



Über dieses Buch

Dies ist ein digitales Exemplar eines Buches, das seit Generationen in den Regalen der Bibliotheken aufbewahrt wurde, bevor es von Google im Rahmen eines Projekts, mit dem die Bücher dieser Welt online verfügbar gemacht werden sollen, sorgfältig gescannt wurde.

Das Buch hat das Urheberrecht überdauert und kann nun öffentlich zugänglich gemacht werden. Ein öffentlich zugängliches Buch ist ein Buch, das niemals Urheberrechten unterlag oder bei dem die Schutzfrist des Urheberrechts abgelaufen ist. Ob ein Buch öffentlich zugänglich ist, kann von Land zu Land unterschiedlich sein. Öffentlich zugängliche Bücher sind unser Tor zur Vergangenheit und stellen ein geschichtliches, kulturelles und wissenschaftliches Vermögen dar, das häufig nur schwierig zu entdecken ist.

Gebrauchsspuren, Anmerkungen und andere Randbemerkungen, die im Originalband enthalten sind, finden sich auch in dieser Datei – eine Erinnerung an die lange Reise, die das Buch vom Verleger zu einer Bibliothek und weiter zu Ihnen hinter sich gebracht hat.

Nutzungsrichtlinien

Google ist stolz, mit Bibliotheken in partnerschaftlicher Zusammenarbeit öffentlich zugängliches Material zu digitalisieren und einer breiten Masse zugänglich zu machen. Öffentlich zugängliche Bücher gehören der Öffentlichkeit, und wir sind nur ihre Hüter. Nichtsdestotrotz ist diese Arbeit kostspielig. Um diese Ressource weiterhin zur Verfügung stellen zu können, haben wir Schritte unternommen, um den Missbrauch durch kommerzielle Parteien zu verhindern. Dazu gehören technische Einschränkungen für automatisierte Abfragen.

Wir bitten Sie um Einhaltung folgender Richtlinien:

- + *Nutzung der Dateien zu nichtkommerziellen Zwecken* Wir haben Google Buchsuche für Endanwender konzipiert und möchten, dass Sie diese Dateien nur für persönliche, nichtkommerzielle Zwecke verwenden.
- + *Keine automatisierten Abfragen* Senden Sie keine automatisierten Abfragen irgendwelcher Art an das Google-System. Wenn Sie Recherchen über maschinelle Übersetzung, optische Zeichenerkennung oder andere Bereiche durchführen, in denen der Zugang zu Text in großen Mengen nützlich ist, wenden Sie sich bitte an uns. Wir fördern die Nutzung des öffentlich zugänglichen Materials für diese Zwecke und können Ihnen unter Umständen helfen.
- + *Beibehaltung von Google-Markenelementen* Das "Wasserzeichen" von Google, das Sie in jeder Datei finden, ist wichtig zur Information über dieses Projekt und hilft den Anwendern weiteres Material über Google Buchsuche zu finden. Bitte entfernen Sie das Wasserzeichen nicht.
- + *Bewegen Sie sich innerhalb der Legalität* Unabhängig von Ihrem Verwendungszweck müssen Sie sich Ihrer Verantwortung bewusst sein, sicherzustellen, dass Ihre Nutzung legal ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass ein Buch, das nach unserem Dafürhalten für Nutzer in den USA öffentlich zugänglich ist, auch für Nutzer in anderen Ländern öffentlich zugänglich ist. Ob ein Buch noch dem Urheberrecht unterliegt, ist von Land zu Land verschieden. Wir können keine Beratung leisten, ob eine bestimmte Nutzung eines bestimmten Buches gesetzlich zulässig ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass das Erscheinen eines Buchs in Google Buchsuche bedeutet, dass es in jeder Form und überall auf der Welt verwendet werden kann. Eine Urheberrechtsverletzung kann schwerwiegende Folgen haben.

Über Google Buchsuche

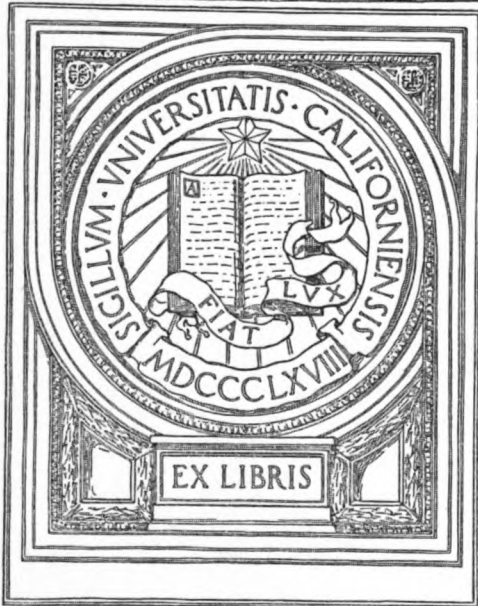
Das Ziel von Google besteht darin, die weltweiten Informationen zu organisieren und allgemein nutzbar und zugänglich zu machen. Google Buchsuche hilft Lesern dabei, die Bücher dieser Welt zu entdecken, und unterstützt Autoren und Verleger dabei, neue Zielgruppen zu erreichen. Den gesamten Buchtext können Sie im Internet unter <http://books.google.com> durchsuchen.

UC-NRLF



B 3 778 041

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
MEDICAL CENTER LIBRARY
SAN FRANCISCO



EX LIBRIS

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

unter Mitwirkung von

H. Ascoli - Catania, L. Asher - Bern, G. Bertrand - Paris, A. Nickel - Berlin, F. Blumenthal - Berlin, A. Bonanni - Rom, F. Bottazzi - Neapel, G. Bredig - Karlsruhe i. B., A. Burg - Wien, F. Ehrlich - Breslau, H. v. Euler - Stockholm, J. Feigl - Hamburg, S. Flexner - New York, J. Frommann - Lund, S. Fränkel - Wien, H. Freund - Wien, H. Freundlich - Berlin-Dahlem, E. Friedberger - Greifswald, E. Friedmann - Berlin, G. v. Fürth - Wien, G. Galicetti - Neapel, F. Haber - Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger - Groningen, P. Mész - Budapest, A. Haeffler - Berlin, V. Henri - Paris, V. Henriques - Kopenhagen, W. Heuser - Göttingen, E. Hüber - Kiel, H. Jacoby - Berlin, A. Koch - Göttingen, H. Kumagawa - Tokio, F. Landell - 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. Molesch - Wien, J. Morgenson - Berlin, E. Müntz - Prag, W. Normant - Berlin, W. Ostwald - Leipzig, W. Palladin - St. Petersburg, W. Pauli - Wien, E. Pflüger - Breslau, E. P. Fleck - Wien, J. Fohl - Breslau, Ch. Fercher - Lyon, F. Fieser - Berlin, S. Salaskin - St. Petersburg, H. Slesser - St. Petersburg, H. Siegfried - Leipzig, S. P. L. Sørensen - Kopenhagen, K. Spiro - Straßburg, H. H. Starling - London, J. Stoklasa - Prag, W. Straub - Freiburg i. B., A. Statten - Königberg i. Pr., H. v. Tappiner - München, H. Thoms - Berlin, F. Trendelenburg - Rostock, A. J. A. Van der Veide - Gent, G. Warburg - Berlin, W. Wiczkowski - Prag, A. Wehl - Danzig, J. Wöhlgemuth - Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg - Berlin.

Hundertunddritter Band.

Mannnachdruck



Berlin.

Verlag von Julius Springer.

1920.

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Leiser, E. J. Über das Wesen des Pankreasdiabetes. (Die Änderung der diastatischen Wirksamkeit der Leber und die Unbeeinflussbarkeit der glykolytischen Fähigkeit des Muskels durch Pankreasexstirpation beim Frosch	1
Rona, P. und L. Michaels. Das Adsorptionsvermögen der Cellulose nebst Bemerkungen über die elektrometrische Mikroanalyse des Chlor	19
Rosenbaum, S. Untersuchungen über Abwehrfermente	80
Jochimsoglu, G. Ein Thermostat mit elektromagnetischer Regulier- vorrichtung und elektrischer Heizung	49
Michaëlis, Leonor. Über die Analyse des CO ₂ -Gleichgewichts im Blute nach H. Straub und K. Meyer	53
Baudisch, Oskar. Beitrag zur Milchsäurespaltung durch kurzwellige Strahlen	59
Beecker, Eduard. Über das Verhalten des Chinins im Organismus .	63
Briannmeyer, Emil und Gustav Hilgendorff. Optisch aktive Zimtsäuren und die bei ihrer Bildung nebenher entstehenden Cinnamate der Weinsäure	79
Deussen, Ernst. Die Gramsche Bakterienfärbung, ihr Wesen und ihre Bedeutung	123
Windisch, Wilhelm und Walther Dietrich. Über die Umsetzungen von primärem Kaliumphosphat mit wachsenden Mengen von Calcium- bicarbonat beim Kochen	142
Rippel, August. Bemerkungen über die quantitative Bestimmung des Phytins in Pflanzenauszügen	163
Aren, Hans. Über den „Nährwert“ und die Bedeutung der Nah- rungsfette	172
Michaëlis, L. und Albert v. Szent-Györgyi. Der Einfluß der Salze auf das Fällungsoptimum des Caseins	178
Salkowski, E. Über eine Reaktion auf Pyrrol	185
Warburg, Otto. Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen. II.	188

191705

	Seite
Hofmeister, Franz. Zur Kenntnis der alkaloidischen Bestandteile der Reiskleie	318
Michaëlis, L. Theoretische Untersuchungen über den Dissoziations- zustand der Ampholyte. I. Die Wirkung einwertiger Ionen bei Vernachlässigung aller kolloidalen Erscheinungen	325
Pitts, W. Vergleichende Untersuchungen über die hämolytische Wirkung einiger Chlorderivate des Methans, Äthans und Äthylens	248
Härl, Paul. Über die Lichtabsorption des Methämoglobins in neu- traler und soda-alkalischer Lösung	271
Partos, S. Bestimmung des durch Urease zersetzten Harnstoffs aus der CO ₂ -Komponente des Zersetzungsproduktes	292
Hägglund, Erik. Schweflige Säure und Hefegärung	299
Bönniger, M. Die Permeabilität der roten Blutkörper für den Trauben- zucker	306
Ehrlich, Marta. Über die angebliche Inaktivierung des d-Mannits .	312
Nord, F. F. Phytochemische Reduktion von o-Nitrobenzaldehyd . .	315
Neuberg, Carl. Weitere Erfahrungen über die Bildung und Beden- tung der Fructosediphosphorsäure im Stoffwechsel der Hefe . .	320
Autorenverzeichnis	326

Über das Wesen des Pankreasdiabetes.

(Die Änderung der diastatischen Wirksamkeit der Leber und die Unbeeinflussbarkeit der glykolytischen Fähigkeit des Muskels durch Pankreasexstirpation beim Frosch.)

Von
E. J. Lesser.

(Aus dem Laboratorium der städtischen Krankenanstalten in Mannheim.)

(Eingegangen am 22. November 1919.)

Mit 1 Figur im Text.

Das von mir verwendete¹⁾ Verfahren zur Bestimmung der diastatischen Wirksamkeit von herausgeschnittenen Froschorganen hat bisher dazu gedient, zu zeigen, daß durch Anoxybiose und durch Adrenalinzufuhr die diastatische Wirksamkeit in Leber und Muskel erhöht wird. Starke Ausschläge werden dabei nur im Frühjahr erzielt, im Winter, besonders im November und Dezember, erhält man fast nie eine deutliche Beeinflussung durch Anoxybiose und Adrenalin. Es lag nahe, dieses Verfahren zu benutzen, um die diastatische Wirksamkeit von Froschorganen zu bestimmen, die von pankreasdiabetischen Tieren stammen. Seit Minkowskis grundlegenden Versuchen ist es bekannt, daß im Pankreasdiabetes das Leberglykogen sich sehr schnell vermindert, während das Muskelglykogen zunächst weniger beeinflusst wird. Es war daher zu erwarten, daß in der herausgeschnittenen Leber, die von pankreasdiabetischen Tieren stammte, die diastatische Wirksamkeit erhöht sein würde. Die Leber des pan-

¹⁾ Diese Zeitschr. 55, 355, 1913, Ergebnisse der inn. Med. u. Kinderheilk. 16, 279, 1919.

kreasdiabetischen Tieres ist mit richtiger Methodik bisher nur von einem Autor auf ihre diastatische Wirksamkeit geprüft worden, nämlich von Hinselmann¹⁾. Dieser maß die Abnahme des Glykogens in Hundelebern, die unzerkleinert 7 Stunden bei 36° sich selbst überlassen wurden. Er fand dabei, daß die Leber, die vom pankreasdiabetischen Hund stammte, eine erheblich größere Menge Glykogen hydrolysierte als die Leber des normalen Hundes. Seine Zahlen für die diastatische Wirksamkeit verhalten sich wie 4:0,7. Die pankreasdiabetische Leber hydrolysierte also etwa 6 mal soviel Glykogen als die normale. Dabei erwies es sich aber als nötig, die Leber schon etwa 1 Stunde nach erfolgter Pankreasextirpation zu untersuchen, denn schon 3 Stunden nach erfolgter Pankreasextirpation enthält die Hundeleber in Hinselmanns Versuchen nur noch 0,5% Glykogen. Damit kommt eine Komplikation der Versuchsanordnung zustande, die beim Kaltblüter, bei dem der Prozeß des Glykogenschwundes im Pankreasdiabetes sehr viel langsamer verläuft, fehlt.

Die Versuche, die in folgendem beschrieben werden sollen, unterscheiden sich aber von den früher von mir gemachten Bestimmungen der diastatischen Wirksamkeit der Leber in einem wesentlichen Punkte. Bei der Beeinflussung durch Adrenalin und durch Anoxybiose konnte von ein und derselben Leber der eine Seitenlappen mit, der andere ohne die betreffende Beeinflussung untersucht werden. Bei der Bestimmung der diastatischen Wirksamkeit der pankreasdiabetischen Leber hingegen mußte diese Größe bei Lebern von pankreasdiabetischen Tieren mit Lebern von normalen Tieren verglichen werden. Es war daher wünschenswert, eine größere Zahl von pankreasextirpierten Lebern mit einer ebenso großen Zahl von Normallebern zu vergleichen. Etwaige Unterschiede, die auch ohne vorherige Pankreasextirpation zwischen den verschiedenen Lebern hinsichtlich der diastatischen Wirksamkeit bestanden, mußten auf diese Weise wirkungslos werden. Die Schlüsse, die in folgendem gezogen werden sollen, beruhen auf Durchschnittswerten aus 54 normalen und 54 pankreasdiabetischen Lebern. Die Tiere, die miteinander verglichen wurden, waren stets

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 61, 265, 1905.

gleicher Art, gleichen Geschlechtes, nahezu gleichen Gewichtes und gleicher Gefangenschaftsdauer. Insbesondere das Letztere ist sehr wichtig, da mit längerer Gefangenschaftsdauer der Glykogengehalt der Tiere auch im Winter abnimmt.

Die Pankreasexstirpation wurde in der Weise vorgenommen, daß das Pankreas zunächst in seiner ganzen Länge vom Duodenum möglichst stumpf abpräpariert wurde. Dann wurden die Gefäße zwischen Milz und Pankreas ohne Unterbindung durchtrennt. Die Blutung kommt meist schnell spontan zum Stehen. Unterbindet man aber vor der Durchtrennung, so tritt meist schwere Stauung im Darmgebiet ein. Nunmehr wurden auch die Verbindungen zwischen Pankreas und Magen getrennt und der größte Teil des Pankreas abgeschnitten. Dann wurde der mit der Leber verwachsene Pankreasansatz möglichst vollständig mit kleiner Klemme gefaßt und unterbunden. Nach der Unterbindung abgetrennt. Da auf diese Weise der Gallenabfluß zum Darm verhindert wird, wurde ein Teil der zum Vergleich dienenden Tiere ebenfalls operiert, indem das Pankreas in der Mitte zwischen Leber und Darm doppelt unterbunden und durchtrennt wurde. Diese Operation der Kontrolltiere änderte am Ergebnis der Versuche nichts. Ebensowenig ließ sich nach dieser Operation reduzierende Substanz im Harn nachweisen. Ein großer Teil der Tiere wurde unter aseptischen Kautelen operiert auch hierdurch wurde am Ergebnis der Versuche nichts geändert.

Die operierten Tiere überleben verschieden lange, je nach der Jahreszeit. Die besten Monate, um die Exstirpation vorzunehmen, sind die Monate August bis Oktober. Will man ein möglichst langes Überleben der Tiere nach der Operation erzielen, so verwende man keine frisch gefangenen mit noch gefülltem Magen und Darm, sondern Tiere, die 8 bis 10 Tage bereits sich in Gefangenschaft befinden und deren Magen und Darm leer ist. Nimmt man an solchen Tieren die Operation vor, so überleben sie meist 8 Tage, bisweilen auch länger, bis zum 14. Tage die Operation. In den Monaten Juni und Juli gehen sie fast immer nach 2 oder 3 Tagen ein. In den Monaten August bis Oktober findet man bei Tieren, die nicht länger als 8 bis 10 Tage in der Gefangenschaft sind, 24 Stunden nach der Operation immer reichlich Traubenzucker im Harn, der mit der Trommerschen Probe in $\frac{1}{2}$ bis 1 ccm Harn stets leicht nachweisbar ist. In den Wintermonaten gelingt der qualitative Nachweis nicht immer. Engt man aber das Wasser, in dem die Tiere gegessen haben und in das sie ihren Harn entleeren, im Wasserbade nach Ansäuern ein, und reinigt dann mit Quecksilberacetat, so findet man spätestens 30 Stunden nach der Operation immer reduzierende Substanz, deren Ausscheidung bis zum Tode der Tiere anhält. Quantitativ kann sie recht gering sein. Es kommt vor, daß ein 50 g schwerer Frosch nur 2 mg Traubenzucker pro Tag liefert, meist allerdings mehr (etwa 10 mg). Diese Mengen werden nur bei sorgfältigem quantitativem Verfahren gefunden und auch nur dann mit Sicherheit, wenn man vor Anstellung der Reduktion die stickstoffhaltigen Substanzen, die das

Ausfallen von Kupferoxydul verhindern können, durch Quecksilberacetat entfernt. Auf diese Weise gelingt es auch, im Juni nach Pankreasexstirpation reduzierende Substanz in den Ausscheidungen der Tiere nachzuweisen, wenn man die Ausscheidungen von 6 bis 8 Tieren zusammen verarbeitet. Qualitativ ist mit der Reduktionsprobe im ausgedrückten Harn im Juni fast niemals Traubenzucker nach der Pankreasexstirpation nachzuweisen. Dann enthält der Harn weniger als 0,05% Traubenzucker, was bei der glykogenarmen Leber des Sommertieres begreiflich ist. Markuse¹⁾ hat ja bereits 1894 den Nachweis geliefert, daß bei gleichzeitiger Exstirpation von Pankreas und Leber beim Frosch keine Glykosurie auftritt. Im Juni enthält die Leber häufig nur 1% und noch weniger Glykogen. Daher treten nur sehr geringe Mengen Traubenzucker in den Harn über, die bei qualitativen Proben nicht gefunden werden. Bei dem von mir angewendeten Verfahren (Sammlung der Exkrete von 8 bis 10 Tieren und Quecksilberreinigung, quantitative Bestimmung nach Bertrand, in der Modifikation von Möckel und Frank) findet man auch im Juni stets nach Pankreasexstirpation reduzierende Substanz im Frosharn.

