fischer dargestellten Peptiden, daß man ihm beipflichten muß, wenn er annimmt, daß sie vermutlich denselben Bau wie diese besitzen. Sie bestehen aus Aminosäuren, die nach dem Schema



miteinander verbunden sind. R bedeutet ein Radikal, das an verschiedenen Stellen gleich oder verschieden sein kann. Wie

bei den erwähnten Dipeptiden, kann durch Kochen mit Säuren zwischen NH und CO unter Aufnahme der Bestandteile des Wassers eine Spaltung und Bildung von Aminosäuren $\text{HOOC}\cdot\text{CH}(\text{R})\text{NH}_2$ erfolgen.

Nun ist die Zahl der bisher bekannten Aminosäuren, die man aus dem Eiweiß erhalten kann, etwa 20. Die Zahl der Verbindungen, die dadurch entstehen können, daß sie sich in verschiedener Zahl und verschiedener Reihenfolge miteinander verbinden können, ist eine schier unendlich große, besonders wenn man berücksichtigt, daß infolge der Asymmetrie des mit einem Sternchen (*) bezeichneten Kohlenstoffatoms die Lagerung der Atome im Raume des Moleküls eine von Stelle zu Stelle verschiedene sein kann. In welcher Weise die Aminosäuren in den Albumosen, die durch Pepsinsalzsäuren aus dem Eiweiß entstehen, miteinander verbunden sind, und welches der sterische Aufbau des Moleküls ist, entzieht sich bisher vollständig unserer Kenntnis. Auf jedem Fall sind die Albumosen ein kaum trennbares Gemisch verschiedener Peptide.

Kommen diese Peptide mit dem Trypsin zusammen, so zerfallen sie, indem sich Aminosäuren bilden, daneben bleiben aber in der Flüssigkeit noch eine gewisse Menge von Peptiden, von denen wir nicht sagen können, ob sie von vornherein in dem Albumosengemenge enthalten waren, oder aus höheren Polypeptiden durch Abbau entstanden sind. Diese Spaltung erfolgt, wie ich annehme, in der Weise, daß an den verschiedenen Stellen einer Polypeptidkette verschiedene Fermente angreifen. Das Trypsin ist kein einheitliches Ferment, sondern ein Gemisch verschiedener Fermente, von denen ein jedes nur eine ganz bestimmte Bindung zu lösen vermag.

Ähnliches gilt auch für das Pepsin; nur wirkt dieses auf Atomgruppen ein, die in anderer Weise miteinander verbunden sind, als dies bei den Peptiden der Fall ist.

Auch die in den verschiedenen Organen enthaltenen peptolytischen Fermente sind nicht einheitlicher Natur, sondern stellen, wie ich annehme, ein Gemisch verschiedenster Fermente dar. Zum Teil werden sie mehr oder weniger mit dem im Pepsin, zum Teil mit dem im Trypsin enthaltenen übereinstimmen, könnten aber auch von ihnen verschieden sein.

Ein Urteil hierüber zu gewinnen, ist bisher nicht möglich. Wenn E. Abderhalden zur Prüfung der Fermentwirkung so verfährt, daß er auf gewisse Peptone das Blutserum oder die Extrakte von Organen einwirken läßt, so kann er mit den von ihm angenommenen Methoden günstigstenfalls nur feststellen, ob ein solches Pepton überhaupt angegriffen wird oder nicht. Das Ausbleiben einer Spaltung kann in dem betreffenden Falle nicht ohne Wert sein. Aber etwas über die charakteristischen Organfermente erfahren wir auf diese Weise nicht. Wir können aber ihr in anderer Weise näherzukommen versuchen.

Ein Weg hierzu führt über die Immunsera. Injiziert man Eiweißkörper oder Peptone parenteral, so darf man sich nicht wundern, wenn die im Serum erscheinenden Fermente nicht spezifisch sind. Die injizierten Eiweißstoffe werden in die Zellen der verschiedensten Organe gelangen, hier die Bildung einer Reihe der dort schon für gewöhnlich vorhandenen Fermente steigern und ihren Übertritt in das Blut veranlassen. Bringt man jetzt das Serum mit dem injizierten Eiweißstoffe zusammen, so wird man wieder durch Änderungen des Drehungsvermögens oder durch irgendeine andere allgemein anwendbare Methode feststellen können, ob eine Spaltung eintritt oder nicht. Über die Spezifität der Wirkung erfahren wir, auch wenn sie vorhanden ist, wiederum nichts.

Um Sera von einer spezifischen Wirkung zu erhalten, wird man von bestimmten, in ihrem Bau genau bekannten, einfachen Peptiden als Antigenen ausgehen müssen und die Sera eine bestimmte Zeit nach der Injektion auf dieselben oder andere in ihrem Bau genau bekannte Peptide einwirken lassen. Eine Spezifität läge z. B. vor, wenn ein nach Einspritzung von l-Leucyl-d-Alanin gewonnenes Serum nur dieses Peptid spaltet, oder ein Peptid, das die Gruppe l-Leucyl-d-Alanin enthält. Es ist aber durchaus nicht sicher, ob nach der Einspritzung dieses Dipeptids nur das eine Ferment, das auf das Antigen abgestimmt ist, im Serum erscheint. Denken wir an die Folgen der Rohrzuckereinspritzung bei Kaninchen, so könnten sehr wohl neben dem erwarteten Fermente noch ganz andere Fermente im Blute erscheinen. Erhielte man Sera mit charakteristischer Fermentwirkung, so hätte man in ihnen, beiläufig

bemerkt, die wichtigsten Hilfsmittel für einen systematischen Abbau der Eiweißstoffe.

Verwenden wir als Antigene Polypeptide oder ganz allgemein Eiweißstoffe irgendwelcher Art, so werden wir eine Spezifität nur dann nachweisen können, wenn sie gewisse charakteristische Bindungen in verhältnismäßig großer Menge enthalten.

Eine ausgesprochene Spezifität zeigen die bakteriolytischen Immunsera. Ihre Entstehung erkläre ich mir in folgender Weise: Mit den betreffenden lebenden oder vorher abgetöteten Bakterien oder mit den Bakterienprodukten des Nährbodens, auf dem sie gewachsen waren, gelangen Eiweißstoffe ganz charakteristischer Art in die Blutbahn und mit dem Blute zu den Körperzellen. Diese Eiweißstoffe werden in irgendwelchen Zellen von Fermenten, die auch sonst Eiweißstoffe angreifen, gespalten. Hierbei treten infolge des eigenartigen Baues des betreffenden Bakterieneiweißes in verhältnismäßig großer Menge Stoffe mit charakteristischer Atomverkettung auf, sagen wir bestimmte Peptide, wie sie sonst bei enteraler oder intracellulärer Verdauung nur in geringer Menge entstehen.

Die absoluten Mengen des wirksamen Antigens können hierbei äußerst gering sein. Am Orte ihrer Entstehung oder mit dem Blutstrom zu anderen Zellen gebracht, finden diese Eiweißspaltungsprodukte die auf sie eingestellten Fermente. Sie werden zersetzt. Ein Teil der Spaltungsprodukte des Antigens bleibt aber mit dem Ferment verbunden in der Zelle liegen. Es bildet sich der Katalysator, der auch in der Norm zur Erzeugung des verbrauchten Fermentes dient, diesmal aber unter dem Einfluß der großen Menge des in die Zelle gelangten Substrats in abnorm großer Menge. Infolge hiervon ist auch die Bildung des Fermentes über die Norm gesteigert und bleibt es so lange, bis durch irgendwelche Stoffwechselforgänge der Katalysator auf seine gewöhnliche Menge zurückgeführt worden ist. Ich nehme also an, daß auch die Bildung des bakteriolytischen Immunkörpers in ähnlicher Weise erfolgt, wie die Bildung der Fermente, die wir nach der parenteralen Injektion des Rohrzuckers im Blut gefunden haben und wie sie vermutlich auch nach der parenteralen Zufuhr irgendwelcher Eiweißantigene im Blute erscheinen. Der Amboceptor wäre hier-

nach nicht ein einheitlicher Stoff, sondern wie Pepsin und Trypsin ein Gemisch peptolytischer Fermente bzw. ihrer Zymogene. Er wäre spezifisch, insofern er ganz bestimmte Fermente (in maskierter Form) enthält, die nur ganz bestimmte Molekülbindungen zu lösen vermögen, und zwar gerade diejenigen, die zu ihrer Bildung Veranlassung gegeben haben. Kommen diese Fermente in Berührung mit den lebenden Bakterien, so greifen sie unter den geeigneten Bedingungen die Eiweißstoffe des Bakterienprotoplasmas an den durch jene Bindungen charakteristischen Stellen ein und führen Tod und Auflösung der Bakterien herbei.

Untersuchungen über Diffusionsvorgänge in Gallerten.

III.

Über die Beziehungen des Diffusionsweges zum Diffusionskoeffizienten und seine Abhängigkeit von der Konzentration des Indicators.

Von

Otto Fürth, Hans Bauer und Hansi Piesch.

(Aus der chemischen Abteilung des Physiologischen Institutes der Wiener Universität.)

Mit 4 Figuren im Text.

(Eingegangen am 25. August 1919.)

In zwei früheren Untersuchungen hat der eine von uns gemeinsam mit F. Bubanovic Diffusionsvorgänge in Gallerten in bezug auf die Abhängigkeit des Diffusionsweges von der Konzentration, sowie in bezug auf den Zusammenhang des Diffusionsvermögens mit der Hydratation und Polymerisation der Moleküle eingehender studiert¹⁾.

Es ergab sich nun weiterhin die Notwendigkeit, darüber ins Klare zu kommen, welcher Zusammenhang denn eigentlich zwischen dem Diffusionswege, den wir mit Hilfe von Niederschlagsbildungen oder Farbenreaktionen in unseren Gallerten messend verfolgen konnten, und dem Diffusionskoeffizienten besteht, der als das in der Physik allgemein übliche Maß des Diffusionsvermögens angesehen wird. Daß zwischen dem Diffusionswege und dem Diffusionskoeffizienten keinesfalls ein Verhältnis einfacher Proportionalität bestehe, ist schon in der ersten der erwähnten Arbeiten hervorgehoben worden.

Wir müssen uns zunächst klar machen, daß der Begriff des Diffusionsweges keineswegs so einfach und selbstverständ-

¹⁾ O. v. Fürth und F. Bubanovic, diese Zeitschr. **90**, 265, 1918 und **92**, 139, 1918.

lich ist, wie es etwa auf den ersten Blick scheinen mag. Es liegt ja im Wesen des Diffusionsvorganges, daß von einer scharfen Grenze zwischen diffundierender Substanz und Medium überhaupt nicht gesprochen werden kann. Von dem Augenblicke an, da Substanz und Medium miteinander in Berührung treten, haben wir uns die erstere kontinuierlich über das letztere verbreitet vorzustellen, derart, daß einige Substanzteilchen bereits beliebig weit vorgedrungen sind. In diesem Sinne können wir sagen, daß die Fortpflanzungsgeschwindigkeit der Diffusion eine unendliche sei. Daß bei den Versuchen, die den Gegenstand dieser Abhandlung bilden, gleichwohl von einem Diffusionswege¹⁾, also von einer endlichen Ausbreitungsgeschwindigkeit der Diffusion gesprochen werden kann, erklärt sich daraus, daß nicht etwa die Grenze zwischen Substanz und Medium messend verfolgt wird, was ja unmöglich wäre, sondern eine Zone bestimmter Konzentration, bei der die erste Reaktion zwischen Substanz und Indicator stattfindet. In bezug auf die durch den Indicator markierte Grenze können wir von einer endlichen Diffusionsgeschwindigkeit und einem endlichen Diffusionswege reden. Es ist dabei indes wohl zu beachten, daß das bequeme Hilfsmittel der Sichtbarmachung, das der Indicator darstellt, nicht ohne Gefahr angewendet werden kann, da die damit verbundenen unvermeidlichen chemischen Veränderungen die Reinheit des Diffusionsprozesses offenbar stören werden. Dies kommt insbesondere dann in Betracht, wenn die relative Konzentration des Indicators nicht unerheblich ist. Sie wurde, wo nicht anders angegeben, immer so gewählt, daß man die erwähnte Störung vernachlässigen kann.

Bei den früheren Diffusionsversuchen in diesem Laboratorium wurde nur der Diffusionsweg in einer Gallerte beobachtet; über die Menge der in die Gallerte eindringenden Substanz

¹⁾ Eine Definition eines endlichen Diffusionsweges bzw. einer endlichen Fortpflanzungsgeschwindigkeit der Diffusion vom Molekular-kinetischen Standpunkte der Brownschen Bewegung aus wurde von Ph. Frank gegeben (Physikal. Zeitschr. 19, 516, 1918). Sie bezieht sich auf den „reinen“ Diffusionsvorgang ohne Anwendung eines Indicators und steht daher mit unseren Untersuchungen in keinerlei Zusammenhang.

vermochten jedoch diese Versuche nichts auszusagen. Wir können aber die Kenntnis dieser letzteren keinesfalls entbehren, wenn wir den Diffusionskoeffizienten für den Fall eines Diffusionsvorganges ermitteln wollen, der sich nicht innerhalb einer Flüssigkeit, sondern innerhalb einer Gallerte vollzieht. Ohne Kenntnis der Beziehungen des Diffusionsweges zum Diffusionskoeffizienten erscheint ein tieferes Eindringen in unser Problem nicht möglich.

Da in dieser Hinsicht, soweit wir wissen, in der Literatur keine brauchbaren Angaben vorliegen, sind wir nun zunächst daran gegangen, uns einiges experimentelle Material zu beschaffen, um uns auf empirischem Wege zum mindesten in bezug auf einige Hauptpunkte in dieser Richtung einigermaßen zu orientieren. Wir haben also in bezug auf einige Elektrolyte, die wir in Agar- oder Leimgallerten hineindiffundieren ließen, gleichzeitig den Diffusionsweg und die diffundierte Substanzmenge bestimmt. Wir verfahren dabei zunächst in der Weise, daß wir die in einem Zylinder befindliche Gallerte mit einer bestimmten Menge Elektrolytlösung bestimmter Konzentration überschichteten und in der Regel von Tag zu Tag die in die Gallerte hineindiffundierte Substanzmenge ermittelten. Hierbei wurde die Lösung entfernt und sodann, dem gefundenen Titer entsprechend, erneuert. Der Diffusionsvorgang erfolgte somit unter Abnahme der Konzentration der außerhalb der Gallerte vorhandenen Lösung. Im Wesen der eben geschilderten Art der Ermittlung der hineindiffundierten Substanzmenge liegt es ferner, daß der in der Lösung selbst sich abspielende Diffusionsprozeß wesentlich gestört war. Wir lassen die Ergebnisse der in dieser Weise ausgeführten Versuche folgen. In jedem Falle wurden aus den beobachteten Größen: Diffusionsweg s , diffundierte Substanzmenge S , Zeit t und Querschnitt des Zylinders q , die für das Folgende bedeutsamen Quotienten $\frac{S}{q\sqrt{t}}$ und $\frac{S}{qs}$ berechnet.

I.

Diffusionsversuche bei abnehmender Konzentration.

1. Diffusion von n_{20} -Salzsäure in Agaragargallerte.

Eine 2%ige phenolphthaleinhaltige Agaragarlösung wurde in heißem Zustande so lange tropfenweise mit Natronlauge versetzt, bis sie eine

gleichmäßige rote Färbung angenommen hatte. Sodann wurde sie in einem hohen Zylinder von 12,5 qcm Querschnitt erstarren gelassen. Am nächsten Tage wurden 100 ccm Salzsäure (appr. $n/_{20}$, Titer 0,480 ccm $n/_{10}$ -HCl im Kubikzentimeter) darüber geschichtet. Nach 1, 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12 Tagen wurde der an der Entfärbung der Gallerte kenntliche Diffusionsweg s gemessen. Sodann wurde die Gesamtmenge der Salzsäure in ein Kөлbchen überspült, titriert und schließlich 100 ccm eines Gemenges von $n/_{20}$ -HCl und Wasser entsprechend dem eben ermittelten Titer neu aufgegossen.

Versuch A.

Versuchsdauer t in Tagen	1	2	3	5	7	8	10	12
Diffusionsweg s in cm .	4,7	6,4	8,2	10,1	11,8	12,6	13,7	15,4
Diffund. Gesamtmenge S der Salzsäure in ccm $n/_{10}$ -HCl	9,5	13,7	16,2	19,9	22,9	23,9	24,8	26,4
$\frac{S}{q\sqrt{t}}$	0,76	0,77	0,75	0,71	0,68	0,67	0,63	0,61
$\frac{S}{qs}$	0,16	0,16	0,16	0,15	0,15	0,15	0,15	0,14

Versuch B.

Versuchsdauer t in Tagen	1	2	3	5	7	8
Diffusionsweg s in cm . . .	4,7	6,4	8,1	10,1	11,8	12,6
Diffundierte Gesamtmenge S der Salzsäure in ccm $n/_{10}$ - HCl	9,9	13,8	16,6	20,6	22,6	23,7
$\frac{S}{q\sqrt{t}}$	0,76	0,75	0,74	0,71	0,66	0,66
$\frac{S}{qs}$	0,16	0,16	0,16	0,16	0,15	0,15

Die Quotienten $\frac{S}{q\sqrt{t}}$ und $\frac{S}{qs}$ zeigen eine merkliche Tendenz zur Abnahme mit zunehmender Versuchsdauer, die jedoch erst nach dem 5. Tage auffälliger wird. Immerhin ist diese Abnahme keine so hochgradige, als daß diese Größen in den ersten Tagen nicht in erster Annäherung als „Konstante“ gelten dürften.

2. Diffusion von $n/_{20}$ -Natronlauge in Agaragargallerte.

Analoge Versuche mit phenolphthaleinhaltiger Gallerte haben wir auch mit appr. $n/_{20}$ -Natronlauge ausgeführt, indem

wir dieselbe bei absinkender Konzentration in phenolphthaleinhaltige Agaragargallerte bei Zimmertemperatur hineindiffundieren ließen.

Anfangskonzentration 0,404 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH im Kubikzentimeter
 $q = 12,5$ qcm.

Versuchsdauer t in Tagen	2	3	4	6	8
Diffusionsweg s in cm . . .	4,9	5,8	6,2	7,8	8,9
Diffundierte Gesamtmenge S der Natronlauge in ccm $\frac{n}{10}$ - NaOH	11,4	13,8	16,2	18,8	21,0
$\frac{S}{q\sqrt{t}}$	0,65	0,64	0,66	0,62	0,59
$\frac{S}{qs}$	0,19	0,19	0,21	0,19	0,19

Auch in diesem letzteren Versuche können $\frac{S}{q\sqrt{t}}$ und $\frac{S}{qs}$ den Rang von approximativen Konstanten für sich in Anspruch nehmen.

3. Diffusion von Kochsalzlösung in silbernitratthaltige Agaragargallerte.

2 $\frac{0}{10}$ ige Agaragarlösung wurde in heißem Zustande mit ein wenig stark verdünnter Silbernitratlösung versetzt, in einen hohen Glaszylinder von 13 qcm Querschnitt eingegossen und darin erstarren gelassen. Sodann wurden 100 ccm einer Kochsalzlösung aufgegossen, von der 1 ccm 0,1232 g NaCl enthielt (also eine etwa 12 $\frac{0}{10}$ ige Kochsalzlösung). Das Fortschreiten der Chlorsilberzone wurde messend verfolgt. Von der oberhalb der Gallerte befindlichen (vor Verdunstung geschützten) Kochsalzlösung wurden täglich nach Durchmischen je 2 Proben zu 5 ccm entnommen, in breite Wägegläschen übertragen, bei 110 $^{\circ}$ zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Sodann wurde der Salzurückstand wieder in 5 ccm heißem Wasser gelöst und in den Zylinder zur diffundierenden Flüssigkeit zurückgebracht. In dieser Weise konnte die Kontinuität des Diffusionsversuches (der unter stetigem Absinken der Konzentration der überstehenden Salzlösung vor sich ging) im wesentlichen gewahrt werden. Die Versuchstemperatur betrug 18 bis 20 $^{\circ}$.

Von den Quotienten $\frac{S}{q\sqrt{t}}$ und $\frac{S}{qs}$ zeigt der letztere merkliche Konstanz.

Versuchsdauer t in Tagen	2	3	4	5	7	8	9
Diffusionsweg s in cm .	5,9	7,2	8,3	9,3	11,2	?	12,85
Diffund. Gesamtmenge S Kochsalz in g (Mittel aus 2 Parallelver- suchen)	2,667	3,260	3,538	4,009	4,432	4,736	5,076
$\frac{S}{q\sqrt{t}}$	0,145	0,144	0,135	0,137	0,129	0,129	0,130
$\frac{S}{qs}$	0,034	0,035	0,033	0,033	0,030	?	0,030

4. Diffusion einer Natriumthiosulfatlösung in jodjodkalihaltige Agaragargallerte.

Für Beobachtungen des Diffusionsvorganges hat sich das Eindringen einer Thiosulfatlösung in eine durch Zusatz von einer kleinen Menge Lugolscher Lösung blau gefärbte 2^o/_oige Agaragargallerte als recht geeignet erwiesen. Man erkennt den Diffusionsweg an der sich scharf abzeichnenden Entfärbungszone in der blauen Gallerte. Andererseits läßt sich die Menge des bereits in der Gallerte eingedrungenen Salzes auf jodometrischem Wege ebenso bequem wie genau feststellen.

Wir haben die blaue Gallerte in einem Zylinder von 12,5 qcm Querschnitt mit 50 ccm einer 0,7425^o/_oigen Thiosulfatlösung überschichtet. Bei jeder Versuchsphase wurde die ganze oberhalb der Gallerte befindliche Flüssigkeit in ein Kölbchen übergespült, mit ⁿ/₁₀-Jodlösung und Stärkekleister titriert, sodann, dem Ausfall der Titration gemäß, 50 ccm eines entsprechend aus Wasser und ⁿ/₂₀-Na₂S₂O₃-Lösung zusammengesetzten Gemenges neu auf die Gallerte aufgegossen. Der Effekt war also praktisch der gleiche, als wenn der Diffusionsvorgang kontinuierlich weitergegangen wäre. Derselbe hat sich bei 18,5 bis 20^o vollzogen.

Versuchsdauer t in Tagen	1	2	3	5	6	8	10
Diffusionsweg s in cm .	2,4	3,6	4,2	?	6,3	7,2	8,2
Diffund. Gesamtmenge S Na ₂ S ₂ O ₃ in g	0,0891	0,1263	0,1485	0,1936	0,2043	0,2221	0,2323
$\frac{S}{q\sqrt{t}}$	0,0071	0,0071	0,0069	0,0069	0,0067	0,0063	0,0059
$\frac{S}{qs}$	0,0029	0,0028	0,0028	?	0,0027	0,0024	0,0022

Man beachte die besonders in den ersten Tagen auffallende Konstanz der Quotienten $\frac{S}{q\sqrt{t}}$ und $\frac{S}{qs}$.

II.

Die Diffusionsversuche Schuhmeisters. Berechnung des Diffusionskoeffizienten nach Stefan.

Überblicken wir die Ergebnisse unserer ersten Versuche, so ist vor allem die Tatsache der wenigstens in den ersten Tagen merklichen Konstanz des Quotienten $\frac{S}{q\sqrt{t}}$ hervorzuheben. Sie ist der Ausdruck eines bereits von Stefan für die Diffusion aufgefundenen Gesetzes, dessen Gültigkeit sich nunmehr auch für die Diffusion in Gallerten erweist. Damit erscheint die Möglichkeit gegeben, auf dieser Grundlage auch in unserem Falle Diffusionskoeffizienten zu berechnen. Wir wollen uns zunächst den genauen Inhalt dieses Gesetzes vergegenwärtigen.

Stefan¹⁾ hat nun weiter gezeigt, daß die Ficksche Gleichung zu einer einfachen Beziehung der partiellen Ableitungen $\frac{\partial u}{\partial t}$ und $\frac{\partial^2 u}{\partial x^2}$ führt: „Ist die Diffusion nicht im Zustande der Beharrung, wohl aber so beschaffen, daß die Konzentration sich nur längs der Achse des Rohres, aber nicht in der dazu senkrechten Richtung ändert, dann ist die Konzentration u in der Höhe x zur Zeit t durch die Gleichung $\frac{\partial u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2}$ vollständig bestimmt.“

Die mathematische Behandlung dieser Differentialgleichung gibt nun, wie Stefan gezeigt hat, unter gewissen vereinfachenden Voraussetzungen die Möglichkeit, die in der Zeit t in eine Flüssigkeit hineindiffundierte Substanzmenge S zu berechnen, wenn der Querschnitt q , durch welchen hindurch die Diffusion erfolgt, die Anfangskonzentration u_0 und der Diffusionskoeffizient D bekannt sind.

¹⁾ Sitzungsber. d. Wien. Akad. 78, II., 957.

A. So hat Schuhmeister, ein Schüler Stefans¹⁾ auf einen mit Salzlösung gefüllten Zylinder einen zweiten mit Wasser gefüllten Zylinder von genau gleichem Querschnitte und gleicher Länge gestellt. Nach Beendigung des Versuches konnten die beiden Zylinder ohne Mischung ihres Inhaltes voneinander getrennt werden, worauf in jedem derselben die Konzentration bestimmt wurde. Auf Grund der theoretischen Ableitungen Stefans ergibt sich nun für die aus dem unteren Zylinder in der Zeit t ausgetretenen Substanzmenge die Gleichung $S = u_0 q \sqrt{\frac{Dt}{\pi}}$.

B. Schuhmeister ging (l. c.) auch derart vor, daß er über einen mit einer Salzlösung gefüllten Zylinder einen langsamen Wasserstrom hinweggleiten ließ, in den das Salz aus dem Zylinder hindiffundieren konnte. Die Menge des ausgetretenen Salzes wurde aus der Konzentration vor Beginn und nach Beendigung des Versuches bestimmt. Für diese Versuchsanordnung, wobei die Diffusion immer in reines Wasser hinein erfolgt und keinerlei Verzögerung des Diffusionsvorganges durch den bereits diffundierten Elektrolyten in Rechnung zu setzen ist, ergibt sich aus den mathematischen Ableitungen Stefans, daß die aus dem Zylinder in der Zeit t ausgetretene Substanzmenge S ceteris paribus doppelt so groß ist, wie vorhin, nämlich $S = 2 u_0 q \sqrt{\frac{Dt}{\pi}}$.

C. Die Relation $S = 2 u_0 q \sqrt{\frac{Dt}{\pi}}$ gilt jedoch, wie Stefan gelegentlich seiner klassischen Untersuchungen über Gasdiffusion²⁾ gezeigt hat, ganz allgemein auch überall dort, wo die Dichte der diffundierenden Substanz in der Grenzschicht des Flüssigkeitszylinders bei konstanter Größe erhalten wird. „Experimentell läßt sich diese Bedingung verwirklichen, wenn man ein zylindrisches Gefäß mit reinem Wasser füllt, über dasselbe ein mit demjenigen Gase, dessen Diffusion untersucht werden soll, gefülltes Gefäß schiebt und in diesem das Gas (allgemeiner

¹⁾ Schuhmeister, Sitzungsber. d. Wien. Akad. 79, 605, 1879.

²⁾ J. Stefan, Sitzungsber. d. Wien. Akad. 77, II., 374, 1878.

die diffundierende Substanz) bei konstanter Dichte erhält.“

Will man also nach Stefan und Schuhmeister den Diffusionsquotienten D berechnen, so ergibt sich

$$\text{im Falle A} \quad \text{aus } S = u_0 q \sqrt{\frac{D t}{\pi}} \quad \dots \quad D = \frac{\pi}{u_0^2} \left(\frac{S}{q \sqrt{t}} \right)^2 \quad \dots \quad (1)$$

$$\text{„ „ Bund C „} \quad S = 2 u_0 q \sqrt{\frac{D t}{\pi}} \quad \dots \quad D = \frac{\pi}{4 u_0^2} \left(\frac{S}{q \sqrt{t}} \right)^2 \quad \dots \quad (2)$$

Für den Fall späterer Anwendung sei bemerkt, daß wir, um den Diffusionskoeffizienten D im üblichen Maßsysteme zu erhalten, die Zeit t in Tagen, den Querschnitt q in Quadratcentimetern ausdrücken müssen. In welchem Maße wir die Substanzmenge S messen, ist gleichgültig, vorausgesetzt, daß wir auch für die Anfangskonzentration u_0 denselben Maßstab zur Anwendung bringen. Bequemlichkeit halber haben wir beide Größen in Kubikcentimetern $\frac{1}{10}$ -Elektrolyt ausgedrückt.

Von den obengenannten drei Fällen erwies sich im Hinblick auf unsere bisherige Versuchsmethode der letzte als allein realisierbar. Der erste scheidet schon deswegen aus, weil er einen völlig ungestörten Verlauf der Diffusion nicht allein in der Gallerte, sondern auch in der außerhalb befindlichen Lösung zur Voraussetzung hat, eine Bedingung, die bei der Art unserer Messung der diffundierten Substanzmenge, wie schon früher bemerkt, unerfüllbar ist. Der zweite Fall hätte uns gleichfalls eine völlig veränderte Versuchsanordnung aufgezwungen. Zur Verwirklichung des dritten brauchten wir nur dafür Sorge zu tragen, daß die Konzentration der Lösung in der Trennungsschicht beständig konstant (gleich der Anfangskonzentration u_0) war. Wir erreichten dies wenigstens angenähert dadurch, daß wir gelegentlich der Ermittlung der diffundierten Substanzmenge alltäglich die Konzentration der Lösung auf ihren ursprünglichen Betrag u_0 brachten. Dies ist jedenfalls nur eine rohe Annäherung, die aber zur ungefähren Beurteilung der Größe des Diffusionskoeffizienten ausreichen mag. Wir geben im folgenden die Versuche mit den nach Formel (2) berechneten Diffusionskoeffizienten D wieder.

III.

Diffusionsversuche bei konstant erhaltener Anfangskonzentration des Elektrolyten.

1. Diffusion von $n/_{20}$ -Salzsäure in Agaragargallerte.

Wir haben zunächst Parallelversuche in der Weise angesetzt, daß wir $n/_{20}$ -HCl in Agaragargallerte hineindiffundieren ließen, der als Indicator a) Kongorot, b) Phenolphthalein zugesetzt war. Circa $1/4$ l einer 2%igen Agaragarlösung wurde in heißem Zustande mit dem betreffenden Indicator versetzt, in einen hohen Zylinder, den die Lösung etwa zu $2/3$ erfüllte, hineingegossen und erkalten gelassen. Die erstarrte Gallerte wurde in jedem Zylinder mit 100 ccm appr. $n/_{20}$ -HCl überschichtet. Das Fortschreiten der Säurediffusion innerhalb der Gallerte wurde am Farbenumschlage des Indicators erkannt und die hineindiffundierte Säuremenge täglich titrimetrisch festgestellt. Sodann wurden neue 100 ccm $n/_{20}$ -HCl aufgegossen, derart, daß die Konzentration der diffundierenden Säure während des ganzen Versuches annähernd konstant erhalten wurde. Die Anfangskonzentration u_0 betrug in allen Fällen 0,485 ccm $n/_{10}$ -HCl im Kubikzentimeter, der Querschnitt q des Diffusionszylinders a) 12,66 qcm, b) 15,15 qcm.

a) Diffusion von $n/_{20}$ -HCl in kongorothaltige Agaragargallerte.

Zeit t in Tagen	0,63	1,63	2,63	3,66	4,79	5,41
Diffusionsweg s in cm . .	3,2	5,7	6,8	7,6	8,9	1,01
Diffundierte Menge S in ccm $n/_{10}$ -HCl	9,0	17,0	22,0	26,0	30,5	32,0
$\frac{S}{q\sqrt{t}}$	0,97	1,05	1,06	1,06	1,09	1,08
$\frac{S}{qs}$	0,24	0,24	0,25	0,27	0,27	0,25

$$D = \frac{\pi}{4u_0^2} \left(\frac{S}{q\sqrt{t}} \right)^2 = 3,68 \frac{\text{qcm}}{\text{Tag}}, \text{ berechnet aus den Mittelwerten } 1,05 \text{ von } \frac{S}{q\sqrt{t}}.$$

b) Diffusion in phenolphthaleinhaltige Agaragargallerte.

Zeit t in Tagen	0,63	1,63	2,63	3,66	4,79	5,41
Diffusionsweg s in cm . .	3,7	6,1	7,8	8,7	9,9	11,2
Diffundierte Menge S in ccm $n/_{10}$ -HCl	12,5	21,0	—	28,5	33,0	36,5
$\frac{S}{q\sqrt{t}}$	1,04	1,08	—	0,98	1,00	1,00
$\frac{S}{qs}$	0,23	0,23	0,20	0,22	0,22	0,21

$D = \frac{\pi}{4u_0^2} \left(\frac{S}{q\sqrt{t}} \right)^2 = 3,47 \frac{\text{qcm}}{\text{Tag}}$, berechnet aus dem Mittelwerte 1,02 von $\frac{S}{q\sqrt{t}}$.

Aus a und b finden wir als mittleren Diffusionskoeffizienten von HCl in 2⁰/₀iger Agaragargallerte den Wert $D = 3,57 \frac{\text{qcm}}{\text{Tag}}$. Bei der Diffusion in Wasser berechnet sich derselbe für eine molekulare Lösung bei 18⁰ zu 2,2 (nach Oehofm), zu 2,3 $\frac{\text{qcm}}{\text{Tag}}$ [nach Nernst - Scheffer¹⁾]. Dagegen hat Thovert für 0,9 mol. Lösung bei 19⁰ 2,63 $\frac{\text{qcm}}{\text{Tag}}$ gefunden. Wir müssen daraus den etwas befremdenden Schluß ziehen, daß die Ionenbeweglichkeit in der Agaragargallerte unter diesen Versuchsbedingungen jedenfalls größer ist als in Wasser.

2. Diffusion von $n/_{20}$ -Natronlauge in phenolphthaleinhaltige 6⁰/₀ige Leimgallerte.

a)

6⁰/₀ige reine Gelatinelösung wurde heiß mit einigen Tropfen einer alkoholischen Phenolphthaleinlösung versetzt, in einen Zylinder ($q = 10,42 \text{ qcm}$) ausgegossen und darin erstarren gelassen. Am nächsten Tage wurden 100 ccm $n/_{20}$ -NaOH aufgegossen und der Zylinder in ein Gefäß mit Wasser von Zimmertemperatur gestellt; $u_0 = 0,50$. In jeder Versuchsphase wurden neue 100 ccm $n/_{10}$ -NaOH aufgegossen und die in der abgegossenen Flüssigkeit noch enthaltene Menge NaOH titrimetrisch ermittelt.

¹⁾ Vgl. Fürth-Bubanovic, diese Zeitschr. 92, 146, 1918.

Versuchsdauer t in Tagen:	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{4}$	1	2	3	4	Mittel
Temperatur in Celsius- graden	17,8	17,8	18,1	17,4	16,3	16,5	17,3
Diffusionsweg s in cm	0,6	1,0	1,9	2,8	3,0	3,2	—
Diffundierte Menge S in ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH .	8,0	4,9	9,1	12,0	14,1	16,1	—
$\frac{S}{q\sqrt{t}}$	0,82	0,94	0,88	0,82	0,78	0,78	0,84
$\frac{S}{qs}$	0,48	0,47	0,46	0,41	0,45	0,46	0,46
$D = \frac{\pi}{4u_0^2} \left(\frac{S}{q\sqrt{t}} \right)^2$. .	2,09	2,77	2,43	2,11	1,91	1,91	2,20

b)

Parallelversuch zum vorigen Versuche.

Versuchsdauer t in Tagen:	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{4}$	1	2	3	4	Mittel
Temperatur in Celsius- graden	17,8	17,8	18,1	17,4	16,3	16,5	17,3
Diffusionsweg s in cm	0,6	1,1	1,9	2,8	3,0	3,2	—
Diffundierte Menge S in ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH .	3,1	5,2	10,5	13,5	15,4	17,1	—
$\frac{S}{q\sqrt{t}}$	0,71	0,84	0,85	0,77	0,72	0,69	0,76
$\frac{S}{qs}$	0,42	0,39	0,45	0,39	0,41	0,43	0,42
$D = \frac{\pi}{4u_0^2} \left(\frac{S}{q\sqrt{t}} \right)^2$. .	1,57	2,22	2,27	1,86	1,63	1,50	1,84

Sowohl $\frac{S}{q\sqrt{t}}$ (daher auch D) als auch $\frac{S}{qs}$ tragen hier durch-

aus den Charakter von Konstanten. Der Diffusionskoeffizient D erscheint auch hier größer als bei der Diffusion in Wasser, für die Oehlm bei 18° den Wert 1,29 ermittelt hat.

3. Diffusion von $\frac{n}{20}$ -Essigsäure in phenolphthaleinhaltige Leimgallerte.

6 $\frac{0}{10}$ ige reine Gelatinelösung wurde heiß mit ein wenig alkoholischer Phenolphthaleinlösung, sodann tropfenweise mit verdünnter Natronlauge versetzt, bis intensive Rotfärbung eingetreten war. Sodann wurde die Lösung heiß in zwei Zylinder

($q = 27,0$ qcm bez. $32,2$ qcm) eingegossen und darin erstarren gelassen. Die Zylinder befanden sich in einem großen Gefäß mit Wasser von Zimmertemperatur. Nach 3 Tagen wurden in jeden Zylinder 100 ccm app. n_{20} -Essigsäure ($u_0 = 0,504$) eingegossen. Die Essigsäure wurde in jeder Versuchsphase neu ersetzt und der durch die Diffusion erfolgte Säureverlust titrimetrisch ermittelt.

a)

Versuchsdauer t in Tagen:	$\frac{7}{24}$	1	2	3	4	6
Temperatur in Celsiusgraden	19,3	19,7	19,7	20,4	20,5	17,7
Diffusionsweg s in cm	1,1	1,6	2,4	2,9	3,2	3,8
Diffundierte Menge S in ccm n_{10} -Säure	6,1	12,3	19,3	25,0	29,9	37,5
$\frac{S}{q\sqrt{t}}$	0,42	0,45	0,51	0,53	0,55	0,57
$\frac{S}{qs}$	0,25	0,28	0,30	0,32	0,34	0,36
$D = \frac{\pi}{4 u_0^2} \left(\frac{S}{q\sqrt{t}} \right)^2$	0,55	0,64	0,82	0,88	0,95	1,00

b)

Versuchsdauer t in Tagen:	$\frac{7}{24}$	1	2	3	4	6
Temperatur in Celsiusgraden	19,3	19,7	19,7	20,4	20,5	17,7
Diffusionsweg s in cm	1,1	1,6	2,4	2,8	3,2	3,8
Diffundierte Menge S in ccm n_{10} -Säure	6,7	13,2	20,6	26,9	32,6	40,9
$\frac{S}{q\sqrt{t}}$	0,39	0,41	0,45	0,48	0,50	0,52
$\frac{S}{qs}$	0,20	0,26	0,27	0,30	0,32	0,33
$D = \frac{\pi}{4 u_0^2} \left(\frac{S}{q\sqrt{t}} \right)^2$	0,48	0,53	0,64	0,72	0,78	0,86

Hier weisen sowohl $\frac{S}{q\sqrt{t}}$, als auch $\frac{S}{qs}$ und D zwar eine ausgesprochen steigende Tendenz auf; dabei ist aber die rasche Annäherung an konstante Werte unverkennbar. Die Werte von D übersteigen durchaus nicht jene Größenordnung, die für den Diffusionskoeffizienten der Essigsäure in wäßrigen Lösungen ermittelt worden ist. So fand Oehlm für n_{10} -Essigsäure bei 18° $D = 0,884$.

4. Diffusion von $\frac{n}{10}$ -Natriumchloridlösung in silbernitrat-haltige 9⁰/₀ige Leimgallerte.

Eine 10⁰/₀ige Lösung käuflicher Gelatine wurde heiß mit $\frac{1}{10}$ Volumen $\frac{n}{10}$ -AgNO₃-Lösung versetzt, derart also, daß die Gelatine in bezug auf Silbernitrat $\frac{1}{100}$ normal war, und in zwei Zylindern ($q = 27,0$ qcm, bez. 32,2 qcm) erstarren gelassen. Dieselben wurden in ein Gefäß mit Wasser von Zimmertemperatur eingestellt. Nach 2 Tagen wurden je 100 ccm $\frac{n}{10}$ -NaCl ($u_0 = 1,0$) aufgegossen. In jeder Versuchsphase wurde die Kochsalzlösung erneuert und das Chlorid in mehreren Proben zu 20 ccm nach Volhard titrimetrisch ermittelt.

a)

Versuchsdauer t in Tagen	$\frac{9}{24}$	1	3	4
Temperatur in Celsiusgraden	21,0	21,0	18,2	20,2
Diffusionsweg s in cm . . .	1,7	2,9	4,9	5,4
Diffundierte Menge S in ccm $\frac{n}{10}$ -NaCl	30,0	55,0	104,0	124,0
$\frac{q\sqrt{t}}{S}$	1,81	2,04	2,23	2,29
$\frac{q^s}{S}$	0,65	0,72	0,78	0,85
$D = \frac{\pi}{4 u_0^2} \left(\frac{S}{q\sqrt{t}} \right)^2$	2,52	3,26	3,90	4,13

b)

Versuchsdauer t in Tagen	$\frac{9}{24}$	1	3	4
Temperatur in Celsiusgraden	21,0	21,0	18,2	20,2
Diffusionsweg s in cm . . .	1,7	2,8	4,9	5,5
Diffundierte Menge S in ccm $\frac{n}{10}$ -NaCl	32,0	59,5	102,5	126,5
$\frac{q\sqrt{t}}{S}$	1,63	1,85	1,84	1,96
$\frac{q^s}{S}$	0,59	0,66	0,67	0,71
$D = \frac{\pi}{4 u_0^2} \left(\frac{S}{q\sqrt{t}} \right)^2$	2,09	2,69	2,66	3,02

5. Diffusion von $\frac{n}{10}$ -NaCl in 10⁰/₀ige Leimgallerte ohne Indicatorenzusatz.

Versuchsordnung wie früher, jedoch mit dem Unterschiede, daß der den Diffusionsweg s anzeigende Zusatz von AgNO₃ entfallen ist.

a)

$$q = 29,4 \text{ qcm}, u_0 = 0,96.$$

Versuchsdauer t in Tagen	1	2	3	4	Mittel
Temperatur in Celsiusgraden	19,8	19,3	17,8	17,4	18,6
Diffundierte Menge S in cem $^{n/10}\text{-NaCl}$	29,0	41,5	53,5	69,5	
$\frac{S}{q\sqrt{t}}$	0,98	1,01	1,05	1,18	
$D = \frac{\pi}{4 u_0^2} \left(\frac{S}{q\sqrt{t}} \right)^2$	0,82	0,88	0,94	1,19	0,96

Versuchsdauer t in Tagen	1	2	3	4	Mittel
Temperatur in Celsiusgraden	19,8	19,3	17,8	17,4	18,6
Diffundierte Menge S in cem $^{n/10}\text{-NaCl}$	24,0	36,5	50,0	62,5	
$\frac{S}{q\sqrt{t}}$	0,90	0,97	1,09	1,17	
$D = \frac{\pi}{4 u_0^2} \left(\frac{S}{q\sqrt{t}} \right)^2$	0,69	0,79	1,00	1,17	0,91

Das Ergebnis der Versuchsreihen 4 und 5 ist sehr lehrreich. Die steigende Tendenz der Werte für $\frac{S}{q\sqrt{t}}$, $\frac{S}{qs}$ und D mit zunehmender Zeit t ist auch hier unverkennbar. Während aber die Mittelwerte von D dort, wo die Gallerte kein Silbernitrat enthielt ($D=0,96$, bez. $0,91$) durchaus mit dem Diffusionskoeffizienten des Kochsalzes in reinem Wasser harmonieren (Thovert fand für $^{n/10}\text{-NaCl}$ bei 15° $D=0,94$), sind die D -Werte in jenen Fällen, wo der Gallerte Silbernitrat zugesetzt worden war, 2- bis 4mal größer. Es ist also offenbar, daß in diesem Falle die chemischen Affinitäten zwischen Ag- und Cl-Ionen sozusagen als Triebkraft gewirkt und das Eindringen des Kochsalzes in die Gallerte wesentlich beschleunigt haben. Wenn wir ähnliches bei anderen analogen Versuchen vermißt haben (so bei dem gleich zu beschreibenden Versuche mit Calciumchlorid, sowie bei einem weiter unter dem Abschnitt VIII folgenden Versuche mit Kochsalz) kann die hypothetische Erklärung möglicherweise in folgendem gesucht

werden: Wenn wir einer Gallerte einen Elektrolyten zusetzen, so tritt ja eine physikalische, eventuell auch chemische Wechselwirkung zwischen beiden ein. Letzteres ist aber zweifellos der Fall, wenn wir z. B. eine heiße Leimlösung mit Silbernitrat versetzen. In der erstarrten Gallerte wird sich sicherlich ein Teil des Silbers in nichtionisierter, organisch gebundener Form vorfinden. Wir können uns nun ganz gut vorstellen, daß die Triebkraft, die beim Diffusionsvorgange die Cl-Ionen in die AgNO_3 -haltige Gallerte hineintreibt, eben davon abhängt, wieviel Silber in ionisierter und wieviel in nichtionisierter dynamisch unwirksamer Form jeweilig vorhanden ist. Andererseits ist es einleuchtend, daß für die Stärke der chemischen Affinitäten der Dissoziationsgrad des Elektrolyts maßgebend sein muß. Dieser ist aber bei sonst gleicher Konzentration bei NaCl größer als bei CaCl_2 .

6. Diffusion von Calciumchlorid in 10⁰/₀ige Leimgallerte mit und ohne Silbernitratzusatz.

a)

Mit Zusatz von Silbernitrat.

Die 10⁰/₀ige heiße Leimlösung wurde mit $\frac{1}{20}$ Volumen $\frac{n}{10}$ - AgNO_3 versetzt, enthielt somit $\frac{n}{300}$ - AgNO_3 .

Die Anfangskonzentration der CaCl_2 -Lösung war $u_0 = 0,59$ (nach Volhard ermittelt). Die erstarrte Gallerte wurde mit 100 ccm der CaCl_2 -Lösung überschichtet und die letztere in jeder Versuchsphase erneuert. In mehreren Proben derselben zu je 20 ccm wurde der Chloridgehalt nach Volhard titrimetrisch bestimmt.

$$q = 29,4 \text{ qcm.}$$

Versuchsdauer t in Tagen	$\frac{0}{24}$	1	3
Temperatur in Celsiusgraden	17,4	16,4	17,2
Diffusionsweg s in cm	1,9	3,1	4,6
Diffundierte Menge S in ccm $\frac{n}{10}$ - CaCl_2	11,5	17,0	26,0
$\frac{S}{q\sqrt{t}}$	0,64	0,58	0,51
$\frac{S}{qs}$	0,21	0,19	0,19
$D = \frac{\pi}{4 u_0^2} \left(\frac{S}{q\sqrt{t}} \right)^2$	0,92	0,76	0,59

b.

Ohne Zusatz von Silbernitrat.

$$u_0 = 0,59. \quad q = 26,6 \text{ qcm.}$$

Versuchsdauer t in Tagen	$\frac{9}{24}$	1	3
Temperatur in Celsiusgraden .	17,4	16,4	17,2
Diffundierte Menge S in ccm $\text{}^n/_{10}\text{-CaCl}_2$	9,0	14,0	24,6
$\frac{S}{q\sqrt{t}}$	0,55	0,53	0,52
$D = \frac{\pi}{4 u_0^3} \left(\frac{S}{q\sqrt{t}} \right)^2$	0,68	0,63	0,61

Hier hat der Diffusionsvorgang in beiden Parallelversuchen einen ziemlich gleichartigen Verlauf genommen, und zwar entsprechen die für D ermittelten Werte (0,59 bis 0,92) etwa jenen Zahlen, die für die Wasserdiffusion des Calciumchlorides ermittelt worden sind (D für $\text{}^m/_{1}\text{-Lösung}$ bei 18° nach Scheffer 0,93, nach Lang 0,70).

7. Diffusion von appr. $\text{}^n/_{10}\text{-Ammoniak}$ in $10^0/0$ ige Leimgallerte ohne Indicatorenzusatz.

$10^0/0$ ige Leimgallerte mit 100 ccm NH_3 -Lösung überschichtet. Der Titer wurde mit Hilfe von Methylorange ermittelt: $u_0 = 0,91$. Die Lösung wurde in jeder Versuchsphase erneuert. $q = 27,0$ qcm.

Versuchsdauer t in Tagen	$\frac{1}{3}$	1	2	3	5	6
Temperatur in Celsiusgraden .	17,9	17,3	17,3	17,8	19,6	20,2
Diffundierte Menge S in ccm $\text{}^n/_{10}\text{-NH}_3$	15,8	31,3	46,3	61,0	75,1	90,1
$\frac{S}{q\sqrt{t}}$	1,01	1,16	1,21	1,30	1,23	1,36
$D = \frac{\pi}{4 u_0^3} \left(\frac{S}{q\sqrt{t}} \right)^2$	1,04	1,28	1,39	1,60	1,43	1,75

Hier ist wieder ein allmähliches Ansteigen der D -Werte mit offener Annäherung an einen konstanten Wert bemerkbar, der von jener Größe ist, wie sie bei der Diffusion von NH_4OH in Wasser beobachtet wurde (für die Diffusion des Ammoniaks

in wäßriger $m/1$ -Lösung bei 18° $D = 1,63$ nach Arrhenius und Hagenbach).

Überblicken wir nunmehr die vorliegenden Versuche, so ergibt sich etwa folgendes:

Erhält man die Konzentration des in eine Gallerte hineindiffundierenden Elektrolyten nahezu konstant, so findet man, daß die Diffusion annähernd dem Stefanschen Diffusionsgesetz folgt, insofern $\frac{S}{q\sqrt{t}}$ und damit auch $D = \frac{\pi}{4u_0^2} \left(\frac{S}{q\sqrt{t}}\right)^2$ in erster Annäherung als Konstante gelten können. Die Beobachtung des Diffusionsweges s lehrt weiterhin, daß das Gleiche auch für den Ausdruck $\frac{S}{qs}$ gilt. Es muß hier darauf hingewiesen werden, daß der konstante Charakter dieser Größen zweifellos noch klarer zum Ausdruck gekommen wäre, wenn eine längere Ausdehnung der Versuche nicht an technischen Schwierigkeiten gescheitert wäre. Diese Gesetzmäßigkeiten sind aber trotzdem vielfach nur angenähert vorhanden, insofern sich bei dem Diffusionsvorgange in Gallerten verschiedene Faktoren störend geltend machen: Zunächst die spontanen Veränderungen, die sich, wie bekannt, innerhalb einer Gallerte vollziehen, das „Altern der Gallerte“ u. dgl. Sodann aber jene unausbleiblichen Veränderungen, die durch das Eindringen des Elektrolyten in die Gallerte in dieser hervorgerufen werden. Es liegt auf der Hand, daß z. B. die Diffusion von Salzsäure oder Natronlauge unmöglich von dem Umstande unbeeinflusst bleiben kann, daß eine Leimgallerte durch diese Agentien zur Quellung gebracht wird. Dort aber, wo wir, um den Diffusionsweg messend verfolgen zu können, Indicatoren der Gallerte hinzusetzen, müssen (abgesehen von einer möglichen Reaktion zwischen Indicator und Gallerte) überdies notwendigerweise chemische Affinitäten ins Spiel kommen, die durch Wechselwirkung zwischen Elektrolyt und Indicator den reinen Diffusionsvorgang beschleunigend beeinflussen.

Derartige Affinitäten können die hemmende Wirkung, die nach der Meinung der meisten Autoren die Diffusion in Gallerten im Vergleiche zur Diffusion in reinem Wasser in der Regel erfährt, ganz erheblich überkompensieren. Wir werden

uns also nicht darüber wundern dürfen, daß die Werte $\frac{S}{q\sqrt{t}}$, D und $\frac{S}{qs}$ in der Regel nicht wirkliche Konstante sind, vielmehr eine ausgesprochene Tendenz zum Steigen oder Fallen (meist das erstere) mit zunehmender Versuchsdauer erkennen lassen. Wir werden also auch verstehen, daß unter der Wirkung vorerwähnter chemischer Affinitäten der in einer Gallerte beobachtete Diffusionskoeffizient unter Umständen ein Vielfaches des D -Wertes bei Diffusion in reinem Wasser betragen kann.

IV.

Beziehung des Invasionsfaktors zum Diffusionskoeffizienten.

Aus den mitgeteilten Versuchen ergab sich zunächst, daß die Diffusionsgleichung nicht nur für Wasser, sondern auch für Gallerten gilt, und daß dementsprechend die Werte $\frac{S}{q\sqrt{t}}$ und daher auch $D = \frac{\pi}{4u_0^2} \left(\frac{S}{q\sqrt{t}} \right)^2$ (bei konstanter Temperatur) als Konstante gelten dürfen.

Dieses Ergebnis war ja wohl von vornherein zu erwarten. Als unerwartete Tatsache aber ergab sich ferner die annähernde Konstanz des Quotienten $\frac{S}{qs}$, d. h. die Tatsache, daß, wenn eine Elektrolytlösung in eine Gallerte hineindiffundiert und man gleichzeitig den Diffusionsweg s und die diffundierte Substanzmenge S beobachtet, die jeweils diffundierte Substanzmenge dem Diffusionswege annähernd proportional ist¹⁾. (Siehe dazu auch die Versuchsergebnisse auf S. 61.)

Durch Division der Konstanten $\frac{S}{q\sqrt{t}}$ und $\frac{S}{qs}$ ergibt sich, daß auch der Ausdruck $\frac{s}{\sqrt{t}}$ eine Konstante sein muß (siehe die Versuche auf S. 59).

¹⁾ Die Konstanz dieses Quotienten hat eine anschauliche Bedeutung, sie besagt, daß sich die mittlere Konzentration der diffundierten Substanz, bezogen auf das Reaktions- (Niederschlags- bzw. Farbumschlags-)Gebiet, unverändert erhält.

Die Erkenntnis dieses einfachen Zusammenhanges bedeutet aber für uns eine wesentliche Erweiterung unseres Verständnisses der Diffusionsvorgänge in Gallerten.

Wenn wir zwei verschiedene Elektrolyte von der gleichen Anfangskonzentration u_0 während des gleichen Zeitintervalls t durch den gleichen Querschnitt q hindurchdiffundieren lassen,

so folgt aus $D = \frac{\pi}{4 u_0^2} \left(\frac{S}{q \sqrt{t}} \right)^2$:

$$\frac{D_1}{D_2} = \frac{S_1^2}{S_2^2}, \text{ d. h. die Diffusionskoeffizienten werden}$$

sich zueinander verhalten wie die Quadrate der gleichzeitig diffundierten Substanzmengen.

Wenn nun aber (was wir früher nicht gewußt und jetzt erfahren haben) die diffundierten Substanzmengen den zurückgelegten Diffusionswegen proportional sind, also bei gleichem Querschnitte q :

$$S_1 = q m_1 s_1 \qquad S_2 = q m_2 s_2$$

ist, so ist

$$\frac{D_1}{D_2} = \frac{m_1^2}{m_2^2} \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{und} \quad \frac{s_1}{s_2} = \frac{m_2}{m_1} \sqrt{\frac{D_1}{D_2}},$$

das heißt also so viel als: wenn zwei Elektrolyte von gleicher Anfangskonzentration während der gleichen Zeit durch den gleichen Querschnitt hindurch in eine Gallerte hineindiffundieren, so ist das Verhältnis ihrer Diffusionswege gegeben durch das Produkt aus einem Zahlenfaktor und der Wurzel aus dem Verhältnisse ihrer Diffusionskoeffizienten.

Über diesen Zahlenfaktor $\frac{m_2}{m_1}$ können wir nun freilich vorläufig nichts Näheres aussagen. Dagegen ergibt sich folgende Überlegung.

In einer früheren Arbeit¹⁾ (Fürth und Bubanovic) ist der „Invasionsfaktor“ als Verhältnis der Diffusionswege definiert worden, die ein Elektrolyt einerseits, eine Kochsalzlösung andererseits bei gleicher molekularer Konzentration und gleicher Temperatur innerhalb eines gleichen Zeit-

¹⁾ Diese Zeitschr. 92, 144, 1918.

abschnittes beim Hineindiffundieren in ein und dieselbe Gallerte zurücklegt.

Es wurden nun die Invasionsfaktoren¹⁾ einerseits mit den Diffusionskoeffizienten, andererseits aber mit den „theoretischen Invasionsfaktoren“ verglichen. Die letzteren wurden²⁾ auf Grund der Nernstschen Ionenbeweglichkeitsfaktoren $N = \frac{UV}{U+V}$, welche die theoretischen Ausdrücke für die Diffusionskoeffizienten darstellen, aus den Quotienten $\frac{N_{\text{Elektrolyt}}}{N_{\text{NaCl}}}$ berechnet. Dabei wurde N_{NaCl} als Einheit gewählt und auch der Diffusionskoeffizient des Kochsalzes für eine $\frac{m}{1}$ -Lösung bei 18° mit 1 bewertet.

Diese Beobachtungen (Fürth und Bubanovic) schienen nun erhebliche Unstimmigkeiten zwischen der Schnelligkeit, mit der manche Elektrolyte in Gallerten eindringen und der Ionenbeweglichkeit zu ergeben. Insbesondere erschien die Schnelligkeit, mit der Säuren, Basen und polymerisierte Salze in eine Gallerte eindringen, weit geringer zu sein, als ihrer Ionenbeweglichkeit adäquat war. Andererseits schienen stark hydratisierte Salze relativ schneller als erwartet zu diffundieren.

Die neu gewonnene Erkenntnis der Relation $\frac{s_1}{s_2} = \frac{m_2}{m_1} \sqrt{\frac{D_1}{D_2}}$ läßt uns nun aber alle diese Dinge in einem neuen Lichte erscheinen.

Wir mußten mit Notwendigkeit erwarten, daß die erwähnten Unstimmigkeiten wegfallen, wenn wir unsere Invasionsfaktoren statt mit den Diffusionskoeffizienten, mit den Wurzeln aus den Diffusionskoeffizienten und statt mit den Quotienten $\frac{N_{\text{Elektrolyt}}}{N_{\text{NaCl}}}$ mit den Wurzeln aus diesen Quotienten vergleichen. Unter N ist immer der „theoretische Diffusionskoeffizient“ $\frac{UV}{U+V}$ verstanden. Es ergibt sich so aus der Tabelle I³⁾:

¹⁾ L. c., Tabelle I, S. 146.

²⁾ L. c., S. 149 bis 153.

³⁾ Diese Zeitschr. 92, 146.

I	II	III	IV	V	VI
Bezeichnung des Elektrolyten	Diffusions- koeffizient D , bezogen auf 18° und $m/1$ -Lösung	\sqrt{D}	$\sqrt{\frac{N_{\text{Elektrolyt}}}{N_{\text{NaCl}}}}$	Mittel aus III u. IV	Empirischer Invasionsfaktor $\frac{s_{\text{Elektrolyt}}}{s_{\text{NaCl}}}$ nach Fürth u. Bubanovic
HCl	2,25	1,50	1,43	1,47	1,25
HNO ₃	2,20	1,47	1,40	1,43	1,17
NH ₃	1,63	1,27	1,6	1,26	1,06
KOH	1,59	1,26	1,34	1,30	1,22
KBr	1,39	1,12	1,13	1,12	1,06
KJ	1,37	1,17	1,12	1,15	1,08
NaOH	1,35	1,16	1,15	1,15	1,11
KCl	1,33	1,15	1,11	1,13	1,06
H ₂ SO ₄	1,33	1,15	1,46	1,30	0,98
NH ₄ Cl	1,20	1,09	1,11	1,10	1,07
HCOOH	1,13	1,06	1,25	1,15	0,86
NaJ	1,01	1,00	1,00	1,00	1,05
NaCl	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
NaBr. 2H ₂ O	1,00	1,00	1,00	1,00	1,06
LiCl. 2H ₂ O	0,92	0,96	0,92	0,94	0,93
(COOH) ₂ . 2H ₂ O	0,84	0,93	1,42	1,27	1,10
CaCl ₂ . 6H ₂ O	0,81	0,90	1,06	0,98	0,94
BaCl ₂ . 2H ₂ O	0,80	0,89	1,08	0,98	1,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,76	0,87	1,13	1,00	0,67
K ₂ SO ₄	0,74	0,86	1,13	1,00	1,06
K ₂ CrO ₄	0,72	0,85	1,14	1,00	0,87
SrCl ₂ . 6H ₂ O	0,72	0,85	1,02	0,93	0,93
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,56	0,75	1,02	0,89	0,99
CuCl ₂ . 2H ₂ O	0,50	0,71	1,02	0,86	1,02
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,50	0,71	1,03	0,87	0,67
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,48	0,69	1,03	0,86	0,74

Wir sehen nun tatsächlich beim Vergleiche unserer auf empirischem Wege ermittelten Invasionsfaktoren (Kolonne VI) mit den berechneten Mittelwerten (Kolonne V) aus den Wurzeln aus den Diffusionskoeffizienten (Kolonne III) und aus den Werten der Kolonne IV $\sqrt{\frac{N_{\text{Elektrolyt}}}{N_{\text{NaCl}}}}$, daß die Übereinstimmung eine ganz leidliche ist. (Nur die Schwefelsäure und das Ammonsulfat, die sich schon früher in bezug auf ihr Verhalten bei der Diffusion als durchaus atypisch erwiesen hatten, fallen weit außerhalb der Reihe.)

Die früher geäußerte Annahme¹⁾, daß die Säuren, Basen und manche polymerisierte Salze weit langsamer, die stark

¹⁾ Fürth und Bubanovic, l. c. S. 169.

hydratisierten Salze aber schneller in eine Gallerte eindringen, als ihrer Ionenbeweglichkeit entspricht, erweist sich sozusagen als eine „optische Täuschung“. Dieselbe ist einfach durch das numerische Verhalten der Wurzeln aus den Diffusionskoeffizienten bedingt: Für jene D -Werte, die in der Nähe von 1 liegen, ist auch \sqrt{D} nicht sehr von 1 verschieden. Für einen hohen D -Wert, z. B. 2,20, wird \sqrt{D} bedeutend kleiner als D ; daher bleibt der „Invasionsfaktor“ weit hinter dem Diffusionskoeffizienten zurück. Das Umgekehrte aber gilt für sehr langsam diffundierende Substanzen. Hat z. B. eine Substanz, wie Kupferchlorid, einen Diffusionskoeffizienten $D = 0,50$, so wird die Wurzel aus diesem ($\sqrt{D} = 0,71$) nicht kleiner, sondern größer werden und ein beschleunigtes Diffusionstempo vortäuschen. Die Ursache dieser „optischen Täuschung“ war eben die irrige Meinung, daß die Invasionsfaktoren einen ungefähren Maßstab für die Diffusionskoeffizienten bieten. Tatsächlich bieten sie aber offenbar einen ungefähren Maßstab nicht für die Diffusionskoeffizienten selbst, sondern vielmehr für die Wurzeln aus den Diffusionskoeffizienten.

Unsere Tabelle lehrt uns aber noch etwas Weiteres.

Vergegenwärtigen wir uns, daß der Diffusionskoeffizient des Kochsalzes = 1 bewertet werden kann, dann ist, wenn wir den Diffusionsweg s_1 irgendeines Elektrolyten mit dem Diffusionswege s_2 einer Kochsalzlösung innerhalb derselben Gallerte bei gleicher molekularer Konzentration, gleicher Temperatur und innerhalb des gleichen Zeitabschnittes vergleichen, der Invasionsfaktor J definiert als

$$J = \frac{s_1}{s_2} = \frac{m_2}{m_1} \sqrt{\frac{D_1}{D_2}} \quad (\text{siehe S. 48}),$$

und, da $D_2 = 1$ zu setzen ist,

$$J = \frac{m_2}{m_1} \sqrt{D_1}.$$

Nun zeigt uns aber unsere Tabelle, daß J und $\sqrt{D_1}$ nicht sehr voneinander verschieden sind, einander so ziemlich parallel verlaufen und oftmals zusammenfallen. Das wäre nicht möglich, wenn der Zahlenfaktor $\frac{m_2}{m_1}$ sehr von 1 verschieden wäre.

Die allgemeine Annahme $m_2 = m_1$ würde besagen, daß, wenn z. B. $m_{/10}$ -HCl und $m_{/10}$ -NaCl in zwei gleichartige Gallerten durch gleiche Querschnitte hindiffundieren und man nun, nachdem beide durch den gleichen Zeitraum bei gleicher Temperatur diffundiert sind, die eingedrungenen Mengen feststellt, diese sich, den Relationen auf S. 48 gemäß, wie die von ihnen zurückgelegten Diffusionswege verhalten:

$$S_1 : S_2 = s_1 : s_2.$$

Sollte sich diese Annahme bewahrheiten, so würde die einfache Relation

$$\frac{s_1}{s_2} = \frac{S_1}{S_2} = \sqrt{\frac{D_1}{D_2}}$$

gelten. Inwiefern dies aber wirklich zutrifft, müssen erst weitere Untersuchungen lehren.

Daß man aber jedenfalls gut daran tut, bei derartigen Untersuchungen nicht allzu schematisch vorzugehen und daß man noch auf mancherlei Komplikationen und Überraschungen gefaßt zu sein hat, mag man weiter unten (Abschnitt VI) ersehen.

V.

Theoretisches über die Beziehung des Diffusionsweges zum Diffusionskoeffizienten (Hans Bauer).

Die auf empirischem Wege gewonnene Beziehung

$$(1) \quad \frac{S}{qs} = m \text{ (konst.) (vgl. S. 48),}$$

aus der sich im Hinblick auf das Stefansche Gesetz

$$(2) \quad S = 2qu_0 \sqrt{\frac{Dt}{\pi}}$$

die Relation

$$(3) \quad s = \frac{2u_0}{m} \sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \text{ oder } \frac{s}{\sqrt{Dt}} = \text{konst.}$$

und weiter für zwei verschiedene Elektrolyten mit gleicher Anfangskonzentration u_0 bei gleicher Zeit t

$$(4) \quad \frac{s_1}{s_2} = \frac{m_2}{m_1} \sqrt{\frac{D_1}{D_2}} \text{ (siehe oben S. 48)}$$

ergibt, soll im folgenden vom theoretischen Standpunkte näher beleuchtet werden.

Wenn wir von einer durch die Gegenwart eines Indicators bedingten Störung absehen, was bei sehr geringer Konzentration desselben jedenfalls zulässig ist, so haben wir als Grundlage jedes unbehinderten eindimensionalen Diffusionsvorganges die aus dem Fickschen Gesetze fließende partielle Differentialgleichung

$$(5) \quad \frac{\partial u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2}$$

anzusehen, in der u die Konzentration der diffundierenden Lösung in der Entfernung x von der Trennungsschicht zur Zeit t (vom Beginn der Diffusion gerechnet) und D den Diffusionskoeffizienten bezeichnen.

Für den Idealfall, daß die Diffusion aus einem unendlich ausgedehnten Zylinder, der mit einer Salzlösung von der Anfangskonzentration u_0 erfüllt ist, in eine angrenzende unendlich ausgedehnte Säule eines Lösungsmittels stattfindet¹⁾, gewinnt man als Integral der Gleichung (5)

$$(6) \quad u(x, t) = \frac{u_0}{\sqrt{\pi}} \int_{\frac{x}{2\sqrt{Dt}}}^{\infty} e^{-\eta^2} d\eta = \frac{u_0}{2} \left(1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\frac{x}{2\sqrt{Dt}}} e^{-\eta^2} d\eta \right)$$

Der hierin auftretende Ausdruck

$$(7) \quad \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\frac{x}{2\sqrt{Dt}}} e^{-\eta^2} d\eta = \Phi\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right)$$

führt den Namen „Fehlerintegral“ und kann für verschiedene Werte des Argumentes $\frac{x}{2\sqrt{Dt}}$ mit Hilfe besonderer Tafeln berechnet werden. Die beige druckte Fig. 1 erläutert für $D = 1 \frac{\text{qcm}}{\text{Tag}}$ den Verlauf der Konzentration $u(x, t)$ zu beiden Seiten der Grenze ($x = 0$) zwischen Lösung und Lösungsmittel für verschiedene Werte der Zeit t .

¹⁾ Dieser Fall ist praktisch auch bei endlicher Länge von Lösungs- und Lösungsmittelsäule erfüllt, wenn deren Ausdehnung nur genügend groß ist im Vergleich mit dem beobachteten Diffusionswege.

Damit die angegebene Lösung (6) zu Recht bestehe, ist aber Voraussetzung, daß der Diffusionsvorgang beiderseits der Trennungsgrenze ($x = 0$) völlig ungestört gemäß Fig. 1

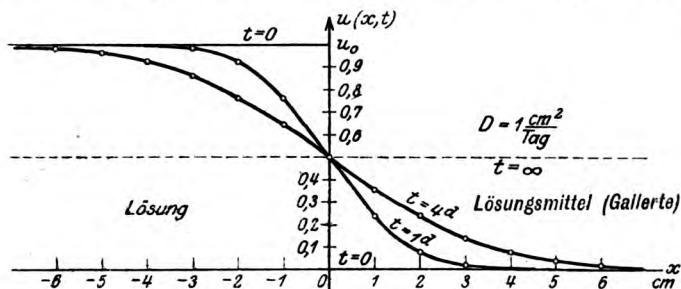


Fig. 1.

verlaufe. Bei unseren Versuchen war dies nur im Lösungsmittel (in der Gallerte) der Fall — von den Unterbrechungen des regelmäßigen Prozesses gelegentlich der Feststellung der hineindiffundierten Substanzmenge darf wohl abgesehen werden — außerhalb dagegen (in der Lösung) wurde mehr oder weniger genau die Anfangskonzentration u_0 konstant erhalten. Während aus (6) für $x = 0$ (Trennungsschicht) zu jeder Zeit t

$$(8) \quad u(0, t) = \frac{u_0}{2} \int_0^{\infty} e^{-\eta^2} d\eta = \frac{\sqrt{\pi}}{2}$$

folgt, war also bei unseren Versuchen wenigstens angenähert beständig

$$(9) \quad u(0, t) = u_0;$$

wir haben daher für unseren Fall als Lösung der Diffusionsgleichung (5) den doppelten Wert von (6), nämlich

$$(10) \quad u(x, t) = \frac{2u_0}{\sqrt{\pi}} \int_{\frac{x}{2\sqrt{Dt}}}^{\infty} e^{-\eta^2} d\eta = u_0 \left(1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\frac{x}{2\sqrt{Dt}}} e^{-\eta^2} d\eta \right) = \\ = u_0 \left[1 - \Phi \left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}} \right) \right]$$

anzunehmen. (10) gilt für alle $x > 0$ (Gallerte), während für alle $x < 0$ (Lösung) die Konzentration $u(x, t)$ beständig den Wert u_0 behält.

Diesen Sachverhalt bringen die Fig. 2 und 3 zum Ausdruck, die erste für $D = 2 \frac{\text{qcm}}{\text{Tag}}$, was im wesentlichen den em-

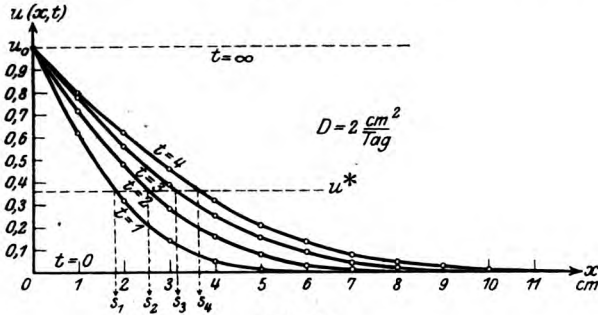


Fig. 2.

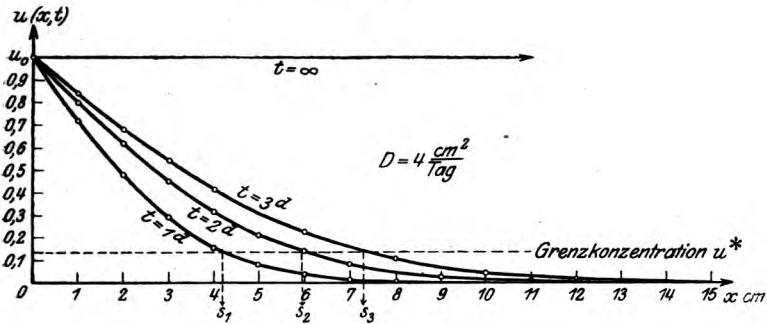


Fig. 3.

pirisch ermittelten Verhältnissen bei NaOH entspricht, die zweite für $D = 4 \frac{\text{qcm}}{\text{Tag}}$, was im wesentlichen dem Diffusionsvorgange bei HCl entspricht.

Berechnen wir unter Zugrundelegung dieses Ansatzes die in der Zeit t durch die Trennungszone ($x = 0$) vom Querschnitt q diffundierte Substanzmenge t , so finden wir

$$(12) \quad S = -qD \int_0^t \left(\frac{\partial u}{\partial x} \right)_{x=0} dt = qD \int_0^t \frac{u_0}{\sqrt{\pi Dt}} dt = 2qu_0 \sqrt{\frac{Dt}{\pi}},$$

das Stefansche Gesetz (2). In den Fig. 2 und 3 ist dieser Wert jeweils für einen bestimmten Wert von t durch den Flächeninhalt der zugehörigen Konzentrationskurve für $x > 0$ dargestellt.

Fig. 4 erläutert noch den zeitlichen Verlauf der Konzentration $u(x, t)$ für $D = 2 \frac{\text{cm}^2}{\text{Tag}}$ in verschiedenen Entfernungen x von der Trennungsgrenze zwischen Lösung und Gallerte (Lösungsmittel) in der letzteren.

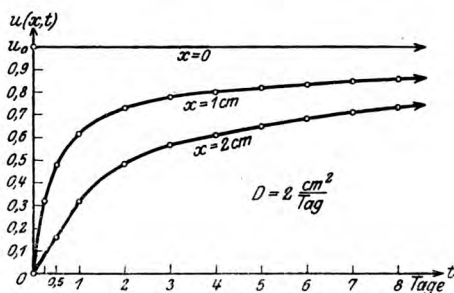


Fig. 4.

Wir wollen nun unser Augenmerk jenen chemischen Vorgängen zuwenden, die sich zwischen diffundierender Lösung und Indicator abspielen und die Feststellung des Diffusionsweges überhaupt erst ermöglichen¹⁾. Vergewenwärtigen wir uns, daß auch der in der Gallerte befindliche Indicator diffundiert und daß dieser Vorgang der Diffusion der Lösung gerade entgegengesetzt verläuft, so liegt jedenfalls bei angenäherter Übereinstimmung der Diffusionskoeffizienten von Lösung und Indicator die Annahme nahe, daß die Reaktion zwischen den einander entgegendiffundierenden Substanzen: Lösung und Indicator, dem Massenwirkungsgesetze gemäß immer bei annähernd konstanter Konzentration der diffundierenden Lösung sowohl wie des Indicators stattfindet; mit anderen Worten: die Niederschlags- bzw. Farbumschlagsgrenze wird immer dort sein, wo zum ersten Male das Löslichkeits- bzw. Gleichgewichtsprodukt von diffundierender Substanz und Indicator überschritten wird, und, unserer Annahme entsprechend, wird dies immer dort eintreten, wo die Konzentration der diffundierenden Lösung einen ganz bestimmten konstanten Wert hat. Bezeichnen wir diese Grenzkonzen-

¹⁾ Beachte für das Folgende insbesondere die Versuchsergebnisse auf den S. 59 u. 61!

tration, bei der die erste Reaktion (Niederschlag, Farbumschlag) erfolgt, mit u^* , so bedeutet der für einen bestimmten Wert der Zeit t zu u^* gehörige Wert von x den Diffusionsweg s zur Zeit t . Denn für jeden kleineren Wert von x ist dann die Reaktion zwischen gelöster Substanz und Indicator bereits erfolgt, während dies für alle größeren x -Werte noch nicht der Fall ist. In den Fig. 2 und 3 bezeichnet die gestrichelte Parallele zur x -Achse jene Grenzkonzentration u^* , die den empirisch gewonnenen und jeweils nach den arithmetischen Mittelwerten von $\frac{S}{q\sqrt{t}}$ und $\frac{S}{qs}$ korrigierten Diffusionswegen $s_1, s_2 \dots$ für $t=1, 2 \dots$ Tage entspricht.

Daß aus der Annahme einer konstanten Grenzkonzentration u^* die experimentell ermittelte Gesetzmäßigkeit (1) folgt, zeigt ein Blick auf die Lösung (10) der Diffusionsgleichung (5). Denn es ist dann

$$(13) \quad u^* = u(s, t) = \frac{2u_0}{\sqrt{\pi}} \int_{\frac{s}{2\sqrt{Dt}}}^{\infty} e^{-\eta^2} d\eta = \text{konst.},$$

woraus sich unmittelbar die Konstanz der unteren Grenze des Integrales, also

$$(14) \quad \frac{s}{2\sqrt{Dt}} = \text{konst.}$$

in Übereinstimmung mit (3) ergibt.

Hieraus aber folgt mit Heranziehung des Stefanschen Gesetzes (2) die empirisch gewonnene Relation

$$(15) \quad \frac{S}{qs} = \text{konst.},$$

identisch mit (1).

Die in den Formeln (13), (14) und (15) bzw. (3) und (1) auftretenden Konstanten sind Funktionen der jeweiligen Anfangskonzentration des Indicators, wie aus späteren, auf den S. 59 und 61 mitgeteilten Versuchen hervorgeht.

Eine wesentliche Voraussetzung dieser Betrachtungen ist ferner die, daß, abgesehen von den Störungen, die in den molekularen Veränderungen infolge Reaktion zwischen Lösung und Indicator ihren Grund haben, keine Beeinflussung des

Diffusionsvorganges als solchen, also keine Änderung des Diffusionskoeffizienten D durch die Gegenwart eines Indicators eintritt¹⁾. Das dürfte nun allerdings und vielleicht in vielen Fällen geschehen und die Nichteinhaltung der Gesetze (1), (2), (3) bzw. (14) ist dann die unmittelbare Folge. Dies kommt in der Tat auch in einem Teile unserer Versuche zum Ausdruck, die sich eben deswegen zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten D ungeeignet erwiesen.

VI.

Abhängigkeit des Diffusionsweges von der Konzentration des einer Gallerte zugesetzten Indicators.

Bei unseren bisherigen Beobachtungen über den Diffusionsweg von in eine Gallerte hineindiffundierenden Elektrolyten haben wir der Konzentration des der Gallerte zugesetzten Indicators nur insofern Aufmerksamkeit geschenkt, als wir die Reaktion des Elektrolyten mit dem Indicator als störenden, wenn auch unvermeidlichen Nebenumstand betrachtet und dementsprechend den Zusatz des Indicators auf ein Minimum beschränkt hatten. Nun hat bereits Vanzetti²⁾ den Diffusionsweg von Halogenwasserstoffsäuren in Gelatine beobachtet, der neben Silbernitrat überdies noch ein Indicator zugesetzt war. Er sagt diesbezüglich: „Bei Veränderung der Konzentration des fallenden AgNO_3 in der Gelatine bleibt (innerhalb gewisser Grenzen) die von einer Säure in einer bestimmten Zeit erreichte Höhe (h_1) dieselbe; doch ändert sich dagegen die Höhe des unlöslichen Silbersalzes (h), und zwar so, daß das Verhältnis $\frac{h_1}{h}$ sich mit dem Fallen der AgNO_3 -Konzentration dem Werte 1 nähert.“

Auch aus den im folgenden mitgeteilten Versuchen ergibt sich nun die für alle Versuche über Diffusionsvorgänge in Gallerten sehr wichtige Tatsache, daß der Diffusionsweg von der Konzentration des Indicators in der Gallerte in hohem Grade beeinflusst wird.

Wir haben dies durch zwei Versuche festgestellt, indem wir $\frac{2}{10}$ -NaCl-Lösung in Proben einer 2%igen Agaragargallerte hineindiffundieren ließen, der in heißem Zustande Silbernitrat

¹⁾ Vgl. die Ausführungen auf S. 46 f.!

²⁾ B. L. Vanzetti (Padua), Zeitschr. f. Elektrochem. 20, 570, 1914.

in wechselnden Mengen zugesetzt worden war. Wir stellten eine Serie von Proben in Eprouvetten auf, die in bezug auf den AgNO_3 -Gehalt der Gallerte zwischen $1/_{11}$ - und $1/_{2200}$ -Normalität variierten. Für jede Konzentrationsstufe waren 2 Röhrchen aufgestellt. Der auf den ersten Tag reduzierte Diffusionsweg $\frac{s}{\sqrt{t}}$ betrug in $\frac{\text{mm}}{\text{Tag}^{1/2}}$:

Versuch A.

Versuchsdauer Tage	AgNO_3								
	$n/_{22}$	$n/_{55}$	$n/_{110}$	$n/_{220}$	$n/_{550}$	$n/_{1100}$	$n/_{2200}$		
1	$\frac{s}{\sqrt{t}}$	13,5	20,0	24,5	29,5	35,0	39,0	43,0	$\frac{\text{mm}}{\text{Tag}^{1/2}}$
2		13,5	19,7	25,6	29,3	35,3	39,8	45,1	
4		11,2	18,2	23,7	28,2	33,7	38,6	42,7	
5		10,7	17,6	23,1	28,0	32,9	38,0	42,7	
Mittelwert $\frac{s}{\sqrt{t}}$		12,2	18,9	24,9	28,7	34,2	38,8	43,4	

Versuch B.

Versuchsdauer Tage	AgNO_3								
	$n/_{11}$	$n/_{22}$	$n/_{55}$	$n/_{110}$	$n/_{220}$	$n/_{550}$	$n/_{1100}$		
1	$\frac{s}{\sqrt{t}}$	9,9	13,6	21,1	25,6	29,2	33,4	38,6	$\frac{\text{mm}}{\text{Tag}^{1/2}}$
2		10,5	14,4	20,9	24,9	29,6	33,2	39,0	
3		10,2	14,4	20,6	25,6	27,5	31,7	37,7	
4		10,4	13,7	20,0	25,0	27,6	31,5	37,1	
5		10,6	13,6	20,5	25,0	28,0	32,2	36,9	
6		10,7	13,7	20,3	24,9	28,1	31,9	—	
7		10,4	13,5	20,3	—	28,9	31,7	—	
8		10,5	13,8	20,3	25,1	—	—	—	
Mittelwert $\frac{s}{\sqrt{t}}$	10,3	13,8	20,5	25,2	28,4	32,2	38,0	$\frac{\text{mm}}{\text{Tag}^{1/2}}$	

Der Effekt des wechselnden Gehaltes an Silbernitrat auf den Diffusionsweg des Kochsalzes innerhalb der Gallerte war also über alle Erwartung groß und geradezu imposant. Ist doch der Diffusionsweg durch die Abschwächung der AgNO_3 -Konzentration auf $1/_{100}$ fast auf das 4fache vergrößert worden.

Wir ersehen aus diesen Beobachtungen, daß jeder künftige Versuch, die Messung des Diffusionsweges bei erheblicherer Indikatorkonzentration für eine Berechnung des Diffusionskoeffizienten zu verwenden, die sorgfältige Beachtung und rech-

nerische Berücksichtigung der Konzentration des der Gallerte zugesetzten Indicators zur selbstverständlichen Voraussetzung haben muß.

Es erübrigt nun noch die Erörterung, wie denn diese Erscheinung gedeutet werden soll. Aus den Beobachtungen von Bechhold und Ziegler¹⁾ über Niederschlagsmembranen in Gallerten geht hervor, daß, wenn auf einer Seite einer Niederschlagsmembran ein höherer osmotischer Druck herrscht als auf der anderen, die Membran in der Richtung desselben in die Lösung von niedrigerem osmotischen Druck hineinwächst. Es wäre also immerhin naheliegend, Verschiedenheiten des osmotischen Druckes auch zur Erklärung der uns interessierenden Erscheinung heranzuziehen.

Ein einfacher Versuch hat uns jedoch darüber belehrt, daß diese Erklärungsweise unzutreffend ist.

Wir ließen $\frac{1}{10}$ -NaCl-Lösung in eine Serie von Agaragargallerten von untereinander gleichem AgNO_3 -Gehalte hineindiffundieren. Gleichzeitig aber haben wir den osmotischen Druck innerhalb der Gallerte durch Zusatz eines indifferenten Neutralsalzes, nämlich Kaliumsulfat, innerhalb weiter Grenzen variiert. Es geschah dies in der Weise, daß zu 360 ccm heißer 2%iger Agaragarlösung 40 ccm $\frac{1}{20}$ - AgNO_3 -Lösung hinzugefügt wurden. Zu je 20 ccm der silbernitrat haltigen Agaragarlösung wurden in einer Epruvette 2 ccm einer jeweilig verdünnten Kaliumsulfatlösung (9% K_2SO_4 auf $\frac{1}{1}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{20}$, $\frac{1}{50}$, $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{200}$ verdünnt) zugemischt. Nach Erkalten der Gallerte in den Epruvetten wurden dieselben mit $\frac{1}{30}$ -NaCl überschichtet.

In allen Parallelproben ist nun die Diffusion vollkommen gleichmäßig fortgeschritten, ohne durch die innerhalb der verschiedenen Gallerten bestehenden weitgehenden Verschiedenheiten des osmotischen Druckes irgendwie beeinflußt zu werden.

Wenn also die Erscheinung der verzögerten Diffusion infolge gesteigerter Konzentration des Indicators nichts mit dem osmotischen Drucke zu tun hat, wird man die Erklärung wohl ausschließlich auf das Gesetz der chemischen Massenwirkung gründen müssen.

Wir haben uns schließlich die Frage vorgelegt, ob die Zunahme des Diffusionsweges s mit abnehmendem Indicatorengehalte der Gallerte etwa auch einer Zunahme der diffundierenden Substanzmenge S entspricht.

¹⁾ H. Bechhold und S. Ziegler, Annal. d. Physik, 4. Folge, 20, 900, 1906.

Zu diesem Zwecke wurden 3 Zylinder ($q = 27,7, 33,3, 27,7$ qcm) mit einer 10⁰/₀igen Leimgallerte beschickt, die a) ⁿ/₂₀, b) ⁿ/₁₀₀, c) ⁿ/₂₀₀-AgNO₃ enthielt. Darüber wurden je 100 ccm einer appr. ⁿ/₁₀-NaCl-Lösung ($u_0 = 0,96 \frac{\text{ccm } ^n/_{10}}{\text{ccm}}$) geschichtet. Die Kochsalzlösung wurde in jeder Versuchsphase neu ersetzt und die herausdiffundierte Chloridmenge nach Volhard ermittelt.

Versuchsdauer t in Tagen	AgNO ₃ ⁿ / ₂₀				AgNO ₃ ⁿ / ₁₀₀				AgNO ₃ ⁿ / ₂₀₀			
	¹ / ₃	1	2	4	¹ / ₃	1	2	4	¹ / ₃	1	2	4
Temperatur in Celsiusgraden	17,3	17,3	17,8	19,6	17,3	17,3	17,8	19,6	17,3	17,3	17,8	19,6
Diffusionsweg s in cm	0,7	1,4	2,1	3,2	1,6	2,1	3,7	5,2	2,1	3,5	4,9	6,6
Diffundierte Menge S in ccm ⁿ / ₁₀ -NaCl	15,5	35,0	47,0	71,5	14,0	27,0	36,5	57,0	13,5	26,0	31,0	54,5
$\frac{S}{q\sqrt{t}}$	0,97	1,25	1,21	1,29	0,73	0,81	0,77	0,86	0,84	0,98	0,79	0,98
$\frac{S}{qs}$	0,80	0,90	0,76	0,81	0,26	0,31	0,29	0,33	0,23	0,26	0,23	0,30
$D = \frac{\pi}{4u_0^2} \left(\frac{S}{q\sqrt{t}}\right)^2$	0,90	1,30	1,25	1,41	0,45	0,56	0,49	0,63	0,60	0,82	0,53	0,82

Dieser Versuch ist sehr instruktiv. Er belehrt uns darüber, daß einer Verdopplung des Diffusionsweges in der silberärmeren Gallerte im Vergleich mit der silberreicheren nicht etwa eine Verdopplung der eindiffundierten Kochsalzmenge entspricht. Ganz im Gegenteil ist in die silberärmere Gallerte durch die Querschnittseinheit in derselben Zeit weniger Kochsalz eingedrungen.

Auch im dritten Falle, wo wir im Maximum eine Verdreifachung des Diffusionsweges gegenüber dem ersten Falle beobachteten, ist keine entsprechende Zunahme der eingedrungenen Kochsalzmenge feststellbar. Vielmehr ist durch die Querschnittseinheit in derselben Zeit etwaß weniger NaCl eingedrungen.

Daraus mag man als Gesetzmäßigkeit folgendes entnehmen: Eine Verminderung des Indicatorengehaltes der Gallerte hat im wesentlichen eine Zunahme des Diffusionsweges s , dagegen eine Abnahme der diffundierten Salzmenge S zur Folge.

Die Erklärung des Verhaltens von S muß wohl in den chemischen Affinitäten zwischen NaCl und AgNO_3 gesucht werden, die als Triebkräfte bei wachsender Konzentration um so wirksamer werden müssen. Dagegen muß das Verhalten von s wesentlich im chemischen Massenwirkungsgesetze begründet sein.

VII.

Zusammenfassung.

1. Bei der Diffusion verschiedener Elektrolyte (Salzsäure, Essigsäure, Natronlauge, Ammoniak, Natriumchlorid, Calciumchlorid, Natriumthiosulfat) in Agaragargallerte bei konstant erhaltener oder absinkender Konzentration der diffundierenden Lösung wurde gleichzeitig der (durch Zusatz eines geeigneten Indicators kenntlich gemachte) Diffusionsweg s gemessen, andererseits aber auch die hineindiffundierte Substanzmenge S analytisch ausgewertet.

Es ergab sich dabei, daß die Diffusionsgesetze auch auf die Diffusion in Gallerten im wesentlichen Anwendung finden können und daß im Sinne derselben $\frac{S}{q\sqrt{t}}$ und $D = \frac{\pi}{4 u_0^2} \left(\frac{S}{q\sqrt{t}} \right)^2$ annähernd als Konstante gelten dürfen.

2. Es ergab sich aber weiterhin, daß auch $\frac{S}{qs}$ in erster Annäherung als konstant gelten darf, d. h. wenn eine Elektrolytlösung in eine mit einem Indicator versetzte Gallerte hineindiffundiert, ist die jeweilig durch einen Querschnitt diffundierte Substanzmenge dem Diffusionswege annähernd proportional; dabei bedeutet:

- S die in der Zeit t diffundierte Substanzmenge,
- s den in der Zeit t zurückgelegten Diffusionsweg,
- q den Querschnitt des Diffusionszylinders,
- u_0 die Anfangskonzentration der diffundierenden Lösung,
- D den Diffusionskoeffizienten.