An auf diese Weise pankreasdiabetisch gemachten Tieren wurden nun in den Monaten August bis Februar Bestimmungen der diastatischen Wirksamkeit vorgenommen, die in Tabelle I zusammengestellt worden sind. Tabelle II ergibt die Mittelwerte getrennt für die Monate

Tabelle I.

Datum	Zahl der Tiere	Zeit nach der Operation Std.	Tiere ohne Pankreas		Tiere mit Pankreas		Bemerkungen
			Glykogen in 100 g Leber	Diastatische Wirksamkeit	Glykogen in 100 g Leber	Diastatische Wirksamkeit	
2. VIII. 14.	5	20	12,17	0,64	10,50	[— 0,35]	Kontrolltiere Pankreas zwischen Leber und Duodenum doppelt durchschnitten. Tiere unter aseptischen Kautelen operiert.
7. VIII. 13.	4	65	8,27	1,66	13,44	0,60	
19. VIII. 13.	4	48	7,36	1,01	13,20	0,66	
21. VIII. 13.	4	81	8,69	1,41	11,82	0,36	
	17		9,12	1,18	12,24	0,32	
6. X. 13.	5	96	10,98	2,88	12,40	[— 0,74]	
8. X. 13.	6	72	12,98	1,35	13,37	0,91	
14. X. 13.	3	96	4,17	0,77	5,66	0,85	
24. X. 13.	1	48	7,68	0,96	14,68	0,55	
25. X. 13.	1	72	9,81	0,65	9,10	0,48	
	16		9,12	1,32	11,04	0,41	
8. XI. 13.	7	72	11,15	1,72	12,43	0,74	
2. XII. 13.	4	72	9,60	0,66	14,16	0,63	
12. II. 14.	5	144	5,65	0,75	6,24	0,52	
26. II. 14.	5	168	3,80	1,37	9,36	0,15	
	21		7,55	1,12	10,55	0,51	

¹⁾ Zeitschr. f. klin. Med. 26, 225, 1894.

Tabelle II.

Monat	Zahl der Lebern	Tiere ohne Pankreas		Tiere mit Pankreas	
		Glykogen in 100 g Leber	Diastatische Wirksamkeit	Glykogen in 100 g Leber	Diastatische Wirksamkeit
August . .	17	9,12	1,18	12,24	0,32
Oktober . .	16	9,12	1,32	11,04	0,41
November } bis Februar }	21	7,55	1,12	10,55	0,51
	54	8,60	1,21	11,28	0,41

August, Oktober und die Monate November bis Februar und endlich den Mittelwert aus allen 54 Lebern. Die diastatische Wirksamkeit der normalen Leber (auch von Tieren, bei denen das Pankreas zwischen Leber und Duodenum durchschnitten und doppelt unterbunden war) liegt stets unter 1. Sie schwankt in den angegebenen Monaten zwischen 0,15 und 0,91, d. h. also, daß 100 g Leber in 4 Stunden bei 22° zwischen 0,15 und 0,91 g Glykogen hydrolysieren. Die Mittelwerte wachsen von August bis Februar etwas an, von 0,32 auf 0,51. Die Werte der pankreasdiabetischen Lebern liegen im August, wenn man frühestens 2 Tage nach Pankreasexstirpation untersucht, stets höher als 1. Im Oktober liegen von 16 Lebern 4 deutlich unter 1. Diese Werte sind von denen der Normallebern nicht wesentlich unterschieden. Zwischen November und Februar liegen die Werte von 9 Lebern unter 21 unterhalb der Einheit und sind damit von ähnlicher Größenordnung wie die Werte der Normallebern. Wenn man von dem Versuche am 2. VIII. 14, der nur 20 Stunden nach der Pankreasexstirpation vorgenommen wurde, absieht, so ergibt sich, daß von 49 Lebern, die von pankreasexstirpierten Tieren stammen, 36 eine doppelt bis dreifach so große diastatische Wirksamkeit haben als normale Lebern, während bei 13 die diastatische Wirksamkeit von etwa der gleichen Größenordnung ist. Mithin wird durch Pankreasexstirpation in 72% aller Fälle in der Zeit zwischen August und Februar die diastatische Wirksamkeit der herausgeschnittenen Leber ganz erheblich gesteigert. Im August immer, in den späteren Monaten weniger regelmäßig. Die Mittelwerte liegen, wie Tabelle II zeigt, sowohl in den einzelnen Monaten, als auch im Durchschnitt aller Versuche bei der pankreasexstirpierten Leber ganz erheblich höher. Es ergibt sich schließlich als Mittelwert der diastatischen Wirksamkeit von 54 Lebern, die von pankreasexstirpierten Tieren stammen, die Zahl 1,21 und als Mittelwert von 54 Lebern, die von normalen Tieren stammen, die Zahl 0,41. Durch vorherige Pankreasexstirpation wird also die diastatische Wirksamkeit der herausgeschnittenen Leber um 300% gesteigert. Dabei hat das Glykogen in der Leber durch Pankreasexstirpation stets mehr oder weniger abgenommen. Im Mittel aller Versuche beträgt es nur 77% des Glykogengehalts der normalen Lebern.

Wie beim Säugetier, so schwindet auch beim Frosch nach Pankreasextirpation das Leberglykogen ziemlich rasch, aber entsprechend der um 20° niederen Temperatur, bei der der Kaltblüter lebt, verläuft der Vorgang der Glykogenhydrolyse langsamer und der Tod der Tiere tritt ein, bevor die Leber jene minimalen Mengen Glykogen erreicht hat, die beim pankreasdiabetischen Hunde schon wenige Tage nach totaler Pankreasextirpation gefunden werden.

Es läßt sich nun an der herausgeschnittenen Leber von pankreasextirpierten Tieren nicht nur eine vermehrte Hydrolyse des Glykogens, sondern auch eine vermehrte Bildung von reduzierender Substanz nachweisen. Für die Schildkrötenleber haben bereits Fröhlich und Pollack eine vermehrte Zuckerabgabe bei kontinuierlicher Durchspülung nach Pankreasextirpation nachgewiesen. Um das gleiche für die Froschleber zu zeigen, benutzte ich das von Fröhlich und Pollack¹⁾ angegebene Verfahren der Durchströmung der Froschleber mit Ringerlösung in der Art, wie es in der vorausgehenden Abhandlung im einzelnen

Tabelle III.

Datum	Zeit nach der Operation	Tiere ohne Pankreas		Tiere mit Pankreas	
		mg Zucker pro 100 g Leber		mg Zucker pro 100 g Leber	
		in 2 Std.	in 4 Std.	in 2 Std.	in 4 Std.
25. II. 18.}	3 Tage	530	1030	579	873
2. III. 18.}					
16. III. 18.}	3 Tage	331	533	541	918
12. III. 18.}					
23. III. 18.}	5 Tage	973	1180	353	588
1. IV. 18.}					
4. V. 18.}	2 Tage	686	927	353	592
3. V. 18.}					
10. V. 18.}	3 Tage	583	750	657	1062
11. V. 18.}					
17. V. 18.}	2 Tage	581	1230	310	604
18. V. 18.}					
25. V. 18.}	2 Tage	570	860	295	533
27. V. 18.}					
Mittel aus 7 Lebern		608	937	441	739
22. VIII. 18.	40 Std.	888	1572	600	1112
30. VIII. 18.	48 Std.	939	1576	425	925
9. IX. 18.	48 Std.	1423	2164	306	566
11. IX. 18.	40 Std.	420	749	409	637
14. IX. 18.	44 Std.	493	723	354	623
19. IX. 18.	48 Std.	753	1151	564	984
Mittel aus 6 Lebern . .		819	1323	443	800
Mittel aus 13 Lebern . .		714	1180	442	770

¹⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 77, 265 u. 299, 1914.

beschrieben worden ist. Es wurde dabei an normalen und pankreasextirpierten Tieren gleicher Auswahl und gleicher Vorbehandlung bei gleicher Durchströmungsgeschwindigkeit und Temperatur die Zuckermenge bestimmt, die von der herausgeschnittenen Leber in den ersten 4 Stunden nach Tötung des Tieres an die Durchströmungsflüssigkeit abgegeben wurde, und zwar in 2 aufeinander folgenden Perioden von je 2 Stunden. Je 7 Lebern wurden in der Zeit von Februar bis Mai, und je 6 Lebern im August und September untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengestellt. Bei den Frühjahrslebern ist 2 mal die Zuckerbildung der pankreasdiabetischen Leber geringer, 5 mal größer als die der Normaltiere. Bei den Herbstlebern ist die Zuckerbildung der pankreasdiabetischen Tiere immer deutlich größer als bei den Normaltieren. Die Mittelwerte aus sämtlichen Frühjahrsversuchen ergeben in den ersten 2 Stunden nach Tod des Tieres eine Vermehrung der Zuckerbildung um 38%, in den ersten 4 Stunden eine Vermehrung um 21% für die pankreasdiabetischen Tiere. Die Mittelwerte aus den Herbstversuchen ergeben eine Vermehrung von 85% in den ersten 2, und eine Vermehrung um 65% für die ersten 4 Stunden. Die Differenz hinsichtlich der Zuckerabgabe nimmt also mit längerdauernder Durchspülung der Leber ab (zur Erläuterung vergleiche man die Kurve). Sie verhält sich genau wie die Beeinflussung der Froschlebern beim Fröhlich und Pollack-Verfahren durch Adrenalin, die mit längerdauernder Durchströmung ebenfalls verschwindet — wegen Ausspülung von Diastase aus der Leber —. Es ist bemerkenswert, daß längere forcierte Durchspülung demnach sowohl Vermehrung der Zuckerbildung durch Strukturzerstörung, als auch durch Adrenalin, als auch durch vorherige Pankreasextirpation aufhebt.

Die Mittelwerte aus allen 13 Lebern ergaben in 2 Stunden für die normalen Lebern eine Zuckerabgabe von 442 mg Traubenzucker pro 100 g Leber. Für die pankreasdiabetischen Lebern eine Zuckerbildung von 714 mg. Demnach Zunahme um 61%. In 4 Stunden geben im Mittel 13 normale Lebern 770 mg Traubenzucker pro 100 g Leber ab, 18 pankreasdiabetische Lebern 1130 mg Traubenzucker. Eine Vermehrung mithin um 47%. Es ergeben mithin sowohl die Bestimmung der Glykogenabnahme als auch die Ermittlung der Zuckerbildung für die herausgeschnittene Leber eine erhebliche Steigerung durch vorherige Pankreasextirpation. In beiden Fällen sind die Ergebnisse nur in den Monaten August und September immer positiv. In den Frühjahrsmonaten wird in einer gewissen

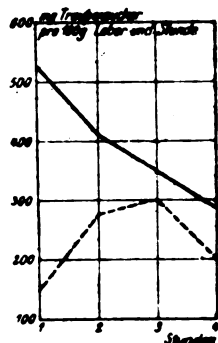


Fig. 1.
Versuch vom 30. VIII. 18.
— Leber vom pankreasdiabetischen Tier.
--- Leber vom normalen Tier.

Minderzahl der Versuche die Vermehrung durch vorherige Pankreasexstirpation vermißt. Die Differenz bezüglich der Vermehrung der diastatischen Wirksamkeit und der Zuckerbildung kann also noch am herausgeschnittenen Organ gefunden werden; damit ist bewiesen, daß durch Pankreasexstirpation in der Leberzelle selbst eine Veränderung eintritt, die vermehrte Hydrolyse des Glykogens hervorruft. Da ja Einflüsse des Zentralnervensystems auf das herausgeschnittene Organ ausgeschlossen sind.

Umgekehrt läßt sich am herausgeschnittenen Froschmuskel zeigen, daß dieser beim normalen und pankreasdiabetischen Tiere genau in der gleichen Weise Kohlenhydrate zum Verschwinden bringt. Diesen Vorgang will ich im folgenden mit dem Ausdruck „Glykolyse“ bezeichnen. Darunter soll verstanden werden, daß die Gesamtmenge der Kohlenhydrate im Muskel abnimmt, ohne daß etwas darüber ausgesagt werden soll, ob es sich dabei um einen oxybiotischen oder einen anoxybiotischen Vorgang handelt. Die Gesamtmenge der Kohlenhydrate im Muskel setzt sich zusammen aus hydrolysierbarem Polysaccharid (Glykogen, Dextrine), Disaccharid (Maltose) und Monosaccharid (Traubenzucker). Die einzelnen Fraktionen der gesamten Kohlenhydrate zu bestimmen, ist eine schwierige Aufgabe. Bei der Glykogenbestimmung wird der größte Teil der Dextrine, das Di- und Monosaccharid, zerstört. Diese für sich zu bestimmen oder gar untereinander zu trennen, ist recht schwierig. Sie fallen aber quantitativ weniger ins Gewicht, da bei weitem die Hauptmenge der Gesamtkohlenhydrate im Froschmuskel aus Glykogen besteht. Ich habe auf die Bestimmung der Einzelfraktionen völlig verzichtet, vielmehr die Muskulatur durch Kochen mit 2 bis 3%iger Salzsäure der totalen Hydrolyse unterworfen und hieran die Bestimmung der reduzierenden Substanz nach Bertrand angeschlossen. Die erhaltenen Kupferwerte wurden auf Traubenzucker umgerechnet. Im einzelnen wurde so verfahren: Sofort nach Tod des Tieres wurden die beiden Hinterschenkel möglichst unter Vermeidung von Verletzungen präpariert, gewogen, im Erlenneyerkolben mit 20 bis 30 ccm 2,2%iger Salzsäure von 100° übergeben und ins siedende Wasserbad gebracht, ohne daß die Muskeln irgendwie vom Knochen abgetrennt oder zerkleinert wurden. Während des Verweilens im Wasserbad wird häufig herausgenommen und geschüttelt. Die Muskulatur zerfällt dabei zu feinen Partikeln, die Knochen lösen sich auf. Nach 3 Stunden kühlt man ab, macht ganz schwach alkalisch und säuert sofort wieder mit Essigsäure an. Die trübe Flüssigkeit, die kleinste Gewebepartikel enthält, wird in einen Meßkolben von 150 ccm überführt mit 30%iger Quecksilberacetatlösung ausgefällt und bis zur Marke aufgefüllt. Man schüttelt gut durch und läßt bis zum nächsten Tage stehen. Dann wird durch Faltenfilter filtriert, das klare Filtrat mit Schwefelwasserstoff entquecksilbert. Durch das klare Filtrat vom Schwefelquecksilber wird mehrere Stunden ein wasseruampfgesättigter Luftstrom geleitet. Dann wird, nötigenfalls nach nochmaliger Filtration, in einer gemessenen Menge die Zuckerbestimmung nach Bertrand ausgeführt. (Nach vorheriger Neutralisation.) Die Menge,

die zur Zuckerbestimmung benutzt wird, muß so bemessen werden, daß einesteils genügend große Permanganatwerte erhalten werden (zur Verringerung der Titrationsfehler), andererseits die in der Flüssigkeit enthaltenen Salze der Knochenasche nicht störend bei der Filtration wirken, oder gar das schön rote Ausfallen des Kupferoxyduls hindern. Ich habe die Methode anfangs zur Bestimmung der Gesamtkohlenhydrate im Froschovarium verwendet. Sie ist aber auch für die Analyse von ganzen Froschschenkeln verwendbar gefunden worden. Ähnlich sind früher Lépine¹⁾ bei Bestimmung seines Sucre virtuel im Blute, Bierry und Gruzewska²⁾, Röhmann³⁾, Forschbach und Schäffer⁴⁾ verfahren.

Man erhält mit dieser Methode stets höhere Werte als bei der Glykogenbestimmung nach Pflüger. Diese werden aber nicht durch im Organ enthaltenes Monosaccharid verursacht. Ich erhielt z. B. im Froschovarium am 8. V. 14 Gesamtkohlenhydrate als Traubenzucker berechnet 3,27%. Glykogen nach Pflüger 2,93%. Traubenzucker im frischen Organ 0,045%. Es ergaben sich also durch die Glykogenmethode rund 90% der Traubenzuckermengen, welche die Methode der Gesamtkohlenhydrate lieferte. Im Froschschenkel ergab sich Gesamtkohlenhydrat 1,27% (als Traubenzucker berechnet). Glykogen nach Pflüger 0,96% (als Traubenzucker berechnet), also rund 83% der Gesamtkohlenhydrate waren Glykogen. Die Zunahme von 10 bis 18%, welche die Methode der Gesamtkohlenhydrate gegenüber der Glykogenmethode liefert, ist höchstwahrscheinlich zum großen Teil durch Dextrin (und Disaccharid?) verursacht, die durch Kochen mit 60%iger Kalilauge zerstört werden. Vielleicht sind auch in geringer Menge reduzierende Substanzen vorhanden, die keine Kohlenhydrate sind. Die Vorfrage, ob die beiden Froschschenkel eines Tieres, nach dieser Methode untersucht, gleiche Mengen an Gesamtkohlenhydraten enthalten, wird durch die in Tabelle IV mitgeteilten 11 Analysen erledigt.

Bei 11 Versuchen differieren die beiden Hinterschenkel 6mal um mehr als 5%, 5mal um weniger als 5%. Im Einzelversuch beträgt die größte Differenz 9,8%, die kleinste 0,7%. Der Mittelwert ist so gezogen, daß sämtliche an Gewicht schwereren mit sämtlichen an Gewicht leichteren Schenkeln verglichen werden. Die Gewichtsunterschiede kommen dadurch zustande, daß die Halbierung der Hinterhälfte des Tieres niemals genau die Mittellinie trifft. Bei so gezogenen Mittelwerten ergibt sich eine Übereinstimmung der beiden Hinterschenkel auf 1,6% des Gesamtkohlenhydratgehaltes. Demnach sind im Einzelversuch nur solche Werte als positive zu betrachten, bei denen durch die Glykolyse mehr

¹⁾ Lépine, Diabète sucré Paris 1909.

²⁾ Bierry und Gruzewska, Compt. rend. Soc. Biol. 76, 824.

³⁾ Röhmann, Biochemie 1906, 231.

⁴⁾ Forschbach u. Schäffer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol,

Tabelle IV.

Datum	Gewicht des ersten Schenkels in g	Gewicht des zweiten Schenkels in g	In 100 g Schenkel I Trauben- zucker in g	In 100 g Schenkel II Trauben- zucker in g	Differenz %
11. VII. 19	4,81	4,52	0,321	0,342	6,1
12.	5,76	5,63	0,455	0,482	5,6
12.	4,42	4,32	0,418	0,399	4,6
14.	6,21	6,07	0,483	0,524	7,8
14.	4,71	4,60	0,557	0,545	2,5
19.	3,25	3,24	0,364	0,329	9,9
19.	2,82	2,65	0,399	0,402	0,7
22.	3,98	3,74	0,358	0,397	9,8
22.	6,64	6,32	0,332	0,349	4,9
23.	4,49	4,43	0,518	0,498	6,0
23.	3,05	2,97	0,624	0,641	2,7
	50,14	48,49	4,829	4,908	
	4,558	4,408	0,4390	0,4461	1,6

als 10% Abnahme bezüglich der Gesamtkohlenhydrate gegenüber dem Vergleichschenkel sich finden.

Aus den Untersuchungen von Fletcher und Hopkins¹⁾ wissen wir, daß die mechanische Zerkleinerung des Froschmuskels eine sofortige starke Milchsäurebildung hervorruft. Parnas und Wagner²⁾ haben gezeigt, daß durch mechanische Zerkleinerung außerdem eine starke Abnahme der Gesamtkohlenhydrate stattfindet, die aber langsamer verläuft und zeitlich der Milchsäurebildung nachfolgt. Anstatt die Muskeln mechanisch zu zerkleinern, wobei Substanzverluste schwer vermeidbar sind, habe ich die Muskelstruktur dadurch verändert, daß der eine Froschschenkel in destilliertes Wasser gebracht wurde. Der Versuch wurde so angeordnet. Ein Frosch wurde in Eis verpackt und $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde abgekühlt, dann wurde das Tier schnell getötet, beide Hinterschenkel rasch präpariert, gewogen und der eine sofort auf Gesamtkohlenhydrate verarbeitet. Der andere wurde im Erlenmeyerkolben mit 10 bis 20 ccm destilliertem Wasser übergossen und bei Zimmertemperatur 3 Stunden stehen gelassen. Dann wurden so viel Kubikzentimeter 20%ige Salzsäure zugesetzt, daß die Flüssigkeit 2,2% Salzsäure enthielt. sofort ins siedende Wasserbad gebracht und die Bestimmung der Gesamtkohlenhydrate angeschlossen. Das Ergebnis 13 solcher Versuche zeigt die Tabelle V.

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß in 11 von 13 Versuchen eine sehr erhebliche Glykolyse eingetreten ist. 2 Versuche verlaufen negativ. Die Gesamtkohlenhydrate haben in den 11 positiven Versuchen maximal um 59%, minimal um 11,8% abgenommen. Im Mittel aus allen 13 Versuchen beträgt die verschwundene Traubenzuckermenge 0,206 g auf

¹⁾ Fletcher u. Hopkins, Journ. of Physiol. 33, 247. 1906.

²⁾ Parnas u. Wagner, diese Zeitschr. 61. 387. 1914.

Tabelle V.

Datum	Gewicht des Schenkels ante	Gewicht des Schenkels post	Trauben-zucker in 100 g Schenkel ante	Trauben-zucker in 100 g Schenkel post	Abnahme %	Abnahme absolut
11. IX. 19	8,64	8,79	0,752	0,663	11,8	0,089
12.	4,92	4,50	0,739	0,808	— 9,3	— 0,069
15.	8,84	8,70	0,772	0,627	18,8	0,145
16.	10,91	11,01	0,527	0,454	13,9	0,073
17.	8,20	7,98	0,701	0,285	59,3	0,416
17.	11,16	12,28	0,598	0,432	27,8	0,166
15.	7,02	6,59	0,776	0,550	29,1	0,226
29.	6,15	6,00	0,813	0,754	7,2	0,059
29.	6,61	6,73	0,890	0,507	43,0	0,383
29.	8,79	9,00	0,696	0,329	52,8	0,367
1. X. 19	3,34	3,26	0,591	0,338	42,8	0,253
1.	4,89	5,06	0,711	0,598	15,9	0,113
1.	2,85	2,85	0,523	0,386	26,2	0,137
	87,10	87,65	9,089	6,781		
	6,70	6,74	0,693	0,487	29,7	0,206

100 g Froschschenkel, oder 29,7% des Anfangsgehaltes an Gesamtkohlenhydraten. Da der Anteil des Gesamtkohlenhydrates, der kein Glykogen ist, zu 18% gefunden wurde, so ergibt sich, daß auch ein beträchtlicher

Tabelle VI.

Datum	Zeit seit der Operation Tage	Gewicht des Schenkels ante	Gewicht des Schenkels post	Trauben-zucker in 100 g Schenkel ante	Trauben-zucker in 100 g Schenkel post	Abnahme %	Abnahme absolut
8. IX. 19	4	7,51	7,64	1,275	0,947	25,7	0,328
8.	4	8,38	8,92	0,757	0,685	9,5	0,072
9.	5	7,98	8,10	0,996	0,671	32,6	0,325
9.	5	7,66	7,41	1,068	0,704	34,9	0,364
10.	6	11,92	10,32	0,994	0,607	39,6	0,394
10.	6	7,02	7,17	1,031	0,788	23,6	0,243
11.	7	7,65	7,34	1,069	0,694	35,1	0,375
11.	7	7,07	7,10	0,419	0,196	53,2	0,223
12.	8	5,53	5,70	0,739	0,250	66,1	0,489
12.	1	9,17	9,57	0,691	0,450	34,9	0,241
15.	4	8,79	3,72	0,790	0,748	5,3	0,042
16.	5	7,23	7,37	0,705	0,311	55,9	0,394
16.	5	6,10	6,11	0,996	0,941	5,5	0,055
17.	6	6,44	6,27	0,516	0,291	43,6	0,225
26.	7	6,71	6,85	0,857	0,639	25,4	0,218
26.	7	4,17	4,42	0,438	0,249	43,2	0,189
26.	7	6,00	5,89	0,883	0,743	15,9	0,140
		115,33	115,90	14,224	9,914		
		6,78	6,82	0,8367	0,5832	30,3	0,2525

Anteil des Muskelglykogens bei Strukturstörung glykolytisch wird. Wie dies Parnas und Wagner¹⁾ bereits sehr richtig hervorgehoben haben.

Die folgende Tabelle gibt nun eine Übersicht über 17 Versuche, die an pankreasdiabetischen Fröschen in genau gleicher Weise durchgeführt wurden. Dabei zeigt sich, daß von 17 Versuchen 3 negativ verlaufen, d. h. die Abnahme der Gesamtkohlenhydrate durch Einbringen in destilliertes Wasser für 3 Stunden bei Zimmertemperatur beträgt weniger als 9,8%. In den 14 positiven Versuchen ist die maximale Abnahme 66%, die minimale 15,9%. Dabei spielt die Zeit, die seit der Exstirpation des Pankreas vergangen ist, keine wesentliche Rolle. Die maximale Glykolyse von 66% findet sich zufällig bei einem Tiere, dessen Pankreasexstirpation am längsten zurücklag (8 Tage). Im Mittel aus allen 17 Versuchen ergibt sich eine Abnahme um 0,254 g Traubenzucker auf 100 g Muskel. Das sind 30,3% der zu Beginn des Versuches vorhandenen Menge. Der Vergleich mit den normalen Muskeln ergibt, daß die Gesamtkohlenhydratmenge des Muskels und der absolute Verlust durch Glykolyse beim pankreasdiabetischen Tiere größer sind als bei den Normalversuchen. Die prozentige Abnahme ist aber in beiden Fällen die gleiche. Bemerkenswert ist es, daß, obwohl die Durchschnittsgewichte der Schenkel beim normalen und pankreasdiabetischen Tiere gleich sind, dennoch die pankreasdiabetischen Tiere einen erheblich größeren Gehalt an Gesamtkohlenhydraten aufweisen. Es erscheint damit als nicht ausgeschlossen, daß das Glykogen beim Pankreasdiabetes des Frosches im Muskel ebenso zunimmt, wie dies beim Diabetes des Hundes und des Menschen z. B. für die Niere bekannt ist.

Es ist also im herausgeschnittenen Muskel die prozentische Glykolyse beim normalen und pankreasdiabetischen Tiere gleichgroß. Sie beträgt bei Einbringen des Schenkels in destilliertes Wasser für 3 Stunden bei Zimmertemperatur etwa den dritten Teil des Anfangsgehaltes der Gesamtkohlenhydrate. Damit ist die Annahme, daß beim Pankreasdiabetes eine Störung im „Verbrauch“ des Zuckers eintrete, für die quergestreifte Muskulatur unmöglich gemacht.

Nun haben aber J. Forschbach und H. Schäffer²⁾ kürzlich die Ansicht ausgesprochen, daß Versuche am isolierten Organ von vornherein darauf verzichten müssen, über Vorgänge im Organismus etwas auszusagen. Sie meinen im Hinblick auf Versuche von Starling und von Landsberg, die Versuche dieser Autoren hätten für das Verhalten des Muskels im lebenden, diabetischen Tiere keine Beweiskraft. Forschbach und Schäffer halten es für möglich, daß der herausgeschnittene diabetische Muskel den Zucker genau so gut „verwerten“ kann wie der normale, daß er aber diese Fähigkeit nicht besaß, solange er einen Teil des diabetischen Körpers bildete.

Ich halte diese Anschauung für falsch. Sie stützt sich auf komplizierte noch nicht bewiesene Vorstellungen über hemmende und beschleunigende

¹⁾ Parnas u. Wagner, a. a. O. 400.

²⁾ Forschbach u. Schäffer, a. a. O. 350.

nigende Einflüsse der inneren Sekretion auf die Glykolyse im Muskel. Es ist leicht, durch richtig angeordnete Versuche zu zeigen, daß experimentelle Grundlagen für Forschbach und Schöffers Meinung fehlen. Zu diesem Zweck wurde folgendermaßen verfahren: 2, 5 und 7 Tage nach erfolgter Pankreasexstirpation wurde je ein pankreasdiabetischer Frosch mit dem Bauche nach unten durch Fäden, die mit der Nadel durch die Haut gezogen wurden, auf einem Froschbrett befestigt. Dann wurde der Plexus ischiaticus der einen Seite freigelegt und während zweier Stunden in Intervallen jeweils bis zur deutlichen Ermüdung des Schonkels elektrisch gereizt. Nach Tötung des Tieres wurde sofort im gereizten und nicht gereizten Beine die Bestimmung der Gesamtkohlenhydrate vorgenommen. Eine Übersicht über diese Versuche ergibt die Tabelle VII.

Tabelle VII.

Datum	Zeit nach der Operation Tage	Gewicht des		Traubenzucker in 100 g des		Abnahme durch Muskelreizung	
		Ruhe-schenkels g	gereizten Schenkels g	Ruhe-schenkels	gereizten Schenkels	absolut	%
8. X. 19	2	7,17	7,16	0,652	0,485	0,167	25,6
6.	5	4,48	4,84	0,508	0,407	0,101	19,9
8.	7	6,59	7,37	0,504	0,339	0,175	34,7
Mittelwerte		6,080	6,457	0,5547	0,4070	0,148	26,6

Das Ergebnis ist in allen drei Versuchen eine sehr deutliche Abnahme der Gesamtkohlenhydrate im gereizten Schenkel. Auch wenn der Versuch 7 Tage nach erfolgter Pankreasexstirpation angestellt wird. Also auch der Muskel im lebenden, pankreasdiabetischen Tiere besitzt eine deutlich nachweisbare Fähigkeit zur Glykolyse. Im Mittel der 3 Versuche ist sie nahezu ebenso groß als die Glykolyse im herausgeschnittenen Muskel durch Strukturstörung.

Durch diese hier mitgeteilten Versuche ist für den Pankreasdiabetes des Frosches also bewiesen:

1. Im lebenden Tiere und im herausgeschnittenen Organ findet sich eine verstärkte Hydrolyse des Leberglykogens.

2. Im lebenden Tiere und im herausgeschnittenen Organ findet sich die gleiche Fähigkeit des Muskels zur Glykolyse wie beim normalen.

Der letzte Befund stimmt mit den Arbeiten von Starling, Patterson und Cruickshank¹⁾, sowie von Landsberg²⁾. Macleod und Pearce³⁾ überein, die sämtlich beim Pankreas-

¹⁾ Journ. of Physiol. 47, 1. 137, 381, 1913 bis 1914.

²⁾ Landsberg, Arch. f. klin. Med. 115, 465, 1914.

³⁾ Americ. Journ. of Physiol. 23, 278, 1909; 32, 184, 1913; 33, 378, 1914.

diabetes die Fähigkeit des Muskels zur Glykolyse nachgewiesen haben. Um diese nachzuweisen, ist die einwandfreieste Methode der von mir angewendete Vergleich des herausgeschnittenen Muskels beim normalen und pankreasdiabetischen Tier, hinsichtlich der Glykolyse durch Strukturstörung. Landsberg hat z. B. die Abnahme des Blutzuckers bei künstlich durchströmten und gereizten Muskeln vom Hund untersucht. Hier wäre immer noch die Möglichkeit vorhanden, daß der verschwundene Blutzucker im Muskel in komplexe Kohlenhydrate umgewandelt wäre. Es ist immer unmöglich, bindende Schlüsse zu ziehen, wenn nur die Änderung des Blutzuckers oder nur die Änderung der Gesamtkohlenhydrate bei einem in der Zirkulation befindlichen Organe untersucht werden. Ich habe daher auch nur 3 Versuche mit einer derartigen Versuchsanordnung angestellt. Ich weiß nicht, wie es möglich sein soll, Schlüsse aus Forschbach und Schäffers Untersuchungen zu ziehen, in denen in der Zirkulation befindliche Muskeln auf Kohlenhydratschwund untersucht werden, ohne Berücksichtigung des Blutzuckers. Forschbach und Schäffer vergleichen den Kohlenhydratschwund im gereizten Muskel von narkotisierten, normalen und pankreasdiabetischen Hunden, deren eine hintere Extremität elektrisch gereizt wird, also die Versuchsanordnung, die ich am Frosch nachgeahmt habe; nur waren meine Tiere nicht narkotisiert. Forschbach und Schäffer haben dabei ganz andere Resultate erhalten als ich. Sie vergleichen aber Tiere, deren Muskeln mehr als 0,5% Glykogen enthielten und die einen normalen Blutzucker hatten, unbedenklich mit solchen, deren Muskeln Glykogen nur in Spuren besaßen und deren Blutzuckergehalt den 5- bis 6fachen Wert der Normaltiere erreichte. Die Gesamtkohlenhydrate der Normalmuskeln betragen dabei bei 1%, die Gesamtkohlenhydrate der pankreasdiabetischen Muskeln bei 0,3% (Die Glykogenbestimmungen ergeben allerdings nicht den wahren Glykogenwert. Um ihn zu erhalten, muß die unzerkleinerte Muskulatur möglichst bald nach Tod des Tieres in die 100° warme 60%ige Kalilauge gebracht werden. Bis die Glykogenbestimmung bei Forschbach und Schäffer begann, war schon Hydrolyse eingetreten. Das geht aus den hohen Mengen präformierten Traubenzuckers hervor, die im Muskel gefunden

wurden [1mal 0,45^o/_o]. Der Hergang in Forschbach und Schäffers Versuchen ist wahrscheinlich so: bei reichlichem Gehalt an Glykogen wird bei Muskelarbeit zunächst dieses oder seine hydrolytischen Produkte der Hydrolyse anheimfallen, während der Blutzucker erst in zweiter Linie angegriffen wird. Bei sehr glykogenarmen Muskeln und auf das 5- bis 6fache erhöhtem Blutzucker (Pankreasdiabetes des Hundes) wird das Umgekehrte der Fall sein. Diese Annahme scheint mir im Hinblick auf die Versuche Landsbergs die richtige Deutung der Versuche von Forschbach und Schäffer zu sein. Die Differenz in meinen Versuchen zu denen von Forschbach und Schäffer kommt also dadurch zustande, daß beim Pankreasdiabetes des Frosches eine Abnahme des Muskelglykogens nicht stattfindet. Es erscheint sogar möglich, daß beim Pankreasdiabetes des Frosches das Glykogen der Muskulatur zunehmen kann. Was nach Starlings und seiner Mitarbeiter Versuchen beim Hunde nur für den Herzmuskel zu gelten scheint.

So bilden diese Versuche am pankreasdiabetischen Frosch eine neue Stütze für den bereits früher durch Macleod und Pearce, Starling und seine Mitarbeiter und Landsberg gebrachten Nachweis, daß im Pankreasdiabetes die Fähigkeit des Muskels zur Glykolyse unverändert weiterbesteht. Ein scheinbarer Widerspruch muß aber noch besprochen werden. Minkowski¹⁾ fand, daß Nahrungszucker beim Pankreasdiabetes nahezu quantitativ im Harn ausgeschieden wird. Verzar²⁾ hat das gleiche mit anderer Methodik für die späteren Tage des Pankreasdiabetes des Hundes nachgewiesen. In diesen gelingt es nicht mehr, durch intravenöse Traubenzuckerzufuhr den respiratorischen Quotienten zu steigern. Verzar hat daraus den Schluß gezogen, daß „auf der Höhe des Pankreasdiabetes der Körper die Fähigkeit, zugeführten Zucker zu verbrennen, verloren hat“. Gegen diesen Schluß kann kaum etwas eingewendet werden, wenn man besonderen Nachdruck auf die Worte „zugeführten Zucker“ legt.