3. Als relatives Maß für das Diffusionsvermögen eines Elektrolyten kann der „Invasionsfaktor“ (Fürth und Bubanovic) dienen, d. h. das Verhältnis der Diffusionswege, die der Elektrolyt einerseits, eine Kochsalzlösung andererseits bei

gleicher molekularer Konzentration und gleicher Temperatur innerhalb eines gleichen Zeitabschnittes beim Hineindiffundieren in eine und dieselbe Gallerte zurücklegen. Es hat sich nun herausgestellt, daß die Invasionsfaktoren zwar nicht als Maß für die Diffusionskoeffizienten selbst, wohl aber als ein ungefährender Maßstab für die Wurzeln aus den Diffusionskoeffizienten Verwertung finden können, freilich nur insoweit, als nicht der Diffusionsvorgang in der Gallerte durch Nebenumstände (chemische Reaktionen zwischen Lösung und Indicator, die bei größerer Konzentration des letzteren erhebliche Störungen, sowie kolloidale Veränderungen innerhalb der Gallerte bewirken können) modifiziert wird.

4. Es ergibt sich daraus die Erkenntnis, daß das vermeintlich langsamere Diffundieren von Säuren und Basen, das schnellere Diffundieren stark hydratisierter Salze in Gallerten nicht zutrifft und daß die meisten Elektrolyten auch in eine Gallerte im großen und ganzen adäquat ihren Ionenbeweglichkeiten einzudringen vermögen, insoweit die Diffusionsgeschwindigkeit nicht durch das Hinzutreten chemischer Affinitäten beschleunigt oder durch kolloidale Veränderungen innerhalb der Gallerte modifiziert wird.

5. Auch theoretische, auf Stefans Arbeiten sich gründende Erwägungen führen unter der Annahme, daß beim Fortschreiten der Diffusion die jeweilige Konzentration in der Grenzschichte, bei welcher die erste Reaktion (Niederschlag, Farbumschlag) erfolgt, eine konstante sei, zu der Folgerung, daß die diffundierte Salzmenge S proportional dem Querschnitte q und dem Diffusionswege s sei:

$$\frac{S}{qs} = \text{konst.}$$

6. Als besonders wichtiges Moment bei Beobachtungen über den Diffusionsweg ergab sich die (bereits von Vanzetti bemerkte) Tatsache, daß der Diffusionsweg in hohem Grade von der Konzentration des der Gallerte zugesetzten Indicators beeinflusst wird.

Zur Chemie des Blutfarbstoffes.

Von

E. Herzfeld und R. Klinger.

(Aus dem chem. Laboratorium der med. Klinik und aus dem Hygiene-Institut der Universität Zürich.)

(Eingegangen am 27. August 1919.)

Das Hämoglobin wurde bisher den Proteiden zugezählt und als eine Verbindung von Eiweiß („Globin“) mit dem Hämatin betrachtet. Da sich die Eiweißkörper aus lauter poly-peptidartig verbundenen Aminosäuren zusammensetzen, so könnte eine solche Verbindung nur in der Weise möglich sein, daß das Hämatin sich mit einzelnen dieser Bausteine verbindet und nun gemeinsam mit diesen im Eiweiß eingebaut würde. Nur in dieser Form wäre ein „Hämatineiweiß“ denkbar, ähnlich dem „Jodeiweiß“ der Schilddrüse, mit dessen Eigenschaften wir uns in unserer letzten Mitteilung beschäftigt haben¹⁾. Gegen die Existenz eines solchen Körpers spricht aber die leichte Trennbarkeit des Farbstoffes von der Eiweißkomponente (Darstellung von essigsauerm Hämatin usw.). Dieser Umstand beweist, daß das Hämatin höchstens mit denjenigen Eiweißabbauprodukten verbunden sein kann, die sich an den Oberflächen des Hämoglobins wie an jedem anderen kolloid-löslichen Eiweiß vorfinden. Die Ablösung des Farbstoffes vom Eiweiß könnte dann in der Weise erfolgen, daß entweder vorher eine Spaltung seiner Verbindung mit den Abbauprodukten stattfindet, oder daß er mitsamt den Abbauprodukten in Lösung geht.

¹⁾ Diese Zeitschr. 96, 260.

Das erstere können wir durch geeignete Versuchsbedingungen ausschließen. Wenn wir nämlich frisch gewonnene und gewaschene rote Blutkörperchen so eintrocknen, daß keinerlei Spaltungen einsetzen können (rasches Trocknen des in dünner Schicht auf Glas ausgestrichenen Breies oder Versetzen desselben mit geglühtem CaCl_2 in Substanz) und das vollständig trockene Pulver mit wasserfreier Essigsäure behandeln, hierauf mit Äther versetzen, so geht der Blutfarbstoff als „essigsäures Hämatin“ glatt in den Äther über. Da wir hier ganz ohne Wasser operiert haben, so kann eine hydrolytische Spaltung einer eventuellen Farbstoffverbindung ausgeschlossen werden. Es bleibt daher, um die leichte Ablösbarkeit des Farbstoffes vom Eiweiß zu erklären, nur noch möglich, entweder anzunehmen, daß er hierbei mit seinen Trägern, den Aminosäuren oder Peptiden der Globinoberfläche, abgelöst wird, oder daß er eben nicht in fester chemischer Bindung, sondern bloß locker durch Nebenaflinitäten festgehalten (adsorbiert) ist. Schütteln wir die ätherische Lösung mit Wasser und prüfen dieses dann auf Aminogruppen, so lassen sich darin wohl geringe Mengen von solchen nachweisen. Im Verhältnis zur Menge des gelösten Farbstoffes sind dieselben aber zu klein, als daß man annehmen könnte, daß sie die „Träger“ des Hämamins am Hämoglobin waren. Es dürfte sich vielmehr bloß um mit in Lösung gegangene Abbauprodukte handeln, wofür ja auch der Umstand spricht, daß sie durch bloßes Ausschütteln mit Wasser von der ätherischen Farbstofflösung trennbar sind.

Wäre das Hämatin mit den Bausteinen des Globins fest verbunden, so müßten wir es auch im Innern der Eiweißpartikelchen antreffen. Wir sehen aber, daß es bei der Globinsynthese draußen bleibt, sich somit ganz ähnlich wie die Salze verhält, die ebenfalls an die Abbauprodukte der Eiweißoberflächen locker gebunden sind, im Innern des Eiweißes selbst aber fehlen. Hier wie dort haben wir es daher mit rein „adsorptiven“, d. h. auf Nebenvalenzen beruhenden Bindungen zu tun, die deshalb leicht und schon durch geeignete Lösungsbedingungen, nicht erst durch chemische Reaktionen im engeren Sinne, getrennt werden können. In unserm Beispiel hat sich die Essigsäure, vermutlich infolge von Nebenaflinitäten, die ihre O-Atome für die N-Atome der Pyrrolringe

besitzen, an den Farbstoff angelagert, und da diese Affinität stärker ist als jene, die das Hämatin an der Eiweißoberfläche festhielt, hat sie das letztere vom Eiweiß abgelöst, ganz ähnlich wie z. B. NaCl-Moleküle bei der Dialyse von Eiweiß gegen Wasser abgelöst werden. Die Essigsäure dient hierauf ihrerseits als Lösungsvermittler des Hämatins für den Äther. Der ganze Vorgang geht, wie wir unten zeigen werden, ohne tiefere chemische Umwandlungen des Blutfarbstoffs vor sich. Die Säure funktioniert vielmehr nur nach Art echter Lösungsvermittler in der Weise, daß sie sich locker und ohne den von ihr gelösten Stoff chemisch zu verändern, an denselben anlagert¹⁾.

Aus dieser Feststellung, für die wir später noch weitere Stützen vorbringen werden, folgt, daß der Blutfarbstoff im Hämoglobin nicht als chemische Verbindung (im engeren Sinne des Wortes) vorkommen kann, sondern bloß ganz locker auf Grund von Nebenaffinitäten festgehalten, d. i. adsorbiert sein muß; denn sonst könnte es nicht möglich sein, denselben ohne vorherige Spaltung bloß durch ein geeignetes Lösungsmittel in der eben beschriebenen Weise abzutrennen. Wir müssen vielmehr annehmen, daß der Farbstoff an der Oberfläche der kolloidverteilten Globinpartikelchen adsorbiert ist, was dadurch geschieht, daß er mit geeigneten Gruppen der an diesen Oberflächen vorhandenen Bausteine (Peptide oder Aminosäuren) in ganz lockerer („adsorptiver“) Bindung steht.

Wir gingen nun darauf aus, die Eigenschaften dieses Farbstoffes näher zu untersuchen, wobei uns vor allem die in einer früheren Arbeit²⁾ bereits gestreifte Frage der Bindung der Gase im Blute von Interesse schien. Wir bemühten uns, einen Lösungsvermittler zu finden, der die Abtrennung des Farb-

¹⁾ Die physikalisch-chemischen Vorstellungen, die wir diesem Lösungsvorgang zugrunde legen, haben wir in unseren „Beiträgen zur physikalischen Chemie der Flüssigkeiten“ (Zürich 1919, nicht im Buchhandel) eingehender entwickelt. Die folgenden Ausführungen dürften weitere Beweise dafür erbringen, daß sich die von uns aufgestellten Theorien sowohl als heuristisches Prinzip, wie für die theoretische Verarbeitung der gefundenen Tatsachen bewähren.

²⁾ Diese Zeitschr. 91.

stoffes auf eine möglichst indifferente Weise gestattet; denn wir waren zu Beginn dieser Versuche noch der (allgemein verbreiteten) Ansicht, daß das essigsäure Hämatin schon ein Derivat des eigentlichen Blutfarbstoffes ist (wofür u. a. auch die Verfärbung zu sprechen schien). Da wir beabsichtigten, eine Lösung in absolutem Alkohol zu erhalten (weil hierin jede Hydrolyse ausgeschlossen ist), mußten wir uns nach einem Lösungsvermittler umsehen, der in reinem Alkohol gut löslich ist. Wir wählten zuerst das CaCl_2 und fanden, daß sich mit seiner Hilfe in der Tat leicht eine alkoholische Lösung von Blutfarbstoff gewinnen läßt. Man setzt zu dem nach mehrmaligem Waschen auf der Zentrifuge erhaltenen Brei aus roten Blutkörperchen geglühtes CaCl_2 im Überschuß zu, so daß alles Wasser gebunden und genügend CaCl_2 als Lösungsvermittler für den absoluten Alkohol zugegen ist. Wird nun vorher mit CaCl_2 getrockneter Alkohol zugesetzt und auf dem Wasserbade erwärmt, so erhält man nach Filtration eine prachtvoll rote Lösung mit einem dem Hämoglobin ähnlichen Spektrum (ein Streifen zwischen 580 und 620). Wenn man diese Lösung mit Essigsäure versetzt, mit Wasser verdünnt und mit Äther ausschüttelt, so kann man im Wasser mit Sulfosalicylsäure noch eine geringe Menge mit in Lösung gegangenen Eiweißes (Globin) nachweisen. Sehr wahrscheinlich hat das CaCl_2 nicht nur den Blutfarbstoff, sondern auch einen Teil des Eiweißes alkohollöslich gemacht. Wir wissen ja, daß Eiweiß auch in absolutem Alkohol gelöst werden kann, wenn man Alkali oder Säure als Lösungsvermittler verwendet, und daß Eiweißlösungen, die sehr reich an Alkalisalzen von Abbauprodukten sind, durch Alkohol nicht vollständig enteiweißt werden können.

Ähnlich wie mit CaCl_2 gelingt es, durch größere Mengen kristallisierten Harnstoffes den Blutfarbstoff in Alkohol zu lösen. Von Interesse ist hierbei, daß bei Versetzen mit Äther der Farbstoff nicht im Äther gelöst bleibt (wie oben bei der Ätherbehandlung des essigsäuren Hämatins), sondern diesmal ausfällt, weil jetzt der Lösungsvermittler Harnstoff im Gegensatz zur Essigsäure in Äther unlöslich ist. Der letztere bleibt farblos, während die ausfallenden Harnstoffkrystalle deutlich rot gefärbt sind.

Die erhöhte Löslichkeit des Farbstoffes bei Zusatz von Harnstoff und CaCl_2 als Lösungsvermittler ist keine chemisch isolierte Beobachtung, sondern kann auch an andern Beispielen gezeigt werden; wenn man nämlich Harnsäure oder Tyrosin in absolutem Alkohol ohne Zusatz in der Hitze zu lösen sucht und heiß filtriert, so findet man im Filtrat nur Spuren von Blaufärbung bei Zugabe von Phenolreagens und Sodalösung. Fügt man aber bei der Auflösung in Alkohol Harnstoff oder CaCl_2 zu derselben Menge der zu lösenden Körper, kocht und filtriert heiß, so kann im Filtrat eine weitaus intensivere Blaufärbung festgestellt werden, als Zeichen dafür, daß die Harnsäure oder das Tyrosin mit diesen Lösungsvermittlern gelöst wurden. Auch hier handelt es sich um Zwischenlagerung der lösungsvermittelnden Moleküle: die NH_2 -Gruppe lagert ein CaCl_2 -Molekül an, welches nun die Beziehung zum Alkohol vermittelt; mit Harnstoff werden wahrscheinlich ureidartige Körper gebildet, welchen die Alkohollöslichkeit des Harnstoffes eigen ist.

Oxy-Phenol ist alkohollöslich, ebenso Salicylsäure; der Eintritt einer aliphatischen Kette hat auch noch keinen Einfluß auf die Alkohollöslichkeit, denn die Para-oxy-Phenyl-Propionsäure ist noch alkohollöslich. Erst der Eintritt der NH_2 -Gruppe in diesen aliphatischen Rest hat zur Folge, daß plötzlich die Löslichkeit in Alkohol sehr stark herabgesetzt ist; das gilt für die aliphatischen Säuren allein wie für deren Verbindungen mit einem Benzolring. Erst wenn man die NH_2 -Gruppe mit einem in Alkohol löslichen Körper besetzt, wird wieder die Möglichkeit zur Lösung in Alkohol geschaffen.

Unser Wunsch, den Farbstoff vollständig ohne Eiweiß im Alkohol zu erhalten, war aber auch mit Harnstoff noch nicht erfüllt, da auch hierbei geringe Mengen Eiweiß in Lösung übergingen. Dies gelang uns erst, als wir NaHCO_3 als Lösungsvermittler wählten. Am zweckmäßigsten stellte sich hierbei folgendes Verfahren heraus: Der auf der Zentrifuge erhaltene Brei gut gewaschener roter Blutkörperchen wird mit festem NaHCO_3 in großem Überschuß zerrieben. Die erhaltene Masse wird mit dem ca. 10fachen Volumen absoluten Alkohols auf dem Wasserbade zu mäßigem Sieden erhitzt. Es wird filtriert, der Rückstand abermals mit neuem heißen Alkohol extrahiert usw. so lange bis der abfiltrierte Alkohol farblos bleibt. Auf diese Weise gelingt es, den Blutfarbstoff bis auf Spuren vom Eiweiß zu trennen. Man erhält eine prächtig rotgefärbte Lösung, die wieder ein dem reduzierten Hämoglobin ähnliches Spektrum besitzt und diesmal vollständig eiweißfrei ist. (Nachweis wie oben, Zusatz von Äther und Ausschütteln mit Wasser. Reaktion mit Sulfosalicylsäure bleibt negativ.)

Das Zurückbleiben des Eiweißes bei Verwendung von NaHCO_3 dürfte darauf zurückzuführen sein, daß dieses Salz im Gegensatz zu CaCl_2 viel weniger in Alkohol löslich ist und daher nicht mehr genügend reichlich vorhanden ist, um die großen Eiweißpartikelchen im Alkohol in „Lösung“ zu erhalten.

Auffallend war nun, daß wir bei allen bisher beschriebenen Verfahren stets Lösungen eines Farbstoffes erhielten, der spektroskopisch dem reduzierten Hämoglobin entsprach, obwohl wir vom Blut ausgegangen waren, das viel Oxyhämoglobin enthalten hatte. Auch wenn man das Ausgangsmaterial reichlich mit Luft in Kontakt bringt (Durchleiten usw.) und einen Alkohol verwendet, der seinerseits gut durchlüftet war (Alkohol löst bekanntlich viel O_2), so erhält man stets denselben „reduzierten“ Farbstoff, obwohl jetzt genügend Gelegenheiten gegeben waren, um Oxyhämoglobin entstehen zu lassen. Aber nicht nur für O_2 , auch für andere „Abkömmlinge“ des Hämoglobins ergab sich das gleiche: Wenn man das Blut vorher durch Durchleiten von CO so verändert, daß es ein deutliches CO -Hämoglobinspektrum zeigt, und nun den Farbstoff in der geschilderten Weise ablöst, weist derselbe nicht mehr dieses, sondern das auch sonst erhaltene Hämoglobinspektrum auf. Selbst aus Blut, das durch Behandlung mit heiß gesättigter Ferricyankaliumlösung in einen grau-grünen Brei verwandelt wurde, indem aller Farbstoff in Methämoglobin übergeführt ist, gibt, mit Bicarbonat verrieben und mit Alkohol extrahiert, die schön rote Lösung desselben, spektroskopisch dem Hämoglobin gleichen Körpers. Ebenso läßt sich aus essigsauerm Hämatin mit demselben Verfahren der gleiche Farbstoff zurückgewinnen; wir können die Essigsäure sogar auf eine recht wenig schonende Art (z. B. durch Eindampfen einer wäßrigen Lösung auf dem Wasserbade) entfernen, somit unter Bedingungen, unter denen ein leicht veränderlicher Körper gewiß schon tiefgreifende Veränderungen erfahren hätte. Auch vom gekochten Hämoglobin kann der Farbstoff noch unverändert wiedergewonnen werden: Von dem schwarz-braunen Koagulum, das nach Kochen von Blut in Wasser erhalten wird, wird nach mehrmaligem Wechseln und neuerlichem Kochen das Wasser abfiltriert, der Rückstand getrocknet und mit gepulvertem NaHCO_3 gemischt. Wird hierauf mit absolutem Alkohol auf dem Wasserbade

wiederholt ausgekocht, so geht der Farbstoff wieder schön rot gefärbt in diesem in Lösung.

Diese Beobachtungen gestatten uns, über die Natur des Blutfarbstoffes wesentliche Schlüsse zu ziehen. Wir sehen, daß es eigentlich nur einen und im Gegensatz zu der bisherigen Meinung recht stabilen Farbstoff gibt, dessen Spektrum in bicarbonatalkoholischer Lösung demjenigen des reduzierten Hämoglobins ähnlich ist. Es ist gleichgültig, ob wir bei der Darstellung dieses Körpers von Oxyhämoglobin oder einer durch irgendeinen Zusatz hervorgebrachten Umwandlung des Hämoglobins ausgehen, immer gelangen wir zu dem gleichen Farbstoff, immer können wir denselben durch das gleiche Verfahren gewinnen, das darauf beruht, daß wir ihn mit Hilfe von geeigneten Lösungsvermittlern vom Eiweiß ablösen. Daraus folgt, daß die bisher als chemische Umwandlungen des Hämoglobins angesehenen Verbindungen wie Oxy-, Met-, CO-Hämoglobin, Säure- oder Alkalihämatin usw. keine irgendwie tiefergreifenden Veränderungen des Farbstoffes sind; es kann sich vielmehr nur um Adsorptionsbindungen, um Anlagerung der betreffenden Gas-, Säure- oder Alkalimoleküle an dem eigentlichen und unversehrt bleibenden Farbstoff handeln; dieser wird dadurch wohl in seinen spektroskopischen und einigen anderen Eigenschaften modifiziert, nicht aber chemisch umgewandelt.

Wir möchten diesen Farbstoff, der ja begrifflich keinem der bisherigen Blutfarbstoffe entspricht, als Hämochrom bezeichnen, nicht in der Absicht, die schon recht komplizierte Terminologie dieses Gebietes um einen neuen Namen zu bereichern, sondern weil wir hoffen, dadurch die vielen und in ihren chemischen Beziehungen wenig klaren Bezeichnungen auf eine einheitliche und übersichtliche Nomenklatur zu bringen¹⁾.

¹⁾ Der Ausdruck Hämochrom ist, vielleicht gerade weil er der nahe-
liegendste ist, in der Literatur noch nicht verwendet. Nur Hári (Lehr-
buch der physiol. Chemie 1919) führt ihn an, ohne jedoch den von uns auf-
gestellten Begriff damit zu verbinden und ohne ihm besondere Bedeutung
beizumessen. Wir glauben uns daher berechtigt, ihn für unsere Ter-
minologie in Anspruch zu nehmen.

Für die Reindarstellung des Hämochroms hat sich uns schließlich folgendes Verfahren als das beste erwiesen: Mehrmals gewaschenes Blut (wir verwendeten meistens Rinderblut) wird als dicker Brei leicht erwärmt bis Hämolyse eintritt, hierauf mit absolutem Alkohol gefällt (zuerst kleine, dann steigende Mengen Alkohol zusetzen, im ganzen etwa 10faches Volumen). Der Alkohol wird hierauf bis zum Sieden erhitzt und mehrmals erneuert. Sind dadurch die meisten Lipide und niedern Eiweißbausteine entfernt, so wird mit Äther nachgewaschen und hierauf getrocknet. Das erhaltene Pulver wird mit gleichem Teil gepulverten Na-Bicarbonats versetzt und nun mit absolutem Alkohol in der Hitze behandelt. Jetzt geht der Farbstoff in Lösung; da er auch beim Erkalten des Alkohols gelöst bleibt, so kann man, um den Hauptteil des mitgelösten Bicarbonates zu entfernen, in der Kälte filtrieren. Der Alkohol wird hierauf abgedampft, es bleibt ein amorphes Pulver zurück, das in absolutem Alkohol selbst in der Hitze an sich unlöslich ist, so daß man es noch mit Alkohol nachwaschen kann, wodurch der größte Teil des Bicarbonats entfernt werden kann¹⁾.

Das so erhaltene Hämochrom zeigt folgende chemisch und physikalisch interessante Eigenschaften:

Die mit Hilfe von Bicarbonat erhaltene Lösung in absolutem Alkohol ist bei stärkerer Konzentration blutrot, bei schwächerer bräunlich-rot und gibt ein Spektrum mit einem dunklen Streifen, der zwischen $\lambda = 580$ bis 620 liegt (ähnlich dem „reduzierten“ Hämoglobin aber verschoben). Lösen wir den Farbstoff statt in Alkohol in Pyridin (worin er sich beim Erwärmen, wenn auch nicht sehr schnell, löst), so zeigt diese Lösung ein deutlich verschobenes Spektrum, einen Streifen, der um 550 gelegen ist. Beide Lösungen sind echte molekular disperse Lösungen. Wir sehen somit, daß durch die Verwendung eines jeweils andern Lösungsmittels eine deutliche Veränderung im spektroskopischen Verhalten des Farbstoffes hervorgerufen wurde. Daraus können wir schließen: 1. daß schon so lockere Verbindungen, wie sie den Lösungen zugrunde liegen — durch Eindampfen des Lösungsmittels können wir den Farbstoff immer wieder unverändert zurückgewinnen — das Ver-

¹⁾ Da die Asche derart gereinigten Hämochroms immer noch etwas Alkali enthält, und da es außerdem im Wasser kolloid verteilbar ist (also noch geringe Mengen eines Lösungsvermittlers enthalten muß), so ist es wahrscheinlich, daß auch dieses Präparat noch etwas Bicarbonat enthält. Es dürfte sich hierbei aber nur um eine Verunreinigung, nicht um eine wirkliche Verbindung handeln, denn sonst würde es in keinem Alkohol direkt löslich sein.

halten eines Stoffes im Spektroskop wesentlich zu beeinflussen vermögen und 2., daß die Lösungen, wie wir gegenüber der van t'Hoff'schen Lösungstheorie geltend gemacht haben, wirklich Molekülverbindungen mit dem Lösungsmittel sein müssen, nicht eine bloße Verteilung des gelösten Stoffes; denn sonst wäre es unverständlich, wieso bei einer in beiden Fällen molekulardispersen „Verteilung“ ein anderes Spektrum erhalten werden könnte, sobald wir bloß das Lösungsmittel durch ein anderes ersetzen.

Von anderen Lösungsmitteln sei erwähnt, daß Hämochrom, abgesehen vom absoluten Alkohol auch in Aceton, Äther, Chloroform, Xylol unlöslich ist, sich dagegen in heißem Glycerin gut mit bräunlich-roter Farbe löst (Spektrum ähnlich demjenigen der wäßrig-alkoholischen Lösung). In Eisessig ist der Farbstoff schon in der Kälte, besser in der Wärme löslich und zeigt zunächst ein Spektrum mit einem schwarzen Streifen bei 630 bis 640, der sich beim Stehen nach einigen Stunden in den grünen Teil des Spektrums verschiebt (530 bis 540). Wird die Lösung in Eisessig mit Eisessig verdünnt, so bleibt der Absorptionsstreifen bestehen, wird sie dagegen mit Wasser verdünnt, so verschwindet derselbe, das Verhalten entspricht dann demjenigen des essigsäuren Hämatins.

In Wasser löst sich der Farbstoff deutlich kolloid und sieht wie eine kolloide Silberlösung (Kollargol usw.) aus; wir müssen daraus schließen, daß für das Wasser wohl gewisse Affinitäten vorhanden sind (vermutlich kommen in erster Linie die N-Atome dafür in Betracht); daß diese Wasserbindung aber noch nicht ausreicht, um die relativ großen Moleküle vollständig voneinander zu isolieren, d. h. in molekulardisperser Lösung zu erhalten. Es wird eben nur ein Teil der Moleküloberfläche mit einer Wasserhülle umgeben, während andere Teile (die von den C-Ringen eingenommenen Seiten) ohne Bedeckung bleiben. Hier überwiegt daher die gegenseitige Anziehung der Moleküle, es bilden sich Komplexe vieler Moleküle, und damit ist die kolloide Beschaffenheit der Lösung gegeben.

Noch ungünstiger für eine Lösung liegen die Verhältnisse im absoluten Alkohol. Hier bestehen zwar auch gewisse Affinitäten (vermutlich der C-Ringe einerseits, der C-Atome des Alkohols andererseits); aber auch hier wird dadurch nur eine einseitige Einhüllung geschaffen, während diesmal die andere Seite (die N-Atome) ganz ohne Absättigung bleibt und sich

daher hier Molekül an Molekül lagert, so daß eine feinere Aufteilung nicht möglich ist. Im absoluten Alkohol ist daher das Hämochrom selbst in der Hitze unlöslich. Erst wenn wir an diese direkt mit Alkohol nicht reagierenden Atome ein Molekül heranbringen, das sich an dieselben locker bindet und zugleich noch Affinitäten für eine Verbindung mit Alkohol frei hat, gelingt es uns, eine alkoholische Lösung zu erzielen. Wir haben gesehen, daß das Bicarbonat dieser Anforderung entspricht und wir verstehen, warum jetzt die Lösung (im Gegensatz zur rein wäßrigen) eine molekulardisperse ist: Denn jetzt wird der Lösungsvermittler (Alkohol) teils direkt, teils indirekt (mit Hilfe des Bicarbonats) an die Oberfläche der Teilchen gebunden, so daß sich dieselben nicht mehr untereinander vereinigen können.

Die kolloidwäßrige Lösung des Hämochroms ist nun dadurch ausgezeichnet, daß sie wieder ein besonderes Spektrum zeigt, das bei 610 bis 620 liegt und am ehesten demjenigen des Methämoglobins entspricht. Das neue „Lösungs“mittel hat somit wieder eine Änderung im spektroskopischen Verhalten mit sich gebracht. Setzen wir der wäßrigen Lösung langsam Alkohol zu, so geht die kolloide Verteilung allmählich in die schöner rote molekulare Lösung über (die Moleküle sind jetzt einerseits mit Wasser, auf der anderen Seite mit Alkohol gebunden, somit allseitig eingehüllt und daher genügend voneinander isoliert). Gleichzeitig ändert sich auch das Spektrum, bis wieder der breite, dem reduzierten Hämoglobin entsprechende Streifen vorhanden ist.

Das Säure- und Alkaliämatin sind weitere Beispiele von Molekülverbindungen des Farbstoffes. Setzen wir zu Blut z. B. starke Essigsäure zu, so lagert sich diese an die mit geeigneten Nebenaaffinitäten versehenen Atome des Hämochroms an und macht es wasserlöslich. Da die Essigsäure auch in Äther löslich ist, können wir jetzt sogar die Essigsäure-Hämochromverbindung aus dem Wasser mit Äther ausschütteln. Nach dem Abdampfen des Äthers und der Essigsäure bleibt ein amorpher Farbstoff übrig, den wir mit Bicarbonat versetzen und in Alkohol lösen können: das typische, unveränderte Hämochrom. Damit ist auch für diese scheinbare Umwandlung des Farbstoffes erwiesen, daß sie nur eine Adsorptions-

verbindung ist, für die ein besonderer Name nicht nötig erscheinen dürfte.

Alkalihämatin. Auch das nach Versetzen von Hämoglobin mit Lauge entstehende Produkt zeigt ein ganz verändertes Aussehen und Spektrum. Es liegt aber auch diesmal nur eine Anlagerung eines neuen Moleküles vor, denn nach Neutralisation des überschüssigen Alkalis und Zusatz von Bicarbonat und Alkohol erhalten wir wieder das ursprüngliche Hämochrom. Auch dieser Versuch zeigt, daß das Hämochrom nicht so empfindlich gegen chemische Reagenzien ist als es bisher angenommen wurde¹⁾.

Dasselbe wäre nun von der Salzsäureverbindung des Hämochroms, dem sogenannten Hämin, zu sagen. Wir möchten deshalb vorschlagen, die zahlreichen bisherigen Namen wie Hämatin, Hämin, Hämochromogen²⁾ usw., vollständig fallen zu lassen, da dieselben den irrigen Anschein erwecken, als ob es sich um neue besondere Körper handelte; es scheint zweckmäßiger, nur von Hämochrom-Molekülverbindungen zu sprechen, z. B. Hämochrom-Essigsäureverbindung usw., ebenso wie die Lösungen in Alkohol usw. als Hämochrom-Bicarbonat-Alkoholverbindung zu bezeichnen wären.

Dagegen verdient die besondere Form, in der sich das Hämochrom an Globin adsorbiert vorfindet, eine eigene Benennung und wird zweckmäßig weiter als Hämoglobin bezeichnet werden. Wir verstehen darunter diejenige Verbindung des Hämochroms, in der dasselbe an den Oberflächen von kolloid verteilten Eiweißpartikelchen (Globin) adsorbiert (auf Grund von Nebenaffinitäten von den Eiweißabbauprodukten festgehalten) ist. Lagern sich an die freie Seite des Farbstoffes Gasmoleküle, z. B. O₂, CO, NO usw. an, so entstehen daraus jene Molekülverbindungen, die als Oxy-, CO- usw.

¹⁾ Auch die Tatsache, daß der Blutfarbstoff bei Fäulnis des Blutes nicht zugrunde geht, beweist seine große chemische Stabilität; auch aus stark faulig-zersetztem Blut läßt sich das Hämochrom leicht darstellen.

²⁾ Hämochromogen ist ein zum Teil losgelöster Blutfarbstoff, in dem aber noch reichlich Eiweiß zugegen ist. Entsteht aus einer alkalischen Hämatinlösung bei Anwendung von Reduktionsmitteln.

Hämoglobin bekannt sind, Bezeichnungen, die gut verständlich und klar sind und daher am besten weiter beibehalten werden.

Für die Verbindung dieser Gase mit dem Hämoglobin dürfte folgendes von Bedeutung sein: Wichtig ist vor allem, daß das Hämochrom auf seiner Unterlage mit gewissen Nebenaffinitäten festgehalten ist. Dadurch wird der noch freie Rest seiner Affinitäten verringert, so daß der Farbstoff jetzt so gut wie wasserunlöslich ist und daher fest am Eiweiß haftet. Wäre er auch nur teilweise wasserlöslich, so würde er sich ja leicht in dem wäßrigen Milieu verbreiten und durch die Ausscheidungsorgane austreten können, was Verluste zur Folge hätte. Tatsächlich finden wir den Farbstoff dagegen nur am Hämoglobin (von anderen Eiweißflächen wie Muskeleiweiß abgesehen).

Die Unlöslichkeit spielt aber auch für das Adsorptionsvermögen des Hämoglobins eine Rolle. Nach den von uns a. a. O. entwickelten Vorstellungen beruht ja jede Adsorption darauf, daß das Adsorbens Nebenvalenzen frei hat, die nun durch den adsorbierten Stoff abgesättigt werden, ebenso wie jede Lösung nur dadurch zustande kommt, daß gelöster Stoff und Lösungsmittel auf Grund derartiger Nebenvalenzen in lockere Verbindung treten. Lösung und Adsorption sind somit ähnliche Vorgänge, sie müssen sich daher unter gewissen Bedingungen antagonistisch beeinflussen, da sie häufig die Nebenaffinitäten desselben Atomes an einem Molekül benützen; wenn ein Stoff in einem anderen gelöst ist, so hat das Lösungsmittel bereits einen guten Teil der Nebenaffinitäten (oder alle) in Beschlag genommen, es bleiben daher relativ wenige für eventuelle Adsorption eines dritten Stoffes frei. Wir sehen daher, daß die guten Adsorbentien ungelöste Stoffe sind, was nicht in „besonderen“ Eigenschaften der „Grenzflächen“ seine Erklärung findet, sondern aus dem eben Gesagten verständlich sein dürfte. Daher hängt das Adsorptionsvermögen vom physikalischen Zustand ab und daher wird es wesentlich abnehmen müssen, wenn wir das Adsorbens in Lösung bringen. Denn während es vorher viele Nebenaffinitäten frei hatte, werden diese jetzt vom Lösungsmittel besetzt. (Daß daneben noch die chemische Konstitution des Stoffes, spez. die Zahl der in

seinem Molekül enthaltenen, nicht vollends abgesättigten Atome für die Adsorptionsfähigkeit wichtig sein muß, und daß die Nebenaffinitäten, wie jede andere chemische Affinität, nicht beliebig, sondern elektiv [von gewissen Atomen leichter als von andern] abgesättigt werden, braucht hier wohl kaum noch betont zu werden.)

Der Blutfarbstoff gibt uns für diese Auffassung der Adsorption ein gutes Beispiel. Er besitzt in seinem Fe- und in den vier vermutlich mit dem Fe verbundenen N-Atomen eine Anzahl nicht völlig abgesättigter Atome, deren Nebenvalenzen mit solchen Gasen lebhaft reagieren, die ihrerseits stärkere Nebenvalenzen frei haben. (O_2 , CO, NO usw.) Mit Wasser reagieren seine Nebenaffinitäten dagegen solange fast gar nicht, als ein Teil derselben durch die Eiweißunterlage beschlagnahmt ist. Erst das völlig abgelöste Hämochrom ist, wie erwähnt, teilweise (kolloid) wasserlöslich. Als Hämoglobin ist das Hämochrom daher, in dünner Schichte auf der Oberfläche des Globins adsorbiert, ein gutes Adsorbens für derartige Gase. Bei gleichzeitiger Konkurrenz mehrerer Gase wird jenes am stärksten gebunden werden, welches diese Affinitäten am besten absättigt (z. B. $CO > O_2$). Wenn wir aber diese Nebenaffinitäten durch andere Stoffe absättigen, wie wir dies z. B. bei den beschriebenen Lösungsverfahren mit Bicarbonatalkohol tun, so müssen wir erwarten, daß jetzt die Fähigkeit zur Gasbindung verloren oder doch wesentlich eingeschränkt sein wird. Dies hat sich experimentell vollauf bestätigt: das in Alkohol gelöste Hämochrom wird bei Durchleiten von O_2 , CO usw. nicht nachweislich beeinflußt, eine Veränderung seines Spektrums findet nicht statt. Obwohl wir den Farbstoff im Alkohol noch viel feiner (molekular) dispers verteilt haben als in der kolloiden Hämoglobinlösung, so reagiert er jetzt mit den für ihn sonst so affinen Gasen nicht mehr. Nur wenn es uns gelänge, ihn aus dem Alkohol wieder in eine ähnliche kolloide Verteilung mit teilweiser Absättigung, teilweisem Freibleiben seiner Nebenaffinitäten zu bringen, wie sie auf den Hämoglobinoberflächen bestand, könnten wir erwarten, daß derselbe mit O_2 , CO usw. neuerlich in der bekannten Weise reagieren würde.

Auch die katalytische Wirkung gegen H_2O_2 , die dem Hämoglobin in so hohem Maße zukommt, hängt mit der jeweiligen Besetzung der Nebenaaffinitäten des Hämochroms durch Lösungsmittel zusammen. Die kolloide Lösung in Wasser katalysiert zwar auch deutlich, aber doch wesentlich schwächer als eine Hämoglobininlösung von ungefähr gleicher Konzentration (Farbstärke), während die molekularen Lösungen in Glycerin, Bicarbonatalkohol usw. noch schwächere Gasentwicklung verursachen. (Die Lösung in Glycerin wird hierbei rasch entfärbt.) Wir sehen daraus, daß auch die katalytische Wirkung der Fähigkeit zur O_2 -Adsorption parallel geht und wie diese geschwächt wird, wenn die Nebenaaffinitäten stärker besetzt sind.

Wie die Bindung der einzelnen Gase am Hämochrom des Hämoglobins erfolgt, ob bald mehr die einen, bald mehr die andern Atome in Betracht kommen, so daß z. B. für O_2 mehr das Fe, für CO_2 mehr die N-Atome als Bindungsstellen funktionieren, läßt sich vorläufig noch nicht sagen. Hier wird erst dann ein Urteil möglich sein, wenn wir über den chemischen Bau des Hämochrommoleküles besser unterrichtet sein werden. Man muß sich jedenfalls vorstellen, daß nicht nur ein, sondern meist eine größere Anzahl Gasmoleküle adsorbiert werden, da z. B. ein einzelnes O_2 -Molekül nur einen Bruchteil der Nebenaaffinitäten des Fe absättigt, so daß neben ihm noch andere Platz haben.

Da die reine, kolloide Lösung des Hämochroms ein dem Methämoglobin ähnliches Spektrum zeigt, lag die Vermutung nahe, daß auch der als „Methämoglobin“ bekannte Körper nicht einer eigentlichen Umwandlung (wie bisher angenommen wurde), sondern bloß einer Änderung der Löslichkeitsverhältnisse seine Entstehung verdankt. Nach den Lehrbüchern kann Methämoglobin durch eine Reihe von Oxydationsmitteln oder O-Überträgern erhalten werden (Chlorate, Ferricyankalium, Permanganat usw.). Prüft man aber diese Angaben nach, so zeigt sich, daß eigentlich nur mit Ferricyankalium das für Methämoglobin charakteristische Spektrum ($\lambda = 610$ bis 630) deutlich und regelmäßig erhalten wird, während die andern Reagenzien kein oder nur wenig typische Spektren geben. Das Ferricyankalium scheint eine besondere Verbindung mit dem Farbstoff zu liefern, welche relativ beständig ist, andererseits aber schon durch Zusatz von NH_4S_3 wieder in Hämoglobin resp. Oxyhämoglobin zurückgeführt werden kann, wogegen Zusatz von etwas Soda-

lösung ein Spektrum hervorruft, welches dem des Oxyhämoglobins ähnlich, aber deutlich verschoben ist (530 bis 540, 565 bis 610). Daß der Verbindung mit Ferricyankalium keine tiefgreifende chemische Veränderung zugrunde liegt, beweist die leichte Rückverwandlung; speziell scheint es nicht möglich, dieses Methämoglobin als ein Oxydationsprodukt des Hämochroms aufzufassen, entstanden durch festere Bindung eines O-Atoms¹⁾. Dagegen spricht u. a. der Umstand, daß auch Sodalösung, also ein nicht zu den Reduktionsmitteln gehöriger Stoff, das Spektrum zurückbildet. Aus diesem Grunde scheint uns der bisherige Name wenig zweckmäßig und sollte besser durch den Ausdruck Ferricyankalium-Hämoglobin ersetzt werden.

Wie die anderen, angeblich zu Methämoglobinbildung führenden Reagenzien das Hämoglobin verändern, darüber möchten wir vorläufig nichts aussagen, da unsere diesbezüglichen Versuche uns, wie erwähnt, keine deutlichen spektroskopischen Veränderungen ergeben haben. Wir erwähnen nur noch, daß gewöhnliche Hämoglobinlösung mit reichlich $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2$ versetzt, ein ähnliches Spektrum gibt, wie reines Hämochrom in wäßriger Lösung, nämlich einen Streifen zwischen 600 und 620.

Das Hämochrom ist ein amorphes schwarzbraunes Pulver; es gelang uns nicht, dasselbe in Krystallform zu erhalten. Die bisher beschriebenen und z. T. für das Hämoglobin-„Molekül“ resp. für gewisse chemische Umwandlungen desselben als charakteristisch angesehenen Krystalle möchten wir durchgehend (wie alle andern Eiweißkrystalle) als Gemische ansehen, in denen ein gerade vorhandener krystallisierbarer Stoff mit der entsprechenden Hämochromverbindung zusammen sich ausscheidet; keineswegs können diese Stoffe als einheitliche Individuen gelten²⁾.

¹⁾ Bei wirklicher Oxydation (z. B. durch Wasserstoffsperoxyd) wird das Hämochrom rasch zu einem gelblichen Körper umgewandelt, also zerstört.

²⁾ Ganz ähnlicher Ansicht war auch Emil Fischer, wie folgende Stellen zeigen (Organische Synthese und Biologie, 1908): „Leider ist aber dadurch noch nicht die Frage entschieden, ob diese Stoffe (genannt wurden Oxyhämoglobin, Hühnerei-Albumin, Edestine usw.) wirklich einheitliche Individuen sind, denn je komplizierter die Moleküle werden, desto mehr steigt die Neigung der Stoffe, Mischkrystalle zu bilden. . . . Es wäre deshalb geradezu wunderbar, wenn die krystallisierten, natürlichen Proteine als ganz einheitliche Stoffe erkannt würden.“

Bei zwei mit dem möglichst von Bicarbonat befreiten Hämochrom ausgeführten Bestimmungen fanden wir einen N-Gehalt von 3,10 und 3,15⁰/₀. Die Asche reagierte ganz schwach alkalisch gegen Lackmus und enthielt hauptsächlich Fe.

Die bicarbonat-alkoholische Lösung dürfte sich eignen, nach einer Molekulargewichts-Bestimmungsmethode (am besten wohl Siedepunkts-erhöhung) und bei gleichzeitiger Bestimmung des N- resp. Fe-Gehaltes, Aufschluß über die Größe des Hämochrommoleküles zu erhalten.

Zusammenfassung.

Es gibt nur einen stets identischen und relativ beständigen Blutfarbstoff, für den der Name Hämochrom gewählt wird. Derselbe kann nach einer näher beschriebenen Methode aus allen bisher als chemische Umwandlungen und Derivate des Blutfarbstoffes angesehenen Verbindungen (wie Oxy-, CO-Hämoglobin, Hämatin, Hämin usw.) in stets gleicher Beschaffenheit gewonnen werden und erweist sich somit als der eigentliche Blutfarbstoff. Im gereinigten Zustande (vom Eiweiß abgelöst) ist dieser in Wasser nur kolloid verteilbar, nicht molekular löslich. Dagegen läßt er sich mit Hilfe von Bicarbonat in Alkohol in eine schön rote, molekular disperse Lösung bringen. In dieser zeigt er ein charakteristisches, dem reduzierten Hämoglobin nahestehendes Spektrum, während er in andern Lösungsmitteln wie Pyridin, Glycerin usw. wieder andere Spektren ausweist und in der kolloid wäßrigen Lösung ein mehr dem Methämoglobin entsprechendes Spektrum beobachtet wird. Das spektroskopische Verhalten des Hämochroms erweist sich somit von seinen jeweiligen Lösungsmitteln, d. h. von den Molekülverbindungen, die es eingeht, bestimmt.

Das Hämoglobin ist ein an die Abbauprodukte von Eiweißoberflächen (Globin) adsorbiertes Hämochrom; dasselbe vermag mit dem Rest seiner Nebenaaffinitäten noch geeignete (selbst mit Nebenaaffinitäten versehene) Gase zu binden und bildet dadurch die spektroskopisch in der bekannten Weise charakterisierten Verbindungen Oxy-CO-usw.-Hämoglobin. Wird eine Hämoglobinlösung mit Ferricyankalinm versetzt, so kommt die als „Methämoglobin“ bekannte Umwandlung zustande, die eben-

falls keine tiefer greifende Veränderung (spez. keine Oxydation) ist, sondern ebenfalls bloß eine Art von Molekülverbindung sein dürfte. Wie die anderen als Methämoglobin bezeichneten Derivate des Farbstoffes chemisch aufzufassen sind, ist gegenwärtig noch unentschieden.

Die als (Säure- oder Alkali-)Hämatin, Hämin usw. bekannten Abkömmlinge des Farbstoffes sind gleichfalls durch bloße Anlagerung von Säure- oder Alkalimolekülen an den Farbstoff entstandene Molekülverbindungen.

Das Hämochrom ist in reinem Zustand ein amorphes Pulver, Krystallisation wurde nicht beobachtet.

Über den Einfluß der Temperatur auf die Oberflächen- spannung narkotischer Stoffe.

Von
Hans Winterstein.

(Nach Versuchen von Frl. Else Hirschberg.)

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 30. August 1919.)

Bei Untersuchung des Einflusses, den die Temperatur auf die Größe des Teilungskoeffizienten Öl/Wasser einerseits und auf die narkotische Wirkungsstärke bei Kaulquappen andererseits ausübt, hatte H. Meyer¹⁾ einen auffälligen Parallelismus zwischen beiden Größen beobachtet, der als eine der besten Stützen der Lipoidtheorie der Narkose angesehen zu werden pflegt. Nach dem Bekanntwerden der vielfach erheblich weitergehenden Übereinstimmung zwischen Wirkungsstärke und Oberflächenaktivität der Narkotica lag der Gedanke nahe, zu untersuchen, ob diese Übereinstimmung nicht auch in dem Einfluß der Temperatur zum Ausdruck kommt und so eine Zurückführung der mit der Temperatur eintretenden Änderungen der Wirkungsstärke auf solche der Oberflächenaktivität gemäß der Haftdrucktheorie von Traube ermöglicht. In der Tat will v. Isserkutz²⁾ bei stalagmometrischer Untersuchung der Oberflächenspannung wäßriger Lösungen durchweg eine Übereinstimmung zwischen der durch Temperaturänderungen bedingten Änderung der Oberflächenaktivität und der narkotischen Wirksamkeit beobachtet haben, mit alleiniger Ausnahme des Amylalkohols,

¹⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 46, 338, 1914.

²⁾ Biochem. Zeitschr. 88, 213, 1918.

dessen Oberflächenaktivität bei Temperaturerhöhung abnahm, dessen Wirksamkeit dagegen nach Zehl¹⁾ zunehmen würde. Gleichzeitig mit v. Issekutz hat im hiesigen Institut Unger²⁾ den Einfluß der Temperatur auf die Wirkungsstärke und Oberflächenaktivität der Narkotica einer eingehenden Untersuchung unterzogen, aber unter Verwendung des Traubeschen Visco-stagonometers bei allen untersuchten Stoffen für die Grenzfläche Narkoticumlösung/Luft mit Erhöhung der Temperatur eine Abnahme der Oberflächenspannung (= Zunahme der Oberflächenaktivität) festgestellt. v. Knaffl-Lenz³⁾ schließlich fand ungleichmäßige Veränderungen, die keine bestimmte Gesetzmäßigkeit erkennen ließen.

Zur Aufklärung dieses Widerspruches habe ich Fr. Hirschberg gebeten, mit einem bei gewöhnlicher Temperatur über 100 Tropfen fassenden Traubeschen Stalagmometer den Einfluß der Temperatur auf die Oberflächenspannung der vier Substanzen Salicylamid, Benzamid, Monacetin und Äthylurethan nachzuprüfen, von denen die ersten drei nach Meyer, die letzte nach Zehl mit steigender Temperatur im Gegensatz zu den anderen Narkoticis eine Abnahme der Wirkungsstärke beobachten lassen würde. Es war mir allerdings von vornherein kaum zweifelhaft, daß die Beobachtungsfehler auf seiten der anderen Autoren und nicht derjenigen Ungers liegen müßten. Denn, da mit Erhöhung der Temperatur die Molekularattraktion eine Verminderung erfährt, so muß a priori überall eine Abnahme der Oberflächenspannung an der Grenzfläche flüssig/gasförmig zu erwarten sein (nicht aber notwendig an der Grenzfläche flüssig/flüssig; vgl. hierzu die Ausführungen bei Unger (a. a. O.) und Winterstein⁴⁾). Auch zeigen die von v. Issekutz mitgeteilten Tropfenzahlen, trotzdem sie durch eine Multiplikation der wirklich beobachteten auf fast den dreifachen Wert erhalten sind, und ebenso die Werte von v. Knaffl-Lenz nur so geringfügige Differenzen, daß sie augenscheinlich in die Fehlergrenzen hineinfallen und die Genauig-

¹⁾ Zeitschr. f. allgem. Physiol. 8, 140, 1908.

²⁾ Biochem. Zeitschr. 89, 238, 1918.

³⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 84, 66, 1919.

⁴⁾ Die Narkose in ihrer Bedeutung für die allgemeine Physiologie. Berlin 1919, 244 f.

keit der verwendeten Methodik als unzureichend erscheinen lassen¹⁾.

Einfluß der Temperatur auf die Tropfenzahl.

Lösung	15,5° C.	42,5° C.
Wasser	104,7	112,4
ⁿ / ₁₀₀ -Benzamid . .	107,1	113,2
gesättigt " . .	110,5	114,0
ⁿ / ₁₀₀ -Monacetin . .	110,0	115,0
ⁿ / ₁₀ " . .	112,5	118,0
ⁿ / ₁₀₀ -Salicylamid .	105,7	113,0
gesättigt " . .	108,0	113,0
ⁿ / ₁₀₀ -Äthylurethan	105,0	115,1
ⁿ / ₁₀ " . .	110,6	123,0

Die aus nur wenig voneinander abweichenden Bestimmungen berechneten Mittelwerte der Tropfenzahlen sind in der obigen Tabelle zusammengestellt. Sie zeigen, den Forderungen der Theorie entsprechend in voller Übereinstimmung mit den Ergebnissen Ungers bei allen Substanzen mit dem Ansteigen der Temperatur eine deutliche Zunahme der Tropfenzahl und damit der Oberflächenaktivität.

Daß diese Feststellungen im übrigen für die Theorie der Narkose in keiner Weise von ausschlaggebender Bedeutung sind, weil die Beobachtungen Meyers über die Änderungen der Wirkungsstärke bestimmter Narkotica mit der Temperatur keine allgemeine Gültigkeit besitzen und die Verhältnisse infolge der Beeinflussung des Stoffwechsels durch die Temperatur in Wahrheit viel komplizierter liegen, ist bereits von Unger (a. a. O.) und mir (a. a. O. S. 184 f.) eingehend dargelegt worden und wird auch durch die neuen Beobachtungen von Bierich²⁾ und Höber³⁾ bestätigt.

¹⁾ Vgl. gegenüber v. Knaffl-Lenz auch die von Traube (Arch. f. d. ges. Physiol. 176, 72, 1919) gegen seine Methodik erhobenen Einwände.

²⁾ Arch. f. d. ges. Physiol. 174, 202, 1919.

³⁾ Ebenda S. 218.

Über die Beziehungen des Cholesterins zum intermediären Fettstoffwechsel.

Von

W. Hueck und L. Wacker.

(Aus dem pathologischen Institut der Universität München.)

(Eingegangen am 3. September 1919.)

Vor mehreren Jahren angestellte, durch den Krieg unterbrochene Versuchsreihen über die Bedeutung des Cholesterins im tierischen Organismus und den Einfluß der künstlichen Cholesterinzufuhr auf den Gehalt des Blutes an diesem Stoffe lieferten Anhaltspunkte für die Annahme, daß dem Cholesterin eine Rolle beim intermediären Fettstoffwechsel zukommt. Es soll damit aber nicht gesagt werden, daß dies die einzige Funktion desselben ist, denn der äußerst komplizierte Bau des chemischen Moleküls, das Vorkommen in allen Zellen und in der Gehirnsubstanz lassen auch auf andere wichtige Aufgaben schließen.

Die Gründe, die für die Beziehungen dieser rätselhaften Substanz zu den Fetten in Frage kommen, sind die folgenden:

1. Das Cholesterin ist ein ständiger Begleiter der tierischen Fette.

2. Das mit der Nahrung zugeführte Cholesterin erscheint nach der Resorption im Blute der Hauptmenge nach als Fettsäureester.

3. Die künstliche Anreicherung des Cholesterins durch die Nahrung führt nicht nur zu einer Cholesterinämie, sondern sie bewirkt auch gleichzeitig einen Anstieg der übrigen Lipoidfraktionen, insbesondere der fettsäurehaltigen Phosphatide.

4. Es existieren Beziehungen zwischen den cholesterinreichen weißen Blutkörperchen und den verschiedenen Cholesteatosen (im pathologisch-anatomischen Sinne) zum Fettstoffwechsel.

1. Das Cholesterin, ein ständiger Begleiter der tierischen Fette.

Wie in den Pflanzenfetten in geringen Mengen Phytosterin enthalten ist, so findet sich bekanntlich in dem tierischen Fett das Cholesterin. Die Mengen sind gering und betragen beim Menschen unter normalen Verhältnissen im Mittel 0,127%, können aber bei pathologischen Zuständen und im hohen Alter auf die 2- bis 3fache Menge ansteigen¹⁾. Fette mit hohem Cholesteringehalt sind im Gegensatz zu jenen mit niedrigem durch eine intensiv gelbe Farbe gekennzeichnet. Das Cholesterin findet sich im Fett zum großen Teil, wenn nicht ausschließlich, als freies Cholesterin (siehe experiment. Teil). Für unsere Betrachtung geht aus diesen ungleichen Mengenverhältnissen hervor, daß das Cholesterin für den tierischen Organismus als Energiespender nicht in Betracht kommt, sondern nur als Hilfs- substanz beim Ab-, Auf- und Umbau der Fette eine Rolle spielen kann. Zur Beurteilung der letzteren Frage ist es von Bedeutung, zu wissen, ob das Cholesterin als ein zufälliger, mit der Art der Isolierung der Fette zusammenhängender Bestandteil aufzufassen ist oder ob es als integrierende, einem bestimmten Zweck dienende Begleitsubstanz angesehen werden muß. Bei der Gewinnung des tierischen Fettes durch Ausschmelzen könnte das Cholesterin der Zellen durch die erhöhte Temperatur herausgelöst und über das Gesamtfett verteilt worden sein, in diesem Falle würde es sich also um eine mehr zufällige Beimischung handeln. Gegen diese Zufallstheorie spricht jedoch der Umstand, daß das MilCHFett gleichfalls einen ähnlichen Prozentsatz an Cholesterin enthält wie das Depotfett. Es liegt natürlich keine Veranlassung vor, das Cholesterin des MilCHFettes als eine zufällige Beimengung anzusehen, und so kann man wohl im Zusammenhang mit den folgenden Beweisführungen annehmen, daß dem Cholesterin im Fettstoffwechsel eine gewisse Bedeutung zuzuweisen ist.

¹⁾ L. Wacker, Zeitschr. f. physiol. Chem. 78, 351, 1912; 80, 385, 1912.

Tabelle I.
Verteilung des Cholesterins im Blute verschiedener Tierarten.

Tierart	Gesamtblut			Blutserum						Erythrocyten feucht		Leukocyten feucht		Erythrocyten trocken	Leuko- cyten trocken
	Freies Chole- sterin %	Ester- chole- sterin %	Gesamt- chole- sterin %	Verhältnis v. freiem Chole- sterin zu Ester- cholesterin	Ester- chole- sterin %	Freies Chole- sterin %	Gesamt- chole- sterin %	Gesamt- cholesterin colorimet. nach Auten- rieth-Funk	Freies Chole- sterin %	Ester- chole- sterin %	Freies Chole- sterin %	Ester- chole- sterin %	Freies Chole- sterin %	Freies Chole- sterin %	
															0,070
Kaninchen . . .	0,070	0,0228	0,0928	0,020	0,0835	1 : 1,7	0,0535	0,060	0,154	0,004	—	—	—	—	
Hammel . . .	—	—	—	—	—	—	0,0639	—	0,162	0,000	—	—	—	—	
Kalb . . .	0,0832	0,0483	0,1315	0,025	0,073	1 : 2,9	0,098	—	0,199	0,000	—	—	0,4224	—	
Ochse . . .	—	—	—	0,0287	0,1227	1 : 4,4	0,1515	0,125	—	—	—	—	—	—	
Pferd . . .	0,0618	0,0360	0,0978	0,0184	0,0633	1 : 3,4	0,0817	—	0,112	0,004	0,520	0,0013	0,369	1,729	
Schwein . . .	—	—	—	0,0275	0,0891	1 : 3,2	0,1166	0,1009	—	—	—	—	—	—	
Hund . . .	0,0997	0,0469	0,1466	0,0365	0,0919	1 : 2,5	0,1284	—	0,185	0,000	—	—	—	—	
Katze . . .	—	—	—	0,0437	0,1098	1 : 2,5	0,1773	0,155	—	—	—	—	—	—	
							0,1595	0,170	—	—	—	—	—	—	

2. Das mit der Nahrung zugeführte Cholesterin erscheint nach der Resorption im Blut der Hauptmenge nach als Fettsäureester.

Im Blutserum der Tiere befindet sich unter normalen Verhältnissen 0,02 bis 0,04% freies Cholesterin (vgl. Tabelle I), während die 2- bis 4fache Menge in Esterform, an Fettsäure gebunden, zugegen ist. Diese Esterquote bleibt normaliter für die einzelne Tiergattung ziemlich konstant, das gebundene Cholesterin überwiegt. Auch für den Menschen trifft dies zu. Bloor und Knudsen¹⁾ sowie Feigl²⁾ berichten, daß sie im Plasma im Mittel 58% Estercholesterin, mit 15% Variationsbreite nach unten und oben, beobachtet hätten. In pathologischen Fällen z. B. bei Übertritt des Cholesterins der Galle ins Blut kann nach Beumer und Bürger³⁾ auf 2 Teile freies Cholesterin 1 Teil Estercholesterin treffen. Ähnliches fand J. Feigl⁴⁾ als Folge von Fettsäureverarmung bei Hungerödemen. Andererseits läßt sich durch Cholesterinfütterung im Blutplasma der Kaninchen kein Überschuß an freiem Cholesterin erreichen. Nach unseren analytischen Ergebnissen (s. Tabelle II) befinden sich im normalen Kaninchenblutserum ca. 0,3 bis 0,4% ätherlösliche Bestandteile (sog. Gesamtlipide). Sie bestehen zur Hälfte aus Triglyceriden (sog. Neutralfett, aus der Differenz berechnet) zu einem Viertel aus Phosphatiden (als Lecithin berechnet) und zu einem Viertel aus Cholesterin + Cholesterinester (als Ölsäureester berechnet). Die letztere Lipidfraktion läßt sich durch Cholesterinfütterung enorm steigern. So gelang es in einem Falle, eine Zunahme des 12fachen der Norm herbeizuführen, wobei sich die Esterquote nicht wesentlich änderte. (Vgl. Tabelle II und die Tabelle im Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm. 74, 440, 1913). Die Frage nach der Herkunft und Bedeutung dieser Estervermehrung soll im nächsten Abschnitt zusammen mit der Lecithinsteigerung erörtert werden.

¹⁾ Bloor und Knudsen, Journ. of Biolog. Chem. 27, 107, 1916; 29, 7, 1917.

²⁾ J. Feigl, diese Zeitschr. 88, 70, 1918.

³⁾ Beumer und Bürger, Arch. f. experim. Pathol. u. Ther. 13, 358, 1913.

⁴⁾ J. Feigl, diese Zeitschr. 85, 385, 1918.

Tabelle II.
Veränderungen des Lipoidkomplexes im Blutserum des Kaninchens bei Cholesterinfütterung.

Nr.	Körpergewicht g	Art des Versuches %	Gesamtlipoide %	Phosphatide als Lecithin berechnet %	Gesamtcholesterin %	Freies Cholesterin %	Estercholesterin %	Verhältnis von freiem zum Estercholesterin	Cholesterin - Ölsäureester aus Estercholesterin berechnet %	Triglyceride (Neutralfett) aus der Differenz berechnet %	Freies Cholesterin des Gesamtlipoids %	Cholesterin - Ölsäureester des Gesamtlipoids %	Lecithin des Gesamtlipoids %	Triglyceride (Neutralfett) des Gesamtlipoids %	Bemerkungen
1	4300	Norm. Futter mit milchs. Natron	0,1778	0,0553	0,0462	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Gefüttert mit Heu und Hafer, 118 Tage lang tägl. 0,5 g milchsäures Natron i. Trinkwasser, Sektionsbefd. normal, Anfangsgewicht 2700 g
2	3300	Norm. Futter	0,2373	0,0678	0,0387	0,0124	0,0263	1 : 2,1	0,0444	0,1130	5,2	18,7	28,5	47,6	Gefüttert mit Heu und Hafer
3	3290	Norm. Futter	0,4091	0,0957	0,0595	0,0157	0,0438	1 : 2,8	0,0740	0,2237	3,8	18,0	23,4	54,6	Desgl.
4	2070	Norm. Futter	0,4571	0,1579	0,0966	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Seit 3 Tagen in un- serem Stall und hat vielleicht freiwillig ge- hungert
5	2150 vor 1730 nach	Hungertier	0,4605	0,1390	0,0940	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3 Tage lang gehungert
6	4200	Cholesterintier	1,4920	—	0,6018	0,1750	0,4268	1 : 2,4	0,7213	—	11,7	48,3	—	—	181 Tage mit Cholesterin-Hafer gefüttert, erhalten 230 g Cholesterin, Milchiges Serum
7	2750	Cholesterintier	0,8738	0,2069	0,1379	0,0505	0,0874	1 : 1,7	0,1477	0,4687	5,8	16,9	23,7	53,6	126 Tage mit Cholesterin-Hafer gefüttert, Milchiges Serum
8	3100	Cholesterintier	1,6241	0,3888	0,6441	—	—	—	—	—	—	—	23,9	—	Milchiges Serum
9	4180	Cholesterintier	1,3143	0,3081	0,4491	0,1397	0,3099	1 : 2,2	0,5237	0,3428	10,6	39,8	23,4	26,1	Kastrirtes Tier, 164 Tage Cholesterinfütterung, Erhalten 130 g Cholesterin

Zunahme der Lipoide bei-Cholesterinfütterung.
Ungefähr Mittelzahlen. Normales Kaninchen = 1.

Gesamtlipoid	Freies Cholesterin	Ölsäure-Cholesterin-ester	Phosphatide als Lecithin berechnet	Triglyceride aus d. Differenz berechnet
4 bis 4 $\frac{1}{2}$ fach	8 $\frac{1}{2}$ fach	8fach	3fach	2 $\frac{1}{2}$ fach

3. Die künstliche Anreicherung des Cholesterins durch die Nahrung führt nicht nur zu einer Cholesterinämie, sondern sie bewirkt auch gleichzeitig einen Anstieg der übrigen Lipoidfraktionen, insbesondere der fettsäurehaltigen Phosphatide.

Das Blutserum der Cholesterin-Fütterungskaninchen zeigt eine beträchtliche Mehrung der Gesamtlipoide, ohne daß in allen Fällen eine milchige Fettemulsion im Serum in Form von Hämoconien sichtbar würde. Erst bei längerer Zeit hindurch fortgesetzter Fütterung von Cholesterin läßt sich eine Steigerung der Gesamtlipoide auf das 5fache der Norm herbeiführen und damit nicht selten eine Trübung des Serums erreichen. Wie schon im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, kommt das in den Organismus aufgenommene Cholesterin im Blutserum größtenteils in Form von Fettsäureestern zum Vorschein. Es ist dies deshalb besonders bemerkenswert; weil nur freies Cholesterin verfüttert wurde. Das Cholesterin hat also eine große Menge Fettsäure an sich gerissen und man steht daher vor der Frage, woher die erforderliche Fettsäure genommen wird, wo der Prozeß stattfindet und welchem Zweck die Esterbildung dient?

Ohne auf die pathologischen Lipämien, die in neuerer Zeit von anderen Seiten¹⁾ eine eingehende Bearbeitung erfahren haben, eingehen zu wollen, sei auf den innigen Zusammenhang der einzelnen Lipoidfraktionen im Plasma hingewiesen.

Mit der künstlichen Vermehrung einer Komponente kann eine Zunahme der anderen Lipoidsubstanzen eintreten, wobei allerdings sehr häufig das prozentuale Verhältnis der normalen Bestandteile eine Verschiebung erleidet, trotzdem aber die absolute Menge aller Stoffe wächst. Eine

¹⁾ Beumer und Bürger, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 13, 263, 1913; S. Sakai, diese Zeitschr. 62, 387, 1914; W. R. Bloor, Journ. of Biolog. Chem. 26, 417, 1916; J. Feigl, diese Zeitschr. 1918 bis 1919 (I bis VI); I. Bang, diese Zeitschr. 91, 122, 1918.

derartige typische Lipoidämie im Sinne Klemperers läßt sich durch Cholesterinfütterung beim Kaninchen erzeugen, weil in diesem Falle das prozentuale Verhältnis des Neutralfettes (Triglycerids) in den Hintergrund tritt, dafür aber neben dem Cholesterin die Phosphatide¹⁾ eine Zunahme erfahren. Eine direkte Bestimmung der Triglyceride, etwa durch Berechnung aus den Fettsäuren, war mit Rücksicht auf die Menge des zur Verfügung stehenden Serums untunlich, sie konnten daher nur aus der Differenz berechnet werden. Aus der Zusammenstellung der Versuchsergebnisse in Tafel II ist ersichtlich, wie mit der exzessiven Zunahme des freien und gebundenen Cholesterins eine bedeutende Steigerung der absoluten Mengen der Phosphatide (als Lecithin berechnet) und des Neutralfettes parallel geht.

Ebenso wie das Cholesterin imstande ist, die Gesamtlipoide des Blutserums in die Höhe zu treiben, kann umgekehrt der Cholesterinspiegel durch reichliche Zufuhr von Nahrungsfett²⁾ emporgehen. Den Beweis lieferte Sakai (a. a. O. S. 423) an der durch Milch oder Palminfütterung erzeugten Lipämie des anämisch gemachten Kaninchens. Die Erhöhung des Cholesterinspiegels beträgt bei stärkerer Lipämie das 3- bis 5fache der Norm, eine Steigerung, die sich durch den Cholesterin- bzw. Phytosteringehalt des dargereichten Fettes nicht mehr erklären läßt. Leider existieren unseres Wissens nach keine Versuche über das Verhalten der Lipoide bei reichlicher Lecithinfütterung. Ein hoher Lecithingehalt des Serums könnte gleichfalls eine Vermehrung der anderen Lipoidfraktionen verursachen und das Bild über die Beziehungen dieser Stoffe vervollständigen.

Es ist ungemein schwer, sich ein annäherndes Bild über den chemischen Zusammenhang dieser Vorgänge zu machen und sie auf den Fettstoffwechsel zu übertragen. Auf Grund der chemischen Eigenschaften der in Frage kommenden Stoffe soll der Versuch gewagt werden, eine Skizze des allenfallsigen Weges des Abbaues der Fette zu entwerfen:

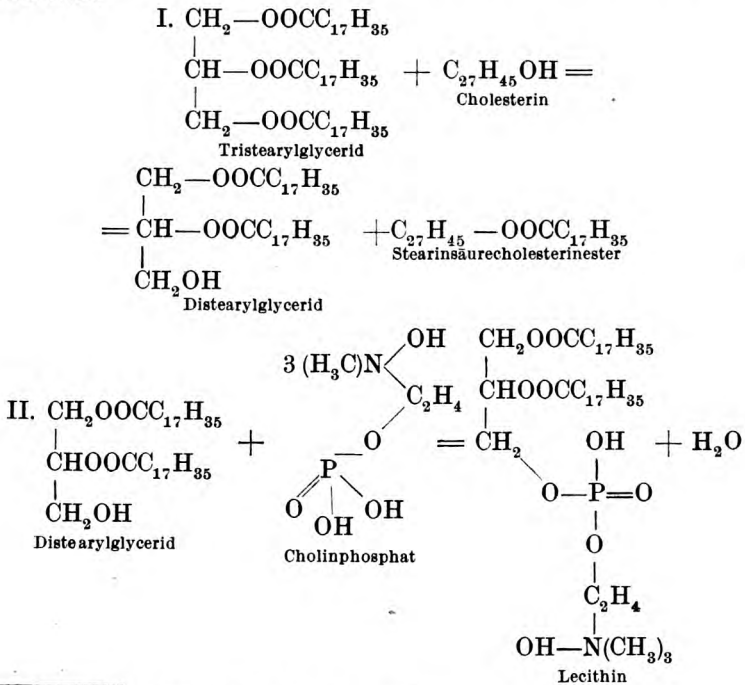
²⁾ Reicher, Verhdl. des 28. Kongresses f. innere Medizin, Wiesbaden 1911, 327; Röhl, Verhdl. des 29. Kongresses f. innere Medizin, Wiesbaden 1912, 607.

¹⁾ W. Lindemann, Untersuchungen über die Lipoidchemie des Blutes, Zeitschr. f. Geb. u. Gyn. 74, 814, 1913.

Die ihres Fettsäuregehaltes wegen für den Abbau in Frage kommenden Substanzen sind die Triglyceride, Cholesterinfettsäureester und die Phosphatide. Die Stabilität der Triglyceride (in den Fettdepots) und der Cholesterinester ist bekannt, ein direkter oxydativer Abbau dieser Substanzen kommt wohl nicht in Frage, dagegen ist die Fettsäure in den Phosphatiden der Oxydation leicht zugänglich. Die Veränderlichkeit dieser Körperklasse ist so groß, daß die Isolierung und Erforschung erschwert wird. In den Lecithinen wird häufig Linol- und Linolensäure nachgewiesen, diese können aus den entsprechenden H-reicheren Säuren (Stearin- und Ölsäure) durch H-Entziehung entstanden sein. Durch Wasseraufnahme und Spaltung ist die Möglichkeit tieferer Abbauprodukte gegeben. Ein sukzessiver Oxydationsprozeß verbunden mit hydrolytischer Spaltung des Fettsäurerestes im Phosphatidmolekül würde die Mannigfaltigkeit dieser Verbindungen erklären. Die Kombination mit Cholin und Phosphorsäure scheint erforderlich zu sein, um das Fettsäureradikal reaktionsfähig zu machen. Ein Abbau der Fette über das Lecithin wäre daher nicht unmöglich, er könnte direkt zu den Endprodukten der Oxydation oder über die Kohlenhydrate führen. Das Auftreten von Verbindungen von Kohlenhydraten mit Phosphorsäure im Blute ist ja schon beobachtet worden, es sei nur an das Jecorin erinnert. Wenn sich in der Tat der Nachweis erbringen ließe, daß der Fettstoffwechsel über die Phosphatide geht, dann wäre die lange Dauer der nicht dem Fetttransport dienenden pathologischen Lipämien erklärlicher. Das erste Stadium der Oxydation des Lecithins könnte im Blut sich vollziehen und eine gewisse Zeit beanspruchen oder es könnten Bausteine des Lecithins fehlen, wodurch das Fett übermäßig lange in der Blutbahn bleiben muß. Auch der Zweck der beiden Cholesterinformen würde unserem Verständnis näher gerückt. Man kann sich die Lecithine aus Triglyceriden durch Austausch eines Fettsäurerestes durch ein mit Phosphorsäure gekuppeltes Cholinradikal entstanden denken. Verbindet sich die aus dem Triglycerid abgestoßene Fettsäure mit Cholesterin, so wäre neben der Vermehrung des Cholesterinesters gleichzeitig diejenige des Lecithins erklärt.

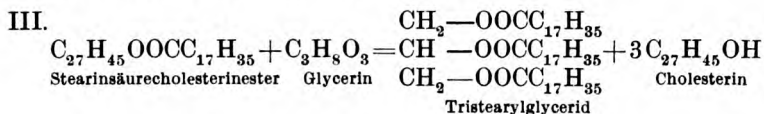
Die zur Synthese des Lecithins erforderlichen anorganischen Phosphate sind ebenso wie das Cholin¹⁾ immer im Blute vorhanden. Cholin wie Phosphorsäure stehen auch nach vollendeter Oxydation des Lecithins zu neuer Synthese von Lecithin zur Verfügung, es ist also nicht nötig, an eine Synthese des Cholins in großem Umfang zu denken, besonders da es im Pflanzenreich auch sehr verbreitet ist. Ein Mangel an Cholin kann allerdings eine Verzögerung der Lecithinbildung hervorrufen und zu einer Stagnation des Fettabbaues führen, die sich in einer Lipämie äußern kann. Das Cholin könnte also den Fettabbau beherrschen, ähnlich wie das Adrenalin den Kohlenhydratstoffwechsel reguliert. Da Fett und Kohlenhydrate als Energiespender sich vikariierend vertreten, ergäbe sich für die Regulatoren: Adrenalin und Cholin, ein gewisser Antagonismus.

Der Vorgang der Lecithinsynthese aus Triglyceriden unter Mitwirkung des Cholesterins ließe sich in folgender Weise formulieren:



¹⁾ Siehe biochem. Handlexikon 4, 828.

Eine weitere Frage von Interesse wäre dann noch das Schicksal der entstandenen Cholesterinester. Da sie an und für sich stabile Körper sind, wäre nur an eine Regeneration des Triglycerids durch Austausch des einwertigen Cholesterinalkohols gegen das Glycerin zu denken, nach folgendem Schema:



Auf diese Weise würde wiederum Cholesterin zur Verfügung stehen, um bei der Umwandlung des exogenen oder endogenen Fettes in Lecithin aufs neue eingreifen zu können. Denkt man sich diesen Prozeß der Umsetzung der Cholesterinester in Triglyceride und Cholesterin in die Leber verlegt, so würde der Cholesteringehalt der Galle bei gleichzeitigem Fehlen der Ester erklärlich.

Im Zusammenhang mit der Pathogenese der Cholelithiasis ist der Ursprung des Cholesterins der Galle der Gegenstand lebhafter Kontroversen gewesen. Während man bis vor kurzem im wesentlichen die Naunynsche¹⁾ Anschauung als die herrschende ansehen konnte — nach der der Cholesteringehalt der Galle ein ziemlich konstanter sein und sich in erster Linie von den abgestoßenen Epithelien der Gallenwege herleiten sollte —, haben sich neuerdings durch die besonders von Aschoff²⁾ wieder aufgenommene Frage der Cholelithiasis mehr und mehr Stimmen gefunden [Beumer und Bürger usw.³⁾], die für eine unmittelbare Ausscheidung des Cholesterins in der Leber sprechen. Man könnte sich also vorstellen, daß in der Leber eine Spaltung der Cholesterinester stattfindet und das überflüssige Cholesterin mit der Galle entfernt wird. Über die hierzu erforderlichen esterspaltenden Fermente der Leber (Cholesterasen) berichtet J. H. Schultz⁴⁾.

¹⁾ Naunyn, Klinik d. Cholelithiasis, Verlag v. Vogel, Leipzig 1892.

²⁾ L. Aschoff und A. Bacmeister, die Cholelithiasis, Jena, Fischer 1909.

³⁾ Beumer und Bürger, a. a. O. S. 359; I. Bang, a. a. O. S. 124.

⁴⁾ J. H. Schultz, diese Zeitschr. 42, 255, 1912; diese Zeitschr. 45, 281, 1912.

4. Es existieren Beziehungen zwischen den cholesterinreichen weißen Blutkörperchen und den verschiedenen Cholesteatosen (im pathologisch-anatomischen Sinne) zum Fettstoffwechsel.

Den Leukocyten wird nicht nur eine lipolytische Funktion zugeschrieben, sondern sie sollen sich sogar in den Darm-epithelien mit Fett beladen und auf diese Weise am Fetttransport teilnehmen. Die Verhältnisse sind keineswegs geklärt, doch soll hier nicht unerwähnt bleiben, daß dabei vielleicht der hohe Cholesteringehalt der weißen Blutkörperchen eine Rolle spielt. [Die nach besonderer Methode¹⁾ isolierten Leukocyten des Pferdebluts enthielten 5 mal soviel freies Cholesterin als die Erythrocyten.] Bekanntlich wurden dem Cholesterin gewisse entgiftende Eigenschaften wie z. B. gegen Kobragift zugesprochen. Man ist versucht, die Schutzwirkung der weißen Blutkörperchen bei Infektionen gleichfalls auf den hohen Cholesteringehalt zurückzuführen.

Die Beziehungen des Cholesterins zu einer Reihe von Cholesteatosen, insbesondere zur Atherosklerose, sind von uns an anderer Stelle²⁾ schon ausführlich erörtert worden und werden von dem einen³⁾ von uns noch weiter verfolgt werden.

Experimenteller Teil.

1. Über die Verteilung des Cholesterins und seiner Ester im Blute verschiedener Tierarten.

In der Literatur finden sich mehrfach widersprechende Angaben über den Cholesteringehalt des Blutes, des Blutserums, besonders über den Cholesterinestergehalt der roten Blutkörperchen sowie über die vorteilhaftesten Methoden zur Ermittlung derselben, die zum Teil schon in die Lehrbücher übergegangen sind und Verwirrung in die Verhältnisse zu bringen drohen. Wir geben daher unsere schon vor dem Kriege ermittelten Zahlen in der folgenden Zusammenstellung (Tabelle I) wieder und verweisen bezüglich der Details über das eingeschlagene Verfahren auf unsere früheren Angaben⁴⁾. Durch

¹⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 74, 424, 1914.

²⁾ Münch. med. Wochenschr. 60, 2097, 1913.

³⁾ W. Hueck, „Über das Mesenchym“ erscheint in Zieglers Beiträgen 1919 ff.

⁴⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 74, 419, 1914.

die Fällung und 2 malige warme Extraktion des Serums mit dem stark hygroskopischen Alkohol wird dem Eiweißniederschlag jegliches Wasser entzogen und dieser infolge seines feinen Verteilungszustandes in vorzüglicher Weise zur Extraktion mit Äther vorbereitet. Bei der Analyse des Gesamtblutes wird vor dem Zusatz von Alkohol durch Zugabe von wenig Wasser die Hämolyse eingeleitet. Die warme Alkoholfällung und Extraktion mit darauf folgender Ätherbehandlung eignet sich besser als die Extraktion nach dem Trocknen. Bei den verschiedenen Trocknungsverfahren mit oder ohne Zusatz¹⁾ von Verdünnungsmitteln wie Sand, Gips, Glaubersalz, Cellulose usw., besteht die Gefahr, daß das eingetrocknete Eiweiß Teilchen des Serums umschließt, die der Einwirkung des Äthers entzogen werden.

Die auf diese Weise gefundenen Resultate haben wir für die verschiedenen Tiergattungen in Tabelle I zusammengestellt. Sie zeigen, abgesehen von individuellen Schwankungen und von solchen der verschiedenen Tierrassen, eine analoge Verteilung des Cholesterins. Die roten Blutkörperchen enthalten keine Cholesterinester. Die angegebenen geringen Mengen fallen in die Fehlergrenze der Methode. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit jenen anderer Autoren, z. B. mit Beumer und Bürger²⁾, die auch in den Erythrocyten des Menschen keine Ester fanden. Dagegen hat Röhmann³⁾ im Verein mit Cytronberg⁴⁾ den Gehalt des freien und Gesamtcholesterins im Pferdeblut (Gesamtblut) und Serum bestimmt

¹⁾ Thaysen, diese Zeitschr. 62, 89, 1914. Das von diesem Autor auf S. 103 angelegentlichst empfohlene Trocknungsverfahren halten wir aus den angeführten Gründen für einen Rückschritt. Ganz abgesehen von der zeitraubenden zweiten Extraktion nach vorangegangener Aufschließung mit starker Natronlauge (S. 108) besitzt das Verfahren einen prinzipiellen Fehler. Durch die Verwendung von NaOH wird natürlich auch Cholesterinester verseift und dadurch der Zweck der Untersuchung, „die Ermittlung des Verhältnisses zwischen freiem und gebundenem Cholesterin“, vollkommen in Frage gestellt.

²⁾ E. Hepner, Arch. d. ges. Physiol. 73, 600, 1898; Beumer und Bürger, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 13, 349, 1913; Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 71, 1916, 1913.

³⁾ Röhmann, Berl. klin. Wochenschr. 49, Nr. 42, 1993, 1912.

⁴⁾ Cytronberg, diese Zeitschr. 45, 281, 1912.

und aus dem Verhältnis von Blutkörperchen zum Serum einen Estergehalt der Erythrocyten berechnet. Angesichts der Fehlerquellen halten wir die Berechnung für unzulässig und unsicher. Kauders¹⁾ findet in den Hammelblutkörperchen große Mengen der Ester, während diejenigen des Hundes, Meerschweinchens und Kaninchens frei sind. Das Serum der Tiere enthält freies Cholesterin und überschüssige Ester, nach Kauders ist das Rinderserum esterfrei, während das Serum des Hundes, Pferdes, Kaninchens, Meerschweinchens und Hammels solche enthält. Die Kaudersschen Zahlen zeigen, wahrscheinlich infolge ungleichmäßiger Extraktion nach vorangegangener Trocknung, enorme Schwankungen, wie die folgende Gegenüberstellung zeigt und stehen deshalb mit den tatsächlichen Verhältnissen nicht im Einklang.

	Nach Kauders		Nach Hueck u. Wacker	
	freies Cholest.	Cholest.-Ester pro 100 ccm Serum	freies Cholest.	Cholest.-Ester
Hundeserum .	0,0001	0,0033	0,0365	0,0919
Kaninchen- serum . . .	0,0074	0,0295	0,0200	0,0335 ²⁾
Rinderserum .	0,0070	0,0000	0,0287	0,1227

Wir glauben somit, daß die Angaben über den Estergehalt der roten Blutkörperchen nicht beweiskräftig sind³⁾. Wie aus Tabelle I weiterhin ersichtlich ist, enthalten auch die Leucocyten keine Ester, dagegen ist ihr Gehalt an freiem Cholesterin ca. 5mal so hoch (beim Pferd) als jener der Erythrocyten. Das Gesamtcholesterin des Serums wurde der Kontrolle wegen neben der Digitoninmethode noch colorimetrisch nach Autenrieth und Funk bestimmt.

2. Ist das Cholesterin im Fett in freier oder gebundener Form vorhanden?

Wegen der nahen Beziehung des Cholesterins zum Fettstoffwechsel schien es uns wünschenswert, zu wissen, ob dasselbe im Depotfett frei oder in Esterform oder als Gemisch beider auftritt. Da die Salkowskische Methode der Isolierung des Unverseifbaren durch Kochen mit alkoholischer Kalilauge

¹⁾ Kauders, diese Zeitschr. 55, 96, 1913.

²⁾ Vgl. dazu Sakai, diese Zeitschr. 62, 419, 1914.

³⁾ Vgl. Rosenthal, Deutsch. med. Wochenschr. 45, 21, 572, 1919.

darüber keinen Aufschluß zu geben vermag, wurde versucht, die Cholesterinfraktion in unveränderter Form aus dem Fett zu isolieren. Dies kann durch Extraktion des Fettes mit warmem Alkohol von 94,8% geschehen. In diesem löst sich das Cholesterin verhältnismäßig leicht, während das Triglycerid nur schwer und unvollkommen löslich ist. Man wird also das Cholesterin beim Schütteln des Fettes mit Alkohol in letzterem auffinden müssen, so daß zum mindesten der qualitative Nachweis des freien Cholesterins erbracht werden kann. Zu diesem Zwecke schüttelten wir 500 g menschliches Fett einmal mit einem Liter, ein zweites Mal mit $\frac{1}{2}$ Liter Alkohol im Scheidetrichter tüchtig durch. Um eine leichtere Scheidung in 2 Schichten und bessere Lösung des Cholesterins herbeizuführen, wurde diese Extraktion bei einer Temperatur von 60° durchgeführt. Die beiden Alkoholextrakte wurden vereinigt und durch Eindampfen konzentriert. In diesem Extrakt wurde das freie Cholesterin direkt nach der Digitoninmethode und nach der Verseifung mit Natriumalkoholat das Gesamtcholesterin bestimmt. Es ergab sich, daß die alkoholische Lösung Cholesterinester nicht enthielt. Die Menge des aus dem Fett extrahierten freien Cholesterins betrug 0,099%. Eine erschöpfende Extraktion des Cholesterins ist somit nicht erfolgt. Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß die Ester im Fett gelöst geblieben sind. Läßt man den alkoholischen Extrakt in einer Schale von selbst verdampfen, so bildet sich nach einiger Zeit eine Krystallhaut, bestehend aus den charakteristischen dünnen Cholesterintafeln mit rhombischen Umrissen. Nebenher finden sich erhebliche Mengen des Lipochroms, das sehr wahrscheinlich mit dem im Blutserum (besonders des Rindes) auftretenden gelben Farbstoff identisch ist.

Nebenbei bemerkt, konnten auch aus Olivenöl mit Alkohol 0,07% Phytosterin isoliert werden. Es wurde mit Digitonin und durch die konzentrisch gruppierten Nadeln beim Verdampfen des Extraktes identifiziert.

3. Die Vermehrung der Lipoidfraktion bei Cholesterinfütterung.

Die diesbezüglichen Versuche gehen schon auf die Jahre 1913 und 1914 zurück¹⁾ und sollten noch weiter ausgedehnt

¹⁾ Vgl. dazu W. Hueck, Verhdl. d. pathol. Ges. 1914.

werden. Durch die Schwierigkeiten der Tierhaltung während des Krieges wurden die Versuche unterbrochen. Zur Beweisführung für die vorstehenden theoretischen Erörterungen sind die Unterlagen ausreichend. Es kam darauf an, die Beobachtung sicherzustellen, daß mit der prozentischen Vermehrung des Cholesterins die absolute Menge der Phosphatide anstieg. Es ist selbstverständlich, daß mit der Zunahme der beiden genannten Fraktionen auch die Gesamtlipoide eine Zunahme erfahren mußten. Der Anstieg der letzteren war aber so erheblich, daß an eine Vermehrung des gesamten Lipoidkomplexes inkl. des Neutralfettes gedacht werden muß. Da die Untersuchungen gravimetrisch durchgeführt wurden, reichte leider das zur Verfügung stehende Serum zu einer gleichlaufenden Ermittlung der Fettsäuren nicht aus. Die Neutralfettzunahme mußte also aus der Differenz zwischen Gesamtlipoid minus Cholesterin- und Lecithinfraktion errechnet werden.

Als Versuchstiere dienten Kaninchen und Hunde, denen das Cholesterin mit der Nahrung (zwischen dem Hafer oder gelöst in Oliven- oder Pfirsichkernöl) zugeführt wurde¹⁾.

Die Extraktion des Serums erfolgt zuerst mit Alkohol und dann mit Äther in der weiter oben angegebenen Weise. Nach dem Verdampfen und Trocknen des ätherischen Extraktes bei Wasserbadtemperatur wurde derselbe zur Reinigung in Petroläther gelöst. Nach der Filtration der Lösung und dem Nachwaschen des Filters mit Petroläther ergänzte man das Volumen auf 250 ccm. Diese Lösung wurde in 3 Teile geteilt und

1. 75 ccm zur Bestimmung des freien Cholesterins
2. 75 ccm " " " Gesamtcholesterins
3. 100 ccm " " " Gesamtlipoids bzw. der Phosphatide

verwendet.

Der Petroläther der sämtlichen 3 Proben wurde verdampft und in 1. und 2. das freie bzw. Gesamtcholesterin nach Windaus ermittelt. Bei der 3. Probe wurde der Rest des Petroläthers in einer gewogenen Platinschale verjagt und der Rückstand am Wasserbad getrocknet. Nach weiterem $\frac{1}{2}$ tägigen Nachtrocknen im Vakuumexsiccator wurde das Gesamtlipoid ge-

¹⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 74, 427, 1913.

wogen. Durch Schmelzen des letzteren mit einer Messerspitze voll eines Gemisches von 2 Teilen Soda und 1 Teil Salpeter ließen sich die organischen Phosphate in anorganische überführen. Der Glührückstand wurde in Salzsäure gelöst, mit Ammoniak im Überschuß versetzt und mit Magnesiamischung gefällt. Aus der gewogenen pyrophosphors. Magnesia berechneten sich die Phosphatide bezogen auf Lecithin durch Multiplikation mit dem Faktor 7,27.

Aus den Versuchen der Tabelle II geht hervor, daß der Cholesteringehalt im normalen Kaninchenblut an sich schon individuellen Schwankungen unterliegt. Inwieweit bei Versuchstier Nr. 1 das milchsaure Natron mit dem niedrigen Cholesterinspiegel in Zusammenhang steht, kann auf Grund eines einzigen Versuchs (das andere Tier ist leider eingegangen) nicht beurteilt werden. Immerhin beweist der Versuch den Parallelismus zwischen Cholesterin und Lecithin auch bei abnehmenden Lipoidmengen. Die Lipämie bei Hungertieren ist auch von anderer Seite bestätigt, doch liegen in unserer Tabelle die Hungerwerte nicht wesentlich höher als manche normale.

Der Lipoidkomplex des normalen Kaninchenserums (Versuche Nr. 2 und 3) setzt sich aus rund 50% Neutralfett, 25% Phosphatiden (Lecithin) und 25% Cholesterinester + Cholesterin zusammen. Bei mäßiger Cholesterinfütterungslipämie werden die erwähnten prozentischen Verhältnisse (s. Versuch 7) der einzelnen Fraktionen beibehalten, bei einer Zunahme des Gesamtlipoids um das 4- bis 5fache der Norm nimmt die Cholesterinfraktion auf Kosten des Neutralfettes zu (s. Versuch 9).

Ähnliche Fütterungsversuche wurden auch an Hunden angestellt. Wenn man nicht über sehr große Cholesterinmengen verfügt und das Cholesterin in Öl gelöst zuführt, ist es in diesem Falle schwer, dauernde Cholesterämien¹⁾ zu erzeugen. Immerhin ist es gelungen, für den Hund dieselben Gesetzmäßigkeiten in den Veränderungen der Blutlipoiden nachzuweisen wie für das Kaninchen.

¹⁾ I. Bang, diese Zeitschr. 91, 122, 1918.

Beitrag zur Kenntnis der chemischen Natur der Enzyme¹⁾.

Von

Th. Bokorny, München.

(Eingegangen am 65. September 1919.)

Mit 1 Figur im Text.