Aus dem Verhalten des intravenös dem kurarierten Tiere eingeführten Traubenzuckers läßt sich

¹⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 31, 85, 1893.

²⁾ Verzar, diese Zeitschr. 53, 140, 1913; 66, 75, 1914.

ein Schluß auf das Schicksal des Muskelglykogens nämlich nicht ziehen. Das wird sehr deutlich, wenn wir Johannsens¹⁾ Versuche über Zuckierzufuhr am Menschen mit vorsätzlicher Muskelruhe mit denen Verzars am kurarisierten Hunde vergleichen. Johannsen fand, daß beim Menschen nach Traubenzuckertzufuhr die Kohlensäureabgabe in den nächsten Stunden steigt, und zwar bis zu einer gewissen Grenze proportional der Zufuhr. Diese Steigerung der Kohlensäureabgabe fällt aber geringer aus, oder fehlt vollständig, wenn vorher der Glykogenbestand des Menschen durch Hunger und Muskelarbeit stark reduziert wurde, mit andern Worten: Nahrungszucker verdrängt Fett nur dann aus der Zersetzung, wenn der Glykogengehalt der Leber ein gewisses Minimum überschreitet. Johannsen hat gemeint, daß bei glykogenarmer Leber der Nahrungszucker mit so großer Geschwindigkeit in Glykogen umgewandelt würde, daß er infolgedessen das Fett nicht mehr aus der Zersetzung verdrängen könne. Diese Vorstellung ist aber falsch. Das wissen wir aus den Versuchen Hofmeisters²⁾ über den sogenannten Hungerdiabetes, aus den Versuchen Bangs³⁾ über das Verhalten des Blutzuckers am hungernden Kaninchen nach Traubenzuckertzufuhr und aus den Versuchen Barrencheens⁴⁾ über die Glykogensynthese in der herausgeschnittenen künstlich vorher glykogenarm gemachten Leber. Die glykogenarme Leber nämlich synthetisiert Glykogen ganz im Gegensatz zu Johannsens Annahme nur mit sehr viel kleinerer Geschwindigkeit als die Leber mittleren Glykogengehaltes. Wir müssen also Johannsens Befunde etwas anders auffassen und sagen: Verdrängung des Fettes durch Nahrungszucker aus der Zersetzung und merklich schnelle Synthese von Glykogen aus Nahrungszucker in der Leber sind zwei koordinierte Vorgänge, die beide nur stattfinden, wenn der Glykogengehalt der Leber ein gewisses Mi-

¹⁾ Johannsen, Skand. Arch. f. Physiol. 21, 1, 1909.

²⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 26, 355, 1891.

³⁾ Bang, Der Blutzucker 1913, 57 ff.

⁴⁾ Barrencheen, diese Zeitschr. 58, 303, 1913.

nimum überschreitet. Bei glykogenarmer Hungerleber des Menschen ebenso wie bei praktisch glykogenfreier Leber des pankreasdiabetischen Hundes findet Verdrängung des Fettes durch Nahrungszucker aus der Zersetzung nicht statt. Damit findet auch die Tatsache Erklärung, daß Verzaar in den ersten Tagen des Pankreasdiabetes bei noch glykogenhaltiger Leber auf Traubenzuckerzufuhr noch Zunahme der Kohlensäureausgabe erhält. Wenn aber auch die Fähigkeit, Fett aus der Zersetzung zu verdrängen, infolge veränderter Verhältnisse in der Leber für den Nahrungszucker verloren gegangen ist, so besitzt dennoch der Muskel seine Fähigkeit zur Glykolyse beim Pankreasdiabetes genau so wie beim normalen Tier. Nicht die Fähigkeit des Organismus zur Glykolyse ist beim Pankreasdiabetes gestört; nur der Nahrungszucker kann kein Körperfett mehr aus der Zersetzung verdrängen; mit andern Worten: Nahrungszucker kann das Fett im Pankreasdiabetes nicht mehr isodynam vertreten. Diese Fähigkeit verliert der Organismus nach Johannsen nicht nur im Diabetes, sondern immer, wenn der Glykogengehalt der Leber unter ein gewisses Maß herabsinkt. Eine eigentliche Oxydationsstörung der Kohlenhydrate aber gibt es im Pankreasdiabetes nicht.

In seiner klassischen Abhandlung¹⁾ über den Pankreasdiabetes vom Jahre 1893 hat Minkowski zwei Punkte besonders hervorgehoben, die den Nahrungszucker betreffen. Einerseits geht der Nahrungszucker quantitativ in den Urin über, andererseits aber bewirkt der Nahrungszucker keine merkliche Glykogensynthese mehr in der Leber. Minkowski hat bereits damals hinzugefügt, daß zwischen diesen beiden Vorgängen irgendein Zusammenhang angenommen werden muß. Mir scheint, daß wir jetzt über diesen Zusammenhang etwas klarer sehen, denn auf die Vermehrung der Hydrolysegeschwindigkeit des Glykogens in der Leber lassen sich alle Erscheinungen des Pankreasdiabetes nunmehr zurückführen. Auch über das Zustandekommen der Beschleunigung der Hydrolysegeschwindigkeit des Glykogens in der Leber kann man sich eine Vor-

¹⁾ a. a. O. 167 ff.

stellung bilden. Wenn man nämlich die von mir begründete Hypothese annimmt, daß in der Leberzelle ein Mechanismus vorhanden ist, der die räumliche Trennung von Glykogen und Diastase in der Leberzelle bewirkt. Dieser Mechanismus ist es, der sich nach Pankreasextirpation ändert und alle Erscheinungen des Pankreasdiabetes sind Folgen dieser Veränderung.

Das Adsorptionsvermögen der Cellulose; nebst Bemerkungen über die elektrometrische Mikroanalyse des Chlor.

Von

P. Rona und L. Michaelis.

(Aus den biologischen Laboratorien des städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 24. November 1919.)

Nachdem wir in den früheren Arbeiten die adsorptiven Eigenschaften der Kohle und der anorganischen Adsorbentien in ihren Grundlagen festgestellt haben, ist es jetzt unsere Aufgabe, diejenigen Adsorptionsmittel zu untersuchen, die für die Biologie Bedeutung haben, also die adsorptiven Eigenschaften der organischen und organisierten Substanzen. Wie früher, wollen wir auch hier zwischen den elektrisch indifferenten und den elektrolytartigen Adsorbentien unterscheiden. Der zweifelloseste Vertreter der organischen, elektrisch indifferenten Adsorbentien ist die Cellulose, und es lag die Frage sehr nahe, ob die adsorptiven Eigenschaften der Cellulose denen des elementaren Kohlenstoffs ähnlich seien. Die Adsorption wurde wiederum 1. an gut adsorbierbaren oberflächenaktiven Nichtelektrolyten (einfache apolare Adsorption), 2. an gut adsorbierbaren Elektrolyten, und zwar wegen der Leichtigkeit der Analyse an organischen Farbstoffen geprüft (kombinierte apolare Adsorption).

Die Versuche mit oberflächenaktiven Nichtelektrolyten wurden ausgeführt mit Heptylalkohol, sekundärem und normalem Octylalkohol. Sie ergaben das wohl kaum erwartete Resultat, daß hier nur unter den allergünstigsten Bedingungen eine eben nachweisbare Spur von Adsorption eintritt. Bei

Heptylalkohol ließ sich Adsorption meist überhaupt nicht sicher nachweisen; bei sekundärem Octylalkohol in zweifelhaften Spuren: bei normalem Octylalkohol nur eben deutlich nachweisbar. Die Reihenfolge der Adsorbierbarkeit der Alkohole ist also dieselbe wie an Kohle und Talk, aber der absolute Betrag der Adsorption selbst bei Berücksichtigung der vielleicht kleineren spezifischen Oberfläche der Cellulose in Form von Filtrierpapier oder Baumwolle gegenüber dem Kohlepulver ganz unverhältnismäßig kleiner als bei Kohle. Gegenüber einer gegebenen Lösung von Heptylalkohol z. B. kann man mit Milligrammen von Kohle mehr erreichen als mit der größten, im Versuche möglichen Menge Papier oder Baumwolle (d. h. 20 g und mehr).

Von den organischen Farbstoffen wurde als basischer Farbstoff das Methylenblau untersucht. Es handelte sich hier darum, ob eine äquivalente, hydrolytische oder Austauschadsorption vorlag. Aschefreies Filtrierpapier wurde mit einer dünnen Methylenblaulösung bekannter Konzentration nahezu erschöpft und in der Flüssigkeit dann der Gehalt an Methylenblau colorimetrisch, die Konzentration der H^+ mit der Gaskette bestimmt. Die Analyse des Chlor konnte wegen der sehr geringen Mengen auf gewöhnlichem analytischem Wege kaum ausgeführt werden. Seine Bestimmung gelang aber leicht durch eine Quecksilber-Kalomel-Konzentrationskette. Es ergab sich, daß nach fast völliger Adsorption des Farbstoffes der Chlorgehalt der Flüssigkeit nicht verändert worden war. Es wird also kein Chlor adsorbiert. Die H^+ Konzentration der Lösung ist aber nach der Adsorption nicht erhöht. Es liegt somit keine hydrolytische, sondern eine Austauschadsorption vor. Da nun eine solche an Cellulose nicht denkbar ist, so folgt daraus, daß die Cellulose selbst an der Adsorption in einem meßbaren Umfange überhaupt nicht beteiligt ist, sondern nur ihre Aschenbestandteile, vor allem kieselsaurer Kalk. Hiervon ist auch nicht die reinste aschefreie Cellulose ganz frei, und eine Überschlagsrechnung zeigt, daß der Aschengehalt selbst des reinsten Filtrierpapiers der aufgenommenen Farbstoffmenge reichlich äquivalent ist. Die Cellulose hat also ganz und gar nicht die Eigenschaften des elementaren Kohlenstoffs; sie adsorbiert einen so gut adsorbierbaren Farbstoff wie Methylenblau überhaupt

nicht nachweisbar. Ihre Färbbarkeit beruht allein auf ihren Aschebestandteilen.

Bei den sauren Farbstoffen Eosin und Diaminechrotrot in Form ihrer NH_4 -Salze ließ sich unter Bedingungen, wo der Farbstoffgehalt bis zu 95 % erschöpft wurde, doch so gut wie alles NH_4 in der Lösung wiederfinden. Es wurden kaum jemals weniger als 90 bis 95 % wiedergefunden, und es läßt sich somit analytisch nicht sicher erweisen, daß außer der Austauschadsorption überhaupt noch eine Adsorption des Farbsalzes als Ganzes vorkommt. Es liegt also auch hier eine Austauschadsorption mit den Aschebestandteilen der Cellulose vor. Damit steht in Übereinstimmung, daß gewöhnliches Filtrierpapier diese Farbstoffe stärker adsorbiert als „aschefreies“, und besonders beim Eosin tritt dieser Unterschied stark hervor. Das ist damit zu erklären, daß das Ca, das wichtigste Kation der Asche, nur als Bindungsmittel für Diaminechrotrot, nicht aber für Eosin wirkt, denn das Ca-Salz des Eosins ist löslich, das des Diaminechrotrots völlig unlöslich. Dagegen könnte für Eosin Al und Fe als Bindemittel in Betracht kommen, weil ihre Eosinsalze völlig unlöslich sind. Bei den sogenannten „aschefreien“ Filtern dürfte wohl der übrigbleibende Kationengehalt der Asche überwiegend auf Ca zu beziehen sein. Daraus erklärt sich das relativ viel schlechtere Bindungsvermögen des aschefreien Papiers für Eosin als des aschehaltigen¹⁾.

¹⁾ Der Kalkgehalt aller Pflanzenfasern ist somit eine natürliche Beize für alle diejenigen sauren Farbstoffe, deren Ca-Salz unlöslich ist. Dies sind z. B. Kongorot, Diaminechrotrot, wahrscheinlich überhaupt alle die sogenannten „substantiven Baumwollfarbstoffe“, die Disazoverbindungen des Benzidins; sie zeichnen sich vor den anderen sauren Farbstoffen dadurch aus, daß sie „ungebeizte“ Pflanzenfaser in neutraler Lösung (oder aus leicht alkalischer Lösung unter Zusatz von Seife, Wasserglas, Natriumphosphat) färben. Es erscheint uns sehr wahrscheinlich, daß diese Eigenschaft der sogenannten „Baumwollfarbstoffe“ zum Teil auf der Unlöslichkeit ihres Kalksalzes beruht. Es kommt allerdings ein zweites Moment hinzu. Die Lösungen der Benzidinfarbstoffe werden durch Elektrolyte sehr leicht ausgeflockt und geben leicht mehr oder weniger kolloidale Lösungen, sie gehen z. B. nicht durch Ultrafilter. Diese Farblösungen nähern sich daher, wenn sie nicht ganz elektrolytfrei gelöst sind, sehr den Suspensionen, und wir werden in einer folgenden Arbeit zeigen, daß diese, ebenso wie z. B. Bakteriensuspensionen, allerdings von allen Oberflächen, auch von der Cellulose, in hohem Maße

In Anbetracht des Umstandes, daß für die Adsorption der Farbstoffe die Aschenbestandteile der Cellulose als verantwortlich erwiesen wurden, könnte man nun auch meinen, daß die oben beschriebene, außerordentlich geringfügige Adsorption des Octylalkohols auch durch die Silicate der Asche bewirkt wird. Dies scheint um so näher zu liegen, als gerade manche Silicate (Talk) Adsorptionsvermögen gegen oberflächenaktive Stoffe besitzen, wie wir früher zeigten. Das ist aber uns nicht wahrscheinlich. Denn die Silicate sind für Farbstoffe gute, für oberflächenaktive Stoffe aber sehr schlechte, mit Ausnahme des Talkes sogar ganz außerordentlich schlechte oder sogar gar keine Adsorptionsmittel; es wäre nicht zu erwarten, daß die Spuren von Silicaten im Filtrierpapier ausreichen, um Octylalkohol zu adsorbieren; wohl aber reichen sie sicher aus um Methylenblau zu adsorbieren. Ferner läßt sich zeigen, daß sogenanntes aschefreies und gewöhnliches Filtrierpapier oder Baumwolle sich gegen Octylalkohol trotz verschiedenen Aschegehaltes ganz gleich verhält; dagegen nimmt gewöhnliches Filtrierpapier z. B. Eosin oder Diaminechtrot wesentlich stärker an als aschefreies Papier. Wenn auch das Adsorptionsvermögen der Cellulose für oberflächenaktive Stoffe wirklich in unerwartetem Maße winzig ist, so scheint es doch der Cellulose selbst, und nicht ihren Aschebestandteilen anzuhaften.

Das Gesamtergebnis ist also: Adsorptionsvermögen der Cellulose gegenüber oberflächenaktiven Nichtelektrolyten ist praktisch so gut wie nicht vorhanden; nur gegen die alleroberflächenaktivsten Stoffe läßt sich soeben eine Spur Adsorption nachweisen, dies allerdings sicher. Das viel bessere Adsorptionsvermögen der Cellulose gegen Farbstoffe dagegen haftet ganz an den Aschebestandteilen der Cellulose.

Experimenteller Teil.

1. Die Cellulose. Als Cellulose wurden aschefreie Filter von Schleicher & Schüll Nr. 589, 11 cm Durchmesser, angewendet.

adsorbiert werden. Wir betonen also nochmals, daß die von uns für die Adsorption echt gelöster Stoffe erhaltenen Resultate nicht ohne weiteres auf die Adsorption von Kolloiden, besonders aber Suspensionskolloiden, übertragen werden dürfen. Über diese folgt eine weitere Untersuchung.

Der Aschegehalt eines etwa 0,57 g schweren Filters ist mit 0,12 mg angegeben, erwies sich aber bei der Bestimmung als etwas höher (2- bis 3mal soviel). Das Papier gibt an Wasser keine bemerkbaren Mengen Chlor ab. In jedem Versuch wurden zu je 7 (bzw. 10) Blatt dieses Papiers 10 ccm (bzw. 15 ccm) Lösung genommen; das Papier wurde wiederholt mit der Lösung gut durchgeknetet und zum Schluß ausgepreßt. Die Finger, mit denen das Papier und die Lösung berührt wurde, wurden bei den Chlorversuchen mit Gummiüberzug geschützt, da sonst beim Auspressen des Papiers mit der Hand meßbare Mengen Chlor in Lösung gingen. Das Papier wurde teils direkt, teils nach 3maligem Auskochen mit destilliertem Wasser und nachträglicher Trocknung angewendet; das Resultat änderte sich dadurch nicht.

Ferner wurde gewöhnliches Filtrierpapier und entfettete Baumwolle verwendet.

A. Versuch mit Methylblau.

2. Die Bestimmung der $[H^+]$ geschah mit einer kleinen Elektrode, die die ständige Durchleitung von Wasserstoff gestattete. Eine solche Methode ist für den vorliegenden Zweck einer Methode mit stehender Wasserstoffatmosphäre, sei es mit oder ohne Schaukeln, vorzuziehen; denn die Austreibung von Spuren CO_2 ist für den vorliegenden Zweck nur erwünscht.

Eine $m/_{500}$ -Lösung von Methylblau ergab in 3 Versuchen $p_H = 4,30, 4,22, 4,21$. Im Mittel $[H^+] = 5,75 \cdot 10^{-5}$. (Hieraus berechnet sich die Hydrolyse der $m/_{500}$ -Methylblaulösung zu 2,9%)

10 ccm $m/_{500}$ -Methylblaulösung werden mit 7 Filtern wiederholt durchgeknetet und ausgepreßt. Die ausgepreßte Flüssigkeit ergibt $p_H = 4,99, 4,57, 4,81$; im Mittel $[H^+] = 1,6 \cdot 10^{-5}$. Die Lösung ist also nicht saurer geworden nach der Adsorption, sondern hat sogar eine Spur von Acidität verloren.

Bei Annahme hydrolytischer Adsorption war in dem ausgepreßten Saft, der nur noch 5% des angewendeten Methylblau enthielt, zu erwarten:

$$[H^+] = 1,90 \cdot 10^{-5} n.$$

Es wurden aber gefunden: $[H^+] = 1,6 \cdot 10^{-5} n$. und die Methylblaulösung hatte vorher $[H^+] = 5,75 \cdot 10^{-5} n$.

Gesamtergebnis: Die $[H^+]$ der Methylenblaulösung ist nach ihrer fast völligen Erschöpfung durch Filtrierpapier nicht größer geworden, eher noch um einen ganz kleinen Betrag kleiner. Es ist also sicher keine freie HCl entstanden. Andererseits kann man aus der geringen Abnahme der $[H^+]$ nichts Sicheres schließen; es handelt sich um so geringe Unterschiede, wie sie in so pufferfreien Lösungen durch irgendwelche Spuren von Verunreinigungen aus dem Filtrierpapier, vielleicht sogar durch die Unsicherheit der Messung entstehen können. Wenn es zutrifft, daß diese Acidität ganz aus der Hydrolyse des Methylenblausalzes hervorgeht, so ist die Abnahme sogar dadurch zu erklären, daß die $[H^+]$ in der 20fach dünneren Methylenblaulösung nach der Adsorption geringer sein muß als in der stärkeren Lösung vor der Adsorption.

Bestimmung des Chlorgehalts.

Gemessen wurde die Konzentration der Chlorionen mit Hilfe einer Konzentrationskette mit der Kalomelektrode. Auf der einen Seite befand sich eine 0,1 n-Lösung von KCl, auf der anderen Seite die Farbstofflösung. Die Elektrode für die Farblösung war in besonders kleinen Maßverhältnissen, mit einem Fassungsraum von wenig über 1 cm Flüssigkeit, sonst wie gewöhnlich. Das Kalomel wurde mit Hg verrieben aufbewahrt, und eine kleine Probe vor dem Gebrauch etwa 10 mal mit großen Mengen destilliertem Wasser und dann 3 mal mit der zu untersuchenden Lösung ausgewaschen. Zahlreiche Kontrollversuche an Lösungen mit bekanntem Gehalt an KCl ergaben, daß, wenn das Kalomel gut ausgewaschen wurde, das Potential sich mit einer Abweichung meist von nicht mehr als 1, eventuell 2 Millivolt von dem erwarteten Wert schnell einstellte.

Diese elektrometrische Chlorbestimmung wurde gewählt, 1. weil sie die Cl-Bestimmung direkt in der gefärbten Lösung ohne Veraschung gestattete, 2. weil bei den außerordentlich kleinen Cl-Konzentrationen unserer Lösungen die Titrationsmethoden kaum zum Ziele geführt hätten, nicht einmal in Form der Mikromethoden. Die Kalomel-Konzentrationskette wurde schon mehrfach angewendet; bezüglich der Technik

verweisen wir auf Manabe und Matula¹⁾. Die Verbindung zwischen den Elektroden wurde folgendermaßen hergestellt. Die Ausflußöffnung jeder der beiden Elektroden tauchte je in eine Lösung, die dieselbe Flüssigkeit enthielt wie die zugehörige Elektrode. Diese beiden Lösungen wurden durch einen engen Glasheber verbunden, der mit gesättigter KCl-Gallerte gefüllt war, hergestellt durch Verkochen von 40 g KCl auf 100 ccm Wasser + 3 g Agar. Die Berechnung ist dieselbe wie bei der H-Konzentrationskette. Die $[Cl^-]$ der 0,1 n-KCl-Lösung (in der Ableitungselektrode) wurde = 0,0864 n angenommen.

Probeanalysen.

1. Cl-Gehalt in einer Cl-freien Lösung von KNO_3 .

0,1 m-Lösung von KNO_3 (pro analysi Kahlbaum) gibt gegen die Dezinormal-Kalomel-Elektrode bei 18° EMK = 234,7 Millivolt. Folglich ist

$$p_{Cl} = \frac{234,7}{57,7} + p_{Cl} \text{ der } 0,1 \text{ m-KCl-Lösung}$$

$$= 4,067 + 1,063 = 5,130$$

$$[Cl^-] = 7,42 \cdot 10^{-6}$$

Da der Dissoziationsgrad des Cl in dieser Lösung derselbe sein muß wie in einer 0,1 m-KCl-Lösung, d. h. 0,864, so berechnet sich daraus der Gesamt-Cl-Gehalt = $8,57 \cdot 10^{-6}$.

In einer zweiten Probe von 0,01 m- KNO_3 ergab sich $[Cl^-] = 6,9 \cdot 10^{-6}$. Hieraus erkennen wir folgendes: 1. Die $[Cl^-]$ hat sich bei der Verdünnung der KNO_3 -Lösung um das 10fache kaum geändert. Der Cl-Gehalt ist also nicht oder jedenfalls nicht allein als eine Verunreinigung des KNO_3 zu betrachten, sondern stammt aus dem Kalomel und stellt die eigene Löslichkeit des Kalomels sowie die etwa durch Auswaschen nicht entfernten Verunreinigungen derselben dar. Wir können daraus entnehmen, daß mit unserer Methodik Cl-Konzentrationen, die unter 10^{-5} liegen, nicht mehr genau bestimmt werden können.

2. Eine Lösung, die im Liter 0,1 Mol KNO_3 und $1,00 \cdot 10^{-4}$ Mol KCl enthält, ergibt bei 18,5° gegen die dezinormale Kalomel-Elektrode eine EMK = 175,5 Millivolt. Folglich ist

¹⁾ Diese Zeitschr. 52, 369, 1918. Zu unserem Bedauern ist uns infolge erklärlicher äußerer Verhältnisse die Arbeit von W. E. Ringer (Zeitschr. f. physiol. Chem. 95, 195, 1915) entgangen, in der eine Cl-Konzentrationskette sehr genau beschrieben wird. (Anmerkung bei der Korrektur.)

$$P_{Cl} = \frac{175,5}{57,8} + 1,063 = 4,099,$$

$$[Cl'] = 7,96 \cdot 10^{-5},$$

$$\text{Gesamt-Cl} = [Cl'] : 0,864 = 9,21 \cdot 10^{-5},$$

$$\text{erwartet} = 10,00 \cdot 10^{-5},$$

$$\text{Fehler} = 7,9\%.$$

3. Eine Lösung, bestehend aus 5 ccm 2fach m-KNO₃, 0,56 ccm 0,1 m-KCl, Wasser auf 100 ccm, ergibt bei 18,5° EMK = 129,7 Millivolt. Folglich ist

$$P_{Cl} = \frac{129,7}{57,8} + 1,063 = 3,307,$$

$$[Cl'] = 4,93 \cdot 10^{-4},$$

$$\text{Gesamt-Cl} = 5,70 \cdot 10^{-4},$$

$$\text{erwartet} = 5,60 \cdot 10^{-4},$$

$$\text{Fehler} = +1,8\%.$$

4. 7,5 ccm m-KCl + 5 ccm 2fach m-KNO₃, Wasser auf 100 ccm. Bei 20° EMK = 66,0 Millivolt.

$$P_{Cl} = \frac{66,0}{58,1} + 1,063 = 2,199,$$

$$[Cl'] = 6,33 \cdot 10^{-3},$$

$$\text{Gesamt-Cl} = 7,32 \cdot 10^{-3},$$

$$\text{erwartet} = 7,50 \cdot 10^{-3},$$

$$\text{Fehler} = 2,4\%.$$

Wir sehen aus diesen Kontrollanalysen, daß Cl-Bestimmungen bis etwa zu 10⁻⁵ m allen Anforderungen genügen. Für die Durchführung der Analyse sind bei Anwendung unserer Mikroelektrode zur Ausführung der Analyse einschließlich des Waschens des Kalomels 5 ccm reichlich genug. Diese enthalten bei 10⁻⁵ fach molarer Konzentration 0,0018 mg Cl. Cl-Mengen dieser Größenordnung können wir also mit einer Genauigkeit von einigen Prozenten des Gesamtwertes noch gut bestimmen.

a) Direkte Chlorbestimmung in $\frac{m}{1500}$ -Methylenblaulösung.

$$\text{Versuch 1: } [Cl'] = 2,03 \cdot 10^{-3},$$

$$\text{ " 2: } [Cl'] = 1,92 \cdot 10^{-3},$$

$$\text{ " 3: } [Cl'] = 1,88 \cdot 10^{-3},$$

$$\text{ " 4: } [Cl'] = 1,75 \cdot 10^{-3}.$$

¹⁾ Nach Zusatz von $\frac{1}{10}$ Vol. 0,1 n-KNO₃-Lösung gemessen; Cl'-Wert auf die ursprüngliche Konzentration des Methylenblaus umgerechnet.

Zu erwarten bei Annahme totaler Dissoziation des Methylenblau $2,00 \cdot 10^{-3}$. Hieraus ersieht man gleichzeitig, daß das Methylenblau ein normaler Elektrolyt und in $m/500$ -Lösung praktisch total dissoziiert ist.

b) Chlorbestimmung in dem Färbeversuch.

Auf je 10 ccm $m/500$ -Methylenblau werden 7 Filter = 4 g Filterpapier benutzt, mit der Farbstofflösung mehrmals durchgeknetet und ausgepreßt.

Versuch 1: $[Cl'] = 1,94 \cdot 10^{-3}$,

" 2: $[Cl'] = 2,00 \cdot 10^{-3}$,

" 3: $[Cl'] = 1,99 \cdot 10^{-3}$.

Der Cl' -Gehalt der Farblösung ist also unverändert geblieben, obwohl 95% des Farbstoffes durch Adsorption verschwunden sind.

7 Filter mit 10 ccm destilliertem Wasser durchgeknetet, ausgepreßt: Cl -Konzentration des ausgepreßten Wassers a) $1,2 \cdot 10^{-4}$, b) $1,6 \cdot 10^{-4}$. (Dieses sind Spuren Cl aus dem Papier und dergl.)

c) Colorimetrische Bestimmung der Farbstoffadsorption.

Anordnung der Versuche wie oben. Colorimeter nach Dubosq. Versuch 1: Die abgepreßte Lösung hat genau den Farbstoffgehalt der 20fach verdünnten Originallösung des Methylenblaus, d. h. es sind 95% des Farbstoffs adsorbiert. Versuch 2: Genau dasselbe Resultat.

B. Versuche mit Diaminechtrot-ammonium.

1. Ammoniakbestimmung in der reinen Farbstofflösung. Die Bestimmung geschah nach der Mikromethode in der Anordnung von I. Bang. Der Farbstoff wurde ohne vorherige Aufschließung mit einem Überschuß von Kalilauge in die Säurevorlage destilliert. Die analysierten Mengen waren ungefähr von derselben Größe, wie sie nachher für den eigentlichen Färbeversuch in Betracht kamen. Je 1 ccm der Farblösung entsprach in den verschiedenen Versuchen folgenden Kubikzentimetern $m/100$ -HCl: 2,00, 2,06, 1,91, 1,80, 2,04, 2,20, 2,12, 1,62, 1,74, 1,78. Im Mittel also 1,89 ccm

2. 20 ccm der auf das 5fache verdünnten Farbstofflösung wurden mit 14 Blatt Filtrierpapier wiederholt durchgeknetet und dann ausgepreßt. Es ließen sich ohne Mühe 3 bis 5 ccm Preßsaft erhalten. Auf je 5 ccm Preßsaft umgerechnet, entsprechend 1 ccm der ursprünglichen Farblösung, enthielt die Flüssigkeit in mehreren Versuchen eine NH_3 -Menge entsprechend folgenden Kubikzentimetern $\frac{\text{m}}{100}\text{-HCl}$: 2,31, 1,53, 1,34, 2,00, 1,38, 1,64. Also im Mittel 1,70 ccm; d. h. 90% der in dem Farbstoff überhaupt vorhandenen Menge.

Es fragt sich, ob wir berechtigt sind, die fehlenden 10% auf eine teilweise Äquivalentadsorption zu beziehen. Wenn wir nur bedenken, daß die Reproduzierbarkeit des Färbeversuches nicht ganz so gut ist wie die des Kontrollversuches, ferner, daß das Filtrierpapier infolge seiner Feuchtigkeit die Farblösung um etwa 3 bis 5% verdünnt, so glauben wir uns berechtigt, die bleibende Differenz von etwa 7% in Anbetracht der sehr kleinen absoluten Zahlen auf die Versuchsfehler zu beziehen.

Wir finden somit von dem Farbstoff nach der Adsorption das NH_3 praktisch ganz in der an Farbstoff fast erschöpften Lösung wieder.

Ein Versuch mit gewöhnlichem Filtrierpapier bei ganz gleichen Mengenverhältnissen ergab folgendes: Der Farbstoff wird weit stärker adsorbiert als durch „aschefreies“ Papier; die Lösung ist fast erschöpft an Farbstoff. In der hellrosa gefärbten Lösung finden sich bei gleicher Berechnung wie oben auf je 1 ccm der Originalfarblösung NH_3 entsprechend 1,67 ccm, genau wie mit dem aschefreien Papier.

3. Die colorimetrische Bestimmung des Farbstoffgehaltes in einem ganz entsprechenden Färbeversuch mit aschefreiem Filtrierpapier ergab, daß 90% des Farbstoffes adsorbiert worden sind.

Mit gewöhnlichem Filtrierpapier waren nur noch Spuren Farbstoff der Adsorption entgangen.

C. Filtrierpapier und Eosinammonium.

1. NH_3 -Bestimmung in der Eosinlösung. 5 ccm einer ungefähr $\frac{\text{m}}{500}$ -Eosinlösung enthalten NH_3 entsprechend 1,78; 1,85 ccm 0,01 n-HCl. Im Mittel 1,81.

2. Färbeversuch. 8 g gewöhnliches Filtrierpapier mit 20 ccm der obigen Eosinlösung durchgекnetet und ausgepreßt.

a) Colorimetrische Bestimmung: Es befinden sich noch 8% des Farbstoffes im Preßsaft, also 92% sind adsorbiert.

b) NH₃-Bestimmung im Preßsaft bezogen auf 5 ccm entspricht 1,63; 1,97, im Mittel 1,85 ccm NH₃. Es ist also kein NH₃ adsorbiert worden.

Genau derselbe Versuch mit aschefreiem Filtrierpapier.

a) Colorimetrische Bestimmung: Der Preßsaft enthält 33% des ursprünglichen Farbstoffes. Also sind nur 67% des Farbstoffes adsorbiert worden. In Parallelversuchen 75%, 60%.

b) NH₃-Bestimmung in ausgepreßtem Saft bezogen auf 5 ccm 1,56; 1,66 ccm $\frac{N}{100}$ -HCl entsprechend, im Mittel 1,61 ccm. Es fehlen demnach 13% NH₃ gegenüber 60 bis 75% Farbsäure.

D. Versuche mit Heptylalkohol, sekundärem Octylalkohol, normalem Octylalkohol (in wäßriger Lösung).

Einzelheiten der Versuchsanordnung wie in der vorigen Mitteilung
Tropfenzahl für reines Wasser 98.

Adsorbens g	Adsorbendum ccm	Tropfenzahl		Adsorbiert ca. %
		vor	nach	
Gewöhnl. Filtrierpapier 20,0	Heptylalkohol 50,0	121	119,5	5
" " 20,0	" 50,0	121	119,0	5
" " 20,0	" 50,0	119	119,0	0
" " 20,0	" 50,0	116	114,0	10
Cellulose 20,0	" 50,0	116	113,5	10
Baumwolle „entfettet“ 10,0	" 30,0	119	116,0	10
Gewöhnl. Filtrierpapier 20,0	s. Octylalkohol 50,0	127	123,0	10
Baumwolle „entfettet“ 10,0	" 30,0	124	119,0	20
Gewöhnl. Filtrierpapier 20,0	n. Octylalkohol 50,0	138	121,0	30
" " 20,0	" 50,0	138	122,0	30
" " 20,0	" 50,0	138	122,0	30
Baumwolle „entfettet“ 10,0	" 25,0	138	121,0	30
Filtrierpapier Schleicher & Schüll 589 . . . 10,0	" 25,0	138	121,0	30

Untersuchungen über Abwehrfermente.

Von
S. Rosenbaum.

(Aus der Chemischen Abteilung des Physiologischen Instituts
der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 29. November 1919.)

Die Methoden zum Nachweis der Fermente, die nach parentaler Zufuhr von körperfremden Substanzen beobachtet sind, haben mehrfach Beanstandung gefunden. Es erschien notwendig, einerseits die Fehlerquellen des Dialysierverfahrens zu vermeiden, andererseits den Abbau des jeweiligen Substrats durch das Ferment zahlenmäßig einwandfrei zu bestimmen.

Wir stellten uns die Aufgabe, bei Kaninchen das Auftreten von derartigen Fermenten nach Injektion von Eiweißkörpern zu untersuchen. Es kam also für unsere Zwecke darauf an, eine Methode zu finden, die den Abbau von Eiweißkörpern einwandfrei zum Ausdruck bringt. Als solche wurde die Bestimmung des Amino-N nach van Slyke¹⁾ gewählt, wie sie in ähnlichem Zusammenhang anscheinend²⁾ bereits von van Slyke³⁾, van Slyke-Vinograd-Villochur⁴⁾, Abderhalden⁵⁾, Sherman-Neun⁶⁾, Funk⁷⁾, McNeil-Kahn⁸⁾ angewandt wurde, von Sloan⁹⁾, der mit ihr in der Schwangerschaft und nach Zufuhr von Placentaraufschwemmung keine Vermehrung des proteolytischen Ferments nachweisen konnte, als nicht geeignet abgelehnt wurde.

¹⁾ van Slyke, Journ. of Biolog. Chem. 12, 275; 16, 121.

²⁾ Die Arbeiten des Auslandes waren lediglich im Referate zugänglich.

³⁾ van Slyke and Vinograd, Proc. Soc. Exp. Biol. New York 9, so. 5.

⁴⁾ van Slyke, Vinograd-Villochur, Journ. of Biol. Chem. 23, H. 1.

⁵⁾ Abderhalden, Fermentforschung Nr. 1.

⁶⁾ Sherman and Neun, Journ. of Amer. Chem. Soc. H. 33, 2199.

⁷⁾ Funk, Journ. of Biol. Chem. 26.

⁸⁾ McNeil and Kahn, Journ. of Immun. 3, H. 4.

⁹⁾ Sloan, Amer. Journ. of Physiol. 43, H. 4.