Verschiedene Male wurde vom Verf. schon der Versuch gemacht, dieser heiklen Frage näher zu treten, heikel besonders deswegen, weil in den Enzympräparaten wohl meist keine reine Substanzen (chemische Individuen) vorliegen. Beilstein lehnt in seinem bekannten Handbuch zunächst den Gedanken einer Beschreibung der Enzyme als chemischer Stoff ab, entschließt sich aber dann doch dazu, dieselben im 4. Band, S. 1642 bis 1644, wenigstens zum kleinen Teil (Pepsin, Lab, Trypsin, Invertin) im Anschluß an die Eiweißstoffe kurz zu beschreiben. Im Ergänzungsband 4, S. 1170 bis 1176, folgt dann eine weitere Berücksichtigung der wichtigsten Enzyme an der Hand von Oppenheimers Schrift „Die Fermente“. Es wird dabei hervorgehoben, daß die Enzyme eigentlich nur nach ihren Wirkungen erkannt sind, nicht nach ihrer chemischen Natur. Dieses 1906 abgegebene Urteil stimmt zum großen Teile heute noch. Nur wenige, an verhältnismäßig gut gereinigten Präparaten ausgeführte Arbeiten über die chemische Natur liegen vor. Pekelharing hat das Pepsin des Hundemagensaftes der Elementaranalyse unterzogen und die in folgender Zusammenstellung enthaltenen Zahlen gefunden, ebenso die Pepsinsäure, die er bei 5 Minuten langem Kochen des Gerinnungs-

¹⁾ Diese wie auch die vorausgehende Arbeit über Enzyme wurde mit Unterstützung der Akademien der Wissenschaften in München und Berlin ausgeführt.

produktes seines Pepsins (nach Erhitzen in saurer Lösung entstanden) mit 1^o/₀iger Kalilauge erhalten hatte. Das Hefe-Invertin wurde von Sullivan und Thompson elementar-analytisch untersucht usw. Zum Vergleich seien daneben auch noch Zahlen für bekannte Eiweißstoffe angeführt:

	Pepsin	Pepsinsäure	Invertin	Diastase	Hühnerei-albumin	Weizen-albumin
C	51,99	50,79	46,5	52	52,8	53,1
H	7,07	7,02	6,91	6,6	7,2	7,2
N	14,44	14,44	6,2	15,3	16,6	17,6
S	1,63	1,08	0	1	1,6	1,6
P				0,8		
	(Pekelharing)	(Pekelharing)	nach Abzug von 5,1 ^o / ₀ Asche (Sullivan u. Thompson)	nach Abzug von ca. 2,5 ^o / ₀ Asche (Sherman u. Schlesinger)	(Schützenberger)	(Ritthausen)

	Prien- ¹⁾ iweiß	Algen-Eiweiß C ₇₂ H ₁₃₅ N ₁₇ S _{0,5} O ₂₂	Konglutin ¹⁾ aus Mandeln	Fibrin ¹⁾	Casein der Kuhmilch
C	52,32		50,2	52,68	53,0
H	7,55		6,8	6,83	7,1
N	14,75	14,3	18,4	16,91	15,7
S			0,5	1,10	0,78
P					0,85
O		nach O. Loew ²⁾			22,87 nach Hammarsten

Diese Zahlen dürften vorläufig genügen.

Es fällt die eiweißähnliche Elementarzusammensetzung der Fermente bei Betrachtung dieser Tabelle sofort auf. Nur das Invertin macht eine Ausnahme, indem sein Stickstoffgehalt mit nur 6,91^o/₀ angegeben wird.

Freilich fehlen in dieser Zusammenstellung eine große Anzahl der bekannten Fermente, manche aus dem einfachen Grunde, weil sie nicht isoliert werden konnten.

Auch müssen wohl eine Anzahl Fermente von den „echten Fermenten“ geschieden und besonders behandelt werden. Als echte Fermente betrachte ich diejenigen, die dem Protoplasma chemisch ähnlich sind und von diesem quasi als mole-

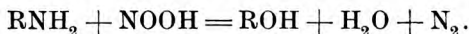
¹⁾ Aus Beilsteins Handbuch der Chemie entnommen.

²⁾ L. u. B., Die chem. Kraftquelle im leb. Protoplasma.

kulare Splitter, die noch die Beschaffenheit des aktiven Albumins haben, abgelöst werden, um an Stellen zu wirken, die dem Protoplasma selbst nicht erreichbar sind. „Jeden Katalysator biologischer Provenienz“ (Oppenheimer) als Ferment zu bezeichnen, dürfte doch zu weit gegangen sein. Die chemische Natur des Katalysators wäre hierbei ganz gleichgültig. Nur wenn der Katalysator ein anorganischer Stoff (Eisensalz, Mangansalz usw.) wäre, scheint Oppenheimer eine Ausnahme machen zu wollen¹⁾. An anderer Stelle wiederum scheint Oppenheimer daran festhalten zu wollen, daß „echte Fermente“ ein kompliziertes organisches Molekül haben müssen. Auch wird häufig genug darauf hingewiesen, daß die Fermente Stoffe von kolloidaler Natur seien, die bekanntlich auf große Moleküle schließen läßt.

Eine weitere Frage ist (den Eiweißcharakter der Fermente vorausgesetzt) die, in welcher Form der Stickstoff in den Fermenten und in den Eiweißstoffen enthalten ist. Daß er in den Eiweißstoffen wenigstens zum Teil als Amidstickstoff vorkommt, ist schon bekannt. Hingegen finde ich bezüglich der Fermente keine Notiz hierüber vor. Ich versuchte experimentellen Aufschluß darüber zu erhalten. Man muß unterscheiden zwischen Alkylaminen und aromatischen Aminen.

Bekanntlich reagieren alle Alkylaminokörper mit salpetriger Säure nach der Gleichung:



Die Entwicklung des Stickstoffgases, dessen Volumen gemessen werden kann, läßt einen Schluß auf die Menge des Amidstickstoffes zu, soweit er als Alkylamin vorhanden ist.

Die salpetrige Säure stellte ich mir her, indem ich Kaliumnitrit mit Schwefelsäure versetzte, stets erst unmittelbar vor dem Versuch und unter Einhaltung gewisser Konzentrationen. Letzteres ist von größter Wichtigkeit, indem das Natriumnitrit mit Schwefelsäure bei stärkerer Konzentration gasförmige Zersetzungsprodukte der salpetrigen Säure entwickelt, da die salpetrige Säure unter Entwicklung von Stickoxydgas zerfällt: Salpetrige Säure = Stickoxydgas + Stickstoffperoxyd + Wasser. Das Stickstoffperoxyd wiederum geht mit Wasser in Salpetersäure

¹⁾ Oppenheimer, Fermente 2, 771 bis 775.

und salpetrige Säure über. Es ist wohl anzunehmen, daß die salpetrige Säure in sehr verdünnter Lösung im freien Zustande bestehen kann. Denn wenn man Natriumnitrit auf 0,1% bringt und dann mit Schwefelsäure versetzt, erfolgt keinerlei Gasentwicklung. Da Stickstoffoxydgas sehr wenig in Wasser löslich ist, müßte sich eine Zersetzung der salpetrigen Säure in Stickoxyd + Stickstoffperoxyd + Wasser durch Gasentwicklung kenntlich machen. Auch in 0,25%iger Lösung ist die salpetrige Säure noch beständig, da man hier ebenfalls keine nennenswerte Gasentwicklung bemerkt. Ich setzte 77 ccm einer 0,25%igen Natriumnitritlösung mit etwas Schwefelsäure in dem nachher zu beschreibenden Apparat B an und erhielt binnen mehreren Tagen kaum 0,5 ccm Gas. Hingegen entwickelt schon eine 0,5%ige Lösung ziemlich erhebliche Gas mengen. Das in letzterem Falle entstehende Gas ist Stickoxyd; denn es färbt sich bei Berührung mit Luft rotbraun (NO_2 -Bildung).

Ich wählte zu den folgenden Versuchen immer die 0,25%ige Lösung, da mit 0,1%iger Natriumnitritlösung eine gar zu träge Reaktion auf Zusatz von Aminokörpern erfolgt. Auch 0,25%ige Lösung reagiert recht langsam, so daß man mehrere Tage bis zu Beendigung der Gasentwicklung zuwarten muß. Das mit Aminokörpern entstandene Gas wurde stets mit dem brennenden Holzspan und durch Vermischen mit Luft auf seine Stickstoffnatur untersucht.

Der Stickstoff ist nur äußerst wenig in Wasser löslich, nämlich $1\frac{1}{2}$ Volumina in 100 Vol. Wasser. Immerhin ist dieses gelöste Gas mitzurechnen, also bei 340 ccm Natriumnitritlösung (siehe nachher) 5,1 ccm und bei 75 ccm Nitritlösung 1,1 ccm Stickstoffgas.

Um das entwickelte Gas zu messen, verwandte ich anfangs eine 3 cm weite, in halbe Kubikzentimeter geteilte Eudiometer-röhre von 200 ccm. Sie wurde mit der Natriumnitritlösung gefüllt und in eine zur Hälfte mit Lösung gefüllte Glasschale von 400 ccm gestürzt. Das Ferment wurde entweder mit Natriumnitritlösung angerieben und von vornherein in die Eudiometer-röhre verbracht oder trocken in Filtrierpapier gewickelt und mit diesem nachträglich von unten in die Eudiometerröhre eingeführt, wobei das Paketchen durch seinen Luftgehalt emporstieg. Erstere

Methode verbot sich bald von selbst, indem das Ferment herabsank und auch in den Raum außerhalb der Röhre sich verbreitete. Letztere war unangenehm zu gebrauchen, da man genötigt war, die sehr langsam vor sich gehende Benetzung abzuwarten; außerdem geriet immer (nach der Zerfall der Papierkapsel) einiges Pulver in den Raum außerhalb der Röhre.

Die Versuche mit der Eudiometerröhre wurden aufgegeben.

Ich arbeitete nun mit den hier gezeichneten Apparaten (Fig. 1 *A* u. *B*). Dieselben sind ohne weiteres verständlich. In Apparat *A* wurde die durch Gasentwicklung herausgetriebene Flüssigkeit mittels eines Gashahns abgelassen und in einem

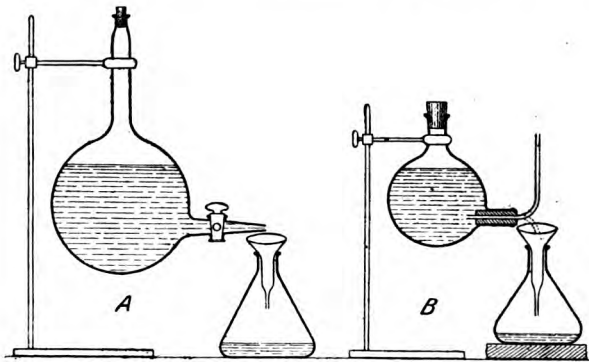


Fig. 1.

vorgelegten Kölbchen aufgefangen. In *B* tropft die verdrängte Flüssigkeit durch ein rechtwinklig gebogenes Röhrchen, das im Korke gedreht werden kann, in die Vorlage ab. Oben sind bei beiden Apparaten gutgepreßte fehlerlose Korke angebracht, welche luftdicht schließen. Nach Beendigung des Versuches wurde das Gasvolumen durch Aufgießen von Flüssigkeit¹⁾ bis zum Pfropfen gemessen. Glaskölbchen *A* faßte (bis zum Pfropfen) 340 ccm, Glaskölbchen *B* 75 ccm. Die Einfüllung wurde durch die obere Öffnung vorgenommen, zuerst Nitritlösung, dann das mit Nitritlösung angeriebene Pulver, dann nochmal Nitritlösung mit Schwefelsäure. Dann wurde sofort geschlossen und der Glashahn aufgedreht, bzw. das Glasröhrchen gedreht (bis zur horizontalen Stellung). Beim Abtropfen gehen kleine

¹⁾ Unter Zudrehen des Hahnes bzw. Senkrechtstellen des Röhrchens.

Mengen des Pulvers mit in die Vorlage hinein, die vermutlich nicht ganz zersetzt sind. Dadurch wird ein kleiner Amidstickstoffverlust hervorgerufen, der aber kaum erheblich sein dürfte, da ja nur wenige feinste Teilchen schwebend bleiben. Bei löslichen Fermenten macht es etwas mehr aus; die gefundenen Zahlen sind da also etwas zu klein. Aus diesem Grunde wurden alle Versuche mit solchen Quantitäten der Flüssigkeit und des Fermentés gemacht, daß nur eine relative kleine Menge der Nitritlösung verdrängt werden konnte (die Zeichnung stellt das ungefähre Endstadium dar).

Da der Stickstoff zu $1\frac{1}{2}$ Volumprozenten in Wasser löslich ist, mußte zur erhaltenen Kubikzentimeterzahl noch etwas hinzugeaddiert werden (5,1 ccm bei A, 1 ccm bei B). Vom herrschenden Barometerstand mußte noch eine der Niveauhöhe über der Ausflußöffnung entsprechende Wassersäule abgezogen werden bei Umrechnung des Gases auf 760 mm und 0° .

Vor dem Auffüllen nach Beendigung des Versuches wurde immer der Holzspanversuch gemacht, beim Auffüllen wurde auf die eventuelle Färbung des ausströmenden Gases geachtet.

Die Versuchsdauer betrug 4 bis 6 Tage, da die 0,25%ige Nitritlösung mit Alkylaminen, besonders wenn sie ungelöst sind, nur langsam Stickstoffgas entwickelt.

Ein Versuch mit krystallisierter Asparaginsäure ergab die Brauchbarkeit meiner Methode¹⁾, da die berechnete N-Menge nahezu erhalten wurde. Weitere Versuche wurden nun mit Fermenten und Eiweißstoffen angestellt.

Versuch 1.

Asparaginsäure (Kahlbaum) . 1,5 g
 Natriumnitritlösung von 0,25% . 340 ccm
 Schwefelsäure 0,75 g
 Temperatur $17,5^{\circ}$
 Barometerstand 719 mm
 Apparat A.

Nach 5 Tagen hatten sich 110,4 ccm Stickstoffgas von 0° und 760 mm entwickelt (gegen 114,8 ccm nach der Berechnung aus der Aspa-

¹⁾ Die Benutzung einer selbstausgearbeiteten Methode (deren chemisches Prinzip schon lang bekannt ist) rechtfertigt sich dadurch, daß ich keine meinem Zweck entsprechende Methode in der mir zur Verfügung stehenden Literatur auffinden konnte.

raginsäureformel). Das vorhandene Minus erklärt sich wohl ausreichend aus dem Verlust von Stickstoff, der sich aus dem Abtropfen noch nicht zersetzter Asparaginsäureteile in die Vorlage ergeben mußte. Die Asparaginsäure war völlig gelöst und mußte demnach einen etwas größeren Fehlbetrag ergeben, als er bei ungelösten Stoffen entsteht.

Nachdem also dieser Versuch annähernd richtiges Resultat ergeben hatte, durfte ich erwarten, daß die folgenden Versuche einen annähernd wahren Aufschluß über den Gehalt der Fermente und Eiweißstoffe an primärem Alkylamidstickstoff ergeben werden. Der sekundäre Amidstickstoff wie auch der aromatische Amidstickstoff gibt mit salpeteriger Säure kein Stickstoffgas, sondern andere Produkte.

Versuch 2.

Pepsin (Grübler) 1,2 g
 Natriumnitritlösung von 0,25% . 340 ccm
 Schwefelsäure 0,75 g
 Temperatur 17°
 Barometerstand 718,5 mm
 Apparat A.

Nach 6 Tagen ergaben sich 30,2 ccm Stickstoffgas von 0° und 760 mm, d. i. 37,6 mg Stickstoff; das macht 3,16% Amidstickstoff (primär, an Alkyl gebunden).

Auf der ersten Seite dieser Abhandlung wurde schon erwähnt, daß Pikelharing bei einer Elementaranalyse des Pepsins 14,44% Stickstoff gefunden hat.

Es ist also nicht viel mehr als $\frac{1}{5}$ des Stickstoffs als primärer Alkylamidstickstoff vorhanden.

Die geringe Zahl überraschte mich einigermaßen; ich hatte mir mehr erwartet.

Der übrige Stickstoff muß entweder als sekundärer oder tertiärer Amidstickstoff oder als Amidgruppe mit aromatischem Anhängsel (Ar. NH₂) oder in ganz anderer Bindung vorhanden sein.

Versuch 3.

Apparat B
 Hühnereialbumin (Kahlbaum) . 0,5 g
 Natriumnitritlösung von 0,25% . . 75 ccm
 Schwefelsäure 0,375 g
 Temperatur 17°
 Barometerstand 718,5 mm.

Nach 6 Tagen ergaben sich 13,22 ccm Stickstoffgas von 0° und 760 mm, d. i. 16,46 mg Stickstoff oder 3,281% Amidstickstoff.

Auch hier wurde eine viel geringere Zahl erhalten als bei der Elementaranalyse, die 16,6% Gesamtstickstoff aufweist (nach Schützenberger).

Da auch die folgenden Analysen alle ähnlich geringe Amidstickstoffzahlen ergaben, muß wohl als zweifellos angenommen werden, daß in den Eiweißstoffen und den Fermenten von Eiweißnatur nur $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{5}$ des Stickstoffs in Form von Alkyl-Amid vorhanden sei.

Dabei ist freilich zu berücksichtigen, daß an den Fermentmolekülen vermutlich beim Verlust der Fermentkraft eine chemische Veränderung (Atomumlagerung), die zum Verlust von Amidgruppen führt, auftritt (O. Loew). Eine dauernde Inaktivierung tritt aber sicherlich durch die Einwirkung der Nitritlösung mit Schwefelsäure ein. Die freie salpetrige Säure ist ein heftiges Gift für Protoplasma und Ferment.

Versuch 4.

Emulsin 1,5 g
 Natriumnitritlösung von 0,25% . 340 ccm
 Schwefelsäure 0,75 g
 Temperatur 18,5°
 Barometerstand 719 mm
 Apparat A.

Nach 6 Tagen hatten sich 53,2 ccm Stickstoff von 0° und 760 mm, d. i. 66,234 mg Amidstickstoff gebildet; das macht 4,417% Amidstickstoff.

Über die chemische Beschaffenheit der Emulsinpräparate finde ich in der Literatur verzeichnet, daß Hérissey aus süßen Mandeln ein weißes pulveriges Emulsin herstellte, das stets Eiweißgehalt aufwies, während Neuberg aus Mandeln durch Trypsinverdauung und nachfolgende Dialyse Emulsin gewann, das eiweißfrei und doch gut wirksam war.

Mein Emulsin war von G. Grübler, Leipzig, bezogen und stellte ein weißliches Pulver dar.

Versuch 5.

Labferment 0,5 g
 Natriumnitritlösung von 0,25% . 75 ccm
 Schwefelsäure 0,25 g
 Temperatur 20°
 Barometerstand 720 mm
 Apparat B.

Es ergaben sich nach 6 Tagen 12,26 ccm Stickstoff von 0° und 760 mm, d. i. 15,23 mg Stickstoff oder 3,05% Amidstickstoff.

In der Literatur finde ich angegeben, daß das Labferment die üblichen Reaktionen der Fermente aufweist.

Es gibt eine kolloidale Lösung, haftet an porösen Niederschlägen, Tierkohle usw.

Durch Ammonsulfat wird es bei 80 bis 100% Sättigung gefällt; durch Kochsalz bei 20% unter Säurezusatz fällt es ebenfalls aus.

Mein Präparat war ein gelblich weißes Pulver, wurde von G. Grübler, Leipzig, bezogen und war mit der Wirksamkeitsbezeichnung 1:300000 versehen.

Versuch 6.

Diastase (aus Malz) 1,5 g
 Natriumnitritlösung von 0,25% . 340 ccm
 Schwefelsäure 0,75 g
 Temperatur 20,5°
 Barometerstand 720 mm
 Apparat A.

Nach 7 Tagen wurden 62 ccm Stickstoff durch Einfüllen bis zum Pfropfen bestimmt. Dazu kommen noch 5 ccm gelöster Stickstoff, was zusammen 67 ccm Stickstoff ergibt. Beim Umrechnen auf 0° und 760 mm ergibt sich 59 ccm Stickstoff oder 73,5 mg, das macht 4,9% Amidstickstoff.

Über die Elementarzusammensetzung der Diastase wurde schon in der Einleitung angegeben, daß dieselbe 15,3% Gesamtstickstoff enthält (Sherman und Schlesinger).

Der durch Versuch 6 gefundene Amidstickstoff beträgt kaum $\frac{1}{3}$ des gesamten Stickstoffes. Man muß also annehmen, daß der Stickstoff zum größeren Teile nicht als Alkylamidstickstoff vorhanden ist.

Mein Präparat stammte von G. Grübler in Leipzig und trug die Bezeichnung purissimum. Es war ein weißes Pulver.

Eine andere Diastase, die mir zufällig zur Verfügung stand, die Takadiastase, sollte nun auch noch zur Untersuchung gelangen.

Versuch 7.

Takadiastase 0,5 g
 Natriumnitritlösung von 0,25% . 75 ccm
 Schwefelsäure 0,25 g
 Temperatur 21°
 Barometerstand 720 mm
 Apparat B.

Mein Präparat war ein weißliches Pulver, stammte von E. Merck in Darmstadt.

Nach 8 Tagen hatten sich 141 ccm Stickstoff von 0° und 760 mm Barometerstand gebildet, das macht 17,56 mg oder 3,5% Amidstickstoff.

Die Takadiastase ist eine von dem Pilz *Aspergillus Oryzae* (in Koji-Hefe, die den japanischen Reiswein Sake liefert, enthalten) erzeugte Amylase.

Sie ist zuerst von Aktinson, dann von Kellner Mori und Nagaoka, ferner von Büsgen und dann von Münster beschrieben worden.

Nach Stone und Wright sowie nach Takamine soll sie sehr viel energischer als Malzdiastase auf Stärke wirken.

Gegen Salzsäure ist sie nicht so empfindlich wie Malz- und Speicheldiastase. Gegen Erwärmung ist sie empfindlicher, sie wird schon bei 60° dauernd inaktiviert.

Die Amylasebildung wurde von Saito an Kulturen von *Aspergillus Oryzae* untersucht, die auf Nährböden mit verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen gewachsen waren, wobei als Stickstoffquellen sowohl organische wie auch unorganische Stoffe gebraucht wurden.

Wurden organische Stickstoffquellen gebraucht, so fand sich stets Amylase vor.

Wurde aber Ammonnitrat oder Ammonsulfat (mit Glycerin bzw. Stärke) angewendet, so bildete sich Diastase nur unter bestimmten Umständen.

Auch in der tonkinesischen Hefe findet sich ein dem *Mucor* nahestehender Schimmelpilz vor (*Amylomyces Rouxii*), der reichlich Amylase erzeugt.

Ferner hat man aus Bakterien eine Amylase (Diastase) isolieren können, welche Stärke angreift (manchmal nur Dextrine).

Leider standen mir andere Diastasen als die beiden eben angegebenen nicht zur Verfügung.

Auch von tierischer Diastase (im Speichel, Darmsaft, Pankreas enthalten) hatte ich keine Präparate.

Versuch 8.

Somatose 1,5 g
 Natriumnitritlösung von 0,25% . 340 ccm
 Schwefelsäure 0,78 g
 Temperatur 18°
 Barometerstand 719 mm
 Apparat A.

Nach 8 Tagen hatten sich insgesamt 78,2 ccm Stickstoffgas (von 0° und 760 mm) ergeben; Stickstoffexperiment und Färbung stimmten. Das macht 97,36 mg Stickstoff oder 6,47% Alkylaminstickstoff.

Die Somatose (Bayer, Elberfeld) ist bekanntlich ein hauptsächlich aus Albumosen bestehendes Präparat, ein weißliches Pulver, das aus Fleischrückständen durch Erwärmen mit verdünnten Säuren hergestellt wird. Die Albumosen sind veränderte Eiweißkörper, aus den genuinen Eiweißstoffen durch Hydrolyse entstanden.

Papayotin (Papain).

Dieses in den Früchten und dem Milchsafte des Melonenbaumes, *Carica Papaya*, vorkommende Ferment hat eine energische fleischverdauernde Wirkung und wird deshalb von den Eingebornen der Antillen und Brasiliens zur Bereitung des Fleisches verwendet. Es ist ein trypsinähnliches Ferment. Wurtz¹⁾ hält es für einen Eiweißkörper.

¹⁾ Compt. rend. 90, 1379 1880.

Leider stand mir von diesem Ferment nur eine kleine Menge, 0,3 g, zur Verfügung. Ich verwendete diese zu einem Versuch über die Amidbeschaffenheit des Fermentes. Es war ein weißliches Pulver.

Versuch 9.

Papayotin 0,3 g
 Natriumnitritlösung von 0,25% . 75 ccm
 Schwefelsäure 0,75 g
 Temperatur 21°
 Barometerstand 719 mm
 Apparat B.

Nach 6 Tagen hatten sich 14,7 ccm Stickstoffgas von 0° und 760 mm gebildet; das sind 23 mg oder 7,66% Amidstickstoff. Das ist der höchste Gehalt an Alkylamidstickstoff, der in dieser Arbeit bei Fermenten gefunden wurde.

Das Papayotin (Papain) wurde in den Früchten und in dem Milchsaft des Melonenbaums isoliert (auch aus andern Carica-Arten). Es hat eine energische Wirkung auf Fleisch, gehört also zu den Proteasen oder eiweißspaltenden Fermenten.

Nach Wurtz gibt dieses Ferment die üblichen Eiweißreaktionen. Ob dieselben durch Eiweißverunreinigungen oder durch das Ferment selbst, das dann ein Eiweißstoff wäre, gegeben werden, ist noch die Frage.

Nach den vorstehenden Untersuchungen sticht das Papayotin von andern Fermenten und von den Eiweißstoffen ab durch seinen hohen Alkylamidstickstoffgehalt.

Nach Martin ist das Papayotin ein an Albumose gebundenes Ferment.

Soweit die Untersuchungen verschiedener Forscher reichen, kann man das Papayotin bis jetzt wohl zu den Tryptasen rechnen.

Versuch 10.

Pepton (Witte) 0,5
 Natriumnitritlösung von 0,25% . 75 ccm
 Schwefelsäure 0,25 g
 Temperatur 18°_h
 Barometerstand 719 mm
 Apparat B.

Nach 8 Tagen hatten sich insgesamt 25 ccm Gas von 0° und 760 mm Barometerstand ergeben, das macht 31 mgr Stickstoff oder 12,4% Alkylamidstickstoff.

Dieser hohe Gehalt an Aminstickstoff ist jedenfalls durch Verunreinigung des Präparates mit Aminosäuren (Spaltprodukten des Eiweißes) bedingt gewesen, die oft bis 20% Amidstickstoff in sich haben.

Die Peptone sind wie die Albumosen veränderte Eiweißkörper, durch Hydrolyse aus Eiweißstoffen hervorgegangen.

Die Albumosen und Peptone des Handels stellen nicht einheitliche chemische Stoffe, sondern Gemische verschiedener Abbauprodukte dar, die den synthetischen Polypeptiden E. Fischers verwandt zu sein scheinen.

Casein. Das Präparat (von Kahlbaum, Berlin) war ein feines weißliches Pulver.

Versuch 11.

Casein 1,5 g
 Natriumnitritlösung von 0,25% . 340 ccm
 Schwefelsäure 0,75 g
 Temperatur 21°
 Barometerstand 719 mm
 Apparat A.

Nach 6 Tagen hatten sich 71,5 ccm Stickstoff von 0° und 760 mm gebildet; das sind 89 mg oder 5,93% Amidstickstoff. Im Vergleich zu andern Proteinstoffen, die hier zur Untersuchung kamen, ist das ein ziemlich erhöhter Gehalt an Alkylamidstickstoff.

Das Casein gehört zu den zusammengesetzten Proteiden, und zwar zu den Phosphorproteiden.

Mein Präparat war ein gelb-weißliches Pulver, stammte von C. A. F. Kahlbaum in Berlin.

Eine Zusammenstellung der erhaltenen Resultate zeigt folgendes:

Name des Fermentes bzw. Eiweißstoffes	Alkylamidstickstoff %	Gesamtstickstoff %
Pepsin	3,16	14,44
Emulsin	4,417	
Diastase	4,9	15,3
Lab	3,05	
Takadiastase	3,5	
Papayotin	7,66	
Hühnereialbumin	3,281	16,6
Casein	5,93	15,7
Somatose	6,47	
Pepton (Witte)	12,4	
Konglutin aus Mandeln		18,4

Die Kontroverse, ob die Fermente Eiweißstoffe sind oder andersgeartete Körper, ist seit lange in Diskussion und heute noch nicht entschieden.

Bezüglich der sogenannten Endoenzyme, die nicht isoliert werden können, gilt die genannte Streitfrage als unlösbar.

Indessen gibt gerade diese nicht kleine Anzahl von Fermenten zu denken. Warum sind sie nicht isolierbar? Entweder weil sie zu große Moleküle haben, oder weil sie bis zu einem

gewissen Grade noch mit dem Protoplasma verbunden sind. Beides läßt sich mit dem Eiweißcharakter sehr wohl vereinbaren.

In der Hefe allein sind eine beträchtliche Anzahl von Fermenten aufgefunden worden; die wenigsten konnten isoliert werden.

Name des Fermentes	Wirkung	Entdecker
Glykogenase .	von Glykogen zu Glucose führend	nach A. Koch u. Hosaeus.
Dextrinase . .	von Dextrin zu Maltose führend	nach Lindner.
Maltase	von Maltose zu Glucose führend	nach E. Fischer (spaltet überhaupt die Glucoside).
Invertase . . .	von Rohrzucker zu Dextrose und Lävulose führend	nur in <i>S. apicul.</i> nicht.
Laktase	von Milchzucker zu Dextrose und Galaktose führend	in Hefen selten.
Zymase	von Zucker zu Alkohol + CO ₂ führend	nach E. Buchner.
Phosphatase .	von Phosphorsäureester zu Phosphorsäure und Zucker führend	nach Harden und Joung.
Phosphatase ¹⁾	von Zucker und Phosphorsäure zu Phosphorsäureester führend	nach Euler.
Carboxylase .	von Brenztraubensäure zu CO ₂ und Acetaldehyd führend	nach Neuberg u. Karczag.
Aldehydase .	von 2 R·CHO zu R·CH ₂ OH + R·COOH führend (Cannizaro-Reaktion)	nach Neuberg.
Endotryptase	von Eiweiß zu Aminosäure führend	nach Hahn und Geret.
Peptase	von Eiweiß zu Pepton führend	nach Abderhalden u. Cohn.
Lipasen	an Verbrauch und Steigerung von Fettgehalt in Hefe beteiligt	nach Laxa.
Amidase ²⁾ . .	führt zu Abspaltung von Ammoniak aus Aminosäuren	nach Effront.
Reduktase . .	entfärbt Methylenblaulösung	nach Hahn.
Katalase . . .	führt von H ₂ O ₂ zu H ₂ O + O	nach O. Loew.
Emulsin . . .	spaltet Amygdalin	in Hefe nach Henry u. Auld, Bokorny.
Myrosin . . .	spaltet myronsaures Kali	in der Hefe von Bokorny aufgefunden.

Die Glykogenase wird nicht aus der Hefezelle ausgeschieden. Außerhalb der Zelle befindliches Glykogen wird also nicht angegriffen.

Die aus Stärke entstehenden Dextrine werden nach Lindner durch das Hefeferment Dextrinase gespalten, die in allen Hefen, aber nur in geringer Menge, vorkommen soll. Von einer Isolierung des Fer-

¹⁾ Ist identisch mit Phosphatase.

²⁾ Existiert nach Neuberg und F. Ehrlich nicht.

menten ist nicht die Rede. Da häufig Dextrine von Hefe assimiliert werden, scheinen die Dextrine in die Hefezelle einzudringen. Falls sie vergoren werden, geschieht dies vermutlich innerhalb der Zellen.

Die Maltase ist von E. Fischer aus Hefe isoliert worden (ist mit Wasser nur in geringer Menge extrahierbar aus der bei 30° auf Ton getrockneten Hefe).

Die Invertase läßt sich leicht aus der trocknen Hefe extrahieren mit Wasser.

Die Lactase wurde von E. Fischer aus Kefirkörnern mit Wasser extrahiert und mit Alkohol gefällt.

Die Zymase ist bekanntlich ein Endoenzyme.

Euler hat Hefeextrakte hergestellt, die eine Bildung von Phosphorsäureestern bewirken, also ist die Phosphatase extrahierbar, freilich nur aus getrockneter Hefe.

Die Carboxylase wurde von Neuberg aus auf 50° erwärmtem Macerationssaft durch Filtrieren als wasserklare goldgelbe Lösung erhalten, ist nach N. auch aus getrockneter Hefe extrahierbar.

Bezüglich der Aldehydase finde ich keine Angaben.

Das Hefetrypsin ist ein Endoenzym. Die Hefepoptase scheint mir aus toten Hefezellen herauszugehen, da man Eiweiß damit peptonisieren kann (in ziemlich stark saurem Medium, bei Gegenwart von 0,75% Phosphorsäure).

Über die Hefe-Lipase finde ich keine einschlägige Angabe; sie scheint aber nur das Fett innerhalb der Hefe anzugreifen.

Reduktasen sind im Preßsaft gefunden worden.

Die Hefenkatalase läßt sich aus der Hefe leicht extrahieren (mit Wasser und Glycerin). Die (gesperrt gedruckten) Endoenzyme sind der chemischen Untersuchung nicht zugänglich.

Alles in allem läßt sich aus der vorstehenden Arbeit eher eine Meinung für die Eiweißnatur der untersuchten Fermente als gegen diese gewinnen. Es handelt sich da um „echte“ Fermente, die auch bisher, soweit sie untersucht waren, meist als Eiweißstoffe angesprochen wurden.

Die Melaninbildung im autolysierenden Kartoffelpreßsaft.

Von

Hugo Haehn.

(Mitteilung aus der Rohstoffabteilung des Instituts für Gärungsgewerbe.)

(Eingegangen am 6. September 1919.)

Die bekannte Erscheinung der Verfärbung der Kartoffelpreßsäfte ist auf die Bildung eines Melaninfarbstoffes zurückzuführen. Nach den Untersuchungen von Bertrand und anderen Forschern findet sich in Tieren und Pflanzen ein Enzym, die Tyrosinase, das das Tyrosin zu einem schwarzen Farbstoff, dem Melanin, oxydiert bzw. kondensiert. Obgleich außer Tyrosin noch andere Stoffe, wie Adrenalin und Tryptophan, in demselben Sinne verändert werden, wird dennoch die Tyrosinase — Bertrand isolierte sie aus Kleie — als eine besondere Oxydase betrachtet. In der Kartoffel wird sie reichlich angetroffen und kann nach der Vorschrift von W. Staub¹⁾ aus den Kartoffelschalen als sehr wirksames Präparat gewonnen werden. Da man andererseits in den Kartoffeln bis etwa 30⁰/₀ freie Aminosäuren vorfindet und unter ihnen auch Tyrosin²⁾ nachgewiesen ist, so liegt eine Einwirkung der Tyrosinase auf Tyrosin im Preßsaft zweifellos vor. Gibt man zu einer reinen schwach alkalischen Tyrosinlösung einige Tropfen Kartoffelpreßsaft, so färbt sich das Reaktionsgemisch sehr schnell rötlich, und erst ganz allmählich tritt Schwärzung ein. In ganz analoger Weise erfolgt auch im Kartoffelpreßsaft für sich die Pigmentbildung. Anfangs haben wir eine rötliche Farbe, erst

¹⁾ W. Staub, Nouvelles recherches sur la Tyrosinase, Travaux de l'Institut de Botanique de l'Univers. de Genève, 8^e série I. fasc. 1908.

²⁾ Maerker-Delbrück, Handb. d. Spiritusfabrikation. 9. Aufl., S. 109.

später — die Geschwindigkeit der Umwandlung ist bei verschiedenen Kartoffelsorten verschieden groß — tritt die braune bis schwarze Farbe auf. Es ist demnach kein Zweifel, daß es sich hier um eine Melaninbildung handelt.

Was ist Melanin? Melanine¹⁾ sind schwarzbraune bis schwarze Pigmente, die im Tier- und Pflanzenkörper vorkommen können. Ihre chemische Konstitution ist vollkommen unbekannt. Fast alle haben eine Zusammensetzung, die dem Verhältnis N:H:C = 1:5:5 entspricht. Reine Präparate sind noch nicht erhalten worden, da bei der Darstellung Zersetzung eintritt. Durch Behandlung mit Kalilauge gehen sie in Pigmentsäure über, die durch eine beliebige Säure ausgefällt werden kann. Man kennt bis jetzt je nach der Herkunft verschiedene Arten, wie Hippomelanin, Sarkomelanin, Augenmelanin, Haarmelanin, z. B. das Schwarz der Negerhaare, Harnmelanin und Sepiaschwarz aus dem Farbbeutel des Tintenfisches. Dieses letzte Produkt sprechen v. Fürth und Schneider²⁾ als Einwirkungsprodukt der Tyrosinase auf Tyrosin oder eines tyrosinhaltigen, aromatischen Komplexes an. Die künstlichen Melanine, die man aus Tryptophan, Tyrosin, Oxyphenyläthylamin, Adrenalin mit Hilfe von Tyrosinase hergestellt hat, gleichen in ihren Eigenschaften dem Sepiamelanin. In der neueren Literatur³⁾ unterscheidet man die in $\frac{1}{8}$ % Alkali löslichen von den unlöslichen.

C. Neuberg, der mit dem Enzym des Farbbeckels von *Sepia officinalis* Adrenalin zu Melanin umwandelte, weist besonders in seinen Arbeiten⁴⁾ auf die Beziehung von Tyrosin zu dem physiologisch namentlich wichtigen Adrenalin hin, das vom Extrakt eines Tumors der Nebennieren ebenfalls zu Melanin oxydiert wird.

W. J. Schmidt⁵⁾ betrachtet in seiner Arbeit „Über die Methoden zur mikroskopischen Untersuchung der Farbzellen und Pigmente in der Haut der Wirbeltiere“ das 3,4-Dioxyphenylalanin, das bei der sogenannten „Dopa“-Reaktion entsteht, als Muttersubstanz des Melanins.

A. Angeli⁶⁾ verweist auf die Analogie des Pyrrolschwarz mit den natürlichen Melaninen und gibt eine Pyrrolreaktion an, die mit Nitroprussidnatrium und Kalilauge angestellt wird. Die hierbei entstehende intensive Violett färbung soll mit Eisessig in Blau übergehen. Auf die Bedeutung des Pyrrolkerns in den Melaninen hatte seinerzeit schon C. Neuberg⁷⁾ aufmerksam gemacht. Mit Kartoffelpreßsaft konnte hier die Reaktion nicht erhalten werden.

¹⁾ Biochem. Handlexikon 6, 293, 1911.

²⁾ v. Fürth u. Schneider, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 1, 241, 1901.

³⁾ v. Gortner, Chem. Centralbl. 4, 1411, 1913.

⁴⁾ Neuberg, Biochem. Zeitschr. 8, 383, 1907; Virchows Archiv 192, 514, 1908; Z. f. Krebsforschung 8, Heft 2, 1909.

⁵⁾ Schmidt, Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie 35, 1 bis 43, 1918.

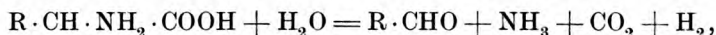
⁶⁾ Angeli, Gazz. chim. ital. 48, II, 67, 1918; Chem. Centralbl. 1, 734, 1919.

⁷⁾ Neuberg, l. c.

H. W. Wollenweber¹⁾ spricht den Farbstoff der Schwarzfleckigkeit der Knollen als Melanin an, gebildet aus Tyrosin mittels Tyrosinase.

Das Kartoffelmelanin (Tuberomelanin) gibt beim Kochen mit 5%iger KOH ein schwarzbraunes, melaninsaures Salz, Säuren geben helle Färbungen bzw. Fällungen. Auf Zusatz von NaOH tritt wieder Dunkelfärbung ein, die man abermals mit Säure verschwinden lassen kann. So läßt sich das Spiel oft wiederholen.

Die Tyrosinasewirkung ist ein sehr komplizierter, noch nicht völlig aufgeklärter chemischer Prozeß. Jedenfalls handelt es sich nicht um eine einfache Oxydation. Bach läßt zunächst das Tyrosin durch ein System spezifischer Oxygenase + Metallsalz angreifen, während die stickstoffhaltige Seitenkette durch ein anderes enzymatisches Reagens nach der Streckersehen Gleichung zerlegt wird. Es ist möglich, daß dabei der Benzolkern, da er para-substituiert ist, zum Chinoderivat oxydiert wird, wodurch auch das Auftreten der Farbe eine ungezwungene Erklärung finden würde. Allerdings ist in dem Falle die chemische Formulierung nicht ohne weiteres ganz klar, wenn es sich einfach um ein p-Chinoderivat handeln sollte. Da für die Streckerse Gleichung folgendes Schema gilt:



so wäre eine darauffolgende Kondensation des entstandenen Aldehydes mit anderen bisher noch unveränderten Molekülen und dem Oxydationsprodukt möglich. Der rote Stoff, der bei der Tyrosinase-reaktion zuerst auftritt, könnte als Produkt der ersten Phase aufgefaßt werden, während das Melanin wahrscheinlich seine Entstehung einer Kondensation der ersten Reaktionsprodukte verdankt.

Um etwas Einblick in die komplizierte Reaktion zu bekommen, wurde eine reine Tyrosinlösung hergestellt durch Auflösen von 0,05 g Tyrosin (Kahlbaum) in 100 ccm einer 0,04%igen Natriumcarbonatlösung und in verschlossener Flasche 8 Monate lang bei Zimmertemperatur dem Tageslicht ausgesetzt. Die Tyrosinlösung blieb nahezu wasserhell. Eine zweite Probe, im offenen Kolben, rötete sich in derselben Zeit bei Lichtabschluß. Der Farbenton hatte einen geringen Stich ins Bräun-

¹⁾ Wollenweber, Zeitschr. f. Spiritusindustrie 41, 52, 1918.

liche bekommen, jedoch war typische Melaninbildung nicht eingetreten. Blieb ein offener Kolben mit Tyrosinlösung im Lichte stehen, so trat die Rotfärbung intensiver und schneller ein. Der Versuch zeigt zunächst, daß der rote Farbstoff einer Oxydation durch Luft seine Entstehung verdankt. Licht allein bewirkt keine Veränderung, allem Anscheine nach keine Kondensation. Sauerstoff ist also für den Beginn der Reaktion das Wichtigste.

Es soll heute nicht behauptet werden, daß der dunkle Farbstoff des Kartoffelsaftes ausschließlich aus Melanin besteht. Es wäre denkbar, daß außer der Tyrosinase noch andere Oxydasen Pigmente bilden, so daß nicht nur Tyrosin, sondern noch andere Eiweißabbauprodukte das Ausgangsmaterial solcher dunkel gefärbten Stoffe sind. Da zur Zeit an eine Aufklärung dieser äußerst kompliziert zusammengesetzten Saftpigmente nicht gedacht werden kann, so soll hier mit Kartoffelmelanin dieser schwarze Stoff des Preßsaftes bezeichnet werden, wobei aber ausdrücklich angenommen wird — und was auch wahrscheinlich ist —, daß die Hauptmenge des in Frage kommenden Stoffes aus Tyrosin mit Hilfe der Tyrosinase entstanden ist. Die gelegentlich auftretende Schwarzbraunfärbung statt Schwärzung namentlich der aufgekochten und filtrierten Säfte läßt sich durch einen anderen Dispersitätsgrad des Melanins erklären, da bekanntlich der Farbton eines Kolloids hiervon wesentlich abhängig ist. Der schwarze grobdisperse Anteil des Melanins wird wahrscheinlich mit dem gerinnbaren Eiweiß ausgefällt.

Wie schon erwähnt wurde, ist die Saftfärbung bei verschiedenen Kartoffelsorten verschieden stark. Manche Arten geben sofort eine starke rotbraune Färbung, manche liefern sehr bald einen schwärzlichen Saft. Zwischen beiden Typen liegt eine Anzahl von Zwischenstufen. Die Unterschiede sind augenfällig.

Um diese Erscheinung noch deutlicher zu machen, befeuchtet man die frische Schnittfläche einer Kartoffel mit einer Tyrosinlösung der oben beschriebenen Zusammensetzung. Hierbei beobachtet man, daß manche Kartoffelsorten in einiger Zeit eine starke Rotfärbung geben, während andere sich nur schwachrosa bis rosa färben; später tritt Melaninbildung in

verschiedenen Abstufungen ein. Es sei hier gleich darauf hingewiesen, daß diese Reaktion nur dadurch zustande kommen kann, wenn die Tyrosinase im Überschuß vorhanden ist. Die an der Schnittfläche der Knolle vorhandene Tyrosinmenge ist relativ klein und kann nur eine schwache Farbreaktion geben, mit der Zugabe von Tyrosin hat dann die reichliche Menge vorhandener Oxydase Gelegenheit, Melanin zu bilden. Also wir finden hier in der Knolle: Wenig Tyrosin, reichliche Mengen von Tyrosinase. Wäre viel Tyrosin vorhanden, so müßte ohne Tyrosinbefeuchtung schon Rotfärbung eintreten. Nun unterscheiden sich die Kartoffelsorten durch ihren verschiedenen Tyrosinasegehalt, wodurch die verschieden starke Färbung ihre Erklärung findet. Interessant ist, daß die Reaktion nur deutlich nach der Ernte im Herbst eintritt. Im Frühjahr ist die Verfärbung der aufgeschnittenen Knollen schwach.

Eine andere Farbreaktion auf Oxydase, die allerdings auch noch ganz der Aufklärung bedarf, kann man in analoger Weise mit einer verdünnten p-Kresollösung (ca. 0,1% bis 0,5%) anstellen. Nach Chodat¹⁾ geben viele Aminosäuren wie Glykoll, Valin, Leucin, Phenylalanin, d-Alanin und Prolin mit einer Mischung von Tyrosinase und p-Kresol eine intensive Rotfärbung, die bei den meisten Aminosäuren in dichroitisches Blau übergeht. Nur die d-Alanin- und Prolinreaktionen bleiben rot. Versetzt man ein Gemisch von Alanin (Kahlbaum) mit p-Kresollösung und fügt einige Tropfen Kartoffelpreßsaft zu, so tritt binnen weniger Minuten eine starke himbeerrote Färbung auf. Leucin gibt eine langsamere Reaktion. Befeuchtet man eine frische Kartoffelschnittfläche mit p-Kresollösung, so hat man auch in ganz kurzer Zeit dieselbe Färbung auf der Schnittfläche. Die verschiedenen Kartoffelsorten geben in bestimmten Zeitabschnitten verschieden starke Rotfärbung, wodurch Sortenunterschiede bemerkbar werden.

Aber alle die ausgeführten Erscheinungen sind nicht so prägnant, daß sie in diesen Formen zur Charakterisierung der Kartoffelsorten dienen könnten. Es wurde nach einem zahlenmäßigen Ausdruck gesucht und deshalb zu einer quantitativen Bestimmung des Melanins im Kartoffelpreßsaft geschritten.

¹⁾ R. Chodat, *Nouv. rech. sur les f. oxyd.* Arch. des sc. phys. nat. 4, 32, 70 und 225, 1912; C. Oppenheimer, *Die Fermente* 1, 371.

Dieser Preßsaft ist naturgemäß ein Gemisch der verschiedenartigsten Stoffe, und da man das Melanin nicht rein isolieren kann, so konnte eine Bestimmung des absoluten Melaninwertes nicht ausgeführt werden. Der Preßsaft wurde zunächst durch Aufkochen in ganz schwach essigsaurer Lösung von gerinnbarem Eiweiß befreit und das klare Filtrat zur Melaninbestimmung benutzt. Man verfährt folgendermaßen:

Die Kartoffeln — es wurden immer 5 Pfund genommen, um eine gute Durchschnittsprobe zu erhalten — wurden nach dem Waschen und Schälen in einer Küchenreibmaschine zerkleinert und in einer Handpresse ausgepreßt. Schon während des Zerreibens beginnt die Verfärbung des Saftes, indem die Tyrosinase aus dem Tyrosin des Saftes Melanin bildet. Der dunkle Saft, 600 bis 800 ccm, wird von der Stärke und sonstigen Teilchen durch Zentrifugieren befreit. Jetzt kocht man in ganz schwach essigsaurer Lösung auf und filtriert. 10 ccm des klaren, dunklen Filtrates füllt man auf 100 ccm auf und oxydiert davon 10 ccm nach Zufügen von 1 ccm 10%iger Schwefelsäure mit 0,002 n-Permanganatlösung bis zur Entfärbung. Von 7 bis 10 Bestimmungen wird der Mittelwert genommen.

Als Melaninzahl wird nun die Anzahl Kubikzentimeter 0,002 n-Permanganatlösung bezeichnet, die nötig ist, um 1 ccm unverdünnten Preßsaft (gekocht und filtriert) zu entfärben.

So hat z. B. die Kartoffel Silesia die Melaninzahl 5,89 und die Sorte Adonis 8,18 (Tabelle I). Es sei bemerkt, daß die Darstellung des Saftes immer gleichmäßig schnell geschehen muß, da der Saft nachdunkelt. Vom Zerreiben der Knolle bis zum Aufkochen des Saftes haben wir gerade 1 Stunde Zeit verstreichen lassen.

Läßt man dagegen unaufgekochten Preßsaft mit 5% reinem Fluornatrium 24 Stunden im Brutschrank bei 37° stehen, so nimmt die Melaninbildung zu. Während dieser Zeit wirken die proteolytischen Enzyme auf die Proteine und spalten neues Tyrosin ab, das sofort durch die Tyrosinase in Melanin übergeführt wird. Nach Abderhalden¹⁾ und Reinbold tritt be-

¹⁾ Oppenheimer, Die Fermente, 1, 372.

kanntlich sehr bald bei tryptischen Verdauungen Tyrosin auf. Kocht man nach 24 Stunden das Kartoffelsaftautolysat auf, so erhält man ein stark dunkel gefärbtes Filtrat. Die Melaninzahl hiervon fällt naturgemäß bedeutend höher aus als vom frischen Saft. Silesia hat jetzt 8,70, während Adonis 21,30 zeigt.

Als autolytischer Wert soll nun die Differenz der beiden Melaninzahlen bezeichnet werden, da die Zunahme an Melanin der eingetretenen Autolyse zu danken ist.

Diese Melaninbestimmung hat naturgemäß Schwächen, aber es ist zur Zeit unmöglich, nach irgendeiner Methode in dem kompliziert zusammengesetzten Kartoffelpreßsaft den absoluten Melaninwert einwandfrei festzustellen. Auch die optische Methode nach v. Fürth und Jerusalem mit dem Spektrophotometer, die leider der widrigen Zeitumstände halber nicht ausprobiert werden konnte, kann in einem solchen Kolloidgemisch mit Systemen fast aller Dispersitätsgrade, wie im Kartoffelpreßsaft, keine genauen Werte geben. Da bei der benutzten Oxydationsmethode immer die gleichen Fehler gemacht werden, so gestattet sie immerhin eine Vergleichung der Resultate untereinander, und darauf kommt es bei der Kartoffelsortenvergleichung an. Wir werden sehen, daß drei Preßsäfte von ein und derselben Kartoffelsorte nahezu dieselben autolytischen Werte gaben.

Auf Tabelle I sind die Melaninzahlen von 16 Kartoffelsorten zusammengestellt und wir beobachten, daß die frischen Säfte ganz verschiedene Werte ergeben haben. (3. Spalte.) Die Sorte Nr. 7, Silesia, die einen sehr hellen Saft liefert, gab z. B. die Melaninzahl 5,89. Mit anderen Worten: um 1 ccm aufgekochten und filtrierten Preßsaft dieser Kartoffelsorte zu oxydieren, sind 5,89 ccm einer 0,002 n-KMnO₄-Lösung nötig. Knolle Nr. 5, Adonis, hat schon eine größere Zahl. Das würde bedeuten, daß der Zellsaft hier mehr Tyrosin enthält. Der Unterschied der beiden Knollen ließe sich auch dadurch erklären, wenn man in der Adonis eine größere Menge Tyrosinase annehmen würde. Bei gleichen Mengen Tyrosin in beiden Säften könnte in Adonis auf diese Art mehr Melanin entstehen. Die zweite Erklärungsweise in dieser Form ist jedoch unwahrscheinlich, denn durch die Bestimmung der Aminosäuren mittels

Formoltitration hat sich herausgestellt, daß Adonispreßsaft reicher an Aminosäuren ist als der Silesiapreßsaft; dieser enthält nämlich 0,0630% (nach der Ernte), jener aber 0,0910% N als Aminosäure. (Tabelle I, Spalte 6.) Dabei ist anzunehmen, daß die Tyrosinmenge in allen Fällen im gleichen Verhältnis zur Gesamtaminosäuremenge auftritt. Nun läßt sich nicht

Tabelle I.

Melaninbildung im Kartoffelpreßsaft.

Material: Frisch geerntete Kartoffel.

20. November 1918.

Nr.	Sorte	Melanin- zahl vom frischen Saft ¹⁾	Melanin- zahl von 24 stün- digem Autolysat	Auto- lytischer Wert	Amino- säuren N-Gehalt in 100 ccm
1	Richters Imperator .	8,31	17,55	9,19	0,1103
2	Wohltmann-Cimbal .	8,45	10,07	1,62	0,0987
3	Greisitzer Wohltmann	6,80	12,69	5,89	0,0840
4	Deodara	12,88	20,50	7,62	0,0980
5	Adonis	8,18	21,30	13,12	0,0910
6	Lotos	12,12	15,53	3,41	0,1225
7	Silesia	5,89	8,70	2,81	0,0630
8	Mimosa	17,52	19,60	2,08	0,0910
9	Belladonna	7,80	13,54	5,74	0,0630
10	Parnassia	12,78	16,26	3,48	0,0840
11	Hindenburg	5,87	8,83	2,96	0,0784
12	Helios	7,10	9,30	2,20	0,1050
13	Kartz v. Kameke . .	9,90	14,02	4,12	0,1050
14	Beseler	5,83	9,10	3,27	0,0903
15	Gratiola	7,62	9,65	2,03	0,1001
16	Goldspende	7,80	11,56	3,76	0,0924

allgemein behaupten, daß alle Knollen mit der höchsten Melaninzahl auch die größte Menge Aminosäuren haben. So hat Knolle Lotos bei 0,1225% N als Aminosäure eine Melaninzahl von 12,12, während Mimosa bei nur 0,091% N 17,52 als Melaninzahl aufweist. Das würde ja auch den natürlichen Verhältnissen entsprechen: Sowohl Tyrosin als auch Tyrosinase treten in allen Kartoffelsorten in verschiedenen großen Mengen auf. Dadurch ist der Unterschied in den Melaninzahlen bedingt.

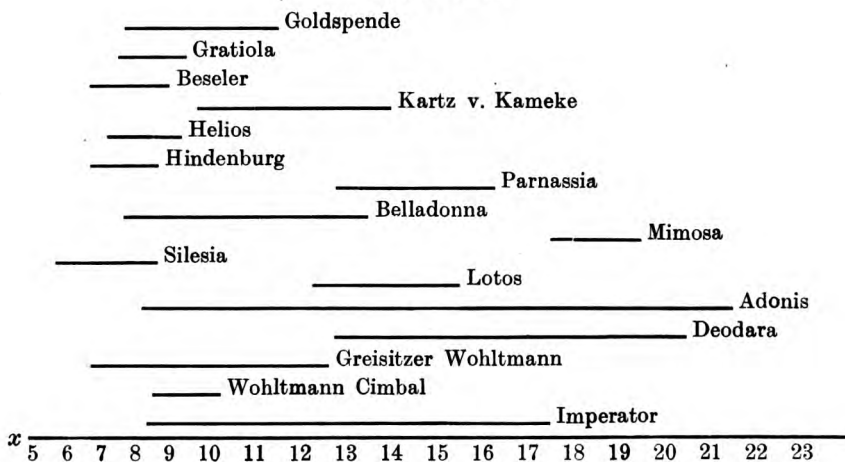
Betrachtet man nun die Melaninwerte der autolysierten Säfte von Silesia und Adonis (Spalte 4), so werden neue Unter-

¹⁾ Die Tyrosinase konnte nur 1 Stunde auf das Tyrosin wirken.

schiede augenfällig. Adonis zeigt jetzt einen so schwarzen Saft, daß die Melaninzahl auf 21,30 gestiegen ist, während Silesia eine relativ kleine Zunahme an Melanin zu verzeichnen hat. Die Knolle Adonis konnte also während der 24stündigen Autolyse bedeutend mehr Tyrosin abscheiden und der Tyrosinase zur Verfügung stellen wie die Silesia. Der Unterschied der beiden Knollen erklärt sich vor allem durch den Umfang der Autolyse. Wir können also durch eine solche Bestimmung Aufschluß über die Größe der stattgefundenen Autolyse bekommen. Daß in der Tat bei der Warmlagerung des Kartoffelpreßsaftes Abbau der Proteine zu Aminosäuren erfolgt, ist erkennbar durch die Bestimmung der Aminosäuren nach Sörensen vor und nach der Autolyse bei 37°. Auf Tabelle VII, die einer größeren, noch nicht abgeschlossenen Arbeit über die Selbstverdauung des Kartoffelpreßsaftes entstammt, finden wir die Analysen verschiedener Säfte. So hat Silesia (nach 8monatlicher Lagerung) vor der Preßsaftautolyse 0,1137% N als Aminosäure, nach 24 Stunden dagegen 0,1540, also 35,44% Zunahme. Aber auch die anderen Sorten verhalten sich so.

Zurück zu Tabelle I. Ein Blick darauf zeigt, daß sich alle Kartoffelsorten durch ihren autolytischen Wert sehr deut-

Tabelle II.



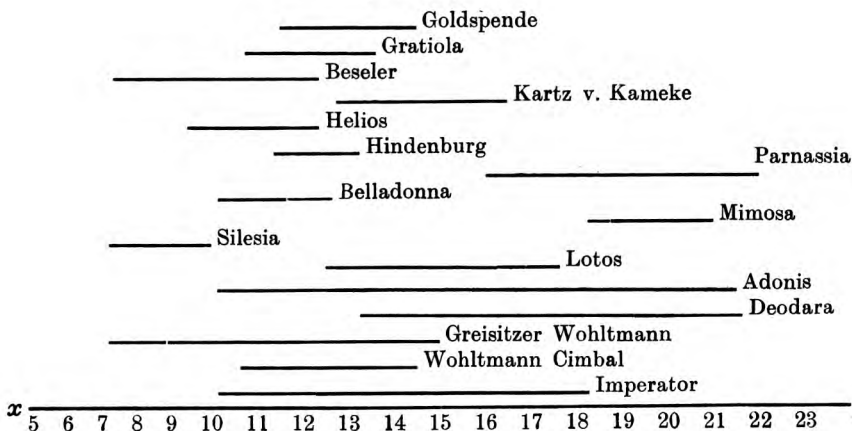
Melaninbildung im Kartoffelpreßsaft.

21. November 1918.

Lineare Darstellung der autolytischen Werte.

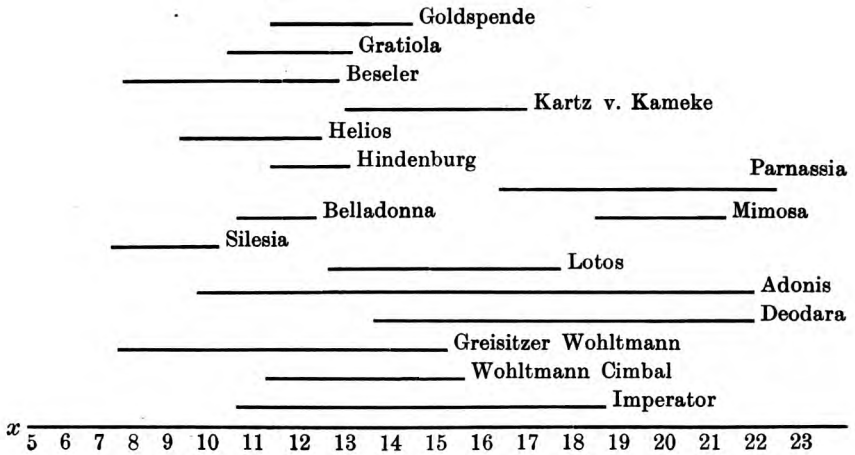
lich unterscheiden. Dies wird um so prägnanter, wenn man denselben linear darstellt, wie auf Tabelle II. Dort sind über der Basis x mit den Melaninzahlen auf den darüberliegenden Zeilen mit Hilfe der beiden durch die Melaninzahlen festgelegten Punkte einfach der Reihe nach aus Tabelle I die autolytischen Werte in der entsprechenden Lage eingetragen. Silesia z. B. von 5,89 bis 8,70; Adonis von 8,18 bis 21,3. Wir sehen hier, wie verschiedenartig sich auch die verschiedenen Kartoffelsorten verhalten. Die meisten haben kleine autolytische Werte, wenschon sie auch nicht alle eine gleiche Anfangszahl besitzen. Ähnlich müssen hiernach sein Silesia, Hindenburg, Helios, Beseler, Gratiola und Goldspende, während Lotos, Mimosa und Parnassia mit ähnlich großem autolytischen Wert dagegen abseits liegen. Imperator, Deodara und Adonis sind wieder andere Typen. Um ein Zufallsresultat auszuschalten, wurden die Versuche vom 21. November 1918 nach kurzer Knollenlagerung bei 2 bis 8° am 9. Januar 1919 doppelt wiederholt, und zwar mit ganz ähnlichem Resultat. Genau dieselben Zahlen konnten freilich nicht gefunden werden, da inzwischen in der Knolle eine natürliche Autolyse eingetreten war. Über diese Verhältnisse wird später ausführlich berichtet. Immerhin bleiben die eben erwähnten Kartoffeltypen bestehen. (Tabellen III und IV.)

Tabelle III.



Melaninbildung im Kartoffelpreßsaft. 9. Januar 1919. 2. Versuch.
Lineare Darstellung der autolytischen Werte.

Tabelle IV.



Melaninbildung im Kartoffelpreßsaft. 9. Januar 1919. 1. Versuch.
 Lineare Darstellung der autolytischen Werte.

Tabelle V.

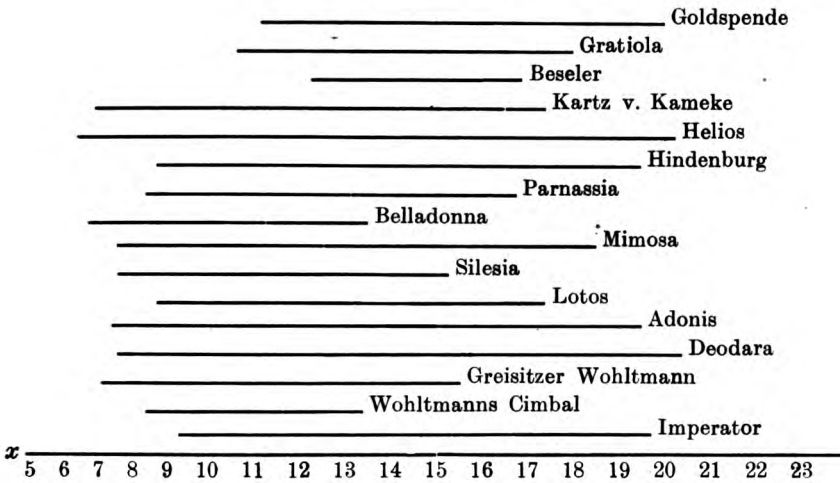
Melaninbildung im Kartoffelpreßsaft.

Material: gelagerte Kartoffel.

2. Juni 1919.

Nr.	Sorte	Melanin- zahl vom frischen Saft	Melanin- zahl vom 24stün- digen Autolysat	Auto- lytischer Wert	Amino- säuren. N-Gehalt in 100 ccm
1	Richters Imperator .	9,3	19,7	10,4	0,1160
2	Wohltmann Cimal .	8,3	13,4	5,1	0,1236
3	Greisitzer Wohltmann	7,0	15,5	8,5	0,1050
4	Deodara	7,5	20,3	12,8	0,1026
5	Adonis	7,3	19,5	12,2	0,1283
6	Lotos	8,7	17,3	8,6	0,1283
7	Silesia	7,5	15,2	7,7	0,1108
8	Mimosa	7,5	18,5	11,0	0,1236
9	Belladonna	6,9	13,5	6,6	0,0945
10	Parnassia	8,4	16,8	8,4	0,1222
11	Hindenburg	8,6	19,5	10,9	0,1201
12	Helios	6,4	20,1	13,7	0,1225
13	Kartz v. Kameke . .	6,9	17,3	10,4	0,1073
14	Beseler	12,4	16,9	4,5	0,1225
15	Gratiola	10,7	17,8	7,1	0,1423
16	Goldspende	11,1	19,9	8,8	0,1026

Tabelle VI.



Melaninbildung im Kartoffelpreßsaft. 2. Juni 1919.

Lineare Darstellung der autolytischen Werte.

Tabelle VII.

Zunahme an Aminosäuren im Kartoffelpreßsaft bei 24stündiger Autolyse.

Bestimmung der Aminosäuren durch Formoltitration.

Temp. 37°.

Nr.	Datum	Kartoffelsorte	N-Gehalt an Aminosäuren in 100 cem frischem Preßsaft	N-Gehalt an Aminosäuren in 100 cem Preßsaft nach 24stündiger Autolyse	Zunahme an Aminosäuren %
1	} 23. X. 1918	unbekannt	0,0910	0,1050	} 15,38
2			0,0910	0,1050	
3	} 4. XI. 1918	Thieles Juli	0,1365	0,1540	} 12,89
4			0,1365	0,1540	
5	} 24. III. 1919	Imperator	0,1008	0,1225	} 21,52
6			0,1008	0,1225	
7	} 11. VIII. 1919	Silesia (nach 8 monatlicher Lagerung)	0,1137	0,1540	} 35,44
8			0,1137	0,1540	

Ein ganz anderes Bild wird erhalten, wenn wir die Kartoffel nach der langen Lagerung, Anfang Juni, untersuchen. Die Knolle hat namentlich im Frühjahr, wenn die Temperatur

etwas steigt, mit dem Abbau ihrer Proteide begonnen, um für den Keimling Baustoffe in Form von Aminosäuren mobil zu machen. Die Folge davon ist, daß in allen Knollen der Aminosäuregehalt mehr oder weniger zugenommen hat. Ein Vergleich der 6. Spalte von Tabelle V mit Tabelle I läßt dies deutlich erkennen. Aber auch die proteolytischen Enzyme haben sich jedenfalls in vielen Knollen vermehrt, denn wir sehen, namentlich auf Tabelle VI, fast überall ein Ansteigen des autolytischen Wertes. Ein Vergleich mit Tabelle II gibt uns deutlich zu erkennen, welche starke Umwandlung in vielen Kartoffelsorten vor sich gegangen ist. Man betrachte z. B. Helios. Zu Beginn der Lagerung am 20. November 1918 betrug der autolytische Wert 2,20, am Ende der Lagerung, am 2. Juni 1919 also, 13,7. Wir haben also eine Vermehrung, die das 6fache des Wertes übersteigt. Silesia hatte anfangs einen autolytischen Wert von 2,81, nach der Lagerung zeigte sie 7,7, mithin nahezu das 3fache. Die Tyrosinase ist jetzt noch nach der Lagerzeit kräftig, denn sie liefert in 1 Stunde noch die Melaninzahl 7,5 im Vergleich zu 5,89 nach der Ernte im November. Anders verhält sich z. B. die Knolle Mimosa. Dort ist die Anfangsmelaninzahl von 17,52 (frische Kartoffel) auf 7,5 Melaninzahl der gelagerten Knolle gefallen, ein Zeichen, daß die Oxydationskraft der Tyrosinase nachgelassen hat. Tyrosinmangel kann nicht die Ursache sein, denn die gelagerte Knolle verrät eine bedeutende Zunahme an Aminosäure (Tabelle I und V). Einen solchen Tyrosinaseschwund charakterisiert auch die Kartoffelsorten Deodara, Adonis, Lotos, Parnassia und Kartz v. Kameke. Einen anderen Typus vertreten die Kartoffeln der vorhin aufgeführten Sorten mit dem kleinen linksliegenden autolytischen Wert (Tabelle II), nämlich Silesia, Hindenburg, Helios, Beseler, Gratiola und Goldspende. Sie zeigen alle in den meisten Fällen sogar starke Zunahme der beiden Melaninzahlen, was für gute Autolyse und kräftige Oxydation spricht. Abseits stehen die Sorten Wohltmanns Cimal, Greisitzer Wohltmann und Belladonna, sie sind relativ stabil, denn die Lagerzeit hat keine wesentliche Veränderung gebracht.

Alle Kartoffelpreßsäfte reagierten deutlich sauer. Leider konnte die für Enzymreaktionen so wichtige Wasserstoffionen-

konzentration noch nicht bestimmt werden, da die Beschaffung des Apparates länger als 1 Jahr dauerte. Es wurde daher nur die „Lackmussäure“ titriert durch Tüpfelung gegen neutrales Lackmuspapier.

Im Anschluß hieran sollte auch die Frage aufgeworfen werden, ob bei Lagerung des Saftes in alkalischer Reaktion eine höhere Melaninzahl zu erreichen ist. Die Tyrosinase wirkt nämlich, wie andersartige Versuche ergeben haben, in alkalischer

Tabelle VIII.

Autolyse des Preßsaftes in saurer und alkalischer Lösung.

Nr.	Datum	Kartoffelsorte	Dauer der Autolyse	Reaktion des Preßsaftes während der Autolyse	Melaninzahl
1	18. IX. 1918	Frühkartoffel	Saft, frisch	sauer	10,7
			24 Stunden	sauer	12,13
			24 „	alkalisch	12,60
2	18. VIII. 1919	Silesia	Saft, frisch	sauer	9,9
		8 Monate gelagert	24 Stunden	sauer	17,7
			24 „	alkalisch	23,4
3	20. VIII. 1919	Deodara	Saft, frisch	sauer	12,2
		8 Monate gelagert	24 Stunden	sauer	20,3
			24 „	alkalisch	23,1
4	21. VIII. 1919	Gratiola	Saft, frisch	sauer	10,5
		8 Monate gelagert	24 Stunden	sauer	17,8
			24 „	alkalisch	20,5

Lösung bedeutend stärker, und da auch nach Verdauungsversuchen in alkalischer Reaktion Abbau der Proteine eintritt, so war Hoffnung auf Erfolg gegeben. Wie aus Tabelle VIII hervorgeht, ist die Reaktion des Mediums in der Tat von Bedeutung. Wenn zwar bei einer Frühkartoffel im sauren wie im alkalischen Milieu fast keine Unterschiede gefunden wurden, so traten doch merkliche Differenzen bei drei alten Kartoffelsorten ein. Silesia zeigt bei alkalischer Lagerung eine Zunahme von etwa 32⁰/₁₀₀. Deodara und Gratiola verhalten sich ebenso, läßt man die Autolyse 48 bzw. 72 Stunden lang stehen, so

nimmt die Melaninbildung noch zu. Leider ist dann ein Teil des Pigmentes in grobdisperssem Zustande, so daß er beim Aufkochen mit dem gerinnbaren Eiweiß ausfällt. Die erhaltenen Melaninzahlen sind deshalb sehr ungenau.

Das Interessanteste dieser Versuche ist also, daß Tyrosinase sowohl im sauren, wie im alkalischen Milieu wirken kann. Dazu sei aber bemerkt, daß die Wasserstoffionenkonzentration hier eine besonders wichtige Rolle zu spielen scheint, da orientierende Versuche ergaben, daß in deutlich essigsaurer Lösung keine Melaninbildung stattfand, während primäres Kaliumphosphat den Oxydationsprozeß zuließ. Wahrscheinlich besteht auch die ursprüngliche Säure des Preßsaftes aus primären Phosphaten, weshalb in ihnen so leicht Schwärzung eintritt. Aber auch die Wirksamkeit der verdauenden Enzyme der Knollen sind nach obigen Versuchen nicht streng an eine bestimmte Reaktion gebunden.

Diese Arbeit über die Melaninbildung im autolysierenden Kartoffelpreßsaft kann naturgemäß nur der Anfang einer Reihe von Untersuchungen über die äußerst wichtigen Oxydationsenzyme in der Kartoffelknolle sein. Es muß nun in erster Linie darauf hingezielt werden, trotz der enormen Schwierigkeiten eine exakte Grundlage für die Methodik zu finden.

Es sei mir noch gestattet, Herrn Willy Clauß und Fräulein Marie Harder an dieser Stelle für die gewissenhafte Mitarbeit bestens zu danken.

Zusammenfassung.

1. Das aus Tyrosin durch die Tyrosinase gebildete Melanin gibt den Kartoffelpreßsäften je nach der Sorte eine mehr oder weniger starke Dunkelfärbung.

2. Diese findet ihren genauen Ausdruck in der Melaninzahl, die angibt, wieviel Kubikzentimeter einer 0,002 n-KMnO₄-Lösung nötig sind, um einen Kubikzentimeter aufgekochten und filtrierten Preßsaftes zu entfärben.

3. Während der Lagerung des Preßsaftes bei 37° tritt Abbau der Proteine ein, wodurch sich die Aminosäuren anreichern.

4. Durch die Zunahme an Tyrosin während der Autolyse des Preßsaftes ist der Tyrosinase Gelegenheit gegeben, neues

Melanin hinzubilden, wodurch nach der Autolyse eine größere Melaninzahl erhalten wird.

5. Der autolytische Wert ist die Differenz der beiden Melaninzahlen eines Saftes, nämlich derjenigen vor und derjenigen nach der Autolyse.

6. Die verschiedenen Kartoffelsorten haben charakteristische autolytische Werte.

7. Diese verändern sich bei einer halbjährigen Lagerung der Knolle durch die Zunahme von Aminosäuren und Abnahme der Tyrosinase.

8. Die Melaninbildung wird in schwach alkalisch gemachten Preßsäften bei der Warmlagerung deutlich vergrößert.

Titrationen mit oberflächenaktiven Stoffen als Indicator.

II. Mitteilung.

Aciditätsbestimmungen mit capillaraktiven Stoffen alkalischer Natur.

Von

Wilhelm Windisch und Walther Dietrich.

(Aus dem technisch-wissenschaftlichen Laboratorium des Instituts für Gärungsgewerbe, Berlin.)

(Eingegangen am 8. September 1919.)

Mit 4 Figuren im Text.

In der ersten Mitteilung unserer Untersuchungen über „Titrationen mit oberflächenaktiven Stoffen als Indicator“¹⁾ hatten wir Aciditätsbestimmungen mit den Homologen der Fettsäurereihe ausgeführt. Wir hatten also Indicatoren saurer Natur benutzt, die durch Veränderung der Oberflächenspannung geringe Mengen saurer Stoffe anzeigen und die in ihren ausgewähltesten Vertretern, der Nonylsäure, Caprinsäure und Undecylsäure, den Farbenindicatoren an Schärfe zum mindesten gleichkommen.

In weiterer Verfolgung des Aciditätsproblems wendeten wir zur Erreichung unserer Ziele oberflächenaktive Stoffe alkalischer Natur an. Es seien hier noch einmal die Worte J. Traubes und R. Somogyis, die zuerst diese Methode erkannt haben, zitiert: „Wenn man zu der capillarinaktiven Lösung des Salzes einer capillaraktiven, schwachen Base (wie Chininchlorhydrat) eine stärkere capillarinaktive Base setzt, so wird die schwächere Base als solche in Freiheit gesetzt, und es tritt eine Oberflächenspannungsverminderung ein, die man mit Hilfe des Stalag-

¹⁾ Diese Zeitschr. 97, 135, 1919.

moments oder Viscostagonometers messen kann, und die die vorhandene Menge der stärkeren Base zu bestimmen ermöglicht.“

Besonders zur weiteren Klärung der Phosphatverhältnisse in physiologischen Flüssigkeiten schienen uns die capillaraktiven Stoffe alkalischer Natur geeignet, und hauptsächlich in dieser Richtung zielten die im folgenden angegebenen Versuche, die in künstlichen Lösungen vorgenommen wurden.

Die Anordnung des Stoffes in der vorliegenden Arbeit geschieht wieder wie in der vorigen Mitteilung, indem von den weniger capillaraktiven Körpern alkalischer Natur, die also geringe Oberflächenspannungsausschläge gegenüber Alkalien und so auch geringe Empfindlichkeit zeigen, zu sehr capillaraktiven und somit auch sehr alkaliempfindlichen Basen übergegangen wird.

Die ersten Versuche wurden mit dem Chininchlorhydrat ausgeführt, mit dem auch schon J. Traube gearbeitet hat.

1. Chininchlorhydrat.

Für die folgenden Versuche wurde wieder das Viscostagonometer mit dem Wasserwert 114,5 bei 18 bis 20° benutzt, das auch für die Versuche der vorhergehenden Abhandlung diente.

Die als Indicator verwendete Lösung von Chininchlorhydrat enthielt 0,2 g des Salzes in 100 ccm Wasser gelöst. Diese Lösung zeigte noch eine Oberflächenspannung von 108,7, mußte also noch freie Base enthalten. Nach Zusatz von 1,1 ccm $\frac{n}{10}$ -Salzsäure zu 100 ccm der Lösung ging die Oberflächenspannung hinauf, und zwar zeigte

	Oberflächenspannung
5,0 ccm Chininchlorhydrat + 5 ccm Wasser	114,0

Die Empfindlichkeit des Chininchlorhydrats als Alkaliindicator zeigt folgende Versuchsreihe.

Einwirkung von $\frac{n}{10}$ -Lauge.

	Oberflächenspannung
5 ccm Chininchlorhydrat + 5,0 ccm Wasser + 0,0 ccm $\frac{n}{10}$ -Lauge	112,0
5 " " + 4,9 " " + 0,1 " " "	100,0
5 " " + 4,8 " " + 0,2 " " "	86,7
5 " " + 4,7 " " + 0,3 " " "	Trübung 9*

Einwirkung von $n/_{10}$ -sekundärem Phosphat.

5 ccm Chininchlorhydrat	+ 5,0 ccm Wasser	+ 0,0 ccm $n/_{10}$ -sek. Phosphat	112,0
5 " " "	+ 4,5 " " "	+ 0,5 " " " "	102,7
5 " " "	+ 4,0 " " "	+ 1,0 " " " "	97,0
5 " " "	+ 3,0 " " "	+ 2,0 " " " "	94,9
5 " " "	+ 2,0 " " "	+ 3,0 " " " "	93,1

Die beiden Versuchsreihen zeigen den großen Unterschied des kaustischen Alkalis und des sekundären Phosphats in ihrer Wirkung auf das Chininchlorhydrat. Die bedeutend geringere Wirkung des Phosphats ist ohne weiteres erklärlich aus der geringeren Basizität des Phosphats gegenüber dem Alkali.

Was die Alkaliempfindlichkeit des Chininsalzes anbetrifft, so ist sie noch sehr gering und genügt nicht den Anforderungen, die man zur Benutzung bei physiologischen Flüssigkeiten an den Indicator stellen muß. In diesen befindet sich ja nach der vorigen Mitteilung nur eine Acidität, die etwa 0,6 ccm $n/_{10}$ -primärem Phosphat in 50 ccm entspricht und die demnach bei der Titration mit $n/_{10}$ -Lauge auch nur eine entsprechende Menge sekundären Phosphats geben kann.

Als nächster Versuch wurde die Einwirkung von Gemischen von primärem und sekundärem Phosphat auf das Chininchlorhydrat verfolgt, indem $n/_{10}$ - KH_2PO_4 allmählich mit Lauge neutralisiert wurde. Dieser Versuch ist von Wichtigkeit, da er parallel mit der Titration nach Lüers geht, bei der bekanntlich auch alles primäre Phosphat allmählich in sekundäres übergeführt wird; denn den Umschlagspunkt zwischen sekundärem und tertiärem Salz ermittelt man nach dieser Methode.

				Oberflächen- spannung
5 ccm Chin.-Cl.	+ 3,0 ccm Wasser	+ 2,0 ccm prim. Phosph.	+ 0,0 $n/_{10}$ -Lauge	113,1
5 " " "	+ 2,5 " " "	+ 2,0 " " "	+ 0,5 " " "	111,5
5 " " "	+ 1,5 " " "	+ 2,0 " " "	+ 1,5 " " "	105,9
5 " " "	+ 1,2 " " "	+ 2,0 " " "	+ 1,8 " " "	101,8
5 " " "	+ 1,0 " " "	+ 2,0 " " "	+ 2,0 " " "	97,1
5 " " "	+ 0,8 " " "	+ 2,0 " " "	+ 2,2 " " "	88,6
5 " " "	+ 0,7 " " "	+ 2,0 " " "	+ 2,3 " " "	Trübung

Näher soll auf dieses Resultat an dieser Stelle nicht eingegangen werden, da es später mit empfindlicheren Indicatoren wiederholt wird.

Ergänzung der Stufentitration eines Säure-Phosphatgemisches durch alkalische Indicatoren.

Nach der Mitteilung I war es in künstlichen Lösungen, die freie Säure neben primärem Phosphat enthielten, möglich, die freie Säure neben dem primären Phosphat fast genau zu bestimmen. Es ergibt sich nämlich, wenn man zu einem Säure-Phosphatgemisch das capillarinaktive Salz einer capillaraktiven schwachen Säure zusetzt und durch Lauge allmählich eine Neutralisation eintreten läßt, an der Übergangsstelle von freier Säure zum primären Phosphat infolge der ganz verschieden starken Wirkung, die beide durch ihre verschiedenen Dissoziationskonstanten auf das Salz ausüben, ein Knick in der ansteigenden Oberflächenspannungskurve, der in unbekanntem Lösungszustand gestattet, die Menge der freien Säure zu bestimmen.

Setzt man zu einem Säure-Phosphatgemisch einen alkalischen Indicator (z. B. Chininchlorhydrat), so wird zunächst keine Erniedrigung der Oberflächenspannung eintreten, da die Reaktion sauer ist, sondern der ursprüngliche Oberflächenspannungswert der Lösung, also in nicht eigencapillaraktiven Lösungen der Wasserwert erhalten bleiben. Neutralisiert man nun mit $n/_{10}$ -Lauge, so wird zunächst keine Veränderung der Oberflächenspannung eintreten, da zuerst eine Neutralisation der freien Säure eintritt, demnach ein neutrales Reaktionsprodukt entsteht und die Flüssigkeit immer noch sauer durch das primäre Phosphat reagiert. Kommt die Neutralisation in das Gebiet des primären Phosphats, so bildet sich als Reaktionsprodukt nicht mehr ein neutraler Körper, sondern ein schwach alkalischer, nämlich sekundäres Phosphat. Auch dieses wird, wenigstens bei einem relativ alkaliunempfindlichen Indicator wie Chininchlorhydrat, zunächst keine Indicatorbase oder genauer eine nicht merkliche Menge frei machen und damit auch keine Oberflächenspannungserniedrigung herbeiführen, weil der vorläufige Überschuß an primärem Phosphat noch die alkalische Reaktion des sekundären Salzes zu weitgehend paralyisiert. Setzt man den Alkalizusatz fort, so wird, auch wenn noch nicht alles primäre Phosphat in sekundäres übergegangen ist — es wird hierüber später noch eingehend gesprochen werden —, oberflächenaktives Alkali frei werden und die merkliche

Oberflächenspannungserniedrigung allmählich beginnen. Dieser Ausschlag wird also einsetzen, bevor der sogenannte Lüerssche Neutralpunkt erreicht ist, der, worauf schon häufig hingewiesen wurde, anzeigt, daß sämtliches, in der Flüssigkeit vorhandenes primäre Salz in sekundäres übergegangen ist. Der Beginn der ersten Oberflächenspannungserniedrigung ist — immer ein ziemlich alkaliunempfindlicher Indicator vorausgesetzt — bei der Stufentitration von keiner Bedeutung. Bei weiterem Laugenzusatz wird nun allmählich sämtliches primäre Phosphat in sekundäres übergegangen sein und sich das erste tertiäre bilden. Das tertiäre Phosphat reagiert nun im Verhältnis zum sekundären Salz außerordentlich stark alkalisch, und es muß jetzt ein Knick in der sinkenden Oberflächenspannungskurve eintreten. Da sich dieser Knick zeigen muß, wenn sämtliches primäre Phosphat in sekundäres übergeführt ist und das erste tertiäre sich bildet, so fällt er mit dem Lüersschen Neutralpunkt zusammen.

Der folgende Versuch bestätigt das eben Gesagte. Stufentitriert wurde das aus der vorigen Mitteilung bekannte Säurephosphatgemisch, das 0,6 ccm freie Säure und 3,2 ccm $\frac{n}{10}$ primäres Phosphat (0,9 g im Liter) enthält.

5 ccm Chininchlorhydrat + 50 ccm Säure-Phosphatgemisch.

$\frac{n}{10}$ -Lauge in ccm . .	0,0	1,0	2,0	3,0	3,5	4,0	4,5
Oberflächenspannung .	115,3	115,3	115,4	114,3	112,7	104,0	94,7

Bis 2,0 ccm $\frac{n}{10}$ -Lauge zeigt sich überhaupt kein Einfluß; bei 3,0 bis 3,5 ccm setzt die Spannungserniedrigung schwach ein, um dann zwischen 3,5 und 4,0 ccm stark zu fallen. Der Wert des beginnenden tertiären Phosphats liegt also zwischen 3,5 und 4,0 ccm. Es wurde nun zur Ausmittlung der Zwischenwerte geschritten, da die Grenze 3,5 und 4,0 ccm zu weit auseinander liegt.

5 ccm Chininchlorhydrat + 50 ccm Säure-Phosphatgemisch.

$\frac{n}{10}$ Lauge in ccm . .	3,5	3,6	3,7	3,8	3,9	4,0
Oberflächenspannung .	112,0	111,0	110,7	109,3	106,0	103,3

Die Differenzen zwischen 3,5 und 3,8 ccm betragen nur etwa einen Strich; zwischen 3,8 und 3,9 ccm dagegen drei Striche, so daß zwischen 3,8 und 3,9 ccm der Umschlagspunkt liegt, der also in der Tat mit dem Lüersschen, der bei 3,8 ermittelt wurde, zusammenfällt.

In eigencapillaraktiven Lösungen geht diese Titration natürlich nicht, da die Ausschläge selbst in der Nähe des Wasserwertes zu gering sind.

2. Veratrinchlorhydrat.

Da das Chininchlorhydrat in seiner Alkaliempfindlichkeit nicht ausreichend war, mußten wir uns um andere empfindlichere Indicatoren bemühen. Eine Regel wie die Traubesche steht für die hierfür in Betracht kommenden Körper nicht zur Verfügung. Auf ihre Geeignetheit als Indicatoren wurden folgende Alkaloide ausprobiert, die von J. Traube auch schon teilweise untersucht worden sind: Cocain, Aconitin, Physostigmin, Pilocarpin, Brucin, Morphin, Scopolamin, Dionin, Nicotin, Coniin, Arecolin, Eumydrin, Colchicin und Coffein. Die meisten von diesen sind mehr oder weniger, aber nicht ausreichend, capillaraktiv. Im Veratrin fand sich endlich ein Alkaloid, das schon bedeutend empfindlicher war, als das Chinin.

Zur Herstellung der Indicatorlösung wurde 0,5 g Veratrin mit 6,0 ccm n_{10} -Salzsäure zum Chlorhydrat neutralisiert und zu 65 ccm mit Wasser aufgefüllt.

Einwirkung von n_{10} -Lauge.

5 ccm Veratrinchlorhydrat + 50 ccm Wasser.							
n_{10} -Lauge in ccm . .	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	
Oberflächenspannung .	112,3	108,3	91,2	85,2	81,7	80,2	u.Trübung.

Einwirkung von n_{10} -sekundärem Phosphat.

5 ccm Veratrinchlorhydrat + 50 ccm Wasser.				
n_{10} -sek. Phosphat in ccm .	0,0	0,5	1,0	1,5
Oberflächenspannung . . .	113,3	102,7	100,0	99,0

Es zeigen sich annähernd dieselben Verhältnisse wie beim Chininchlorhydrat, nur daß die Versuche in viel größeren Verdünnungen möglich sind, die Empfindlichkeit also gesteigert ist.

Es wurde auch mit diesem Indicator der Versuch der Neutralisation des primären Phosphats wiederholt.

5 ccm Veratrinchlorhydrat + 47,5 ccm Wasser + 2,2 ccm sek. Phosphat.

$\frac{1}{10}$ -Lauge in ccm . .	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Oberflächenspannung .	114,7	112,7	111,7	110,3	109,3	107,7	107,0
$\frac{1}{10}$ -Lauge in ccm . .	1,4	1,6	1,8	2,0	2,2	2,4	
Oberflächenspannung .	106,0	104,7	103,3	101,0	96,3	88,0	

Eine Stufentitration mit Veratrinchlorhydrat als Indicator wurde nicht ausgeführt, da die Empfindlichkeit des Indicators doch nicht ausreichen würde, um derartige Titrationsen, selbst in nur schwach eigencapillaraktiven Lösungen auszuführen.

3. Eucupinbichlorhydrat.

Von J. Traube wurden wir auf unsere Anfrage, ob er im Laufe seiner vielen Untersuchungen mit oberflächenaktiven Stoffen auf bedeutend stärkere capillaraktive Basen als Veratrin gestoßen sei, in freundlichster Weise auf das Eucupin und Vucin und deren Toxine hingewiesen. Von den Chininfabriken Zimmer & Co. in Frankfurt wurden uns dann Eucupin (Isoamyhydrocupreinbichlorhydrat) und Vucin (Isooctylhydrocupreinbichlorhydrat) und deren Toxine in liebenswürdigstem Entgegenkommen überlassen.

Für unsere Titrationsen wurde eine Indicatorlösung von Eucupinbichlorhydrat hergestellt, die 0,1 g des Salzes in 100 ccm Wasser gelöst enthält.

Oberflächenspannung

2,5 ccm Eucupinbichlorhydrat + 50 ccm Wasser 113,0.

Das Arbeiten mit dem Eucupin und Vucin als Indicatoren ist bedeutend unangenehmer als das mit den Fettsäuren. Die Lösungen, in denen aus dem Salz durch Alkalien Eucupinbase in Freiheit gesetzt ist, sind ziemlich instabil und zeigen schwankende Oberflächenspannungswerte. Nach jeder vorgenommenen Veränderung des Gehalts der Lösung an freier Base durch Alkali muß stets etwa 5 Minuten gewartet werden, bevor eine Ablesung am Viscostagonometer vorgenommen wird, um

einigermaßen Stabilität der Lösung zu erzielen. Des ferneren zeigen die Basen häufig die unangenehme Eigenschaft, in gewisser Weise fettartig zu wirken, so daß die Abtropffläche des Viscostagonometers nicht mehr vollständig benetzt wird und daher eine häufige Reinigung mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure erfolgen muß. (Ob es sich bei letzterer Erscheinung um eine fehlerhafte Konstruktion des Viscostagonometers oder um eine spezifische Eigenschaft des Eucupins handelt, wollen wir nicht entscheiden, da J. Traube bei seinen Versuchen eine solche fettartige Verbindung nicht konstatieren konnte.)

Die Empfindlichkeit des Eucupins als Indicator zeigt folgende Tabelle:

Einwirkung von $n/_{10}$ -Lauge.

Die Lauge wird aus einer in 0,01 ccm geteilten Bürette der Lösung zugelassen.

2,5 ccm Eucupinbichlorhydrat + 50 ccm Wasser.