Die Apparate wurden mit verschiedenen chemisch reinen Aminosäuren wiederholt geprüft. Die Kontrollen des jeweils in der Schüttelpipette verbliebenen Flüssigkeitsgemisches ergaben mit der durch Wasserturbine erreichten Umdrehungszahl des Exzenters bei Eiweißlösungen als notwendig eine Schütteldauer von 10 Minuten. Die vollständige Absorption des NO_2 und der etwa entwickelten CO_2 in der Hempelpipette wurde immer wieder durch doppelte Ablesung gesichert. Zur Prüfung des Apparates wurde nach je 10 Bestimmungen ein blinder Versuch ausgeführt. Die ermittelte Fehlerquelle ergab $\pm 0,05$ mg Amino-N. Zur Verhinderung des Schäumens wurde bei einzelnen Versuchen Octylalkohol sekundär 1 oder Paraffinum liquidum angewandt.

Um einerseits eine etwa mögliche Hydrolyse des nicht abgebauten Eiweißes während der Reaktion anzuschließen, andererseits eine Prüfung des Abbaus auch in mehr als 2% betragenden Eiweißlösungen zu ermöglichen — das Schäumen solcher Lösungen beeinträchtigt die Genauigkeit der van Slyke-Reaktion —, wurde das Gemisch von jedesmal 1 ccm Serum oder Serumverdünnung und 2 ccm Substratlösung jeweils nach dem Verweilen im Brutschrank enteiweißt durch Neutralisation der Lösung gegen Lackmoid, Auffüllen auf das doppelte Volumen und nachfolgendes kurzes Erhitzen¹⁾. Nach der Ausfällung des Eiweißes wurde durch Zentrifuge sedimentiert, die überstehende Flüssigkeit sodann entweder sogleich zur van Slyke-Reaktion verwandt oder bis zur Anstellung der Reaktion im Eisschrank in steril gehaltenem Röhrchen aufbewahrt. Ein Vergleich desselben Zentrifugats gleich nach der Enteiweißung und nach mehrtägigem Stehen zeigte keine Vermehrung des Amino-N-Gehalts (Tabelle I, Nr. 9, 11 und 12).

Bei der Herstellung der Peptonlösung zeigte sich, daß ein sehr geringer Teil der abgewogenen Peptonmenge in Wasser nicht löslich war. Dieser minimale Niederschlag blieb in allen Versuchen unberücksichtigt. Die daraus sich ergebende Fehlerquelle für die Angabe des Prozentgehaltes an Amino-N des Peptons ist äußerst gering. Für die Resultate kommt der Fehler überhaupt nicht in Betracht, da er in allen Versuchen,

¹⁾ Röhmann, F., Phys.-Chem. Methoden. S. 81.

Tabelle I.
Vorversuche.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nr.	Blut-entnahme	Beginn der Einwirkung	Einwirkend	Substrat	Einwirkungs-dauer in Stunden	Pepton-stimmung	Pepton		Nutrose		Nor-mal-Ka-minchen ♂
							Amino-N in 2,0 ccm des Gewichtes	Amino-N in % des Peptons	Amino-N in 2,0 ccm des Gewichtes	Amino-N in % der Nutrose	
1		26. I. 1 ⁰⁰ p.	0,08 Pankrofirm	0,2 Pepton	50	28. I.	1,70	2,56	—	—	} „Nor-mal-Ka-minchen“ ♂
2			1,0 Wasser	0,2 „	50		1,1	1,65	—	—	
3			0,08 Pankrofirm	0,2 Nutrose	50		—	—	0,90	1,35	
4			1,0 Wasser	0,2 „	50		—	—	0,16	0,24	
5			0,05 Pankrofirm	2,0 10%ige Gelatine-lösung	50						
6			1,0 Wasser	2,0 10%ige Gel.-Leg.	50						
9	10. II. 4 ⁰⁰ p.	10. II. 5 ⁰⁰ p.	1,0 Serum	0,2 Pepton	48	12. II.	1,34	2,01	—	—	} Serum 0,18 mg in 2,0 ccm des Serum-NaF-Lös.-Gemisch.
10			1,0 Serum	0,2 „	48		1,00	1,51	—	—	
11			1,0 Serum	0,2 „	48	14. II.	1,42	2,18	—	—	
12			1,0 „	0,2 „	48	16. II.	1,87	2,08	—	—	
13			1,0 „	2,0 1%ige NaF-Lösung	48	12. II.	—	—	—	—	

auch den Kontrollen, gleich groß ist. Die Mengenverhältnisse von 1,0 ccm der einwirkenden Substanz bzw. deren Lösung und 2,0 ccm der Substratlösung bleiben zur Erleichterung der Vergleichsmöglichkeiten immer gewahrt. Ein Vergleich zwischen niedrigprozentigen enteiweißten und nicht enteiweißten Lösungen von Serum + Substrat erwies, daß eine Verminderung der gebildeten Aminosäuren und Polypeptide durch Adsorption bei der Ausfällung nicht stattfindet.

Die Lösungen wurden nach Möglichkeit steril behandelt. Zur Antisepsis diente Zusatz von NaF im Verhältnis 1:100. Ein Vergleich mit chloroformversetztem Reaktionsgemisch ergab, daß NaF nicht als fermentschädigend angesprochen werden konnte.

Die Einwirkungszeit betrug meist 48 Stunden. Den Brutschrank auf der konstanten Temperatur von 39 bis 40° zu halten, gelang aus äußeren Gründen — Gassperrstunden — nur annähernd. Die Menge der Versuche schließt hieraus sich ergebende Fehlerquellen aus. Eine Variation der H-Ionenkonzentration wurde durch Wechsel des Prozentgehaltes der Gemische an Eiweiß bewirkt, so daß die Übereinstimmung der Resultate nicht durch eine bestimmte, jedesmal gleiche Alkalescenz bedingt sein kann.

Die Beurteilung der Fermentwirkung nach parenteraler Zufuhr von Eiweißstoffen konnte in zweierlei Hinsicht erfolgen: Einmal durch den Vergleich mit der Einwirkung des Serums von Normaltieren, zum andern durch die Differenz des Amino-N aus Serum + Substrat, jedes für sich allein, und des Amino-N aus dem Reaktionsgemisch. Beide Methoden fanden Verwendung. Sorgfältige Untersuchung der Versuchstiere fand statt. Keines der weiblichen Tiere war belegt. Die Sektion ergab bei einem Kaninchen Coccidiosis. Trotzdem unterscheiden sich die bei diesem Tier gefundenen Resultate nicht von den anderen, ebenso vorbehandelten Kaninchen¹⁾.

Injiziert wurden Casein in durchschnittlich 0,5% iger alkalischer Lösung, Pepton Witte in meist 8% iger Lösung, Gelatine des Handels in 20% iger Lösung, jedes mehrmals zu verschiedenen Zeiten, meist am 1., 4. und 7. Tage. Die Injektion erfolgte

¹⁾ Abderhalden-Ewald, Münch. med. Wochenschr. 14, 17.

Biochemische Zeitschrift Band 108.

Tabelle
Kaninchen X, ♂.

1	2	3	4	5	6	7
Nr.	Blutentnahme	Beginn der Einwirkung	Einwirkend	Substrat	Einwirkungs-dauer in Stunden	Be-stimmungs-tag
1	18. IX. 12 ⁰⁰ m.	18. IX. 12 ⁰⁰ p.	0,1 Serum	2,0 NaF-Lösung	48	22. IX.
4			0,1 "	0,2 Pepton	48	
6			0,1 "	0,1 Casein	48	
				2. X. 12 ⁰⁰ m. 2,0 Caseinum	Hammarsten in	
11	8. X. 12 ⁰⁰ p.	8. X. 1 ⁰⁰ p.	0,1 Serum	0,2 Pepton	48	9. X.
12			0,1 "	0,1 Casein	48	
13			0,1 "	2,0 10% Gelatine	48	
15		8. X. 3 ¹⁵ p.	0,1 „inaktiv.“ Serum	0,2 Pepton	45	
16			0,1 "	0,1 Casein	45	
17			0,1 "	2,0 10% Gelatine	45	
				7. X. 1 ⁰⁰ p. 2,0 Caseinum	Hammarsten in	
				9. X. 1 ⁰⁰ p. 2,0 "	"	"
19	11. X. 12 ⁰⁰ m.	11. X. 7 ¹⁵ p.	0,1 Serum	0,1 Casein	48	16. X.
20			0,1 "	0,2 Pepton	48	
21			0,1 "	2,0 10% Gelatine	48	
22			0,1 „inaktiv.“ Serum	0,2 Pepton	48	
23			0,1 "	2,0 NaF-Lösung	48	
24			0,1 "	0,1 Casein	48	
25	18. X. 11 ⁰⁰ a.	13. X. 12 ⁰⁰ m.	0,1 Serum	2,0 NaF-Lösung	48	
26			0,1 "	0,2 Pepton	48	
27			0,1 "	0,1 Casein	48	
28			0,1 "	2,0 10% Gelatine	48	
29			1,0 Wasser	0,1 Casein	48	
30		18. X. 8 ⁰⁰ p.	0,1 „inaktiv.“ Serum	2,0 NaF-Lösung	45	
31			0,1 "	0,2 Pepton	45	
32			0,1 "	0,1 Casein	45	
52	25. X. 5 ⁰⁰ p.	25. X. 8 ¹⁵ p.	0,1 Serum	0,1 Pepton	48	27. X.
55			0,1 Normalserum	0,1 "	48	
53			0,1 Serum	0,1 Casein	48	
56			0,1 Normalserum	0,1 "	48	
				28. X. 2,0 Caseinum	Hammarsten in	
				30. X. 2,0 "	"	"
				1. XI. 2,0 "	"	"
57	1. XI. 5 ⁰⁰ p.	1. XI. 8 ⁰⁰ p.	0,1 Serum	0,1 Casein	48	6. XI.
IX. 51			0,1 Normalserum	0,1 "	48	
				28. X. 2,0 Caseinum	Hammarsten in	
				30. X. 2,0 "	"	"
				1. XI. 2,0 "	"	"
				5. XI. 2,0 "	"	"
				7. XI. 2,0 "	"	"
58	7. XI. 4 ⁰⁰ p.	7. XI. 4 ¹⁵ p.	0,5 Serum	0,1 Casein	48	11. XI.
59			0,5 „Normalserum“	0,1 Casein	48	
				11. XI. 12 ¹⁵ p. 2,0 Caseinum	Hammarsten in	
63	11. XI.	11. XI. 1 ⁰⁰ p.	0,5 Serum	0,1 Casein	—	15. XI.

II.

12 x 2,0 ccm Casein subcutan.

8		9		10		11		12		13		14	
Albumose		Casein				Serum						Gewicht g	
Amino-N in 2,0 ccm	Amino-N in % der Albumose	Amino-N in 2,0 ccm	Amino-N in % des Caseins	Amino-N in 2,0 ccm	Amino-N in 2,0 ccm	Amino-N der angewandten Menge mg							
—	—	—	—	—	0,08	0,24				2215			
1,19 mg	1,79	—	—	—	—	Serum leicht hämolytisch				—			
—	—	0,65	1,94	—	—					—			
40,0 ccm 1%iger Na ₂ CO ₃ -Lösung subcutan													
1,18 mg	1,79	—	—	—	—	—				—			
—	—	0,65	1,94	—	—	—				—			
Gelatinelösung bei 17° fest													
1,05 mg	1,57	—	—	—	—	„inaktiviert“ durch 1stündiges Erhitzen im Wasserbad				—			
—	—	0,49	1,46	—	—					—			
40,0 ccm 1%iger Na ₂ CO ₃ -Lösung subcutan													
40,0 "	"	"	"	—	—	—				—			
—	—	0,55	1,66	—	—	Serum klar				—			
1,56	2,34	—	—	—	—	—				—			
Gelatinelösung bei 17° fest													
1,34 mg	2,02	—	—	—	—	—				—			
—	—	0,49	1,46	—	0,09	0,26				—			
—	—	—	—	—	—	—				—			
1,63 mg	2,44	—	—	—	0,10	0,31				—			
—	—	0,47	1,41	—	—	—				—			
Gelatinelösung bei 17° fest													
—	—	0,26	0,74	—	—	—				—			
—	—	—	—	—	0,0	0,0				—			
1,39 mg	2,09	—	—	—	—	—				—			
—	—	0,40	1,18	—	—	—				—			
0,65 mg	1,96	—	—	—	—	—				2100			
0,64 "	1,91	—	—	—	—	—				—			
—	—	0,56	1,67	—	—	—				—			
—	—	0,65	1,94	—	—	—				—			
25,0 ccm 1%iger Na ₂ CO ₃ -Lösung subcutan													
25,0 "	"	"	"	—	—	—				2150			
25,0 "	"	"	"	—	—	—				—			
—	—	0,96	2,87	—	—	—				Caseinlösung zeigt nach 2 Tagen Fäulnisgeruch!			
—	—	1,11	3,90	—	—	—				—			
25,0 ccm 1%iger Na ₂ CO ₃ -Lösung subcutan													
25,0 "	"	"	"	—	—	—				—			
25,0 "	"	"	"	—	—	—				—			
40,0 "	"	"	"	—	—	—				2000			
40,0 "	"	"	"	—	—	—				—			
—	—	0,59	1,77	—	—	—				—			
—	—	0,59	1,77	—	—	—				—			
35,0 ccm 1%iger Na ₂ CO ₃ -Lösung subcutan													
—	—	0,49	1,46	—	—	—				—			

einmal intravenös, sonst subcutan. Zur Blutentnahme dienten die Ohrvenen nach Xylolreizung. Serum wurde durch Abstehen des Blutes im Brutschrank und nachfolgendes Zentrifugieren gewonnen. „Inaktivierung“ erfolgte durch Erhitzen im Wasserbade bei verschiedenen Temperaturen und verschiedener Erhitzungsdauer.

Die nachfolgenden Versuchsergebnisse stellen lediglich die Auswahl der charakteristischen Ergebnisse dar. Versuche, die keine Änderung der Resultate zeigen, wurden nicht in die Tabellen aufgenommen. Doch sind alle Abweichungen irgendwelcher Art, insbesondere Versuchsfehler ausdrücklich verzeichnet. (Siehe Tabelle I, S. 32.)

Der Abbau des Peptons und der Nutrose geht aus der Erhöhung des Amino-N in der van Slyke-Reaktion deutlich hervor (1 bis 4). Eine Lösung von 0,08 Pankrofirm, in 3 ccm 1%iger NaF-Lösung, 50 Stunden im Brutschrank steril gehalten, ergibt nur eine ganz mäßige Erhöhung des Amino-N-Gehaltes, die Vermehrung der Amino-N-Werte (bei 1 gegen 2 und 3 gegen 4) ist also im wesentlichen auf die Aufspaltung des Peptons und der Nutrose zu beziehen. Gelatine (5 und 6) wird durch das gleiche tryptische Ferment verflüssigt. Serum eines unvorbehandelten, männlichen Kaninchens (9) ergibt mit gelöstem Pepton nach 48 stündiger Einwirkung im Brutschrank ebenfalls eine Erhöhung des Amino-N-Gehaltes im Vergleich mit einer gleichstarken wässrigen Peptonlösung; auch diese Zunahme des Amino-N ist größer als die Summe des Amino-N aus reiner Peptonlösung (10) und reinem Serum (13) nach gleichlangem Stehen im Brutschrank unter gleicher Temperatur. Denn selbst bei Addition des beobachteten höchsten Fehlers in der van Slyke-Reaktion (0,05 mg) zur Summe des Amino-N aus den Versuchen 10 und 13 ergibt noch immer eine Differenz von $(1,34 - 0,05) - (1,0 + 0,05 + 0,18 + 0,05) = 0,01$ mg. Um diese Menge ist demnach bei Einwirkung von Serum auf Pepton der Gehalt des Gemisches an Amino-N selbst bei ungünstigster Lage des Fehlers bei Anstellung der Reaktion angestiegen. Da dieses Resultat bei nachfolgenden Versuchen mit Normalkaninchen-serum mehrfach wiederkehrte, so dürfte an der Tatsache einer die Fehlergrenze zwar kaum überragenden, aber immerhin doch vorhandenen Vermehrung der Amino-N-Werte im Serum-Peptongemisch nicht zu zweifeln sein. (Siehe Tabella II, S. 33 u. 34.)

Nach 11 Injektionen von je 2 g Casein ergibt das Gemisch von 0,5 ccm Serum mit 0,1 Casein (58) im Vergleich zum Serum eines männlichen, unvorbehandelten Kaninchens (59) keinen Unterschied im Gehalt an Amino-N. Ein nach 6 Injektionen in gleicher Weise mit 0,1 ccm Serum angestellter Versuch (57) ergab zunächst eine auffallende Zunahme des Ab-

baus, doch zeigte der gleichlaufende Kontrollversuch (9, 51) einen wesentlichen Abbau der Caseinlösung auch mit Normalserum, so daß hier nicht Abbau durch Serumferment, sondern einsetzende Fäulnis der Caseinlösung angenommen werden mußte, was 2 Tage darauf deutlich wahrnehmbare Fäulniserscheinungen in der kühl aufbewahrten Stammlösung bestätigten. Mehrmals ergaben sich auch bei anderen Versuchen ähnliche, plötzlich auftretende Abbauerscheinungen. Daß diese nicht auf Serumwirkungen zurückzuführen waren, ergab die jedesmal mitlaufende reine Substratlösung gleicher Konzentration. Ihr Amino-N-Gehalt wurde nicht jedesmal geprüft, konnte aber bei eintretender Erhöhung des Abbaus jedesmal festgestellt werden, und so bei negativem Ausfall der Kontrolle ein tatsächlicher Abbau auch in den Fällen sichergestellt werden, wo aus Beschaffungsschwierigkeiten, wie z. B. bei den Organextrakten, ein Vergleich mit „Normalserum“ oder „Normalorganextrakten“ unterbleiben mußte. Diese Kontrollen mit gleichkonzentrierter, wäßriger Lösung des Substrats haben in der Tabelle im allgemeinen keine Aufnahme gefunden.