$n/_{10}$ -Lauge in ccm . .	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20
Oberflächenspannung .	114,0	87,0	70,0	68,0	71,0

Von 0,10 ccm an tritt Trübung ein. Das Eucupin entspricht in seiner Alkaliempfindlichkeit etwa der der Caprinsäure an Säureempfindlichkeit.

Bei dieser Empfindlichkeit konnte daran gedacht werden, wie bei den Fettsäuren auch in durch 96⁰/₁₀-igen Alkohol eigencapillaraktiv gemachten Lösungen¹⁾ zu arbeiten.

2,5 ccm Eucupinbichlorhydrat + 48 ccm Wasser
+ 2,0 ccm Alkohol.

$n/_{10}$ -Lauge in ccm . .	0,00	0,05	0,10
Oberflächenspannung .	95,0	91,0	73,0

Selbst in einer ziemlich eigencapillaraktiven Lösung führen also 0,05 ccm $n/_{10}$ -Lauge schon einen merklichen Ausschlag der Oberflächenspannung herbei.

Es zeigt sich hier ein weiterer Nachteil der alkalischen Indicatoren gegenüber den Fettsäuren. Die Spannungsherab-

¹⁾ Siehe I. Mitteilung in dieser Zeitschrift 97, 1919.

setzung geht nicht unter etwa 70,0 herab — bei Veratrin und Chinin sogar nur bis etwa 80,0 —, während bei den Fettsäuren Werte um 50,0 herum erreicht werden. Das ist für die Titration von eigencapillaraktiven Flüssigkeiten sehr nachteilig, da der Spielraum der Ausschläge außerordentlich eingeschränkt ist, was die Genauigkeit sehr beeinträchtigt.

Einwirkung von $n/_{10}$ -sekundärem Phosphat.

Die $n/_{10}$ -Lösung des sekundären Phosphats wurde, da eine aus einem Kahlbaumschen Präparat von sekundärem Kaliumphosphat hergestellte Lösung ziemlich sauer, statt schwach alkalisch reagierte, in der Weise hergestellt, daß zunächst eine Lösung von $n/_{10}$ -primärem Phosphat (reinstes Präparat zu Enzymstudien nach Soerensen von Kahlbaum) zubereitet wurde, die dann mit einer carbonatfreien $n/_{10}$ -Kalilauge in der berechneten Menge versetzt wurde. Die Flüssigkeit wurde in der Platinschale eingedampft und dann wieder in der nötigen Menge Wasser aufgenommen.

In ganz analoger Weise wurde das für spätere Versuche benutzte tertiäre Kaliumphosphat aus primärem Salz hergestellt.

2,5 ccm Eucupinbichlorhydrat + 50 ccm Wasser.

$n/_{10}$ -sek. Phosphat in ccm	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	0,50
Oberflächenspannung .	112,0	100,0	95,0	90,0	88,0	85,0	78,0

$n/_{10}$ -sek. Phosphat in ccm	1,00	2,00
Oberflächenspannung .	74,0	71,0

Auch diese Titration wurde in durch Alkohol herabgespannter Lösung wiederholt.

2,5 ccm Eucupinbichlorhydrat + 48 ccm Wasser
+ 2,0 ccm Alkohol.

$n/_{10}$ -sek. Phosphat in ccm	0,00	0,10	0,20	0,30	0,50	1,00	2,20
Oberflächenspannung . .	95,0	93,0	90,0	87,0	82,0	73,0	72,0

Einwirkung von $n/_{10}$ -tertiärem Phosphat.

Als $n/_{10}$ -Lösung von tertiärem Phosphat wurde eine solche Lösung bereitet, die $\frac{K_3PO_4}{10}$ g im Liter gelöst enthält.

2,5 ccm Eucupinbichlorhydrat + 50 ccm Wasser.

$n_{/10}$ -tertiäres Phosphat in ccm .	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25
Oberflächenspannung	111,0	96,0	89,0	80,0	76,0	74,0

Das tertiäre Kaliumphosphat steht in seiner Wirkung zwischen dem sekundären Phosphat und dem kaustischen Alkali.

Der folgende Versuch zeigt dieselbe Titration in capillaraktiver Lösung.

2,5 ccm Eucupinbichlorhydrat + 48 ccm Wasser
+ 2,0 ccm Alkohol.

$n_{/10}$ -tertiäres Phosphat in ccm	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20
Oberflächenspannung . . .	95,0	91,0	84,0	75,0	71,0 u. Trübung

Die Wirkungen der $n_{/10}$ -Kalilauge, des $n_{/10}$ -sekundären Phosphats und des $n_{/10}$ -tertiären Phosphats auf das Eucupinbichlorhydrat sind auf Figur 1 als Kurven augenscheinlich gemacht. Dieselben bedürfen keiner weiteren Erläuterung.

Indicator: Eucupin.

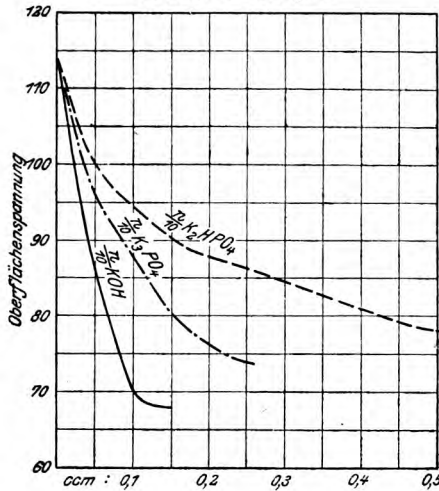


Fig. 1.

Als nächster Versuch wurde wieder eine Lösung von $n_{/10}$ -primärem Phosphat allmählich mit $n_{/10}$ -Kalilauge neutralisiert und die Veränderung der Oberflächenspannung bei Eucupinbichlorhydrat als Indicator beobachtet.

2,5 ccm Eucupinbichlorhydrat + 50 ccm Wasser
+ 2,2 ccm $\frac{n}{10}$ -prim. Phosphat.

$\frac{n}{10}$ -Lauge in ccm . . .	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4
Oberflächenspannung .	111,0	103,0	100,0	98,0	96,0	95,0	93,0	90,0
$\frac{n}{10}$ -Lauge in ccm . . .	1,6	1,8	2,0	2,2	2,4			
Oberflächenspannung .	87,0	82,0	71,0	70,0	70,0			

Derselbe Versuch wurde zur Kontrolle noch einmal durch Mischen von primärem und sekundärem Phosphat (selbst hergestellte Lösungen aus primärem Phosphat) in den Verhältnissen des obigen Versuchs durchgeführt.

2,5 ccm Eucupinbichl.	+ 50 ccm Wasser	+ 2,2 ccm prim. Phosph.	+ 0,0 ccm sek. Phosph.	110,0
2,5 " "	+ 50 " "	+ 2,0 " "	+ 0,2 " "	103,0
2,5 " "	+ 50 " "	+ 1,8 " "	+ 0,4 " "	99,0
2,5 " "	+ 50 " "	+ 1,6 " "	+ 0,6 " "	97,0
2,5 " "	+ 50 " "	+ 1,4 " "	+ 0,8 " "	96,0
2,5 " "	+ 50 " "	+ 1,2 " "	+ 1,0 " "	93,0
2,5 " "	+ 50 " "	+ 1,0 " "	+ 1,2 " "	90,0
2,5 " "	+ 50 " "	+ 0,8 " "	+ 1,4 " "	88,0
2,5 " "	+ 50 " "	+ 0,6 " "	+ 1,6 " "	85,0
2,5 " "	+ 50 " "	+ 0,4 " "	+ 1,8 " "	81,0
2,5 " "	+ 50 " "	+ 0,2 " "	+ 2,0 " "	75,0
2,5 " "	+ 50 " "	+ 0,0 " "	+ 2,2 " "	70,0

und Trübung

Zur Ergänzung sei auch der Versuch der Neutralisation von $\frac{n}{10}$ -primärem Phosphat durch $\frac{n}{10}$ -Kalilauge noch einmal in alkoholischer Lösung wiederholt.

2,5 ccm Eucupinbichlorhydrat + 48 ccm Wasser
+ 2,0 ccm Alkohol + 2,2 ccm prim. Phosphat.

$\frac{n}{10}$ -Lauge in ccm . . .	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4
Oberflächenspannung .	95,0	95,0	96,0	96,0	93,0	91,0	89,0	88,0
$\frac{n}{10}$ -Lauge in ccm . . .	1,6	1,8	2,0	2,2				
Oberflächenspannung .	87,0	85,0	80,0	71,0				

Die beiden Versuchsreihen (nicht eigencapillaraktive Lösungen) stimmen innerhalb enger Grenzen sehr gut überein und sind von außerordentlichem Interesse.

Betrachtet man diese Versuchsergebnisse, sowohl beim Veratrin als auch beim Eucupin — das Chinin zeigt ganz dasselbe Resultat, nur wegen seiner geringen Empfindlichkeit ganz schwach ausgeprägt —, so ergibt sich, daß das primäre Phosphat ohne Einwirkung auf die Indicatoren ist. Setzt man jetzt 0,2 ccm $\frac{n}{10}$ -Lauge hinzu, so daß sich also in der Flüssigkeit 0,2 ccm $\frac{n}{10}$ -sekundäres Phosphat und 2,0 ccm $\frac{n}{10}$ -primäres Phosphat befinden, also im Verhältnis 1:10 vorhanden sind, so beginnt bereits die Erniedrigung der Oberflächenspannung, d. h. es wird Veratrin bzw. Eucupin aus dem betreffenden Salz in Freiheit gesetzt. Aus den Tabellen ist ersichtlich, daß der Spannungsabfall in den Verhältnissen 1:10 und 2:9 bedeutend ist, dann von Verhältnis 3:8 bis 8:3 sehr langsam wird, um dann wieder von 9:2 bis 10:1 stärker abzufallen. Näher auf die entstehende Kurve soll in einer folgenden Arbeit, die theoretische Berechnungen der Umsetzung enthalten soll, eingegangen werden. Es macht sich also, und das ist von Wichtigkeit, schon eine verhältnismäßig kleine Menge sekundäres Phosphat neben primärem Salz bemerkbar, und die Methode gestattet, zunächst in nicht eigencapillaraktiven Lösungen sekundäres Phosphat neben primärem zu bestimmen.

Ein Gemisch von primärem und sekundärem Phosphat reagiert amphoter; denn nimmt man z. B. ein Mischungsverhältnis 2:9 des sekundären Salzes zum primären, so ist die H⁺-Ionenkonzentration etwa $0,5 \cdot 10^{-7}$, also sauer. Trotzdem ist diese nicht imstande, die nur mit einem alkalisch reagierenden Körper mögliche Umsetzung

$$2K_2HPO_4 + \text{Eucupin (HCl)}_2 \rightleftharpoons 2KH_2PO_4 + 2KCl + \text{Eucupin}$$

völlig im Sinne des unteren Pfeils zurückzudrängen, so daß die Wirkung des sekundären Phosphats durch das primäre zwar abgeschwächt, aber nicht aufgehoben wird. Es zeigen also Gemische von sekundärem und primärem Phosphat in Konzentrationen, deren Wasserstoffionenkonzentrationen noch auf der sauren Seite liegen, alkalische Eigenschaften.

Andererseits reagieren sie sauer, was sowohl aus ihren Wasserstoffionenkonzentrationen als auch aus ihren Umsetzungen mit den Salzen capillaraktiver Fettsäuren hervorgeht. Das zeigt die folgende Tabelle:

5 ccm Na-Undecyl.	+2,2 ccm prim. Phosph.	+0,0 ccm sek. Phosph.	+47,8 ccm Wasser	70,0
5 " " "	+2,0 " " "	+0,2 " " "	+47,8 " " "	93,7
5 " " "	+1,8 " " "	+0,4 " " "	+47,8 " " "	102,7
5 " " "	+1,6 " " "	+0,6 " " "	+47,8 " " "	107,0
5 " " "	+1,4 " " "	+0,8 " " "	+47,8 " " "	109,3
5 " " "	+1,2 " " "	+1,0 " " "	+47,8 " " "	113,3
5 " " "	+1,0 " " "	+1,2 " " "	+47,8 " " "	114,0

Aus diesen Versuchen erhellt auf einem ganz anderen Wege als dem der elektrometrischen Messungen die außerordentliche Fähigkeit der Mischungen von primärem und sekundärem Phosphat als Puffer in physiologischen Flüssigkeiten zu dienen und amphoter zu reagieren.

Diese Verhältnisse sind übersichtlich aus den Kurven der Figur 2 zu ersehen. Die untere gestrichelte Kurve zeigt die Einwirkung des sekundären Phosphats allein auf Eucupinbichlorhydrat, während die mittlere ausgezogene die Abschwächung

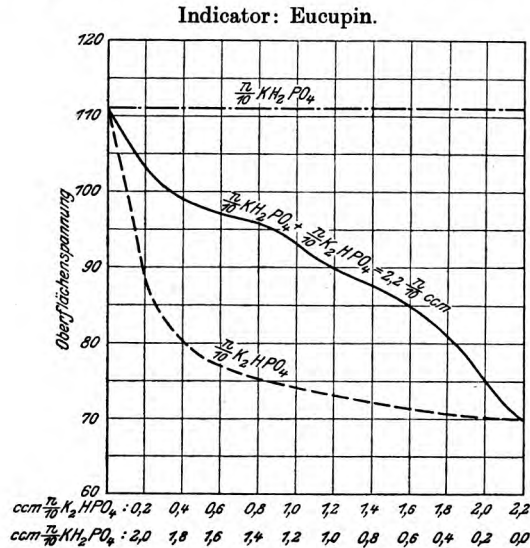


Fig. 2.

der alkalischen Wirkung durch primäres Phosphat kenntlich macht. Die oberste Kurve zeigt die Wirkungslosigkeit des primären Phosphats auf Eucupinbichlorhydrat. Daß die Kurve der Mischung von primärem und sekundärem Phosphat zwischen

denen des primären und sekundären allein liegt, ist auch nach der Überlegung wahrscheinlich.

Auf Figur 3 sind die amphoteren Verhältnisse der Mischungen aus den Kurven erkenntlich. Man sieht den Schnittpunkt der Eucupinkurve mit der Undecylsäurekurve, d. h. also, dasselbe Gemisch von primärem und sekundärem Phosphat macht sowohl Eucupin als auch Undecylsäure frei.

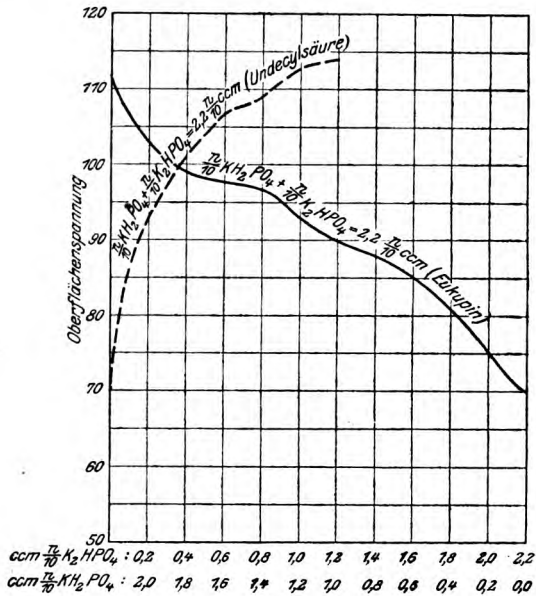


Fig. 3.

Stufentitrationen.

Da aus den vorhergehenden Versuchsreihen ersichtlich ist, daß das Eucupinbichlorhydrat auf die ersten neben primärem Phosphat entstehenden Mengen sekundären Phosphats reagiert so muß es möglich sein, mit Eucupin freie Säure und primäres Phosphat in einer Titration nebeneinander zu bestimmen. Das erste Auftreten einer Oberflächenspannungsabnahme zeigt an, daß die freie Säure verschwunden ist und sekundäres Phosphat sich bildet. Ein plötzliches starkes Abfallen der Spannung an einem späteren Punkt der Neutralisation muß das erste Auf-

treten des tertiären Phosphats veranlassen, was schon oben näher ausgeführt worden ist.

Die zu titrierende Lösung darf an primärem Phosphat nicht mehr als etwa 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ -primäres Salz enthalten, da sonst das sich bei der Titration bildende sekundäre Phosphat schon einen Spannungsabfall bis zur überhaupt möglichen Erniedrigung veranlaßt und so kein Umschlagpunkt beim Übergang des sekundären Salzes in tertiäres zu erkennen ist.

2,5 ccm Eucupinbichlorhydrat + 48 ccm Wasser
+ 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ -Salzsäure + 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ -primäres
Phosphat.

$\frac{n}{10}$ -Lauge in ccm . .	0,0	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6
Oberflächenspannung .	114,0	115,0	115,0	111,0	101,0	90,0	88,0
$\frac{n}{10}$ -Lauge in ccm . .	1,8	2,0	2,2				
Oberflächenspannung .	86,0	75,0	starke Trübung				

Die Titration ist in einwandfreier Weise gelungen. Die erste Erniedrigung der Oberflächenspannung setzt bei 1,0 ccm ein, also in der Tat, nachdem alle freie Säure neutralisiert ist. Die Oberflächenspannung sinkt dann allmählich, und es setzt bei 2,2 ccm plötzlich Trübung ein, was ohne weiteres auf das erste gebildete tertiäre Phosphat weist; denn 2,0 ccm sekundäres Phosphat allein rufen nach früher angeführten Tabellen keine Trübung hervor.

Zum Vergleich wurde die Lösung noch einmal mit Natrium-Undecylat als Indicator stufentitriert.

5 ccm Na-Undecyl. + 48 ccm Wasser + 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ -
Salzsäure + 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ -prim. Phosphat.

$\frac{n}{10}$ -Lauge in ccm . .	0,0	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6
Oberflächenspannung .	56,0	54,0	54,0	75,0	83,0	94,0	112,0

Der Umschlagpunkt liegt deutlich zwischen 0,8 und 1,0 ccm. Der Zwischenwert ließe sich durch eine weitere Titration noch genauer ausmitteln.

Während also die Titration mit Undecylsäure nur die freie Säure zu ermitteln gestattet, erlaubt die Titration mit Eucupin sowohl freie Säure als auch primäres Phosphat nebeneinander zu bestimmen.

Auf Figur 4 zeigt die ausgezogene Kurve den Verlauf der Stufentitration mit Eucupin als Indicator, die Strichpunktcurve diejenige mit Undecylsäure. Es ist deutlich zu sehen, wie der erste Umschlagspunkt sowohl bei der Eucupin- wie Undecylsäurekurve an derselben Stelle 0,8 bis 1,0 ccm liegt; es ist ferner ersichtlich, daß die Undecylsäurekurve an einer nicht näher definierten Stelle den Wasserwert erreicht, also keinen Schluß auf die Umschlagsstelle zwischen sekundärem und tertiärem Phosphat zuläßt, die Eucupinkurve dagegen nach 1,8 ccm einen sehr starken Abfall zeigt.

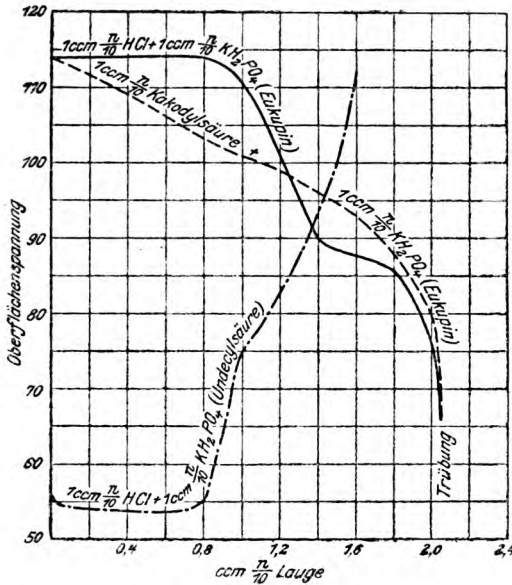


Fig. 4.

Dieselbe Stufentitration wurde in einer in bekannter Weise durch 96%igen Alkohol eigencapillaraktiv gemachten Lösung wiederholt. Es war zu erwarten, daß hier die erste Bildung des sekundären Phosphats, also die Ermittlung der freien Säure nicht möglich sein würde, da ja bekanntlich die ersten Ausschläge in eigencapillaraktiven Lösungen ganz zurückgedrängt werden. Es zeigen das die Tabellen im ersten Kapitel über Eucupin, in dem eine Titration des primären Phosphats durch Neutralisation mit $\frac{n}{10}$ -Lauge in eigencapillaraktiver Lösung durchgeführt ist.

War in nicht capillaraktiver Lösung die Stufentitration einer stark dissoziierten freien Säure neben primärem Phosphat gelungen, so haben wir im folgenden Versuch das Verhalten einer außerordentlich schwach dissoziierten Säure — wir wählten rein zufällig Kakodylsäure (10^{-7}) — festgelegt.

Theoretisch durfte die Titration nicht gelingen, da eine derartig schwache Säure ein alkalisch reagierendes Kaliumsalz, wie es auch die Kohlensäure (10^{-7}) tut, bilden mußte, also vom Beginn der Titration als Reaktionsprodukt nicht ein neutraler Körper, wie KCl beim vorigen Versuch, sondern ein alkalischer entstehen mußte, der auch sofort in merklicher Weise Eucupin frei machen sollte. Es mußte sich demzufolge der Übergang zwischen freier Säure und primärem Phosphat bzw. zwischen gebildetem Kaliumkakodylat und sekundärem Kaliumphosphat vollständig verwischen und nur der Umschlagspunkt vom sekundären Phosphat zum tertiären erkennbar sein. Der Versuch bestätigt diese Überlegung.

2,5 ccm Eucupinbichlorhydrat								
+ 48 ccm Wasser + 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ -Kakodylsäure								
+ 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ -prim. Phosphat.								
$\frac{n}{10}$ -Lauge in ccm . .	0,0	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	
Oberflächenspannung .	114,0	109,0	106,0	103,0	101,0	99,0	96,0	
$\frac{n}{10}$ -Lauge in ccm . .	1,6	1,8	2,0	2,2				
Oberflächenspannung .	93,0	88,0	80,0	Trübung				

Es ist in der Tat nur der Umschlag zwischen 2,0 und 2,2 ccm Lauge bemerkbar, der sich in der Trübung äußert. Der Lührsche Umschlagspunkt läßt sich also in jedem Falle ermitteln.

Auch diese Titration ist in Tafel 4 eingetragen (gestrichelte Kurve). Man sieht, daß der Umschlagspunkt bei 0,8 fortfällt und nur der um 2,0 ccm herum zu erkennen ist.

Vergleichsweise sei hier noch eine Titration der $\frac{n}{10}$ -Kakodylsäure allein ohne primäres Phosphat angeführt.

2,5 ccm Eucupinbichlorhydrat + 49 ccm Wasser								
+ 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ -Kakodylsäure.								
$\frac{n}{10}$ -Lauge in ccm . .	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	
Oberflächenspannung .	114,0	112,0	110,0	108,0	104,0	95,0	Trübung	

Die Titration verläuft ganz ähnlich wie eine Titration von $n/_{10}$ -primärem Phosphat mit $n/_{10}$ -Lauge.

Aus den Versuchen geht hervor, daß das Eucupinbichlorhydrat als Indicator empfindlichen Farbenindicators an Empfindlichkeit wenigstens gleichkommt und für viele Titrationsen geeignet ist, die mit Farbenindicators nicht ausführbar sind; allerdings gilt auch hier die Einschränkung für eigencapillaraktive Lösungen, über die ausführlich in der vorigen Mitteilung gesprochen worden ist.

Über das im Anfang des dritten Abschnitts erwähnte Vucin sei noch bemerkt, daß es noch alkaliempfindlicher ist als Eucupin, aber auch dessen unangenehme Seiten, wie Instabilität der Lösung, Nichtbenetzung der Abtropffläche des Viscostagometers in verstärktem Maße besitzt. Auch ist hier das Chlorhydrat als solches schon so capillaraktiv, daß es stets störend auf die Resultate wirkt. Es ergibt das Arbeiten mit dem weniger empfindlichen Eucupin daher genauere Resultate als mit dem Vucin.

Zusammenfassung.

1. Die Titrationsen nach Traube auf Grund von Oberflächenspannungsausschlägen wurden auf Indicatorsen alkalischer Natur ausgedehnt und Versuche mit Chininchlorhydrat, Veratrinchlorhydrat und Eucupinbichlorhydrat ausgeführt. Im Eucupinbichlorhydrat fand sich ein Indicator, der an Alkaliempfindlichkeit der Säureempfindlichkeit der Caprinsäure gleichkommt.

2. Mit Eucupinbichlorhydrat als Indicator ließen sich Stufentitrationsen ausführen, die gestatten, eine stärker dissoziierte freie Säure und primäres Phosphat nebeneinander in Lösungen zu bestimmen.

3. Auf Grund dieser Methoden ließ sich in neuartiger Weise die amphotere Reaktion von Gemischen von primärem und sekundärem Phosphat darlegen und so die außerordentliche Brauchbarkeit derartiger Gemische, als Puffersubstanzen zu wirken, belegen.

Über die Verteilung des Zuckers, der Chloride und der Reststickstoffkörper auf Plasma und Körperchen im strömenden Blute¹⁾.

Von

W. Falta und M. Richter-Quittner.

(Aus der III. med. Abteilung und dem chemischen Laboratorium des Kaiserin-Elisabeth-Spitals in Wien.)

(Eingegangen am 18. September 1919.)

I. Kapitel.

Unter den Problemen, die die Einführung der physikalischen Chemie in die Biologie mit sich brachte, ist das Permeabilitätsproblem eines der interessantesten. Man versteht darunter die Frage, für welche Stoffe die die Zellen umgebende Zellhaut durchgängig ist und von welchen Gesetzen diese Durchgängigkeit abhängt. Diese Frage steht mit dem Stoffwechsel der Zelle in engster Beziehung, denn sie soll uns darüber Aufschluß geben, wie die Nährstoffe in die Zelle gelangen und wie sich die Zelle der Stoffwechselschlacken entledigt. Wie R. Höber hervorhebt, sind die Blutkörperchen aller Tierarten von jeher ein beliebtes Objekt für diese Untersuchungen gewesen; aus leicht begreiflichen Gründen, einerseits weil sie freie, im Plasma suspendierte Zellen sind, weil man also die Gewebe nicht erst zertrümmern muß, um die freien Zellen zu erhalten, andererseits weil man genügende Mengen derselben leicht erhalten kann, ohne den Organismus zu schädigen und den Ablauf der Gesamtstoffwechselforgänge wesentlich zu beeinflussen. Man isolierte die Blutkörperchen durch Ausschleudern, befreite sie von den Plasmaresten durch

¹⁾ Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden am 9. April in der Wiener Gesellschaft für Biologie vorgetragen.

Waschen mit physiologischer Kochsalz- oder isotonischer Rohrzuckerlösung und untersuchte dann, ob und unter welchen Bedingungen sie für die im Plasma normalerweise vorkommenden Stoffe durchgängig sind. Es sind besonders drei Gruppen von Stoffen in Betracht gezogen worden: 1. der Traubenzucker, 2. die Salze, 3. die nichteiweißartigen N-haltigen Substanzen, die sogenannten Rest-N-Körper. So interessant die bisherigen Ergebnisse auch sind, so ist man unserer Ansicht nach nicht berechtigt, sie ohne weiteres auf die im normalen Organismus sich abspielenden Stoffwechselforgänge zu übertragen. Erstens muß man mit der Möglichkeit rechnen, daß die Blutkörperchen durch das Isolierungsverfahren irgendwie geschädigt werden, daß sie also für Stoffe durchgängig gefunden werden, für die sie unter normalen Verhältnissen überhaupt nicht durchgängig sind. Ferner wäre möglich, daß unter den erwähnten experimentellen Bedingungen viel größere Mengen dieser Stoffe in die Blutkörperchen eindringen, als dies je unter physiologischen Verhältnissen vorkommt, und endlich wäre möglich, daß sie unter diesen unphysiologischen Bedingungen in freier diffusibler Form in den Blutkörperchen vorgefunden werden, während sie unter normalen Verhältnissen bei ihrem Eintritte sofort irgendwie gebunden werden, wodurch sie sich dem Nachweis durch die üblichen chemischen Methoden entziehen. Es ist daher aus allen diesen Gründen sehr wichtig, zu wissen, wie sich diese Substanzen unter normalen Verhältnissen im strömenden Blut auf Plasma und Blutkörperchen verteilen, bzw. ob sie sich überhaupt in den Blutkörperchen in freier Form nachweisen lassen.

Diese Frage ist aber auch noch für viele andere Stoffwechselfprobleme von grundlegender Bedeutung. Der durch die Tätigkeit der Endothelien bewirkte Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebsflüssigkeit und damit auch die Stoffwechselforgänge in den von der Gewebsflüssigkeit umspülten Organzellen werden beherrscht oder zum mindesten beeinflußt durch Schwankungen im Gehalt des Blutes an diesen Substanzen, Schwankungen, die entweder durch die Nahrungsaufnahme oder durch Stoffwechselforgänge in gewissen Organen des Körpers bedingt werden. Für die Feststellung des Schwellenwertes, bei dessen Überschreitung gewisse physiologische oder patho-

logische Prozesse einsetzen (wir erinnern z. B. an die Zuckerausscheidung durch die Nieren bei Überschreitung eines gewissen Schwellenwertes im Zuckergehalt des Blutes der Nierenarterien), wäre es nur dann gleichgültig, ob wir den Zuckergehalt des Gesamtblutes oder den des Plasma bestimmen, wenn sich der Zucker gleichmäßig auf Plasma und Körperchen verteilen würde. Die Untersuchung im Gesamtblut würde aber zu unrichtigen Vorstellungen führen, wenn der Zucker ausschließlich im Plasma vorhanden wäre.

Wenn wir nur in der Literatur der letzten 10 Jahre die Untersuchungen, die sich mit der Frage der Verteilung dieser Substanzen auf Plasma und Körperchen befassen, durchsehen, so müssen wir konstatieren, daß sich eine beträchtliche Wandlung in den Anschauungen über diesen Punkt vollzogen hat. Betrachten wir zuerst die Untersuchungen über den Blutzucker. Früher war man fast allgemein der Ansicht, daß der Zucker sich ausschließlich im Plasma befinde, während die Blutkörperchen zuckerfrei seien. Wir verweisen z. B. auf die Untersuchungen von Otto. In diesem Sinne äußert sich Hammarsten noch 1907 in seinem bekannten Lehrbuch. Erst die Arbeiten von Rona und seiner Mitarbeiter haben einen Umschwung in dieser Anschauung bewirkt. Rona und Michaelis untersuchten im Hundeblut den Zuckergehalt des Gesamtblutes und des Plasmas und bestimmten auch direkt den Zuckergehalt des Blutkörperchenbreis. Sie fanden im Gesamtblut verhältnismäßig hohe Zuckerwerte; daraus mußte geschlossen werden, daß auch in den Blutkörperchen nicht unbeträchtliche Zuckermengen vorhanden waren. Dies konnte durch die direkte Untersuchung der Blutkörperchen tatsächlich bestätigt werden. Auffallend sind an diesen Zahlen die großen Schwankungen im prozentischen Verhältnis von Plasmazucker zu Körperchenzucker; manchmal liegt der prozentische Zuckergehalt der Körperchen viel tiefer als der des Plasmas, manchmal reicht er fast an diesen heran.

Rona und Michaelis untersuchten auch die Verteilung des Zuckers auf Plasma und Körperchen bei Hunden vor und nach 24 Stunden nach der Eingabe von 100 bis 150 g *D*. Auch hier zeigen sich in den Zahlen vor der Zuckerdarreichung große Schwankungen. Die Differenz beträgt zwischen 13 und 74 mg, ja in einem Falle findet sich im Gesamtblut sogar mehr Zucker als im Plasma, es müssen also in diesem Falle die Blutkörperchen mehr Zucker enthalten haben als das Plasma. Nach der Zuckergabe findet sich bedeutende Hyperglykämie. Auch hier bestehen große Schwankungen im Verhältnis von Plasmazucker zu Blutkörperchenzucker. Die Differenzen betragen zwischen 42 und 147 mg-%.

Rona und Takahashi untersuchten auch das Verhältnis zwischen Plasma- und Körperchenzucker vor und nach einem Aderlaß. Sie fanden zuerst ein bedeutendes Überwiegen des Körperchenzuckers und dann ein starkes Absinken desselben und ein starkes Überwiegen des Plasmazuckers.

Rona und Michaelis untersuchten ferner das Verhältnis zwischen Plasma- und Körperchenzucker bei der diabetischen Hyperglykämie des Menschen. Auch hier finden sich enorme Schwankungen. Manchmal finden sich sogar im Gesamtblut höhere Werte als im Plasma. Daraus muß, wie schon oben erwähnt, geschlossen werden, daß die Körperchen zuckerreicher gewesen sind als das Plasma.

In späteren Untersuchungen haben Rona und Takahashi gleichzeitig auch das Blutkörperchenvolumen mittels des Hämatokriten bestimmt. Es läßt sich daraus der absolute Gehalt der Blutkörperchen an Zucker in 100 ccm Gesamtblut berechnen. Wir haben dies in der Tabelle I getan. Die Tabelle zeigt uns, daß die in 100 ccm Gesamtblut

Tabelle I.
Rona und Takahashi. Hund.

D im Gesamtblut	D im Plasma	Blutkörperchen-Volumen	In 100 ccm Gesamtblut ¹⁾	
			Plasma-D	Körperchen-D
228	210	38	128,2	99,8
216	170	47	90,1	125,9
124	123	36	78,7	45,3
158	151	37	95,1	62,9
157	158	47	83,7	73,3
193	190	33	127,3	68,7
128	184	42	106,7	21,3

enthaltenen Blutkörperchen trotz ihres viel geringeren Volumens manchmal viel mehr Zucker enthalten als das Plasma, manchmal viel weniger. Auch hier sind die Schwankungen enorm. Sehr bemerkenswert ist nun, daß Rona und Takahashi in den Blutkörperchen des Kaninchens keine oder nur Spuren von Zucker fanden, und daß auch bei Katzen die Blutkörperchen manchmal nur sehr wenig, einmal sogar gar keinen Zucker enthielten.

Die gleichen Anschauungen wie Rona vertritt auch A. Hollinger; er bestimmte den Zuckergehalt im Gesamtblut und im Serum; er fand zwar auch manchmal Differenzen nach beiden Richtungen hin, meist fand er aber den Zucker gleichmäßig auf Körperchen und Serum verteilt.

Auch Frank fand ähnliche Verhältnisse. In 30 Untersuchungen fand er große Schwankungen im Verhältnis zwischen Plasma- und Körperchenzucker auch bei derselben Person. Oft waren die Körperchen zuckerreicher als das Plasma. Zu ähnlichen Resultaten gelangte Kobliner bei Untersuchung des Blutes von Säuglingen. Dieser Anschauung gegenüber hatten nur Lyttgens und Sandgreen auf Grund ihrer Analysen daran festgehalten, daß die Blutkörperchen sowohl beim Menschen wie beim Kaninchen frei von Zucker sind, was später von Frank und Bretschneider entschieden bestritten wird, da sie nicht

¹⁾ Von uns berechnet.

nur in den Blutkörperchen des Menschen sondern auch in jenen des Kaninchens manchmal reichlich Zucker fanden.

Später hat A. Löb nochmals Stellung zu dieser Frage genommen. Er findet in den Blutkörperchen aller von ihm untersuchten Tierarten Zucker, wenn auch große Schwankungen zwischen den einzelnen Tierarten vorkommen. In den beiden Versuchen am Menschen findet er in den Körperchen einmal annähernd gleich viel, einmal sogar mehr Zucker als im Plasma. Zu ähnlichen Resultaten kam später auch Welz in Versuchen an 10 stoffwechselgesunden Menschen. 2 bis 2 $\frac{1}{2}$ Stunden nach einer amylenreichen Nahrung finden sich große Schwankungen in der Differenz zwischen Gesamtblut und Plasmazucker; meist sind die Werte im Gesamtblut so hoch, daß die Körperchen Zucker enthalten müssen.

Zu ähnlichen Resultaten kamen ferner Rolly und Oppermann bei der Untersuchung des Blutes von Anämischen. Der Zucker im Gesamtblut reichte manchmal an den Plasmawert heran, einmal übertraf er ihn. Auch bei Diabeteskranken finden sich nach Verabreichung von Fleisch bzw. von Traubenzucker große Schwankungen in den Differenzen zwischen Gesamtblut und Plasmazucker. In einem Versuch ist die Differenz fast Null. Auch in den Untersuchungen an normalen Menschen mit gleichzeitiger Bestimmung des Körperchenvolumens stimmen die Resultate nicht überein, da die Körperchen manchmal Zucker enthalten, manchmal frei von Zucker sind.

Endlich kam auch R. Höber zu ähnlichen Resultaten. Bei Hunden fand er regelmäßig viel Zucker in den Körperchen, in Versuchen mit Adrenalin starkes Ansteigen des Zuckers im Plasma, bei pankreasdiabetischen Hunden fand sich mehr Zucker im Plasma als in den Körperchen, bei Kaninchen fanden sich sehr große Schwankungen, kurz es bestand kein Parallelismus zwischen Plasma- und Körperchenzucker. Der Eintritt des Zuckers in die Blutkörperchen beruhe daher nicht auf einer physikalischen Durchlässigkeit der Zellhaut, sondern auf aktivem Import und Export. Es handle sich um eine Art von Sekretion.

Überblicken wir die angeführten Untersuchungen, so stehen mit Ausnahme von Lyttgens und Sandgreen¹⁾ alle neueren Autoren auf dem Standpunkte, daß die Blutkörperchen der meisten Tierarten Zucker enthalten; beim Kaninchen seien die Blutkörperchen meist aber nicht immer zuckerfrei, beim Menschen würden sie nur ganz ausnahmsweise zuckerfrei gefunden, oft sogar sollen sie mehr Zucker als das Plasma enthalten. Die Blutkörperchen seien daher bei verschiedenen Tierarten, aber auch bei ein und derselben Tierart unter verschiedenen physiologischen Verhältnissen verschieden resistent. Damit scheinen auch endlich die Untersuchungen im Reagensglas von Masing, Kotzawa, Rona und Döblin, Katz (unter Höber

¹⁾ Anmerkung bei der Korrektur: In neuester Zeit erschien eine Arbeit von H. J. Hamburger und R. Brinkmann (diese Zeitschr. 94, 131, 1919), in der diese Autoren beim Frosch den Zucker ausschließlich im Plasma fanden.

und anderen übereinzustimmen. So fand z. B. Masing die Blutkörperchen der Gans undurchgängig für Traubenzucker, die des Kaninchens, des Schweins und Hammels wenig durchgängig, die des Hundes und Rindes besser durchgängig, die des Menschen am besten durchgängig. Von Noorden sagt bei der kritischen Besprechung aller dieser Versuche, daß die Blutkörperchen sich doch viel mehr an den Schwankungen des Plasmazuckers zu beteiligen scheinen als man dies früher annahm.

Was nun die zweite Gruppe von Substanzen, die Salze, anbelangt, so finden sich zwar eine Unzahl von Versuchen in der Literatur, die sich mit der Permeabilität der Körperchen für Neutralsalze bzw. deren Ionen beschäftigen, wir haben aber in der Literatur keine Versuche finden können, die sich für die Beantwortung der uns hier interessierenden Frage heranziehen ließen. Man begegnet zwar oft der Angabe, daß in den Blutkörperchen kein oder nur wenig Chlor vorhanden ist, in anderen Untersuchungen wurde aber reichlich Natriumchlorid gefunden.

Eine sehr wichtige Gruppe ist endlich die dritte, die Gruppe der Rest-N-Körper. In ihr spielen einerseits die Aminosäuren als Nährmaterial für die Zellen, andererseits der Harnstoff, die Harnsäure und das Kreatinin als Stoffwechselschlacken eine wichtige Rolle. Bezüglich des Harnstoffs, der unter normalen Verhältnissen ca. 90% der gesamten Rest-N-Körper ausmacht, liegen Untersuchungen von I. Bang vor, der eine gleichmäßige Verteilung des Harnstoffs auf Körperchen und Plasma fand. Bang untersuchte auch die Verteilung der Aminosäuren und fand in den Körperchen sogar mehr Aminosäuren-N als im Plasma. Damit scheinen auch die Reagensglasversuche übereinzustimmen. Katz (unter Höber) faßt sie in dem Satz zusammen: daß nach den Untersuchungen von Overton, Grijns, Hedin die Permeabilität für den Harnstoff als eine generelle Eigenschaft aller Zellen anzusehen sei.

Wir kommen nun zu unseren eigenen Untersuchungen, die durch mannigfache Zweifel an der Richtigkeit der herrschenden Anschauung veranlaßt wurden. Der eine von uns hat aus manchen Gründen, auf die wir hier nicht näher eingehen wollen, immer an der Vorstellung festgehalten, daß unter normalen Verhältnissen die erwähnten organischen wie anorganischen Körper in der Zelle nur in kolloidaler Form existieren können. Sehen wir doch, daß der Zucker bei der Aufnahme in die Zelle entweder verbrennt oder als Glykogen also in kolloidaler Form gespeichert wird¹⁾.

Das Vorkommen einer so großen Menge freien, diffusiblen Zuckers in den Blutkörperchen, wie es die Autoren beschreiben, wäre mit dieser Vorstellung unvereinbar. Unsere Zweifel an der Richtigkeit dieser Befunde wurde durch die enorme Un-

¹⁾ Vgl. S. Bernstein und W. Falta.

stimmigkeit derselben untereinander bestärkt. Man kann sich schwer vorstellen, daß die Blutkörperchen des Menschen einmal gar keinen Zucker, ein anderes Mal mehr als das Plasma enthalten sollen.

Zuerst einige Bemerkungen über unsere Methode.

Der Zucker wurde fast durchwegs nach der Methode von Bertrand titrimetrisch bestimmt, manchmal benützten wir auch die Pearce-Modifikation der Bangschen Methode unter Verwendung von 3 ccm¹⁾.

Was die Salze anbelangt, so haben wir uns vorderhand auf die Bestimmung der Chloride beschränkt, weil diese unter den Salzen des Plasmas eine besonders wichtige Rolle spielen. Wir müssen hier zum Verständnis des folgenden darauf hinweisen, daß nach unseren früheren Untersuchungen ein Teil der Chloride im Plasma in gebundener Form, und zwar an Fibrinogen gebunden, sich vorfindet und daß dieser bei der Gerinnung frei wird. Wir haben meistens die freien Chloride, in manchen Fällen aber auch die Gesamtchloride bestimmt. Letztere wurden durch trockene Veraschung im Tiegelofen unter Zusatz von Na₂CO₃ oder durch feuchte Veraschung mit Kaliumpermanganat und Salpetersäure (Koranyi) bestimmt.

Die freien diffusiblen Chloride, die allein auch Einfluß auf die elektrische Leitfähigkeit des Plasmas haben, können erst bestimmt werden, wenn die Eiweißkörper des Plasmas oder Gesamtblutes und mit ihnen die gebundenen Chloride ausgefällt sind. Früher bedienten wir uns hauptsächlich des Ferrum oxydatum dialysatum. Wie schon in der Mitteilung von M. Richter-Quittner angegeben ist, hat sich diese Methode aber als unzuverlässig erwiesen. Wir bedienten uns daher später durchwegs der Enteiweißung mit Metaphosphorsäure (Oppler) oder mit Methylalkohol.

Bezüglich der Methoden der Rest-N-Bestimmung verweisen wir ebenfalls auf die beiden Mitteilungen von M. Richter-Quittner. Für die Bestimmung des Blutkörperchenvolumens verwendeten wir das Hämatokritverfahren. Wir benutzten dazu eine Zentrifuge mit 10000 Touren in der Minute. Das Blut wurde dazu nicht, wie sonst üblich, aus der Fingerbeere entnommen; bei diesem Verfahren fanden wir ganz in Übereinstimmung mit den Angaben in der Literatur, wo es mit Recht angegriffen wird, große Unstimmigkeiten. Wir verwendeten vielmehr das durch Venaepunctio oder -sectio gewonnene Blut, das ausschließlich in mit Hirudin²⁾ in Substanz beschickten Kölbchen aufgefangen wurde. Die Füllung der Hämatokritröhrchen erfolgte unmittelbar nach der Blutentnahme. Die Kontrollanalysen stimmen immer bis auf 0,1% überein, weshalb wir auf eine Wiedergabe beider Werte ver-

¹⁾ Vgl. die Mitteilung I von M. Richter-Quittner.

²⁾ Das Hirudin wurde uns von der Firma E. Sachsse & Co. in Leipzig in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt.

zichten. Aus diesem Blute wurde nach der Beschickung der Hämatokritröhrchen das Plasma durch Zentrifugieren gewonnen.

Wie schon erwähnt, wurde nur mit Hirudin ungerinnbar gemachtes Blut für den Hämatokriten verwendet, denn bei Verwendung von Na-Oxalat oder Na-Citrat erfahren die Blutkörperchen regelmäßig eine geringe Schrumpfung. Bei Verwendung von größeren Dosen von Na-Oxalat ist diese sogar nicht unbeträchtlich, wie die Tabelle II zeigt.

Tabelle II.
Hämatokritversuche.

	Ohne Vorlage	Na-Oxalat 3%	Na-Oxalat 1%	Hirudin
Normal : . . .	43	40	42	43
Kriegsödem . .	44	40	41	—
Diab. mell. . .	44	40	42	44

Wir kommen nun zur Gewinnung des Plasmas und möchten gleich erwähnen, daß hier das Punctum saliens unserer Untersuchungen liegt. Die meisten Autoren fangen das Blut, aus dem das Plasma durch Zentrifugieren gewonnen wird, in NaF oder Na-Oxalat auf. Die folgenden Versuche werden aber zeigen, daß ersteres schon in kleinen Dosen, letzteres in etwas größeren Dosen als Blutkörperchengift wirkt und die Zelle durchgängig macht, ferner, daß es durchaus nicht gleichgültig ist, wie lange man das Blut mit diesen Substanzen stehen läßt, wann und wie lange man es zentrifugiert, und endlich, daß es schädlich ist, das Blut auf Eis stehen zu lassen. Wir verwenden daher bei Gewinnung des Plasmas ausschließlich das unschädliche Hirudin, zentrifugieren sofort und vermeiden die Kühlung.

Für die Bestimmungen im Gesamtblut kann man das Blut auch im Kölbchen auffangen, in denen sich eine Vorlage von Na-Citrat (1 g auf 100 ccm) oder Na-Oxalat (1 g auf 100 ccm) befindet.

Was endlich das Serum anbelangt, so haben wir dieses durch einfaches Stehenlassen des Blutes bei Zimmertemperatur gewonnen und Defibrinieren durch Schlagen und ebenso Eiskühlung vermieden.

Wir sind bei unseren Untersuchungen von folgender Voraussetzung ausgegangen: wenn in den Blutkörperchen weder Zucker,

noch freie Chloride, noch Rest-N-Körper vorhanden sind, dann muß sich aus dem Gehalt des Gesamtblutes an diesen Substanzen und aus demjenigen des Plasmas das Blutkörperchenvolumen berechnen lassen. Es müssen ferner die aus dem Gehalt des Gesamtblutes und Plasmas an Zucker resp. an Chloriden oder Rest-N-Körpern berechneten Blutkörperchenvolumina genau untereinander übereinstimmen, endlich muß auch das so berechnete Blutkörperchenvolumen mit dem mittels des Hämatokriten gefundenen übereinstimmen. Die Berechnung ist aus folgendem Beispiel zu ersehen:

$$\begin{aligned} 100 \text{ ccm Gesamtblut} & \dots 360 \text{ mg freie Cl,} \\ 100 \text{ ccm Plasma} & \dots 600 \text{ mg freie Cl,} \\ & + 100 : 360 = x = 360 \\ x \text{ (Plasmavolumen)} & = \frac{360 \cdot 100}{600} = 60, \end{aligned}$$

$$\text{Blutkörperchenvolumen} = 100 - 60 = 40.$$

Daß unsere Voraussetzung im großen und ganzen zutrifft, zeigen die folgenden Versuche:

II. Kapitel.

Experimenteller Teil.

Fall I. J. Mitt., normal, 17. I. 19, nüchtern.

	Vorlage auf 100 ccm	Zucker Bertrand	Bemerkungen
Gesamtblut .	1 g Na-Oxalat	{ 88,47 88,40	
Plasma . .	0,02 g Hirudin	{ 140,09 140,27	

Blutkörperchenvolumen.

$$\text{Hämatokrit} \begin{cases} \text{Hirudin} & \dots \dots \dots 37,5 \\ \text{Na-Oxalat} & \dots \dots \dots 36,2 \end{cases}$$

$$\text{Berechnet: Zucker} \dots \dots \dots 36,9$$

Ergebnis: Normaler Zuckergehalt, der Zucker ausschließlich im Plasma.

Fall II. Joh. V., Aortitis, 20. I. 19, nüchtern.

	Vorlage auf 100 ccm	Zucker Bertrand	Bemerkungen
Gesamtblut .	1 g Na-Oxalat	{ 72,98 72,62	
Plasma . .	0,04 g Hirudin	{ 120,69 120,63	
Rote Blutkörperchen		{ 2,97 2,97	

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit	{	Hirudin	40,0
		Na-Oxalat	39,0
Berechnet:	<i>D</i>		39,73

Ergebnis: Normaler Blutzuckergehalt. Der ganze Blutzucker im Plasma.

Fall III. Rosa H., abgelaufene Pneumonie, 16. I. 19.

	Vorlage auf 100 ccm	Zucker Bertrand	Bemerkungen
Gesamtblut .	0,5 g Na-Oxalat {	72,48 72,40	
Plasma . .	0,017 g Hirudin {	120,92 120,00	
Rote Blut- körperchen	{	4,59 4,00	

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit	{	Hirudin	40,0
		Na-Oxalat	38,0
Berechnet:	<i>D</i>		39,99

Ergebnis: 1. Normaler *D*-Wert, ausschließlich im Plasma.

2. Bei Verwendung von Na-Oxalat Hämatokrit-Wert zu niedrig.

Fall IV. Tryl., normal, 26. I. 19.

	Vorlage auf 100 ccm	Zucker		Bemerkungen
		Bertrand	Mod.Bang	
Gesamtblut .	1 g Na-Citrat {	72,39 72,21	73,00 73,84	
Plasma . .	1 g Na-Citrat {	132,04 132,00	132,56 132,59	Plasma gelb und klar

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit: Na-Citrat	45,2
Berechnet: <i>D</i>	45,24

Ergebnis: 1. Normaler *D*-Wert, *D* ausschließlich im Plasma.

2. Na-Citrat erweist sich in diesem Falle ebenso brauchbar wie Hirudin.

Fall V. C. Ti., abgeklungene Grippe, 6. III. 19.

	Vorlage auf 100 ccm	Gesamtchlor		Fr. Cl. Oppler	Rest N.		Bemerkungen
		Ver- aschung	Ko- ranyi		Essig- säure	Dia- lyse	
Gesamt- blut . .	1 g Na-Oxalat {			0,4000 0,4000			
Plasma .	{	0,660 0,660	0,6598 0,6598	0,6324 0,6324	14,79 14,62	14,75 14,76	Plasma gelb und klar

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit: Hirudin 36,8

Berechnet: Freie Chloride 36,5

- Ergebnis: 1. Wert für freie Chloride an der oberen Grenze der Norm, fr. Cl. ausschließlich im Plasma.
2. Normaler Rest-N-Wert im Plasma.

Fall VI. My., normal, 23. VII., nüchtern.

	Vorlage auf 100 ccm	Freie Chl. Oppler	Ges.-Chl. Koranyi	Rest-N- Dialyse	Bemer- kungen
Gesamtblut .	1 g Na-Citrat	{ 0,3224 0,3220	{ 0,3375 0,3370	{ 8,96 8,90	
Plasma . .	0,04 g Hirudin	{ 0,5239 0,5230	{ 0,5479 0,5482	{ 14,79 14,60	Plasma gelb u. klar Am 27. VII. untersucht
Serum . . .		{ 0,5500 0,5500		{ 14,84 14,80	

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit: Hirudin 38,47

Berechnet { Freie Chloride 38,46

{ Ges.-Chloride 38,34

{ Rest-N. 39,3

- Ergebnis: 1. Normaler Gehalt an freien Chloriden, ausschließlich im Plasma.
2. Normaler Gehalt an Gesamtchlor, ausschließlich im Plasma.
3. Normaler Rest-N, ausschließlich im Plasma.

Fall VII. Joh. Krik., normal, 11. II. 19, nüchtern.

	Vorlage auf 100 ccm	Gesamt- chloride Ver- aschung	Freie Chloride Oppler	Bemerkungen
Gesamtblut .	1 g Na-Citrat	{ 0,340 0,340	{ 0,302 0,302	
Plasma . .	0,05 g Hirudin	{ 0,562 0,569	{ 0,506 0,500	

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit: Hirudin 40,0

Berechnet { Freie Chloride 40,3

{ Gesamtchloride 40,0

- Ergebnis: Normaler Chloridgehalt, die freien Chloride sowie das Gesamtchlor ganz im Plasma enthalten.

Fall VIII. Wilh. Dolež, Epilepsie, 15. II. 19, nüchtern.

	Vorlage auf 100 ccm	Gesamt- chloride Ver- aschung	Freie Chloride Oppler	Bemerkungen
Gesamtblut .	2 g Na-Citrat {	0,408 0,409	0,3639 0,3640	
Plasma . .	0,05 g Hirudin {	0,617 0,610	0,5726 0,5720	Plasma leicht hä- molytisch

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit: Hirudin	36,4
Berechnet { Freie Chloride	36,47
{ Gesamtchl.	33,44

Ergebnis: Normaler Chloridgehalt. Die freien Chloride ganz im Plasma.
In den Blutkörperchen etwas gebundener Chlor, dadurch ist
der Gesamtchlor-Wert im Gesamtblut etwas zu hoch und der
gefundene Blutkörperchenvolumen-Wert etwas zu niedrig.

Fall IX. Franz Hub., normal, 24. III. 19, nüchtern.

	Vorlage auf 100 ccm	H ₂ O	D Bertrand	Freie Chloride Modifik. Bang	Bemer- kungen
Gesamtblut .	1 g Na-Oxalat {		75,39 75,47	0,3377 0,3377	
Plasma . .	0,1 g Hirudin {	92,08	132,34 132,34	0,5928 0,5928	
Serum . . .	{	91,02 91,02	135,72 135,79		nach 28 St. untersucht

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit: Hirudin	43,0
Berechnet { D	43,0
{ Freie Chloride	43,0

Ergebnis: Normaler D-Gehalt, D ausschließlich im Plasma.
Normaler Gehalt an freien Chloriden, ausschließlich im Plasma.
Serum etwas konzentrierter als das Plasma.

Fall X. Anton Grun., Kriegsödem, nüchtern, 28. X. 18.

	Vorlage auf 100 ccm	Freie Chloride Rogee- Fritsch	Gesamt- chloride Koranyi	D Bertrand	Bemer- kungen
Gesamtblut .	3 g Na-Oxalat {	0,3472 0,3476		75,68 75,60	
Plasma . .	0,05 g Hirudin {	0,5462 0,5468	0,6028 0,6028	126,43 126,38	

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit: Hirudin	43,0
Berechnet { <i>D</i>	40,1
Freie Chloride	39,7

Ergebnis: Normaler Blutzucker und normaler Chloridgehalt. Die berechneten Werte stimmen untereinander überein, sind aber tiefer als die mittels des Hämatokriten gefundene.

Fall XI. Anton Beut., abgelaufene Pneumonie, 21. III. 19, früh nüchtern.

	Vorlage auf 100 ccm	Rest-N		Bemerkungen
		Essigsäure	Dialyse	
Gesamtblut	1 g Na-Citrat	{ 12,94 12,87		
Plasma . .	0,05 g Hirudin	{ 21,04 21,09		
Serum . . .		{ 23,98 23,74	{ 23,75 23,76	

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit: (Hirudin)	41,0
Berechnet: Rest-N	38,74

Ergebnis: normaler Rest-N, davon fast alles im Plasma.

Fall XII. Marie Kop., normal 21. VII. 19, früh nüchtern.

	Vorlage auf 100 ccm	Rest-N		Bemerkungen
		Essig- säure	Trichlor- essigsäure	
Gesamtblut	1 g Na-Citrat	{ 10,38 10,38	{ 10,38 10,46	
Plasma . .	1 g Na-Citrat	{ 17,31 17,29	{ 17,29 17,40	Plasma gelb und klar
Serum . . .		{ 17,52 17,63	{ 17,54 17,69	

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin)	39,72
Berechnet: Rest-N	40,00

Ergebnis: 1. Normaler Rest-N, ausschließlich im Plasma.
2. Minimale Konzentrationserhöhung bei der Gerinnung.
3. In diesem Falle bewährt sich das Na-Citrat.

Fall XIII. Math. Schmi., Stauungsödem, Myodegeneratio, Emphysem, 18. II. 19, früh nüchtern.

	Vorlage auf 100 ccm	Gesamtchloride		Freie Chloride Oppler	Rest-N		Bemer- kungen
		Ver- aschung	Ko- ranyi		Essig- säure	Dia- lyse	
Gesamt- blut	1 g Na- oxalat	{ 0,310 0,312		{ 0,2900 0,2900		{ 15,82 15,80	
Plasma .	0,5 g Hi- rudin	{ 0,538 0,536	{ 0,5392 0,5392	{ 0,5090 0,5090	{ 27,95 27,93	{ 27,94 27,94	

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit: Hirudin	43,4
Berechnet: { Freie Chloride	41,06
{ Gesamtchloride	42,1
{ R.-N	43,4

- Ergebnis: 1. Normaler Wert für freie Chloride fast ausschließlich im Plasma, vielleicht ein kleiner Teil entbunden.
 2. Auch Gesamtchloride fast ausschließlich im Plasma.
 3. Normaler Rest-N. ausschließlich im Plasma.

Fall XIV. Marie F., 17. VI. 19, 3 Stunden nach dem Mittagessen (reichlich Eiweiß).

	Vorlage auf 100 ccm	Freie Chlor. Methylalk.	Gesamt Chlor. Koranyi	Rest-N Dialyse	Bemerkungen
Gesamtblut .	1 g Na-Oxalat {	0,3020 0,3021	0,3247 0,3240	17,14 17,08	Plasma stark hämolytisch Serum erst am 30. VI. untersucht, hämolytisch
Plasma .	0,05 g Hirudin {	0,5206 0,5200	0,5372 0,5370	29,74 29,71	
Serum .	{	0,5329			
		0,5332			

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin)	42,6
Berechnet: { Freie Chloride	42,0
{ Gesamt Chloride	39,6
{ Rest-N	43,2

- Ergebnis: 1. Rest-N-Gehalt des Blutes etwas erhöht (Verdauung), der gesamte Rest-N im Plasma.
 2. Normaler Chloridgehalt des Blutes, die gesamten freien Chloride im Plasma.
 3. Der nach dem Gesamtchlor berechnete Volumenwert ist etwas zu niedrig; dieses deutet darauf hin, daß etwas gebundenes Chlor in den Blutkörperchen enthalten ist; dadurch wird der Gesamtchlorwert im Gesamtblut etwas zu hoch und der berechnete etwas zu niedrig.

Fall XV. U. F., normal 11. VII. 19, 1 Stunde nach Zufuhr von 100 g Traubenzucker.

	Vorlage auf 100 ccm	D Bertrand	Freie Chloride Oppler	Rest N Dialyse	Bemerkung.
Gesamtblut .	1 g Na-Oxalat {	142,74 142,75	0,3124 0,3120	7,37 7,37	Plasma gelb u. klar
Plasma .	0,05 g Hirudin {	250,70 250,78	0,5480 0,5480	12,98 12,90	
Serum .	{	252,70	0,5629	12,99	
		252,67	0,5631	12,99	

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin)	43,0
Berechnet: $\left\{ \begin{array}{l} D \\ \text{Freie Chloride} \\ \text{Rest-N} \end{array} \right.$	$\left. \begin{array}{l} 42,20 \\ 43,10 \\ 42,78 \end{array} \right.$

Ergebnis: 1. Nach Zufuhr von 100 g Traubenzucker beträchtliche Hyperglykämie.

2. Trotzdem der ganze Zucker im Plasma.
3. Normale Werte für Rest-N (ganz im Plasma).
4. Freie Chloride ganz im Plasma.

Fall XVI. Vinzenz Hoep, normal 17. VII. 19, eine Stunde nach Zufuhr von 100 g Traubenzucker.

	Vorlage auf 100 ccm	Zucker Bertrand	Rest-N Dialyse	Bemerkungen
Gesamtblut	1 g Na-Citrat	$\left\{ \begin{array}{l} 96,04 \\ 96,00 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 9,10 \\ 9,17 \end{array} \right.$	
Plasma . .	0,05 g Hirudin	$\left\{ \begin{array}{l} 170,92 \\ 170,90 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 16,34 \\ 16,34 \end{array} \right.$	Plasma klar und gelb

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin)	43,8
Berechnet: $\left\{ \begin{array}{l} D \\ \text{Rest-N} \end{array} \right.$	$\left. \begin{array}{l} 42,6 \\ 44,1 \end{array} \right.$

Ergebnis: 1. Nach Zufuhr von 100 g Traubenzucker ganz geringe Hyperglykämie.

2. *D* ausschließlich im Plasma.
3. Normaler Rest-N-Wert, ausschließlich im Plasma.

Fall XVII. Friedr. Sludeny, normal 29. VII. 19, eine Stunde nach 100 g Traubenzucker.

	Vorlage auf 100 ccm	Zucker Bertrand	Rest-N Dialyse	Bemerkungen
Gesamtblut	1 g Na-Citrat	$\left\{ \begin{array}{l} 68,09 \\ 68,00 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 10,00 \\ 10,08 \end{array} \right.$	
Plasma . .	0,05 g Hirudin	$\left\{ \begin{array}{l} 120,40 \\ 120,31 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 17,47 \\ 17,48 \end{array} \right.$	Plasma gelb und klar
Serum . . .			$\left\{ \begin{array}{l} 18,00 \\ 18,00 \end{array} \right.$	am 31. VII. untersucht

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin)	44,2
Berechnet: $\left\{ \begin{array}{l} D \\ \text{Rest-N} \end{array} \right.$	$\left. \begin{array}{l} 42,51 \\ 42,44 \end{array} \right.$

Ergebnis: 1. Normaler Rest-N, ausschließlich im Plasma.
2. Keine Hyperglykämie nach 100 g Traubenzucker.
3. *D* ausschließlich im Plasma.

Verteil. von Zucker, Chloriden u. Rest-N usw. im strömenden Blute. 163

Fall XVIII. Karl Tolz, normal, 3. IV. 19, 2 Stunden nach
Zufuhr von 15 g Ü und reichlich Magerkäse.

	Vorlage auf 100 ccm	Rest-N		Freie Chloride		H ₂ O	Bemer- kung
		Essig- säure	Dia- lyse	Oppler	Mod. Bang		
Gesamtblut	1 g Na- Citrat	{ 35,23 35,92					
Plasma . .	0,03 g Hirudin	{ 60,98 60,92	60,53 60,62	0,5724 0,5729	0,5699 0,5709	90,24 90,24	Plasma gelb und klar
Serum . . .		{ 61,99 62,05			0,6540 0,6540	88,62 88,60	

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin) 45,0

Berechnet (Rest-N) 42,2

Ergebnis: 1. Etwas erhöhter Rest-N entsprechend der Zufuhr von reich-
lich N-haltiger Nahrung, fast ausschließlich im Plasma.

2. Normaler Wert für freie Chloride, entsprechende Entbin-
dung bei der Gerinnung.

3. Serum etwas konzentrierter als das Plasma.

Fall XIX. Josef Schus, chron. Glomerulonephritis, vaskuläre
Hypertonie, 24. I. 19.

	Vorlage auf 100 ccm	Freie Chloride Oppler	Zucker Bertrand	Rest-N Dialyse	Bemer- kung
Gesamtblut	1 g Na- Oxalat	{ 0,3792 0,3784	113,90 113,80		
Plasma . .	0,04 g Hirudin	{ 0,6000 0,6000	180,47 180,40	95,72 95,70	Plasma stark hämolytisch

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin) 37,2

Berechnet: { *D* 36,9
Freie Chloride 36,9

Ergebnis: 1. *D* vermehrt ausschließlich im Plasma.

2. Freie Chloride ausschließlich im Plasma.

Fall XXa. Karl Wint, Diabetes mellitus, 4. XI. 18.

	Vorlage auf 100 ccm	Freie Chloride Rogée- Fritsch	Gesamt- chloride Koranyi	<i>D</i> Bertrand	Bemer- kungen
Gesamtblut	3 g Na- Oxalat	{ 0,3672 0,3668		136,99 136,98	
Plasma . . .	3 g Na- Oxalat	{ 0,4984 0,4987	0,5872	180,44 180,47	2mal lange zentrifugiert
Blutkörper- chen	3 g Na- Oxalat	{ 0,096 0,096		29,48 29,48	

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit:	{	Hirudin	43,0
		1 g Na-Oxalat	42,0
		3 " "	40,0
Berechnet:	{	Freie Chloride	26,31
		<i>D</i>	24,10

- Ergebnis: 1. Bei Verwendung von Na-Oxalat Hämatokritwert zu niedrig.
 2. Sowohl *D* wie freie Chloride nur zum Teil im Plasma.
 3. Der fehlende Betrag, sowohl an *D* wie an freien Chloriden konnte zum großen Teil aus den Blutkörperchen wiedergewonnen werden.

Freie Chloride in 60 ccm Plasma	300 mg
" " " 40 " Blutkörperchen	40 "
	<u>340 mg</u>
<i>D</i> in 60 ccm Plasma	108 mg
" " 40 " Blutkörperchen	12 "
	<u>120 mg</u>

4. Durch langes Zentrifugieren mit Na-Oxalat werden die Blutkörperchen durchgängig.

Fall XXb. Karl Wint, Diabetes mellitus, nüchtern 14. XI 18.

	Vorlage auf 100 ccm	Freie Chloride Rogée- Fritsch	Gesamt- chloride Koranyi	<i>D</i> Bertrand	Bemer- kungen
Gesamtblut	{	0,3640	0,6994	130,28	sofort untersucht
		0,3635		130,19	
Plasma I .	{	0,6000	0,6998	217,00	sofort zentrifugiert
		0,6000		217,10	
Blutkörper- chen I . .		Spuren		Spuren	
Plasma II .	{	0,5174		199,46	48 Stunden als Gesamt- blut auf Eis
		0,5170		199,40	
Blutkörper- chen II . .	{	0,1042		32,48	
		0,1040		32,40	

Blutkörperchenvolumen (Plasma I).

Hämatokrit:	{	Hirudin	42,0
		Na-Oxalat	40,0
Berechnet:	{	Freie Chloride	39,39
		<i>D</i>	39,99

Blutkörperchenvolumen (Plasma II).

Berechnet:	{	Freie Chloride	29,6
		<i>D</i>	35,0

- Ergebnis: 1. Im Plasma I sowohl *D* wie freie Chloride ausschließlich im Plasma.

2. Im Plasma II ein Teil von *D* und freien Chloriden in den Blutkörperchen.

3. In Blutkörperchen I kein *D*, keine freien Chloride, in den Blutkörperchen II der fehlende Betrag in den Blutkörperchen:

Freie Chloride in 60 ccm Plasma . . .	310 mg
" " " 40 " Blutkörperchen 41,6 "	<u>351,6 mg</u>
<i>D</i> in 60 ccm Plasma	120,0 "
" " 40 " Blutkörperchen	<u>13,0 "</u>
	133,0 mg

4. Durch Stehenlassen auf Eis mit Na-Oxalat wurden die Blutkörperchen durchgängig.

Fall XXI. Karoline Nawr., Diabetes mellitus 30. IV. 19, nach dem Frühstück.

	Vorlage auf 100 ccm	Zucker Bang	Freie Chloride	H ₂ O	Bemerkungen
Gesamtblut	0,04 g Hirudin	{ 207,84 207,69	{ 0,3672 0,3670		
Plasma . .	dto.	{ 330,8 330,7	{ 0,6024 0,6028	90,27 90,20	
Serum . . .		{ 332,8 332,7	{ 0,6229 0,6229	89,54 89,54	

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin)	40,2
Berechnet: {Zucker	37,72
{Freie Chloride	39,08

Ergebnis: 1. Enorme Hyperglykämie, *D* fast ausschließlich im Plasma.
 2. Freie Chloride ausschließlich im Plasma.
 3. Geringe Konzentrationszunahme bei der Gerinnung.

Fall XXII. Johann Schneid. Diabetes mellitus, 3. III. 19 früh nüchtern.

	Vorlage auf 100 ccm	Zucker Ber-trand Mod. Bang	Gesamt-chlor-ver- aschung	Freie Chloride Oppler	Bemerkungen
Gesamtblut .	1 g Na-Oxalat	{ 99,83 99,80 99,80	99,79	0,4320 0,433	0,4033 0,4034
Plasma . . .	0,1 g Hirudin	{ 170,99	0,6739 0,6730	0,6502 0,6502	Erst 24 Stunden später untersucht

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin)	36,7
Berechnet: $\left\{ \begin{array}{l} D \\ \text{Freie Chloride} \\ \text{Gesamtchlor} \end{array} \right.$	$\left. \begin{array}{l} 41,60 \\ 37,02 \\ 35,9 \end{array} \right\}$

Ergebnis: 1. Freie Chloride normal, ausschließlich im Plasma.
2. Hyperglykämie, der *D*-Wert im Gesamtblut um 7 mg zu tief (vielleicht Zerstörung infolge des zu späten Untersuchens). Jedenfalls der *D* ausschließlich im Plasma.

Fall XXIIIa. Otto Be., Diabetes mellitus, nüchtern, 6. II. 19.

	Vorlage auf 100 ccm	<i>D</i>		Bemerkungen
		Bertrand	Mod. Bang	
Gesamtblut .	1 g Na-Citrat	$\left\{ \begin{array}{l} 116,02 \\ 116,09 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 116,94 \\ 116,90 \end{array} \right.$	Plasma klar und gelb
Plasma . . .	0,05 g Hirudin	$\left\{ \begin{array}{l} 195,39 \\ 195,42 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 196,00 \\ 196,00 \end{array} \right.$	

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin)	40,0
Berechnet: <i>D</i>	40,65

Ergebnis: Hyperglykämie, *D* ausschließlich im Plasma.

Fall XXIIIb. O. Be., Diabetes mellitus, 1. IV. 19, 1 Stunde nach kohlenhydratreichem Frühstück.

	Vorlage auf 100 ccm	<i>D</i>		Freie Chloride Mod. Bang	H ₂ O	Bemerkung
		Bern- hard	Mod. Bang			
Gesamtblut	1g Na- Citrat	$\left\{ \begin{array}{l} 173,24 \\ 173,29 \end{array} \right.$		$\left\{ \begin{array}{l} 0,3912 \\ 0,3912 \end{array} \right.$		Plasma gelb und stark getrübt
Plasma . . .	0,03 g Hirudin	$\left\{ \begin{array}{l} 270,56 \\ 270,59 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 270,74 \\ 270,68 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0,6629 \\ 0,6634 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 90,00 \\ 90,08 \end{array} \right.$	
Serum . . .		$\left\{ \begin{array}{l} 270,02 \\ 270,09 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 270,31 \\ 270,29 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0,6654 \\ 0,6659 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 90,00 \\ 90,12 \end{array} \right.$	

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin)	41,0
Berechnet: $\left\{ \begin{array}{l} D \\ \text{Freie Chloride} \end{array} \right.$	$\left. \begin{array}{l} 36,0 \\ 41,0 \end{array} \right\}$

Ergebnis: 1. Bedeutende Hyperglykämie, *D* fast ganz im Plasma.
2. Chloride entbunden, ausschließlich im Plasma.
3. Keine Konzentrationszunahme bei der Gerinnung.

Verteil. von Zucker, Chloriden u. Rest-N usw. im strömenden Blute. 167

Fall XXIV. Pfitz, chron. Glomerulonephritis, 29. III., 10 Uhr vormittag.

	Vorlage auf 100 ccm	Rest-N		Bemerkungen
		CH ₃ COO ₄	Dialyse	
Gesamtblut .	1 g Na-Citrat {	53,92		
		53,91		
Plasma . . .	0,25 g Hirudin {	100,56	100,59	
		100,52	100,41	
Serum . . .	24 Stunden {	100,00	100,54	
		100,21	100,27	

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin) 47,0

Berechnet: Rest-N 46,1

Ergebnis: 1. Erhöhter Rest-N, ausschließlich im Plasma.

2. Anscheinend keine Konzentrationszunahme bei der Gerinnung.

Fall XXV. Franz Nem., Grippe, Pneumonie, 4. II. 19 nüchtern.

	Vorlage auf 100 ccm	Rest-N- Dialyse	Zucker Mod. Bang	Bemerkungen
Gesamtblut .	Hirudin {	80,24	75,98	
		80,00	75,59	
Plasma . . .	Hirudin {	117,98	111,52	Plasma stark hämo- lytisch
		117,69	111,50	

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin) 32,4

Berechnet: { *D* 31,89
Rest-N 32,2

Ergebnis: 1. Normaler *D*-Wert, ausschließlich im Plasma.

2. Bedeutend erhöhter Rest-N, ausschließlich im Plasma.

Fall XXVIa. Karol. Wiederm., abgelaufene Grippepneumonie, 23. VI. 19, 3 Stunden nach eiweißreicher Nahrung.

	Vorlage auf 100 ccm	Freie Chloride Methyl- alkohol	Gesamt- chloride Koranyi	Rest-N		Bemerkungen
				Dialyse	Cl ₃ COO ₄	
Gesamtblut	1 g Na- Oxalat {	0,3927	0,4274	22,74		
		0,3927	0,4279	22,70		
Plasma . .	0,05 g Hirudin {	0,7270	0,7831	42,00	42,20	Plasma gelb, leicht getrübt
		0,7271	0,7830	42,08	42,31	
Serum . .	{	0,7629		43,09		
		0,7623		43,08		

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin)	46,0
Berechnet: { Freie Chloride	45,99
{ Gesamtchlor	45,34
{ Rest-N	45,95

- Ergebnis: 1. Rest-N nach eiweißreicher Nahrung mäßig erhöht, vollständig im Plasma.
 2. Sehr hohe Cl-Werte.
 3. Freie Chloride vollständig im Plasma.
 4. Auch Gesamtchlor nur im Plasma.
 5. Im Serum Chlor wahrscheinlich nicht völlig entbunden.

Fall XXVIb. Wiederm., abgelaufene Grippenpneumonie,
 1. VII. 19 NaCl-arme Kost, nüchtern.

	Vorlage auf 100 ccm	Freie Chloride Methyl- alkohol	Gesamt- Chloride Koranyi	Rest-N	Bemerkungen
Gesamtblut	1 g Na- Oxalat {	0,3529	0,3972	10,11	2 Std. nach der Blut- entnahme untersucht
		0,3532	0,3970	10,14	
Plasma . .	0,05 g Hirudin {	0,6723	0,7292	18,10	
		0,6720	0,7292	18,17	
Serum . .	{	0,7039			
		0,7041			

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin)	45,0
Berechnet: { Freie Chloride	47,49
{ Gesamtchlor	45,5
{ Rest-N	44,2

- Ergebnis: 1. Auch bei NaCl-armer Kost hoher Wert für freie Chloride und Gesamtchloride.
 2. Gesamtchlor ausschließlich im Plasma.
 3. Wahrscheinlich im Plasma ein kleiner Teil des gebundenen Chlors bereits entbunden (daher der Wert für Blutkörperchenvolumen zu hoch).
 4. Rest-N normal, ausschließlich im Plasma.
 5. Im Serum gebundenes Chlor nicht völlig entbunden.
 6. Die hohen Cl-Werte in beiden Versuchen erklären sich vielleicht aus einer Nierenschädigung (der Fall wird in einer späteren Publikation ausführlich besprochen).

Exper. XXVII. Pferdeblut, 4. VII. 19, arteriell.

	Vorlage auf 100 ccm	Chloride		Rest-N- Dialyse
		Oppler	Koranyi	
Gesamtblut .	0,05 g Hirudin {	0,2891	0,2999	8,80
		0,2890	0,2999	8,80
Plasma . . .	0,05 g Hirudin {	0,5070	0,5269	15,79
		0,5074	0,5260	15,70
Serum . . .	{	0,5300		
		0,5300		

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit	42,8
Berechnet: { Freie Chloride	43,0
{ Gesamtchloride	43,0
{ Rest-N	44,26

Ergebnis: 1. Freie Chloride und Gesamtchloride vollständig im Plasma.
2. Rest-N vollständig im Plasma.

Exper. XXVIII¹⁾. Pferdeblut, 15. VII. 19, arteriell, zentrifugiert mit einer großen technischen Zentrifuge in 5 Minuten.

	Vorlage auf 100 ccm	Freie Chloride Oppler	Gesamt-Chloride Koranyi	Zucker	Bemerkungen
Gesamtblut	0,05 g	0,3289	0,3573	68,80	Plasma gelb und klar
	Hirudin {	0,3280	0,3570	68,80	
Plasma . .	0,05 g	0,5472	0,5965	114,79	
	Hirudin {	0,5472	0,5960	114,70	
Serum . .	{	0,5902			
	{	0,5900			

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin)	40,00
Berechnet: { Freie Chloride	40,03
{ Gesamtchloride	40,00
{ Zucker	40,19

Ergebnis: 1. Freie Chloride ausschließlich im Plasma.
2. Gesamtchloride, ausschließlich im Plasma.
3. D ausschließlich im Plasma.

Exper. XXIX. Ochsenblut, 23. VIII. 19, arteriell.

	Vorlage auf 100 ccm	Freie Chloride Methyl-alkohol	Gesamt-Chloride Koranyi	Rest-N-Dialyse	Bemerkungen
Gesamtblut	1 g Na-Citrat {	0,2974	0,3268	13,46	
		0,2970	0,3260	13,40	
Plasma . .	1 g Na-Citrat {	0,4952	0,5409	22,48	
		0,4950	0,5412	22,40	

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Na-Citrat)	40,0
Berechnet: { Freie Chloride	40,0
{ Gesamtchloride	39,64
{ Rest-N	40,21

¹⁾ Diese Untersuchungen verdanken wir Herrn Dr. Friedr. N. A. Müller.

- Ergebnis:** 1. Sowohl freie Chloride wie Gesamtchlor ausschließlic in Plasma.
 2. Rest-N ebenfalls ausschließlic in Plasma.
 3. In diesem Falle bewährt sich das Na-Citrat.

Exper. XXX. Ochsenblut, 14. VII. 19, arteriell.

	Vorlage auf 100 ccm	Freies Chlorid	Gesamt-Chlorid	Zucker	Rest-N	Bemerkungen
Gesamtblut	1 g Na-Citrat	{ 0,3068 0,3060	{ 0,3170 0,3170	{ 72,94 72,98	{ 14,72 14,79	
Plasma . .	0,05 g Hirudin	{ 0,5160 0,5160	{ 0,5352 0,5350	{ 123,29 123,31	{ 24,50 24,50	Plasma gelb und klar
Serum . .		{ 0,5341 0,5346		{ 124,72 124,72		Serum am 17. VII. untersucht

Hämatokrit (Hirudin) 40,8

Berechnet: { Freie Chloride 40,60
 Gesamtchloride 40,74
 Rest-N 40,0

- Ergebnis:** 1. Freie Chloride und Gesamtchloride vollständig im Plasma.
 2. *D* vollständig im Plasma.
 3. Rest-N vollständig im Plasma.

Exper. XXXI. Hundeblut, 19. VII. 19, arteriell.

	Vorlage auf 100 ccm	Freie Chloride Methylalkohol	Gesamt-Chloride Koranyi	<i>D</i>	Rest-N-Dialyse	Bemerkungen
Gesamtblut	0,03 g Hirudin	{ 0,3200 0,3204	{ 0,3275 0,3276	{ 72,72 72,80	{ 12,50 12,59	
Plasma . .	0,03 g Hirudin	{ 0,5227 0,5228	{ 0,5319 0,5310	{ 121,47 121,09	{ 20,74 20,68	Plasma gelb und klar
Serum . .		{ 0,5327 0,5329				Erst am 23. VII. untersucht

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin) 40,0

Berechnet: { Freie Chloride 38,75
 Gesamtchloride 38,38
 Zucker 40,91
 Rest-N 40,00

- Ergebnis:** 1. *D* vollständig im Plasma.
 2. Rest-N vollständig im Plasma.
 3. Freie Chloride und Gesamtchloride fast vollständig im Plasma.

Exper. XXXII. Kaninchenblut, 28. VII. 19, arteriell.

	Vorlage auf 100 ccm	Freie Chloride Oppler	Gesamt- Chloride Koranyi	D Ber- trand	Rest-N- Dialyse	Bemerkungen
Gesamtblut	1 g Na- Citrat	{ 0,3014 0,3010	{ 0,3246 0,3247	70,54 70,00	12,70 12,70	
Plasma . .	0,05 g Hirudin	{ 0,5274 0,5270	{ 0,5629 0,5630	114,52 114,50	20,72 20,70	Plasma leicht hämolytisch Am 31. VII. untersucht
Serum . .		{ 0,5501 0,5504				

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin)	38,6
Berechnet: { Freie Chloride	42,87
{ Gesamtchloride	42,29
{ D	37,08
{ Rest-N	38,60

- Ergebnis: 1. D vollständig im Plasma.
 2. Rest-N vollständig im Plasma.
 3. Freie Chloride und Gesamtchloride nahezu übereinstimmende Werte, eine Erklärung für die vorhandene Unstimmigkeit können wir nicht geben.

Exper. XXXIII¹⁾. Gansblut, 31. VIII. 19.

	Vorlage auf 100 ccm	Freie Chloride Oppler	Gesamt- Chloride Koranyi	Rest-N- Dialyse	Bemerkungen
Gesamtblut	0,02 g Hirudin	{ 0,3576	{ 0,3580 0,3580	11,82 11,77	
Plasma . .	0,02 g Hirudin	{ 0,5462 0,5460	{ 0,5981 0,5974	19,17 19,00	} Plasma gelb und klar
Serum . .		{ 0,5972 0,5970			

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin)	40,0
Berechnet: { Freie Chloride	40,0
{ Gesamtchloride	40,1
{ Rest-N	39,2

- Ergebnis: 1. Freie Chloride und Gesamtchloride ausschließlich im Plasma.
 2. Rest-N ebenfalls ausschließlich im Plasma.

¹⁾ Diese Untersuchungen verdanken wir Herrn Dr. Friedr. N. A. Müller.

Fall XXXIVa. Barb. Karl, Nephritis, Urämie, 10. III. 19.

	Vorlage auf 100 ccm	Gesamt- Chloride Koranyi	Freie Chloride Oppler	Rest-N		Bemerkungen
				Essig- säure	Dialyse	
Gesamtblut	1 g Na- Oxalat	{ 0,3528 0,3529	{ 0,3120 0,3120	110,6 110,7		
Plasma . . .	0,01 g Hirudin	{ 0,5750 0,5750	{ 0,5090 0,5090	120,9 121,0	120,7 121,7	Plasma klar und gelb 48 Stunden nach d. Blutentnahme untersucht
Serum . . .		{ 0,5800 0,5800	{ 0,5699 0,5699			

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit (Hirudin) 38,55

 Berechnet: { Gesamtchloride 38,6
 { Freie Chloride 38,7
 { Rest-N 8,6

Ergebnis: 1. Gesamtchlor und freie Chloride ausschließlich im Plasma.
 2. Rest-N zum großen Teil in den Blutkörperchen.
 3. Gesamtchlor im Plasma und Serum stimmen annähernd überein. Wenn der gesamte Rest-N im Plasma vorhanden wäre, so hätten wir 179 mg Rest-N in 100 ccm Plasma finden müssen, wir fanden nur 120,9 mg, es befinden sich also 58,1 mg in den Blutkörperchen.

Fall XXXIVb. Barb. Karl, Nephritis, Urämie, 13. III. 19.

	Vorlage auf 100 ccm	Rest-N		Bemerkungen
		CH ₃ COOH	Dialyse	
Gesamtblut .	1 g Natrium citricum	{ 120,28 120,59		
Plasma . . .	0,1 g Hirudin	{ 135,47 135,29	135,48 135,49	Plasma klar und gelb

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit 39,2

Berechnet: Rest-N 11,1

Ergebnis: Rest-N zum großen Teil in den Blutkörperchen. Wenn der gesamte Rest-N im Plasma vorhanden wäre, hätten wir 198 mg in 100 ccm Plasma finden müssen, wir fanden nur 135,4 mg; es befinden sich also 62,6 mg Rest-N in den Blutkörperchen.

Fall XXXV. Sternh., Nephritis, Urämie, 18. III. 19

	Vorlage auf 100 ccm	Rest-N		Chloride Mod. Methyl- alkohol	Bemerkungen
		CH ₃ COOH	Dialyse		
Gesamtblut	1 g Na- Citrat	170,40 170,45		0,3924 0,3920	Plasma sehr stark hä- molytisch
Plasma . .	0,05 g Hirudin	240,68 240,83	240,92 240,69	0,6234 0,6330	
Serum . .		239,92 239,84	239,90 239,80		

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit 36,9

Berechnet: { Freie Chloride 37,1
 { Rest-N 29,4

- Ergebnis: 1. Freie Chloride ausschließlich im Plasma.
2. Rest-N zum großen Teil in den Blutkörperchen.
3. Rest-N im Plasma und Serum stimmen überein.

Wenn der gesamte Rest-N im Plasma vorhanden wäre, hätten wir 270 Rest-N im 100 Plasma finden müssen; wir fanden nur 240,8. Es befinden sich also 29,2 mg in den Blutkörperchen.

Fall XXXVI. Johann Skro., Nephrose, Ödeme, 20. V. 19 früh nüchtern.

	Vorlage auf 100 ccm	Freie Chloride Oppler	Gesamt Chloride Koranyi	Rest-N		△	Be- mer- kun- gen
				Dia- lyse	CCl ₃ COOH		
Gesamtblut	1 g Na- Oxalat	0,4069 0,4069	0,4297 0,4297		23,00 23,00	— 0,57°	Plasma klar und gelb
Plasma . .	0,05 g Hirudin	0,5090 0,5090	0,5614 0,5619	40,29 40,31	49,72 49,62		
Serum . .		0,5523 0,5520		41,09 41,07		— 0,58°	

Blutkörperchenvolumen.

Hämatokrit 46,4

Berechnet: { Gesamtchloride 23,4
 { Freie Chloride 20,3
 { Rest-N 43,0

- Ergebnis: 1. Rest-N fast ausschließlich im Plasma.
2. Gesamtchloride und freie Chloride zum großen Teil in den Blutkörperchen.
3. Rest-N im Plasma und Serum übereinstimmend.
4. Freie Chloride im Serum und Gesamtchlor im Plasma annähernd übereinstimmend. Wenn das Gesamtchlor,

bzw. die freien Chloride ausschließlich im Plasma vorhanden wären, hätten wir 802 bzw. 759 mg finden müssen; wir fanden 561 bzw. 509. Es befinden sich also 241 mg Gesamtchloride und 250 mg freie Chloride in den Blutkörperchen.

III. Kapitel.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen möchten wir im folgenden kurz zusammenfassen.

1. Berechnung des Blutkörperchenvolumens aus dem Zuckergehalt von Gesamtblut und Plasma.

In den Fällen I bis IV wurde nur der Zucker im Gesamtblut bzw. im Plasma bestimmt. Es handelt sich um normale Individuen bzw. um einen Fall von Aortitis (Fall II). Das Blut wurde frühmorgens im nüchternen Zustand entnommen. In allen 4 Fällen stimmt das aus dem Zuckergehalt berechnete Blutkörperchenvolumen genau mit dem mittels des Hämatokritverfahrens gewonnenen überein.

Auch in den Fällen IX, X und XXV, bei denen neben dem Zucker auch noch die freien Chloride bzw. der Rest-N bestimmt wurden, ist diese Übereinstimmung befriedigend. Auch hier handelt es sich um Entnahme des Blutes in nüchternem Zustand, Fall IX betrifft ein normales, Fall X ein Individuum mit Kriegsödem, Fall XXV eine Pneumonie. In den Fällen XV, XVI und XVII wurde das Blut 1 bis 2 Stunden nach der Zufuhr von 100 g Traubenzucker entnommen. Auch hier stimmt das aus dem Zuckergehalt berechnete Blutkörperchenvolumen mit dem mittels Hämatokritverfahren gefundenen recht gut überein. Es findet sich also auch dann, wenn durch Zuckerezufuhr eine physiologische Hyperglykämie entsteht, der gesamte Zucker im Plasma.

Endlich finden sich unter den angeführten Versuchen auch einige mit pathologischer Hyperglykämie. Im Fall XIX handelt es sich um eine chronische Glomerulonephritis mit vasculärer Hypertonie. Auch hier ist die Übereinstimmung sehr gut. In den Fällen XXb, XXII und XXIIIa handelt es sich um Fälle von Diabetes mellitus, in denen das Blut in nüchternem Zustand entnommen wurde. Auch hier findet sich der Zucker fast ausschließlich im Plasma. Ebenso endlich in den Diabetesfällen XXI und XXIIIb, in denen das Blut nach einer kohlenhydratreichen Mahlzeit entnommen wurde. Es kann also auch unter pathologischen Verhältnissen bei sehr beträchtlicher Hyperglykämie der gesamte Zucker sich im Plasma befinden.

2. Berechnung des Blutkörperchenvolumens aus dem Gehalt von Gesamtblut und Plasma an freien Chloriden.

In den Fällen V, VI, VII, VIII, IX, XV handelt es sich um normale Fälle. Alle diese Fälle waren bei der Blutentnahme nüchtern. In allen

Fällen stimmt das aus den freien Chloriden berechnete Blutkörperchenvolumen mit dem gefundenen überein. Es finden sich also die freien Chloride ausschließlich im Plasma. Im Fall X handelt es sich um ein leichtes Kriegsödem, im Fall XIII um ein Stauungsödem mit Myodegeneratio und Emphysem. Auch hier finden sich die freien Chloride fast ausschließlich im Plasma.

Im Fall XIV (normal) wurde das Blut 3 Stunden nach dem Mittagessen entnommen. Auch hier ist die Übereinstimmung befriedigend.

Im Fall XIX (nüchtern) handelt es sich um eine chronische Glomerulonephritis mit vasculärer Hypertonie.

Im Fall XXb (nüchtern) um einen Diabetes mellitus.

Im Fall XXI um einen Diabetes mellitus nach dem Frühstück.

Im Fall XXII um einen Diabetes mellitus (nüchtern).

Im Fall XIIIb (nach dem Frühstück) um einen Diabetes mellitus.

In allen diesen Fällen ist der Gehalt des Blutes an freien Chloriden normal. Auch hier finden sich die freien Chloride ausschließlich im Plasma.

Es können aber auch, wie Fall XXVIIa und b zeigt, die freien Chloride sich ausschließlich im Plasma finden, wenn der Gehalt an freien Chloriden bedeutend erhöht ist. Wie wir später sehen werden, finden sich bei gewissen pathologischen Fällen die freien Chloride durchaus nicht immer ausschließlich im Plasma.

3. Berechnung des Blutkörperchenvolumens aus dem Gesamtchlorgehalt von Gesamtblut und Plasma.

In Fall VI und VII findet sich das gesamte Chlor im Plasma.

In Fall VIII sind geringe Mengen von Chlor in den Blutkörperchen (Epilepsie nüchtern).

In Fall XIII (Stauungsödem nüchtern) und im Fall XXII (Diabetes mellitus) ist die Übereinstimmung befriedigend.

In Fall XIV (Blutentnahme nach dem Mittagessen) finden sich ganz geringe Mengen von Chlor in den Blutkörperchen.

Endlich findet sich auch in dem pathologischen Fall XXVIa und b mit erhöhtem Gesamtchlorgehalt das gesamte Chlor im Plasma.

Es gehen also freie Chloride und Gesamtchlor ziemlich parallel, woraus geschlossen werden kann, daß unter normalen Verhältnissen die Blutkörperchen kein oder nur sehr wenig Chlor enthalten.

4. Berechnung des Blutkörperchenvolumens aus dem Rest-N-Gehalt von Gesamtblut und Plasma.

Im Fall XI (nüchtern) findet sich fast der ganze, in Fall VI, XII, XIII (Stauungsödem nüchtern), XV, XVI und XVII der ganze Rest-N im Plasma.

Im Fall XIV fand sich 3 Stunden nach einem reichlich eiweißhaltigen Mittagessen der ganze Rest-N im Plasma.

Im Fall XVIII wurde 2 Stunden nach Zufuhr von 15 g Harnstoff und reichlich Magerkäse untersucht. Auch hier findet sich fast der ganze Rest-N im Plasma.

Im Fall XXIV (chronische Glomerulonephritis, nüchtern) ist der Rest-N auf 100 mg/‰ im Plasma erhöht. Auch hier findet sich der ganze Rest-N im Plasma.

Im Fall XXV (Grippe, Pneumonie, nüchtern) ist der Rest-N auf 118 mg/‰ im Plasma erhöht. Auch hier findet sich der gesamte Rest-N im Plasma.

Endlich findet sich auch im Fall XXVIa und b sowohl nüchtern wie 3 Stunden nach eiweißreicher Nahrung der gesamte Rest-N im Plasma.

Es findet sich also unter physiologischen Verhältnissen sowohl nüchtern wie bei Erhöhung des Rest-N nach dem Genuß einer eiweißreichen Nahrung der Rest-N ausschließlich oder nahezu ausschließlich im Plasma, und selbst unter gewissen pathologischen Verhältnissen mit sehr bedeutender Vermehrung des Rest-N können die Blutkörperchen frei von Rest-N bleiben, doch möchten wir betonen, daß dies unter pathologischen Verhältnissen durchaus nicht immer Fall ist.

5. Fehlerquellen in den früheren Untersuchungen anderer Autoren.

Wir müssen nun zunächst die Frage erörtern, wieso es kommt, daß die Ergebnisse unserer Untersuchungen von denen fast aller Autoren (Rona, Embden, Rolly usw.) abweichen. Der Grund hierfür liegt in unserer Methode der Plasmagewinnung. Es war für uns von vornherein sehr wahrscheinlich, daß die erwähnten Autoren bei den bei der Plasmagewinnung verwendeten Manipulationen die Blutkörperchen irgendwie geschädigt haben, wodurch die im Plasma vorhandenen diffusiblen Substanzen in größerer Menge in die Blutkörperchen eindringen. Die Ursache dieser Schädigung konnten wir allerdings erst nach vielen Fehlschlägen feststellen.

Sehr lehrreich war in dieser Beziehung der Fall XXa und b. Im Versuch XXa, in dem wir das Blut in Na-Oxalat (3 g auf 100 cm) auffangen und zur Gewinnung des Plasmas zweimal zentrifugierten, fanden wir viel zu wenig Zucker und freie Chloride im Plasma und beinahe den ganzen Fehlbetrag in den Blutkörperchen. In Versuch XXb fanden wir im Plasma I, das durch sofortiges Zentrifugieren gewonnen war, freie Chloride und Zucker ausschließlich im Plasma. Im Plasma II, das erst nach 48 stündigem Stehen auf dem Eis gewonnen worden war, fanden wir wieder zu wenig Zucker und freie Chloride im Plasma und die Restbeträge nahezu vollständig in den dazugehörigen Blutkörperchen.

Wir haben es vermieden, die vielen Versuche, in denen die verschiedenen Fehlerquellen aufgedeckt wurden, hier anzuführen. Wir wollen nur nochmals darauf hinweisen, daß man bei dem Ungerinnbarmachen des Blutes für die Plasmagewinnung am besten Na-Oxalat und Na-Fluorid vermeidet und sich des Hirudins bedient. Ferner, daß man

gut tut, sofort und nicht zu lange zu zentrifugieren, daß also eine gute elektrische Zentrifuge für solche Untersuchungen unbedingt notwendig ist. Und daß endlich das starke Abkühlen des Blutes (Stehen auf dem Eise) zu vermeiden ist.

Seitdem wir diese Bedingungen kennen, finden wir unter physiologischen Verhältnissen regelmäßig Zucker, Rest-N-Körper und Chloride ausschließlich im Plasma. Die kleinen Differenzen, die sich zeitweise ergeben, können wohl nicht wundernehmen und liegen in der Natur der komplizierten biologischen Verhältnisse. Wie aus den Fällen VI, IX, XI, XII, XIV, XV, XVII, XVIII, XXI, XXIIIb, XXIV, XXVIa und b hervorgeht, stimmt der Gehalt des Serums an Zucker, Chloriden und Rest-N-Körpern ziemlich mit dem des Plasmas überein, wenn das Serum ohne eingreifende Manipulationen (Defibrinieren durch Schlagen, Stehen auf dem Eise) gewonnen wird. Dies gilt natürlich nicht von den freien Chloriden, die im Serum höher sind. Die Differenz, die sich im Zucker- und Rest-N-Gehalt zeigt, beruht, wie H₂O-Bestimmungen ergeben haben, auf der Konzentrationszunahme des Serums bei der Gerinnung, manchmal vielleicht auch auf der Adsorption geringer Mengen dieser Substanzen durch das Fibrin.

6. Hämolyse und Permeabilität.

Einen sehr interessanten Befund möchten wir noch erwähnen. In den Fällen VIII, XIV, XIX, XXV finden sich die von uns untersuchten diffusiblen Substanzen ausschließlich im Plasma, obwohl dieses mehr oder weniger stark hämolytisch verfärbt war. Es kann also das Hämoglobin aus den Blutkörperchen herausdiffundieren, ohne daß die Zellhäute der Blutkörperchen für die erwähnten Substanzen durchgängig geworden sind. Es sind daher die Bedingungen für die Hämolyse und die Bedingungen für das Eindringen gewisser diffusibler Substanzen in das Körperchen nicht ganz die gleichen, und es ist verfehlt, aus dem Auftreten einer Hämolyse ohne weiteres Schlüsse auf eine gesamte Permeabilitätsänderung zu ziehen.

7. Untersuchung des Blutes von Pferd, Ochs, Hund, Kaninchen und Gans.

Außer Menschenblut wurde noch untersucht: Pferdeblut (2 Versuche), Ochsenblut (2 Versuche), Hundeblut, Kaninchen- und Gänseblut. Das Gänseblut war gemischtes Blut (arteriell und venös), bei den anderen Blutarten handelt es sich um arterielles Blut. Es wurden die Chloride (freie und Gesamtchloride), Zucker und Rest-N untersucht. In allen Versuchen finden sich die untersuchten Substanzen ausschließlich im Plasma.

8. Untersuchungen an Nierenkranken.

Während wir in den Versuchen I bis XXXII Rest-N, Zucker und Chloride ausschließlich im Plasma fanden, zeigen die Fälle XXXIV bis XXXVI ein ganz anderes Bild. In allen 3 Fällen handelt es sich um

schwere Nephritis bzw. Nephrose. Im Fall XXXIVa fanden sich die Chloride (Gesamtchlor und freie Chloride) ausschließlich im Plasma, hingegen finden sich 58,1 mg Rest-N in den Blutkörperchen. Daß dies nicht ein Zufall ist, zeigt die 3 Tage später vorgenommene 2. Untersuchung. Hier finden sich 62,6 mg Rest-N in den Blutkörperchen. In Fall XXXV finden sich ebenfalls die freien Chloride ausschließlich im Plasma, hingegen finden sich 29,2 mg Rest-N in den Blutkörperchen.

Man könnte nun annehmen, daß in diesen Fällen aus irgendwelchen Gründen die Resistenz der Blutkörperchen besonders herabgesetzt gewesen sei, so daß die mit der Plasmagewinnung verbundenen Manipulationen genügt haben, um ein Eindringen von Rest-N bzw. Chloriden in die Blutkörperchen herbeizuführen. Diese Annahme muß aber abgelehnt werden, denn das Serum zeigt in allen diesen Fällen die gleiche Zusammensetzung wie das Plasma. So finden wir im Fall XXXIVa im Plasma 575 mg Gesamtchlor, im Serum 580 mg. Im Fall XXXV fanden wir im Plasma 240,8 mg Rest-N, im Serum 239 mg. Im Fall XXXVI fanden wir im Plasma mittels Dialyse 40,3 mg, im Serum 41,08 mg Rest-N. Nun sind die Manipulationen zur Gewinnung des Plasmas ganz andere als zur Gewinnung des Serums. Es ist daher kaum anzunehmen, daß bei der Plasmagewinnung genau soviel Rest-N bzw. Chloride in die Blutkörperchen eingedrungen sind wie bei der Serumgewinnung, und es ist daher die Annahme berechtigt, daß in diesen Fällen ein Teil der Chloride bzw. der Rest-N-Körper sich bereits im strömenden Blute in den Blutkörperchen befunden hat. Auf die Bedeutung dieser Befunde für die Pathologie wollen wir an anderer Stelle eingehen.

IV. Kapitel.

Theoretische Betrachtungen.

Auf Grund des mitgeteilten Materials glauben wir zu der Annahme berechtigt zu sein, daß sich unter physiologischen Verhältnissen weder Zucker noch freie Chloride noch Rest-N-Körper in diffusibler Form in den Blutkörperchen des strömenden Blutes finden, sondern daß diese Substanzen ausschließlich im Plasma vorkommen. Das an Fibrinogen gebundene Chlor findet sich natürlich ausschließlich im Plasma. Wir konnten ferner zeigen, daß sich sogar unter pathologischen Verhältnissen, bei denen es zu einer Vermehrung dieser Substanzen im strömenden Blut gekommen ist (Hyperglykämie bei Diabetes mellitus, Vermehrung der Rest-N-Körper bei Pneumonie, Vermehrung der Chloride bei gewissen Formen der Niereninsuffizienz) die Blutkörperchen frei von diesen

Substanzen sein können. Auf die pathologischen Verhältnisse wollen wir in einer späteren Mitteilung zurückkommen und uns hier ausschließlich mit den physiologischen beschäftigen. Nun beziehen sich unsere Untersuchungen größtenteils auf das menschliche Blut. Wie wir eingangs erwähnt haben, erwiesen sich in den Untersuchungen früherer Autoren die Blutkörperchen der Gans, des Pferdes, des Kaninchens immer oder meistens als zuckerfrei, die des Hundes und Rindes meist als zuckerhaltig, die des Menschen nahezu immer stark zuckerhaltig. Da wir nun nachgewiesen haben, daß auch die „am wenigsten resistenten“ Blutkörperchen des Menschen im strömenden Blute zuckerfrei sind, so ist es schon aus diesem Grunde wahrscheinlich, daß es sich bei dieser Erscheinung um eine **physiologische Konstante** handelt, die nicht nur den Zucker, sondern auch die freien Chloride und die Rest-N-Körper betrifft, was durch die mitgeteilten Tierversuche am Pferde-, Ochsen-, Hunde-, Kaninchen- und Gansblut bestätigt wird¹⁾. Diese Feststellung zeigt, daß die roten Blutkörperchen ein hochdifferenziertes Gewebe mit spezifischer Funktion sind, die mit dem Transport dieser Substanzen nichts zu tun hat.

Deshalb bedürfen fast alle Untersuchungen, die sich mit der Permeabilität der roten Blutkörperchen beschäftigen, einer Nachprüfung. Nach Höber bilden die Blutkörperchen das Hauptobjekt für das Studium des Fundamentalproblems vom Stoffaustausch zwischen Zellinhalt und Zellumgebung. Ihnen kommen an Bedeutung nur die Pflanzenzellen nahe, die zum Studium der Plasmolyse verwendet werden. Von den zahlreichen Theorien, die auf diesem Gebiete besondere Beachtung gefunden haben, möchten wir hier nur die beiden folgenden einer Kritik unterziehen.

Die eine betrifft die Ionendurchlässigkeit der Blutkörperchen. Diese Annahme stützt sich einerseits auf das Ergebnis der Bestimmungen der elektrischen Leitfähigkeit von R. Höber. Zwar hatten Roth, Begarsky und Tangl, Stewart gezeigt, daß der Blutkörperchenbrei den elektrischen Strom fast gar nicht leitet, und daraus geschlossen, daß die Blutkörperchen für die Serumsalze bzw. deren Ionen undurchlässig seien. Höber glaubt aber mittels verschiedener Methoden eine innere Leitfähigkeit derselben festgestellt zu haben. Es müßte

¹⁾ Dieses Gesetz gilt nicht für alle diffusiblen Substanzen des Blutes. In einer späteren Mitteilung wird gezeigt werden, daß das Cholesterin unter normalen Verhältnissen ziemlich gleichmäßig auf Plasma und Körperchen verteilt ist.

aber unserer Ansicht nach erst untersucht werden, ob bei den mit der Gewinnung und dem Waschen der Blutkörperchen verbundenen Manipulationen nicht bereits Salze in das Innere der Blutkörperchen eingedrungen sind.

Andererseits stützt sich diese Annahme auf das Ergebnis chemischer Methoden. H. J. Hamburger beobachtete beim Durchleiten von Kohlensäure durch Blut eine Zunahme der Alkalinität des Serums, eine Zunahme der festen Bestandteile im Serum und ein Eindringen von Chlor, von SO_4 und NO_3 in die Körperchen, auch das Jugularisblut soll weniger Chlor und weniger Zucker enthalten als das Carotisblut. Es sollen daher bei der Beladung der Blutkörperchen mit Kohlensäure Ionen in dieselben eindringen, die später beim Durchgang durch die Lungen wieder ausgetrieben werden. Wir möchten hierzu nur bemerken, daß unsere Untersuchungen am Menschen ausschließlich im venösen Blut angestellt wurden und daß wir freie diffusible Chlorionen in den Blutkörperchen nicht feststellen konnten.

Eine Erörterung bedarf ferner die sogenannte Lipoidtheorie. Overton vertritt auf Grund seiner Untersuchungen an Pflanzen- und Muskelzellen die Ansicht, daß alle Substanzen, die lipoidlöslich sind, ohne weiteres in die Zellen eindringen und daher plasmolysieren, während die lipoidunlöslichen nicht eindringen. Von jenen Substanzen, die im normalen Stoffwechsel eine Rolle spielen, sind die neutralen Salze, der Zucker und die Aminosäuren lipoidunlöslich und sollen daher nicht eindringen, während der Harnstoff als lipoidlösliche Substanz einzudringen vermöge. Daß der Harnstoff in die Pflanzenzellen verhältnismäßig langsam, in tierische Zellen rasch eindringe, erklärt Höber aus der Verschiedenheit der Zellhäute. Schon die Reagensglasversuche an Blutkörperchen zeigen aber gewisse Unstimmigkeiten. Wir erinnern nochmals an die Untersuchungen von Rona und Doeblin, Katz usw. Diese Unstimmigkeiten versuchte man durch die Annahme einer verschiedenen Resistenz der Blutkörperchen der einzelnen Tierarten zu erklären. Höber weist aber schon darauf hin, daß die Heranziehung der Lipoidtheorie zur Erklärung des physiologischen Stoffaustausches gewisse Schwierigkeiten biete. Denn einerseits sollen nach dieser Theorie diejenigen Stoffe, die die Zelle braucht (Zucker, Aminosäuren, Alkali- und Erdalkalisalze) nicht in die Zellen eindringen können, andererseits soll die Zelle aber für die lipoidlöslichen körperfremden Stoffe, wie z. B. für die Narkotica, die fast durchweg im Haushalt der Zelle keine Rolle spielen, besonders durchlässig sein. Höber unterscheidet daher eine passive physikalische und eine aktive physiologische Permeabilität. Für die lipoidunlöslichen Stoffe seien die Zellhäute bald offen, bald geschlossen, je nachdem es der Funktionszustand der Zelle fordere. Neben den physikalischen Kräften Diffusion und Osmose müsse daher eine filtrierende Triebkraft angenommen werden.

Die vorhin erwähnten Unstimmigkeiten bezüglich des Verhaltens des Zuckers und der Neutralsalze sind, soweit die Blutkörperchen in Be

tracht kommen, durch unsere vorhin mitgeteilten Versuche beseitigt und erklärt worden. Auch die am wenigsten resistenten roten Blutkörperchen des Menschen enthalten weder Zucker noch freie Chloride, solange sie im Blute strömen und intakt sind. In dieser Beziehung scheinen unsere Untersuchungen also die Lipoidtheorie zu stützen. Bezüglich des Harnstoffs stehen sie aber im direkten Gegensatz zu derselben, da der Harnstoff von den Vertretern der Lipoidtheorie zu den lipoidlöslichen Substanzen gerechnet ist und daher die Permeabilität für Harnstoff als eine generelle Eigenschaft aller Zellen postuliert wird.

Wir sind nun nicht der Ansicht, daß die Blutkörperchen auch für die lipoidlöslichen Stoffe völlig undurchlässig sind, wir glauben nur, daß diese Stoffe (Zucker, Aminosäuren) bei ihrem Eintritt in die Zellen sofort irgendwie an das Protoplasma verankert und in kolloidale Form übergeführt bzw. verarbeitet werden, ebenso wie die Stoffwechselschlacken (Rest-N-Körper) sofort eliminiert werden müssen, wenn sie nicht die Stoffwechselforgänge in der Zelle schädigen und eine Giftwirkung hervorrufen sollen. Diese Tätigkeit, durch die die Zelle den Import und Export dieser Stoffe regelt, hat demnach wenigstens unter physiologischen Verhältnissen mit der Lipoidlöslichkeit dieser Stoffe nichts zu tun. Wir möchten daher lieber nicht, wie Höber dies tut, von einer passiven Permeabilität der Zellen und Zellhäute sprechen, sondern nur von einer selektiven Tätigkeit der Zelle. Die passive physikalische Permeabilität halten wir für eine Absterbeerscheinung¹⁾.

Wir müssen uns nun die Frage vorlegen, ob wir das Resultat, das wir am Blute erhoben haben, auch auf andere Gewebe des Körpers übertragen können, das heißt, ob wir annehmen können, daß auch in den Muskeln, in der Leber und anderen Drüsen, im Gehirn usw. die Zellen frei oder bis auf Spuren frei von Zucker, Harnstoff und Chloriden sind und daß sich diese Substanzen ausschließlich in der die Zellen umspülenden Gewebsflüssigkeit befinden.

Eine solche Annahme würde im Widerspruch stehen zu der Ansicht der meisten neueren Autoren, die sich mit dieser Frage beschäftigt haben. Dies gilt wieder ganz besonders von dem Harnstoff resp. den Rest-N-Körpern. Wir verweisen z. B. auf die Arbeit von Marshall und Davis, die auf Grund ihrer Untersuchungen eine gleichmäßige Verteilung des Harnstoffes auf fast alle Organe des Körpers (ausgenommen ist das Fettgewebe) annehmen, und zwar sowohl unter physiologischen, wie pathologischen Verhältnissen, eine Annahme, die vollkommen im Rahmen der oben mitgeteilten Lipoidtheorie liegt. Zu einer Kritik der in diesen Untersuchungen angewandten biologischen und chemischen Technik halten wir uns ohne eigene Nachprüfung nicht für berechtigt, wir möchten nur auf eins hinweisen: für uns ist es ausgemacht, daß die Blutkörperchen des strömenden Blutes frei von Rest-N-Körpern, also auch frei von Harn-

¹⁾ Die Annahme von H. H. Meyer und Overton, daß die Lipoidlöslichkeit bei der Wirkung der körperfremden Narkotica eine große Rolle spielt, wird dadurch in keiner Weise berührt.

stoff sind; es muß also der Harnstoffgehalt des Serums wesentlich höher sein als der des Gesamtblutes. Marshall und Davis fanden aber in ihren Untersuchungen entweder übereinstimmende Werte oder nur geringe Differenzen zugunsten des Serums. Entweder war also die Gewinnung des Serums in unserem Sinne nicht einwandfrei oder es ist diese Methode nicht genügend zuverlässig. Ferner kommt noch folgendes in Betracht: So überzeugend sich die Untersuchungsbedingungen bei einem flüssigen Gewebe, wie es das Blut ist, gestalten lassen, so schwierig scheinen uns die Bedingungen zu sein bei der Untersuchung der Leber, der Muskel usw., bei denen schon die Entfernung des Blutes auf mancherlei Schwierigkeiten stößt, die Entfernung der Gewebsflüssigkeit ganz unmöglich ist. Vor allem anderen ist es schwer zu verhüten, daß während der notwendigen Zertrümmerung der Zellen Stoffwechselprozesse weiter vor sich gehen. Alle diese Schwierigkeiten lassen sich bei der Untersuchung des Blutes vermeiden.

Wenn wir also vorderhand einen experimentellen Beweis dafür, daß auch die übrigen Zellen des Körpers sich so wie die Zellen des Blutes verhalten, nicht erbringen können, so können wir doch aus der Stoffwechselphysiologie und -pathologie mancherlei Tatsachen, die in diesem Sinne sprechen, heranziehen. Wir erinnern an die Untersuchungen von Bernstein und Falta, die zeigen, daß nach intravenöser Einverleibung großer Mengen von Traubenzucker, dieser mit großer Schnelligkeit aus dem strömenden Blute verschwindet und, wie das rasche Ansteigen des R. Q. zeigt, von den Zellen aufgenommen und verarbeitet wird. Daß es sich hierbei nicht um eine Oberflächenwirkung handelt, zeigt die rasche Stapelung von Glykogen in der Leberzelle bei Hyperglykämie des portalen Blutes nach Zuckergenuß. Es muß also der Zucker in das Innere der Leberzellen eingedrungen sein. Ebenso muß eine Durchlässigkeit der Zellhäute für den Harnstoff vorhanden sein, da ja die Zellen sich des in ihnen gebildeten Harnstoffs entledigen müssen, endlich auch für Salze, da die Zellen in der Lage sein müssen, jene Salze, die sie zum Aufbau ihres Protoplasmas benötigen, in sich aufzunehmen und sie beim Abbau des Eiweißes wieder in die vorbeiströmende Flüssigkeit abzugeben. Ein Beispiel dafür, daß andererseits die selektive Tätigkeit der Zellen von der Zusammensetzung der sie umgebenden Flüssigkeit in hohem Grade unabhängig ist, ist das Verhalten der Endothelien bei manchen Ödemformen. In einer früheren Arbeit haben wir gezeigt, daß der Gehalt des Plasmas an Chloriden von demjenigen der Ödemflüssigkeit sehr verschieden sein kann. Es bestehen also Hüben wie drüben von der Endothelwand ganz verschiedene osmotische Partiärdrucke.

In seinen bekannten Untersuchungen über den Stoffwechsel der Hefezellen ist M. Rubner zu den gleichen Anschauungen gelangt: „Innerhalb der Grenzen normalen Lebens geht also stets nur so viel Zucker in die Zelle, als gerade für die Lebensleistung notwendig ist. Die lebende Substanz zeigt durch diese Erscheinung, die man im wesentlichen Selbstregulation nennt, daß sie es ist und daß nicht etwa rein physikalische

Verhältnisse es sind, die den Nahrungsstrom regulieren,“ und an anderer Stelle: „Die quantitative Messung an der Hefezelle unter den Bedingungen ihres normalen Lebens... zeigt gerade für die eigentliche Zellnahrung keine physikalische, sondern nur physiologische Permeabilität“, und später: „Für das Wachstum ist nicht die absolute Konzentration einer Lösung an N-haltigen Nährstoffen maßgebend“, „auch hier besteht also Selbstregulierung unabhängig von etwaigem Nahrungsüberschuß.“

V. Kapitel.

Schlußfolgerungen für die Praxis der Blutanalyse.

Bei der Untersuchung des Blutes auf Zucker, Chloride und Rest-N-Körpern ist man bisher merkwürdigerweise nicht einheitlich vorgegangen. Der Zuckergehalt des Blutes, der seit den Zeiten von Claude Bernard, und in neuerer Zeit besonders seit den Untersuchungen von Liefmann und Stern Gegenstand unzähliger Untersuchungen unter den verschiedensten physiologischen und pathologischen Verhältnissen gewesen ist, wurde fast durchweg im Gesamtblut bestimmt. Nur in neuerer Zeit hat man manchmal Untersuchungen des Plasmas vorgenommen (Frank, Rolly und Oppermann). Die Chloride wurden fast durchweg im Serum bestimmt; die Untersuchung auf Rest-N-Körper hat man endlich entweder im Gesamtblut oder im Serum vorgenommen. Wir müssen uns nun zuerst die Frage vorlegen, ob für die biologische Fragestellungen, die bei diesen Untersuchungen verfolgt werden, die Bestimmung im Gesamtblut oder im Plasma oder im Serum richtig ist. Welches sind nun diese biologischen Fragestellungen? Sie verfolgen einerseits den Zweck, festzustellen, ob der Gehalt an Zucker, an Chloriden oder an Rest-N-Körpern im Blute eines Individuums im nüchternen Zustand normal ist, das heißt, innerhalb der physiologischen Breite liegt, oder ob er erhöht bzw. erniedrigt ist, und andererseits, welche Schwankungen der Gehalt des Blutes an diesen Substanzen unter gewissen experimentellen Bedingungen aufweist (Nahrungszufuhr, Pharmaka usw.), und ob diese Schwankungen von den bei normalen Individuen auftretenden nach der einen oder der anderen Richtung hin abweichen. Da wir nun gezeigt haben, daß unter physiologischen Verhältnissen diese Substanzen sich ausschließlich im Plasma befinden, so ist es selbstverständlich, daß die Untersuchung des Plasmas ein viel genaueres Bild von dem Ge-

halt des Blutes bzw. von den in demselben auftretenden Schwankungen gibt als der Gehalt des Gesamtblutes; denn es ist selbstverständlich, daß zwei Blutproben, die im Gesamtblut gleich viel Zucker enthalten, einen verschiedenen Gehalt an Zucker im Plasma aufweisen, wenn die Blutkörperchenvolumina verschieden sind. Differenzen im Plasmavolumen zwischen 55 und 65 sind nun ganz gewöhnlich, solche zwischen 50 bis 70 gar nicht selten. Die folgende Tabelle zeigt, daß bei Schwankungen

<i>D</i> im Gesamtblut	Plasmavol.	<i>D</i> im Plasma	Differenz
100	50	200	—
100	60	166	34
100	70	143	57
200	50	400	—
200	60	333	67
200	70	286	114
300	50	600	—
300	60	500	100
300	70	428	172

des Plasmavolumens innerhalb dieser Grenzen bei gleichem Gehalte des Gesamtblutes an Zucker nämlich von 100 mg der Zuckergehalt des Plasmas zwischen 200 bis 143 differiert. Besteht Hyperglykämie, so sind die bestehenden Differenzen natürlich noch größer. Sie betragen z. B. bei einem Gehalt des Gesamtblutes an Zucker von 300 mg zwischen 600 und 428 mg. Dasselbe gilt natürlich *ceteris paribus* von den Chloriden und Rest-N-Körpern.

Aber auch von jenen Schwankungen des Blutes an Zucker, Chloriden und Rest-N-Körpern, die bei ein und demselben Individuum unter gewissen experimentellen Bedingungen auftreten, gibt uns die Untersuchung des Plasmas eine viel genauere Vorstellung. Hier bleibt das Blutkörperchenvolumen konstant. Der Gehalt des Gesamtblutes an diesen Substanzen bewegt sich zwar in derselben Richtung — er nimmt zu oder nimmt ab —, bleibt aber natürlich hinter den Schwankungen des Plasmas zurück, um so mehr, je größer diese Schwankungen sind.

Der Gehalt des Gesamtblutes an diesen Substanzen ist daher nicht nur abhängig von dem Gehalt des Plasmas an denselben, sondern auch vom Plasmavolumen. Nun erscheint

es uns ganz selbstverständlich, daß für alle Probleme, die mittels Untersuchung des Blutes studiert werden, die Kenntnis des Plasmagehalts viel wichtiger ist als die des Gesamtblutes; denn für den Stoffaustausch zwischen Blut und Geweben in den Drüsen, Muskeln usw. kommt es doch vor allem auf den Partiärdruck dieser Substanzen im Plasma an. Gewiß spielen noch andere Momente eine große Rolle, so z. B. die absolute Menge an Substanz, die in der Zeiteinheit über die Endothelfläche strömt. Diese hängt allerdings auch vom Blutkörperchenvolumen ab, daneben auch von der Durchströmungsgeschwindigkeit. Letztere ist ein Faktor für sich, ersteren zu kennen ist sicher unter Umständen wünschenswert. Wenn wir diesen Grad von Genauigkeit erreichen wollen, dann müssen wir eben neben dem Gehalte des Plasmas an diesen Substanzen auch das Blutkörperchenvolumen bestimmen, in keinem Falle aber wird uns der Gehalt des Gesamtblutes an diesen Substanzen allein etwas nützen, da dies eine Gleichung mit zwei Unbekannten ist.

Von diesen biologischen Gesichtspunkten aus müssen wir also verlangen, daß die Untersuchung dieser Substanzen im Plasma vorgenommen wird. Daß die Plasmagewinnung unter allen jenen Kautelen erfolgt, die einem Eindringen dieser Substanzen in die Blutkörperchen während der Gewinnung vorbeugen, ist nach unseren früheren Ausführungen selbstverständlich. Eine volle Garantie dafür, daß bei der Plasmagewinnung nichts verloren ging, haben wir allerdings erst dann, wenn wir diese Substanzen jedesmal im Gesamtblut und im Plasma bestimmen, daraus das Blutkörperchenvolumen berechnen und uns überzeugen, ob dieses berechnete Blutkörperchenvolumen mit dem mittels des Hämatokriten gefundenen übereinstimmt. Wir sind uns dessen bewußt, daß durch diese Forderung die klinische Forschung wesentlich erschwert wird, schon deshalb, weil die Plasmagewinnung ein sehr subtiles Verfahren ist. Man kann aber wohl für gewöhnlich die Untersuchung vereinfachen, indem man nur das Gesamtblut untersucht, das Plasmavolumen mittels des Hämatokriten ermittelt und daraus den Gehalt des Plasmas an diesen Substanzen berechnet.

Für Zucker und Rest-N-Körper kommt noch eine weitere Möglichkeit in Frage. Wir haben gesehen, daß bei entsprechend vorsichtiger Gewinnung des Serums (Vermeidung des Defibri-

nierens durch Schlagen und der Eiskühlung) die Werte an Zucker resp. Rest-N-Körper im Serum mit denen des Plasmas annähernd übereinstimmen. Man könnte sich also mit der Untersuchung des Serums begnügen. Ganz genau ist aber dieses Verfahren nicht, da bei der Serumbildung meist eine geringe Wasserverschiebung eintritt, so daß das Serum konzentrierter wird und daher die Zucker- resp. Rest-N-Werte etwas höher liegen als in dem entsprechenden Plasma. Bei den Chloriden ist dieses Verfahren aber nicht verwendbar. Die Chloride wurden bisher fast durchweg im Serum bestimmt. Für die Untersuchung von Stoffwechselproblemen kann dies nicht richtig sein; denn es ist mehr als wahrscheinlich, daß sich am Stoffaustausch zwischen Blut und Geweben nur die freien, in diffusibler Form vorhandenen Chloride des strömenden Blutes beteiligen, und daß die Endothelien nur auf die Schwankungen im Gehalt des Plasmas an freien Chloriden reagieren. Da bei der Gerinnung des Blutes die gebundenen Chloride in Freiheit gesetzt werden, bekommt man daher bei der Untersuchung des Serums zu hohe Werte. Die Bestimmung der gebundenen Chloride dürfte für derartige Fragen nicht notwendig sein.

Wie wir im Punkt VIII gesehen haben, sind die Verhältnisse aber bei gewissen pathologischen Zuständen (Urämie) noch viel komplizierter, da es hier vorkommen kann, daß ein Teil des Rest-N bzw. der freien Chloride sich schon im strömenden Blute in den Blutkörperchen befindet. Es ist selbstverständlich, daß in solchen Fällen die Untersuchung des Plasmas oder des Serums allein viel zu niedrige Resultate gibt. Aus diesem Grunde sind daher die Untersuchungen des Rest-N im Serum oder Plasma unzuverlässig; ebenso auch die Untersuchung der Chloride im Plasma. Die Untersuchung der Chloride im Serum ist ganz ungenau. Hier finden sich zwar durch Freiwerden des gebundenen Chlors höhere Werte, es entgehen aber selbstverständlich auch hier jene Chloridmengen der Bestimmung, die sich in den Blutkörperchen befinden. Für eine genaue Blutanalyse muß daher unter solchen Verhältnissen verlangt werden: eine Untersuchung dieser Substanzen im Gesamtblut und Plasma und eine Hämatokritbestimmung. Daraus kann man ersehen, ob sich die betreffenden Substanzen ausschließlich im Plasma befinden und, wenn dies nicht der Fall ist, so kann man be-

rechnen, wieviel von ihnen in den roten Blutkörperchen enthalten ist. Eine Kontrolle darüber, daß Rest-N bzw. freie Chloride nicht erst bei der Plasmagewinnung in die Blutkörperchen eingedrungen sind, sondern sich schon im strömenden Blute in den Blutkörperchen befunden haben, erlangt man durch gleichzeitige Untersuchung des Serums.

Der Gang der Analyse wird daher bei der Nephritis von der Fragestellung abhängig sein. Will man z. B. nur wissen, ob die freien Chloride und Rest-N-Körper vermehrt sind, so genügt eine Bestimmung derselben im Gesamtblut und eine Bestimmung des Blutkörperchenvolumens mit dem Hämatokriten. Daraus kann man den Gehalt des Plasmas berechnen. Mit dieser Fragestellung wird man aber nach unseren bisherigen Erfahrungen nicht auskommen. Darauf wollen wir an anderem Ort ausführlich eingehen. Hier war uns nur darum zu tun, zu zeigen, welche Mängel den bisherigen Methoden der Blutanalyse infolge der bisher herrschenden Planlosigkeit anhaften und wie dieser Planlosigkeit zu steuern wäre.

Die eben angeführten Überlegungen führen weiterhin dazu, daß die bisher vorliegenden Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung der Blutkörperchen revidiert werden müssen. Alle diese Untersuchungen sind in der Weise durchgeführt worden, daß man die roten Blutkörperchen durch Ausschleudern gewann und sie auf verschiedene Weise durch Auswaschen von den Plasmaresten zu befreien suchte. Es sind gewiß Zweifel berechtigt, ob bei dieser Methode ein Eindringen von Zucker, Neutralsalzen, Rest-N usw. in die Blutkörperchen verhindert worden ist. In diesem Sinne sprechen die Unstimmigkeiten, die die bisherigen Resultate aufweisen. So fand z. B. Abderhalden in den Blutkörperchen des Schweines und des Kaninchens viel Kalium und gar kein Natrium, in denen des Hundes aber viel Natrium. Auch die früheren Untersuchungen von Limbeck zeigen ähnliche Unstimmigkeiten.

Es scheint uns fraglich, ob man auf diesem direkten Wege überhaupt zum Ziele kommen kann. Hingegen ist zu erwarten, daß die indirekte Methode exakte Resultate gibt, die darin besteht, daß man die chemische Zusammensetzung des Gesamtblutes untersucht, dann die des unter entsprechenden Kautelen gewonnenen Plasmas und daraus diejenige der Blutkörperchen berechnet.

Auf diese Weise konnten wir, wie schon mehrfach erwähnt, bereits feststellen, daß die Blutkörperchen frei oder nahezu frei von Chloriden sind. In analoger Weise müßten auch die Untersuchungen über die Alkali- und Erdalkalimetalle durchgeführt werden.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen können wir in folgenden Sätzen zusammenfassen:

1. Im strömenden Blute von Menschen, Pferden, Rindern, Hunden, Kaninchen und Gänsen befindet sich der Zucker, die freien und gebundenen Chloride und die Rest-N-Körper ausschließlich im Plasma. Die Blutkörperchen sind frei von diesen Substanzen, sowohl im nüchternen Zustand wie nach Zufuhr von Traubenzucker oder einer NaCl- oder eiweißreichen Nahrung.

2. Aus dem Gehalte des Gesamtblutes und des Plasmas an diesen Substanzen läßt sich das Blutkörperchenvolumen berechnen. Die so berechneten Blutkörperchenvolumina stimmen untereinander und mit dem mittels des Hämatokritverfahrens gefundenen genau überein.

3. Auch unter gewissen pathologischen Verhältnissen (Hyperglykämie bei Diabetes, Vermehrung der Rest-N-Körper bei gewissen Formen der Niereninsuffizienz oder bei Pneumonie, Hyperchlorämie bei Niereninsuffizienz) wurden diese Substanzen ausschließlich im Plasma gefunden, hingegen finden sich in gewissen Stadien der Nephritis und Nephrose die Rest-N-Körper bzw. die freien Chloride zum Teil in den Blutkörperchen.

Literatur.

- Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem 25, 66, 1898.
 Ivar Bang, Über die Verteilung des Rest-N [zwischen Blutkörperchen und Plasma, diese Zeitschr. 74, 294, 1916.
 Bugarsky und Tangel, zit. nach R. Höber.
 S. Bernstein und W. Falta, Über den Einfluß der Ernährungsweise auf den Ruhenüchternumsatz bei normalen und diabetischen Individuen, Arch. f. klin. Med. 121, 95, 1916.
 Dieselben, Respiratorischer Stoffwechsel und Blutzuckerregulation, Arch. f. klin. Med. 125, 234, 1918.
 E. Frank, Über einige Grundtatsachen aus der Physiologie des Blutzuckers nebst methodischen Vorbemerkungen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 70, 129, 1910.
 W. Falta und M. Richter-Quittner, Studien über die Faserstoffgerinnung, diese Zeitschr. 91, 381, 1918.
 G. Gryns, Über den Einfluß der gelösten Stoffe auf die roten Blutzellen usw., Arch. f. d. ges. Physiol. 68, 86, 1896.

Verteil. von Zucker, Chloriden u. Rest-N usw. im strömenden Blute. 189

H. I. Hamburger, Osmotischer Druck und Ionenlehre in den med. Wissensch. 1, 293, 1902.

Derselbe, Der Einfluß des osmotischen Druckes auf das Volumen der roten Blutkörperchen und über das Permeabilitätsproblem, diese Zeitschr. 71, 464, 1915.

S. G. Hedin, Über die Permeabilität der Blutkörperchen, Arch. f. d. ges. Physiol. 68, 229, 1897.

Derselbe, Versuche über das Vermögen der Salze einiger Stickstoffbasen, in die Blutkörperchen einzudringen, Arch. f. d. ges. Physiol. 70, 525, 1898.

Hammarsten, Lehrb. d. physiolog. Chemie, 6. Aufl., 239, 1907.

R. Höber, Die physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe 1911.

Derselbe, Über die Verteilung des Blutzuckers auf Körperchen und Plasma, diese Zeitschr. 45, 207, 1912.

Derselbe, Physiol. Neutralsalzwirkung, Zeitschr. f. physik. Chem. 70, 134, 1910.

Adolf Hollinger, Über die Verteilung des Zuckers im Blute, diese Zeitschr. 17, 1, 1909.

Gertrud Katz, Über den Einfluß der Narkotica auf die Durchlässigkeit von Blutkörperchen für Traubenzucker und Harnstoff, diese Zeitschr. 90, 153, 1918.

Shuzo Kozawa, Beitrag zum arteigenen Verhalten der roten Blutkörperchen, diese Zeitschr. 60, 146, 231, 1914.

A. Loeb, Beziehungen zwischen Erythrocyten und Glykolyse, diese Zeitschr. 49, 1913.

H. Lyttgens und I. Sandgren, Über die Verteilung der reduzierenden Substanzen im Menschenblut, diese Zeitschr. 31, 153, 1911; 36, 261, 1911.

Liefmann und Stern, Über Glykämie und Glykosurie, diese Zeitschr. 1, 199, 1906.

Ernst Masing, Sind die Blutkörperchen durchgängig für Traubenzucker? Arch. f. d. ges. Physiol. 149, 227, 1913.

Derselbe, Über die Verteilung von Traubenzucker im Menschenblut und ihre Abhängigkeit von der Temperatur, Arch. f. d. ges. Physiol. 156, 401, 1914.

Jac. G. Otto, Über den Gehalt des Blutes an Zucker und reduzierenden Substanzen, Arch. f. d. ges. Physiol. 35, 467, 1885.

P. Rona und D. Takahashi, Über den Zuckergehalt der Blutkörperchen, diese Zeitschr. 30, 99, 1911.

P. Rona und L. Michaelis, Die Permeabilität der Blutkörperchen für Traubenzucker, diese Zeitschr. 18, 514, 1909.

Dieselben, Der Zuckergehalt der Blutkörperchen, diese Zeitschr. 16, 60, 1908.

P. Rona und A. Deblin, Weiterer Beitrag zur Permeabilität der Blutkörperchen für Traubenzucker, diese Zeitschr. 31, 215, 1911.

190W.Faltau.M.Richter-Quittner: Verteil. v. Zucker, Chloriden u. Rest-N usw.

M. Richter-Quittner, Zur Methodik der chemischen Blutanalyse I und II, diese Zeitschr. **95**, 179, 1919; **96**, 62, 1919.

Roth, zit. nach Höber.

Rolly und Oppermann, Der Blutzucker bei fieberhaften und dyspnoischen Zuständen des Menschen, diese Zeitschr. **48**, 258, 1913.

M. Rubner, Beitrag über die Resorptionsvorgänge der Organzellen, Arch. f. Physiol. und Anat. **240**, **1913**.

I. Snapper, Über eine Permeabilitätsänderung als Ursache der Chlorretention bei fieberhaften Erkrankungen, Arch. f. klin. Med. **111**, 441, 1913.

Derselbe, Über den Chlorgehalt des Blutes und seine Verteilung auf Serum und Blutkörperchen usw., diese Zeitsch. **51**, 53, 1913.

Über den geringen Katalasegehalt der Weil-Felix (X)-Stämme im Gegensatz zu normalen Proteusstämmen.

Von
Martin Jacoby.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit
in Berlin.)

(Eingegangen am 22. September 1919.)

Da mir aus Untersuchungen über Bakterienkatalase¹⁾ die starke Wasserstoffsperoxyd zersetzende Funktion vieler Proteusstämmen bekannt war, schien es mir von Interesse, zu untersuchen, ob sich die Stämme, die sich durch ihre Agglutinierbarkeit durch das Serum von Fleckfieberkranken auszeichnen, die sogenannten X-Stämme, in dieser Beziehung von anderen Proteusstämmen unterscheiden.

Die Variabilität der Fermentfunktionen der Proteusbacillen war mir schon in früheren Untersuchungen aufgefallen. So hatte ich Proteusstämmen gefunden, die keine Urease bilden. Namentlich aber konnte ich durch geeignete Ernährung die Fermentbildung von Proteusstämmen künstlich beeinflussen²⁾.

Auch die Agglutinabilität der X-Bacillen ist von der Ernährung abhängig. Denn Schiff³⁾ hat gezeigt, daß die Agglutinabilität der X-Stämme auf zuckerhaltigen Nährböden zunimmt. Braun und Schaeffer⁴⁾ geben an, daß die X-Stämme, wie Jötten und sie selbst fanden, Maltose und Saccharose unter Säurebildung spalten. Es gibt nach Braun und Schaeffer auch normale Stämme, die das können. Einen derartigen Stamm erhielten sie aus Galizien, während in Frankfurt und Wien solche Stämme nicht gefunden wurden.

¹⁾ Diese Zeitschr. 88, 35; 89, 350; 92, 129; 95, 124.

²⁾ Studien über Fermentbildung, diese Zeitschr. 79, 88.

³⁾ Münch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 6; vgl. auch Weltmann und Seufferheld, Wiener klin. Wochenschr. 1918, Nr. 52.

⁴⁾ Berl. klin. Wochenschr. 1919, Nr. 18.

Ich habe nun zwischen normalen Proteusstämmen und den X-Stämmen eine sehr ausgesprochene Differenz in der Fähigkeit, Wasserstoffsperoxyd zu zersetzen, aufgefunden. Dies Verhalten ist sehr leicht festzustellen und bequem meßbar. Ich habe 64 gewöhnliche Proteusstämme untersucht, außerdem 7 X-Stämme, endlich einen Stamm mit der Bezeichnung X_2 (?). Alle Kulturen erhielt ich durch die Liebenswürdigkeit von Herrn Professor Friedemann, dem ich auch an dieser Stelle herzlich Dank sage. Die Prüfungen gestalteten sich sehr einfach. Immer wurde je 0,5 ccm einer 4 tägigen Bouillonkultur untersucht, die zu 2 ccm einer 1,5⁰/₀igen Lösung von Wasserstoffsperoxyd hinzugefügt wurde. Die Gemische wurden 30 Minuten im Brutschrank gehalten und dann titriert. Es wurden immer größere Reihen von Stämmen gleichzeitig geprüft, so daß Vergleiche möglich waren. Die mehrfache Wiederholung der Untersuchung ergab zwar, wie es ja zu erwarten war, kleine Unterschiede an den einzelnen Untersuchungstagen. Aber diese Schwankungen waren auffallend gering, die Stämme hatten im Laufe der Wochen ein recht konstantes Zersetzungsvermögen für Wasserstoffsperoxyd.

Die 64 normalen Stämme zersetzten im Durchschnitt 81,6⁰/₀ Wasserstoffsperoxyd, nur 5 von den 64 Fällen weniger als 50⁰/₀. 7 X-Stämme zersetzten im Durchschnitt 31,5⁰/₀, davon 6 Stämme unter 50⁰/₀. Der Stamm mit der Bezeichnung X_2 (?) zersetzte 84,4⁰/₀.

Die spezifische Wärme des Blutes und des Serums unter besonderer Berücksichtigung der Methodik.

Von
Edgar Atzler und Fritz Richter.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Greifswald.)

(Eingegangen am 1. September 1919).

Mit 3 Figuren im Text.

Gelegentliche einiger thermischer Untersuchungen an tierischen Flüssigkeiten stellte sich bei der Durchsicht der Literatur heraus, daß bisher nur wenige, aber recht variierende Werte der spezifischen Wärme des Blutes und des Serums bestimmt worden sind. In der beigefügten Tabelle haben wir die uns zugänglichen Werte zusammengestellt.

Autor	Blut- art	Quelle	Temperatur	Spez. Wärme	Methode
Kopp ¹⁾	art.	Mensch	Anfangstemp. 40°	1,02	Misch.
—	ven.	"	"	0,892	—
J. Rosenthal ²⁾ . . .	def.	?	"	0,927	Eisc.
Gamgee ³⁾	def.	Rind	12° bis 27,8°	0,97 bis 1,07	Misch.
Davy ⁴⁾	def.	Lamm	ähnlich wie Gamgee	0,812 bis 0,934	Misch.
Hillersohn u. Stein- Bernstein ⁵⁾	def.	Kalb	Anfangstemp. 38°	0,8693	Eiscal.
—	art.	—	"	0,8724	—
—	ven.	—	"	0,8708	—
—	Serum	—	"	0,9401	—
Bordier ⁶⁾	def.	Rind, Kalb, Hund	—	0,920	—
—	Serum	—	—	0,932	—
—	art.	—	—	0,901 bis 0,906	—
—	ven.	—	—	0,893	—
Berthelot ⁷⁾	def. ven.	Hammel	46,2° bis 13°	0,872	—

¹⁾ Landois, Lehrb. d. Physiol. 1880, 401.

²⁾ Kgl. Akad. d. Wiss. zu Berlin, Sitz.-Ber. vom 29. April 1878.

³⁾ Journal of anat. a. physiol. 5, 149, 1871.

⁴⁾ Zitiert nach 3, Davy, Observations anatomical and physiological.

⁵⁾ Arch. Anat. and Phys. 1896, 249.

⁶⁾ Compt. rend. 130, 1, 799, 800, 1900.

⁷⁾ Annal. de Chim. et de Phys. 6, s. XX, 178, 1890.

Die von Kopp und Davy gefundenen Werte 1,02 und 1,07 wurden schon damals mit großem Zweifel aufgenommen. Bordier und Hillersohn-Stein-Bernstein wiesen auch die Unrichtigkeit dieser ganz unmöglichen Zahlen nach. Wenn nun die Werte der beiden zuletzt genannten Untersucher noch recht variieren, so kann dies daran liegen, daß die spezifischen Wärmen für die tierischen Flüssigkeiten keine Konstanten im physikalischen Sinne, sondern den physiologischen Zustandsänderungen entsprechend gewissen individuellen Schwankungen unterworfen sind¹⁾. Jedenfalls muß aber berücksichtigt werden, daß das Arbeiten mit dem Eis calorimeter, dessen sich die genannten Untersucher fast ausschließlich bedient haben, sehr schwierig ist und lange Erfahrung voraussetzt.

Die heutzutage angewandten calorimetrischen Methoden mögen wohl technisch und theoretisch etwas kompliziert sein, dafür ist aber dank der Arbeiten Berthelots, Stohmanns und anderer die Methodik aufs exakteste ausgearbeitet und festgelegt. Nur in der Auswertung der Resultate ist noch keine einheitliche Methode erzielt.

Da der eine von uns Gelegenheit hatte, sich bei Herrn Professor Roth in der modernen Calorimetrie auszubilden, so erschienen die äußeren Bedingungen erfüllt zu sein, um an eine Nachprüfung der Werte für die spezifischen Wärmen von Blut und Serum zu gehen.

Vermutlich werden calorimetrische und thermodynamische Untersuchungen für die biologische Forschung noch mehr an Bedeutung gewinnen, als dies bisher der Fall war. Da nun aber die Auswertung des Thermometerganges, des Temperaturausgleiches mit der Umgebung usw. bei den verschiedensten thermischen Arbeiten in prinzipiell gleicher Weise berücksichtigt werden müssen, so halten wir es für berechtigt, die angewandte Methodik etwas ausführlicher zu beschreiben, als wenn es sich nur darum handelte, die Zuverlässigkeit der gewonnenen Zahlen darzutun. Eine zusammenfassende Darstellung der Methodik und des Rechnungsverfahrens ist vielleicht auch aus dem Grunde nicht unwillkommen, als die betreffenden An-

¹⁾ Vergl. hierzu Bordier, *Compt. rend.* **130**, 1, 799. — *Annal. de Chim. et de Phys.* 6. série, **10**, 178.

gaben sich nur sehr verstreut in der naturwissenschaftlichen Literatur vorfinden.

Prinzip des Verfahrens.

Dem mit p Gramm Wasser gefüllten Calorimetergefäß wird auf elektrischem Wege eine definierte Wärmemenge zugeführt. Man mißt die Temperaturzunahme und berechnet hieraus den Wasserwert W . Darauf beschickt man das gleiche Calorimetergefäß mit p Gramm, d. h. etwa dem gleichen Volum der zu untersuchenden Flüssigkeit, führt wiederum die gleiche Wärmemenge zu und bestimmt den jetzt geltenden Wasserwert W' . Dann ist die spezifische Wärme s

$$s = \frac{W'}{W}.$$

Beschreibung der Apparatur.

Als Calorimeter diente uns ein Weinholdbecher (W in Figur 1, „Dewargefäß“!) von etwa 12 cm innerer Höhe und 7 cm lichtigem Durchmesser. Der Deckel bestand aus einer starken, gut paraffinierten Korkscheibe, welche passend durchbohrt war für das Beckmann-Thermometer Th , den Rothschen elektrischen Heizkörper H und den gläsernen Rührer R .

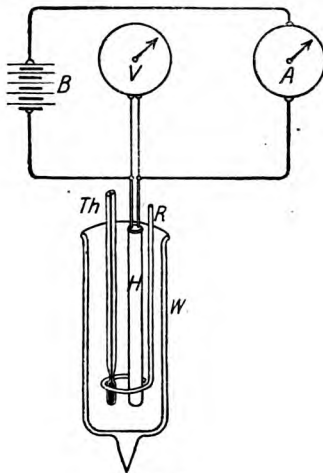


Fig. 1.

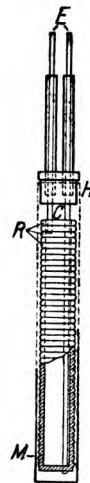


Fig. 2.

Der Heizkörper besteht aus einem Ebonitzylinder C (Fig. 2), auf dessen Mantel eine spiralgige Rinne R verläuft; in diese ist

ein 4,2 m langer Neusilberdraht eingebettet, dessen beide Enden an die voneinander isolierten Kupferelektroden *E* angelötet sind. Die Ebonitspule wird durch eine Messinghülse *M* gegen die umgebende Flüssigkeit abgeschlossen. Der Widerstand der Heizspule wurde zu 52 Ohm bestimmt; ihr Temperaturkoeffizient ist so klein, daß er vernachlässigt werden kann¹⁾.

Den Heizstrom entnahmen wir einer Batterie *B* von 7 hintereinander geschalteten Akkumulatoren (Fig. 1). Zur Ablesung der Volt- und Amperezahlen waren Ruhstratinstrumente, die von uns aufs genaueste nachgeeicht waren, eingeschaltet, und zwar befand sich in der üblichen Weise das Amperemeter im Hauptstrom, während das Voltmeter im Nebenschluß lag (Fig. 1, *A* Amperemeter, *V* Voltmeter).

Als Thermometer verwandten wir ein von der Firma C. Richter, Berlin besonders genau hergestelltes Beckmann-Thermometer, das von der PTR. geeicht war. Besonderen Wert legten wir auf eine gut arbeitende Rührvorrichtung. Nach langem Herumprobieren entschlossen wir uns für den Heirichischen Heißluftmotor als Antriebsvorrichtung; um eine übermäßige Wärmestrahlung zu verhüten, mußte aber der Motor in gehöriger Entfernung vom Calorimeter aufgestellt werden. Eine außerhalb des Calorimeters angebrachte, einfache Führung garantierte ein reibungsloses Auf- und Abgleiten des Rührers. Dadurch, daß der Rührer seine Führung nicht in der Korkdeckeldurchbohrung erhielt, verhinderten wir eine lästige Steigerung der Rührwärme. Die Hubzahl des Rührers betrug durchschnittlich 70 pro Minute.

Ausführung der Messung.

Nachdem das Calorimeter mit einer abgewogenen Menge Flüssigkeit angefüllt war, wurde der Deckel mit dem Thermometer, dem Heizkörper und der Rührvorrichtung aufgesetzt. Der eine von uns las nun alle halben Minuten den Thermometerstand ab. Um die Trägheit der Quecksilbersäule zu überwinden, mußte in bestimmtem Rhythmus an das Thermometer geklopft werden. Natürlich übte die Nähe des Beobachters durch Wärmestrahlung einen Einfluß auf das Calorimeter aus.

¹⁾ Kohlrausch, Lehrbuch d. prakt. Physik, 12. Aufl., 724, 5.

Bei den früheren Arbeiten wurde diese Fehlerquelle wohl meistens durch Fernrohrablesungen ausgeschaltet, heutigentags ist es aber möglich, durch das weiter unten auseinanderzusetzende Verfahren den durch Wärmeaustausch mit der Umgebung entstandenen Fehler auf rechnerischem Wege zu eliminieren, wenn man nur dafür sorgt, daß eine gewisse Konstanz des Fehlers gewahrt bleibt. Aus diesem Grunde wurde die klopfende Hand festgelagert und der Beobachter bemühte sich, immer den gleichen Abstand vom Calorimeter beizubehalten.

Sobald das Calorimeter einen regelmäßigen Gang zeigte, d. h. sobald die Differenz zweier aufeinander folgenden Ablesungen nahezu konstant blieb, wurde die „Vorperiode“ abgeschlossen und mit der elektrischen Heizung begonnen. Dieser Aufgabe widmete sich der zweite Untersucher; der Strom wurde nach der Stoppuhr eine bestimmte Zahl von Sekunden, in der Regel 300, geschlossen; während dieser Zeit wurde aller Viertelminuten abwechselnd am Volt- und Amperemeter abgelesen (Hauptperiode). Nach der Öffnung des Stromes liest der erste Beobachter so lange am Thermometer noch ab, bis wieder ein regelmäßiger Gang eintritt, der eine Weile beobachtet wird (Nachperiode). Die durch die Heizung hervorbrachte Temperaturerhöhung betrug bei 5 Minuten Heizdauer rund 0,5 Grad. Von den Spezialisten auf dem Gebiet der Calorimetrie wird auch allgemein empfohlen, nicht zu stark zu heizen, sondern lieber ein recht empfindliches Thermometer zu benutzen.

Berechnung der durch die Heizung erzielten Temperaturerhöhung.

Es ist natürlich nicht angängig, einfach diejenige Temperatursteigerung der Berechnung zugrunde zu legen, die man erhält, wenn man die Differenz zwischen den am Ende und am Anfang der Heizung abgelesenen Temperaturgraden bildet. Denn es dauert eine gewisse Zeit, bis die Wärme aus dem Heizkörper herauskommt; der Draht sitzt auf dem die Wärme schlecht leitenden Ebonit und ist durch eine dünne Luftschicht von der die Wärme gut leitenden Messinghülse getrennt. Ferner spricht das Thermometer infolge seiner Trägheit nicht momentan auf Temperaturänderungen an und vor allem macht

sich der Wärmeaustausch mit der Umgebung störend bemerkbar. Nun gab bekanntlich Rumford einen Kunstgriff an, der bis zu einem gewissen Grade diesen Fehler eliminiert; für unsere Zwecke ist aber dieses Verfahren, nicht genau genug¹⁾.

Würde weder durch Rührung noch durch die Nähe des Beobachters Wärme in das Calorimeter hineingelangen, so würde die Temperatur, der das calorimetrische System zustrebt (Konvergenztemperatur), die Temperatur der Umgebung sein. Tatsächlich liegt die Konvergenztemperatur ein wenig höher. Solange die Calorimetertemperatur tiefer ist als die Konvergenztemperatur, wird Wärme von außen aufgenommen, sobald sie höher ist, wird Wärme abgegeben.

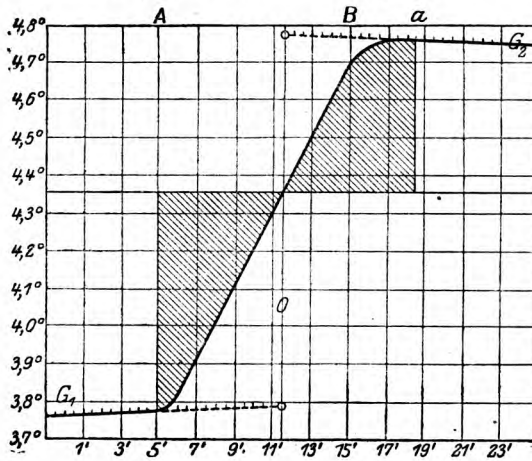


Fig. 3.

Diese Verhältnisse lassen sich graphisch veranschaulichen. In Fig. 3 sind auf der Abszisse die Zeit von 2 zu 2 Minuten, auf den Ordinaten die zu den jeweiligen Zeiten gehörigen Temperaturgrade aufgetragen. Bei A beginnt die Heizung, und das Thermometer folgt relativ schnell, aber aus den schon angeführten Gründen nicht momentan der Temperatursteigerung des calorimetrischen Systems; bei B wird die Heizung

¹⁾ Siehe Roth, Physikal.-chem. Übungen, 1907, 53. Rumfordscher Kunstgriff: „Anfangstemperatur ebensoviel unter (über) der Zimmertemperatur, wie die Endtemperatur (nach erfolgter Reaktion) über (unter) der Temperatur der Umgebung.“

abgebrochen, aber trotzdem steigt die Temperaturkurve noch weiter an, um ein flaches Maximum zu durchlaufen und dann in den negativen Gang überzugehen. Erinnern wir uns des Newtonschen Gesetzes des Wärmeausgleiches, so wird uns der Verlauf der Kurve verständlich sein.

Zwischen 4,3 und 4,4 liege die Konvergenztemperatur. Das unterhalb derselben befindliche, schraffierte Flächenstück ist, wie eine einfache, mathematische Überlegung lehrt, proportional der Wärmemenge, die in das System hineingelangt, das andere, oberhalb der Konvergenztemperatur befindliche Flächenstück würde der Wärmemenge entsprechen, die vom Calorimeter nach außen abgegeben wird.

Natürlich muß durch gleichmäßige Rührung dafür gesorgt werden, daß die am Thermometer abgelesene Temperatur möglichst gleich der wirklichen Temperatur des calorimetrischen Systems ist.

Der positive oder negative Wärmeaustausch mit der Umgebung ist in jedem Moment proportional der Differenz von Calorimeter- und Konvergenztemperatur. Um den gesamten Wärmeaustausch berechnen zu können, muß der Temperaturverlauf möglichst genau festgelegt werden. Durch besondere Versuche hat Roth¹⁾ gefunden, daß es bei guter Rührung und einem nicht zu kleinen Wasserwert genügt, wenn die Temperatur aller halben Minuten abgelesen wird. Man muß also die Werte für den Wärmeaustausch für die einzelnen Ableseintervalle ($\frac{1}{2}$ Min.) summieren. Zu jeder Temperatur gehört ein bestimmter Gangwert. Würde man diesen Wert zu jeder Temperatur, die in der Hauptperiode abgelesen worden ist, kennen, so würde die Summierung der positiven oder negativen Gangwerte direkt den Wärmeaustausch ergeben. Nach Roth²⁾ läßt sich diese Methode mit dem Rechenschieber leicht durchführen.

Bequemer und fast ebenso genau kommt man auf folgendem Wege³⁾ zum Ziel. Während der Heizperiode ist die Temperatursteigerung ziemlich regelmäßig; in den darauf fol-

¹⁾ Roth, Liebigs Annal. 373, 256, 1910.

²⁾ Roth, l. c. 254.

³⁾ Roth, Liebigs Annal. 407, 114, 1914.

genden Intervallen weicht die Temperatur nur wenig von derjenigen der Nachperiode ab, so daß für die letzten Intervalle der Hauptperiode ohne weiteres der Gang der Nachperiode einzusetzen ist. Solange die Temperatur regelmäßig steigt, d. h. während des eigentlichen Heizens, setzt man für die Hälfte der Zeit den Gang der Vorperiode, für die andere denjenigen der Nachperiode ein. Ein Zahlenbeispiel mag das Gesagte erläutern.

Vorperiode	Gang	Hauptperiode	Nachperiode	Gang
1,3975		Beg. d. Hzg. 1,4110	1,9005	
1,3980		1,4370	1,9010	
1,3985	+ 0,00049	1,4880	1,9020	+ 0,00015
1,3995		1,5330	1,9025	
1,3995		1,5800	1,9025	
1,4000		1,6300	1,9025	
1,4005		1,6800	1,9025	
1,4010		1,7270	1,9020	
1,4015		1,7800	1,9020	
1,4020		Ende d. Hzg. 1,8300	1,9020	
		1,8650		
		1,8820		
		1,8915		
		1,8965		
		1,8995		

Berechnung von Gang 1, unter gleichmäßiger Benutzung aller Werte¹⁾.

9	7	5	3	1
4020	4015	4010	4005	4000
— 3975	— 3980	— 3985	— 3995	— 3995
45	35	25	10	5
45 · 9 = 405	81			
35 · 7 = 245	49			
25 · 5 = 125	25			
10 · 3 = 30	9			
5 · 1 = 5	1			

$$\frac{810}{165} = 4,909, \text{ mithin Gang} = + 0,00049$$

Der Gang 2 wurde in analoger Weise zu + 0,00015 berechnet.

Wir verwenden nun nach dem Gesagten für $10/2 = 5$ In-

¹⁾ Über die dem Verfahren zugrunde liegende Formel findet sich Näheres bei Kohlrausch, Lehrb. d. prakt. Physik, 12. Aufl., S. 16.

tervalle den ersten Gang, für die übrigen Intervalle den zweiten Gang, also

$$\begin{array}{r} 5 \cdot + 0,00049 = 0,00245 \text{ Hauptperiode} \\ 5 \cdot + 0,00015 = 0,00075 \text{ —} \\ 6 \cdot + 0,00015 = 0,00090 \text{ Nachperiode} \\ \hline 0,00410 \end{array}$$

oder, da nur halbe Tausendstel Grade abgelesen werden konnten, so beträgt die anzubringende Korrektur 0,0040.

Nun ist von dem ersten Werte der Nachperiode der letzte Wert der Vorperiode abzuziehen:

$$\begin{array}{r} 1,9005^0 \\ - 1,4010^0 \\ \hline 0,4985^0 \text{ und von dieser unkorrigierten Temperatur der be-} \\ - 0,0040^0 \text{ rechnete Korrekturfaktor in Abzug zu bringen.} \\ \hline 0,4945^0 \end{array}$$

Eine genaue Berechnung durch Integration mit dem Rechenschieber¹⁾ ergab eine Korrektur von 0,0045, die mit der von uns gefundenen fast identisch ist.

Die im Heizkörper entstandenen Wärmemengen berechnen wir aus den Mittelwerten der abgelesenen Volt- und Amperezahlen. Nun müssen wir den durch das Voltmeter abgezweigten Strom berücksichtigen. Sei w_1 der Widerstand des Voltmeters, w_2 die Summe der Widerstände im Hauptstromkreise, so ergibt sich durch eine einfache Berechnung als Korrektionsglied₂

$$\frac{w_1}{w_1 + w_2}$$

w_1 bestimmten wir zu 4451,59, w_2 zu 52,25 Ohm.

Berücksichtigen wir noch, daß 1 Joule = 0,2387 cal ist²⁾, und führen wir aus Gründen der einfacheren Rechnung den reziproken Wert dieser Zahl 4,189 ein, so erhalten wir für den Wasserwert folgende Formel

$$Ww = \frac{\text{Volt} \times \text{Ampere} \times \text{Korrektionsglied}_2 \times \text{Sek. Heizdauer}}{4,189 \times \text{Temperaturerhöhung}}$$

In prinzipiell gleicher Weise wird der Wasserwert mit Serum- und Blutfüllung bestimmt.

¹⁾ Roth, l. c.

²⁾ Luther und Scheel, Verhdl. d. Deutsch. Physik. Ges. 10. 584 (1908).

Wir hatten das Calorimeter mit 520 g Wasser beschickt; als Durchschnittswasserwert erhielten wir die Zahl 563,9; ziehen wir von dieser Zahl 520 ab, so erhalten wir den Wasserwert von Calorimetergefäß + Rührer + Heizkörper + Thermometer = 43 : 9. Ist der für Serum gefundene Mittelwert = 536,1, so gilt folgende Beziehung

$$\frac{\text{spez. Wärme Serum}}{\text{spez. Wärme Wasser}} = \frac{536,1 - 43,9}{563,9 - 43,9} = \frac{492,2}{520,0} = 0,9466.$$

Die Versuchsergebnisse.

Es wurden im ganzen 16 Bestimmungen mit Wasserfüllung ausgeführt, drei davon wurden aber ausgeschieden, da sich bei diesen im Verlauf der Berechnung Ungenauigkeiten in den Volt- und Amperezahlen herausstellten. Das Mittel dieser 13 Bestimmungen ergab $Ww = 563,9$. Die Unsicherheit U dieses Mittelwertes wurde nach der Formel¹⁾

$$U = \sqrt{\frac{\sum \Delta^2}{n(n-1)}}$$

berechnet, wobei Δ die Abweichung vom Mittelwert, n die Zahl der Messungen ist, U_{Wasser} betrug 0,306.

An Serum wurden 15 Messungen ausgeführt; sie ergaben im Mittel einen Wasserwert $W_{\text{Serum}} = 536,1$, wobei sich U_{Serum} zu 1,49 berechnete.

Aus 9 Messungen an defibriniertem Blut folgte $W_{\text{Blut}} = 523,1$ und $U_{\text{Blut}} = 1,95$.

Zu den Bestimmungen wurde nur frisches Rinderblut verwandt.

Wie man sieht, ist U bei Wasser sehr klein, hingegen wächst diese Zahl bei den Serum- und Blutbestimmungen. Da immer in der gleichen Weise gearbeitet wurde, so dürften diese Schwankungen wohl auf die schon von Bordier²⁾ beobachteten individuellen Veränderungen in der Zusammensetzung der Körperflüssigkeiten zu beziehen sein.

Aus diesen Daten berechneten sich die spezifischen Wärmen

¹⁾ Kohlrausch, Lehrb. d. prakt. Physik, 12. Aufl., S. 2.

²⁾ Bordier, l. c.

— Blut — 0,9216

— Serum — 0,9465

Auf den von einigen Autoren angegebenen Unterschied in der Wärmekapazität von arteriellem und venösem Blut soll eventuell in einer späteren Arbeit eingegangen werden.

Es gelten hier also ähnliche Verhältnisse, wie bei der Absorption von Gasen durch Blut und Serum. Der Wassergehalt bestimmt hier hauptsächlich ebenso die Größe der Wärmekapazität, wie dort das Absorptionsvermögen für Gase; je mehr er prozentualiter durch Beimengung von festen Bestandteilen herabgedrückt wird, um so geringer wird die Wärmekapazität.

Diese Tatsache gestattet uns, durch eine vielleicht etwas gewagte Extrapolation auf die spezifische Wärme des gesamten tierischen Organismus zu schließen. Wir setzen den Prozentgehalt an festen Bestandteilen im Blut = 21%, im Körper = 36% und im Serum = 9%; es würde sich dann die spezifische Wärme des Körpers zu 0,8 berechnen.

Ehe wir diese Arbeit abschließen, möchten wir nicht verfehlen, Herrn Professor Dr. W. Roth für die bewährten Ratschläge und für die mannigfache Unterstützung unseren ergebensten Dank aussprechen.

Über die Verbreitung von Fermenten im tierischen Organismus, die Gerbsäure und verwandte Stoffe spalten.

Von

Ernst Sieburg und Gustav Mordhorst.

(Aus dem Institut für Pharmakologie und physiologische Chemie der Universität zu Rostock.)

(Eingegangen am 1. Oktober 1919.)

Die ersten Angaben über das Verhalten der Gerbsäure bei Einführung in den tierischen Organismus stammen von Wöhler¹⁾, der über das Auftreten von Gallussäure im Hundeharn nach Darreichung von Tannin berichtet.

Exakte qualitative und quantitative Untersuchungen über Gerbsäure und Gallussäure im Tierkörper sind dann erst verhältnismäßig spät von Mörner²⁾ angestellt, der nach Einführung größerer Mengen (6 bis 8 g) Tannin bei Menschen und Hunden Gallussäure mittels qualitativer Reaktionen und ihrer Krystallform nachwies. Die ältere Angabe von Wöhler und Frerichs³⁾, daß dabei auch Pyrogallussäure gebildet würde, konnte von Mörner als irrig widerlegt werden. Sie gründete sich ausschließlich auf das Verhalten des Harns einem einzigen Reagens (Eisenoxydulsalz) gegenüber, und zwar sollte es mit Gallussäure keine, mit Pyrogallussäure dagegen eine blaue Färbung geben. Mit Lösungen reiner Gallussäure und Pyrogallussäure bei verschiedener Konzentration in Wasser und Harn experimentierend hat Mörner in ihrem Verhalten gegen eine frischbereitete Lösung von Eisenoxydulsalz keinen Unterschied bemerkt; in beiden Fällen stellte sich eine blauviolette Färbung ein.

Bei unsern eigenen diesbezüglichen Versuchen kamen wir zu dem gleichen Ergebnis wie Mörner; die blauviolette Färbung stellte sich allerdings bei der Gallussäure erst nach 2 bis

¹⁾ F. Wöhler, Tiedemanns Zeitschr. f. Physiol. 1, 140, 1824.

²⁾ C. Th. Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 16, 255, 1892.

³⁾ F. Wöhler und C. Frerichs, Liebigs Ann. d. Chem. 65, 335, 1848.

3 Minuten langem Stehen ein. Übrigens erscheint uns schon a priori der Übergang von Tannin in Form von Pyrogallussäure in den Harn aus dem Grunde unwahrscheinlich, weil Pyrogallol ein ziemlich erhebliches Blutgift ist und Methämoglobin bildet. Hier läge dann die paradoxe Tatsache vor, daß der Körper einen relativ ungiftigen Stoff in giftiger Form ausscheidet; zudem würden im Harn hiermit gleichzeitig Methämoglobin oder Zersetzungsprodukte desselben auftreten,

Die Frage, ob Gerbsäure unverändert in den Harn übergehen kann, ist bisher nicht einheitlich beantwortet worden.

In den Fällen Mörners war weder bei Menschen noch bei Hunden eine Spur von Gerbsäure zu entdecken, selbst dann nicht, wenn der Harn und damit auch die möglicherweise vorhandene Gerbsäure durch Einengen auf die 50fache Konzentration gebracht wurde, ein Resultat, das mit dem von Baumann¹⁾ und Stockmann²⁾ unter denselben Bedingungen erhaltenen übereinstimmt. Dagegen zeigten Experimente an Kaninchen von Stockmann und Lewin³⁾, daß auch unveränderte Gerbsäure neben mehr oder weniger Gallussäure mit dem Harn ausgeschieden wird. Dasselbe soll bei Darreichung von Gerbsäure in neutraler Verbindung, als Alkalitannat, auch für Hunde gelten. Bauer⁴⁾ dagegen fand selbst nach intravenöser Einführung bei Hunden niemals Gerbsäure im Harn und auch die ausgedehnten und sorgfältigen Untersuchungen von Rost⁵⁾ konnten dies Resultat nicht bestätigen.

Diese verschiedenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß diese Frage eine allgemein gültige Antwort gar nicht erhalten kann, indem nicht nur die Art der Versuchsobjekte und deren individuelle Verschiedenheiten, die zum Teil in der Ernährung liegen mögen, sondern auch die Form, in der die Gerbsäure dargereicht wird, das Resultat zu beeinflussen scheinen.

Die Ergebnisse der quantitativen Versuche Mörners sind abgesehen davon, daß sie über die Biochemie des Tannins weitgehend aufklärend, auch aus dem Grunde besonders interessant, weil sie uns Vorstellungen geben können über die Art der Wirkungen von Gerbstoffen als Darmadstringentien. Nach anfänglicher Einnahme von 2 g Tannin konnte weder in der

¹⁾ E. Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 1, 263, 1877.

²⁾ R. Stockmann, Brit. med. Journ. 2, 1077, 1887.

³⁾ L. Lewin, Virchows Archiv 81, 74, 1880.

⁴⁾ V. Bauer, Beiträge zur Kenntnis des Tannins und einiger verwandter Substanzen. Inaug.-Dissertation Dorpat 1896.

⁵⁾ E. Rost, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 38, 346, 1897.

24stündigen Harnmenge im ganzen noch in den einzelnen Portionen auch nur eine Spur von Gallussäure aufgefunden werden. Keinen wesentlichen Unterschied boten Versuche mit der doppelten Menge Tannin: der Gehalt des Harns an Gallussäure war gleich Null. Erst nachdem die eingenommene Gerbsäuremenge bis auf 8 g gesteigert war, trat Gallussäure in erwähnenswerter Quantität im Harn auf. Auffällig dabei war nur, welcher unbedeutender Bruchteil der eingenommenen Gerbsäure — es ergaben sich 0,5 bis 1% derselben — in den Harn als Gallussäure übergetreten war.

Hier lag die Möglichkeit am nächsten, daß die Gerbsäure mit den im Magen und Dünndarm vorhandenen Eiweißstoffen unresorbierbare Verbindungen eingegangen war und dann mit den Faeces ausgeschieden wurde. Dieser Annahme zufolge sollte die Resorption unbehinderter vor sich gehen und die Ausscheidung durch den Harn erheblicher sein, wenn die Gerbsäure in den leeren Mastdarm appliziert wurde. Da ein solcher Selbstversuch Mörners ein negatives Ergebnis hatte, untersuchte er die Faeces nach Einnahme verschieden großer Mengen Tannin per os, ohne daß Gerbsäure oder Gallussäure darin nachgewiesen werden konnten, womit die Annahme, daß die Gerbsäure mit dem Darminhalt den Körper verläßt, als unrichtig erwiesen war.

Gallussäure verhält sich anders wie Tannin. Sie erscheint nach Eingabe von 2 g zu etwa 20%, von 4 g mit etwa 30% im Harn, während Tannin bei gleichen Dosen keine nachweisbaren Mengen und erst bei Gaben von 8 g eine höchstens 1% der eingenommenen Dose entsprechende Gallussäuremenge liefert. Bezüglich der Ausscheidung mit dem Darminhalt verhalten sich Gerbsäure und Gallussäure identisch, d. h. auch von letzterer läßt sich keine Spur in den Faeces mehr nachweisen.

Die Erklärung, die Mörner für das Verhalten der beiden Stoffe gibt, ist folgende: In den Magen und oberen Teil des Dünndarms gelangend geht die Gerbsäure mit Eiweißstoffen schwer lösliche Verbindungen ein, aus denen sie, weiter in den Darm heruntergerückt, bei der dort herrschenden alkalischen Reaktion allmählich freigelassen wird. Also allmählich zur Resorption gelangend, tritt sie, ob als Gerbsäure oder schon in Gallussäure umgewandelt, steht dahin, nur in kleiner Menge und während einer längeren Zeitdauer in das Blut über, was

ihre relativ vollständige Verbrennung begünstigen muß. Anders steht es mit der Gallussäure. Da sie keine Neigung besitzt, mit Eiweiß schwerlösliche Verbindungen einzugehen, unterliegt sie einer schnellen Resorption und tritt im Blut in bedeutenden Mengen auf, so daß einem relativ größeren Teile, vor Verbrennung geschützt, Gelegenheit gegeben wird, durch die Nieren ausgeschieden zu werden.

Durch Versuche, die Straub¹⁾ mit Hamamelitannin, einem chemisch dem Galläpfeltannin nahestehenden Körper, anstellte, die ganz ähnliche Ergebnisse zeitigten wie die Mörnernschen Versuche, gewinnt die Hypothese von letzterem an erhöhter Wahrscheinlichkeit.

Uns lag daran, die Umwandlung der Gerbsäure in Gallussäure im Organismus örtlich zu verfolgen. Dabei wurde die charakteristische Eigenschaft der Gerbsäure, zu „gerben“, d. h. mit in flüssigem Zustand befindlichen Eiweißsubstanzen dem Auge ohne weiteres sichtbare Verbindungen einzugehen, als Nachweismethode verwandt. Wir benutzten dabei eine stets frisch bereitete 1^o/₁₀ige Gelatinelösung, die mit Tanninlösungen einen flockigen Niederschlag von weißlicher Farbe gibt. Die Grenze der Brauchbarkeit dieser Reaktion liegt etwa bei einer 0,05^o/₁₀igen Tanninkonzentration, d. h. in einer größeren Verdünnung als 1:2000 kann Gerbsäure mit Gelatine nicht mehr einwandfrei nachgewiesen werden. Die Reaktion muß dabei neutral sein; denn ein Tropfen Mineralsäure bringt den Tannin-Gelatineniederschlag zum Verschwinden. — Gallussäure, der die gerbenden Eigenschaften abgehen, gibt mit Gelatine keine Reaktion.

Ganz ähnlich wie Eiweißkörper reagieren mit Tannin andere stickstoffhaltige Substanzen, vornehmlich die Alkaloide. Wir benutzten eine wäßrige Lösung von salzsaurem Chinin (1:75), die sich als außerordentlich empfindliches Reagens erwies und das Tannin noch in einer Verdünnung von 1:20000, also 10mal schärfer als Gelatine, deutlich nachwies. Bei Konzentrationen des Tannins von weniger als 1:10000 tritt dieser Niederschlag sofort auf. Zusatz von einer Spur Säure löst die Trübung auf. Mit Gallussäure gibt Chininlösung keine Reaktion. Es wurden auch einige Male Versuche mit 1^o/₁₀igen Lösungen von Morphin, Novocain und Berberin angestellt, doch erwiesen sich diese Alkaloide als weit weniger brauchbar zum Nachweis des Tannins als das Chinin, indem sie verschiedentlich dort,

¹⁾ W. Straub, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 42, 1, 1899.

wo die Chinin- und sogar die Gelatinereaktion noch deutlich das Vorhandensein von Gerbsäure anzeigten, gar keine, oder doch kaum verwertbare Reaktionen hervorriefen. Ihre Grenze entspricht etwa der Gelatine.

Zum Nachweis der Gallussäure wurde die gewöhnliche schwach saure verdünnte Eisenchloridlösung benutzt. Diese reagiert natürlich auch mit Tannin, d. h. in beiden Fällen tritt die bekannte schwarzblaue oder schwarzgrüne Farbe auf. Wenn also in unseren Versuchen neben der positiven Eisenchloridreaktion auch die Reaktion mit Chinin oder Gelatine positiv ist, so bedeutet dies, daß noch ungespaltenes Tannin zugegen ist; ob daneben auch schon Gallussäure vorhanden ist, ist hiernach nicht zu entscheiden. Wenn dagegen nur Eisenchlorid reagiert, nicht aber Chinin oder Gelatine, so wollen wir als sicher gelten lassen, daß nur Gallussäure zugegen ist. Letztere wird durch die Eisenchloridreaktion noch in einer Verdünnung von 1:30000 deutlich nachgewiesen.

Lokalisation der Spaltung des Tannins.

Um nun der Lokalisation der im Organismus vorhandenen tanninspaltenden Fermente nachzugehen, wurden die Versuche derart angesetzt, daß zunächst systematisch die Zellauszüge bzw. die Zellen untersucht wurden, die das Tannin bei der Einführung per os auf seiner Wanderung durch den Verdauungstraktus passieren mußte. Die Gemische blieben eine gewisse Zeit im Thermostaten bei 37° stehen und wurden nach der Herausnahme sofort untersucht. Stets wurde in jedem Einzelfalle daneben eine Kontrolle angesetzt. Das Material, soweit es menschliche Organe betraf, aus dem pathologischen Institut, wurde gleich nach der Entnahme verarbeitet. Als Tanninstammlösung diente eine stets frische 1%ige Lösung von acidum tannicum purissimum „Merck“.

1. Speichel.

Es wurden 4 Röhren angesetzt und 24 Stunden bei 37° belassen:

- | | | | | | | |
|----|-------|-------|------|---------|----------------------|----------------------------------|
| 1. | 4 ccm | 0,9% | NaCl | + 1 ccm | Tanninlösung (10 mg) | als Kontrolle, |
| 2. | 3 " | 0,9 " | " | + 1 " | " | + 1 ccm Speichel, |
| 3. | 3 " | 0,9 " | " | + 1 " | " | + 1 " " einer
anderen Person, |
| 4. | 2 " | 0,9 " | " | + 2 " | " | + 2 " Speichel. |

Glas 1 gab bei Zusatz von Gelatine keinen voluminösen Niederschlag wie bei Beginn des Versuches, sondern nur eine starke weißliche Trübung. Bei Prüfung durch Chininzusatz zeigte sich ebenfalls, daß die im Wärmeschrank gehaltene Mischung einen wesentlich geringeren Niederschlag lieferte als die frisch hergestellte. Daraus ergibt sich, daß Tanninlösung bei 24stündigem Stehen bei 37°, auch wenn sie nicht bakteriell zersetzt ist, schon eine, wenn auch geringe Aufspaltung zu Gallussäure erleidet (durch das Alkali des Glases?), wodurch beide Reaktionen abgeschwächt werden. Immerhin ist aber sowohl für die Gelatine- als auch für die Chininreaktion eine gewisse Menge Tannin erkennbar.

Das wasserklare Filtrat von Glas 2 ergibt nach der gleichen Zeit untersucht, mit Gelatine dasselbe Resultat wie die Kontrolle, d. h. eine starke Opaleszenz. Die Chininprobe bringt einen reichlichen Niederschlag hervor. Es scheint also keine Spaltung durch den Speichel hervorgerufen zu sein. Glas 3 ergibt dieselben Resultate wie Glas 2, und Glas 4, in dem die doppelte Menge Tannin enthalten war, zeigte, wie zu erwarten war, starke Fällungsreaktion mit Gelatine und Alkaloiden. Sämtliche Reagenzien gaben natürlich mit Speichel an sich keine Reaktion.

Ergebnis: Speichel vermag auch nach 24stündigem Aufenthalt in der Wärme eine nennenswerte Spaltung des Tannins nicht hervorzubringen.

2. Magen.

Bevor wir die Magenschleimhautzellen selbst auf ihr Spaltungsvermögen untersuchten, wurden 3 Röhrchen mit Pepsin „Witte“ (1%), mit Salzsäure (0,3%), sowie mit Pepsin + Salzsäure angesetzt. Die nach 24 Stunden vorgenommenen Proben ergaben für Pepsin ein völlig negatives Resultat. Mit der Salzsäure verhielt es sich dagegen anders. Eine Probe wurde bereits nach 2 Stunden aus dem Thermostaten herausgenommen und neutralisiert. Sie ergab eine stark positive Gelatine- sowie Chininreaktion; nach 24 Stunden war jedoch die Probe mit Gelatine gleich Null und die mit Chinin nur sehr schwach; Eisenchlorid gab sofort intensive Blauschwarzfärbung.

Wir sind infolgedessen wohl berechtigt anzunehmen, daß die Salzsäure in der physiologisch im Magen vorkommenden Konzentration bei längerem Kontakt das Chinin spaltet.

Pepsin + Salzsäure zusammen ergab keinen Unterschied im Resultat gegen Salzsäure ohne das Ferment.

Das erwähnte Material an sich, d. h. ohne Tanninzusatz, ergab weder mit Gelatine noch mit Alkaloiden, noch mit Eisenchlorid irgendwelche Reaktion. Nun wurden Magenschleimhautzellen selbst angesetzt. Sie wurden durch einfaches Abschaben der gesamten Magenschleimhaut mit dem Rücken eines Präpariermessers gewonnen und mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen bis sie ganz weiß erschienen und die darüberstehende Flüssigkeit farblos war. Von diesen Zellen wurde eine Aufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Die Ver-

Tabelle

Angesetztes Material	Menge	Menge des Tannins mg	Aufenthalt in der Wärme Stunden	Reaktion der Kontrolle
1. Duodenumzellauszug vom Menschen	10 ccm	10	2	Stark positive Gelatine- und Chininreakt.
2. Jejunumzellauszug v. Menschen	10 ccm	10	2	Wie oben
3. Ileumzellauszug vom Menschen	a) 10 ccm	10	24	} Mit Gelatine keine, mit Chinin abgeschwächte Reaktion
	b) 15 ccm	10	24	
	c) 20 ccm	10	24	
	d) 10 ccm	10	2	} Stark positive Gelatine- und Chinin-Reakt.
	e) 15 ccm	10	2	
4. Ileumzellauszug vom Meerschweinchen	a) 5 ccm	10	1/2	} Stark positive Gelatine- und Chinin-Reakt.
	b) 5 ccm	10	1	
5. Ileumzellen vom Menschen	a) 1 ccm in 4 ccm phys. Kochsalzlösung suspendiert	10	24	Trübung mit Gelatine, Niederschlag mit Chinin
	a) wie a)	10	1/2	} Starke Chinin- u. Gelatinereakt. Wie a)
	c) wie a)	50	24	
	d) wie a)	10	2	} Starke Chinin- u. Gelatinereakt.
	e) wie a)	20	2	
	f) 2 ccm in 3 ccm phys. Kochsalzlösung suspendiert	10	1	
6. Dünndarmzellen vom Frosch	1 ccm in 4 ccm phys. Kochsalzlösung susp.	10	1	Starke Chinin- u. Gelatinereakt.

I.

Reaktion des zu untersuchenden Gemisches	Art des von den Zellen adsorbierten Gerbstoffes	Bemerkungen
Mit Gelatine keine, m. Chinin geringe Reakt., mit Eisenchlorid Dunkelfärbung	—	
Mit Gelatine und Chinin keine Spur von Reaktion, mit Eisenchlorid intensive Dunkelfärbung	—	
<p>Mit Gelatine in allen drei Fällen keine Reaktion, mit Chinin reagiert</p> <p>a) und b) schwach</p> <p>c) gar nicht</p> <p>d) mit Gelatine keine, mit Chinin sehr schwache Reaktion</p> <p>e) Gelatine und Chininreaktion völlig negativ</p> <p>FeCl₃ gibt Blauschwarzfärbung</p>	—	Bei a) bis c) ist das Resultat beweisunkräftig, da die Kontrolle bereits weitgehend gespalten ist
<p>a) mit Gelatine nur Opaleszenz, kein Niederschlag, m. Chinin flockig. Niederschlag</p> <p>b) Chinin- und Gelatinereaktion negativ</p>	—	Der Versuch mit Glas a) wurde noch zweimal mit genau demselben Resultat wiederholt
<p>a) mit Gelatine und Chinin keine Reaktion, FeCl₃ stark positiv</p> <p>b) Gelatine und Chinin gibt leichte Trübung</p> <p>c) starke Fällung mit Gelatine und Chinin</p> <p>d) völlig negative Gelatine- und Alkaloidreaktion</p> <p>e) Gelatinereaktion negativ, Chininreaktion deutlich positiv</p> <p>f) sämtliche Reaktionen auf Tannin negativ, FeCl₃ positiv</p>	<p>Gallussäure</p> <p>—</p> <p>Tannin</p> <p>—</p> <p>war nicht sicher zu ermitteln</p> <p>war nicht zu entscheiden, da es nicht gelang, durch Alkali genügend Gerbstoff in Lösung zu bringen</p>	
Stark positive Chinin- und Gelatine-Reaktion	—	Mit gleichem Resultat wiederholt

suche wurden mit menschlichen Magenzellen und solchen von Fröschen angestellt.