Der Mangel an „Normalserum“ einerseits, die Möglichkeit einer Differenz der entweder schon vorhandenen oder erst nach parenteraler Eiweißzufuhr auftretenden Fermente bei den einzelnen Tierindividuen erforderte einen weiteren Vergleich, den zwischen Amino-N-Gehalt des Casein-Serumgemisches vor den Injektionen oder im Verlaufe der Injektionsperiode, oder nach den Injektionen. Auch diese Vergleiche (Stab 10) ergeben bestimmt keine Zunahme des Caseinabbaus, wohl aber eine Schwankung im Amino-N-Gehalt der Lösungen, die über die Fehlergrenze der van Slyke-Reaktion ($\pm 0,05$) hinausgeht. Ein Vergleich mit Stab 8 zeigt, daß hier noch wesentlichere Schwankungen vorliegen. Daß auch diese nicht auf vermehrte fermentative Fähigkeit des Serums zurückzuführen sind, ergibt der Vergleich mit einem Gemisch der Peptonlösung mit „inaktiviertem“ Serum, d. h. einer Serumverdünnung gleicher Konzentration, in der durch mindestens 1stündiges Erhitzen im siedenden Wasserbade die Fermente getötet werden sollten (22, 31). Da auch in diesen Versuchen der Amino-N-Gehalt gegenüber anderen Versuchen (15) wesentlich erhöht ist, so ist auch hier der Schluß zu ziehen, daß ein wesentlich erhöhter

Tabelle III.

Kaninchen IX, ♂, 5 × 2,0 Pepton subcutan.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Nr.	Blut-entnahme	Beginn der Einwirkung	Einwirkend	Substrat	Einwirkungs-dauer in Stunden	Bestimmungstag	Pepton in 2,0 ccm	Amino-N in 2,0 ccm	Amino-N in 2,0 ccm	Amino-N in 2,0 ccm	Amino-N in 2,0 ccm	Amino-N der angewandten Menge	Ge-wicht g
1	17.IX.11 ⁰⁰ a.	17.IX.1 ⁰⁰ p.	1,0 Serum	2,0 NaF-Lösung	48	22. IX.	—	1,88	—	—	0,19	0,57	2380
3			0,1 "	0,2 Pepton	48		1,25	1,88	—	—	—	—	—
5			0,1 "	0,2 Nutrose	48		—	—	0,49	0,74	—	—	—
9			1,0 Wasser	0,2 _n	48		—	—	0,48	0,72	—	—	2300
43	25 X. 4 ³⁰ p.	25. X. 8 ¹⁵ p.	0,1 Serum	29. IX. 2,0 Pepton in 25 ccm Wasser subcutan									
				6. X. 2,0 "	25 "								
				7. X. 2,0 "	25 "								
				0,1 Pepton	48	27. X.	0,64	1,91	—	—	—	—	—
				28. X. 2,0 Pepton in 14 ccm Wasser subcutan									
				80. X. 2,0 "	25 "								
				31. X. Exitus †									
45	31. X. 1 ⁰⁰ p.	1. XI. 8 ⁰⁰ p.	0,1 Serum	2,0 NaF-Lösung	48	6. XI.	—	—	—	—	0,0	0,0	2100
46			0,1 "	0,09 Pepton	48	4. XI.	0,50	1,67	—	—	—	—	—
49			0,1 Normalserum	2,0 NaF-Lösung	48	6. XI.	—	—	—	—	0,02	0,06	—
50			0,1 "	0,09 Pepton	48	4. XI.	0,54	1,79	—	—	—	—	—
53	31. X. 1. 4 ⁰⁰ p.	1. XI. 8 ⁰⁰ p.	1,0 Leberextrakt	0,09 Pepton	48	5. XI.	0,88	2,93	—	—	—	1,0 Ex-trakt	—
54			1,0 Milzextrakt	0,09 "	48		0,80	2,65	—	—	—	0,24	—
55			1,0 Pankreasextr.	0,09 "	48		0,66	2,21	—	—	—	0,09	—
												0,07	—

fermentativer Abbau des Peptons nicht stattgefunden hat, vielmehr die Zunahme des Amino-N auf beginnende Zersetzung der Stammlösung zurückzuführen ist, ein Vorgang, wie er bereits oben beschrieben und schließlich auch in diesem Versuch durch den gleichlaufenden, hier nicht besonders verzeichneten, Versuch mit reiner, gleichprozentiger Peptonlösung bestätigt wurde.

Ist so eine Zunahme der fermentativen Fähigkeit des Serums weder für Casein noch für Pepton erwiesen, so ist doch auch hier wie im Vorversuch durch die Versuche 1, 4 und 6 wahrscheinlich gemacht, daß bereits im Gemisch vom Serum des unvorbehandelten Tieres mit Casein oder Pepton eine Erhöhung des Amino-N vor sich geht, die, so gering sie an und für sich ist, wenigstens für Casein über das hinausgeht, was selbst durch ein Zusammentreffen ungünstigster Versuchsbedingungen — Summation der Fehler — zu erklären wäre:

$$(0,05 - 0,05) - (0,08 + 0,05 + 0,26 + 0,05) = 0,16 \text{ mg.}$$

(Siehe Tabelle III, S. 38).

Nach den Injektionen konnte eine Vermehrung des Fermentgehaltes im Serum nicht festgestellt werden. Das Tier wurde am Tage nach der 5. Injektion tot aufgefunden. Abgesehen von der Herabsetzung der Blutgerinnung war ein charakteristischer Obduktionsbefund nicht zu erheben. Aus Leber, Milz und Pankreas wurden Extrakte durch Extraktion mit der jeweils doppelten Gewichtsmenge einer 1%igen Fluornatriumlösung während 3 Stunden in Zimmertemperatur hergestellt. Danach wurde filtriert. Die Extrakt-Peptongemische ergaben eine deutliche Zunahme des Amino-N-Gehaltes. Bei Beurteilung der Zahlen in Stab 8 und 9 der Tabelle III ist bei Nr. 53 bis 55 freilich der erhöhte Amino-N-Gehalt des Extraktes selbst gegenüber der sonst in dieser Versuchsreihe angewandten $\frac{1}{10}$ -Serumlösung in Abzug zu bringen. Trotzdem ist der Abbau des Peptons durch die Organextrakte in die Augen fallend. Es dürfte sich um die bekannten autolytischen Fermente handeln. (Siehe Tabelle IV. S. 40.)

Das Tier war nach der Injektion stark geschädigt, zeigte Krampferscheinungen, lag auf der Seite. Es wurde deshalb 6 Stunden nach der Injektion durch Eröffnung der Vena jugularis entblutet. Ein peptolytisches Vermögen des Serums konnte

Tabelle IV
Kaninchen V, ♀. 1 × 0,2 Pepton Witte intravenös.

Nr.	Blut-entnahme	Beginn der Einwirkung	Einwirkend	Substrat	Einwirkungs-dauer in Stunden	Bestimmungstag	Pepton		Serum		Gewicht
							in 2,0 ccm Amino-N	in % des Peptons Amino-N	in 2,0 ccm	angewandten Menge	
2	11. III. 4 ⁴⁵ p.	11. III. 5 ⁰⁵ p.	0,2 Serum	0,2 Pepton	48	13. III.	1,08	1,77	—	—	2140
			11. III.	5 ¹⁰ p. 0,2 Peptonum Witte intravenös 11 ³⁰ p.	↑						
5	11. III. 11 ³⁰ p.	12. III. 1 ⁰⁰ p.	1,0 Serum	2,0 NaF-Lösung	51	15. III.	—	—	—	—	—
6			0,1 "	0,2 Pepton	51	14. III.	1,07	1,61	0,44	—	—
8			0,01 "	0,2 "	51	15. III.	1,04	1,56	—	—	—
9			1,0 "	2,0 Wasser	51	14. III.	—	—	0,42	—	—
			1,0 "	+ 1 Tropfen Toluol		14. III.	—	—	—	—	—
10			1,0 "	2,0 Wasser	51		—	—	0,28	0,85	{ Serum 30 Min. { auf 50° erhitzt
	Herstellung der Extrakte								Leberextrakt		
11	12. III. 1 ³⁰ p.	12. III. 5 ³⁰ p.	1,0 Leberextrakt	0,2 Pepton	47	15. III.	1,58	2,36	—	—	—
16			1,0 "	0,2 "	47	19. III.	1,72	2,58	—	—	{ Extrakt 30 Min. { auf 54° erhitzt
17			0,01 "	0,2 "	47	14. III.	1,20	1,80	—	—	—
12			1,0 "	2,0 NaF-Lösung	47	15. III.	—	—	0,24	0,71	—
									Pankreasextrakt		
18			1,0 Pankreasextrakt	0,2 Pepton	47	15. III.	1,17	1,77	—	—	{ Extrakt 30 Min. { auf 54° erhitzt
14			1,0 "	0,2 "	47	19. III.	1,23	1,85	—	—	—
15			1,0 "	2,0 NaF-Lösung	47	19. III.	—	—	0,06	0,19	—

nicht beobachtet werden. Dagegen zeigten auch hier Organextrakte deutlichen Fermentgehalt. Der Amino-N des Gemisches von Extrakt + Pepton war jedesmal erhöht, sobald der Extrakt vor Anstellung des Versuches 30 Minuten auf 54° erhitzt war. Ob die Vermehrung des abgebauten N auf Extrakt oder Pepton zu beziehen ist, ist zunächst nicht zu entscheiden. Im Serum selbst zeigte sich nach gleicher Prozedur eine Verdopplung des Amino-N-Gehaltes. (Siehe Tabelle V, S. 42.)

Auch hier weist das Gemisch von Serum des unvorbehandelten Tieres mit Peptonlösung gegenüber den Amino-N-Werten von Serum und von Peptonlösung für sich allein eine Zunahme auf. Ein Ansteigen des proteolytischen Fermentes nach den Peptoninjektionen tritt jedoch nicht in Erscheinung. Die Organextrakte, die hier durch 24 stündige Einwirkung von 1%iger NaF-Lösung auf die zerstückelten Organe hergestellt sind, zeigen wohl für Leber und Pankreas peptolytische Fähigkeit; doch ist diese geringer als bei den durch 3 stündige Extraktion gewonnenen Extrakten bei Kaninchen 9. Milzextrakt in der angewandten 10%igen Verdünnung weist keine fermentative Fähigkeit auf. (Siehe Tabelle VI, S. 44 u. 45.)

Kein irgendwie deutlicher Fermentgehalt des „Normalserums“, kein Abbau des Peptons nach der parenteralen Peptonzufuhr. Die Erhöhung des Amino-N-Gehaltes in den Versuchen 20 und 33 ist eine scheinbare. Stark durch Erhitzen beeinflusstes Serum gibt einen gleichen Amino-N-Gehalt im Serum-Peptongemisch. Das vermehrte Auftreten von NH_3 -Gruppen ist also auch hier auf eine beginnende Fäulnis in der Peptonlösung zurückzuführen, was sowohl ein gleichlaufender Versuch mit gleichprozentiger Peptonlösung, wie bald darauf sichtbar auftretende Zersetzung der Stammlösung noch bestätigte. Die durch 24 stündige Extraktion gewonnenen Organextrakte enthalten stark wirksames Ferment. Es hat den Anschein, als ob das Ferment auch im steril gehaltenen Extrakt selbst geringe Peptolyse im Laufe der Zeit bewirkt (54, 89, 87). Bei „Inaktivierung“ durch 1 stündiges Erhitzen mit nachfolgendem kurzen Kochen tritt eine Änderung des Amino-N-Gehaltes über die Fehlergrenze hinaus nicht ein.

Fünf weitere, mit Pepton subcutan injizierte und vielfach

Tabelle V
 Kaninchen VII, ♀. 3 × 20 Pepton subcutan.

Nr.	Blut-entnahme	Beginn der Einwirkung	Einwirkend	Substrat	Einwirkungsdauer in Stunden	Bestimmungstag	Pepton		Serum		Gewicht
							Amino-N in 2,0 ccm	Amino-N in % des Peptons	Amino-N in 2,0 ccm	Amino-N in % des Serums	
1	9. IV. 6 ⁰⁰ a.	9. IV. 12 ⁰⁰ p.	1,0 Serum	2,0 NaF-Lösung	52	11. IV.	1,84	2,01	0,06	0,24	8940
2			1,0 "	0,2 Pepton	52						
			9. IV. 7 ⁰⁰ a.	2,0 Pepton subcutan	"						
			12. IV. 6 ⁰⁰ a.	2,0 "	"						
			15. IV. 6 ⁰⁰ a.	2,0 "	"						
13	16. IV. 6 ⁰⁰ a.	16. IV. 12 ⁰⁰ m.	1,0 Serum	0,2 Pepton	48	19. IV.	1,86	2,05			
14			0,1 "	0,2 "	48		1,19	1,78			
20			0,1 "	0,2 "	48		1,10	1,64	Serumverdünnung 3 Min. gekocht		
21			0,1 "	0,2 "	48		1,10	1,65	Serumverdünnung 2 Std. erhitzt		
22	24. IV. 6 ⁰⁰ a.	24. IV. 5 ⁰⁰ p.	1,0 "	2,0 NaF-Lösung	48	28. IV.					
23			1,0 "	0,2 Pepton	48		1,82	1,97			
33			0,1 "	0,2 "	48		1,02	1,53			
34			1,0 Wasser	0,2 "	48		1,02	1,53			
									Extrakt		
35	Extrakt	4. V.	1,0 Leberextrakt	2,0 NaF-Lösung	48	8. V.			0,12	0,36	2870
36	4. V. 12 ⁰⁰ m.	5. V. 1 ⁰⁰ p.	1,0 "	0,2 Pepton	48	7. V.	1,43	2,14			
55	bis 5. V. 12 ⁰⁰ m	5. V. 2 ⁰⁰ p.	1,0 "	2,0 NaF-Lösung	48	12. V.			0,0	0,0	Extr. 1 Std. erhitzt u. gekocht
39			1,0 "	0,2 Pepton	48	10. V.	1,02	1,53			
41			0,1 "	0,2 "	48	12. V.	1,08	1,62			
45			0,01 "	0,2 "	48	12. V.	1,01	1,52			
40			1,0 Milzextrakt	2,0 NaF-Lösung	48	12. V.			0,07	0,20	
56			0,1 "	0,2 Pepton	48	12. V.	1,06	1,59			
50			1,0 "	0,2 "	48	10. V.	1,02	1,64			
51			1,0 Pankreasextrakt	2,0 NaF-Lösung	48	12. V.			0,06	0,18	
52			1,0 "	0,2 Pepton	48	10. V.	1,47	2,21			

auf Fermente geprüfte Kaninchen ergaben keine von den mitgeteilten wesentlich unterschiedlichen Resultate. (Siehe Tabelle VII, S. 46 u. 47.)

Injiziert wurde Gelatine des Handels. Geprüft wurde einmal die Einwirkung des Ferments auf Pepton, zum andern die Einwirkung auf Gelatine in 10% Lösung von Wasser mit 1% Zusatz von NaF. Bereits bei früheren Versuchen war auf die Einwirkung des Serums auf Gelatine geachtet worden. Der Aggregatzustand der Gelatinelösung machte jedoch eine Bestimmung des Aminostickstoffgehaltes im van Slyke-Apparat unmöglich. Es war deshalb in den früheren Versuchen lediglich der Aggregatzustand bei verschiedenen Temperaturen beobachtet worden. Hier erschien die Anwendung einer empfindlichen Methode notwendig. Wir wählten die Bestimmung der inneren Reibung, wie sie von Ostwald angegeben ist.

Methode.

Es wurde auf die angegebene Weise Serum gewonnen. Das erhaltene Serum wurde mit der gleichen Menge sterilen Wassers versetzt, 1 ccm der Verdünnung wurde mit 10 ccm einer 10%igen Lösung von Gelatine mit 1% NaF-Gehalt auf 48 Stunden in den Brutschrank gestellt. Der Rest der Serumverdünnung wurde 1½ Stunden im Wasserbade auf etwa 70° erhitzt. Von dieser Serumverdünnung wurde ebenfalls 1 ccm mit 10 ccm Gelatinelösung aufgestellt. 2 weitere Reageasgläser mit Gelatinelösung wurden mit gleicherweise behandeltem Serum eines männlichen, unvorbehandelten Kaninchens zum Vergleich beschriftet und gleicherweise im Brutschrank gehalten. Die Bestimmung der Durchlaufzeiten erfolgte im Wasserbad von 32° in 2 Capillaren mit einer Durchlaufzeit für destilliertes Wasser von 44 Sekunden und 55,2 Sekunden. Auf vorsichtiges Ansaugen, 15 Minuten langes Stehen nach dem Ansaugen und kräftige Durchmischung des Wassers im Bade wurde geachtet. Die Bestimmung des spezifischen Gewichtes erfolgte in üblicher Weise.

Versuchsergebnis.

Die nach der Formel $\eta = \frac{s \cdot t}{t_0}$ ermittelten Werte für die innere Reibung ergaben für das Serum des vorbehandelten Tieres gegen das unvorbehandelte kein verändertes Resultat, während für das „inaktivierte“ Serum die Werte nicht genau übereinstimmen, was vielleicht auf einen Unterschied in der Viscosität der inaktivierten Serumverdünnung zurückzuführen

Tabelle VI.
Kaninchen VI, ♂, 3 × 2,0 Pepton subcutan.

Nr.	Blut-entnahme	Beginn der Einwirkung	Einwirkend	Substrat	Einwirkungs-dauer in Stunden	Bestimmungstag	Pepton		Serum		Gewicht g
							Amino-N in 2,0 ccm des Gemischtes	Amino-N in % des Peptons	Amino-N in 2,0 ccm des Gemischtes	Amino-N in % des Serums	
1	31. III. 6 ³⁰ a.	31. III. 5 ¹⁵ p.	1,0 Serum	2,0 NaF-Lösung	47	8. IV.	—	—	0,17	0,51	1980 Serum klar
2			1,0 "	0,2 Pepton	47		1,18	1,78	—	—	
5	1. IV. 6 ⁴⁰ a.	1. IV. 7 ⁰⁰ p.	1,0 "	31. III. 7 ⁰⁰ a. 2,0 Pepton subcutan	48	4. IV.	—	—	0,08	0,10	—
6			1,0 "	2,0 NaF-Lösung	48		1,20	1,80	—	—	
9			1,0 Wasser	0,2 Pepton	48		1,08	1,62	—	—	
10	5. IV. 6 ³⁰ a.	5. IV. 12 ⁴⁰ p.	1,0 Serum	3. IV. 6 ³⁰ a. 2,0 Pepton subcutan	52	8. IV.	—	—	0,09	0,27	—
13			0,1 "	2,0 NaF-Lösung	52		1,28	1,91	—	—	
14			0,01 "	0,2 Pepton	52		1,08	1,62	—	—	
19	7. IV. 6 ³⁰ a.	7. IV. 6 ³⁰ p.	1,0 Serum	6. IV. 6 ³⁰ a. 2,0 Pepton subcutan	48	10. IV.	—	—	0,06	0,18	—
26			0,1 "	2,0 NaF-Lösung	48		1,84	2,77	0,0	0,0	
20			0,1 "	0,2 Pepton	48		1,84	2,77	—	—	
24			0,1 "	0,2 "	48		1,95	2,93	Serum bei 80° bis zur Koagulation erhitzt. Koagula werden entfernt		—
33	14. IV. 6 ³⁰ a.	19. IV. 5 ³⁰ p.	1,0 "	0,2 "	48	17. IV.	1,90	2,85	—	—	
47			0,1 "	0,2 "	48		1,18	1,70	—	—	
50	26. IV. 6 ³⁰ a.	26. IV. 6 ⁴⁵ p.	0,1 "	0,2 "	46	29. IV.	1,05	1,58	—	—	—
58		7. V.	1,0 Wasser	0,2 "	46		—	—	—	—	

Tabelle VI (Fortsetzung).