Da, praktisch genommen, die Aufenthaltszeit im Magen nur eine kurze ist, so wurden die Röhren bereits nach 2 Stunden aus der Wärme herausgenommen. Die Kontrolle ergab mit Gelatine und Chinin sofort einen flockigen Niederschlag, ein Beweis, daß das Tannin nicht zerstört worden war. Das klare Filtrat beider Magenzellenarten ergab aber ebenfalls eine starke Tanninreaktion. Ein kleiner Teil der auf dem Filter stehenden Zellen wurde nun mit Eisenchlorid zusammengebracht und ergab eine intensive Schwarzblaufärbung. Das bedeutete, daß ein nicht unbeträchtlicher Teil des Gerbstoffes von den Zellen adsorbiert worden war, und es galt zu ermitteln, in welcher Form derselbe vorlag, ob als Gerbsäure oder bereits in Gallussäure übergeführt. A priori mußte man nach dem Ausfall der Reaktion des in Lösung befindlichen Gerbstoffes annehmen, daß ungespaltenes Tannin vorhanden sei. Zu diesem Behuf wurden die auf dem Filter befindlichen Zellen sauber gewaschen, bis in der durchfiltrierten Waschflüssigkeit die Eisenchloridreaktion negativ geworden war. Nun wurden die Zellen mit 5 ccm warmer $\frac{1}{100}$ -Natronlauge versetzt und nach einigen Minuten dieser Auszug filtriert. War der Gerbstoff an die Zellen verankert, so war zu erwarten, daß das Alkali die Verankerung aufheben und ihn wieder löslich machen würde. Das Filtrat mußte also nach Neutralisierung chemisch die Entscheidung liefern, ob es Gerbsäure oder Gallussäure enthielt. Die stark positive Eisenchloridreaktion ergab zunächst, daß überhaupt mit Eisenchlorid reagierender Stoff durch das Alkali in Lösung gegangen war, die ebenfalls sehr deutliche Fällung mit Gelatine und Alkaloiden zeigte, daß wir tatsächlich, wie erwartet, ungespaltenes Tannin vor uns hatten. Die nach der Extraktion mit Alkali auf dem Filter befindlichen Zellen gaben beim Übergießen mit Eisenchlorid noch die typische Tintenreaktion, ein Beweis, daß ein immerhin nennenswerter Teil des Gerbstoffes noch an den Zellen haftete.

Ergebnis: Die Magenschleimhautzellen von Menschen und Fröschen sind nicht imstande in der physiologisch in Betracht kommenden Zeit eine Spaltung des Tannins herbeizuführen. Ob durch einen längeren Kontakt der Zellen mit der Gerbsäure diese in Gallussäure übergeführt wird, steht dahin, ist jedoch nach dem Ergebnis der Versuche mit 0,3%iger Salzsäure bis zu einem gewissen Grade anzunehmen.

3. Dünndarm.

Die Dünndarmzellen wurden ihren verschiedenen Funktionen entsprechend gesondert untersucht, und zwar Duodenum, Jejunum und Ileum für sich. Es wurden Zellen und Zellauszüge angesetzt. Letztere wurden, auch in allen folgenden Versuchen so gewonnen, daß die Organe geschabt bzw. gut zerkleinert wurden und der Brei mit physiologischer

Kochsalzlösung unter Zugabe von 1 bis 2 Tropfen Terpentinöl oder Formalin oder Wasserstoffsuperoxyd zur Konservierung versetzt wurde. Die Mischung blieb bei Zimmertemperatur 12 bis 24 Stunden stehen. Gesonderte Versuche mit genannten Konservierungsmitteln zeigten, daß diese keinen Einfluß auf das Tannin hatten. Zur Ermittlung des von den Zellen adsorbierten Gerbstoffs wurde hier wie auch später die oben beschriebene Extraktion mit $\frac{1}{100}$ -Natronlauge vorgenommen.

Versuche und Ergebnisse siehe Tabelle I.

Ergebnis: Man gewinnt den Eindruck, daß alle drei Arten von Darmzellen des Menschen ein tanninspaltendes Ferment enthalten, das beim Aufenthalt in der Wärme seine Tätigkeit entfaltet; denn es tritt in allen Versuchen eine Spaltung der Gerbsäure ein. Auch im Röhrchen 5c ist beim Vergleich mit den übrigen Versuchen eine teilweise Zerstörung des Tannins anzunehmen, nur ist die zugesetzte Menge von 50 mg für 1 ccm Zellsubstanz zu groß. Das Untersuchungsergebnis für die Röhrchen 5a und 5c, die beide 24 Stunden im Thermostaten standen, verliert dadurch etwas an Beweiskraft, daß auch die zugehörigen Kontrollen ihre Zusammensetzung, wenn auch im geringeren Grade, nach dieser Zeit geändert haben, so daß Gelatine nur eine Trübung, aber keinen Niederschlag mehr gibt, während dies bei der frisch hergestellten Mischung der Fall ist. Für die Folge wurde daher von einem 24stündigen Aufenthalt der Röhrchen in der Wärme abgesehen.

Die Dünndarmzellen des Frosches scheinen sich anders zu verhalten als die des Menschen, denn das Tannin zeigt beim Kontakt mit diesen Zellen nach 1stündigem Stehen im Wärmeschrank keine Veränderung.

4. Dickdarm.

Von 2 Röhrchen mit je 6 ccm 0,9% NaCl + 2 ccm Tanninlösung (20 mg) + 2 ccm Zellenbrei der Schleimhaut von menschlichem Colon transversum bleibt das eine mit der zugehörigen Kontrolle von 20 mg Tannin in 10 ccm Kochsalzlösung 1 Stunde lang bei 37°, das andere mit der Kontrolle bei Zimmertemperatur.

Bei der Prüfung mit Gelatine und Alkaloiden fand sich kein Unterschied im Verhalten der beiden Kontrollgläser, beide gaben die Tanninreaktion in gleich starkem Maße. Anders dagegen die beiden mit Zellen angesetzten Mischungen. Nach Filtration zeigte das bei Zimmertemperatur gehaltene Gläschen stark positive Gelatine- und Chininreaktion, während bei dem in der Wärme gehaltenen auf Zusatz von Gelatine, Morphin und Novocain keine Spur von Reaktion erfolgte, wohl aber auf Zusatz von Chinin eine deutliche Fällung das Vorhandensein von

Tabelle

Angesetztes Material	Menge	Menge des Tannins mg	Aufenthalt in der Wärme Stunden	Reaktion der Kontrolle
1. Leberzellauszug vom Menschen	a) 10 ccm	10	2	Gelatine- u. Chinin-Reaktion stark positiv
	b) 15 ccm	10	2	
2. Leberzellauszug vom Meerschweinchen	a) 5 ccm	10	2	Wie 1.
	b) 5 ccm	10	$\frac{1}{2}$	
3. Leberzell.v.Menschen, frisch	a) 1 ccm in 4 ccm phys. Kochsalzlös. suspendiert	10	$\frac{1}{2}$	Wie 1.
	b) wie a)	20	$\frac{1}{2}$	
	c) wie a)	40	$\frac{1}{2}$	
4. Leberzell.v.Menschen, frei von Hämoglobin, 4 Wochen alt, unter Formalin	a) 1 ccm in Kochsalzlös. suspendiert	10	$\frac{1}{2}$	Wie 1.
	b) wie a)	10	1	Wie 1.
5. Leberzellen v. Frosch	2 ccm in Kochsalzlös. suspendiert	10	1	Stark positiv. Gelatine- u. Chininreaktion
5a) Leberzellen v. Frosch ¹⁾	4 ccm in Kochsalzlös. suspendiert	10	$\frac{1}{2}$	Stark positiv. Gelatine- u. Chininreaktion
6. Trypsinlög. „Merck“ (1 $\frac{0}{0}$), schwach alkalisch gemacht	1 ccm mit 3 ccm Kochsalzlös. aufgefüllt	10	1	Wie 5.
7. Pankreaszell., Mensch.	a) in neutraler Kochsalzlös. suspendiert	10	1	Wie 5.
	b) u. c) in schwach alkalischer Kochsalzlös. suspendiert	10	2	
	c) 1 ccm	10	3	

¹⁾ Der nach der Filtration zu untersuchende Auszug zeigte durch kogen bedingt war, ließ sich durch die Jod-Jodkaliprobe nachweisen; es Die Anwesenheit des Glykogens bewies übrigens zugleich, daß Fäulnis aus-

II.

Reaktion des zu untersuchenden Gemisches	Art des von den Zellen adsorbierten Gerbstoffes	Bemerkungen
Mit Gelatine und Chinin keine Spur von Reaktion, mit Eisenchlorid Schwarzfärbung	—	Der nach dem Filtrieren zurück- bleibende Niederschlag gibt nach 3 tägigem Waschen noch starke Tintenreaktion; dasselbe war der Fall beim Jejunum- und Ileumauszug; d. h. diese Auszüge enthielten gelöste Eiweißsubstanzen, die mit Tannin eine feste Ver- bindung bilden, die wasser- unlöslich ist. Ob Gerbsäure oder Gallussäure vorlag, war nicht zu entscheiden
Wie 1.	—	
} Wie 1. Mit Gelatine schwache, mit Chinin starke Reaktion	Gallussäure Gallussäure zum Teil noch Tannin	Alle 3 Versuche wurden mit gleichem Resultat wiederholt
Mit Gelatine und Chinin leichte Opalescenz; Mit FeCl ₃ Schwarzfärbung Mit Gelatine keine Reak- tion, mit Chinin leichte Opalescenz Mit FeCl ₃ Schwarzfärbung	— Gallussäure	
In beiden Fällen 5 und 5 a gab nur Eisenchlorid starke Reaktion, während die Tanninproben abso- lut negativ waren	5. Gallussäure 5 a) Gallussäure	Mit gleichem Resultat wiederholt
Siehe 5.	Gallussäure	
Die gleichen Reaktionen wie die Kontrolle		
In allen drei Fällen war die Gelatine-Reaktion nega- tiv, die Chininreaktion deutlich positiv; Eisen- chlorid färbte schwarz- grün	War nicht zu ermitteln, da es nicht gelang, durch Alkali den adsorbierten Gerbstoff in Lösung zu bekommen	

anwesendes Glykogen leichte Opalescenz. Daß letztere tatsächlich durch Gly-
erfolgte eine intensive gesättigte Rotbraunfärbung, die beim Kochen verschwand.
geschlossen war.

noch ungespaltenem Tannin anzeigte. — Der Auszug der mit Natronlauge extrahierten Zellen enthielt in beiden Fällen ungespaltene Gerbsäure, und zwar in so ansehnlicher Menge, daß sogar die Gelatine einen flockigen Niederschlag erzeugte.

Ergebnis: Im Hinblick auf obige Versuche ist anzunehmen, daß im Dickdarm des Menschen ein Ferment vorhanden ist, das unter physiologischen Bedingungen eine gewisse Spaltungsfähigkeit für Tannin entfaltet, doch scheint die Wirksamkeit eine geringe zu sein, so daß sie praktisch nur bei Aufspaltung kleiner Mengen in Betracht kommen dürfte.

5. Leber und Pankreas.

Es wurden analog den vorhergehenden Versuchen Zellauszüge und Zellen geprüft, und zwar vom Menschen, vom Meerschweinchen und vom Frosch. Da die isolierten Leberzellen immer etwas Hämoglobin enthalten und der Leberzellenauszug dementsprechend rötlich gefärbt ist, wurden den Kontrollmischungen einige Tropfen Blut zugesetzt, bis die Färbung in beiden Gläsern gleich war. Die Einzelheiten der Versuche sind aus Tabelle II zu entnehmen.

Ergebnis: Nach diesen Versuchen ist zweifellos die Annahme berechtigt, daß die Leber des Menschen, des Meerschweinchens und des Frosches ein außerordentlich stark wirkendes tanninspaltendes Ferment enthält, das nach längerem Stehen bei Zimmertemperatur durch Wasser in Lösung zu be-

Tabelle

Angesetztes Material	Menge	Menge des Tannins mg	Aufenthalt in der Wärme Stunden	Reaktion der Kontrolle
1. Frische Milzzellen vom Menschen	2 ccm in Kochsalzlös. suspendiert	10	1	Tannin unverändert nachweisbar
2. Milzzellen v. Menschen, 2 Tage alt, unter Formalin	a) 1 ccm in Kochsalzlös. suspendiert	10	1	Tannin unverändert nachweisbar
	b) 2 ccm wie a)	10	1	
	c) 1 ccm in Kochsalzlös. suspendiert	10	3	
3. Frische Nierenzellen vom Menschen	5 ccm in Kochsalzlös. suspendiert	20	3	Tannin unverändert nachweisbar

kommen ist, wie die Resultate bei den Zellauszügen beweisen, das ferner, an die Zellen gebunden, eine viel intensivere Spaltungskraft besitzt als etwa dasjenige des Dünndarms, denn auch größere Mengen Tannin (Nr. 3b) fallen binnen $\frac{1}{2}$ Stunde einer restlosen Aufspaltung zu Gallussäure anheim. Erst unverhältnismäßig große Quantitäten (Nr. 3c) konnten in der gleichen kurzen Zeit nur zum Teil bewältigt werden. Auch mehrere Wochen alte unter Formalin stehende Leberzellen des Menschen entfalten noch eine recht beachtenswerte Tätigkeit, wenn auch nach dem langen Aufbewahren nicht erwartet werden konnte, daß ihre Spaltungskraft ungeschwächt zutage treten würde (Nr. 4a und b). Ein überraschendes Resultat lieferten die Zellen des Pankreas. Von dieser Drüse, die mit die stärksten Fermente des Körpers produziert, mußte von vornherein die Fähigkeit, Gerbsäure zu spalten, angenommen werden. Der Erfolg war jedoch ein recht geringer. Sowohl in neutraler wie in schwach alkalischer Mischung trat nur eine geringfügige Spaltung ein, die auch um nichts vorwärts schritt, wenn die Röhren die doppelte und dreifache Zeit im Thermostaten blieben. Das käufliche Trypsin „Merck“ erwies sich als gänzlich inaktiv.

III.

Reaktion des zu untersuchenden Gemisches	Art des von den Zellen adsorbierten Gerbstoffes	Bemerkungen
Mit Gelatine u. Chinin keine Reaktion, m. Eisenchlorid Schwarzfärbung	Tannin	
Wie 1.	Tannin	
Chinin } fast negativ, aber Morphin } auch die Tintenreaktion } nur spurweise vorhanden	Tannin (siehe hierzu Text)	

6. Milz und Niere.

Wie aus Tabelle III ersichtlich ist, ergab sich für menschliche Milzzellen, daß der in Lösung befindliche Gerbstoff nur aus Gallussäure bestand, während der von den Zellen adsorbierte und anscheinend größere Teil noch ungespaltenes Tannin war. Eine, wenn auch nicht sehr beträchtliche Wirkung auf das Tannin kann daher den Milzzellen nicht abgesprochen werden. Im Gegensatz dazu verhält sich die Niere vollkommen passiv. Dies war aus Folgendem zu schließen. Das klare, ganz schwach rötlich gefärbte Filtrat gab nach Zusatz von Chinin so gut wie keine Reaktion, aber auch Eisenchlorid vermochte nur eine Spur Grünfärbung hervorzurufen. Die nach 48 Stunden vorgenommene Prüfung der mit Alkali extrahierten Zellen ergab als adsorbierten Stoff Tannin, denn sowohl die Chinin- wie Morphinreaktion war stark positiv, ebenso wie die mit Eisenchlorid. Diesen scheinbaren Widerspruch möchten wir so erklären, daß bei der Mischung von Nierenzellen und Tannin nahezu der gesamte Gerbstoff sofort von den Zellen adsorbiert wird; es bleibt nur ein so minimaler Teil in Lösung, daß er eben bloß noch durch die schärfere Eisenchloridreaktion nachgewiesen werden kann. Trotzdem oben also die Alkaloidreaktion negativ ausfiel, muß nach dem Ergebnis der mit Natronlauge ausgezogenen Zellen geschlossen werden, daß eine Zersetzung des Tannins in der Niere nicht stattfindet.

7. Blutserum.

Die Prüfung des menschlichen Blutserums, das bekanntlich etwa 8% Eiweiß enthält, machte zuerst einige Schwierigkeiten. Das Serum als solches gab mit Tannin sofort eine dicke Fällung. Verdünnung mit zwei Teilen physiologischer Kochsalzlösung erwies sich noch als unbrauchbar. Erst bei einem Gehalt von etwa 1% Eiweiß ergab das Serum ein brauchbares Filtrat. Es wurde nun folgender Vorversuch angesetzt:

5 ccm Blutserum vom Menschen im Verhältnis 1:7 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, wurden mit 0,5 ccm Tanninlösung versetzt, filtriert und nun versucht, das Tannin nachzuweisen. Von der Gelatinereaktion war von vornherein nichts zu erwarten, da das Tannin eine Bindung mit den Eiweißsubstanzen des Serums eingeht und aus derselben, wie leicht verständlich, nicht durch Gelatine gelöst werden kann. Die chemische Affinität des Tannins zu den Alkaloiden ist dagegen

größer als zum Eiweiß, und das leicht gelblich gefärbte, aber klare Filtrat nahm auf Chininzusatz sofort eine milchweiße Färbung an; nach wenigen Sekunden trat auch ein reichlicher Niederschlag auf; Eisenchlorid gab die typische Tintenreaktion.

Mit Serum allein gibt Chinin keine sichtbare Reaktion. Genau das gleiche Verhalten zeigt eine frisch bereitete 1%ige Eialbuminlösung; sie wurde daher in diesem Falle als Kontrolle benutzt, d. h. es mußte sich in ihr nach dem Stehen im Thermostaten das Tannin in ungespaltenem Zustande nachweisen lassen. Es wurden angesetzt:

1. 10 ccm Eialbuminlösung (1%) + 1 ccm Tannin (10 mg);
2. 10 ccm Blutserum (1:7) + 1 ccm Tannin.

Nach 3stündigem Stehen bei 37° ergibt nach Filtration Probe 1 mit Chinin Weißfärbung und deutlich feinflockigen Niederschlag, Probe 2 dagegen weder eine Weißfärbung noch gar einen Niederschlag, sie ist von dem chininfreien Filtrat in nichts zu unterscheiden. Die Eisenchloridreaktion ist stark positiv.

Mit Hinblick auf die große Verdünnung des Blutserums schließen wir daher, daß letzteres über ein stark wirkendes gerbsäureabbauendes Ferment verfügt.

8. Andere normale Körperbestandteile.

Von sonstigen Organen wurde noch geprüft: Placenta, Muskulatur und Gehirn; von Abscheidungsprodukten: Harn, Kuhmilch und Kuhmilchserum. Letzteres wurde dadurch gewonnen, daß aus Vollmilch durch etwas Salzsäure das Casein gefällt und das Filtrat wieder neutralisiert wurde.

Die einzelnen Versuche zeigt die Tabelle IV.

Ergebnis: Es entfalten Placenta, Vollmilch und Milchserum tanninspaltende Wirkung, während dieselbe in den Gehirnzellen nur in sehr beschränktem Maße anzunehmen ist. Quergestreifte Muskulatur und Harn bringen keine Zerlegung des Tannins hervor.

9. Pathologische Körperbestandteile.

Von hierher gehörigen Stoffen wurden Eiterzellen und Ascitesflüssigkeit untersucht, letztere war, ähnlich wie das Blutserum, nur verdünnt zu gebrauchen, und zwar in einer Konzentration 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung.

In einem Vorversuch wurden 2 ccm Ascitesflüssigkeit + 2 ccm 0,9% NaCl + 1 ccm Tanninlösung angesetzt, filtriert und sofort untersucht. Das filtrierte Gemisch besitzt ein grauweißes Aussehen, an dünne Gallerte erinnernd, ist aber, in dünner Schicht betrachtet, durchsichtig und frei von jedem Niederschlag. Bei Zusatz von einigen Tropfen Chi-

Tabelle

Angesetztes Material	Menge	Menge des Tannins mg	Aufenthalt in der Wärme Stunden	Reaktion der Kontrolle
1. Placentabreipulver vom Menschen, von Blut befreit, 10 Jahre alt	1 Messerspitze in Kochsalzl. suspend.	10	1	Starke Fällung m. den Tanninreagenzien
2. Placentazell., Mensch, frisch geschabt und längere Zeit gewaschen	1 ccm in Kochsalzl. suspend.	10	1	Wie 1.
3. Muskulatur, Mensch (Obliquus abd. exter.), frisch geschabt und gewaschen	2 ccm in Kochsalzl. suspend.	10	2	Wie 1.
4. Gehirnzellen, Mensch, frisch	2 ccm in Kochsalzl. suspend.	10	1	Wie 1.
5. Harn, eigener, sofort post mictionem angesetzt	a) 10 ccm b) 15 ccm	10 10	1 1	Wie 1.
6. Vollmilch (Kuh)	4 ccm	10	1	Wie 1.
7. Milchserum (Kuh)	4 ccm	10	1	Wie 1.

ninlösung färbt sich das Ganze sofort milchweiß und es entsteht nach etwa 10 Sekunden ein deutlicher, kleinflockiger Niederschlag. Mit Eisenchlorid gibt das Filtrat sofort Schwarzblaufärbung. Ascitesflüssigkeit ohne Tannin reagiert mit Chinin nicht.

Es wurden nun angesetzt:

10 ccm Ascitesflüssigkeit (1:1) + 1 ccm Tanninlösung (10 mg) und 3 Stunden im Thermostaten belassen. Eine zweite Probe gleicher Zusammensetzung blieb als Kontrolle dieselbe Zeit bei 0° stehen. — Bei der Prüfung der Kontrolle mit Chinin stellte sich sofort eine milchweiße Färbung sowie ein flockiger Niederschlag ein, während das dem Wärmeschrank entnommene Glas seine ursprüngliche Farbe beibehielt und keine Spur von Fällung erkennen ließ; Eisenchlorid gab starke Tintenreaktion.

Ergebnis: Ascitesflüssigkeit spaltet Tannin leicht und

IV.

Reaktion des zu untersuchenden Gemisches	Art des von den Zellen absorb. Gerbstoffes	Bemerkungen
Gelatine und Chinin negativ, Eisenchlorid: intensive Blauschwarzfärbung	—	Derselbe Versuch wurde mit gleichem Erfolg wiederholt
Wie 1.	Gallussäure	
Chininreaktion schwach positiv, Eisenchlorid: auch nur sehr geringe Reaktion	Tannin	Es waren nur Spuren von Gerbstoff in Lösung, der sich nach der Extraktion mit Alkali als Tannin erwies
Gelatine und Chinin negativ Eisenchlorid: positiv	War durch Alkali nicht in Lösung zu bekommen	Eine Wiederholung des Versuches ergab mit Chinin leichte Opalescenz
Flockiger Niederschlag m. Gelatine und Chinin	—	
Tanninreagenzien: sämtlich negativ	—	Nach Herausnahme aus der Wärme wurde erst das Casein ausgefällt, dann filtriert und neutralisiert
Tanninreagenzien: negativ	—	

völlig; auch die angesetzten Eiterzellen — es handelte sich um frischen Absceßteiler und um Zellen unter Formalin — brachten in beiden Fällen eine nahezu restlose Aufspaltung des Tannins binnen 2 Stunden zuwege.

Zusammenfassung.

Tannin wird, per os eingeführt, auf seiner Wanderung durch den Körper nur von bestimmten Organen angegriffen. Es passiert Mundhöhle, Speiseröhre und Magen unverändert. In den Dünndarm gelangt, geht es einer weitgehenden Zerlegung entgegen, die im Dickdarm endgültig beendet zu werden

scheint. Sollte ein Teil der Gerbsäure — und das ist unter Umständen durchaus nicht unwahrscheinlich — als solche resorbiert werden, so käme als nächstes spaltendes Organ die Leber in Betracht, deren Spaltungskraft sich als die weitaus größte von allen untersuchten Organen erwiesen hat. Auf dem Transport dahin mag auch dem Blut ein gewisser Anteil an der Zerstörung des Tannins nicht abgesprochen werden. Die Tatsache jedenfalls muß als feststehend angesehen werden, daß über die Leber hinaus kein ungespaltenes Tannin in die Blutbahn gerät, denn sonst müßte dieses durch die Nieren ausgeschieden werden. Eine Aufspaltung innerhalb der Nieren selbst kann ausgeschlossen werden, da die Nierenzellen keine Spaltungsfähigkeit besitzen.

Die Organe von Meerschweinchen und Fröschen verhalten sich im großen und ganzen wie die entsprechenden beim Menschen.

Etelen.

Unter Etelen oder Trigallacetol ist der Triacetyläthylester

der Gallussäure C_6H_2 $\begin{matrix} \nearrow (OCOCH_3)_3 \\ \searrow COOC_2H_5 \end{matrix}$ zu verstehen. Er bildet eine

farblose krystallinische geschmacklose Substanz, die in Alkohol und Äther sehr schwer, in Wasser gar nicht löslich ist und die durch heiße Alkalien zu Gallussäure aufgespalten wird. Das Etelen wird von den Farbenfabriken vorm. Friedrich Bayer & Co. in Leverkusen seit 1913 hergestellt und kommt in Tablettenform in den Handel. Klinisch wird es bei den meisten mit Diarrhöen einhergehenden Darmerkrankungen als prompt wirkendes Adstringens empfohlen¹⁾.

Verhalten des Etelens im Organismus.

Um das Verhalten des Etelens nach der Einführung in den menschlichen Körper festzustellen, insbesondere um zu prüfen, ob es als solches oder als Gallussäure den Organismus

¹⁾ F. Loewenthal, Münch. med. Wochenschr. 62, 1748, 1915; O. Seiffert, ebenda S. 1750.

verläßt, oder ob es vollkommen verbrannt wird, stellten wir folgende Selbstversuche an.

Morgens 10³⁰ Uhr Einnahme von 1,5 g Etelen (S). Der nach Zufuhr von reichlich Flüssigkeit in etwa 1 bis 1¹/₂ stündigen Intervallen entleerte Harn zeigte zuerst 11²⁰ Uhr, also 50 Minuten nach Zuführung des Mittels, eine deutliche, wenn auch nicht sehr starke Eisenchloridreaktion. Gegen 4 Uhr, also nach 5¹/₂ Stunden, ist die Reaktion zuletzt ganz schwach positiv, von da ab negativ. Abgesehen von den ersten beiden Stunden nach Einführung des Mittels war die Reaktion in dem allerdings stark sauern Harn so schwach, daß eine deutliche dunkelviolette Färbung auf Zusatz von Eisenchlorid erst bei Zugabe einiger Tropfen Natriumcarbonatlösung nach einigen Sekunden langem Stehen eintrat.

Bei Einführung von 1,5 g Etelen ist die Ausscheidung von geringen Mengen Gallussäure im Harn innerhalb 5¹/₂ Stunden beendet.

Vor einem zweiten Selbstversuch (M.) wurde am Vorabend durch Einnahme von Magnesiumsulfat und Natriumsulfat zunächst eine ausgiebige Darmentleerung vorgenommen, dann morgens um 8 Uhr 3 g, und mittags um 1 Uhr nochmals 3 g Etelen eingenommen, und die Nahrung während dieses Tages auf etwas Fleisch und Kartoffeln beschränkt, um nicht allzu große Fäcesmengen zu erhalten. Die erste, mittags um 1 Uhr gelassene Urinportion gab, diesmal nach Zusatz von etwas verdünnter Salzsäure um störende Phosphatniederschläge hintanzuhalten, mit Eisenchlorid deutliche Schwarzfärbung. Noch intensiver war diese in der zweiten Portion von 6 Uhr und in der dritten von 11 Uhr abends; auch in der vierten Harnportion vom andern Morgen 8 Uhr früh reagierte Eisenchlorid noch sehr deutlich, während in der fünften von 11 Uhr vormittags die Reaktion so gering war, daß sie kaum noch als solche verwertet werden konnte. Der dann folgende Harn von 5 Uhr nachmittags des zweiten Tages war bereits völlig frei von eisenschwärendem Spaltungsprodukt. Dieser Körper kann nur unverändertes Etelen oder dessen Spaltungsprodukt, Gallussäure, sein. Ersteres kommt schon deshalb nicht in Frage, weil es unhydrolysiert gar nicht die Eisenchloridreaktion gibt. Es findet also im Körper ein Abbau des Etelens zu Gallussäure statt. Bei obiger Dosierung war rund 24 Stunden nach der letzten Gabe der Harn frei von Gallussäure. Es blieb aber noch die Möglichkeit, daß das Etelen gespalten oder ungespalten durch die Fäces abgeführt wurde. Der nach Eingabe des Etelens zuerst abgesetzte Kot von 10 Uhr morgen des ersten Versuchstages wurde in 2 Teile geteilt. Der eine wurde mit heißem Alkohol extrahiert, filtriert und das Filtrat eingedampft. Die filtrierte wäßrige Lösung dieses alkoholischen Extraktes ergab jedoch mit Eisenchlorid nicht die geringste Reaktion. Der zweite Teil wurde zur Prüfung auf ungespaltenes Etelen verwandt. Zu diesem Behufe wurden die Faeces mit der doppelten Menge Wasser versetzt und dieses Gemisch mit Natronlauge alkalisch gemacht; aufs heiße Wasserbad gebracht,

blieb es etwa $\frac{3}{4}$ Stunden stehen. War ungespaltenes Etelen noch zugegen, so mußte es jetzt durch das heiße Alkali zerlegt sein. Die Untersuchung des filtrierten und neutralisierten Gemisches ergab jedoch ein völlig negatives Resultat. Zur Kontrolle wurde nunmehr der alkalischen Kotschwemmung $\frac{1}{4}$ g Etelen zugesetzt und erstere nach $\frac{1}{4}$ stündigem Stehen auf dem Wasserbade mittels Eisenchlorid geprüft. Wie zu erwarten war, trat eine ganz intensive Tintenreaktion ein.

Das Etelen wird hiernach im Körper abgebaut und verläßt diesen zum Teil als Gallussäure mit dem Harn. Eine Ausscheidung mit den Faeces, gleichgültig in welcher Form, ist nicht erweisbar.

Worin der anti diarrhoische Effekt des Präparates, wie er in der Literatur beschrieben ist, gesucht werden muß, ist uns nicht recht verständlich; denn beim Tannin und seinen direkten Abkömmlingen wirkt eben die freie Gerbsäure als solche adstringierend, während das hydrolytische Zerfallsprodukt, die Gallussäure, ja gar keine adstringierenden Eigenschaften mehr hat. Daß dem Etelenmolekül als solchem adstringierende Eigenschaften zukommen, ist schon wegen der Unlöslichkeit in wäßrigen Medien kaum anzunehmen; der hydrolytische Abbau zu Gallussäure schien hier auch noch viel leichter und schneller vonstatten zu gehen wie beim Tannin.

Lokalisation der Spaltung des Etelens.

Die Versuche, welche Zellen, speziell welche des Magen-Darmkanals eine Aufspaltung des Etelenmoleküls hervorrufen, wurden analog denen beim Tannin angestellt. Das Etelen wurde in einer 1%igen Aufschwemmung in Wasser verwandt, die durchschnittlich den Gemischen hinzugefügte Menge betrug, wie bei der Gerbsäure, 10 mg. Mit Eisenchlorid reagiert diese Aufschwemmung natürlich nicht unter Dunkel-färbung. Da infolge der Unlöslichkeit des Etelens in Wasser eine Adsorption des Präparates an die Zellen im Gegensatz zum Tannin nicht stattfindet, so fielen die Untersuchungen hierüber weg. Über die Einzelheiten gibt Tabelle V Auskunft.

Ergebnis: Das Etelen passiert beim Einführen per os die Mundhöhle, die Speiseröhre und den Magen unverändert und wird erst im Darm angegriffen. Zweifellos beteiligt sich diesmal auch das Pankreas, im Gegensatz zu den mit Tannin angestellten Versuchen. Die Leber hat sich auch jetzt wieder als intensiv spaltendes Organ erwiesen, sowohl beim Menschen als auch beim Frosch.

Tabelle V.

Angesetztes Material	Menge	Menge d. Ete- lens mg	Aufent- halt in der. Wärme Stunden	Reaktion der Kontrolle	Reaktion des zu unter- suchenden Gemisches
1. Speichel	1 cem in Kochsl.	10	2	FeCl ₃ negativ	FeCl ₃ negativ
Speichel	3 cem in Kochsl.	10	2	" "	" "
2. Pepsin „Witte“ (1%)	1 cem in Kochsl.	10	1	" "	" "
3. Salzsäure (0,3%)	4 cem	10	1	" "	" "
4. Pepsin „Witte“ und Salzsäure (0,3%)	2 cem + 2 cem	10	1	" "	" "
5. Frische Magen- zellen vom Men- schen	2 cem in Kochsl. suspend.	20	1	" "	" "
6. Frische Ileum- zellen vom Men- schen	2 cem in Kochsl. suspend.	10	1	" "	mit FeCl ₃ Schwarzfärb.
7. Zellen des Colon transversum vom Menschen, frisch	2 cem in Kochsl. suspend.	20	1	" "	" "
8. Leberzellen vom Frosch, frisch	2 cem in Kochsl. suspend.	10	1	" "	" "
9. Leberzellen vom Menschen, frisch	2 cem in Kochsl. suspend.	10	1	" "	" "
	1 cem in Kochsl. suspend.	10	1	" "	" "
	1 cem in Kochsl. suspend.	10	1/2	" "	" "
	1 cem in Kochsl. suspend.	20	1	" "	" "
10. Leberzellen vom Menschen frei v. Hämoglobin, 4 Wochen alt, unter Formalin	1 cem in Kochsl. suspend.	10	1	" "	" " (Formalin an sich spaltet nicht)

Tabelle V (Fortsetzung).

Angesetztes Material	Menge	Menge d. Eiters mg	Aufenthalt in der Wärme Stunden	Reaktion der Kontrolle	Reaktion des zu untersuchenden Gemisches
11. Trypsin (1%) „Merck“, alkalisch gemacht	1 ccm in Kochsl.	10	1	FeCl ₃ negativ	FeCl ₃ negativ
12. Frische Pankreaszellen vom Menschen	1 ccm in Kochsl. suspend.	10	3	" "	FeCl ₃ stark positiv
13. Frische Milzzellen v. Menschen	2 ccm in Kochsl. suspend.	10	1	" "	" "
14. Frische Nierenzellen v. Menschen	2 ccm in Kochsl. suspend.	20	2	" "	" "
15a. Placentarpulver vom Menschen, von Blut befreit, 10 Jahre alt	1 Messerspitze in Kochsl. suspend.	10	1	" "	FeCl ₃ kaum nennenswert. Dunkelfärbg.
15b. Frische Placenta vom Menschen	1 ccm in Kochsl. suspend.	10	1	" "	FeCl ₃ so gut wie negativ
16a. Gehirnzellen v. Menschen, unter Formalin	2 ccm in Kochsl. suspend.	10	1/2	" "	FeCl ₃ negativ
16b. Frische Gehirnzellen vom Menschen	2 ccm in Kochsl. suspend.	10	1	" "	" "
17. Harn, eigener	10 ccm 15 ccm	10 10	1 2	" " " "	" " " "
18. Blutserum vom Menschen (1:1 Kochsalzlösung)	4 ccm	10	1	" "	" "
19. Eiterzellen vom Menschen, aus einem Absceß, unter Formalin	2 ccm in Kochsl. suspend.	10	1	" "	FeCl ₃ geringe Dunkelfärbg.
20. Ascitesflüssigkeit, Mensch (1:2 Kochsalzl.)	10 ccm	10	3	" "	" "

Im Vergleich zum Tannin ist als Hauptunterschied außerdem noch zu erwähnen die erhebliche Spaltungskraft der Niere einerseits und das passive Verhalten des Blutserums und der Placenta andererseits.

Tannigen.

Das Tannigen, eine esterartige Verbindung des Tannins mit Essigsäure, ist wie Tannin und Gallussäure in Alkohol und wäßrigen Alkalien löslich, sehr schwer dagegen im Wasser. Seiner Zusammensetzung entsprechend liefert die völlige hydrolytische Zerlegung zunächst Essigsäure und Gerbsäure, welche letztere dann in einer weiteren Phase Gallussäure liefert. Die Ausscheidung aus dem Körper ist experimentell von H. H. Meyer¹⁾, F. Müller¹⁾, Bauer (l. c.) und Rost (l. c.) untersucht worden. Danach konnte im Harn von Katzen und Kaninchen niemals Tannigen oder Tannin, sondern nur Gallussäure nachgewiesen werden, dagegen fand sich in den Faeces von Katzen ein Teil des Tannigens unverändert wieder. Bei Versuchen an Menschen fand Rost keine nachweisbare Spur von Gallussäure im Harn, sondern ein wenn auch nicht sehr beträchtlicher Teil des Tannigens erschien in den Faeces als Gerbsäure, daneben war auch etwas Gallussäure vorhanden. Diese Resultate haben nicht nur theoretisches, sondern auch praktisches Interesse: Während der Wanderung des Tannigens durch den Magen-Darmkanal wird es zum großen Teil zu Gerbsäure verseift, die nun ihrerseits ihre austrocknende und adstringierende Wirkung bis in die untersten Darmabschnitte entfalten kann.

Spaltungsversuche des Tannigens mit Körperelementen.

Die Spaltungsversuche von Tannigen wurden im großen und ganzen wie die vom Tannin ausgeführt. Auch hier wurden zunächst einige Versuche mit 24stündigem Aufenthalt im Thermostaten angestellt, doch ergab sich in allen diesen Fällen, daß die Kontrolle bereits weitgehend gespalten war, so daß ein positiver Ausfall der Eisenchloridreaktion bei Untersuchung der übrigen Proben nicht als beweisend hätte angesehen werden dürfen. Weitere Versuche ergaben dann als Maximalzeit für das Stehen in der Wärme 1 Stunde, d. h. die Kontrolle ergab nach Ablauf dieser Zeit aus dem Thermostaten genommen keine, oder doch nur so geringe

¹⁾ Deutsche med. Wochenschr. 1899, Nr. 31.

Tabelle VI.

Angesetztes Material	Menge	Menge d. Tannigens	Aufenthalt in der Wärme Stunden	Reaktion der Kontrolle	Reaktion des zu untersuchenden Gemisches
1. Speichel	1 ccm in Kochsl.	eine Messerspitze	$\frac{1}{2}$	ganz schwache Dunkelfärbg.	die gleiche Reaktion wie die Kontrolle
2. Frische Magenzellen v. Menschen	2 ccm in Kochsl. suspend.	"	$\frac{1}{2}$	" "	keine Spur von Reaktion mit FeCl_3
3. Pepsin „Witte“ und Salzsäure 0,3%	1 + 1 ccm in Kochsl.	"	$\frac{1}{2}$	" "	keine Spur von Reaktion mit FeCl_3
4. Frische Ileumzellen v. Menschen (mit gleichem Resultat wiederholt)	2 ccm in Kochsl. suspend.	"	1	schwache Grünfärbung	wie die Kontrolle
5. Trypsin (1%) „Merck“	5 ccm	"	$\frac{1}{2}$	" "	keine Spur von Reaktion mit FeCl_3
6a. Leberzellen v. Menschen 3 Wochen alt, unter Formalin	2 ccm in Kochsl. suspend.	"	$\frac{1}{2}$	" "	wie die Kontrolle (Formalin an sich spaltet nicht)
6b. Leberzellen v. Menschen, einige Wochen alt, unter Formalin	2 ccm in Kochsl. suspend.	"	1	" "	" "
7. Frische Milzzellen v. Menschen	1 ccm in Kochsl. suspend.	"	$\frac{1}{2}$	" "	wie die Kontrolle
8a. Placentarbreipulver v. Menschen, frei von Blut, 10 Jahre alt	1 Messerspitze in Kochsl. suspend.	"	1	" "	" "
8b. Frische Placenta v. Menschen	1 ccm in Kochsl. suspend.	"	1	" "	" "
9. Eiterzellen vom Menschen, aus einem Absceß, unter Formalin	2 ccm in Kochsl. suspend.	"	1	" "	" "
10. Frische Eiterzellen v. Menschen, aus einem Absceß	2 ccm in Kochsl. suspend.	"	$\frac{1}{2}$	" "	" "

Eisenchloridreaktion, daß das Resultat als beweiskräftig angesehen werden konnte. Näheres über die Untersuchungen siehe Tabelle VI.

Es erscheint auffallend, daß in keinem einzigen Falle innerhalb 1 Stunde eine nennenswerte Spaltung des Tannigen erzielt werden konnte, ja, daß sogar in einzelnen Versuchen in denen die zugehörige Kontrolle bereits schwache Eisenchloridreaktion zeigte, bei Zusatz von Eisenchlorid nicht die geringste Farbenveränderung eintrat. Das Resultat bestätigt jedoch nur die Richtigkeit der Versuchsergebnisse von Rost, der, wie oben erwähnt, niemals Gallussäure im Harn beim Menschen nachweisen konnte, was bei einer raschen und vollständigen Aufspaltung zu erwarten gewesen wäre.

Bei den im vorstehenden untersuchten Substanzen der Gerbstoffklasse erfolgt bei hydrolytischer Spaltung durch Elektrolyte im Reagensglas Abbau zu Gallussäure. Bei einigen dieser Körper — Tannin, Etelen — erfolgt dies wenigstens bis zu einem gewissen Grade auch im Organismus. Bemerkenswert ist hierbei aber die Tatsache, daß der Ort der Spaltung trotz der nahen chemischen Verwandtschaft der Körper ein ganz verschiedener sein kann. Diese feinen biologischen Unterschiede scheinen uns insofern auch für den Chemiker beachtenswert, als sie darauf hinweisen, daß Unterschiede in der Art der Esterbindung der Gallussäure vorliegen, die uns ihrer Art nach beim Tannin und Tannigen noch nicht genügend bekannt sind, die sich durch noch so subtile, rein analytisch-chemische Methoden kaum erweisen lassen.

Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen.

Von
Otto Warburg.

(Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.

(Eingegangen am 16. Oktober 1919.)

Mit 11 Figuren im Text.

Nach den bisherigen Erfahrungen¹⁾ ist die Fähigkeit der Pflanzenzelle, Kohlensäure photochemisch zu zersetzen, an die Intaktheit des Chlorophyllkorns gebunden. „Sobald die Struktur des Chlorophyllkorns überall zerstört ist . . . , hört die Möglichkeit der Sauerstoffproduktion sofort und definitiv auf“ [Th. W. Engelmann²⁾]. Es entsteht so die Frage, welche Faktoren die photochemische Zersetzlichkeit der Kohlensäure in dem intakten Chlorophyllkorn bedingen.

Um der Lösung dieser Frage näher zu kommen, wurden die im folgenden beschriebenen Versuche unternommen, die in ihrer Anlage eine Fortsetzung von Untersuchungen Blackmans³⁾ und Willstaetters⁴⁾ bilden.

Gegenüber früheren Arbeiten wurde, wie ich glaube, die Technik der Versuche vereinfacht, sowohl durch die Wahl des Versuchsobjektes — einer kleinen, isoliert wachsenden Grünalge —, als auch durch Anwendung von Meßmethoden, die durch Umbildung der Haldane-Barcroft'schen⁴⁾ Methode der Blutgasanalyse entstanden.

¹⁾ Willstaetter und Stoll, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin 1918.

²⁾ Botan. Zeitg. **39**, 441, 1881.

³⁾ Zusammenfassung in „Optima and Limiting Factors“. Annals of Botany **19**, 281, 1905.

⁴⁾ J. Barcroft, Ergebnisse der Physiologie **7**, 690, 1908.

In der vorliegenden ersten Mitteilung beschränke ich mich nach Möglichkeit auf die Beschreibung von Methoden und Tatsachen, später soll dann auf den Zusammenhang der Tatsachen vom physikalisch-chemischen Standpunkt aus, d. h. auf die Kinetik der Kohlensäureassimilation, näher eingegangen werden.

Die Wiedergabe der Versuche zerfällt in folgende Abschnitte:

- I. Züchtung und Eigenschaften der Alge.
- II. Meßmethoden: Die Lichtquelle. Prinzip der Messungen. Ausführung der Messungen. Die rotierenden Sektorscheiben.
- III. Einfluß der Kohlensäurekonzentration.
- IV. Einfluß der Beluchtungsstärke.
- V. Einfluß der Temperatur.
- VI. Einfluß intermittierender Belichtung.
- VII. Einfluß permeierender Substanzen. Allgemeines. Versuche mit Blausäure. Versuche mit Phenylurethan.

I. Züchtung und Eigenschaften der Alge.

Für die Wahl des Organismus waren schnelles Wachstum, Unbeweglichkeit und einfacher Entwicklungszyklus maßgebend. Nach einigen Vorversuchen blieb ich bei einer runden, unbeweglichen, im Durchmesser 3 bis 6μ messenden grünen Alge, die sich ohne Bildung größerer Verbände oder beweglicher Sporen durch sukzessive Zweiteilung vermehrte, ähnlich der in der Literatur¹⁾ als „Chlorella“ beschriebenen Grünalge.

Wenn die Zelle auch durchweg grün erscheint, so ist doch anzunehmen, daß sie ein abgegrenztes Chlorophyllkorn¹⁾ besitzt, das in Form einer fast geschlossenen Hohlkugel den farblosen Zelleib umgibt.

Die Alge wächst gut bei künstlicher Beleuchtung, sowohl auf Agar als auch in rein anorganischen Salzlösungen. Seit 10 Monaten züchte ich sie in Knopscher Lösung unter Beleuchtung mit einer Metallfadenlampe, ohne daß bis jetzt Degenerationerscheinungen aufgetreten wären.

¹⁾ Oltmanns, Morphologie und Biologie der Algen I, 1904, 183.

Nach einer Vorschrift von Tollens¹⁾ hielt ich mir folgende Stammflüssigkeiten vorrätig:

- | | |
|-------------------------|---------------------------------|
| 1. 100 g Calciumnitrat | 2. 25 g Kaliumphosphat (primär) |
| 25 g Kaliumnitrat | 1000 ccm Wasser |
| 15 g Natriumchlorid | |
| 1000 ccm Wasser | |
| 3. 50 g Magnesiumsulfat | |
| 1000 ccm Wasser | |

und gab je 10 ccm zu 1000 ccm Wasser, das aus Glas in Glas destilliert war. Zur Kultur wurden 2 ccm einer 0,3⁰/₀igen Ferrosulfatlösung pro Liter zugesetzt, während zur Messung der Assimilation Knopsche Lösungen ohne Eisenzusatz verwendet wurden.

Als Aussaat diente eine nach Kochs Plattenverfahren gewonnene Einzelkultur, die zunächst steril weitergezüchtet wurde. Später war steriles Arbeiten nicht mehr erforderlich, da in den anorganischen Nährflüssigkeiten, bei den hohen Beleuchtungsstärken und relativ großen Aussaaten weder Bakterien noch andere Algen auf kamen.

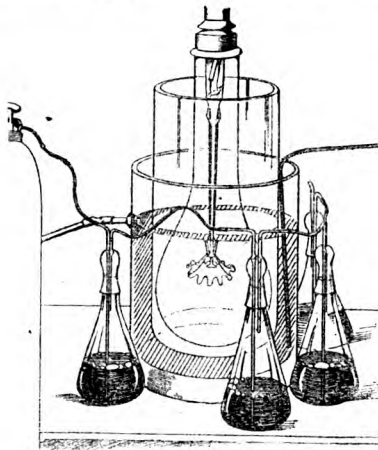


Fig. 1.

Die Lichtquelle, eine $\frac{1}{2}$ -Watt-Metallfadenlampe von 300 Watt Stromverbrauch, war in einem von fließendem Kühlwasser umgebenen Becherglas aufgehängt und brannte Tag und Nacht. Ein langsamer Luftstrom, dem 4 Volumteile Kohlensäure beigemischt waren, perlte dauernd durch die Kulturkolben und verhinderte die Sedimentierung der Zellen (Fig. 1).

Bei einer mittleren Temperatur von 18⁰ stieg die Zellenzahl im Laufe einiger Tage auf ein Mehrfaches der Aussaat, wobei die anfangs hellgrüne Kulturflüssigkeit allmählich schwarzgrün wurde. Genauere Angaben über die Geschwindigkeit der

¹⁾ Küster, Kultur der Mikroorganismen 1913, 17.

Vermehrung haben wenig Interesse; sie ändert sich in komplizierter Weise mit der Zeit, indem mit fortschreitender Vermehrung innere Faktoren gegen äußere Bedingungen, wie Beleuchtungsstärke, Suspensionsdichte und Form der Kulturkolben zurücktreten. Die Vermehrung hört auf, wenn Gleichgewicht zwischen Assimilation und Atmung herrscht.

Beziehen wir den Gaswechsel nach dem Vorgang von Th. Saussure¹⁾ auf das Volumen des lebenden Organismus, so zersetzte die Alge unter günstigsten Bedingungen bei 25° in etwa 2 Minuten ein ihrem Eigenvolumen gleiches Volumen an Kohlensäuregas (0° , 760 mm); im Dunkeln schied sie unter sonst gleichen Bedingungen $\frac{1}{20}$ bis $\frac{1}{30}$ dieses Volumens an Atmungskohlensäure aus. Assimilationsvermögen und Atmung stiegen bei Belichtung in Nährlösungen langsam an, entsprechend der Zunahme an Zellsubstanz.

Das Assimilationsvermögen der Alge änderte sich zunächst nicht, wenn sie aus der Kulturflüssigkeit in destilliertes Wasser gebracht wurde oder in nicht zu konzentrierte Lösungen von freien Alkalien, Mineralsäuren, Alkali-, Erdalkali- oder Schwermetallsalzen, von Zuckern oder Aminosäuren. Erst im Laufe von Stunden oder Tagen trat in diesen Lösungen eine Schädigung ein, die an dem allmählichen Sinken des Assimilationsvermögens verfolgt werden konnte. Die Alge ist somit, ähnlich den Kokken unter den Bakterien, ein typischer Vertreter der Zellen mit unempfindlicher Grenzschicht.

Die Zeit, nach der sich die Schädigungen bemerkbar machen, wurde außerordentlich herabgesetzt durch kleine Mengen oberflächenaktiver Substanzen. So blieb die Alge in einer reinen Carbonat-Bicarbonatlösung, deren OH-Ionenkonzentration $10^{-4,8}$ betrug, tagelang intakt und von unverändertem Assimilationsvermögen; es genügte aber die Zugabe eines Krystalls des fast unlöslichen und in Knopscher Flüssigkeit unschädlichen n-Dodecylalkohols, um die Zelle bei 25° fast sofort zu vergiften. Das Assimilationsvermögen erlosch dann innerhalb weniger Minuten, und bei Belichtung wurde kein Sauerstoff ausgeschieden, sondern mehr Sauerstoff verbraucht als im Dunkeln. Das Auf-

¹⁾ Chemische Untersuchungen über die Vegetation in Ostwalds Klassik. d. Naturwissensch. (Leipzig 1890).

treten dieser „Photooxydation“ war stets ein sicheres Zeichen der definitiven Zerstörung.

Wurde auch in den genannten Salzlösungen vielfach lange Zeit keine Schädigung bemerkbar, so unterblieb doch bald, wenn unentbehrliche Baustoffe fehlten, die Vermehrung und damit der für messende Versuche sehr störende Anstieg der Assimilation mit der Zeit. Diese Beobachtung wurde für die Methodik ausgenutzt und die Alge für längerdauernde quantitative Versuche nicht in Knopscher Lösung, sondern in einseitig zusammengesetzten Salzlösungen suspendiert. Als besonders geeignet erwiesen sich Gemische von Carbonat- und Bicarbonatlösungen, die gleichzeitig als Kohlensäurequellen dienten.

Bemerkenswert war die große Resistenz gegen niedrige Temperaturen. Suspensionen in Knopscher Lösung konnten wochenlang bei $+5^{\circ}$ aufbewahrt werden, ohne daß sich das Assimilationsvermögen änderte; stundenlange Kühlung in flüssiger Luft und darauffolgendes schnelles Auftauen brachte das Assimilationsvermögen nicht zum Verschwinden. Allerdings sank in einigen Fällen die Assimilationsleistung nach Vorbehandlung mit flüssiger Luft, stieg aber allmählich wieder auf ihre normale Höhe, ein Phänomen, das wohl zu denen von Ewart¹⁾ als „Assimilatory inhibition“ beschriebenen gehört.

Vermutlich verdankt die Alge ihre Resistenz gegen tiefe Temperaturen der besonderen Lage ihres Chlorophyllkorns, das an die starre Zellulosehaut grenzt und bei einer plötzlichen Dehnung, wie sie beim Gefrieren eintritt, vor Zerreißung geschützt ist, als frei in der Zelle liegende Chlorophyllkörner. Algen mit freiliegenden Chlorophyllkörnern, wie *Euglena viridis*, büten beim Gefrieren ihr Assimilationsvermögen völlig ein; die Chlorophyllkörner wurden hierbei breiter und zeigten deutliche Veränderungen ihrer Struktur.

II. Meßmethoden.

Die Lichtquelle.

Als Lichtquelle benutzte ich nach dem Vorgang Willstaetters²⁾ Metallfadenlampen, und zwar meist $\frac{1}{2}$ -Watt-Metall-

¹⁾ The Journal of the Linnean Society, Botany, 31, 364, 1895 bis 1897.

²⁾ Willstaetter, l. c. Berlin 1918, 68.

fadenlampen der Allgemeinen Elektrizitätsgesellschaft; sie wurden mit Gleichstrom (220 Volt) betrieben und brannten stets bei maximaler Belastung, auf die sich alle Angaben des Energieverbrauchs beziehen.

Nach Bestimmungen, die in der Physikalisch-Technischen Reichsanstalt mit einer meiner Versuchslampen ausgeführt wurden, änderte sich die Lichtstärke um 8⁰/₁₀, wenn die Spannung von 220 auf 225 Volt stieg oder von 220 auf 215 Volt sank. Während der Assimilationsversuche konnte die Spannung mittels eines Regulierwiderstandes leicht innerhalb 2 Volt konstant gehalten werden, so daß die Schwankungen der Lichtintensität während eines Versuchs nicht mehr als 3⁰/₁₀ betragen. Neue Lampen, deren Lichtstärken sich anfangs bei konstanter Spannung erheblich ändern, wurden stets vor ihrer Verwendung einige Stunden gebrannt.

Wie Willstaetter¹⁾ hervorhebt, erzielt man mit den im Handel befindlichen Lampen von 1500 Watt Stromverbrauch bei Annäherung auf etwa 15 cm an die zu beleuchtende Fläche Beleuchtungsstärken, die, photometrisch gemessen, die Helligkeit in direktem Sonnenlicht übertreffen. Auch die (bolometrisch gemessene) Energie der sichtbaren Strahlung, die unter gleichen Bedingungen auf 1 qcm beleuchteter Fläche auffällt, ist größer als in direktem Sonnenlicht²⁾.

Prinzip der Messungen.

Bei der Assimilation der Kohlensäure entsteht aus einem Volumen Kohlensäure ein Volumen Sauerstoff³⁾. Schließt man grüne Zellen mit kohlenstoffhaltiger Luft in einem Gefäß ab und belichtet, so bleibt also im allgemeinen der Druck unverändert. Eine Druckänderung tritt jedoch auf, wenn

entweder das Flüssigkeitsvolumen gegen den Gasraum nicht klein ist, wobei dann die Differenz der Absorptionskoeffizienten der umgewandelten Gase wirksam wird,

¹⁾ Willstaetter, l. c. Berlin 1918, 68.

²⁾ Nach Lux, Zeitschr. f. Beleuchtungswesen 20, H. 2 und 3, 1914, beträgt die Ausbeute an sichtbarer Strahlung in cal für die $\frac{1}{2}$ -Wattlampe 5⁰/₁₀ des Gesamtenergieverbrauchs.

³⁾ Willstaetter, l. c. 315 ff.

oder die Kohlensäure einer in der Flüssigkeit gelösten chemischen Verbindung entnommen wird.

Auf beide Prinzipien lassen sich einfache Methoden zur Messung der Assimilation gründen.

Erstes Prinzip.

Wir denken uns ein luftdicht verschlossenes Gefäß zum Teil mit einer wäßrigen Suspension grüner Zellen, zum Teil mit einem Gemisch von Sauerstoff- und Kohlensäuregas gefüllt und bei konstanter Temperatur so lange geschüttelt, bis Gleichgewicht zwischen dem Gasraum und der Flüssigkeit eingetreten ist. Es sei

v_G das Volumen des Gasraumes in ccm

v_F das Volumen der Flüssigkeit in ccm

P der Partialdruck des Sauerstoffs in mm Hg

P_1 der Partialdruck der Kohlensäure in mm Hg

T die Temperatur in absoluter Zählung

α der Absorptionskoeffizient des Sauerstoffs für Wasser bei der Temperatur T

α_1 der Absorptionskoeffizient der Kohlensäure für Wasser bei der Temperatur T .

Dann enthält

der Gasraum $\frac{Pv_G}{760} \times \frac{273}{T}$ ccm Sauerstoff . . (0°, 760 mm)

$\frac{P_1v_G}{760} \times \frac{273}{T}$ ccm Kohlensäure . (0°, 760 mm)

die Flüssigkeit $\frac{Pv_F\alpha}{760}$ ccm Sauerstoff (0°, 760 mm)

$\frac{P_1v_F\alpha_1}{760}$ ccm Kohlensäure . . (0°, 760 mm)

Bei der Belichtung sollen sich x ccm Kohlensäure in x ccm Sauerstoff umwandeln, wobei der Partialdruck des Sauerstoffs von P auf p steige, der Partialdruck der Kohlensäure von P_1 auf p_1 sinke. Nach der Belichtung enthält

der Gasraum $\frac{pv_G}{760} \times \frac{273}{T}$ ccm Sauerstoff . . (0°, 760 mm)

$\frac{p_1v_G}{760} \times \frac{273}{T}$ ccm Kohlensäure (0°, 760 mm)

die Flüssigkeit $\frac{pv_F\alpha}{760}$ ccm Sauerstoff (0°, 760 mm)

$\frac{p_1v_F\alpha_1}{760}$ ccm Kohlensäure (0°, 760 mm)

Bezeichnen wir die Änderung des Gesamtdrucks in mm Hg mit H , so ist

$$H = (p - P) - (P_1 - p_1)$$

$$x = \frac{p - P}{760} \left(v_G \frac{273}{T} + v_F\alpha \right)$$

$$x = \frac{P_1 - p_1}{760} \left(v_G \frac{273}{T} + v_F\alpha_1 \right).$$

Nach Elimination von P , P_1 , p und p_1

$$x = H \left[\frac{\left(v_G \frac{273}{T} + v_F\alpha \right) \left(v_G \frac{273}{T} + v_F\alpha_1 \right)}{760 v_F (\alpha_1 - \alpha)} \right] \quad (1)$$

x , die zersetzte Kohlensäuremenge, ist also proportional H , der Änderung des Gesamtdrucks, und unabhängig von den Anfangspartialdrucken an Sauerstoff und Kohlensäure.

Die Druckänderung wurde an einem Manometer abgelesen, dessen Sperrflüssigkeit die von Brodie¹⁾ angegebene wäßrige Lösung war, von der 10000 mm = 760 mm Hg. Das Volumen v_M der Manometercapillare bis zum Meniskus der Sperrflüssigkeit war gegen v_G nicht zu vernachlässigen; die Druckänderung in dem Gefäß ergab sich aus der am Manometer beobachteten Druckänderung durch Multiplikation mit $\frac{v_G + v_M}{v_M}$, unter der Voraussetzung, daß sich die Gase der Capillare an dem Gasaustausch nicht beteiligten. Bezeichnen wir mit h die beobachtete Druckänderung in Millimetern Brodiescher Flüssigkeit, mit x_1 die zersetzten Kohlensäuremengen in Kubikmillimetern, so folgt aus (1)

$$x_1 = h \left[\frac{\frac{v_G + v_M}{v_G} \left(v_G \frac{273}{T} + v_F\alpha \right) \left(v_G \frac{273}{T} + v_F\alpha_1 \right)}{10 v_F (\alpha_1 - \alpha)} \right] \quad (2)$$

Der in der eckigen Klammer stehende Ausdruck ist für bestimmte Abmessungen und eine bestimmte Temperatur eine

¹⁾ I. Barcroft, Ergebnisse der Physiol. 7, 775, 1908.

Konstante; er wird für jedes Gefäß einmalig berechnet und ergibt die zersetzte Kohlensäuremenge in Kubikmillimetern für eine Druckänderung von 1 mm.

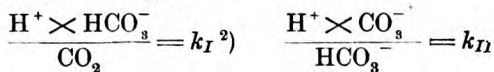
Betrag der Rauminhalt des Gefäßes 15 ccm, das Volumen der eingefüllten Flüssigkeit 10 ccm, das Volumen der Manometercapillare bis zur Sperrflüssigkeit 1,2 ccm, so war die Konstante für $25^{\circ} = 1$. Dies waren ungefähr die Abmessungen bei der Ausführung der Versuche, so daß also 1 mm Druckänderung die Zersetzung von 1 cmm Kohlensäure anzeigte.

Während der Assimilation nimmt die Kohlensäurekonzentration in dem abgeschlossenen Gefäß ab. Diese Abnahme darf nicht so weit gehen, daß sie die Geschwindigkeit der Assimilation beeinflusst. Sättigte man mit 4 Volumprozent Kohlensäure bei dem Gesamtdruck von einer Atmosphäre, so enthielt das Gefäß einen Kohlensäurevorrat von 490 cmm Kohlensäure; erst wenn die Druckänderung etwa 490 mm betrug, war also der Kohlensäurevorrat erschöpft. Wurde der Versuch abgebrochen, wenn die Druckänderung nicht mehr als 200 mm betrug, so war man sicher, daß die Abnahme der Kohlensäurekonzentration die Assimilationsgeschwindigkeit nicht merklich (vgl. Abschnitt III) verminderte.

Voraussetzung der Methode ist, daß chemische Bindungen der Gase, wie die von Willstaetter¹⁾ entdeckte Addition der Kohlensäure an die Blattsubstanz, gegen den Umsatz in der Assimilation zu vernachlässigen sind. Bei den außerordentlich kleinen Mengen an Zellsubstanz, die verwendet wurden — 1 bis 2 mg Substanz auf 10 ccm Flüssigkeit — konnte diese Voraussetzung stets als erfüllt betrachtet werden.

Zweites Prinzip.

Aus den beiden Gleichungen für die elektrolytische Dissoziation der Kohlensäure



ergibt sich durch Division

¹⁾ l. c. S. 172 und 226 ff.

²⁾ $k_I =$ der wahren Dissoziationskonstante der Kohlensäure $\times \frac{H_2CO_3}{CO_2}$.

Vgl. Thiel u. Strohecker, Ber. d. d. Chem. Ges. 47, 945, 1914.

$$\frac{(\text{HCO}_3^-)^2}{\text{CO}_3^{--} \times \text{CO}_2} = \frac{k_I}{k_{II}} = K \quad (3)$$

Kennen wir in Mischungen von Bicarbonat- und Carbonatlösungen die Werte für HCO_3^- und CO_3^{--} , so läßt sich, wenn K bekannt ist, die CO_2 -Konzentration in jedem Fall berechnen.

Bezeichnen wir mit NaHCO_3 die Gesamtkonzentration des zugesetzten Bicarbonats, mit Na_2CO_3 die Gesamtkonzentration des zugesetzten Carbonats, beide in Molen pro Liter, mit α den

Dissoziationsgrad des Bicarbonats $\left(\frac{\text{HCO}_3^-}{\text{NaHCO}_3}\right)$, mit β den Dissoziationsgrad des Carbonats $\left(\frac{\text{CO}_3^{--}}{\text{Na}_2\text{CO}_3}\right)$, so ergibt sich aus (3)

$$\frac{\alpha^2 (\text{NaHCO}_3)^2}{\beta \text{Na}_2\text{CO}_3 \times \text{CO}_2} = K$$

$$\frac{(\text{NaHCO}_3)^2}{\text{Na}_2\text{CO}_3 \times \text{CO}_2} = K \frac{\beta}{\alpha^2} = K' \quad (4)$$

Diese Gleichung wurde für nicht zu verdünnte Lösungen, in denen die Hydrolyse zu vernachlässigen ist, von Mc. Coy¹⁾, Auerbach und Pick²⁾ und Seyler und Lloyd³⁾ verifiziert.

K' ist konstant, wenn der Gesamt-Na-Gehalt konstant gehalten wird; variieren wir den Gesamtgehalt an Na, so ändert sich $\frac{\beta}{\alpha^2}$, und damit auch K' .

Bezeichnen wir mit c den Gesamtgehalt an Na in Milliäquivalenten pro Liter, so gilt für das Gebiet zwischen $c = 100$ und $c = 1000$ bei 25° die empirische Formel

$$K' = 8739 - 1671 \log c. \quad (5)$$

Zur Berechnung der Kohlensäurekonzentration für andere Temperaturen als 25° liegen keine Bestimmungen von K' vor; doch läßt sich die Änderung von K' mit der Temperatur aus der Wärmetönung des Bicarbonatzerfalls, die allerdings

¹⁾ Amer. Chem. Journ. **29**, 437, 1903.

²⁾ Arbeiten aus d. Gesundheitsamt **38**, 274, 1911.

³⁾ Journ. Chem. Soc. London **111**, 133, 1917.

sehr ungenau bekannt ist, ungefähr berechnen. Beim Zerfall von 2 Mol NaHCO_3 (gelöst) in 1 Mol CO_2 (gelöst) und 1 Mol Na_2CO_3 (gelöst) werden 2028 cal absorbiert¹⁾. Unter der Annahme, daß sich die Dissoziationsgrade der Salze mit der Temperatur nicht merklich ändern, ergibt sich für die absolute Temperatur T

$$\log K'_{(T)} = \frac{\left(\frac{2028}{2 \times T} - \frac{2028}{2 \times 298}\right) + 2,3 \log K'_{(298)}}{2,3} \quad (6)$$

In Tabelle I sind für 11 verschiedene Carbonatgemische und 3 verschiedene Temperaturen die Kohlensäurekonzentrationen nach den Gleichungen 4, 5 und 6 berechnet. Wird eine spätere genauere Bestimmung von K' auch Korrekturen der absoluten Werte von c_{CO_2} erforderlich machen, so dürften doch die relativen Werte von c_{CO_2} innerhalb einer Reihe auf etwa 10⁰/₀ genau sein.

Tabelle I.

Nr. des Gemisches	Zusammensetzung des Gemisches		Millimole Na pro l	Für 5°		Für 10°		Für 25°	
	ccm ¹ / ₁₀ molar Na_2CO_3	ccm ¹ / ₁₀ molar NaHCO_3		K'	Mole CO_2 pro l	K'	Mole CO_2 pro l	K'	Mole CO_2 pro l
1	85	15	185	6400	$0,41 \times 10^{-6}$	6000	$0,44 \times 10^{-6}$	5000	$0,53 \times 10^{-6}$
2	80	20	180	6400	$0,78 \times 10^{-6}$	6000	$0,83 \times 10^{-6}$	5000	$1,0 \times 10^{-6}$
3	75	25	175	6400	$1,3 \times 10^{-6}$	6000	$1,4 \times 10^{-6}$	5000	$1,7 \times 10^{-6}$
4	70	30	170	6400	$2,0 \times 10^{-6}$	6000	$2,1 \times 10^{-6}$	5000	$2,6 \times 10^{-6}$
5	60	40	160	6500	$4,1 \times 10^{-6}$	6100	$4,4 \times 10^{-6}$	5100	$5,3 \times 10^{-6}$
6	50	50	150	6500	$7,7 \times 10^{-6}$	6100	$8,2 \times 10^{-6}$	5100	$9,8 \times 10^{-6}$
7	35	65	135	6700	18×10^{-6}	6200	19×10^{-6}	5200	23×10^{-6}
8	25	75	125	6700	33×10^{-6}	6200	36×10^{-6}	5200	43×10^{-6}
9	15	85	115	6800	71×10^{-6}	6300	76×10^{-6}	5300	91×10^{-6}
10	10	90	110	6800	120×10^{-6}	6300	129×10^{-6}	5300	150×10^{-6}
11	5	95	105	6900	260×10^{-6}	6500	274×10^{-6}	5400	330×10^{-6}

Bringt man die grüne Alge aus ihrer Nährlösung in derartige Carbonat-Bicarbonatgemische, so tritt zunächst keine Schädigung ein; die Zeit, bis die ersten Anzeichen einer Schädigung bemerkbar werden, ist für die verschiedenen Gemische verschieden, und um so kürzer, je höher die OH-Ionenkonzentration ist.

¹⁾ Landolt-Börnstein, Tabellen, S. 874, 1912. Den Hinweis verdanke ich der Freundlichkeit des Herrn Prof. F. Auerbach.

tration. Gemisch 9 mit einer OH-Ionenkonzentration von $10^{-4.8}$ läßt die Zellen bei tagelanger Einwirkung intakt. Gemisch 1 — das Gemisch höchster OH-Ionenkonzentration — schädigt bei 25° schon bei 5- bis 6stündiger Einwirkung, bei 10° sehr viel langsamer. Im allgemeinen wurde mit Gemisch 9 gearbeitet, mit den Gemischen 1 bis 8 nur zur Lösung einer besonderen Fragestellung, wobei die Versuchszeiten einige Stunden nicht überschritten.

Belichtet man die Alge in den Carbonatgemischen, so wird durch Zersetzung der Kohlensäure das Gleichgewicht gestört; es zerfällt neues Bicarbonat in Carbonat und Kohlensäure, und die Konzentrationen der Salze — somit auch die Konzentration der Kohlensäure — ändern sich. Ist der Kohlensäureverbrauch jedoch klein gegen die Menge der Salze, so fällt die Änderung der Konzentrationen nicht ins Gewicht und die Carbonatgemische spielen die Rolle von Puffergemischen im Sinne von L. J. Henderson¹⁾ und Sörensen²⁾.

Die „Resistenz“ des am meisten benutzten Puffergemisches, des Gemisches 9, soll als Beispiel berechnet werden. Für dieses Gemisch ist bei 25° :

$$\begin{aligned}c_{\text{NaHCO}_3} &= 0,085 \text{ Mole pro Liter} \\c_{\text{Na}_2\text{CO}_3} &= 0,015 \text{ " " " } \\c_{\text{CO}_2} &= 91 \times 10^{-6} \text{ Mole pro Liter} \\K' &= 5,3 \times 10^3 \text{ " " " }\end{aligned}$$

Entziehen wir 10 ccm des Gemisches 0,2 ccm Kohlensäure, so nehmen wir pro Liter $0,9 \times 10^{-3}$ Mole Kohlensäure heraus, wobei die gleiche Zahl an Na_2CO_3 Molekülen entsteht, die doppelte Zahl an NaHCO_3 Molekülen verschwindet. Aus Gleichung 4 berechnet sich

$$c_{\text{CO}_2} = \frac{(0,085 - 1,8 \times 10^{-3})^2}{(0,015 + 0,9 \times 10^{-3}) \times 5,3 \times 10^3} = 82 \times 10^{-6},$$

c_{CO_2} sinkt also von 91×10^{-6} auf 82×10^{-6} oder um ca. 10% .

Berechnung der Assimilation.

Wir denken uns ein abgeschlossenes Gefäß zum Teil mit einem algenhaltigen Carbonatgemisch, zum Teil mit Luft ge-

¹⁾ Ergebnisse der Physiologie 8, 254, 1909.

²⁾ Ergebnisse der Physiologie 12, 393, 1912.

füllt. Bei Belichtung sollen x cmm Kohlensäure in x cmm Sauerstoff umgewandelt werden.

Bezeichnen wir mit

v_G das Volumen des Gasraums in ccm,

v_F " " der Flüssigkeit in ccm,

α^1) den Absorptionskoeffizienten des Sauerstoffs bei der Temperatur T ,

T die Temperatur in absoluter Zählung,

P den Partialdruck des Sauerstoffs vor der Belichtung,

p den Partialdruck des Sauerstoffs nach der Belichtung

} in mm
Brodiescher
Flüssigkeit,

so ist

$$x = p - P \left[\frac{v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha}{10} \right],$$

oder, wenn $(p - P) = h$ gesetzt wird

$$x = h \left[\frac{v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha}{10} \right]. \quad (7)$$

x ist also proportional h und unabhängig vom Anfangs-Partialdruck des Sauerstoffs.

Der eingeklammerte Ausdruck ist für bestimmte Abmessungen und eine bestimmte Temperatur eine Konstante; er wird für jedes Gefäß einmalig berechnet und ergibt die entwickelte Sauerstoffmenge in cmm für eine Änderung des Sauerstoffpartialdrucks von 1 mm.

Die beobachtete Druckänderung war ohne merklichen Fehler gleich h , der Änderung des Sauerstoffpartialdrucks, zu setzen, indem die Änderung des Kohlensäurepartialdrucks nicht ins Gewicht fiel. Wurde $v_G = 5$, $v_F = 10$ gemacht, so ergab sich für die Konstante bei 25° der Wert von 0,5, das heißt: wenn 0,5 cmm Kohlensäure zersetzt wurden, änderte sich der Sauerstoffpartialdruck um 1 mm, oder um 400 mm, wenn 200 cmm Kohlensäure zersetzt wurden. Der Kohlensäurepartialdruck des Carbonatgemisches 9 ist bei $25^\circ = 0,27 \times 10^{-2}$ Atmosphären

¹⁾ Für α ist ohne merklichen Fehler stets der Absorptionskoeffizient in Wasser zu setzen. Über die Abweichungen vgl. Geffken, Zeitschr. f. physikal. Chem. 49, 257, 1904.

oder = 27 mm unserer Manometerflüssigkeit, er änderte sich nach der gegebenen Berechnung um 10% oder 3 mm, wenn aus 10 ccm des Gemischs 200 cmm Kohlensäure fortgenommen wurden. Die Änderung des Kohlensäurepartialdrucks beträgt also weniger als 1% von der Änderung des Gesamtdrucks, ist mithin zu vernachlässigen. Noch günstiger liegen die Verhältnisse für die resistenteren Carbonatgemische mittlerer Zusammensetzung.

Was den Einfluß auf die Geschwindigkeit der Assimilation betrifft, so fällt eine Änderung des Kohlensäurepartialdrucks um so mehr ins Gewicht (vgl. Abschnitt III), je niedriger der Anfangsdruck ist. In allen Fällen ließen sich die Versuche so anordnen, daß der Kohlensäureverbrauch die Geschwindigkeit nicht merklich verminderte.

Ausführung der Messungen.

Eine mehrtägige Kultur wurde aus den Kolben (Fig. 1) in ein Zentrifugierglas gespült und zunächst einige Minuten bei niedriger Tourenzahl zur Entfernung von Salzniederschlägen zentrifugiert. Die in der überstehenden Flüssigkeit befindlichen Zellen wurden dann zweimal auf der Zentrifuge bei hoher Tourenzahl mit Knopscher Lösung gewaschen, für Versuche mit Carbonatgemischen zuletzt mit $\frac{1}{10}$ molar NaNO_3 -Lösung, damit beim Eingießen in die Carbonatgemische keine Niederschläge entstanden.

Die geeignete Dichte der Suspensionen wurde zunächst durch Vorversuche bestimmt; war dies einmal geschehen, so wurden Standardsuspensionen von bekanntem Assimilationsvermögen im Eisschrank aufbewahrt und späterhin frische Kulturen durch colorimetrischen Vergleich mit den Standardsuspensionen auf passende Verdünnungen gebracht. Man sparte so die täglichen Vorversuche; selbstverständlich aber durften Messungen nicht auf gleiche Färbungen bezogen werden, sondern nur auf gleiche Zellmengen ein- und derselben Suspension. Jeder Versuch stellte, mit allen erforderlichen Kontrollen, ein in sich abgeschlossenes Ganze dar; die Kenntnis absoluter Werte war in keinem Fall erforderlich.

Die Assimilation wurde bestimmt als Differenz der Druckänderungen, die in einem belichteten und einem verdunkelten

Gefäß auftraten¹⁾. „Dunkel-“ und „Hellgefäß“ waren gleich groß und mit gleichen Mengen Zellsuspension beschickt; sie unterschieden sich voneinander nur dadurch, daß das eine eine Metallhülse zur Ablendung des Lichts trug. War die Atmung nicht klein im Vergleich zur Assimilation, so wurde sie vielfach nicht nur gleichzeitig mit der Assimilation, sondern auch vorher und nachher gemessen²⁾.

Alle Versuche wurden in Wasserthermostaten ausgeführt deren Temperatur auf $\frac{1}{10}$ Grad konstant gehalten werden konnte. Auch bei höchster Beleuchtungsstärke entstanden zwischen Thermostatenwasser und den Zellsuspensionen keine größeren Temperaturdifferenzen, als $\frac{1}{10}$ Grad.

Die Fehler, die durch die Abmessung der Zellen entstanden, waren die Ablesungsfehler der Pipetten, der Fehler einer Druckmessung betrug etwa $\frac{1}{2}$ mm. Weder diese Fehler, noch Unsicherheiten durch Schwankungen der Lichtstärke (vgl. den Anfang dieses Abschnitts) kamen in Betracht gegen Schwankungen der Leistung infolge der Inkonstanz innerer Faktoren. Im allgemeinen blieb die Leistung, wenn die Vermehrung verhindert wurde, unter konstanten äußeren Bedingungen während der Versuche innerhalb 5% konstant, doch wurden vereinzelt auch Schwankungen bis zu 20% beobachtet. Wenn irgend möglich, wurden deshalb am Schluß eines Versuches die Anfangsbedingungen wieder hergestellt, um festzustellen, wie weit die Leistung unter gleichen äußeren Bedingungen als konstant zu betrachten war.

Es folgt nunmehr die Beschreibung der einzelnen Anordnungen, die Verfahren zur Messung sowohl der Atmung, als auch der Assimilation sind und sich im Anschluß an früher beschriebene Methoden entwickelt haben³⁾. Als Manometer benutzte ich die Haldane-Barcroft'schen Blutgasmanometer⁴⁾,

¹⁾ Dieses Verfahren ist nicht unter allen Umständen richtig; in einer späteren Mitteilung wird gezeigt werden, daß der Atmungsprozeß in der belichteten Zelle rückgängig gemacht wird, ehe sich Kohlensäure bildet.

²⁾ Vgl. hierzu Kreuzler, Landwirtsch. Jahrbücher 14, 913, 1885.

³⁾ Siebeck, In Abderhalden, Biochem. Arbeitsmethoden 1915.

⁴⁾ J. Barcroft, Ergebnisse der Physiologie 7, 699, 1908.

die sich wiederum, wie schon früher bei den Atmungsstudien, ausgezeichnet bewährt haben¹⁾.

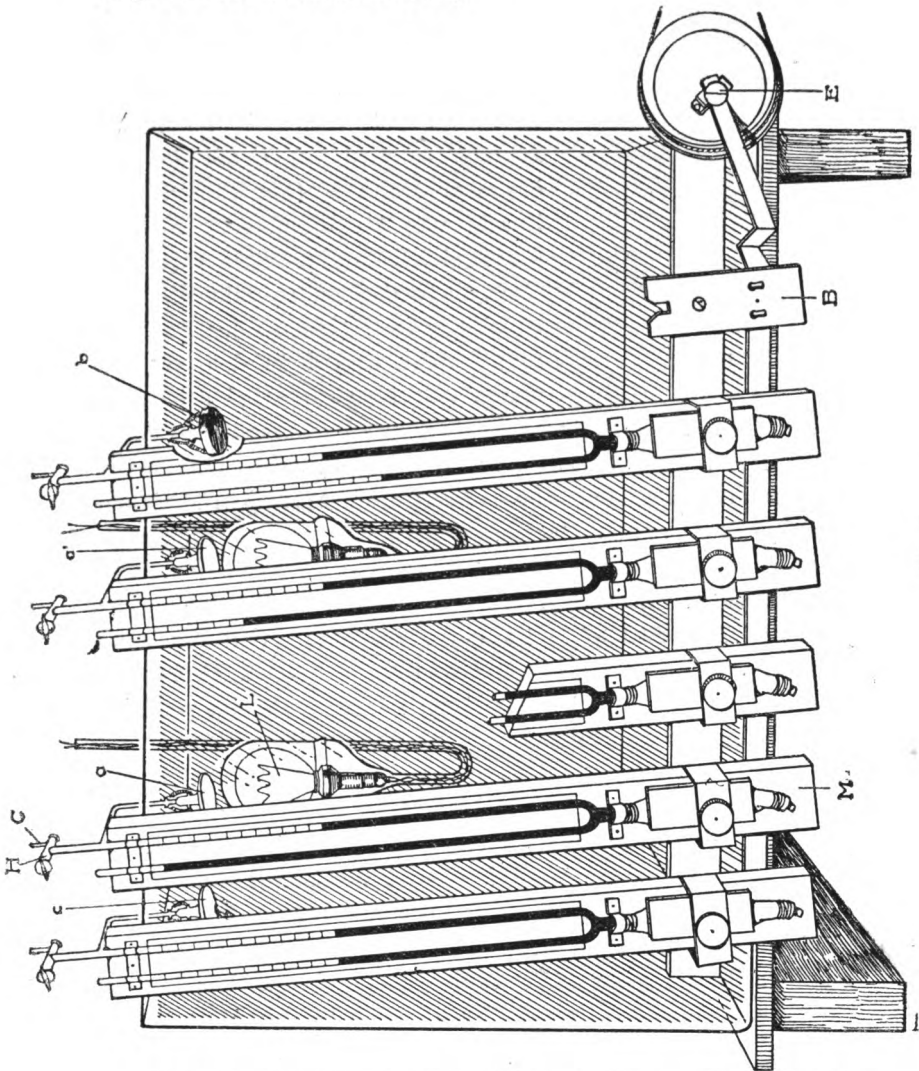


Fig. 2.

Anordnung I (Fig. 2). Die Lichtquellen, $\frac{1}{1}$ Watt-Metallfadenlampen von 40 Watt Stromverbrauch, sind in wasserdichten Glasgehäusen in das Wasser des Thermostaten versenkt; ihr

¹⁾ Die Glasgefäße wurden von der Firma Hanff & Buest, Berlin, Luisenstraße, die übrigen Geräte von den Mechanikern Schluder und Nägelein Berlin-Dahlem, Boltzmannstraße, hergestellt.

leuchtender Faden kann den Assimilationsgefäßen aa_1 bis auf 4 cm genähert werden. Der Rauminhalt der Assimilationsgefäße (Fig. 3) beträgt etwa 15 ccm. Zum Versuch werden sie mit je 10 ccm Zellsuspension beschickt und durch einen Glas-

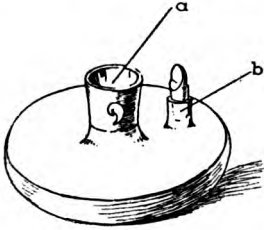


Fig. 3.

schliff mit den Manometern verbunden. Arbeitet man mit Knopscher Lösung, so wird von C aus bei geöffnetem Hahn H (Fig. 2) Luft mit Zusatz von 4 Volumprozent Kohlensäure eingeleitet, arbeitet man mit Carbonatgemischen, so fällt die Gas-einleitung fort. Manometer und Gefäße werden darauf in den Thermostaten eingehängt und bei geöffneten

Hähnen H 10 Minuten durch Bewegen der Exzenterscheibe E geschüttelt, bis Temperatur- und Druckgleichgewicht eingetreten ist. Dann unterbricht man das Schütteln, stellt die Sperrflüssigkeit der Manometer auf eine bestimmte Marke ein, schließt die Hähne H und entzündet die Lampen unter den „Hellgefäßen“. Die „Dunkelgefäße“ b tragen Metallkappen zum Schutze gegen seitliche Beleuchtung. c ist ein „Leergefäß“ und dient als Thermobarometer. Unter fortgesetztem Schütteln beobachtet man nunmehr die Druckänderungen; nachdem sie eine passende Höhe erreicht haben, unterbricht man das Schütteln, stellt die Sperrflüssigkeit auf ihren Anfangsstand ein und erhält so die Druckänderungen bei konstantem Volumen, die durch den Ausschlag des Thermobarometers auf die Anfangstemperatur und den Anfangsaußendruck korrigiert werden. Die korrigierten Druckänderungen, mit den Gefäßkonstanten multipliziert (Gleichung 2 oder 7) ergeben den Gaswechsel im Hellen und Dunkeln, die Differenz dieser Werte ist gleich der Assimilation.

Ein Vorzug der Anordnung ist die Möglichkeit, in kurzen Intervallen abzulesen und so den „Gang“ der Prozesse zu beobachten; ein Nachteil, daß jedes einzelne Assimilationsgefäß durch eine gesonderte Lichtquelle beleuchtet wird. Die Anordnung eignet sich im wesentlichen für Beeinflussungsversuche bei hohen Beleuchtungsstärken, bei denen erhebliche Unterschiede in der Beleuchtung die Assimilationsleistung nicht ändern.

Anordnung II unterscheidet sich hinsichtlich der Ap-

paratur von Anordnung I nur durch die Form der Assimilationsgefäße (Fig. 4). Der Rauminhalt der Gefäße beträgt etwa 15 ccm, die Zellsuspensionen, 1 bis 2 ccm, werden auf den flachen Boden gebracht. Der Tubus *b* dient zur Aufnahme von Absorptionsmitteln, aus dem Ansatz *c* können der Zellsuspension, ohne daß die Messung unterbrochen wird, Substanzen zugefügt werden.

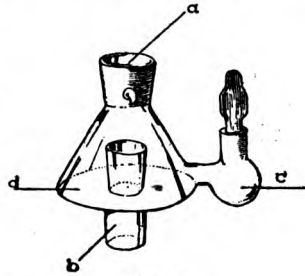


Fig. 4.

Ist der Gasraum mit Luft, der Tubus *b* mit verdünnter Kalilauge gefüllt, so wird der Gasraum frei von Kohlensäure gehalten und das Manometer zeigt nur Änderungen des Sauerstoffdrucks an; ist der Gasraum mit Kohlensäure und einem indifferenten Gas, wie Stickstoff oder Wasserstoff, gefüllt, der Einsatz *b* mit einer sauerstoffabsorbierenden Flüssigkeit, so wird der Gasraum frei von Sauerstoff gehalten und das Manometer zeigt nur Änderungen des Kohlensäuredrucks an. Bedeckt man den Boden *d* des Gefäßes mit lebenden grünen Zellen und belichtet, so wird im ersten Fall dem Gasraum um soviel weniger Sauerstoff entnommen, als im Assimilationsprozeß entsteht, die Druckänderung ist im Hellen geringer als im Dunkeln; im zweiten Fall ist die Druckänderung im Dunkeln Null bei Belichtung erscheint ein negativer Druck, entsprechend einem Verbrauch an Kohlensäure.

Die Anordnung diente zur Lösung von Fragenstellungen, die im folgenden nicht berührt sind.

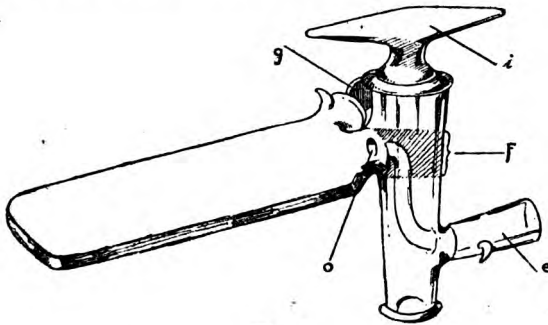


Fig. 5.

Anordnung III. Das Assimilationsgefäß (Fig. 5), dessen Rauminhalt etwa 15 ccm beträgt, wird durch den Schliff *e* mit dem Haldane-Barcroft'schen Manometer verbunden, von dem Tubus *g* aus mit der Zellsuspension, meist 10 ccm, beschickt. Sättigung mit Gasen erfolgt, indem man bei *g* ein bis auf den Boden des Gefäßes reichendes Glasröhrchen einführt. Der bei *F* nicht eingefettete Hahn *i* ermöglicht es, das Assimilations-

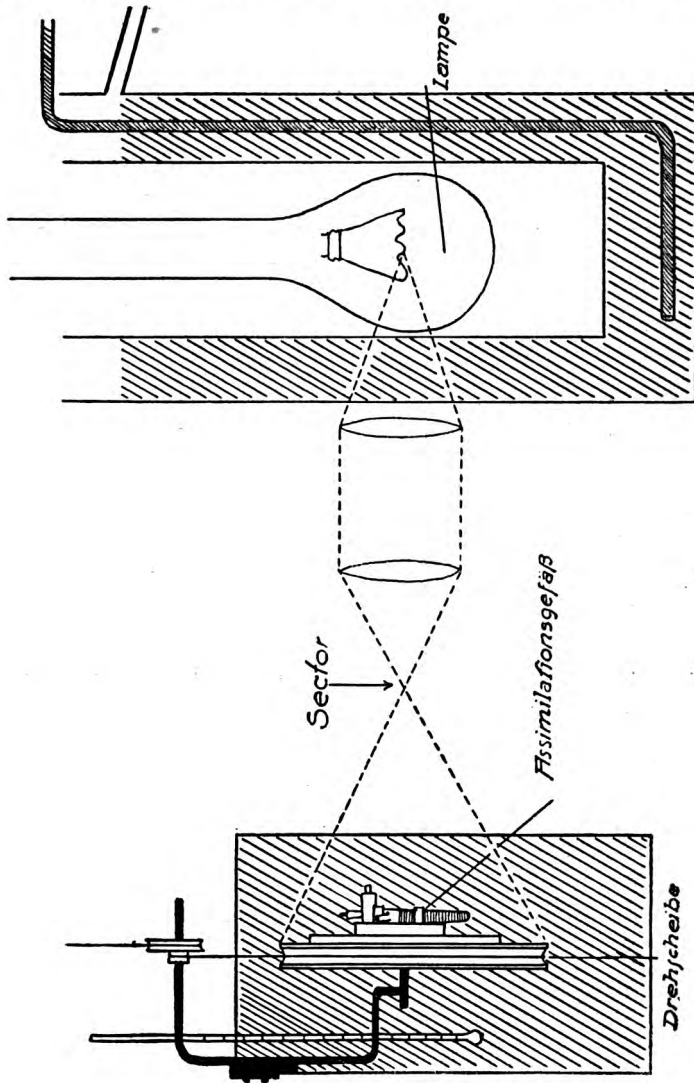


Fig. 6.

gefäß gasdicht zu verschließen und die Belichtung getrennt von dem Manometer vorzunehmen.

In dem „Meßthermostaten“ wird zunächst durch Schütteln Temperatur- und Druckgleichgewicht herbeigeführt. Dann schließt man den Hahn *i* unter Wasser, trennt das Gefäß von dem Manometer und befestigt es auf einer sich langsam drehenden Scheibe in dem „Belichtungsthermostaten“, einer Wanne aus Eisenblech, die einen durch eine Spiegelglasscheibe verschlossenen Ausschnitt trägt (Fig. 6).

Die Lichtquelle, eine $\frac{1}{2}$ -Watt-Metallfadenlampe, ist außerhalb des Belichtungsthermostaten aufgehängt; in den Versuchen mit den rotierenden Sektorscheiben schaltet man zwischen Lichtquelle und Assimilationsgefäß ein Kondensorsystem (Fig. 6), im übrigen wird ohne Linsen gearbeitet. In den Versuchen mit variierenden Beleuchtungsstärken steht die Lichtquelle fest, der Belichtungsthermostat ist auf einer Schiene verschiebbar; das reflektierte Licht wird, wie in der Photometrie üblich, durch geschwärzte Schirme von dem Assimilationsgefäß ferngehalten.

Nach einer passenden Zeit entfernt man das Assimilationsgefäß von der Drehscheibe, verbindet mit dem Manometer, hängt in den Meßthermostaten ein und öffnet, nachdem Temperaturgleichgewicht eingetreten ist, den Hahn *i*. Der hierbei auftretende Druck wird mitteis eines Thermobarometers auf konstante Anfangsbedingungen reduziert. Die reduzierte Druckänderung, mit der Gefäßkonstante (Gleichung 2 oder 7) multipliziert, ergibt den Gaswechsel, die Differenz des Gaswechsels im Hellen und Dunkeln die Assimilation.

Die Anordnung ist von den beschriebenen die genaueste und hat sich im Lauf von über 1000 Messungen bewährt. Durch die Möglichkeit, die Belichtung getrennt von dem Manometer vorzunehmen, wird die Freiheit der Experimente außerordentlich erweitert, ohne daß sich irgendwelche Nachteile ergeben hätten. Werden mehrere Assimilationsgefäße symmetrisch zur Lichtquelle auf der Drehscheibe befestigt, so sind die Beleuchtungsverhältnisse für die verschiedenen Gefäße völlig gleich und der Einfluß variierender Beleuchtungsstärken auf verschieden behandelte Zellen kann in sehr genauer Weise ermittelt werden.

Anordnung IV. Der Rauminhalt des Assimilationsgefäßes (Fig. 7) beträgt 15 bis 20 ccm. Zum Versuch füllt man durch den Tubus einige Kubikzentimeter Zellsuspension ein, setzt bei

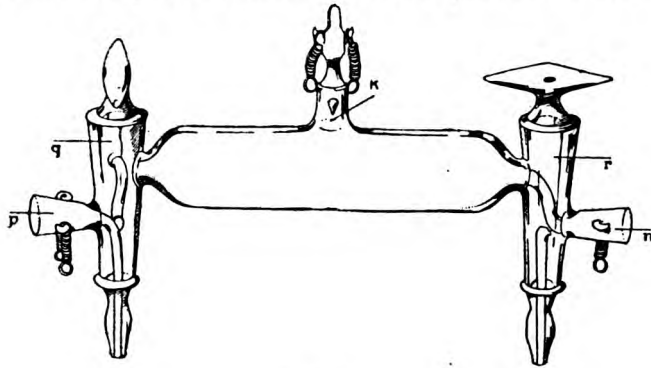


Fig. 7.

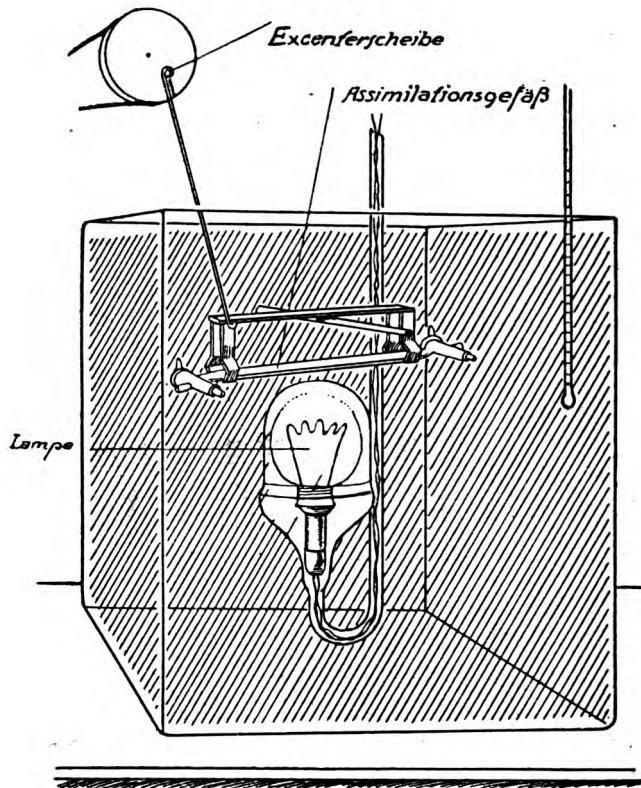


Fig. 8.

p und w rechtwinklig gebogene Gas-Zu und -ableitungsröhren an, versenkt das Ganze in einen Wasserthermostaten, leitet bei geöffneten Hähnen q und r unter ständigem Schütteln 10 Minuten eine Gasmischung bekannter Zusammensetzung durch, schließt dann die Hähne und bringt das Gefäß in den Belichtungsthermostaten (Fig. 8).

Die Lichtquelle ist eine $\frac{1}{11}$ -Watt-Metallfadenlampe von 40 Watt Stromverbrauch, ihr leuchtender Faden kann bis auf etwa 4 cm dem Assimilationsgefäß genähert werden.

Während des Versuchs wird das Assimilationsgefäß durch die Exzentrerscheibe geschüttelt. Nach einer passenden Zeit nimmt man das Gefäß heraus, verbindet es mit einem Haldaneschen Analysenapparat und ermittelt die Zusammensetzung des Gasinhalts in bekannter Weise. Auf den Hellversuch folgt der Dunkelversuch, aus der Differenz des Gaswechsels im Hellen und Dunkeln ergibt sich die Assimilation.

Die Anordnung ist umständlicher als I, II, und III und diente lediglich zur Kontrolle der Druckverfahren.

Die rotierenden Sektorscheiben.

Zur periodischen Erhellung und Verdunkelung in kurzen Intervallen wurden zwischen Lichtquelle und Assimilationsgefäß rotierende Scheiben eingeschaltet, die mit einem oder mehreren Ausschnitten versehen waren (Fig. 9.). Der Umfang der Ausschnitte war in allen Fällen gleich dem halben Scheiben-

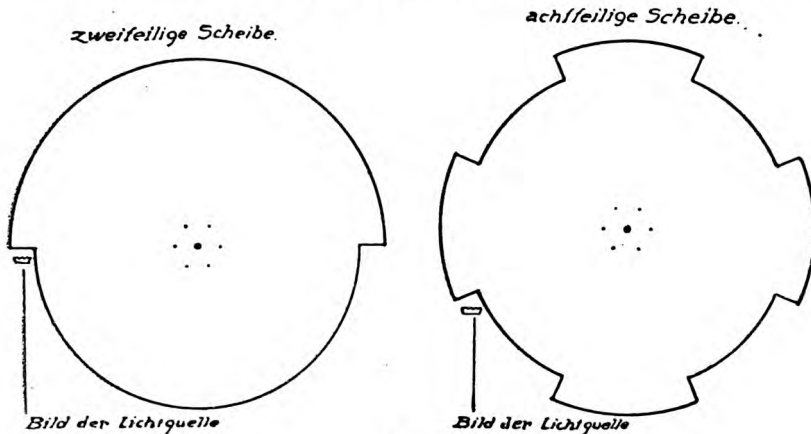


Fig. 9.

umfang, so daß während einer Umdrehung die Hälfte des Lichts abgeschnitten wurde.

Als Antrieb diente ein Gleichstrommotor. Die Tourenzahl wurde zwischen 2 und 2000 pro Minute variiert und mittels eines Zählers oder nach der Stimmgabelmethode gemessen. Bezeichnen wir mit T die Tourenzahl der Scheibe pro Minute, mit S die Zahl der Scheibenausschnitte, so war die Dauer einer Verdunkelung oder Erhellung

$$t = \frac{60}{T \times 2 S} \text{ Sekunden.} \quad (9)$$

Als Lichtquelle diente eine $\frac{1}{2}$ -Watt-Metallfadenlampe von 1500 Watt Stromverbrauch; ihr leuchtender Draht wurde in der Ebene der vertikal stehenden Sektorscheibe so abgebildet, daß die Höhe des Bildes etwa 1,2 cm betrug.

Rotiert die Scheibe, so liegen zwischen den Perioden völliger Erhellung und Verdunkelung Übergangsperioden zunehmender und abnehmender Helligkeit; diese müssen nach Möglichkeit verkleinert werden und fallen um so weniger ins Gewicht, je kleiner das Lichtquellenbild im Vergleich zu dem Umfang eines Scheibenausschnittes. Bei einem Scheibendurchmesser von 50 cm betrug die Übergangsperiode für die zweiteilige Scheibe 2%, für die achteilige Scheibe 8% der reinen Erhellungs- oder Verdunkelungsperiode. Kam es nicht auf Erzielung besonders kurzer Perioden an, so wurde stets mit der zweiteiligen Scheibe gearbeitet.

III. Einfluß der Kohlensäurekonzentration.

Mittels der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Carbonatgemische wurden 8 verschiedene Kohlensäurekonzentrationen hergestellt, die zwischen $0,53 \times 10^{-6}$ und 91×10^{-6} Molen pro Liter lagen. Die Konzentration, die mit 0,03 Volumprozent oder dem normalen Kohlensäureteildruck der Atmosphäre im Gleichgewicht ist, beträgt bei 25° und für Wasser etwa 10×10^{-6} , so daß also die Konzentrationen von $\frac{1}{20}$ bis auf das 10fache der atmosphärischen Sättigungskonzentration variiert wurden.

Gleiche Zellmengen wurden zu gleichen Volumina der verschiedenen Carbonatgemische gegeben, und die Assimilations-

leistungen in je 10 ccm bei hoher und konstanter Beleuchtungsstärke nach Anordnung III bestimmt.

Tabelle II.

Beleuchtungsstärke 16^1). 25° . $1 \text{ mm} = 0,67 \text{ omm } \text{CO}_2$.

Nr. des Carbonatgemischs ²⁾	$\text{CO}_2 =$ in Molen pro Liter	Dauer des Versuchs in Minuten	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm	Assimilation in mm pro Stunde
1	$0,53 \times 10^{-6}$	60	29	29
2	$1,0 \times 10^{-6}$	60	47	47
4	$2,6 \times 10^{-6}$	30	60	120
5	$5,3 \times 10^{-6}$	30	72	144
6	$9,8 \times 10^{-6}$	30	89	178
7	23×10^{-6}	30	101	202
8	43×10^{-6}	30	107	214
9	91×10^{-6}	30	121	242

Tabelle II und die graphische Darstellung Fig. 10 zeigen, daß die Assimilationsgeschwindigkeit bei niedrigen Kohlensäurekonzentrationen nahezu proportional der Kohlensäurekonzentration wächst; bei höheren Kohlensäurekonzentrationen, etwa von 2×10^{-6} Molen pro Liter an, entspricht einem bestimmten Zuwachs der Konzentration ein stetig kleiner werdender Zuwachs der Assimilationsgeschwindigkeit, die schließlich unabhängig von der Konzentration wird.

Die Form der Kurve wird verständlich, wenn wir die Geschwindigkeit der Assimilation proportional der Konzentration der Kohlensäure und der Konzentration eines zweiten Stoffes setzen, mit dem die Kohlensäure reagiert³⁾. Bezeichnen wir mit A die in der Zelle vorhandene Gesamtmenge dieses zweiten Stoffes, mit x und $A-x$ die jeweils in freiem und gebundenem Zustand vorhandenen Mengen, mit c_{CO_2} die Konzentration der Kohlensäure, so wäre im stationären Zustand $\frac{c_{\text{CO}_2} \cdot x}{A-x}$ konstant.

Hierbei nehmen wir also an, daß die Geschwindigkeit der Assimilation bei allen, auch den niedrigsten Kohlensäurekon-

¹⁾ Vgl. Abschnitt IV.

²⁾ Vgl. Tabelle I.

³⁾ Vgl. hierzu die Entdeckung Willstaetters (l. c. S. 172 u. 226 ff.), daß die Kohlensäure mit Bestandteilen grüner Zellen chemische Verbindungen eingeht.

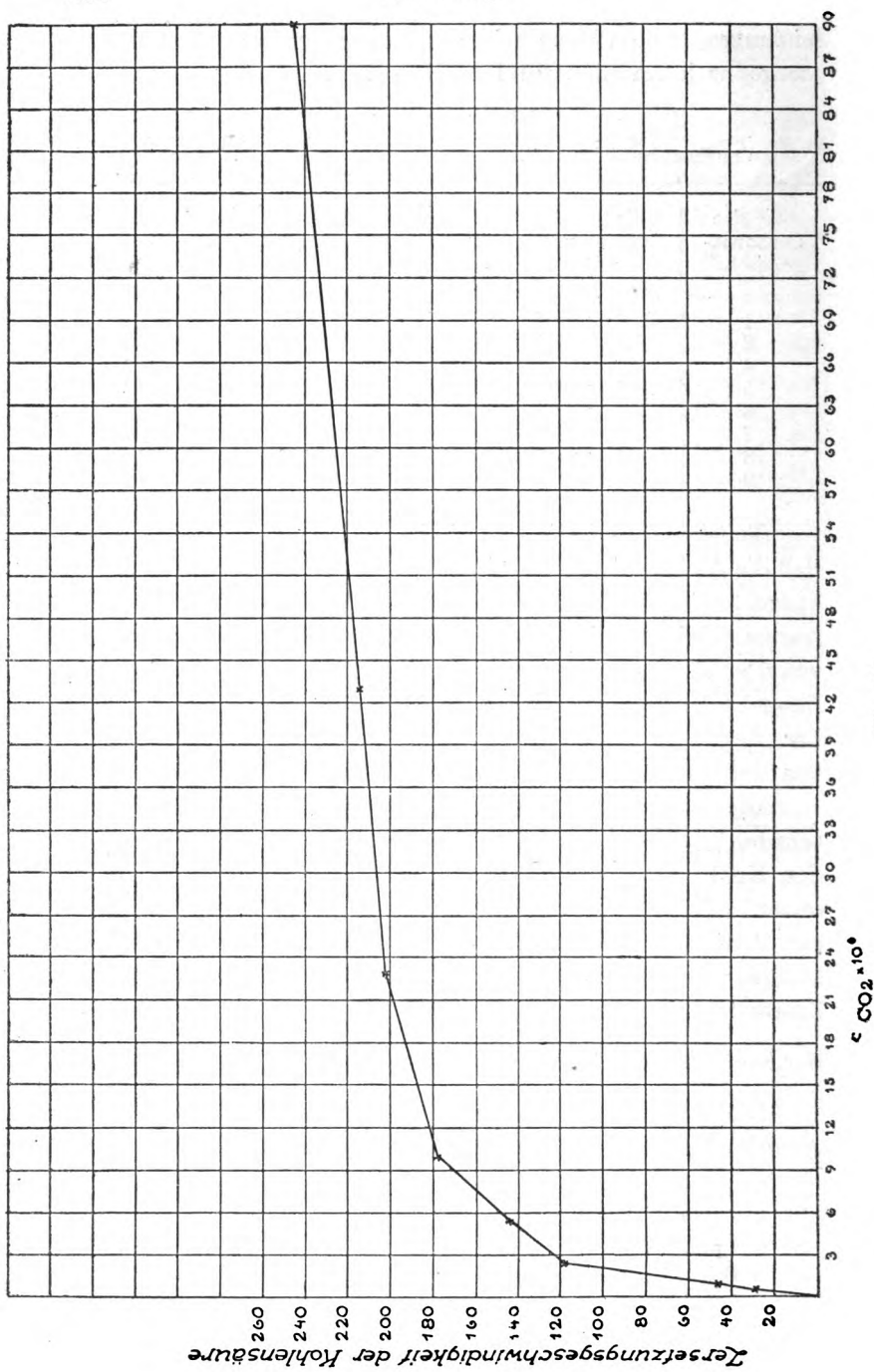


Fig. 10.

zentrationen, nicht durch die Diffusion, sondern durch eine chemische Reaktion bestimmt wird. Für die Richtigkeit dieser Annahme spricht, daß bei niedrigen Kohlensäurekonzentrationen eine Temperatursteigerung von 10° die Assimilationsgeschwindigkeit etwa vervierfachte bis verfünffachte (vgl. Abschnitt V).

Die Konzentrationsgeschwindigkeitskurven, die früher¹⁾ in Versuchen an grünen Blättern erhalten wurden, zeigen recht erhebliche Abweichungen von der Form unsrer Kurve; so geht nach Blackman¹⁾ die gerade ansteigende Linie, die dem Gebiet proportionalen Wachstums entspricht, durch einen scharfen Knick in eine zur Abszissenachse parallele Linie über. In diesen sowohl als auch in den übrigen früher beschriebenen Versuchen bestand jedoch bei niedrigen Kohlensäurekonzentrationen zwischen der Außenkonzentration und der Konzentration an den Reaktionsorten kein Gleichgewicht, so daß die Assimilationsgeschwindigkeit vorwiegend oder zum Teil durch die Diffusion bestimmt wurde. In der Formel für die Assimilationsgeschwindigkeit im stationären Zustand kommt dann eine Konstante hinzu und das Abhängigkeitsverhältnis wird ein komplizierteres als in unserm Fall.

IV. Einfluß der Beleuchtungsstärke.

Die Beleuchtungsstärken wurden durch Veränderung der Entfernung zwischen Lichtquelle und Assimilationsgefäß variiert, ihre relativen Größen nach dem Entfernungsgesetz berechnet. Je größer die räumliche Ausdehnung der Lichtquelle und je geringer ihr Abstand vom Assimilationsgefäß, um so ungenauer wird die Berechnung; doch betrug nach Bestimmungen, die mit meiner Versuchslampe in der Physikalisch-Technischen Reichsanstalt ausgeführt wurden²⁾, die Fehler nicht mehr als 3%, wenn die Lampe dem Assimilationsgefäß bis auf 20 cm genähert wurde.

¹⁾ Kreuzler, Landwirt. Jahrbücher 14, 913, 1885. — Brown u. Escombe, Proc. Roy. Soc. London 70, 397, 1902. — Blackman u. Smith, Proc. Roy. Soc. London Ser. B. 83, 389, 1911.

²⁾ Herrn Geheimrat Liebenthal von der Physikalisch-Technischen Reichsanstalt spreche ich auch hier für die Ausführung der Bestimmungen meinen herzlichen Dank aus.

Die Suspensionsflüssigkeit war das Carbonatgemisch 9 (Tabelle I), die Konzentration der Kohlensäure somit 91×10^{-6} oder so hoch, daß kleine Änderungen der Konzentration die Assimilationsgeschwindigkeit nicht merklich beeinflussen.

Die Versuche werden um so reiner, je weniger das Licht beim Durchgang durch das Assimilationsgefäß geschwächt wird. Ich arbeitete deshalb mit möglichst dünnen Zellsuspensionen, die von dem auffallenden Licht nur 10 bis 20% absorbierten¹⁾.

Tabelle III.

 $\text{CCO}_2 = 91 \times 10^{-6}$.

25°.

1 mm = 0,67 cmm CO_2 .

Stromverbrauch der Lampe bei normaler Belastung Watt	Abstand der Lampe vom Assimilations- gefäß cm	Relative Be- leuchtungs- stärke	Dauer des Ver- suches Min.	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm	Assimilation in mm pro Stunde
300	80	1	60	45	45
300	56,5	2	30	41	82
300	40	4	20	45	135
300	30	7,1	15	43	172
300	20	16	15	55	220
1500	20	ca. 45	15	60	(240)

Zur Messung wurde je 10 ccm Zellsuspension in ein Assimilationsgefäß pipettiert und weiterhin nach Anordnung III verfahren. Ein Beispiel ist in Tabelle III und der graphischen Darstellung (Fig. 11) wiedergegeben. Die Geschwindigkeit für die höchste Beleuchtungsstärke, deren relative Größe nur ungenau definiert ist, wurde in die graphische Darstellung nicht aufgenommen und ist in der Tabelle eingeklammert.

Aus den Zahlen geht hervor, daß bei niedrigen Beleuchtungsstärken die Assimilationsgeschwindigkeit annähernd proportional der Beleuchtungsstärke ist, ein Resultat, das im Einklang mit allen früheren Beobachtungen steht²⁾; bei höheren Beleuchtungsstärken entspricht einem bestimmten Zuwachs

¹⁾ Die Größe der Absorption läßt sich in einfacher Weise bestimmen, indem man bei tiefen Lichtstärken die Assimilationsleistung für verschieden dichte Zellsuspensionen mißt. Die Zelle dient hierbei selbst als Photometer.

²⁾ Pfeffer, Pflanzenphysiologie 1, 324, 1897. — Brown u. Escombe, Proc. Roy. Soc. London, Ser. B. 76, 29, 1905. — Blackman u. Matthaei, Proc. Roy. Soc. London, Ser. B. 76, 402, 1905. — Blackman u. Smith, Proc. Roy. Soc. London, Ser. B. 83, 389 1911.

der Beleuchtungsstärke ein stetig kleiner werdender Zuwachs der Assimilationsgeschwindigkeit, ein Verhalten, das mit Willstaetters¹⁾ Beobachtungen an den gelben Blättern der Ulme und des Hollunders übereinstimmt.

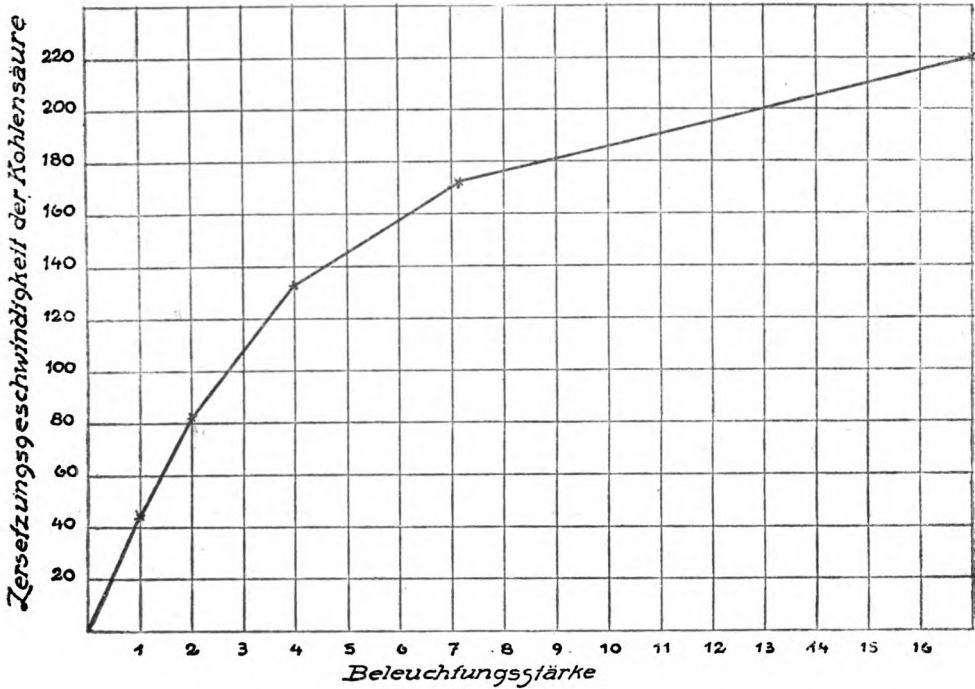


Fig. 11.

Das Bild der Kurve Fig. 11 ist ähnlich der Kurve Fig. 10, die den Einfluß verschiedener Kohlendensäurekonzentrationen bei konstanter Beleuchtungsstärke veranschaulicht; die „Konzentration der Lichtenergie“ wirkt hier wie die Konzentration eines chemischen Stoffes. Diese Übereinstimmung legt die Vermutung nahe, daß jeder Beleuchtungsstärke eine ihr bestimmte Konzentration an photochemischem Primärprodukt entspricht, das nach Maßgabe seiner Konzentration in einer chemischen Reaktion wirksam würde.

Die Form der Kurve Fig. 11 würde dann ebenso wie die Form der Kurve Fig. 10 zu erklären sein, indem wir die Assi-

¹⁾ l. c. S. 149.

milationsgeschwindigkeit proportional der Konzentration des photochemischen Primärproduktes und der Konzentration eines zweiten Stoffes setzten, mit dem das photochemische Primärprodukt reagierte.

V. Einfluß der Temperatur.

Der Belichtungsthermostat war auf Temperaturen zwischen 5 und 32° eingestellt. Die Assimilationsgefäße wurden nach Einbringen in den Belichtungsthermostaten vor Entzündung der Lichtquelle 15 Minuten vorgewärmt oder vorgekühlt. Selbst bei den höchsten Beleuchtungsstärken stieg die Temperatur der Zellsuspensionen nie höher als $\frac{1}{10}$ ° über die Temperatur des Thermostatenwassers. Eine Schwierigkeit, die in Versuchen mit Blättern nie ganz überwunden wurde, die genaue Bestimmung der Temperatur der assimilierenden Zelle, fiel also in unsrer Anordnung fort.

Die Suspensionsflüssigkeiten waren Carbonatgemische oder bei 25° mit 4 Volumprozent Kohlensäure gesättigte Knopsche Lösung; in beiden Flüssigkeiten ändert sich die Konzentration der Kohlensäure mit der Temperatur, im ersten Fall steigt sie, im zweiten Fall sinkt sie, wenn die Temperatur steigt. Bei niedrigen Kohlensäurekonzentrationen müssen diese Änderungen berücksichtigt und die beobachteten Assimilationswerte auf gleiche Kohlensäurekonzentrationen umgerechnet werden. Bei Kohlensäurekonzentrationen von über 1000×10^{-6} sind Korrekturen nicht erforderlich.

Da sich der Temperatureinfluß mit der Temperatur stark ändert, ist es nicht korrekt, Temperaturkoeffizienten für 10° anzugeben. Um jedoch den Vergleich mit früheren Versuchen zu erleichtern, habe ich die Temperaturkoeffizienten in der üblichen Weise für 10° berechnet; sie sind im letzten Stab der Tabelle V, in der einige Versuchsergebnisse zusammengestellt sind, beigefügt.

Betrachten wir zunächst das Verhalten bei hohen Kohlensäurekonzentrationen und Beleuchtungsstärken (Versuch 3, 4 und 5 der Tabelle), so ergibt sich, daß sich der Temperatureinfluß mit der Temperatur sehr stark ändert; in dem Gebiet zwischen 5° und 32° sinkt der Temperaturkoeffizient von 4,3 auf 1,6. Die Assimilation verhält sich in dieser Beziehung ganz ähnlich wie die Atmung, deren Koeffizient in Versuchen an roten

Tabelle IV.

Nr. des Versuchs	Milieu	Temperatur ° C	C _{CO₂} in Molen pro Liter	Beleuchtungs- stärken ¹⁾	Beobachtete Druckdifferenz Hell-Dunkel	Mess- temperatur ° C	Assimilation in mm pro Std.	Auf gleiche CO ₂ - Konzentrationen korrigiert	Temperatur- koeffizient für 10°
1	Carbonat- gemisch 1	5	0,41 × 10 ⁻⁶	16	+ 15 in 120'	10	7,5	8,1	4,7
		10	0,44 × 10 ⁻⁶		+ 35 in 120'	10	17,5	17,5	
	Carbonat- gemisch 2	5	0,78 × 10 ⁻⁶		+ 25 in 120'	10	12,5	13,2	5,0
		10	0,83 × 10 ⁻⁶		+ 59 in 120'	10	29,5	29,5	
2	Carbonat- gemisch 9	5	71 × 10 ⁻⁶	+ 20 in 20'	10	60	61	4,7	
		10	76 × 10 ⁻⁶	+ 44 in 20'	10	132	132		
3	Knopsche Lösung	16	80 × 10 ⁻⁶	16	+ 135 in 60'	25	135	139	2,0
		25	91 × 10 ⁻⁶		+ 127 in 30'	25	254	254	
3	Knopsche Lösung	5,4	mehr als 1000 × 10 ⁻⁶	45	+ 29 in 30'	25	58		4,3
		5,4	1000 × 10 ⁻⁶		+ 29 in 30'	25	58		
		10	1000 × 10 ⁻⁶		+ 57 in 30'	25	114		
		10	1000 × 10 ⁻⁶		+ 61 in 30'	25	122		
4	Knopsche Lösung	10	1000 × 10 ⁻⁶	45	+ 42 in 30'	25	84		2,1
		20	1000 × 10 ⁻⁶		+ 45 in 15'	25	180		
		20	1000 × 10 ⁻⁶		+ 46 in 15'	25	184		
5	Knopsche Lösung	20	1000 × 10 ⁻⁶	45	+ 56 in 15'	25	224		1,6
		30	1000 × 10 ⁻⁶		+ 88 in 15'	25	352		
6	Knopsche Lösung	15	1000 × 10 ⁻⁶	1,8	+ 62 in 30'	25	124		1,06
		25	1000 × 10 ⁻⁶		+ 66 in 30'	25	132		
7	Carbonat- gemisch 9	25	91 × 10 ⁻⁶	1	+ 50 in 15'	25	200	203	1
		32	99 × 10 ⁻⁶		+ 52 in 15'	25	204	204	

Blutzellen zwischen 0° und 38° von 5 auf 2,4 sank²⁾. Für die Assimilation in Blättern wurde bisher eine derartig starke Änderung der Koeffizienten mit der Temperatur nicht beobachtet, Blackman³⁾ berechnete einen konstanten Wert von etwa 2 für den gesamten Temperaturbereich der Assimilation, während nach Kanitz⁴⁾ der Koeffizient zwischen 0° und 37° von 2,4 auf 1,8 fällt. Da jedoch in den Versuchen, auf denen diese Berechnungen beruhen, die Zustände vielfach nicht stationär waren, sondern Zeitfaktoren eine Rolle spielten, ferner die schon erwähnte Schwierigkeit einer genauen Temperaturbestimmung bestand, so ist die Differenz der Werte für Blätter und unsere Grünalge nicht allzu auffallend⁵⁾.

¹⁾ in den Einheiten der Tabelle III.

²⁾ Asher-Spiro, Ergebnisse d. Physiol. 14, 310, 1914.

³⁾ Annales of Botany 19, 281, 1905.

⁴⁾ Temperatur u. Lebensvorgänge, Berlin 1915, S. 18.

⁵⁾ Vgl. von Willstaetter, l. c. S. 152ff.

Versuch 6 und 7 bestätigen die wichtige Entdeckung Blackmans¹⁾, daß sich der Koeffizient bei niedrigen Beleuchtungsstärken dem Wert von 1 nähert.

Versuch 1 zeigt, daß der Koeffizient bei niedrigen Kohlendioxidkonzentrationen 4 bis 5 beträgt, also etwa ebenso hoch ist, wie bei hohen Kohlendioxidkonzentrationen unter sonst gleichen Bedingungen.

VI. Einfluß intermittierender Beleuchtung.

Zur Unterbrechung der Lichtzufuhr dienten die beschriebenen Sektorscheiben (Fig. 8), die während einer Umdrehung die Hälfte des Lichts abschnitten, so daß die Belichtungszeiten gleich der Hälfte der Versuchszeiten waren. Die Dauer einer Belichtungsperiode war gleich der Dauer einer Dunkelperiode und verschieden, je nach der Rotationsgeschwindigkeit der Scheiben und der Zahl ihrer Ausschnitte.

Die Zellen wurden in dem Carbonatgemisch 9 oder in Knopscher Lösung suspendiert, im letzteren Fall unter Sättigung mit 4 Volumprozent Kohlendioxid. Die Kohlendioxidkonzentrationen waren demnach so hoch, daß erhebliche Konzentrationsänderungen die Assimilationsleistungen nicht beeinflußten.

Bei der „hohen Beleuchtungsstärke“ blieb die Assimilationsleistung unverändert, wenn das Licht mittels eines Rauchglases auf die Hälfte geschwächt wurde; bei der „niedrigen Beleuchtungsstärke“ hatte die gleiche Schwächung eine Verminderung der Assimilationsleistung auf etwa die Hälfte zur Folge.

Die Wirkungen intermittierender und kontinuierlicher Beleuchtung wurden verglichen, indem die Assimilationsleistungen nicht auf gleiche Versuchszeiten, sondern auf gleiche Belichtungszeiten bezogen wurden. Die Differenz der Werte für gleiche Belichtungszeiten ist in den Tabellen V bis VIII, in denen einige Messungsergebnisse zusammengestellt sind, als „Mehrleistung des Lichts“ bezeichnet. Sämtliche Messungen, im ganzen über 200, wurden nach Anordnung III ausgeführt.

¹⁾ Annales of Botany 19, 281, 1905.

Tabelle V.

1 mm = 0,67 cmm CO₂.25°. Hohe Beleuchtungsstärke. 2 teilige Sektorscheibe. C_{CO₂} = 91 × 10⁻⁶.

Versuchszeit Min.	Beleuchtungszeit Min.	Tourenzahl des Sektors pro Minute	Dauer einer Periode in Sek.	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm	Mehrleistung des Lichts bei inter- mittierender Beleuchtung
15	15	0 (kontin.)		+ 31	
30	15	2	15	+ 37	14 %
15	15	0 (kontin.)		+ 34	
30	15	20	1,5	+ 45	36 %
15	15	0 (kontin.)		+ 32	
30	15	200	0,15	+ 50	56 %
30	15	2000	0,015	+ 55	72 %
15	15	0 (kontin.)		+ 32	

Tabelle VI.

1 mm = 0,67 cmm CO₂.25°. Hohe Beleuchtungsstärke. 8 teilige Sektorscheibe. C_{CO₂} = 91 × 10⁻⁶.

Versuchszeit Min.	Beleuchtungszeit Min.	Tourenzahl des Sektors pro Minute	Dauer einer Periode in Sek.	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm	Mehrleistung des Lichts bei inter- mittierender Beleuchtung
15	15	0 (kontin.)		+ 49	
30	15	2000	0,0038	+ 94	96 %
30	15	200	0,038	+ 85	77 %
15	15	0 (kontin.)		+ 46	
30	15	20	0,38	+ 70	46 %

Tabelle VII.

1 mm = 1,04 cmm CO₂.25°. Hohe Beleuchtungsstärke. 8 teilige Sektorscheibe. C_{CO₂} = 1360 × 10⁻⁶.

Versuchszeit Min.	Beleuchtungszeit Min.	Tourenzahl des Sektors pro Minute	Dauer einer Periode in Sek.	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm	Mehrleistung des Lichts bei inter- mittierender Beleuchtung
15	15	0 (kontin.)		+ 30	
30	15	2000	0,0038	+ 60	88 %
15	15	0 (kontin.)		+ 33	

Tabelle VIII.

1 mm = 0,67 cmm CO₂.

25°. Niedrige Beleuchtungsstärke. 8teilige Sektorscheibe.

C_{CO₂} = 91 × 10⁻⁶.

Versuchs- zeit Min.	Be- leuchtungs- zeit Min.	Tourenzahl des Sektors pro Minute	Dauer einer Periode in Sek.	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm	Mehrleistung des Lichts bei inter- mittierender Beleuchtung
30	15	2000	0,0038	+ 42	—
15	15	0 (kontin.)		+ 45	
15	15	0 (kontin.)		+ 45	—
30	15	2000	0,0038	+ 43	

Das Ergebnis der Versuche läßt sich folgendermaßen zusammenfassen:

Bei hoher Intensität der Strahlung zersetzte eine bestimmte Energiemenge mehr Kohlensäure, wenn sie intermittierend, als wenn sie kontinuierlich auffiel. Die Mehrleistung hing ab von der Schnelligkeit, mit der Hell- und Dunkelperioden wechselten; sie betrug fast 100 % bei einer Wechselzahl von 8000 pro Minute und etwa 10 % bei einer Wechselzahl von 4 pro Minute.

Bei niedriger Intensität der Strahlung zersetzte eine bestimmte Energiemenge ebensoviel Kohlensäure, wenn sie intermittierend, als wenn sie kontinuierlich auf fiel.

Sowohl bei hohen als auch bei niedrigen Intensitäten kontinuierlich auffallender Strahlung geht nur ein Bruchteil der absorbierten Energie in chemische Energie über, so daß der erste Fall nicht in Widerspruch zu dem ersten Energiesatz steht, der zweite Fall nach demselben Satz nicht vorauszusehen ist.

Der zweite Fall entspricht dem des menschlichen Auges, in dem eine bestimmte Energiemenge die gleichen chemischen Wirkungen hervorbringt, ob sie intermittierend oder kontinuierlich auffällt.

Leistet eine bestimmte Energiemenge, die im Wechsel mit gleichlangen Dunkelperioden auffällt, 100 % mehr als bei kontinuierlicher Einwirkung, so können wir auch sagen: in einem Zeitabschnitt, der groß gegen die Dauer einer Periode ist, wer-

den bei intermittierender und bei kontinuierlicher Beleuchtung gleiche Kohlensäuremengen zersetzt, oder die durchschnittlichen Assimilationsgeschwindigkeiten sind bei beiden Beleuchtungsarten gleich. Zur Erklärung gibt es zwei Möglichkeiten. Entweder die Zersetzung geht in den Dunkelperioden mit unveränderter Geschwindigkeit weiter — wobei an eine Art Energiespeicherung zu denken wäre — oder die Zersetzung ist in den Dunkelperioden unterbrochen, in den Hellperioden verdoppelt. Den letzteren Fall halten wir zunächst für den wahrscheinlicheren und nehmen an, daß bei Unterbrechung der Lichtzufuhr Teilreaktionen des Assimilationsmechanismus noch eine kurze Zeit, bis zur Einstellung eines Dunkelgleichgewichts, weitergehen. Nach einer Dunkelperiode würde dann das Licht auf höhere Konzentrationen an zersetzlicher Substanz treffen und deshalb mehr leisten, als bei kontinuierlicher Einwirkung. Licht niedriger Intensität würde nach einer Dunkelperiode nicht mehr leisten, weil in der Hellperiode das Dunkelgleichgewicht praktisch nicht verschoben würde, mithin die Konzentration an zersetzlicher Substanz während der Verdunkelung nicht zunehmen könnte. Auf die Prüfung dieser Theorie, nach der sich mittels der Sektormethode die Zeitgesetze der verschiedenen Dunkelvorgänge ermitteln lassen müßten, soll erst in einer späteren Mitteilung eingegangen werden.

Die Versuche mit intermittierender Beleuchtung wurden durch eine Bemerkung von Brown und Escombe¹⁾ angeregt, nach der sie sich in ihren Assimilationsversuchen zur Schwächung des Lichts vielfach der Methode der rotierenden Sektoren bedienten. Wurde zwischen ein stark beleuchtetes Blatt und die Lichtquelle ein rotierender Sektor eingeschaltet, so konnte $\frac{3}{4}$ des Lichts fortgenommen werden, „bevor irgendeine merkbare Verminderung der assimilatorischen Leistung des Blattes nachzuweisen war“. Willstaetter²⁾ nimmt an, daß hier bei dem niedrigen Kohlensäuregehalt der umgebenden Luft die verkürzte Belichtungszeit schon genügte, „um die in den kurzen Verdunkelungsintervallen zu den Chloroplasten gelangende Kohlensäure vollständig zu reduzieren“.

¹⁾ Proc. Roy. Soc. London Ser. B, 76, 29, 1905.

²⁾ l. c. S. 240.

Haben Brown und Escombe das Licht nicht nur geschwächt, sondern, was sich aus ihren Angaben nicht ersehen läßt, die assimilierende Zelle periodenweise verdunkelt, so ist der erwähnte Versuch wahrscheinlich nach Willstaetter zu erklären. Auch in diesem Falle würde während der Verdunklungsperioden ein Teilvorgang der Assimilation weitergehen, jedoch keine chemische Reaktion, wie in unserem Fall, sondern die Diffusion der Kohlensäure.

VII. Einfluß permeierender Substanzen.

Der grundlegende Versuch über die Wirkung der Narkotica auf die Assimilation stammt von Claude Bernard¹⁾. Mittels kleiner Dosen Chloroform konnte die Assimilation reversibel gehemmt werden, ohne daß gleichzeitig die Oxydationsgeschwindigkeit sank. „On pourrait donc, à l'aide des anesthésiques, séparer la fonction chlorophyllienne . . . de la respiration.“ Diese Beobachtung wurde in der Folgezeit vielfach bestätigt²⁾, in Blackmans Laboratorium dahin erweitert³⁾, daß Chloroformkonzentrationen, die die Assimilation hemmen, die Atmung sehr erheblich beschleunigen.

In Übereinstimmung mit diesen Erfahrungen ließ sich die Assimilation in der grünen Alge durch Narkotica der verschiedensten Klassen reversibel hemmen, die Atmung recht erheblich — und zwar gleichfalls reversibel — beschleunigen. Sieht man ab von den leicht flüchtigen, bei höheren Konzentrationen cytolytisch wirkenden Narkotica, so konnte die Atmung, wie in früheren Versuchen an nichtgrünen Zellen⁴⁾, auch reversibel gehemmt werden.

Wir haben hiernach drei verschiedene Wirkungen der Narkotica zu unterscheiden: die Assimilationshemmung, die Atmungsbeschleunigung und die Atmungshemmung. Die Konzentrationen, bei denen diese Wirkungen eintraten, sind in Tabelle IX für Phenylurethan zusammengestellt und mit den

¹⁾ Leçons sur les Phénomènes de la Vie, 1, 278 bis 279, Paris 1885.

²⁾ Z. B.: Bonnier u. Mangin, Compt. rend. 101, 1303, 1885.

³⁾ Irving, Annals of Botany 25, 1077, 1911. Thoday, Annals of Botany 27, 97, 1913.

⁴⁾ Asher-Spiro, Ergebnisse der Physiologie 14, 253, 1914.

Tabelle IX.

Phenylurethan.

Gewichts- prozente	Wirkung auf die		Wirkung auf andere Lebensvorgänge
	Assimilation der Alge	Atmung der Alge	
0,1	völlig gehemmt	ca. 50% gehemmt	Hemmung der Gärung in lebender Hefe um ca. 50%
0,05	völlig gehemmt	unverändert	Hemmung der Atmung in nichtgrünen Zellen um ca. 50%
0,025	fast völlig gehemmt	stark be- schleunigt	
0,013	sehr stark gehemmt	"	} Grenzkonzentration für die Gehirnnarkose der Kaulquappen ¹⁾
0,0076	ca. 50% gehemmt	"	
0,005	ca. 30% gehemmt	beschleunigt	
0,002	Grenzgebiet	"	
0,001		Grenzgebiet	

in anderen Fällen wirksamen Konzentrationen desselben Narkoticums verglichen.

Aus der Tabelle ergibt sich, daß die Konzentrationen, durch die die Assimilation in der Alge eben nachweisbar gehemmt, die Atmung eben nachweisbar beschleunigt wird, nahe zusammenliegen und etwa 20 mal so niedrig sind, wie die atmungshemmende Konzentration. Ein Vergleich mit den in anderen Fällen wirksamen Konzentrationen zeigt, daß die Assimilation schon bei Konzentrationen gehemmt wird, bei denen noch keine Wirkung auf die Hirnganglien von Kaltblütern nachweisbar ist. Ordnet man die Lebensvorgänge nach ihrer Empfindlichkeit gegenüber hemmend wirkenden narkotischen Substanzen in eine Reihe, so steht die Assimilation an erster Stelle. Berücksichtigen wir, daß die Wirkung der Narkotica auf einer Veränderung der Grenzschichten beruht, so hebt also die geringfügigste Veränderung der

¹⁾ Overton, Studien über die Narkose, Jena 1901, 112.

Grenzschichten das Assimilationsvermögen auf. Hierzu stimmt die Erfahrung, daß die Assimilation im Gegensatz zu anderen Zellvorgängen, wie Atmung und Gärung, schon durch die geringfügigsten mechanischen Eingriffe in die Zellstruktur sistiert wird.

Von Substanzen, die nicht in die Klasse der Narkotica gehören, wurde besonders die Blausäure geprüft. In früheren Versuchen an tierischen und pflanzlichen Zellen hemmte Blausäure die Oxydationsgeschwindigkeit bei Konzentrationen von 10^{-4} bis 10^{-5} Molen pro Liter. Durch etwa die gleichen Konzentrationen ließ sich die Assimilation der grünen Alge — und zwar reversibel — hemmen; hierbei waren die Oxydationen jedoch nicht gehemmt, sondern beschleunigt. Noch eine $n/100$ -Blausäurelösung — d. h. das 100fache der assimilationshemmenden Konzentration — beschleunigte die Oxydationen erheblich. Die Assimilation in der grünen Zelle verhält sich also gegenüber Blausäure wie die Atmung in nichtgrünen Zellen, während die Atmung der grünen Zelle völlig atypisch reagiert. Hierfür fehlt zunächst jede Erklärung.

Wird die Assimilationsgeschwindigkeit unter verschiedenen äußeren Bedingungen durch verschiedene Teilvorgänge bestimmt, so ist zu erwarten, daß sich die Wirkung eines Stoffes mit den äußeren Bedingungen ändern wird. In der Tat war eine Blausäurekonzentration, die die Assimilation bei hohen Beleuchtungsstärken um 50% hemmte, bei niedrigen Beleuchtungsstärken fast wirkungslos. Phenylurethan in mittleren Konzentrationen hemmte sowohl bei hoher als auch bei niedriger Intensität der Beleuchtung und zwar in letzterem Fall etwas stärker. Der bei hohen Beleuchtungsstärken maßgebende Vorgang ist also empfindlich, der bei niedrigen Beleuchtungsstärken maßgebende Vorgang unempfindlich gegen Blausäure, beide Vorgänge sind empfindlich gegen Phenylurethan. Die Empfindlichkeit des bei niedrigen Beleuchtungsstärken maßgebenden Vorganges gegen oberflächenaktive Stoffe ist von besonderem Interesse und zeigt, daß hier neben der Lichtabsorption, die durch Phenylurethan ja nicht gehemmt wird, eine oberflächenempfindliche Dunkelreaktion eine Rolle spielt (vgl. hierzu Abschnitt IV).

Versuche mit Blausäure.

Die Blausäurelösungen wurden hergestellt entweder durch Zugabe von freier Blausäure zu Knopscher Lösung oder durch Zugabe von Kaliumcyanid zu Carbonatgemischen. Im zweiten Fall berechnete sich die Konzentration an freier Blausäure aus der Wasserstoffionenkonzentration der Carbonatgemische und der Dissoziationskonstante der Blausäure, sofern die zugesetzten Cyanidmengen im Vergleich zu den Carbonatmengen klein waren. Bezeichnen wir mit C die Gesamtkonzentration an Cyanid, mit H^+ die Wasserstoffionenkonzentration der Carbonatgemische, mit K die Dissoziationskonstante der Blausäure, so ist die Konzentration der freien Blausäure

$$x = \frac{C \times H^+}{H^+ + K}$$

Für das meistbenutzte Carbonatgemisch 9 (Tabelle I) wurde H^+ nach Soerensens colorimetrischer Methode¹⁾ bei 25 Grad $= 10^{-9,86}$ gefunden; bei der gleichen Temperatur ist $K^2) = 7,2 \times 10^{-10}$, somit x

$$x = \frac{C}{2,65}$$

Zum Versuch wurden gleiche Zellmengen zu gleichen Mengen blausäurehaltiger und blausäurefreier Flüssigkeit gegeben und 2 Assimilationsgefäße mit je 10 ccm blausäurehaltiger, 2 Assimilationsgefäße mit je 10 ccm blausäurefreier Zellsuspension beschickt. Von den 4 Gefäßen wurden 2 auf der Drehscheibe symmetrisch zur Lichtquelle befestigt und belichtet, 2 dienten als Dunkelkontrollen und wurden während der Belichtung auf der gleichen Scheibe in Metallhülsen gedreht.

Die Kohlensäurekonzentrationen waren so hoch, daß erhebliche Änderungen die Assimilationsgeschwindigkeit nicht merklich beeinflussten, die Beleuchtungsstärken entweder gleichfalls sehr hoch (Stärke 16 bis 45) oder so niedrig (Stärke 1) daß bei einer Schwächung des Lichts auf die Hälfte die Assimilationsgeschwindigkeit auf die Hälfte sank.

¹⁾ Ergebnisse der Physiol. 12, 393, 1912.

²⁾ Landolt-Börnstein, Tabellen, 1912, 1138.

Aus Tabelle X, in der einige Messungsergebnisse zusammengestellt sind, geht hervor, daß eine Blausäurekonzentration

Tabelle X.

25°. $c_{\text{CO}_2} = 91 \times 10^{-6}$. $a = \text{Carbonatgemisch}$, $b = \text{Carbonatgemisch} + 3,8 \times 10^{-5} \text{ Mole freie HCN pro Liter}$. 1 mm = 0,7 mm O₂.

Nr. des Versuchs	Versuchsdauer Min.	Beleuchtungsstärke	Druckdifferenz bei Belichtung		Druckänderung im Dunkeln		Assimilation in mm pro Stunde		Atmung in mm pro Stunde		Assimilationshemmung	Atmungsbeschleunigung
			in b	in a	in b	in a	in b	in a	in b	in a		
1	30	0			-22	-14			44	28		57 ⁰ / ₀
	10	ca. 45	+45	+86			270	516			48 ⁰ / ₀	
	60	1	+81	+82			81	82			1 ⁰ / ₀	
	30	0			-17	-12			34	24		42 ⁰ / ₀
2	30	0			-16	-12			32	24		33 ⁰ / ₀
	15	ca. 45	+66	+113			254	452			44 ⁰ / ₀	
	30	1,5	+39	+42			78	84			7 ⁰ / ₀	
	30	0			-13	-11			26	22		20 ⁰ / ₀

von $3,8 \times 10^{-5}$ Molen pro Liter die Assimilation bei hohen Beleuchtungsstärken um 40 bis 50⁰/₀, bei niedrigen Beleuchtungsstärken nur um wenige Prozente hemmte, während gleichzeitig die Atmung stark beschleunigt war.

Wie sich die Atmung bei höheren Blausäurekonzentrationen verhält, zeigt die folgende Zusammenstellung

25°.

c_{HCN} in Molen pro Liter	Beobachtete Druckänderung im Dunkeln in 60'	Wirkung
0	-59	
10^{-3}	-77	31 ⁰ / ₀ Beschleunigung
10^{-2}	-70	18 ⁰ / ₀ "
10^{-1}	-36	40 ⁰ / ₀ Hemmung.

Hierbei war die Suspensionsflüssigkeit Knopsche Lösung, die frisch bereitete Blausäurelösung vor Herstellung der Verdünnungen mit Silbernitrat titriert. Aus den Zahlen ergibt sich, daß, bei Versuchszeiten von 60 Minuten, erst eine $\frac{1}{10}$ -Blausäurelösung die Sauerstoffaufnahme merklich verminderte, während niedrigere Blausäurekonzentrationen die Oxydationen beschleunigten.

Versuche mit Phenylurethan.

Die Anordnung entsprach den Blausäureversuchen. Das Phenylurethan wurde in Knopscher Flüssigkeit gelöst, die Zellsuspension bei 25° mit 4 Volumprozent Kohlensäure gesättigt.

Sollte auf Reversibilität einer Hemmung geprüft werden, so wurde nach Messung der Hemmung der Inhalt der 4 Assimilationsgefäße getrennt in 4 Zentrifugiergläser übergeführt, auf der Zentrifuge mehrmals mit reiner Knopscher Lösung gewaschen, nach dem letzten Zentrifugieren auf das Anfangsvolumen aufgefüllt und die Assimilation erneut gemessen.

Tabelle XI.

25°. $c_{CO_2} = 1360 \times 10^{-6}$. Knopsche Lösung = a. Knopsche Lösung + $4,6 \times 10^{-4}$ Mole Phenylurethan pro Liter = b. 1 mm = 1,04 cmm O₂.

Nr. des Versuchs	Versuchsdauer Min.	Beleuchtungsstärke	Druckdifferenz bei Belichtung		Druckänderung im Dunkeln		Assimilation in mm pro Stunde		Atmung in mm pro Stunde		Assimilationshemmung.	Atmungsbeschleunigung
			in b	in a	in b	in a	in b	in a	in b	in a		
1	30	1	in b + 6	in a + 25			in b 12	in a 50			76%	
	30	0			in b - 19	in a - 8			in b 38	in a 16		140%
	10	16	+ 27	+ 48			162	288			44%	
	30	1	aus b in a + 23	aus a in a + 23			aus b in a 46	aus a in a 46			—	
2	30	2	in b + 35	in a + 67			in b 70	in a 134			50%	
	30	0			in b - 36	in a - 18			in b 72	in a 36		100%
	30	2	aus b in a + 66	aus a in a + 69			aus b in a 132	aus a in a 138			4%	
	30	0			aus b in a - 14	aus a in a - 15			aus b in a 28	aus a in a 30		—
	10	ca. 45	+ 100	+ 102			600	612			2%	
3	30	1	in b + 9	in a + 23			in b 18	in a 46			61%	
	30	2	+ 25	+ 46			50	92			46%	
	30	0			in b - 20	in a - 6			in b 40	in a 12		234%
	10	16	+ 28	+ 49			168	294			43%	

Aus Tabelle XI, in der einige Resultate zusammengestellt sind, ergibt sich, daß eine Phenylurethankonzentration von 5×10^{-4} Molen pro Liter die Assimilation bei hoher Beleuchtungsintensität um 40 bis 50⁰/₀, bei niedriger Beleuchtungsintensität gleichfalls erheblich — und zwar eher stärker als schwächer — hemmte. Durch die gleiche Konzentration wurde die Atmung um 100 bis 240⁰/₀ beschleunigt. Sowohl die Assimilationshemmung als auch die Atmungsbeschleunigung waren reversibel. Wurde die Assimilationshemmung mit wachsenden Beleuchtungsstärken geringer, so entsprach einem bestimmten Anstieg der Beleuchtungsstärke ein mehr als proportionales Anwachsen der Assimilationsleistung, beispielsweise in Versuch 3 einer Verdoppelung der Beleuchtungsstärke fast eine Verdreifachung der Assimilationsleistung.

Zur Kenntnis der Pektase-Wirkung.

Von

Hans Euler und Olof Svanberg.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Eingegangen am 24. Oktober 1919.)

Gelegentlich einer biochemischen Untersuchung an *Ribes nigrum* wurde die spontane Koagulation des Saftes der Beeren untersucht.

Nach Frémy¹⁾ ist die Koagulation von Fruchtsäften eine enzymatische Reaktion, welche durch die Pektase vermittelt wird.

Dieses Enzym ist eines der am wenigsten erforschten. Die Auffassung, die man sich von der Wirkung der Pektase gebildet hat, ist offenbar von den herrschenden Theorien und Hypothesen über die besser bekannten enzymatischen Koagulationen durch Thrombin und Chymosin stark beeinflusst. Dazu kommt, daß man nicht nur über das Reaktionsprodukt, sondern auch über die chemische Zusammensetzung des Substrates bis vor kurzem vollkommen im Unklaren war. Nachdem v. Fellenberg das nach dem Verfahren von Bourquelot und Hérissey und Bridel gewonnene Pektin als Methyl-ester der Pektinsäure erkannt hatte²⁾, ist durch die ausgezeichnete Untersuchung von Felix Ehrlich³⁾ der Aufbau der Pektine im wesentlichen bekannt geworden. Ehrlich konnte in allen Pektinpräparaten Galakturonsäure, ein Isomeres der d-Glucuronsäure nachweisen, und er faßt das Pektin (der Zell-

¹⁾ Frémy, Journ. de pharm. 26, 392, 1840.

²⁾ v. Fellenberg, Mitt. Schweizer Gesundheitsamt 5 bis 8, 1914 bis 1916. — Diese Zeitschr. 85, 118, 1917.

³⁾ F. Ehrlich, Chem. Ztg. 41, 197, 1917.

membranen) als das Calcium-Magnesium-Salz einer komplexen Anhydro-Arabino-Galaktosemethoxytetragalakturonsäure auf, wobei manchmal die Arabinose durch Methylpentosen ersetzt ist.

Die Untersuchung von Ehrlich wird durch eine ausführliche Mitteilung von Th. v. Fellenberg¹⁾ in vielen Punkten ergänzt. Die Nomenklatur Ehrlichs und Fellenbergs ist verschieden, wir brauchen aber weder hierauf noch auf die sonst bestehenden Differenzen einzugehen. Bei der enzymatischen Koagulierung dürfte es sich um die Bildung eines Pektinkörpers²⁾ mit ausgesprochenen sauren Eigenschaften handeln.

Was die Literatur über diese Enzymwirkung betrifft, so sind, abgesehen von der erwähnten Arbeit Frémys und einer Mitteilung Mangins, die Arbeiten von Bertrand und Mallèvre³⁾⁴⁾, von Bourquelot und Hérissé⁵⁾ und eine Mitteilung von Goyaud⁶⁾ zu erwähnen.

Bertrand und Mallèvre³⁾ kamen in ihrer ersten Arbeit

¹⁾ v. Fellenberg, Mitt. Schweizer Gesundheitsamt 5 bis 8, 1914 bis 1916. — Diese Zeitschr. 85, 118, 1917.

²⁾ Herzfeld hatte schon 1868 aus Pektinen Arabinose erhalten und nach Oxydation mit Salpetersäure auch Schleimsäure, welche vom Galaktosegehalt des Pektins herrührte. Das Auftreten von Carboxylgruppen in Pektinen erkannten Tollens und Tromp de Haas, Ann. 1895, 278, 286. Wegen der späteren Literatur verweisen wir auf die Zusammenstellung von Th. v. Fellenberg und erwähnen außerdem noch folgende Arbeiten: Harlay, Journ. de Pharm. et Chim. (7) 5, 344, 1912; Verdon, Journ. de Pharm. et Chim. (7) 5, 347, 1912. Eingehende Untersuchungen über die Gelatinierung und über die Salzbildung von Pektin unter Berücksichtigung physikalisch-chemischer Gesichtspunkte verdankt man Dorothy Haynes, Journ. Biochem. 8, 553, 1914 und Sven Odén, Intern. Zeitschr. f. Biol. 3, 83, 1917 und Bot. Ber. 34, 648, 1916.

Als spezielle Pektinstoffe sind noch die Alginsäure und die Fucinsäure von Kylin (Zeitschr. f. physiol. Chem. 94, 337, 1915) zu erwähnen, die der l-Arabonsäure nahestehen.

Eine gute Übersicht über den gegenwärtigen Stand der Pektinforschung liefert ein Vortrag von Neuberg (Zeitschr. des Vereins der Deutschen Zuckerindustrie 67, 463, 1917).

³⁾ Bertrand und Mallèvre, Compt. rend. 119, 1013, 1894.

⁴⁾ Bertrand und Mallèvre, Compt. rend. 121, 726, 1895.

⁵⁾ Bourquelot und Hérissé, Journ. de Pharm. et Chim. 8, 145, 1899.

⁶⁾ Goyaud, Compt. rend. 135, 537, 1902.

zum Ergebnis, daß zur Koagulation durch Pektase die Gegenwart löslicher Salze von Calcium, Strontium oder Barium notwendig ist, und nehmen an, daß das Koagulum aus einem Pektat des Calciums (bzw. einer der alkalischen Erden) besteht.

Die enzymatische Umwandlung selbst wird nach Goyaud von der Gegenwart von Calciumsalzen qualitativ nicht beeinflusst. Die Lösung kann nach seinen Befunden ebensowohl Kalium enthalten; Calciumsalze bringen nur die Reaktion zur Erscheinung, indem durch sie unlösliches Calciumpektat entsteht.

Eine spätere Untersuchung von Bertrand und Mallèvre¹⁾ zeigte einerseits die große Verbreitung der Pektase in der Pflanzenwelt, andererseits auch die großen Verschiedenheiten im Pektasegehalt der verschiedenen Arten und der Organe einer und derselben Art.

Aus Klee und Luzerne stellten die genannten Forscher durch Alkohol-fällung ein Enzympräparat dar, das sie — allerdings ohne Angaben von Zahlenwerten — als sehr wirksam bezeichnen.

Frémy hatte die Existenz einer löslichen Pektase in Rüben, dagegen einer unlöslichen Pektase in Säften von Äpfeln und anderen sauren Früchten angenommen.

Bertrand und Mallèvre kamen in dieser Hinsicht zu einer anderen Auffassung. In ihrer zweiten Mitteilung²⁾ hatten sie sich mit dem Einfluß der Acidität auf die Pektasewirkung beschäftigt. Sie wiesen lösliche Pektase auch in Säften von Äpfeln, Birnen und anderen Früchten nach und fanden, daß auch in diesen Koagulation erzielt wird, sobald eine geeignete Menge verdünnten Alkalis zugegeben wird.

Bezüglich der Säureempfindlichkeit beschreiben sie folgenden Versuch:

„Nachdem wir konstatiert hatten, daß eine Mischung aus gleichen Teilen Karottensaft und einer 2⁰/₁₀igen Pektinlösung nach etwa einer Stunde ein kompaktes Gel bildete, haben wir eine Reihe derartiger Mischungen hergestellt, denen wir wachsende Mengen von Salzsäure zugesetzt haben. Diese Zusätze haben eine Verzögerung in der pektischen Umwandlung bewirkt, und zwar um so merkbarer, je größer die Säurezusätze waren: Mit 0,088 g HCl auf 100 ccm Mischung erhob sich die

¹⁾ Bertrand und Mallèvre, Compt. rend. 121, 726, 1895.

²⁾ Bertrand und Mallèvre, Compt. rend. 120, 110, 1895.

Verzögerung schon auf etwa 40 Stunden; überschritt man ein wenig 0,100 g, so trat keine Koagulation mehr ein.

Analoge Ergebnisse wurden erhalten, wenn man die Salzsäure mit einer anderen Mineralsäure wie Schwefel- oder Salpetersäure oder sogar mit einer organischen Säure ersetzte. Wir haben diesbezügliche Versuche gemacht mit Apfelsäure, Oxalsäure und Citronensäure.“

Als Ergebnis führen die genannten Forscher an, daß die Pektasewirkung „n'est réalisable qu'en milieu sensiblement neutre, l'action des acides sur la fermentation pectique étant considérable“.

Diese Beobachtung Bertrands und Mallèvres, daß die Acidität die Pektasewirkung wesentlich beeinflusst, ist zweifellos bemerkenswert, wenn wir auch das quantitative Ergebnis dieser Forscher, daß die Pektase bei Neutralität am besten wirkt, nicht bestätigen können.

Wir geben im folgenden das Ergebnis einiger orientierenden Versuche an, die wir nicht mit reinen Pektinlösungen, sondern mit natürlichen Fruchtsäften angestellt haben.

Methodisches.

Es kamen nur reife Beeren als Ausgangsmaterial zur Verwendung und zwar von *Ribes nigrum*, *Ribes rubrum* und *Ribes grossularia*.

Die Beeren wurden durch ein Preßtuch stark abgepreßt, wodurch von Kernen und Schalen befreite, durchscheinende Säfte erhalten wurden.

Die Färbung war, besonders im Saft aus *Ribes nigrum* so stark, daß Aciditätsmessungen nur elektrometrisch vorgenommen werden konnten. Dies geschah nach der von Michaelis und von Sörensen angegebenen, nunmehr allgemein bekannten Methode.

Versuche.

Versuch 1.

Reife Beeren von *Ribes nigrum* durch Preßtuch ausgepreßt. Die Acidität des homogenen Saftes ergab sich unmittelbar nach dem Auspressen elektrometrisch zu $p_H = 2,96$.

Nach 24 Stunden hatte sich der Saft in eine immer noch vollständig homogene, aber lose koagulierte Masse verwandelt, deren Acidität unverändert 2,96 betrug.

Dieser Versuch zeigte also, daß mit der Koagulierung eine Aciditätsänderung nicht notwendig verbunden ist.

Versuch 2.

In dem im Versuch 1 gemessenen Saft von *Ribes nigrum* wurde nun durch Zusätze von 1 n-HCl bzw. 2 n-NaOH die Acidität variiert. Wir stellen Versuchsbedingungen und Resultate in folgender Tabelle zusammen:

Tabelle I.

Mischung	p _H	Beobachtete Gerinnungszeiten
20 ccm Saft + 5 ccm 1 n-HCl	1,07	Keine Koagulationserscheinungen in 3 Tagen
20 ccm Saft + 2,5 ccm 1 n-HCl	2,16	in 3 Tagen dick schleimig
20 ccm Saft ohne Zusatz	2,96	ca. 24 Stunden
20 ccm Saft + 1 ccm 2 n-NaOH	3,38	in 4 Stunden } fest und homo-
20 ccm Saft + 3 ccm 2 n-NaOH	4,54	in 0,5 Stunden } gen koaguliert
20 ccm Saft + 5 ccm 2 n-NaOH	5,45	in ca. 5 Stunden dick schleimig
20 ccm Saft + 6 ccm 2 n-NaOH	8,7	wird nach 1 Tag allmählich schleimig

Dieser Versuchsreihe zufolge liegt also das Optimum der Koagulation in der Nähe von p_H = 4,5.

Versuch 3.

Die vorhergehende Versuchsreihe wurde nun durch eine weitere ergänzt, die innerhalb engerer Arbeitsgrenzen angestellt wurde.

Anzahl ccm 2 n-NaOH zu 10 ccm Saft	p _H	Koagulationszeit in Minuten
0,5	3,7	90
0,75	4,0	50
1,0	4,25	30
1,25	4,45	45
1,50	4,74	60
1,75	5,0	} > 200
2,0	5,20	
2,25	5,37	
2,50	5,50	
2,10	5,50	

Die Koagulationszeiten sind nur mit einer Genauigkeit bis auf 10% ihres Wertes angegeben¹⁾. Das Aciditätsoptimum liegt hiernach bei etwa p_H = 4,3.

¹⁾ Will man hier eine größere Genauigkeit erzielen, so wird man nicht die Koagulationszeiten bestimmen, sondern von Zeit zu Zeit viscosimetrische Messungen anstellen, etwa mit dem Apparat von Couette [Ann. de Chim. (6) 9, 625].

Versuch 4.

Wir wollten uns davon überzeugen, daß die Koagulation bei den vorher beschriebenen Versuchen wirklich auf einer Enzymwirkung beruht. Eine Saftprobe wurde bei der Acidität $p_H = 3,0$ während 5 Minuten auf 95° erhitzt. Während der Erhitzung trat eine geringe Fällung ein (vermutlich von Eiweißstoffen). Die Acidität änderte sich hierbei nur sehr unbedeutend, nämlich von $p_H = 3,0$ auf $3,03$.

Der erhitzte Saft wurde geteilt:

Mischung	p_H	Koagul.-Zeit
20 ccm Saft + 2 ccm 2 n-NaOH	Nach Zusatz 4,01	} Nach 3 Tg. keine Koagulation
20 ccm Saft ohne Zusatz	bleibt 3,03	

Versuch 5.

Es sollte nun das Enzym inaktiviert werden unter möglichst geringer Veränderung des Saftes im übrigen, besonders ohne daß Fällungen eintraten.

Zu diesem Zweck wurden 100 ccm Saft mit 13,5 ccm 1 n-HCl gemischt, wodurch die Acidität $p_H = 2,0$ entstand. Diese Lösung wurde dann während 5 Minuten auf 75° gehalten. Eine geringe Fällung trat ein.

Nach der Erhitzung wurde die Hälfte des Saftes klar filtriert und beide Hälften mit Alkali versetzt.

Mischung	p_H	Koagul.-Zeit
20 ccm Saft + ca. 3 ccm 2 n-NaOH	4,21	} Keine Koagulation während 24 Stunden
20 ccm Saft + ca. 3,4 ccm 2 n-NaOH	4,24	

Nun wurde eine Probe des filtrierten Saftes (nach der Erhitzung auf 75°) mit 1 ccm frisch ausgespreßten, unveränderten Saftes versetzt. Diese Probe koagulierte nun fest und homogen innerhalb 24 Stunden.

20 ccm einer zweiten Probe des erhitzten Saftes von *Ribes nigrum* wurde auf die Acidität 4,24 gebracht, mit 1 ccm eines frisch ausgespreßten Saftes der Beeren von *Ribes rubrum*.

Nach 20 Stunden war bereits ein festes homogenes Koagulum gebildet, während die erhitzte Probe ohne Zusatz auch nach 3 Tagen keine Koagulation zeigte. Das Enzym aus *Ribes*

rubrum hatte somit das Pektin aus Ribes nigrum zum Koagulieren gebracht.

Aus diesem Versuch geht hervor, daß eine Spezifität des Enzyms auf Pektine verschiedener Gattungen einer Unterfamilie nicht besteht.

Versuch 6.

Ribes rubrum.

Der wie zu den vorhergehenden Versuchen gewonnene Saft zeigte die natürliche Acidität $p_H = 2,8$, war also nur unbedeutend saurer als der aus den schwarzen Johannisbeeren.

Spontane Koagulation nicht beobachtet.

In Analogie mit Versuch 2 wurde die Abhängigkeit der Koagulationsgeschwindigkeit von der Acidität zunächst orientierend festgestellt.

Mischung	p_H	Farbe	Koagulation
20 ccm Saft ohne Zusatz	2,80	Hellrot	Keine Koagulation innerhalb 40 Stdn.
20 ccm Saft + 1,3 ccm 2 n-NaOH	3,48	"	Fest u. homog. i. 15 St.
20 ccm Saft + 2,7 ccm 2 n-NaOH	4,24	"	Homogen, aber nicht ganz fest in 15 St.
20 ccm Saft + 4,0 ccm 2 n-NaOH	4,98	Violettrot	

Beim Vergleich mit Versuch 2 fällt die fast identische Pufferwirkung der Säfte gegen p_H der beiden Ribesgattungen auf.

Versuch 7.

Es folgte nun wieder die Einengung der Grenzen der optimalen Acidität.

Anzahl ccm 2 n-NaOH zu 15 ccm Saft	p_H	Koagulationszeit in Minuten
1,5	3,85	Fest und homogen innerhalb 6 Stunden
1,75	4,05	" " " " 3,5 "
2,0	4,20	Fest und homogen innerhalb 3 Stunden
2,25	4,42	
2,5	4,60	
2,75	4,80	" " " " 3,5 "

Es ergibt sich, wenn auch mit etwas geringerer Schärfe, sehr nahe das gleiche Aciditätsoptimum der Koagulation wie für den Beerensaft aus Ribes nigrum.

Versuch 8.

Ribes grossularia.

Zwei wie früher gewonnene Säfte zeigten bei der elektrometrischen Messung die p_H -Werte 2,91 bzw. 2,87, also etwa denselben Säuregrad wie die Beeren der beiden anderen Ribesgattungen. Wir führen unsere vorläufigen Messungen mit diesem Saft nicht mehr an. Bemerkenswert ist die nahe Übereinstimmung der p_H -Werte der drei untersuchten Beerenarten deshalb, weil die letzteren in reifem Zustand einen bedeutend wenig sauern Geschmack¹⁾ zeigen als die ersteren.

Dieser Widerspruch ist aber nur scheinbar, da der Grad des sauren Geschmackes offenbar nicht mit der wirklichen (elektrometrisch gemessenen) Acidität, sondern mit der Titrationsacidität zusammenhängt. Letztere und damit die Pufferwirkung ist aber bei den Beeren von *Ribes grossularia* bedeutend kleiner.

15 ccm Saft + 1 ccm 2 n-NaOH gab nämlich bereits eine Mischung von $p_H = 4,0$ (vgl. oben).

Zusammenfassung.

1. An den Säften reifer Beeren von *Ribes nigrum*, *Ribes rubrum* und *Ribes grossularia* wurde die natürliche Acidität gemessen. Dieselbe ergab sich ziemlich übereinstimmend zwischen $p_H = 2,8$ und 2,96.

2. Die enzymatische Koagulation dieser Säfte zeigt ein ebenfalls nahezu übereinstimmendes Aciditätsoptimum bei $p_H = 4,3$.

3. Spezifität der Pektase hat sich innerhalb zweier Gattungen der Unterfamilie *Ribes* nicht gezeigt.

¹⁾ Die sauersten Säfte reifer Früchte, die wir gemessen haben, waren diejenigen aus zwei Citronen, an welchen wir $p_H = 2,28$ bzw. 2,25 fanden.

Physikalisch-chemische Bemerkungen zu Neubergs Gärungstheorie.

Von
Wolfgang Ostwald.

(Eingegangen am 5. Oktober 1919.)

Die bewunderungswürdigen Arbeiten C. Neubergs und seiner Mitarbeiter über den Chemismus der alkoholischen Gärung erscheinen als ein wissenschaftlicher Fortschritt, der weit hinausgeht über das spezielle Interesse des Gärungschemikers. Wenn im folgenden mit aller Bescheidenheit einige Bemerkungen vom Standpunkte eines Biochemikers zu diesen Fragen gemacht werden sollen, der mehr von der physikalisch- und kolloidchemischen Seite an die Probleme herantritt, so geschieht dies in erster Linie, zu zeigen, wie stark die Neubergschen Ergebnisse auch den Nichtspezialisten auf dem Gebiete der Gärungschemie anregen.

1. Der normale Gärungsvorgang erscheint, wie auch Neuberg annimmt, als eine Gruppe „gekoppelter Reaktionen“, bei der bis zu den Arbeiten von Neuberg im wesentlichen nur Ausgangs- und Endzustand bekannt war. Obgleich man wußte, daß neben den Hauptendprodukten, Alkohol und Kohlensäure, auch bei der normalen Gärung mannigfaltige Nebenprodukte, darunter auch der inzwischen so berühmt gewordene Acetaldehyd, in kleinen Mengen auftreten, und obschon man wußte, daß Menge und Art dieser Nebenprodukte bei Änderungen der Gärführung gelegentlich variieren, blieb das Bruttoresultat doch praktisch gleich, wie dies aus der bekannten Konstanz des Gärungsquotienten (Zucker zu Alkohol) hervorgeht. Vom Standpunkt

des Massenwirkungsgesetzes aus, das ja schon vielfach auf Fermentreaktionen angewendet wurde, bedeutet dies, daß die bisherigen Beeinflussungen der Gärührung es nicht vermochten, die Geschwindigkeitskonstanten der Nebenreaktionen so weit zu erhöhen, daß auch die ihnen entsprechenden Gleichgewichtskonzentrationen erheblichere Werte annahmen, auf Kosten natürlich der Geschwindigkeitskonstante und der Gleichgewichtskonzentration der Alkohol + CO_2 -Bildung. Erst die Gärührung bei alkalischer Reaktion und insbesondere die Anwendung des Neubergschen Sulfitverfahrens hat im Sinne des Massenwirkungsgesetzes eine radikale Verschiebung der Gleichgewichtskonzentrationen des normalen Gärührungsvorganges ermöglicht, so daß z. B. der Acetaldehyd, statt in Spuren, nach C. Neuberg und E. Reinfurth in über 70% der theoretischen Ausbeute gewonnen werden kann.

Das Sulfitverfahren beruht, wie Neuberg treffend hervorhebt, auf einem „Abfangen“ des während der Gärührung entstehenden Acetaldehyds. Vom Standpunkte des Massenwirkungsgesetzes aus bedeutet nun dieses Abfangen nicht etwa nur das Entfernen einer Aldehydmenge, die sowieso im Gärührungsgemisch auftritt. Vielmehr bedeutet die Reaktion in Gegenwart von Sulfiten von diesem Gesichtspunkt aus außer der Fixierung auch eine Neubildung von Acetaldehyd. Denn betrachtet man die Gärührung als eine Gruppe gekoppelter Reaktionen, so kann keine einzige Reaktionskomponente aus dem Gemisch entfernt oder in ihrer Konzentration vermindert werden, ohne daß nicht gleichzeitig eine Neubildung bzw. eine Konzentrationserhöhung derselben stattfindet. Nimmt man die Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes in seiner allgemeinsten Form auch für den Chemismus der Gärührung an, so kann die Entfernung eines Reaktionsproduktes, gleichgültig welcher Art, nur im Sinne einer Vermehrung dieses Produktes wirken. Daß diese Anwendung auf Gärührungsvorgänge in der Tat erlaubt ist, zeigt das Verfahren zur optimalen Ausnutzung des Gärührungsmaterials bei der Zitronensäuregärührung, das darin besteht, durch Gärührung in Gegenwart von Kalk oder Kreide die gebildete Citronensäure gleich beim Entstehen zu entfernen, im Sinne des Massenwirkungsgesetzes die Reaktion also andauernd zugunsten der Citronensäurekomponente zu verschieben.

Dieselben Betrachtungen führen nun freilich zu einem weiteren Schluß, der zunächst als ein Einwand gegen die Theorie C. Neubergs angesehen werden kann, gemäß der die Acetaldehydbildung eine notwendige, integrierende Stufe auch des normalen Gärungsvorganges darstellt. Vom Standpunkt des Massenwirkungsgesetzes aus ist theoretisch von jedem möglichen Reaktionsprodukt eines solchen Reaktionsgemisches auch eine endliche Konzentration vorhanden. Ferner ist aber auch die Konzentration eines jeden Reaktionsproduktes theoretisch variabel, kann also insbesondere durch geeignetes „Abfangen“ erhöht werden. Daß dies nicht nur theoretisch, sondern auch praktisch richtig ist, zeigt die besonders durch Neubergs Arbeiten erwiesene Möglichkeit, je nach den Gärungsbedingungen die Ausbeute an Milchsäure, Acetaldehyd, Glycerin usw. zu variieren, besonders auch zu erhöhen. Es folgt aus dieser Möglichkeit einer Verschiebung des Gärungsvorganges im Sinne dieser oder jener Komponente indessen noch nicht, daß auch bei normalen Bedingungen eine Reaktionskomponente in so großer Konzentration auftreten muß, wie wir sie unter speziellen Gärungsbedingungen beobachten. Allein die hohe Aldehydausbeute C. Neubergs erscheint in diesem Sinne nicht als ein Beweis dafür, daß auch unter normalen Gärungsbedingungen das Durchlaufen der Aldehydstufe ein integrierender Teil des Gärungschemismus ist. Oder anders ausgedrückt: Aus der Möglichkeit, bei anormaler Gärung ein Nebenprodukt normaler Gärung in abnorm großer Menge zu erhalten, folgt allein nicht zwingend der Schluß, daß dieses Nebenprodukt auch ein Zwischenprodukt der normalen Gärung ist. Denn wenn es gelänge, irgendein anderes Nebenprodukt der Gärung, z. B. die Milchsäure, in gleich hoher Ausbeute „abzufangen“, so wäre man offenbar im Sinne der Deutung, die Neuberg seinen Abfangversuchen gibt, ebenso berechtigt, die Milchsäurebildung als eine notwendige Zwischenstufe des Gärungsvorganges anzusehen. Ebenso könnte man aus der hohen Glycerinausbeute beim Sulfitverfahren folgern, daß auch Glycerin ein Zwischenprodukt der normalen Gärung wäre, was gewiß nicht im Sinne der Neubergschen Theorie läge. Da theoretisch jedes Reaktionsprodukt in höherer Konzentration gewonnen werden kann, so kann aus der Möglichkeit,

auch den Acetaldehyd in großer Konzentration abzufangen, nicht geschlossen werden, daß ihm allein aus diesem Grunde eine zentrale Stellung bei der Gärung zukommt. Die hohe Aldehydausbeute beim Sulfitverfahren genügt m. a. W. vom Standpunkt des Massenwirkungsgesetzes aus an sich nicht allein, um die Neubergsche Theorie der Gärung über allen Zweifel zu stellen. Es müssen vielmehr noch andere Gründe zur Befestigung dieser Theorie herangezogen werden. Denn nur die Vollkommenheit der Abfangmethode einerseits, die Größe der Geschwindigkeitskonstante der einzelnen Reaktionen andererseits bestimmen¹⁾, wie weit der Gärungsverlauf im Sinne einer einzelnen Komponente verschoben werden kann. Bei einer weniger guten Abfangmethode als bei dem Neubergschen Sulfitverfahren und bei geringerer Geschwindigkeitskonstante als bei der Aldehydbildung wäre auch die Ausbeute kleiner, ohne daß aus diesem negativen Resultat ein Schluß auf die Unrichtigkeit der Neubergschen Theorie hätte gezogen werden dürfen. Umgekehrt aber scheint dem Verfasser die positive experimentelle Möglichkeit einer großen Aldehydausbeute bei Sulfitzusatz nur in Zusammenhang mit den anderen Gründen, nicht aber für sich allein, die Neubergsche Theorie zu stützen.

Solche andere Gründe, die auf die zentrale Rolle des Acetaldehyds hinweisen, liegen nun in der Tat reichlich vor²⁾. Es sei nur an die Feststellung der schnellen und vollständigen Vergärbarkeit der Brenztraubensäure zu Acetaldehyd bzw. Alkohol erinnert, ein Vorgang, der physikalisch-chemisch besonders interessant und überzeugend im Neubergschen Sinne • darum ist, weil die Geschwindigkeit dieser Teilreaktion größer als die der Bruttoreaktion ist; ferner an den Parallelismus von Carboxylase und Zymase u. a. m. Der Verfasser betont, daß er durchaus von der Richtigkeit der Neubergschen Gärungstheorie überzeugt ist. Nur kann er in der Möglichkeit, Acet-

¹⁾ Wie Herr Prof. Neuberg dem Verfasser brieflich mitteilte, sind derartige reaktionskinetische Messungen von ihm bereits in Angriff genommen und werden in einer demnächst erscheinenden Arbeit zum Teil veröffentlicht werden.

²⁾ Siehe z. B. den ersten Abschnitt der Arbeit von C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. 89, 365, 1918.

aldehyd bei der Sulfitgärung in größeren Mengen abzufangen, keinen besseren Beweis für die Richtigkeit der Theorie erblicken, als ihn die anderen erwähnten Beweisgründe C. Neubergs schon erbracht hatten.

2. Das „Abfangprinzip“ besteht im Sinne des Massenwirkungsgesetzes darin, daß durch Entfernung eines Reaktionsproduktes das Gleichgewicht im Sinne des letzteren verschoben und daher eine Vermehrung desselben hervorgerufen wird. Es ist aber vom Standpunkt des Massenwirkungsgesetzes ganz gleichgültig, auf welche Weise die Entfernung des Reaktionsproduktes und gleichzeitig damit seine Vermehrung zustande kommt. Das am häufigsten angewandte Abfangverfahren besteht in einer chemischen Bindung der betreffenden Komponente möglichst unter Bildung eines schwer löslichen Bodenkörpers¹⁾. Dies ist z. B. der Fall bei der Citronensäuregärung in Gegenwart von Kalk. Biologisch nicht minder wichtig erscheint die Entfernung von Reaktionskomponenten durch Kondensation und Polymerisation, wie wir sie z. B. bei der Entstehung der Polysaccharide aus den einfacheren Zuckern im pflanzlichen Organismus beobachten. — Das abfangende Reagens muß natürlich noch möglichst indifferent sein in bezug auf die Lebensfähigkeit des Gärungserregers.

Außer rein chemischen Abfangverfahren lassen sich aber sehr wohl auch noch andere Wege vorstellen, auf denen ein Gärungsprozeß in ähnlicher Weise beeinflußt werden könnte. Es ist vom Standpunkt des Massenwirkungsgesetzes aus ganz gleichgültig, ob das Abfangen chemisch, physikalisch-chemisch oder rein physikalisch vor sich geht. Bekanntlich haben ja z. B. H. Buchner, K. Langheld und S. Skraup²⁾ sowie C. Neuberg und Joh. Kerb³⁾ versucht, durch Anwendung des Verteilungssatzes, nämlich durch kontinuierliche Ausätherung, eine Anreicherung, d. h. Gewinnung und gleichzeitige Vermeh-

¹⁾ Daß der „Bodenkörper“ im Sinne der Reaktionskinetik nicht immer ein schwerlösliches festes Produkt zu sein braucht, zeigt die Anwendbarkeit des Dinatriumsulfites bei den Neubergschen Versuchen.

²⁾ E. Buchner, K. Langheld und S. Skraup, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 47, 2550, 1914.

³⁾ C. Neuberg und Joh. Kerb, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 47, 2730, 1914.

ung des Ace $\text{C}_2\text{H}_5\text{CO}$ bzw. er Brenztraubensäure bei der Gärung zu erreichen, freilich mit negativem Erfolg. Nun gibt es aber noch andere physikalisch-chemische Mittel, die zunächst theoretisch zweifellos wirksamer sind als die gewöhnliche Verteilung eines Stoffes zwischen zwei Lösungsmitteln.

Als ein solches Mittel erscheinen Gärführungen in Gegenwart spezifisch adsorbierender Mittel. Es ist bekannt, wie außerordentlich stark namentlich organische Stoffe von Adsorbentien wie Kohle aufgenommen werden und wie namentlich Stoffe in kleiner Konzentration entsprechend der Gestalt der Adsorptionskurve besonders vollständig adsorbiert werden. Man könnte sich also zunächst theoretisch vorstellen, daß bei einer Gärführung in Gegenwart fester, flüssiger oder gasförmiger Adsorbentien Gleichgewichtsverschiebungen derart eintreten, daß die am stärksten adsorbierbaren Reaktionskomponenten abgefangen werden und der Prozeß ebenso im Sinne ihrer Begünstigung verläuft wie beim Abfangen mit chemischen Mitteln.

Es liegen verschiedene Gründe vor, die einen solchen Vorschlag nicht nur als theoretische Spekulation erscheinen lassen. Unter den Nebenprodukten der Gärung finden sich ganz besonders solche Verbindungen, die zu den sog. „oberflächenaktiven“, d. h. stark adsorbierbaren Verbindungen gehören, z. B. Fettsäuren, höhere Alkohole usw., während Zucker z. B. zwar nach G. Wiegner positiv, immerhin aber nicht so stark adsorbiert wird. Aber auch die Milchsäure z. B. wird nach eigenen unveröffentlichten Versuchen des Verfassers außerordentlich stark adsorbiert, und es erscheint dem Verfasser nach ihrem sonstigen physikalisch-chemischen Verhalten nicht zweifelhaft, daß auch z. B. Aldehyde zu den leicht adsorbierbaren Stoffen gehören werden. Sodann sollte man erwarten, daß Adsorbentien wie Kohle, Bolus oder auch höher disperse Gebilde wie organische und anorganische Gele auch der zweiten Forderung eines guten Abfangmittels entsprechen würden, indem sie nämlich die Lebenstätigkeit des Gärungserregers nicht wesentlich hemmen.

Aber auch praktische Beispiele lassen sich dafür anführen, daß dieser Vorschlag zu Gärungsversuchen in Gegenwart von Adsorbentien vielleicht Beachtung verdient. Bekanntlich ist von M. Delbrück und seinen Schülern die bemerkenswerte

Tatsache festgestellt worden, daß die Vergärung klarer Maischwürzen eine sehr unvollständige ist, daß aber durch Zusatz chemisch indifferenten Körper wie Roggenschrot oder auch mit Säuren und Laugen ausgekochter Biertreber eine erhebliche Verbesserung der Gärung erzielt werden kann. Die Erklärung dieser sehr bemerkenswerten Tatsache wurde bisher darin gesehen, daß die eingeführten festen Stoffe einerseits Sauerstoff adsorbieren, welcher der Hefe zugute kommt, und daß andererseits durch ihre Anwesenheit besonders beim Rühren und Lüften ein besserer Konzentrationsausgleich und damit bessere Gärungsbedingungen geschaffen werden. Der Verfasser ist der Ansicht, daß zum mindesten neben diesen Wirkungen auch das Adsorptionsvermögen der Zusätze für hemmende Stoffwechselprodukte zur Erklärung heranzuziehen ist. Denn gerade die besonders schädlichen Fettsäuren und ihre Verbindungen, die nach Neale und anderen zum Beispiel für die Schwergärigkeit mancher Melassen verantwortlich sind, gehören zu den am leichtesten adsorbierbaren Stoffen, die bisher bekannt sind. Aber auch bei der günstigen Wirkung des Lüftens, insbesondere des technisch so wichtigen „Entschäumens“ z. B. bei der Züchtung der Futterhefe muß der Capillarchemiker an Adsorptionerscheinungen denken. Denn auch an der Oberfläche gasförmig-flüssig finden bekanntlich starke Konzentrationserhöhungen, d. h. Adsorptionen statt, und es sind wiederum die oberflächenaktiven Stoffe, wie Fettsäuren usw., die auf diese Weise nicht nur angereichert, sondern durch Verschiebung der Gleichgewichtskonzentration aus dem Reaktionsgemisch neu gebildet, gleichsam „herausgelockt“ werden können.

Ein Weg, die Anwendbarkeit dieser Erörterungen auf die Theorie der Gärung zu prüfen, bestände etwa darin, für möglichst viele der auftretenden Stoffe, z. B. auch für den Acetaldehyd, spezifische Adsorbentien ausfindig zu machen, d. h. solche Zusätze, die den betreffenden Stoff besonders stark adsorbieren. Sodann könnte man versuchen, ob unter diesen Adsorbentien sich auch solche befinden, die ähnlich wie das Natriumsulfit die Lebenstätigkeit der Hefe nicht wesentlich hemmen. Aus dieser engeren Auswahl wären schließlich Adsorbentien zu wählen, in deren Gegenwart Gärversuche ange stellt werden könnten. Vielleicht könnte man auf diese Weise

nicht nur ebenfalls den Aldehyd, sondern auch noch andere Zwischenstufen der Gärung abfangen.

Übrigens kann das Heranziehen von Adsorptionserscheinungen auch bei einem näheren, z. B. kinetischem Studium des Sulfitverfahrens von Vorteil oder sogar von Notwendigkeit sein. In einer jüngsten Arbeit beschreibt C. Neuberg¹⁾ ein Abfangverfahren mit dem praktisch unlöslichen, nämlich suspendierten Calciumsulfit. Die Bindung des Acetaldehyds wird nun in einem solchen mikroheterogenen System offenbar vorwiegend, vielleicht praktisch ausschließlich in der Grenzfläche zwischen Sulfitteilchen und dem übrigen Medium vor sich gehen. Als erstes Stadium dieser Bindung wird aber ebenso zunächst eine adsorptive Bindung beider Komponenten zu erwarten sein, wie dies bei verschiedenen anderen chemischen Reaktionen in mikroheterogenen Systemen, z. B. H_2O_2 -Zersetzung durch kolloides Platin oder Katalase (P. Waentig und O. Steche), Gasreaktionen an porösen Wänden (M. Bodenstein) usw. wahrscheinlich gemacht worden ist. Ebenso wie in letzteren Fällen die Einführung von Adsorptionsvorstellungen wesentlich zur Klärung z. B. der Zersetzungsgeschwindigkeit beigetragen haben, würde wohl auch die kinetische Bearbeitung der Neubergschen Reaktion diese Begriffe mit Vorteil verwenden. Von Interesse wäre auch der Versuch, das hoch disperse gelatinöse Calciumsulfit, das nach Neuberg und Reinfurth vorübergehend erhalten werden kann, zu stabilisieren, um die Wirkung dieses mit außerordentlich großer Reaktionsfläche begabten Präparates mit den gröberen, vermutlich weniger wirksamen Sulfitpräparaten zu vergleichen.

3. Endlich möchte der Verfasser noch ganz kurz auf eine dritte von C. Neuberg gefundene Tatsache hinweisen, die schließlich den Kolloidchemiker mit lebhaftem Interesse erfüllt, Es handelt sich um die Beobachtung, daß der Zusatz von Aldehyden verschiedener Art die normale Hefegärung erheblich begünstigt²⁾. Besonders auffallend ist dabei, daß die chemisch nahe verwandten Ketone keineswegs ähnlich aktivierend wirken.

Ganz dasselbe Verhalten: außerordentliche Wirksamkeit von Aldehyden auf der einen Seite, Wirkungslosigkeit der nahe

¹⁾ C. Neuberg und E. Reinfurth, Berl. Ber. 52, 1677, 1919.

²⁾ C. Neuberg, diese Zeitschr. 88, 145, 1918.

verwandten Ketone andererseits hat nun J. R. Katz¹⁾ beim Einfluß dieser Stoffe auf das Altbackenwerden des Brotes beobachtet. In beiden Fällen finden sich derartige Merkwürdigkeiten, daß z. B. Formaldehyd in gewissen Konzentrationen positiv wirkt, obgleich dieser Stoff bei biologischen Vorgängen als Gift, bei organischen Gelen als Gerbmittel, das heißt als dehydratisierendes Agens gewöhnlich aufgefaßt wird.

Neuberg²⁾ faßt die Wirksamkeit der Aldehyde als eine chemische, z. B. als eine Acceptorwirkung auf, derart, daß die Aldehyde durch Aufnahme von Wasserstoff die intermediäre Dehydrierung des Zuckers zur Brenztraubensäure erleichtern. Diese Auffassung mag durchaus zutreffen. Daneben kann sich aber der Kolloidchemiker nicht gegenüber dem Parallelismus verschließen, der zwischen der gärungsfördernden und der quellungsfördernden Wirkung dieser Stoffe besteht. Wenn Polysaccharide wie das Stärkegel durch Aldehyde, nicht jedoch durch Ketone, stärker hydratisiert werden, so ist eine analoge physikalisch-chemische Wirkung auch auf die Hydratation der einfacheren Saccharide nicht von der Hand zu weisen. Denn wie eng die Hydratation von Zuckerlösungen mit der Quellbarkeit kolloider Systeme zusammenhängt, hat der Verfasser vor einiger Zeit sogar zahlenmäßig zeigen können³⁾. Auch an die technisch bekannten verflüssigenden Wirkungen des Gärungsaktivators Chloralhydrat auf Stärkekleister sei hingewiesen.

Nun erscheint aber die Beschleunigung der Gärung durch Aldehyde durchaus plausibel auf Grund der Auffassung, daß diese ähnlich wie die Stärke so auch gelösten Zucker im Sinne einer stärkeren Hydratation beeinflussen. Denn es ist vielfach bei anderen Fermentreaktionen gefunden worden, daß eine stärkere Hydratisierung des Substrates einen ausgesprochen aktivierenden Einfluß auf die Fermentreaktion ausübt. Beim Zusatz von NaCl variierender Konzentration zu Caseintrypsinmischungen fand z. B. T. B. Robertson⁴⁾, daß die Beschleunigung

¹⁾ J. R. Katz, Zeitschr. f. physiol. Chem 96, 314, 1916.

²⁾ C. Neuberg, l. c., ferner diese Zeitschr. 89, 388, 1918.

³⁾ Wo. Ostwald, Kolloid-Zeitschr. 24, 7, 1918.

⁴⁾ J. B. Robertson, Journ. of Biolog. Chem. 2, 317, 1907; Physikal. Chemie der Proteine, Dresden 1912, 379.

der Hydrolyse parallel läuft dem Einfluß des Salzes auf die Quellbarkeit z. B. von Gelatineplatten. Genau wie bei letzteren¹⁾ ergaben sich bei steigender Salzkonzentration mehrere Maxima resp. Minima. In ganz entsprechender Weise folgt aus den wichtigen Arbeiten von W. E. Ringer²⁾ über die Bedeutung des Zustandes des Substrates für die Geschwindigkeit der Pepsinwirkung, daß der Hydratationszustand des Eiweißes von fundamentaler Bedeutung für die Geschwindigkeit der Reaktion ist. Man könnte also von kolloidchemischen Gesichtspunkten aus schon jetzt sehr wohl die Auffassung entwickeln, daß die Wirkung der Aldehyde wenigstens zum Teil im Sinne einer stärkeren Hydratation des Zuckers und damit einer Erleichterung der Spaltung verläuft. Es wäre in diesem Zusammenhang von Interesse, z. B. die Viscosität von Zucker-Aldehyd-Gemischen zu studieren.

¹⁾ Wo. Ostwald, Arch. f. d. ges. Physiol. **111**, 581, 1906.

²⁾ W. E. Ringer, Kolloid-Zeitschr. **19**, 253, 1916; daselbst ältere Arbeiten.

Die physikalisch-chemische Betrachtung der Gärungsvorgänge.

Zugleich Äußerungen zu Wo. Ostwalds Bemerkungen über die Neubergsche Gärungstheorie.

Von

Carl Neuberg.

In den so anerkennenden Worten, die Ostwald¹⁾ meiner Gärungstheorie und den von meinen Mitarbeitern und mir durch dieselbe erzielten Ergebnissen gewidmet hat, sind keine sachlichen Gegensätze enthalten, sondern sie bringen Erwägungen physikalisch-chemischer Art über den rein chemischen Inhalt unserer Befunde. Wenn ich mich trotzdem zu diesem Gegenstande äußere, so geschieht dieses, um meiner Ansicht Ausdruck zu verleihen, man müsse sich darüber klar sein, daß manche Forderungen des Physikochemikers gegenwärtig noch nicht erfüllbar erscheinen und daß für biologische Probleme erst die rein chemischen Grundlagen geschaffen werden müssen, bevor der durchaus erwünschte Ausbau nach der physikalischen Seite hin erfolgen kann. Man wird dann auch vor dem sich jetzt öfter offenbarenden Bestreben bewahrt werden, an Stelle gut fundierter strukturchemischer Begriffe gar zu geschwind allgemeine physikalische Deutungen in die Biochemie einzuführen, ohne damit eine größere Präzision zu gewinnen. Die Verhältnisse liegen ähnlich wie etwa für die organische Chemie, wo erst die Grundtatsachen ermittelt werden mußten, damit der Physikochemiker nicht zu nächst unübersteigbare Grenzen fand.

In diesem Sinne möchte ich folgende Äußerungen aufgefaßt wissen.

¹⁾ Diese Zeitschr. 100, 279, 1919.

In unserem Gärungsschema aus dem Jahre 1913 ist dem Acetaldehyd eine zentrale Stellung zugewiesen und meiner Mitarbeiter und meine jahrelangen Bemühungen sind darauf gerichtet gewesen, den als eine Durchgangsstufe betrachteten Acetaldehyd in Substanz und in möglichst großen Mengen zu fassen. Denn es schien uns unerlässlich, auf experimentellem Wege zu zeigen, daß eine als Zwischenglied angesehene Verbindung unter richtig gewählten Bedingungen auch in corpore isoliert werden kann. Auf die quantitativen Verhältnisse muß man insofern Wert legen, als nur bei erheblichen Ausbeuten der Zusammenhang eines Körpers wie Acetaldehyd mit dem angewendeten Ausgangsmaterial, dem Zucker, zu erweisen ist. Das erstrebte Ziel erreichten wir auf verschiedenen Wegen, z. B. mit Hilfe unserer „Abfangmethode“. Sie legt den intermediär auftretenden Acetaldehyd fest durch Bindung an schwefligsaure Salze, die sich damit zu dem Aldehyd-Sulfitkomplex vereinigen.

Daß nun mit dieser Entfernung des Acetaldehyds aus der Reaktionsfolge durch unser Abfangmittel eine besondere Neubildung einhergeht, kann nicht angenommen werden. Es besteht vielmehr in dieser Hinsicht kein prinzipieller Unterschied von dem normalen Gärungsvorgange; denn auch hier folgt der Entstehung von Acetaldehyd eine ununterbrochene Fortschaffung, und zwar geschieht sie nicht durch Fixation, sondern durch Reduktion. In welcher Weise die Beseitigung eines Reaktionsproduktes besorgt wird, ist — darin sind Ostwald und ich einig — gleichgültig.

Es wird gar nicht, wie Ostwald glaubt, mehr, sondern ganz beträchtlich weniger Acetaldehyd erzeugt, nämlich dadurch, daß ein Zuckerteil, der für gewöhnlich über Acetaldehyd zu Alkohol abgebaut wird, hier zu Glycerin reduziert und so stabilisiert wird. Lautet doch die Gleichung der zweiten Vergärungsform:



Man darf nicht vergessen, daß die Bedeutung der Abfangmethode eben darin liegt, daß sie den Acetaldehyd in einer Form liefert, die seine Herkunft eindeutig erkennen läßt, im Gegensatz zur gewöhnlichen Gärung, für deren Produkt Äthylalkohol die Abstammung aus dem Acetaldehyd nicht ohne weiteres ersichtlich ist. Offenbar der Umstand, daß aus dem Acetaldehyd-Sulfitkomplex so leicht der reine Aldehyd zurückgewonnen werden kann, hat bei O. die gerade physikalisch-chemisch wohl schwer zu begründende Ansicht hervorgerufen, daß die Vereinigung von Aldehyd mit Sulfit vom Standpunkte des Massenwirkungsgesetzes ganz anders zu bewerten sei als die Verbindung des Aldehyds mit Wasserstoff zum Äthylalkohol.

So wenig im Lichte der Neubergschen Theorie die Abfangung so wie so gebildeten Acetaldehyds eine Neubildung involviert, ebensowenig kann man einsehen, daß „die Entfernung eines Reaktionsproduktes, gleichgültig welcher Art, nur im Sinne der Vermehrung dieses Produktes wirken“ kann. Das geht klar aus folgendem Beispiel hervor. Beseitigt man durch einen indifferenten Gasstrom oder durch Absorption mit KOH die bei der Gärung entstandene Kohlensäure, so tritt doch deshalb keine vermehrte CO₂-Produktion ein, d. h. es wird doch dadurch nie ein Teil des im Alkohol vorhandenen Kohlenstoffs zu Kohlendioxyd.¹⁾

Umgekehrt ist bis zu unserer Festlegung der Acetaldehydstufe der bei der alkoholischen Gärung in wechselnden, aber stets kleinen Mengen vorkommende Acetaldehyd als ein Erzeugnis sekundärer Oxydation zuvor gebildeten Äthylalkohols (vgl. z. B. E. Buchner), also als ein extra ordinem biologicum stehendes Kunstprodukt, betrachtet worden. Wollte man nun etwa die Ansicht vertreten, daß jene normalerweise manchmal auffindbaren Aldehydspuren durch eine eigene biochemische Nebenreaktion des Gäraktes erzeugt würden und sozusagen in

¹⁾ Das hat natürlich nichts mit der Frage zu tun, daß in praxi aus mancherlei Gründen, insbesondere wegen der Giftigkeit der CO₂ und wegen der erwünschten O-Zufuhr, eine Entfernung der Kohlensäure durch Lüftung günstig ist. (Foth.) Die Kohlensäure beeinflusst Ernährung, Entwicklung und Vermehrung der Hefezellen verschieden (M. Delbrück und F. Hayduck, die Gärungsführung 1911, S. 12 bis 62); sie wirkt bald als Sporn und bald als Zügel.

einer Sackgasse stecken blieben, so müßte für die Existenz dieses besonderen Seitenweges ein eindeutiger Beweis gefordert werden, ebenso wie für die Annahme, daß etwa nun das Abfangmittel diesen Schleichpfad plötzlich zur Hauptstraße mache. Zugleich bliebe eine solche Auffassung die Aufklärung schuldig, welches denn der unbekante Weg ist, der von der Brenztraubensäure zu Alkohol und CO_2 führt. Denn die Folgerungen, die sich aus dem Vorhandensein und der Ubiquität der Carboxylase sowie aus der Vergärung der Brenztraubensäure zu Acetaldehyd und Kohlendioxyd ergeben, will Ostwald ja nicht in Zweifel stellen. Bezeichnet man die Aldehydbildung als Nebenweg, so verzichtet man damit auf die doch durch andere chemische und biochemische Zusammenhänge gestützten Beziehungen dieses Körpers zum Weingeist.

Im Hinblick auf die Gleichgewichtsverhältnisse zieht nun weiterhin Ostwald die Bedeutung der Kreide bei einer sauren Gärung (Citronensäuregärung) heran; wir selbst hatten (1918) den Vorgang in eine gewisse äußerliche¹⁾ Parallele mit der Rolle des Abfangmittels gesetzt, durch die Worte²⁾: „Die Wirkung des Calciumsulfit bei diesen Abfangversuchen ist gewissermaßen der Wirkung der Kreide bei sauren Gärungen zu vergleichen.“

Nicht ganz zustimmen möchte man aber dabei Ostwalds Formulierung des physikalisch-chemischen Momentes; er setzt nämlich voraus, die optimale Ausnutzung des Zuckers durch Bindung der Citronensäure als Kalksalz komme dadurch zustande, daß die Reaktion (Oxydation) im Sinne des Massenwirkungsgesetzes dauernd zugunsten der Citronensäurekomponente verschoben werde. Der Hauptgrund für die bessere Ausbeute liegt jedoch in der Empfindlichkeit der Pilze gegen ihr giftiges Stoffwechselprodukt, die freie Citronen-, Milch- oder Oxalsäure. Stumpft man die Wirkung der H-Ionen durch eine Base ab,

¹⁾ Das tertium comparationis besteht darin, daß das Schwefligsäure-Ion der Sulfit sich mit dem Acetaldehyd absättigt und damit den Sulfitkomplex bildet, in ähnlicher Weise, wie das Kation von Kreide oder Zinkcarbonat die bei bestimmten Gärungen entstehende freie Säure (Citronensäure, Oxalsäure oder Milchsäure) bindet und in die entsprechenden indifferenten Salze überführt.

²⁾ C. Neuberg, Zeitschr. f. Botan. 1918.

so vermindert sich die Toxizität. Diese Sachlage geht überzeugend auch aus Wehmers¹⁾ Erfahrungen mit *Aspergillus fumaricus* hervor, der bedeutende Mengen freier Fumarsäure verträgt und dementsprechend aus Zucker erzeugen kann.

Die Berechtigung, das Gärungsendprodukt Citronensäure mit der Zwischenstufe Acetaldehyd in Parallele zu setzen, kann auch sonst wohl zweifelhaft sein. Vergleichbare Zustände sind Citronensäure und Alkohol. Wenn man nun — und das wäre physikalisch-chemisch gleichwertig — den Weingeist aus der gärenden Zuckerlösung kontinuierlich im Vakuum abdestilliert (und das Volumen durch Wasserzusatz konstant erhält), so wird doch dadurch keineswegs die Reaktion beständig zugunsten dieses Produktes verschoben, d. h. es gehen doch immer nur $\frac{2}{3}$ des im Zucker vorhandenen Kohlenstoffes in Alkohol über²⁾. Bedingend und ausschlaggebend ist vorwiegend der biologische Faktor, die Beeinträchtigung nicht sowohl des statischen Gleichgewichtes, als die des Enzyms.

Der Ansicht, daß eine Reaktionskomponente unter den üblichen Bedingungen nicht in so hoher Konzentration³⁾ aufzutreten braucht, wie unter speziellen Verhältnissen, ist unbedingt zuzustimmen. Man darf sogar weiter gehen als Ostwald und sagen, sie kann gar nicht in solcher Anhäufung normalerweise auftreten. Sonst wäre sie ja gar kein Zwischenprodukt mehr. Cumulation führt zu Stabilisierung, d. h. passagere Formen, die wir intermediär annehmen müssen, vertragen in der Norm keine Ansammlungen. Was wir abfangen hat wohl keine labile Struktur mehr. Wir meinen, daß Acetaldehyd als Zwischenstufe etwa in Gestalt des Hydrates, viel-

¹⁾ C. Wehmer, Ber. 51, 1663, 1918; 52, 562, 1919.

²⁾ Ob Gleichgewichtsbetrachtungen für den Vorgang Zucker = Alkohol + CO₂, der sich doch bisher nicht als reversibel erwiesen hat und der praktisch vollkommen im Sinne der Zerlegung abläuft, im strengen Sinne zulässig sind, ist eine Frage für sich.

³⁾ An anderen Stellen (s. S. 281 und 282) scheint die chemische Ähnlichkeit zwischen Aldehyd und Aldehydsulfit zu einer Identifizierung beider geführt zu haben, indem O. von einer erhöhten Konzentration spricht. Wir haben nirgend eine erhöhte Konzentration an Aldehyd, sondern nur die angehäuften Aldehydsulfitverbindung in Betracht gezogen.

leicht auch des Vinylalkohols, der sich ja bei vielen Reaktionen wie ein Tautomeres des Acetaldehyds verhält, oder sonst in einer aktiven Form auftritt. Daß trotzdem das, was fixiert werden kann, der gewöhnliche, beständige Acetaldehyd ist, befindet sich damit nicht im Widerspruch.

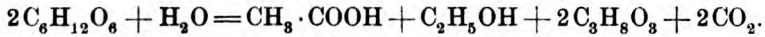
Unserer Auffassung nach verliert auch eine Substanz dadurch nicht den Charakter als Zwischenprodukt, daß ein Derivat derselben unter besonderen und günstigen Umständen in großer Menge abgefangen werden kann. Wir haben niemals, wie Ostwald vielleicht annimmt, allein in dem großen Umfange, in dem uns die Festlegung der Acetaldehydstufe gelungen ist, den ausschließlichen Beweis für die Acetaldehydtheorie gesehen. Wohl aber haben wir ausgeführt und sind noch jetzt der Ansicht, daß es in höchstem Grade wünschenswert ist, den experimentellen Beleg für das Auftreten einer Zwischenstufe dadurch zu erbringen, daß man sie wirklich in unzweifelhafter Form faßt. Darin scheint uns eben der Fortschritt gegenüber nicht beweisbaren und nicht durch das Experiment gestützten älteren Theorien gelegen zu sein¹⁾.

Nun meint Ostwald, wenn es uns gelänge, durch irgend ein Zusatzmittel zu gärenden Zuckerlösungen einen beliebigen neuen Körper zu erzielen, so würden wir ohne weiteres auch diesen als ein Zwischenprodukt betrachten können. Gerade die gegenteilige Auffassung haben wir in unseren Arbeiten begründet. In der Mitteilung von C. Neuberg und J. Hirsch²⁾ über die Gärung mit lebender Hefe in alkalischen Lösungen haben wir weitere Beweise für die Acetaldehyd-Theorie erbracht. Wir

¹⁾ Der Ausspruch O.s, daß theoretisch jedes Reaktionsprodukt in höherer Konzentration gewonnen werden kann (l. c. S. 281) und daß aus diesem Grunde dem Acetaldehyd nicht eine zentrale Stellung zugebilligt werden könne, erscheint in seiner Allgemeinheit nicht eindeutig. Denn erstens wird Acetaldehyd bei der „Abfangmethode“ niemals in höherer Konzentration erhalten, sondern lediglich in vermehrter Menge, aber in Form eines Derivates. Zweitens kann man kaum für Alkohol und Kohlendioxyd, die doch die in maximaler Konzentration entstehenden Reaktionsprodukte der normalen Gärung sind, bezweifeln, daß sie einen Hauptplatz einnehmen, und drittens ist es bei gewöhnlicher Gärführung unmöglich, eines dieser beiden Reaktionserzeugnisse in höherer Konzentration zu gewinnen, als dem Gärungsquotienten entspricht.

²⁾ C. Neuberg und J. Hirsch, diese Zeitschr. 96, 175, 1919.

haben gezeigt, daß unter der Einwirkung bestimmter Salze eine bisher unbekannte Art der Zerlegung des Zuckers durch die Hefe erfolgt. Wir gelangten dazu, eine dritte Vergärungsform des Zuckers aufzustellen, die durch folgende Gleichung ausgedrückt wird:



Wie man sieht, treten hier Essigsäure und Glycerin in ungewöhnlicher Menge auf. Wir können jedoch versichern, daß uns nie der Gedanke gekommen ist, z. B. in der Essigsäure ein Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung zu erblicken. Wir haben vielmehr ausdrücklich die Entstehung dieser Essigsäure theoretisch und experimentell auf eine Disproportionierung des Acetaldehyds zurückgeführt. Er stellt auch in diesem Falle das Zwischenprodukt dar; er ist zeitweise in erhöhter Menge tatsächlich nachweisbar. Es ist demnach nicht zutreffend, falls Ostwald dies annimmt, daß im bloßen Umstände der vermehrten Bildung, im reichlicheren Auftreten, von uns die Beweise für den Charakter einer Verbindung als Zwischenglied erblickt werden. Freilich schreiben wir große Bedeutung der Tatsache zu, daß bei richtiger Versuchsanordnung eine sonst nicht auftretende Verbindung massenhaft produziert werden kann. Denn in Mengen wird durch einen biologischen Prozeß nur hervorgebracht, was natürliche Beziehungen zu dem sich abspielenden Vorgange besitzt. Es wäre nämlich kaum wahrscheinlich, daß eine Stufe, die intermediär nicht erreicht wird und die nicht der Ausgangsort für die Entstehung weiterer Umwandlungsgebilde ist, zu der also der normale Abbau gar nicht führt, plötzlich zur Endstation und zugleich zu einem Haupterzeugnis wird. Dabei ist allerdings die Qualität der abgefangenen Substanz in maßgebender Weise mitbestimmend. Sie muß die entsprechende biochemische Dignität haben, d. h. sie muß, wie die Brenztraubensäure und der Acetaldehyd, tatsächlich biologisch angreifbar sein.

Gewiß stellt jedes in Substanz isolierte Zwischenglied ein das übliche Maß überschreitende Quantum dar. Wenn aber, wie im vorliegenden Falle, gar nicht freier Aldehyd, sondern das Gebilde $\text{CH}_3 \cdot \text{CHO}$ } NaHSO_3 erhalten wird, das völlig der Ver-

bindung $\text{CH}_2 \cdot \text{CHO} \} \text{H}_2$, d. h. dem Weingeist, entspricht, wenn weiter die Qualitätsbedingungen erfüllt sind, so entfällt die Berechtigung für die Einrede „der ungewöhnlichen Menge“. Wollte man diesen Einwand grundsätzlich erheben, so würde man die ganze Erforschung des intermediären Stoffwechsels zur Aussichtslosigkeit verdammen. Würde man wegen dieses Bedenkens die Suche nach Durchgangsstufen aufgeben, so bedeutete das den Verzicht auf die Ergründung der meisten biochemischen Vorgänge. Die Skepsis kann berechtigt sein bei den sogen. negativen Ergebnissen, bei der Nichterfüllung bestimmter Erwartungen, die man auf das Verhalten des gemutmaßten Zwischengliedes gesetzt hatte.

Aber wie anders geartet sind die Verhältnisse im vorliegenden Falle, bei der Festlegung der Acetaldehydstufe! Unser Zusatzmittel bewirkt an den gewöhnlichen Gärprodukten, an Äthylalkohol und Kohlensäure, keine chemischen Veränderungen. Da sich ausdrücklich zeigen läßt, daß die Entstehung von Acetaldehyd auf fermentativem Wege erfolgt, sollte man da annehmen, daß plötzlich, in wenigen Minuten, in einer Zymaselösung ein neues Ferment geboren werde, welches der Hefe bis dahin ganz ungewohnte Leistungen vollbringt? Wenn wir auf mehreren, verschiedenen Wegen — außer mittels Sulfiten mit zahlreichen anderen Salzen — die Produktion von Acetaldehyd aufzuweisen vermögen, wenn wir zugesetzte reduzierbare Substanzen, wie andere Aldehyde, Thioaldehyde, Ketone, mit dem beim normalen Zuckerabbau auftretenden Acetaldehyd konkurrieren lassen, ihn vom „Gärungswasserstoff“ abdrängen und so ebenfalls „abfangen“ können, wenn wir mit der neuen Methodik die Acetaldehydstufe fixieren auch beim analogen Abbau der Kohlenhydrate durch zahlreiche Bakterien, in deren Stoffwechsel Acetaldehyd bisher nicht gefunden ist und nichts auf das Vorhandensein eines entsprechenden Nebenweges hindeutet, so wird man zugeben können, daß diese Entstehung ungewöhnlicher Massen eines Acetaldehydderivates auch in ungewöhnlichem Maße durchsichtig ist.

Solche Erwägungen könnte man nicht anstellen hinsichtlich beliebiger Produkte. Wir wollen die Sachlage noch weiter an dem selben fingierten Beispiele erläutern, das Ostwald heranzieht, nämlich an der hypothetischen Bildung von Milchsäure.

Zunächst muß man von einem Zwischenprodukte verlangen, daß es durch Hefe umsetzbar, vergärbar ist. Das träfe für die Milchsäure bekanntlich nicht zu. Man wolle sich nun vorstellen, daß es möglich wäre, beispielsweise durch das Zusatzmittel starke Kalilauge in einer gärenden Zuckerlösung eine partielle Stabilisierung einer intermediär vorhandenen und normalerweise ganz anders verarbeiteten Modifikation des Methylglyoxals zu Milchsäure: $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{COH} + \text{H}_2\text{O} = \text{CH}_3 \cdot \text{CHOH} \cdot \text{COOH}$ zu erzielen. So hätte man zwar eine Entstehung von Milchsäure erreicht, könnte aber unmöglich die Schlußfolgerung ziehen, dadurch eine zwangsläufige Zwischenstufe abgefangen zu haben. Das Erzeugnis der Wasseranlagerung an Methylglyoxal, d. i. Milchsäure, wäre vergleichbar dem Additionsprodukt von NaHSO_3 an Acetaldehyd; es könnte so wenig wie dieser Schwefligsäure-ester als Zwischenglied gelten. Jene Art der Milchsäurebildung wäre nicht anders zu bewerten, als die rein chemische Umwandlung von Zucker in Lactat mittels Lauge. Mit der Milchsäure ist aber auch deshalb nichts anzufangen, weil sie bei der normalen Gärung, bei der Zuckerspaltung durch lebende Hefe, gar nicht auftritt. Man hat es also dabei auch keineswegs in der Hand, wie Ostwald zu meinen scheint, ihre Menge zu variieren. Zu allen diesen Gründen träte als weiterer noch hinzu, daß nach Nef¹⁾ eine Dissoziation der Milchsäure in Äthylalkohol und Kohlensäure überhaupt unmöglich ist.

Wir benützen die Gelegenheit, zu betonen, daß es nicht im geringsten ein Gegensatz zu der von uns entwickelten Theorie ist, wenn infolge der Aldehydfesselung eine so stark vermehrte Glycerinbildung eintritt. Denn wir haben ja wiederholt und ausführlich auseinandergesetzt, daß durch Fixation der Aldehydstufe der „Gärungswasserstoff“, der sonst zur Überführung des Acetaldehyds in Äthylalkohol dient, auf einen anderen Weg verwiesen, und da er nicht frei entweicht, von einem anderen internen Acceptor aufgenommen und so zur erhöhten Bildung von Glycerin verbraucht wird. Bei Betrachtungen über das Gleichgewicht ist zu berücksichtigen, daß die Menge des Endproduktes Glycerin eine Steigerung um mehr als 1000% — von 3 auf 37 Gewichtsprocente — erfährt. Wollte man hierauf

¹⁾ J. U. Nef, Ann. 335, 279, 298, 1904.

die bei einfachen Verhältnissen gewonnene Anschauung übertragen, so sollte man folgern, daß eine solche gewaltige Anhäufung eines Enderzeugnisses die vollständige Umsetzung des Zuckers unterbinden müßte. In Wirklichkeit wird aber der Zucker vollkommen vergoren. Daraus geht wieder hervor, wie problematisch es ist, a priori die Gleichgewichtsbeziehungen bei diesem komplexen Vorgang festlegen zu wollen. Wohl aber läßt sich biochemisch verstehen, daß das Glycerin teils wegen seiner Ungiftigkeit, teils wegen seiner Fähigkeit, automatisch die Reaktion des Milieus zu regulieren¹⁾, und seiner hiermit vielleicht zusammenhängenden enzymkonservierenden Eigenschaften in hohen Konzentrationen anwesend sein kann.

Wenn man nun ferner zu zeigen vermag, wie das jüngst von C. Neuberg und J. Hirsch²⁾ geschehen ist, daß unter gleichen Bedingungen die Reaktionsgeschwindigkeiten für die normale Zerlegung des Zuckers in Alkohol und Kohlensäure einerseits sowie die durch das Abfangmittel erzwungene Vergärung zu Acetaldehyd, Kohlendioxyd und Glycerin andererseits die gleichen sind, so ist ein neuer und wesentlicher Beweis zugunsten unserer Auffassung erbracht worden, daß beide Vergärungsformen innerlich zusammenhängen. Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten beruht auf quantitativen Analysen der Gärprodukte, die um so genauer ausfallen, je größer die Konzentrationen sind. Mit Spuren käme man hier zu keinem Ergebnis.

Uns scheint also die reichliche Anhäufung des Acetaldehydderivates notwendig gewesen zu sein, während Ostwald darin keinen besseren Beweis unserer Acetaldehydtheorie zu erblicken vermag, wie wir ihn auch schon vorher mit anderen Argumenten erbracht hatten. Dem Biochemiker erscheint es höchst wünschenswert, wenn er eine theoretisch abgeleitete Zwischenstufe auch tatsächlich in Massen demonstrieren kann. Man sollte aber meinen, daß der Physikochemiker dieselbe Forderung stellen müßte; denn bei physikalisch-chemischer Betrachtung ist der Acetaldehyd-Sulfit-Komplex ganz gleichwertig dem Äthylalkohol insofern, als

¹⁾ W. Löffler und K. Spiro, *Helv. Chim. Acta* 2, 533, 1919.

²⁾ C. Neuberg u. J. Hirsch, *diese Zeitschr.* 98, 141, 1919.

beidemale die Entstehung der Verbindung eine gleichgeordnete Veränderung darstellt.

Nach unserer Ansicht beruht die Leistung des Abfangverfahrens darauf, daß ein normalerweise gebildetes Reaktionsprodukt beständig in eine von den biologischen Agenzien nicht mehr angreifbares Derivat übergeführt und auf diese Weise so angehäuft wird, wie für gewöhnlich der Alkohol. Auch durch Veränderung der physikalischen Bedingungen können nun — das hatten z. B. Neuberg und Kerb sowie Buchner und Mitarbeiter früher versucht — ebenfalls Abfangeffekte erstrebt werden. Es ist nicht einzusehen, wieso etwa durch Ausnutzung von Oberflächenkräften erreichbare Erfolge eine größere Beweiskraft haben sollten als die Ergebnisse unserer Methoden, deren Wirkungsweise chemisch klar definiert ist. Sollten auf einem solchen physikalischen Wege die trefflichen Ausbeuten des chemischen Abfangverfahrens — sie reichen bis zu 75⁰/₀ — übertroffen werden, so wäre durch die Quantität nach Ostwalds eigenen Darlegungen nichts gewonnen. Die Art aber, auf welche die Entfernung des Reaktionsproduktes und damit seine Anreicherung vor sich geht, ist — besonders bei physikalischer Betrachtungsweise — gleichgültig. Der Weg der Kondensation und Polymerisation, dem O. eine große biologische Bedeutung beimißt, wird nun gerade beim Gärakte in den Vorgängen, die zur Zuckerspaltung führen, nicht besprochen und kann hier ganz außer Berücksichtigung bleiben. Dagegen sind Versuche mit adsorbierenden Stoffen schon früher von Söhngen, Philippi, Warburg, Meyerhof sowie J. Traube¹⁾ angestellt und werden auch von uns in systematischer Weise verfolgt, ohne daß bisher ein Ergebnis erzielt wäre, das der Wirkung eines guten chemischen Abfangmittels entspräche. Wenn man mit Kolloiden nun, worauf Ostwald hinweist, Fettsäuren und höhere Alkohole adsorbieren kann, so hat das nichts mit der eigentlichen zymatischen Wirkung zu tun; jene Stoffe sind nämlich, wie wir den Feststellungen F. Ehrlichs entnehmen, keine Produkte des Zuckerzerfalls, sondern Erzeugnisse des Eiweißstoffwechsels. Auch berührt es das eigentliche Problem der alkoholischen Gärung nicht, wenn die technische Vergärung von Maischen in Gegenwart

¹⁾ Lit. in der zit. Arbeit von C. Neuberg u. J. Hirsch.

oberflächenaktiver Stoffe, wie Trebern oder Roggenschrot, besser vor sich geht als in klarem Zustande. Denn die Maischen enthalten alle möglichen Fremdkörper, und es soll gewiss nicht bezweifelt werden, daß die Adsorption von Stoffen, die wie die Fettsäuren etwa für den Hefepilz giftig sind, praktisch wichtig sein kann. Aber dieses Verhalten steht in keiner unmittelbaren Beziehung zum chemischen Verlauf der alkoholischen Zuckerspaltung; Delbrück und Hayduck (l. c.) geben ganz andere Erklärungen für die Rolle der Suspensioide, die z. T. auch gärungshemmend wirken und ihren Einfluß hauptsächlich auf dem Wege über die Zellen ausüben.

Adsorptionserscheinungen spielen auch, entgegen Ostwalds Meinung, keine ersichtliche Rolle bei unserer Abfangmethode. Denn gerade die von ihm erwartete besonders günstige Wirkung des suspendierten Calciumsulfits ist nicht erkennbar. Im heterogenen System wirken die unlöslichen Sulfite bei weitem nicht so gut wie im homogenen Medium das gelöste Dinatriumsulfit. Allem Anscheine nach ist die Konzentration an Sulfitionen ganz unvergleichlich bedeutsamer als irgendeine Adsorption. Bei den vielen von uns untersuchten unlöslichen schwefligsauren Salzen¹⁾ hat keines auch nur angenähert den Effekt wie das lösliche sekundäre Natriumsulfit. Wenn wir trotzdem in gewissen Fällen das unlösliche Kalksalz anwenden, so geschieht dies deshalb, weil es auf bestimmte empfindliche Erreger wegen seiner neutralen Reaktion im Gegensatz zur alkalisch reagierenden Dinatriumverbindung nicht schädigend wirkt. Man muß dann durch Schütteln und Gasdurchleiten die träge Tätigkeit des unlöslichen Calciumsulfits unterstützen. Irgendein förderlicher Einfluß einer an dem Suspensoid sich vollziehenden Adsorption ist nicht bemerkbar. Selbst in statu nascendi, d. h. wenn man durch Einführung von schwefliger Säure in eine Aufschwemmung von Calciumcarbonat in gärender Zuckerlösung das Calciumsulfit frisch und in besonders reaktionsfähiger Form entstehen läßt, bleibt der Erfolg weit hinter dem beim Dinatriumsulfit zurück. Kein mit noch so großer Oberfläche ausgestattetes unlösliches Sulfit — die wirklich kolloidalen schwefligsauren Salze des Aluminiums, Thoriums und Urans leisten besonders wenig¹⁾ —

¹⁾ C. Neuberg u. E. Reinfurth, Ber. 52, 1677, 1919.

wirkt auch nur im entferntesten so günstig, wie das homogen gelöste Dinatriumsulfit. Der grobdisperse Zustand bot nachweislich keinen Vorteil. Die Ausbeute hängt, soweit ersichtlich, allein und in vollkommener Übereinstimmung mit der früher von uns eingehend entwickelten Theorie¹⁾ von der Konzentration der Sulfitionen in der Lösung ab. Hier liegen die Verhältnisse recht klar zugunsten der durchsichtigen rein chemischen Umsetzung.

Eine verstärkende Oberflächenwirkung des zugefügten Calciumsulfits ist auch deshalb wenig wahrscheinlich, weil das Reaktionsprodukt, das acetaldehyd-schweflige Calcium, ja in Wasser spielend leicht löslich ist. Darum trifft auch der von Ostwald angestellte Vergleich mit der Citronensäuregärung nicht ganz zu. Wie schon zuvor erwähnt ist, bestehen zwischen beiden Vorgängen bei formaler Analogie wesentliche Differenzen. Im Falle der Citronensäuregärung wird die von den Pilzen auch in kalkfreier Umgebung hervorgebrachte Citronensäure durch CaCO_3 in unlöslicher Form ausgefällt. Es handelt sich um die Beseitigung eines schädlichen Stoffwechselproduktes, das zugleich ein Endprodukt ist. Bei unserem Abfangverfahren wird, auch wenn man Calciumsulfit (CaSO_3) anwendet, ein lösliches Produkt erzeugt. Es wird daher keine Verbindung in unlöslicher Form entfernt, es wird auch kein Endprodukt beseitigt, sondern auf chemischem Wege eine Zwischenstufe fixiert, die in Abwesenheit des Abfangmittels überhaupt nicht oder nicht immer nachweisbar ist. Das Calciumcitrat wird den Erregern einfach durch mechanische Ursachen unzugänglich, der Acetaldehyd-Sulfitkomplex dem Ferment aber lediglich und in deutlicher Weise aus chemischen Gründen.

Schließlich haben alle Vorgänge ihre physikalische Seite. Man muß sich aber fragen, ob die allgemeinen physikalischen Eigenschaften oder speziellere chemische Affinitäten das Feld beherrschen. So verweist Ostwald auf die Möglichkeit, daß die von uns aufgefundene spezifische gärungsfördernde Wirkung der Aldehyde²⁾ mit den von ihm beschriebenen, hochinteressanten

¹⁾ C. Neuberg u. E. Reinfurth, diese Zeitschr. 89, 365 und 92, 234, 1918 und l. c.

²⁾ C. Neuberg, Sitzungsber. d. Preuß. Akad. d. Wissenschaften 28, 588, 1918; diese Zeitschr. 88, 145, 1918; vgl. auch diese Zeitschr. 89, 388, 1918.

Hydratationserscheinungen zusammenhängen könnte. Die Konzentration an wirksamer Substanz ist so außerordentlich gering, daß eine Beziehung zum Quellungsstate nicht gerade zwingend erscheint. Wir hatten übrigens selbst in unserer diesbezüglichen Mitteilung bereits an physikalisch-chemische Einflüsse, und zwar an Oberflächenaktivität, gedacht (l. c.). Eben wegen der außerordentlichen Kleinheit der wirksamen Substanzmengen hätte man am ehesten Effekte der Oberflächenspannung erwarten sollen; aber eine in vielen Fällen sich ergebende Wirkungslosigkeit der isomeren Ketone, deren Oberflächenaktivität nicht sehr verschieden ist, sowie andere Umstände verwiesen uns auf die chemische Deutungsweise. Wenn die von uns angewendeten Aldehydspuren in den großen Verdünnungen eine Hydratation der Zuckerlösung bewirken sollten, so müsste weiter festgestellt werden, ob und wie dadurch eine Beschleunigung der Gärung zu stande kommt. Gerade das von Ostwald als typisch betrachtete Chloralhydrat ist ein recht mäßiger Gärungsaktivator; auch die hydratisierende Kraft, die er hervorhebt, scheint schwach zu sein. Nach Mauch benötigt man nämlich zur Quellung 100 bis 200 Teile Chloralhydrat auf 1 Teil Stärke; wir aber fanden¹⁾, daß z. B. $\frac{3}{10000}$ Teile Formaldehyd auf 1 Teil Zucker deutlich aktivieren²⁾. Bezogen auf das Kohlenhydrat tritt also unser Effekt mit einer ca. $\frac{1}{2}$ -millionenfach geringeren Konzentration ein. Wir glauben, vorläufig an unserem chemischen Erklärungsversuch festhalten zu sollen; denn nach neuen Erfahrungen kommt das Stimulationsvermögen allen solchen Verbindungen in Hinsicht auf die Hefengärung zu, die phytochemisch hydrierbar sind. Hierüber liegen ausgedehnte Versuche von C. Neuberg und M. Ehrlich vor, die demnächst veröffentlicht werden sollen. In diesen wird die Wirkung auch solcher Stoffe beschrieben, die keinen ausgesprochenen Einfluß auf die Solvatation ausüben dürften. Der beste Beweis für die chemische

¹⁾ C. Neuberg, diese Zeitschr. 88, 145, 1918.

²⁾ Auch bei der von J. R. Katz (H. 96, 317, 1916) beobachteten Einwirkung der Aldehyde auf das Altbackenwerden des Brotes sind, wie man aus seinen Zahlen berechnen kann, ca. 100% wasserfreier (!) Aldehyd vom Gewicht der Stärke, an der sich die Grundveränderung des Altbackenwerdens abspielt, zur Anwendung gelangt.

Deutungsweise liegt aber in dem Verbrauch der zugesetzten Aktivatoren; diese Abnutzung erfolgt durch Reduktion.

In ihrer Gesamtheit führen die vorstehenden Darlegungen also zu dem Ergebnis, daß vorläufig chemische Feststellungen mehr zur Ergründung der Gärungsvorgänge beizutragen scheinen, als physikalisch-chemische Betrachtungen; ihnen wird sicherlich dereinst — und es ist ein großes Verdienst Ostwalds, dieses Ziel stets im Auge zu behalten — die wichtige Aufgabe zufallen, das Errungene zu ordnen und seine Bedeutung zu verallgemeinern. Das gegenwärtige Verhältnis schien aber selbstverständlich für einen Vorgang, dessen Aufklärung in erster Linie zunächst noch eine mehr chemische Aufgabe ist.

Die dritte Vergärungsform des Zuckers.

Von

Carl Neuberg und Julius Hirsch.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Institutes für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

A. Entwicklung und Aufgabe.

Für die im Jahre 1916 von C. Neuberg und E. Färber¹⁾ mitgeteilte Tatsache, daß außer den schwefligsauren Salzen eine Reihe anderer Substanzen von alkalischer Reaktion eine ganz wesentliche Wandelung im Verlaufe der alkoholischen Gärung herbeiführen, haben wir vor einiger Zeit die Erklärung liefern können²⁾. Jene Veränderung besteht in einer vermehrten Bildung von Acetaldehyd, Essigsäure und Glycerin sowie in einer entsprechenden Verminderung der gewöhnlichen Gärungsprodukte Äthylalkohol und Kohlensäure.

Der Mechanismus der Sulfitwirkung war von C. Neuberg und E. Reinfurth³⁾ klargelegt worden. Sie hatten gezeigt, daß es sich um eine aktive Anteilnahme der schwefligsauren Salze handelt. Diese greifen an einem Durchgangsgliede des Zuckerabbaus an, und zwar an der Phase des Acetaldehyds. Sie fangen den Acetaldehyd ab, und die Folge dieser Festlegung einer Oxydationsstufe ist die korrelative Bildung eines Reduktionsproduktes, des Glycerins; Acetaldehyd und Glycerin sind zu jedem Zeitpunkte⁴⁾ der Gärung in molekularem Ver-

¹⁾ C. Neuberg und E. Färber, diese Zeitschr. 78, 238, 1916.

²⁾ C. Neuberg und J. Hirsch, diese Zeitschr. 96, 175, 1919.

³⁾ C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. 89, 365 und 92, 234, 1918.

⁴⁾ C. Neuberg u. J. Hirsch, diese Zeitschr. 98, 141, 1919.

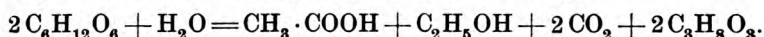
hältnis vorhanden. Die unmittelbare Vorstufe des Acetaldehyds ist die Brenztraubensäure, die bei der Zerlegung durch die Carboxylase neben Acetaldehyd die Gärungskohlensäure ergibt. Auf Grund dieser Ermittlungen konnten Neuberg und Reinfurth der klassischen alkoholischen Zuckerspaltung als eine neue, als zweite Vergärungsform den Zerfall bei der „Abfangmethode“ an die Seite stellen. Er vollzieht sich nach der Gleichung:



Der Reaktionsmechanismus der anderen alkalischen Salze schien zunächst verwickelter. Wir haben gefunden, daß dabei gleichfalls die Stufe des Acetaldehyds eine maßgebende Rolle spielt und daß die am Aldehyd einsetzende Veränderung auch hier den abweichenden Verlauf des ganzen Gärungsvorganges nach sich zieht. Während unter dem Einflusse der schwefligsauren Salze die erwähnte Festlegung des Acetaldehyds in Form von acetaldehyd-schwefligsaurem Salz stattfindet, das den biologischen Agenzien nicht mehr zugänglich ist, kommt unter der Einwirkung von alkalisch reagierenden Salzen, wie von Carbonaten, Bicarbonaten, Phosphaten usw., ein andersgearteter Eingriff in die Phase des Acetaldehyds zustande. Die genannten Salze, die mit keiner spezifischen Affinität zum Acetaldehyd ausgestattet sind, vermögen sich nicht mit ihm zu vereinigen und ihn so festzulegen, sie bewirken aber eine neue Reaktion am Acetaldehyd, nämlich die enzymatische Disproportionierung zweier Moleküle unter Aufnahme von 1 Mol Wasser in Äthylalkohol und Essigsäure. Diese sind dann weiterhin nicht mehr angreifbare Endprodukte. Die übrigen Veränderungen, die der Alkalisatorzusatz zur Folge hat, sind die gleichen, die das Sulfit auslöst: Infolge Inanspruchnahme der Stufe des Acetaldehyds kann der normalerweise seiner abschließlichen Hydrierung zu Äthylalkohol dienende Wasserstoff sich nicht in der gewöhnlichen Art betätigen, sondern erfaßt, da er nicht in molekularem Zustande frei entwickelt wird, einen anderen Zuckerteil und reduziert ihn zu Glycerin. Weil 1 Mol Essigsäure seine Entstehung der „Cannizzarierung“

zweier Moleküle Acetaldehyd verdankt, von denen jedes ursprünglich 1 Mol Glycerin äquivalent ist, so waltet hier die Wechselbeziehung von 1 Mol Essigsäure zu 2 Mol Glycerin ob.

So sind wir zur Feststellung der dritten Form der Zuckerspaltung durch Hefe gelangt¹⁾. Die Zerlegung des Zuckers in Essigsäure, Alkohol, Kohlendioxyd und Glycerin geschieht gemäß der Gleichung:



Bei der Wichtigkeit, die eine neue Vergärungsform für sich in Anspruch nehmen darf, schien uns der Nachweis erforderlich, daß unter den angegebenen Gärbedingungen obige Formulierung durchgehends zutrifft. Wir hatten früher das Bestehen der genannten Beziehungen für die Vergärung des Zuckers in Gegenwart von Natriumhydrocarbonat dargetan. Ihre allgemeine Gültigkeit ergibt sich aus der Durchführung der Versuche mit den verschiedenen schon von Neuberg und Färber benützten Salzen und mit einigen anderen verwandten Verbindungen sowie aus den genauen Analysen der Reaktionsprodukte.

Wir haben von neuem Vergärungen in Gegenwart von Dikaliumcarbonat, Dikaliumphosphat, Trinatriumphosphat, Dinatriumphosphat und im Anschlusse daran mit dem Gemische von saurem und sekundärem phosphorsaurem Natrium, ferner mit Magnesiumoxyd und Zinkhydroxyd vorgenommen.

In sämtlichen Fällen fanden wir ausnahmslos unsere Gleichung der 3. Vergärungsform bestätigt. Genau wie wir beim Natriumhydrocarbonat gezeigt hatten, entstehen Essigsäure und Glycerin — voll entsprechend der Theorie — im Verhältnis von 1:2 Mol. An einigen Beispielen haben wir, ebenfalls ganz wie früher, festgestellt, daß anfangs sich Acetaldehyd anhäuft, um dann offenbar infolge Eintritts der Disproportionierung wieder zu verschwinden. Diese wird allem Anscheine nach durch das alkalische Medium begünstigt, wie das Experiment²⁾ auch für den

¹⁾ C. Neuberg und J. Hirsch, l. c.

²⁾ C. Neuberg und J. Hirsch, diese Zeitschr. 96, 192, 1919.

Fall lehrt, daß eigens zugesetzter, nicht im Gärakte durch Zuckerabbau erzeugter Acetaldehyd mit Hefe in Berührung tritt.

Zu den Versuchen konnte überall Rohrzucker verwendet werden, da die Invertase in Gegenwart von allen vorerwähnten Zusätzen wirksam bleibt. (Neuberg u. Färber, 1916.)

Hinsichtlich des Umfanges, mit dem sich die 3. Vergärungsform des Zuckers verwirklichen läßt, haben wir folgendes zu bemerken: Beim Natriumhydrocarbonat sind wir den früheren Höchstwert von 29,8⁰/₀ überflügelnd, bis zu 35,4⁰/₀ der theoretischen Menge an Essigsäure und Glycerin gelangt, so daß mehr als $\frac{1}{3}$ des Zuckers nach der angeführten Gleichung zerfielen¹⁾. Bei den jetzt in quantitativer Hinsicht geprüften Salzen haben wir die Zerlegung in einem Umfange bis etwa 27⁰/₀ erreicht, ohne behaupten zu wollen, daß diese Werte nicht mehr steigerungsfähig wären. Der nicht in diese Spaltungsart einbezogene Zucker unterliegt der gewöhnlichen alkoholischen Gärung im Sinne der Gay-Lussacschen Gleichung, nämlich der Zersetzung zu Kohlensäure und Äthylalkohol. Mit anderen Worten heißt dieses: Die von uns anwendbar gefundenen Höchstkonzentrationen stellen unter den vorhandenen Bedingungen die Toleranzgrenze der Hefe für diese Alkalisatoren dar; es ist einfach wegen der beschränkten Löslichkeit der Zusatzmittel einerseits, wegen ihrer Giftigkeit andererseits nicht möglich, ihren Gehalt so weit zu verstärken, wie notwendig wäre, um die ganze Gärung in die neue Bahn zu zwingen.

Der chemische Charakter der geprüften Zusatzmittel ist verschieden; unter ihnen befinden sich leicht lösliche wie ganz unlösliche Verbindungen. Alle wirken gleichartig, ähnlich wie wir es früher bei den löslichen und unlöslich schwefligsauren Salzen festgestellt hatten. Der gleichsinnige Endeffekt läßt den Schluß zu, daß es sich hier um einen gemeinsamen Reaktionsmechanismus handelt. Derselbe dürfte in der Begünstigung einer zwar prädisponierten, aber normalerweise nur in beschränktem Umfange einsetzenden

¹⁾ Die entsprechenden Belege werden in anderem Zusammenhange mitgeteilt werden.

Fermentleistung bestehen, nämlich in der Katalysierung der Dislokation¹⁾ intermediär gebildeten Acetaldehyds. Die auf dem Wege der enzymatischen Disproportionierung vollzogene Herausführung einer bedeutenden Menge Acetaldehyd als Oxydationsstufe aus der Kette der normalen Umwandlungen hat dann, durch Reduktion am Gegenort des Systems, zwangsläufig die korrelative Glycerinvermehrung zur Folge.

Die Einzelheiten ergeben sich aus nachstehenden Versuchen.

B. Gärung in Gegenwart von Kaliumcarbonat.

Zunächst wurde in Vorversuchen festgestellt, bis zu welchen Konzentrationen Kaliumcarbonat in den Zuckerlösungen vorhanden sein konnte, ohne daß eine Schädigung der Hefe geschah und somit die Gärung unvollkommen blieb. Zu einem Gäransatze, der 10% Rohrzucker und eine dem Zuckergewicht gleiche Hefenmenge enthielt, wurde in je 5 Proben so viel Kaliumcarbonat hinzugegeben, daß die Lösungen daran 0,1 bis 0,5 m waren. Bei einer Konzentration von 0,5 und 0,4 m-K₂CO₃ trat überhaupt keine Gärung ein; bei 0,3 und 0,2 m-K₂CO₃ war die Umsetzung nicht vollständig; nur bei 0,1 m-K₂CO₃ konnte der Vorgang ganz zu Ende geführt werden. Die Grenze lag ungefähr bei der Alkalinität, die C. Neuberg und E. Färber²⁾ früher auch bei der zellfreien Gärung festgestellt hatten.

Versuch 1. Die Maische bestand aus:

47,5 g Rohrzucker (entsprechend 50 g Hexosen),

50 g Hefe M,

7 g K₂CO₃ sowie

Wasser³⁾ zum Volumen von 500 cem.

(Konzentration an K₂CO₃ = 0,1 m).

Nach 48 Stunden war aller Zucker verschwunden. Die quantitativen Bestimmungen von Alkohol, Glycerin und Essigsäure

¹⁾ Vgl. C. Oppenheimer, Fermente, II, 684, 1913.

²⁾ C. Neuberg und E. Färber, diese Zeitschr. 78, 238, 1916.

³⁾ Auf die besondere Zugabe von Nährsalzen verzichteten wir hier und in den nachstehenden Fällen. Die verwendete Hefesorte war zumeist Rasse M des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin.

wurden nach den gleichen Methoden durchgeführt, wie wir sie früher¹⁾ beschrieben haben. Wir machen besonders darauf aufmerksam, daß für die genaue Ermittlung der Essigsäure das Gärgut vollständig klar filtriert sein muß; anderenfalls bekommt man aus den Hefezellen flüchtige Säure und damit zu hohe Werte.

In 100 ccm Gärgut (enthaltend die Umsetzungsprodukte von 10 g 6-Kohlenstoffzucker) wurden gefunden:

Alkohol	4,17 g,
Glycerin	0,67 g,
Essigsäure	0,23 g.

Versuch 2. Der Gäransatz war von gleicher Beschaffenheit wie in Versuch 1 (0,1 m-K₂CO₃). Die Ausbeuten an Gärungserzeugnissen betragen für 100 ccm:

Alkohol	4,16 g,
Glycerin	0,56 g,
Essigsäure	0,18 g.

Aus diesen beiden Versuchen geht hervor; daß bei Gegenwart von Kaliumcarbonat sowohl die Glycerinal als die Essigsäurebildung deutlich gesteigert sind. Dabei verringert sich entsprechend der Ertrag an Alkohol im Vergleich mit einer Gärung, die ausschließlich nach der Gay-Lussacschen Gleichung verlaufen wäre.

C. Gärung in Gegenwart von Dikaliumphosphat.

Die Prüfung der Toleranzgrenze für Dikaliumphosphat ergab in Vorversuchen, daß bei einer Konzentration von 3,0 m-K₂HPO₄ Gärung überhaupt nicht eintrat; bei 2,0 und 1,5 m-K₂HPO₄ konnte die Umsetzung mit der zur Verfügung stehenden Hefensorte nicht zu Ende geführt werden, während von 1,0 m abwärts eine 10⁰/₀ige Zuckerlösung von einer dem Zuckerquantum gleichen Hefenmenge in 24 Stunden vollständig zerlegt wurde.

Versuch 3. 500 ccm Gärflüssigkeit enthielten:

47,5 g Rohrzucker,
50 g Hefe und
87 g Dikaliumphosphat, K ₂ HPO ₄ ,
(entsprechend einer 1,0 m-Lösung).

¹⁾ C. Neuberg und J. Hirsch, diese Zeitschr. 96, 175, 1919.

Die Gärung war nach 48 Stunden abgelaufen; für 10 g umgesetzter Hexose wurden ermittelt:

Alkohol	3,46 g,
Glycerin	1,37 g,
Essigsäure	0,46 g.

Versuch 4. Ein gleicher Ansatz wie Versuch 3 ergab für 100 ccm Gärgut folgende Erträge:

Alkohol	3,71 g,
Glycerin	1,25 g,
Essigsäure	0,40 g.

In einer 1,0 m-Lösung von Dikaliumphosphat wurde somit der Zucker zu 4 bis 4,6% in Essigsäure und zu 12,5 bzw. 13,7% seines Gewichtes in Glycerin gespalten. Diese Ausbeuten reichen bis 26,8% der Menge, die nach der Gleichung der 3. Vergärungsform auftreten kann. Sie blieben kaum hinter dem mit Natriumhydrocarbonat erzielten Ertrage zurück.

D. Gärung in Gegenwart von Magnesiumoxyd.

Die Vorversuche lehrten, daß bei einer 10%igen Zuckerlösung nur in einer 0,125 Mol Suspension von Magnesiumoxyd (MgO) vollständige Vergärung zu erzielen war. Bei 0,25 und 0,5 Mol trat sie zwar mit erheblicher Verzögerung ein, kam jedoch innerhalb 24 Stunden wieder zum Stillstand.

Versuch 5. Die Maische hatte folgende Zusammensetzung:

47,5 g Rohrzucker,
50,0 g Hefe M,
2,5 g MgO ($=\frac{1}{8}$ m).
Volumen = 500 ccm.

Nach 48 Stunden war die Gärung abgelaufen. Die Analyse wies aus für 100 ccm Gärgut:

Alkohol	4,21 g,
Glycerin	0,73 g,
Essigsäure	0,24 g.

Zur Identifizierung der Essigsäure wurde aus dem die flüchtige Säure enthaltenden Destillat auf die früher beschriebene Weise das Silbersalz hergestellt. Bei der Silberbestimmung gaben

0,1554 g Substanz: 0,0987 g Ag.

$\text{CH}_3\text{.COOAg}$. Ber.: 64,66% Ag; gef.: 63,51% Ag.

Versuch 6. Ein Gäransatz von gleichen Konzentrationsverhältnissen, aber ohne Magnesiumoxyd, lieferte unter sonst den selben Bedingungen für 100 ccm Gärgut folgende Ausbeuten:

Alkohol 4,72 g,
Glycerin 0,31 g.

Die hier bei der Titration der flüchtigen Säure ermittelte Zahl war für 100 ccm verarbeitetes Gärgut 1,0 ccm n-Natronlauge; sie übertraf den für die gewöhnliche Gärung zu beobachtenden Wert nicht, so wenig wie die Glycerinmenge.

Die bisher bei Gärungen unter verschiedenen Bedingungen gefundenen Mengen Essigsäure schwanken nicht unerheblich. A. Béchamp¹⁾, der das ständige Auftreten der Essigsäure bei der alkoholischen Zuckerspaltung nachwies, hat 0,05 bis 0,40% vom Gewichte des angewendeten Kohlenhydrats festgestellt. Zu höheren Aciditäten gelangte A. Fernbach²⁾ bei vielfach variierten Bedingungen, zu 0,40 bis 2,96%; er erkannte, daß hier in der Hauptsache Essigsäure vorliegt und daß sie um so reichlicher entsteht, je mehr man die Anfangsacidität herabsetzt; er betont die Bedeutung des Vorgangs für das Dasein der Hefe mit den Worten: „Ainsi nous arrivons à la conclusion que le fait d'une augmentation d'acidité d'autant plus faible que le liquide est primitivement plus acide est la règle générale dans la vie de la levure. Elle se retrouve, quelles que soient les conditions dans lesquelles la cellule de levure est placée.“ Diese Fähigkeit zur Bildung beträchtlicher Mengen Essigsäure zeigt die Hefe auch in Gegenwart von Phosphaten und Carbonat, wie H. Euler und O. Svanberg³⁾ sowie Joh. Kerb⁴⁾ jüngst konstatieren konnten. Recht gut zu der Auffassung von der Rolle der Gärungsessigsäure, die wir unten (s. S. 320) darlegen, stimmen die Beobachtungen von R. Reisch⁵⁾. Diesen zufolge sind die gärkräftigsten Heferassen auch die stärksten Essigbildner; die Produktion der Essigsäure setzt maximal mit dem Eintritt der Gärung ein und hört dann schnell gänzlich auf. Der Entwicklungsvorgang zeigt eine gewisse Analogie mit der von W. Seiffert und R. Reisch⁶⁾ studierten normalen Entstehung des Glycerins insofern, als auch letztere zusammen mit der eigentlichen Zuckerspaltung beginnt; zu einem Zeitpunkte jedoch, wo das Essigquan-

¹⁾ A. Béchamp, C. r. 56, 1231 u. 57, 520, 1863, 75, 1036, 1872.

²⁾ A. Fernbach, Ann. de la Brasserie et de la Destill. 1913.

³⁾ H. Euler und O. Svanberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 105, 187, 1919.

⁴⁾ Joh. Kerb, Ber. 52, 1795, 1919.

⁵⁾ R. Reisch, Centralbl. f. Bakt. II. 14, 572, 1905.

⁶⁾ W. Seiffert u. R. Reisch, ebenda II. 12, 574, 1904 u. II. 18, 396, 1907.

tum schon konstant geworden ist, steigt der Glycerinertrag noch weiter. An quantitative Beziehungen zwischen Gärungsglycerin und Gärungssigsäure und an die innerliche Abhängigkeit beider Produkte voneinander, hat man anscheinend aber noch niemals gedacht.

Selbst die unlösliche Magnesia bewirkt also, daß ein Teil des Zuckers im Sinne der dritten Gärungsgleichung zerfällt.

E. Gärung in Gegenwart der verschiedenen Formen von phosphorsaurem Natrium (tert., sec. sowie prim. + sec. Phosphat).

Versuch 7 (mit Trinatriumphosphat): Qualitative Vorversuche mit Na_3PO_4 zeigten gänzliche Hemmung der Gärung bei 0,5 m, unvollkommene Zerlegung bei 0,25 m und vollständigen Umsatz bei 0,125 m- Na_3PO_4 innerhalb 48 Stunden.

Die Ermittlung des Grenzwerts führte ungefähr zur gleichen Alkalinität, die Neuberg und Färber¹⁾ vor Jahren bei dem zellfreien System anwendbar gefunden hatten. Genau wie dort setzt hier bald eine deutliche Kohlendioxydentwicklung ein. Die Angabe von G. G. Wilenko²⁾, daß Zucker in Gegenwart von Phosphaten ohne Produktion von CO_2 vergoren werden könne, war nicht recht mit den Resultaten vereinbar, die H. Euler und T. Tholin³⁾ bei Versuchen über die interessante beschleunigende und verzögernde Wirkung des Phosphations schon zuvor erhalten hatten. A. Oelsner und A. Koch⁴⁾ haben jene Ansicht für lebende Hefe besonders und überzeugend widerlegt und die Feststellungen von Neuberg und Färber hinsichtlich der Veränderungen an den Gärprodukten bestätigt gefunden.

Wir führen folgenden Versuch mit Trinatriumphosphat an.

In 1000 ccm der benutzten Maische waren vorhanden:

95 g Rohrzucker (entsprechend 100 g Hexosen),

100 g Hefe M und

48 g Na_3PO_4 (+ $12\text{H}_2\text{O} = \frac{1}{8}$ Mol).

Nach 48 Stunden wurden in 100 ccm Gärgut festgestellt:

Alkohol 3,90 g,

Glycerin 1,03 g,

Essigsäure 0,34 g.

¹⁾ C. Neuberg u. E. Färber, diese Zeitschr. 78, 258, 1916.

²⁾ G. G. Wilenko, Zeitschr. f. physiol. Chem. 98, 255, 1917.

³⁾ H. Euler u. T. Tholin, ebenda, 97, 274, 1916.

⁴⁾ A. Oelsner u. A. Koch, ebenda, 104, 175, 1919.

Demnach belief sich bei Verwendung von Trinatriumphosphat der Ertrag an Glycerin bzw. Essigsäure auf 20,1% der nach der 3. Vergärungsform möglichen Ausbeute.

Versuch 8 (mit Dinatriumphosphat): Orientierende Versuche lehrten, daß 10 g Rohrzucker durch 10 g Preßhefe bei 34° in Gärung gerieten, wenn in 100 ccm Flüssigkeit Na_2HPO_4 in der Menge von 0,25 bis 1,5 m enthalten war. Bei Brutschranktemperatur bleibt Dinatriumphosphat bis zu einem Gehalt von 1 m gerade in Lösung; hier liegt auch die Grenze, bei der der Zucker noch restlos umgesetzt wird.

Zunächst sei ein Versuch mit schwächerer Na_2HPO_4 -Konzentration angeführt.

700 ccm des Gäransatzes enthielten:

66,5 g Rohrzucker (= 70 g Hexosen),
56,0 g Dinatriumphosphat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12\text{H}_2\text{O}$, (= 0,22 Mol) sowie
70,0 g Hefe M.

In der vergorenen Maische wurden nachgewiesen:

Alkohol	41,98%	(vom angew. Zucker),
Glycerin	8,10 "	" " " "
Essigsäure	2,68 "	" " " "

Daß Erhöhung der Phosphatmenge ebenso, wie wir früher bei den Bicarbonat-Versuchen gefunden hatten, einen verstärkten Eintritt der 3. Vergärungsform bewirkt, weist der Versuch 9 aus; bei ihm kam das Dinatriumphosphat in m-Konzentration zur Anwendung.

In 500 ccm Flüssigkeit befanden sich:

47,5 g Rohrzucker,
50,0 g Hefe M und
180,0 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12\text{H}_2\text{O}$.

Nach 60 Stunden war aller Zucker verbraucht. Um die Auskristallisation des Dinatriumphosphates in der Kälte zu verhindern, wurde das Volumen durch Wasserzugabe vor der Verarbeitung verdoppelt. Erhalten wurden für 100 ccm ursprüngliches Gärgut (mit 10 g Invertzucker):

Alkohol:	4,02 g,
Glycerin:	0,97 g,
Essigsäure:	0,38 g.

Versuch 10 (mit einem Gemenge von Di- und Mononatriumphosphat): In 700 ccm des Ansatzes waren zugegen:

66,5 g Rohrzucker (= 70 g Invertzucker),
 70,0 g Hefe M sowie
 ein Gemisch von $23 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 + 12 \text{ H}_2\text{O} +$
 $12 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$.

Nach 48 Stunden ergaben die Analysen für 100 ccm Gärgut:

Alkohol 4,05 g,
 Glycerin 1,13 g,
 Essigsäure 0,40 g.

Das bekannte Pufferungsgemisch der beiden Phosphate hatte also einen wesentlichen Einfluß auf den Gärverlauf; es veranlaßte eine Umsetzung von 22% des Zuckers nach der 3. Vergärungsform.

F. Gärung in Gegenwart von Zinkhydroxyd.

Zu je 4 Gäransätzen, die 10% Rohrzucker und eine dem Zuckergewichte gleiche Menge Hefe M enthielten, wurde von einer Aufschwemmung frisch aus Zinknitrat bereiteten und sorgfältig ausgewaschenen Zinkhydroxyds so viel hinzugegeben, daß in den Proben $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ und 1 Mol $\text{Zn}(\text{OH})_2$ suspendiert war. Nach 48 Stunden war das Gemisch mit 0,5 Mol oder geringeren Konzentrationen vollständig ausgegoren, während bei 1 Mol Gehalt noch Zucker zugegen war.

Versuch 11. 57 g Rohrzucker und 60 g Hefe M befanden sich in 240 ccm Wasser; dazu wurden 360 ccm einer wäßrigen Zinkhydroxydsuspension gegeben, die 99 g $\text{Zn}(\text{OH})_2$ in 1200 ccm enthielt. Angewendet wurden also 30 g $\text{Zn}(\text{OH})_2$, d. i. 0,5 Mol bei einem Gesamtvolumen von 600 ccm. Nach 48 Stunden war die Einwirkung zu Ende, und die Bestimmung der Gärprodukte in 100 ccm Gärgut führte zu:

Alkohol 4,22 g,
 Glycerin 0,69 g,
 Essigsäure 0,24 g.

Es war somit unter dem Einflusse von Zinkhydroxyd mehr als das Doppelte der bei normaler Gärung

auftretenden Glycerinmenge und eine entsprechende Ausbeute an Essigsäure erzielt worden.

G. Gärung in Gegenwart von Aluminiumhydroxyd.

Vorversuche ergaben, daß eine 10⁰/₀ige Zuckerlösung vollständig vergoren wurde, wenn der Gehalt an suspendiertem, aus salpetersaurer Tonerde hergestelltem und sehr gut ausgewaschenem Aluminiumhydroxyd nicht höher als $\frac{m}{2}$ -Al(OH)₃ war.

Versuch 12. 57 g Rohrzucker wurden in Wasser gelöst und mit 60 g Hefe sowie Wasser auf das Volumen von 200 ccm gebracht. Hinzu wurden 400 ccm einer Aluminiumhydroxyd-Suspension gesetzt, die 78 g frisch ausgefällte Substanz in 1333 ccm Wasser enthielt. Zugewogen waren also 23,4 g Al(OH)₃, entsprechend 0,5 Mol bei einem Gesamtvolumen von 600 ccm. Das Gärgut hatte das Aussehen eines hoch viscosen Magmas; die Tätigkeit der Hefe verlief anfangs äußerst lebhaft und war nach 48 Stunden beendet.

Die Alkoholanalyse ergab 4,70 g in 100 ccm Maische für 10 g vergorenen Zucker. Es war somit aller Zucker praktisch völlig nach der Normalgleichung umgesetzt. Dementsprechend war auch die Ausbeute an Glycerin (0,27 g) die gewöhnliche. Ein Einfluß von Aluminiumhydroxyd auf die Natur der Gärprodukte machte sich unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht geltend.

H. Gärung in Gegenwart von kolloidalem Eisenhydroxyd.

Versuch 13. 23,75 g Rohrzucker wurden in 125 ccm Wasser gelöst und mit 25 g Hefe versetzt. Hinzu wurden 150 ccm einer 5⁰/₀igen Lösung von kolloidalem Eisenhydroxyd gegeben. Gesamtvolumen 300 ccm. Nach 48 Stunden war aller Zucker verschwunden; in 100 ccm Gärgut (= $\frac{1}{3}$ der Urlösung) mit einem Zuckergehalt = 8,33 g Hexosen waren zugewogen: 4,12 g Alkohol. Die Vergärung war demgemäß praktisch nach der Gay-Lussacschen Gleichung geschehen und eine Einwirkung des Eisenhydroxyds nicht erkennbar.

J. Bestimmung des im Verlaufe der Gärung auftretenden Acetaldehyds.

Schon früher haben wir im Einklange mit den älteren Beobachtungen von Neuberg und Färber gezeigt, daß bei Vergärungen in Gegenwart von Natriumbicarbonat in den ersten 6 Stunden eine vermehrte Entstehung von Acetaldehyd nachweisbar ist, der im weiteren Verlaufe der Umsetzungen wieder bis auf die auch bei der gewöhnlichen alkoholischen Zuckerspaltung auftretenden Spuren verschwindet. Diese Erscheinung ist uns der Hinweis gewesen, im Acetaldehyd das ursprüngliche Oxydationsäquivalent zu erblicken, das nach der Theorie als korrelatives Gegenstück zu dem auf reduktivem Wege hervorgebrachten Glycerin entstehen muß. Auf den Verbrauch dieses Acetaldehyds konnten wir sodann die massenhafte Bildung von Acetat bei der Vergärung in natriumbicarbonatalkalischer Lösung zurückführen, indem der Acetaldehyd durch die Disproportionierung zu Essigsäure und Äthylalkohol einen Umbau erfährt.

Infolge gleichen Verhaltens haben wir in der nachfolgenden Versuchsreihe auch bei der Phosphatgärung im Anfange der Umsetzung die gesteigerte Bildung von Acetaldehyd dartun und zugleich feststellen können, daß er nach wenigen Stunden zurückgeht auf das bei der gewöhnlichen Gärung vorhandene Normalquantum.

Versuch 14. 142,5 g Rohrzucker wurden mit 261 g Dikaliumphosphat gelöst und mit 150 g Hefe versetzt; dann wurde ein Volumen von 1500 ccm hergestellt (Gehalt an $K_2HPO_4 = 1$ Mol). Bei 31° war im Brutschrank nach 3 Stunden deutliche Kohlensäureentwicklung im Gange.

Die Aldehydanalysen wurden in der früher beschriebenen Weise ausgeführt. Die jeweils gefundenen Mengen Acetaldehyd betragen, berechnet auf die angewendete Menge Zucker,

nach 4 Std.	0,2 ⁰ / ₁₀₀ ,
" 5 ¹ / ₂ "	0,7 " ,
" 7 "	1,3 " ,
" 8 ¹ / ₂ "	1,3 " ,
" 10 "	1,3 " ,
" 14 ¹ / ₂ "	0,3 " ,
" 24 "	0,3 " .

Versuch 15. Zum Vergleich sei eine Serie fortlaufender Aldehydbestimmungen in einem normalen Gäransatz angeführt, in dem 10⁰/₀ Zucker und eine dem Zuckerquantum gleiche Menge Hefe M vorhanden war. Der Gehalt an Acetaldehyd, bezogen auf den angewendeten Zucker, machte aus:

nach 1 Std.	0,2 ⁰ / ₀₀ ,
" 2 "	0,2 " ,
" 4 "	0,25 " ,
" 5 "	0,2 " .
" 24 "	0,2 " .

Die beiden letzten Versuche zeigen, daß bei der Gärführung in m-Dikaliumphosphatlösung die Aldehydmenge anfangs bis ungefähr auf das 6fache des Normalwertes ansteigen kann, um im weiteren Verlaufe der Gärung wieder auf das gewöhnliche Maß herabzusinken.

Um einen Überblick zu geben, stellen wir tabellarisch zusammen, in welchem Umfange die dritte Vergärungsform des Zuckers unter den verschiedenen Bedingungen bisher verwirklicht werden konnte.

Tabelle.

Erzielt wurde in vorstehenden und früheren Versuchen:

bei Gegenwart von	ein Umsatz des Zuckers nach der 3. Vergärungsform in einem Betrage von
1,5 m-Natriumbicarbonat	26,8 ⁰ / ₀ ,
1,0 m-Dikaliumphosphat	26,8 ⁰ / ₀ ,
0,09 m-Na ₂ HPO ₄ + } (Pufferungs- 0,123 m-NaH ₂ PO ₄ } gemisch)	22,1 ⁰ / ₀ ,
0,125 m-Trinatriumphosphat	20,1 ⁰ / ₀ ,
1,0 m-Dinatriumphosphat	19,0 ⁰ / ₀ ,
0,22 m-Dinatriumphosphat	15,8 ⁰ / ₀ ,
0,125 m-Magnesiumoxyd	14,3 ⁰ / ₀ ,
0,5 m-Zinkhydroxyd	13,5 ⁰ / ₀ ,
0,1 m-Kaliumcarbonat	13,1 ⁰ / ₀ .

Ohne daß Schlüsse gezogen werden sollen, gewinnt man bei Betrachtung vorstehender Übersicht den Eindruck, daß im allgemeinen die Höhe, in der die 3. Vergärungsform eintritt, mit dem wechselnden mol. Gehalt der Maischen an Zusatzmitteln in Beziehung gebracht werden kann. Freilich sind obige Zahlen nicht direkt miteinander vergleichbar; der Zustand der verwendeten Hefe ist nicht gleichmäßig gewesen, weil

die betreffenden Experimente in weit auseinander liegenden Zeiten ausgeführt wurden.

In allen Fällen ist das von der Theorie vorgesehene Verhältnis von 1 Mol Essigsäure: 2 Mol Glycerin experimentell nachgewiesen worden; es kommt mit hinreichender Genauigkeit darin zum Ausdruck, daß durchgehends die Essigsäurezahl $\frac{1}{3}$ so groß wie der Glycerinwert ist — entsprechend den Molekulargewichten 60 für 1 CH_3COOH und 184 für $2\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$. Trotzdem sind der Berechnung lediglich die Glycerindaten zugrunde gelegt, da die quantitative Ermittlung des Glycerins die analytisch schärfere Operation ist. Es geht nämlich bei der Destillation eines jeden beliebigen Gärgutes ein gewisses Quantum „unspezifischer“ flüchtiger Säure über und mischt sich, worauf wir schon früher hingewiesen haben, der Menge Essigsäure bei, die gemäß der dritten Vergärungsform entsteht. Bei den unspezifischen flüchtigen Säuren handelt es sich außer um Essigsäure, die auch in der Norm überwiegt, um Säuren, die durch Nebenreaktionen gebildet werden und z. T. auch anderen Quellen als Zucker, z. B. dem Hefeneiweiß, entstammen können.

Bemerkenswert und weiterer Erforschung würdig erscheint uns der Umstand, daß viele, aber keineswegs sämtliche Verbindungen mit basischen Eigenschaften den Eintritt der dritten Vergärungsform des Zuckers herbeiführen. Im Hinblick auf andere Seiten des Gärungsproblems möchten wir hervorheben, daß sich die Phosphate, und zwar die aller Sättigungsstufen, in dieser Richtung als wirksam erwiesen haben (s. vorher). Indem sie zu den besten Erregern der dritten Vergärungsform zählen, verhindern sie den normalen Ablauf der gewöhnlichen alkoholischen Zuckerspaltung. Diese Eigenschaft der phosphorsauren Salze stützt unsere früher¹⁾ über diesen Punkt geäußerten Anschauungen; auf die Verhältnisse wird bei Behandlung anderer Vorgänge zurückzukommen sein.

K. Zusammenhänge und Bedeutung.

Einige kurze Beobachtungen verdient vielleicht die Frage nach den Beziehungen der dritten Vergärungsform zur

¹⁾ C. Neuberg, E. Färber, A. Lewite und E. Schwenk, diese Zeitschr. 83, 244, 1917.

üblichen alkoholischen Zuckerspaltung. Man darf wohl annehmen, daß beide Arten der Umsetzung auch in der Norm nebeneinander ablaufen. Glycerin entsteht nämlich bei jeder Vergärung durch Hefe. Legt man die gewöhnliche Ausbeute von durchschnittlich 3% zugrunde, so kann man daraus den Eintritt der anderen Vergärungsart zu 5,8% berechnen. Acetaldehyd bzw. Essigsäure sind zwar nicht in der Menge auffindbar, die obigem Glycerinwert äquivalent sein müßte; dies kann aber, wie wir schon früher¹⁾ ausgeführt haben, darauf beruhen, daß der Acetaldehyd oder seine Vorstufe Brenztraubensäure während der Gärungsvorgänge einem vielseitigen Verbrauch unterliegen kann. Zum Beispiel sind gerade Brenztraubensäure und Acetaldehyd diejenigen Substanzen, deren synthetische Verwendung durch die Organismen in ihrem Chemismus am besten klar gestellt ist²⁾. Es ist ja auch anzunehmen, daß bei der Nutzung des Zuckers als Baumaterial für die verschiedenen Zellbestandteile die selben Bruchstücke herangezogen werden, die bei der physiologischen Zuckerspaltung entstehen; unveränderter Zucker findet — außer bei der Anlegung gewisser Polysacchariddepots — nirgendwo Anwendung. Die Anschauung von einer solchen Aufgabe des Acetaldehyds und der Brenztraubensäure hat inzwischen durch die Untersuchungen von C. Neuberg und F. F. Nord³⁾ eine nicht unwesentliche Stütze erfahren, indem es den Genannten gelungen ist, mit Hilfe des „Abfangverfahrens“ die Rolle des Acetaldehyds im Stoffwechsel bei einer Reihe anderer Mikroorganismen nachzuweisen.

Jedenfalls gelangt man auch durch diese Überlegungen

¹⁾ C. Neuberg und E. Reinfurth, l. c.

²⁾ Erinnerung sei an die Bedeutung des Acetaldehyds für die biochemische Synthese von Butylderivaten (E. Friedmann, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **11**, 202, 1908 sowie A. Harden und D. Norris, Ch. C. **12**, I. 1045 und 2051), an den Übergang der Brenztraubensäure in Alanin (G. Emden und E. Schmitz, diese Zeitschr. **38**, 393; H. Fellner, diese Zeitschr. **38**, 414, 1911), ferner an die Versuche von P. Mazé, (Compt. rend. **134**, 240, 1902) und A. Perrier (ebenda **151**, 163, 1910) über die Ausnutzung des Aldehyds durch Mikroorganismen; sogar für technische Zwecke wird diese Verwertung von Acetaldehyd (F. Ehrlich und Consort. f. elektrochem. Industrie, Ch. C. **19**, III/IV, t. T. 462) neuerdings ins Auge gefaßt.

³⁾ C. Neuberg und F. F. Nord, diese Zeitschr. **96**, 133 und 158, 1919.

zu dem Ergebnisse, daß es eine normale Funktion der Hefe ist, die durch die Zusätze zu einer ungewöhnlich kräftigen Entfaltung angeregt wird. Als ein Ausdruck dieser Verstärkung erscheint die dritte Vergärungsform.

Es ist nicht unmöglich, sich eine Vorstellung von dem Reigen der verschiedenen in Tätigkeit tretenden Fermente zu machen. Wir wissen, daß die gewöhnliche alkoholische Zuckerspaltung eine bestimmte Acidität erfordert¹⁾, und zwar liegt die optimale H-Ionenkonzentration nach den Messungen von Luers²⁾ bei p_H 2,71, während Boas und Leberle³⁾ ihr den weiteren Spielraum p_H 2,94 bis 3,80 zuerkennen; nach einem maximalen Werte strebt die Hefe jedenfalls hin. Herrscht nicht von vornherein die richtige H-Ionenkonzentration, so erzeugt die Hefe selbst Säure. Diese ist eine flüchtige Säure; sie besteht ganz oder überwiegend aus Essigsäure, und schon Fernbach hat gezeigt, daß auf Säureentziehung die Hefe mit einer vermehrten Produktion von flüchtiger Säure aus Zucker reagiert. Da nun das Enzym der Disproportionierung (Batelli und Stern, Parnaß, Neuberg) seine optimale Wirksamkeit bei bicarbonatalkalischer Reaktion entfaltet, so ist es verständlich, daß es nach der Ausbildung einer bestimmten Acidität nicht in Aktion tritt. Eine derartige Abstimmung kann, wo wir heute die unbedingte Abhängigkeit vieler Enzymwirkungen von einer engumgrenzten H-Ionenkonzentration kennen, durchaus der Grund sein, warum nach Herstellung der für die Zymase günstigsten sauren Reaktion kein Aldehyd mehr zu Essigsäure (und Alkohol) disproportioniert wird. Wenn nunmehr die zymatische Spaltung des Zuckers abläuft, so wird bei der vollkommenen Korrelation der Oxydations- und Reduktionsvorgänge der entstehende Acetaldehyd stets zum Äthylalkohol reduziert werden, solange nicht ein Verbrauch an Acetaldehyd oder Brenztraubensäure — also eine Abfangung irgendwelcher Art — erfolgt. Die interne Benutzung von Acetaldehyd und Brenztraubensäure zu Umsetzungen und Stoffwechselfvorgängen stellt eine

¹⁾ Daß die CO_2 -Entwicklung bei zellfreier Gärung durch Alkalien anfangs angeregt werden kann, auf die Dauer aber vermindert wird, ist von Buchner ausreichend erklärt.

²⁾ H. Luers, Ch. C. 14, I, 1101.

³⁾ F. Boas und H. Leberle, diese Zeitschr. 90, 78, 1918.

physiologische Abfangung dar. Dabei wird genau wie bei der Festlegung des Aldehyds durch rein chemische Mittel „Wasserstoff“ verfügbar; da er nicht frei zur Entwicklung kommt, so wird er von einem Zuckeranteil aufgenommen, und es entsteht Glycerin. Somit wäre das bei jeglicher Gärung auftretende Glycerin der sichtbare Ausdruck für den intermediären Verzehr von Acetaldehyd bzw. von Brenztraubensäure.

Diese Vorstellung erklärt auch aufs beste, wieso bei der Zuckerspaltung durch Hefe der Gärungsquotient Alkohol:Kohlensäure, der theoretisch $46:44 = 1,045$ ist, öfter kleiner als 1 gefunden wird. Es dürfte in diesen Fällen nämlich mehr CO_2 als Alkohol frei werden, weil die synthetische Verwendung des Acetaldehyds den Eintritt der 2. oder 3. Vergärungsform nach sich zieht, die immerhin noch 1 Mol CO_2 auf 1 Mol gebundenen Acetaldehyd, aber höchstens nur $\frac{1}{2}$ Mol durch Cannizzarierung hervorgebrachten Alkohols bereitstellt. Wenn man früher gesagt hat, es mische sich der Gärungskohlensäure das durch andere Stoffwechselleistungen (Respiration, Erhaltungsumsatz) entstandenes Kohlendioxyd bei, so erscheint ein Teil dieser Vorgänge in der stets zu konstatierenden Glycerinbildung ausgedrückt.

Sobald man nun durch Zugabe von Mineralstoffen die OH-Ionenkonzentration erhöht, also die Reaktion dem Optimum des Cannizzarierungsfermentes nähert und die Disproportionierung in Gang bringt, so wird der zymatische Prozeß durch unausbleibliche Fortnahme des Acetaldehyds nur insofern verändert, als an seine Stelle jetzt ein anderer Wasserstoffacceptor (der Glycerin gebende) rückt. Ob man in der einsetzenden verstärkten Bildung von Essigsäure ein Bestreben der Hefe erkennen will, das günstigste Medium für die ihr arteigenste Leistung, die Alkoholerzeugung, zu schaffen, mag dahingestellt bleiben. Es muß auch den Gegenstand weiterer Untersuchungen bilden, ob Unterschiede in der Geschwindigkeit der einzelnen Fermentreaktionen durch die Zusätze zur Geltung kommen und dadurch einen Einfluß auf den Eintritt der einen oder anderen Vergärungsform ausüben.

Die Endprodukte der drei Vergärungsformen sind chemisch scharf unterschieden. Untereinander jedoch hängen die drei Arten der Zuckerspaltung aufs engste

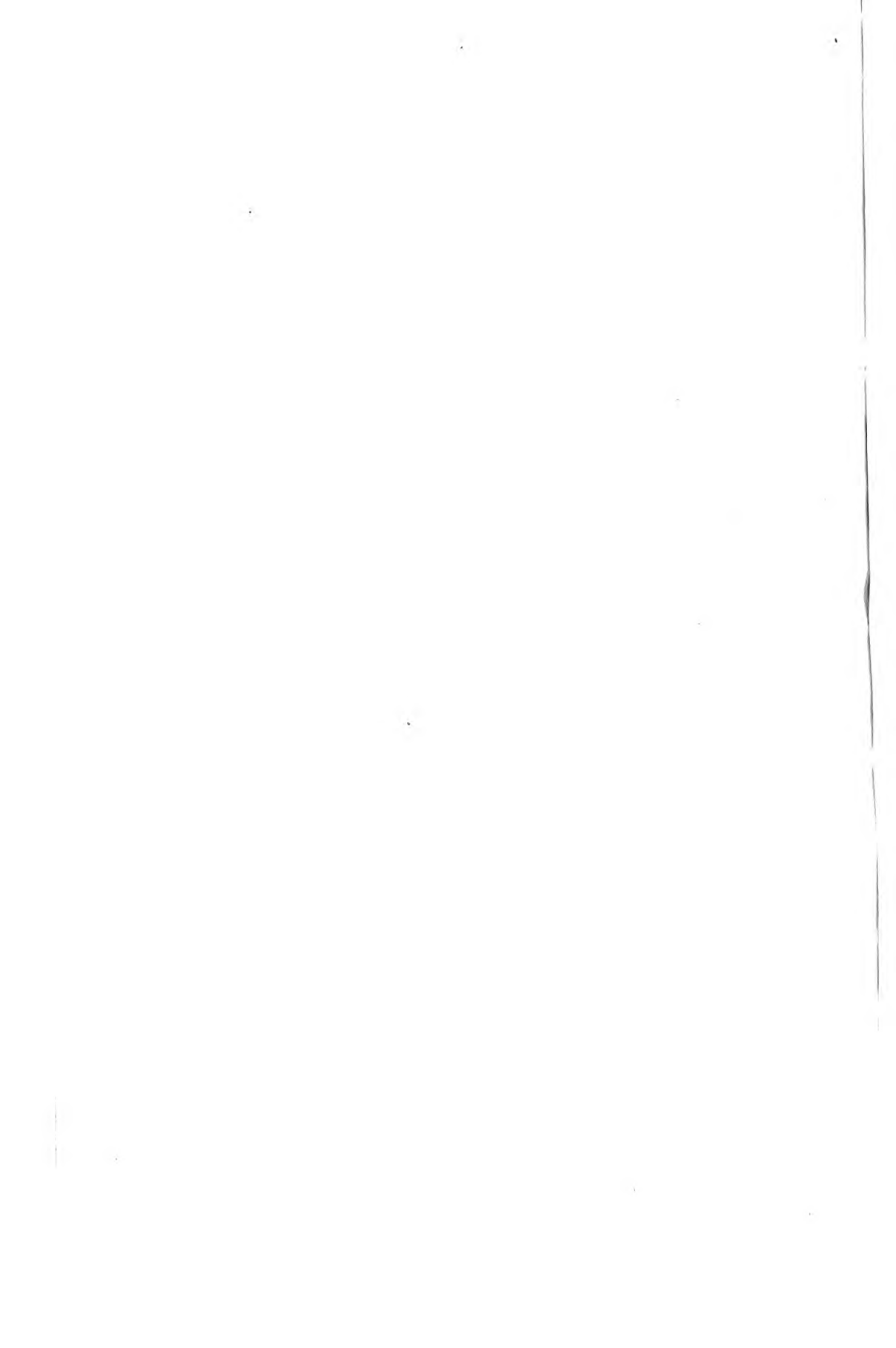
zusammen. Im Sinne der vorstehenden Ausführungen bestimmt die Beschaffenheit des Milieus — H-Ionenkonzentration und interner Bedarf an Oxydationsstufe (Brenztraubensäure, Acetaldehyd) — welche endgültige Gestalt die Zwischengebilde annehmen. Dabei gäbe es keinen direkten Weg und keine Seitenpfade, weder Hauptprodukte noch Nebenerzeugnisse. In reiner Form ist keine der 3 Gärungsgleichungen realisierbar, auch nicht die Gay-Lussacsche Idealfassung; denn wegen des anderweitigen Verbrauchs von Acetaldehyd oder Brenztraubensäure läuft die 2. bzw. 3. Vergärungsform gleichzeitig ab.

Autorenverzeichnis.

- Atzler, Edgar, und Fritz Richter. Die spezifische Wärme des Blutes und des Serums unter besonderer Berücksichtigung der Methodik. S. 193.
- Bauer, Hans, s. Fürth.
- Bokorny, Th. Beitrag zur Kenntnis der chemischen Natur der Enzyme. S. 100.
- Dietrich, Walther, s. Windisch.
- Euler, Hans, und Olof Svanberg. Zur Kenntnis der Pektase-Wirkung. S. 271.
- Falta, W., und M. Richter-Quittner. Über die Verteilung des Zuckers, der Chloride und der Reststickstoffkörper auf Plasma und Körperchen im strömenden Blute. S. 148.
- Fürth, Otto, Hans Bauer, und Hansi Piesch. Untersuchungen über Diffusionsvorgänge in Gallerten. III. Über die Beziehungen des Diffusionsweges zum Diffusionskoeffizienten und seine Abhängigkeit von der Konzentration des Indicators. S. 29.
- Haehn, Hugo. Die Melaninbildung im autolyisierenden Kartoffelpreßsaft. S. 114.
- Herzfeld, E., und R. Klinger. Zur Chemie des Blutfarbstoffes. S. 64.
- Hirsch, Julius, s. Neuberg.
- Hueck, W., und L. Wacker. Über die Beziehungen des Cholesterins zum intermediären Fettstoffwechsel. S. 84.
- Jacoby, Martin. Über den geringen Katalasegehalt der Weil-Felix(X)-Stämme im Gegensatz zu normalen Proteusstämmen. S. 191.
- Kerb, Johannes. Über eine Verbindung der Stärke mit Phosphorsäure. S. 3.
- Klinger, R., s. Herzfeld.
- Mordhorst, Gustav s. Sieburg.
- Neuberg, C. 100 Bände „Biochemische Zeitschrift“. S. 1.
- Die physikalisch-chemische Betrachtung der Gärungsvorgänge. Zugleich Äußerungen zu Wo. Ostwalds Bemerkungen über die Neubergsche Gärungstheorie. S. 289.
- und Julius Hirsch. Die dritte Vergärungsform des Zuckers. S. 304.
- Piesch, Hansi, s. Fürth.
- Richter, Fritz, s. Atzler.
- Richter-Quittner, s. Falta.
- Röhm ann, F. †. Zur Frage nach der Entstehung und Spezifität bakteriolytischer Immunkörper. S. 15.
- Sieburg, Ernst, und Gustav Mordhorst. Über die Verbreitung von Fermenten im tierischen Organismus, die Gerbsäure und verwandte Stoffe spalten. S. 204.
- Svanberg, Olof, s. Euler.
- Ostwald, Wolfgang. Physikalisch-chemische Bemerkungen zu Neubergs Gärungstheorie. S. 279.
- Wacker, L., s. Hueck.
- Warburg, Otto. Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen. S. 230.
- Windisch, Wilhelm, und Walther Dietrich. Titrations mit oberflächenaktiven Stoffen als Indicator. II. Mitteilung. Aciditätsbestimmungen mit capillaraktiven Stoffen alkalischer Natur. S. 130.
- Winterstein, Hans. Über den Einfluß der Temperatur auf die Oberflächenspannung narkotischer Stoffe. S. 81.

77136

842



Princeton University Library



32101 079671721