Nr.	Blutentnahme	Beginn der Einwirkung	Einwirkend	Substrat	Einwirkungs- dauer in Stunden	Bestimmungstag	Pepton		Serum		Gewicht g
							Amino-N in 2,0 ccm des Gemisches	Amino-N in % des Peptons	Amino-N in 2,0 ccm des Serums	Amino-N in % des Serums	
54	Extrakte hergestellt durch 24stündige Extraktion mit der doppelten Gewichtsmenge 1%iger NaF-Lösung	7. V.	1,0 Leberextrakt	—	7 Tage i. Kälte	14. V.	—	—	0,27	} i. Eischr. } bewahrt.	
89		1,0 "	—	—	0	7. V.	—	—	0,24		
87		1,0 "	—	—	7 Tage in 19°	14. V.	—	—	0,62		
86		1,0 Leberextrakt, inakt.	(1 Std. erhitzt u. gekocht)	0	Zimmertemp.	14. V.	—	—	0,51		
55		1,0 Leberextrakt	0,2 Pepton	47	2,11	14. V.	8,16	} in 2,0 in 1,0 } Extrakt	}		}
59		1,0 Leberextrakt, inakt.	0,2 "	47	1,01	1. V.	1,51				
57		1,0 Leberextrakt	10% GelatineLösung	47	Lösung bei 10° noch flüssig	1. V.	—	}	}		}
58		1,0 Leberextrakt, inakt.	10% "	47	" " 20° bereits fest	1. V.	—				
72		1,0 Milzextrakt	—	0	—	15. V.	—	0,68	0,34		
73		1,0 "	0,2 Pepton	47	2,29	15. V.	—	}	}		}
75		1,0 "	0,2 "	47	14. V.	8,48					
76		1,0 "	10% GelatineLösung	47	2,31	16. V.	—	}	}		}
78		1,0 Herzmuskelextrakt	—	0	Lösung bei 10° noch flüssig	9. V.	—				
82		1,0 Herzmuskelextr., inakt.	(1 Std. erhitzt u. gekocht)	0	—	14. V.	—	0,19	0,09		
89	1,0 Herzmuskelextrakt	0,2 Pepton	47	1,95	14. V.	—	0,11	0,06			
83	1,0 Herzmuskelextr., inakt.	0,2 "	47	1,12	—	—	—	—			

Tabelle
Kaninchen 8,
40 g Gelatine in 3 Injektionen

Nr.	Blut-entnahme	Beginn der Einwirkung	Einwirkend	Substrat	Einwirkungsdauer in Stunden
5	24. VI. 6 ⁰⁰ a.	24. VI. 5 ⁰⁰ p.	0,2 Serum	2,0 ccm 10%ige Gelatinelösg.	48
6			1,0 Wasser	2,0 " 10%ige "	48
21	8. VII. 10 ⁰⁰ a.	8. VII. 6 ⁰⁰ p.	1,0 Serum	0,2 Pepton	48
22			1,0 Wasser	0,2 "	48
26			1,0 "	2,0 ccm 10%ige Gelatinelösg.	48
27			1,0 Serum	2,0 " 10%ige "	48
				4. VII. 20,0 Gelatine	
28	5. VII. 10 ⁰⁰ a.	5. VII. 6 ⁰⁰ p.	1,0 Serum	0,2 Pepton	48
29			1,0 Wasser	0,2 "	48
32			1,0 Serum	2,0 ccm 10%ige Gelatinelösg.	48
33			1,0 Wasser	2,0 " 10%ige "	48
				7. VII. 10,0 Gelatine	
36	8. VII. 5 ⁰⁰ p.	8. VII. 6 ⁰⁰ p.	0,5 Serum	0,2 Pepton	48
37			1,0 Wasser	0,1 "	48
40			0,5 Serum	2,0 ccm 10%ige Gelatinelösg.	48
41			1,0 Wasser	2,0 " 10%ige "	48
				10. VII. 10,0 Gelatine	
43	12. VII. 12 ⁰⁰ m.	12. VII. 1 ⁰⁰ p.	1,0 Serum	0,2 Pepton	48
44			1,0 "	0,2 "	48
47			0,5 "	10 ccm 10%ige Gelatinelösg.	48
48			0,5 "	10 " 10%ige "	48
53			0,5 Normalserum	10 " 10%ige "	48
54			0,5 "	10 " 10%ige "	48

sein könnte. Kontrollen mit Serum allein konnten nicht vorgenommen werden. Ein Auftreten von Gelatinase oder eine Vermehrung eines etwa schon vor den Injektionen vorhandenen gelatinolytischen Ferments im Serum des mit Pepton injizierten Tieres ist jedenfalls durch den Vergleich mit „Normalkaninchen-serum“ nicht nachgewiesen worden.

VII.

von 10%iger Lösung subcutan.

Bestimmungs- tag	10%ige Gelatinelösung + Serum	Pepton		Bemerkungen
		Amino-N in 2,0 ccm des Gemisches B/g	Amino-N in % des Peptons	
26. VI.	bei 21° fest	—	—	Gewicht: 3690 g.
	" 21° "	—	—	
7. VII.		1,18	1,78	
		1,01	1,51	
	bei 21° fest	—	—	
	" 21° "	—	—	
in 20%iger Lösung subcutan				
8. VII.		1,16	1,74	
		0,98	1,46	
	bei 21° fest	—	—	
	" 21° "	—	—	
in 20%iger Lösung subcutan				
12. VII.		1,25	1,88	
		0,10	1,50	
	bei 21° fest	—	—	
	" 21° "	—	—	
in 20%iger Lösung subcutan				
14. VII.		1,28	1,84	Serum 1½ Std. scharf erhitzt.
		1,22	1,84	
	$\eta = \frac{1,362 \cdot 359,8}{44,0} = 11,138$	—	—	
	$\eta = \frac{1,341 \cdot 355,0}{44,0} = 10,819$	—	—	Serum 1½ Std. erhitzt.
	$\eta = \frac{1,335 \cdot 460,2}{55,2} = 11,130$	—	—	
	$\eta = \frac{1,350 \cdot 445,0}{55,2} = 10,883$	—	—	Serum 1½ Std. erhitzt.

Zusammenfassung.

Nach wiederholten Injektionen von Casein und von Pepton bei 8 Kaninchen konnte ein Auftreten von spezifischen Abwehrfermenten im Serum des Kaninchens, ausgedrückt in der Zunahme des Aminostickstoffs in einem Serum-Casein- oder Serum-Peptongemisch, nicht nachgewiesen werden.

Durch Bestimmung der inneren Reibung konnte nach Injektion von Gelatine bei einem Versuchstier das Auftreten von Gelatinase nicht beobachtet werden.

Dagegen scheint bei der Einwirkung von normalem Kaninchenserum auf Pepton und Casein eine Zunahme des Amino-N regelmäßig einzutreten. Ob diese Zunahme Ausdruck einer fermentativen Spaltung im Serum oder im Substrat ist, kann zunächst nicht entschieden werden.

Regelmäßigkeit, Ort und Beeinflußbarkeit dieses Abbaus sollen in weiteren Versuchen geprüft werden.

Die Untersuchungen sind auf Veranlassung von Herrn Prof. Röhmann ausgeführt, der sie leitete, bis ein plötzlicher Tod ihn vor Abschluß der Arbeit hinwegraffte.

Ein Thermostat mit elektromagnetischer Reguliervorrichtung und elektrischer Heizung.

Von
G. Joachimoglu.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 29. November 1919).

Mit 4 Figuren im Text.

Die durch die Kohlennot notwendig gewordene zeitweilige Herabsetzung des Druckes in den Röhren der städtischen Gasleitung hat für die Laboratoriumspraxis einige Schwierigkeiten gezeitigt. Diese wurden als ganz besonders störend empfunden im Betriebe der Brutschränke und Thermostaten, die ja fast ausschließlich durch Gas gespeist werden. Bei Versuchen mit isolierten Organen von Säugetieren hängt das Gelingen des Versuches zum größten Teil von der Zuverlässigkeit der zur Konstanthaltung der Temperatur getroffenen Versuchsanordnungen ab. Da uns während der Gassperrstunden die Ausführung derartiger Versuche bei den mit Gasheizung versehenen Thermostaten fast unmöglich war, so haben wir versucht, elektrische Heizung anzuwenden, und ich habe nach vielen mißlungenen Versuchen in Gemeinschaft mit dem Mechaniker des Instituts, Herrn Uhlig, eine Apparatur zusammengestellt, die sich für unsere Zwecke außerordentlich gut bewährt hat und die ich in folgendem kurz beschreiben möchte.

In einen mit destilliertem Wasser gefüllten Aluminiumtopf, dessen Durchmesser 20 cm und dessen Höhe 12 cm beträgt, wird der Heizkörper *F* versenkt, der, wie die Fig. 1 zeigt, aus einer Porzellanplatte¹⁾ ($12\frac{1}{2} \times 12\frac{1}{2}$ cm)

¹⁾ Die Staatliche Porzellanmanufaktur in Berlin hat eine Anzahl Heizplatten für das Institut angefertigt, und wir sind bereit, sie Interessenten zum Selbstkostenpreise abzugeben.

besteht, um die eine etwa 5,5 m langer, 0,15 mm dicker Platindraht umwickelt ist. Der Thermoregulator¹⁾, der ebenfalls in

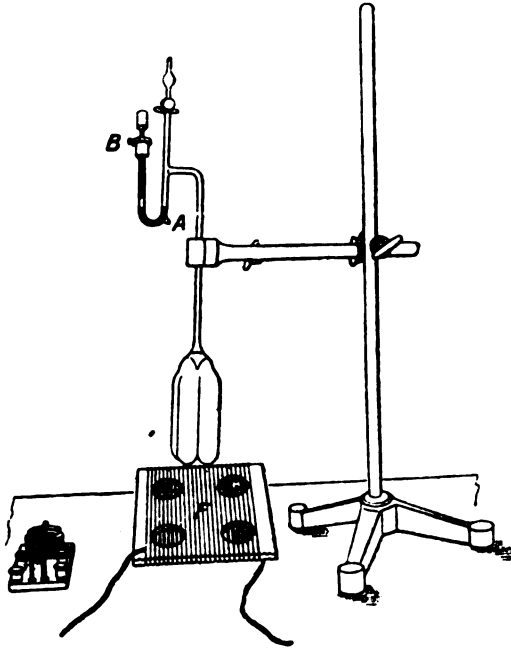


Fig. 1.

das Wasserbad kommt, hat die Form des gewöhnlichen Thermoregulators für Gasheizung und wird mit Toluol gefüllt. Das eine Ende seines U-Rohres ist mit einem Glashahn verschließbar. In das andere Ende kommt ein Metallstift *G*, der durch ein Gewinde in der Mitte der Metallkappe *B* verschieblich ist. Weiter gehört zum Apparat der in Fig. 2 wiedergegebene Unterbrecher²⁾, dessen Konstruktion äußerst

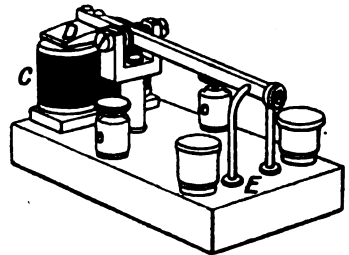


Fig. 2.

¹⁾ Wurde von Bleckmann & Burger, Berlin N 24, Auguststr. 3a, nach unseren Angaben angefertigt.

²⁾ Der Apparat kann von dem Mechaniker des Instituts, Herrn Uhlig, bezogen werden.

einfach ist. Im unteren Teil des U-Rohres befindet sich Quecksilber, und an der Stelle *A* (vgl. Fig. 3) ist ein Platindraht eingeschmolzen.

Der im Wasser befindliche Heizkörper *F* wird nun mit der Starkstromleitung verbunden. Das Wasser wird durch die dabei entwickelte Wärme geheizt, und gleichzeitig entsteht Elektro-

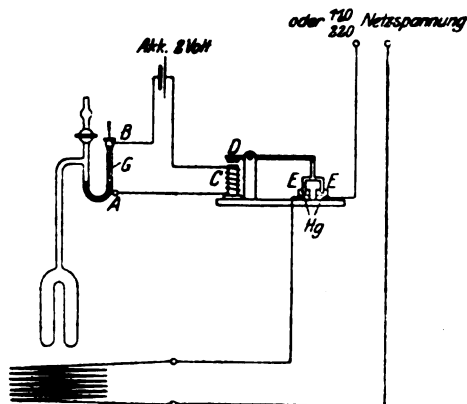


Fig. 3.

lyse, die sich als sehr vorteilhaft erwiesen hat, da durch die Gasperlen eine gleichmäßige Verteilung der Wärme im Thermostaten stattfindet. Zu diesem Zweck hat man ja bei anderen Apparaten ein besonderes Rührwerk angebracht. Sobald das Wasser im Thermostaten die gewünschte Temperatur erreicht hat, wird der Glashahn des Thermoregulators geschlossen, eine weitere Steigerung und damit Ausdehnung des Toluols im Thermoregulator verdrängt das Quecksilber im U-Rohr, dadurch wird in dem Augenblick, wo das Quecksilber den Stift *G* erreicht hat, der Magnet *C* des Unterbrechers, der von einem Akkumulator gespeist wird, magnetisch, der Hebel *D* wird angezogen und dadurch die in zwei Quecksilbernäpfchen eintauchenden Metallstifte *E* aus dem Quecksilber herausgezogen, wodurch die Stromzuführung zu dem Heizkörper *F* unterbrochen wird. Kühlt sich das Wasser im Thermostaten ab, so kehrt das Quecksilber im U-Rohr in seine ursprüngliche Lage zurück, dadurch wird der Schwachstromkreis wieder unterbrochen, so daß eine automatische Schließung des Starkstromkreises erfolgt.

Es ist darauf zu achten, daß das Quecksilber in dem U-Rohr absolut sauber bleibt. Bei Verunreinigung oder bei Quecksilberniederschlägen an der Wandung des Rohres, erhält man unsaubere Kontakte, wodurch die Regulierung selbstverständlich eine mangelhafte ist.

Wie genau der Apparat arbeitet, zeigt Fig. 4, die eine Temperaturkurve eines mit dem Apparat während drei Stunden erwärmten Wasserbades wiedergibt. Wie man sieht, kann die Temperatur bis auf $\frac{1}{10}$ Grad konstant gehalten werden.

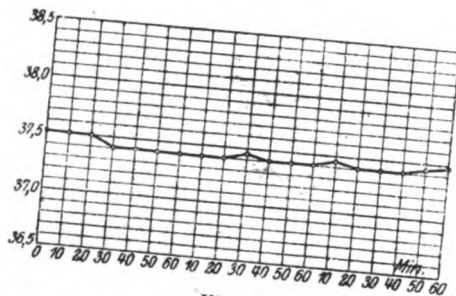


Fig. 4

Will man sich mit einer größeren Regulierung begnügen, so kann man statt des beschriebenen Heizkörpers, der in das Wasser versenkt wird, eine Heizplatte für elektrische Heizung benutzen. Solche Kochplatten finden auch im Haushalt vielfach Anwendung. Die Temperaturschwankungen des Wasserbades, das man auf die Platte stellt, betragen freilich bei einer derartigen Versuchsanordnung 1,0 bis 1,5°.

Über die Analyse des CO_2 -Gleichgewichts im Blute nach H. Straub und K. Meyer.

Von

Leonor Michaelis.

(Eingegangen am 29. November 1919.)

In einer Reihe von Arbeiten haben H. Straub und K. Meyer¹⁾ Untersuchungen über die Bindungsfähigkeit des Hämoglobins für CO_2 angestellt und die Blutgasanalyse zum Studium des Ionengleichgewichts auf Grund der Arbeitsweise von Hasselbalch²⁾ benutzt. Die Resultate der Gasanalyse und die Berechnung des Ionengleichgewichts werden durch eine Überlegung verknüpft, die auf folgendem Grundversuch (in schematischer Beschreibung) beruht.

Gegeben sei eine Lösung von Hämoglobin, die ein wenig NaHCO_3 enthält. Dieser Lösung werden steigende Mengen CO_2 zugefügt und Schritt für Schritt die freie und die gebundene CO_2 bestimmt. Trägt man nun die freie CO_2 auf die Abszisse, die gebundene CO_2 auf die Ordinaten ab, so erhält man eine Kurve, die zunächst in einem sanften Bogen sich erhebt; an einem bestimmten Punkt entsteht ein Knick, der Verlauf wird plötzlich steiler und auf eine Strecke geradlinig; nach einer gewissen Strecke, deren Länge von der gesamten Menge des Hämoglobins abhängt, wird der Anstieg unter erneuter Knickbildung wieder flacher.

Von diesem besonderen Stück der Kurve, dem „Knick“, stellten die Verfasser nun folgendes fest. Zieht man vom O-Punkt des Koordinatensystems eine Schar gerader Linien, so

¹⁾ Diese Zeitschr. 89, 156; 90, 305, 1918; 98, 205 und 228, 1919.

²⁾ Diese Zeitschr. 78, 112, 1916.

verbindet jede einzelne Linie die Punkte, für die das Verhältnis von freier CO_2 zu gebundener CO_2 , das gleiche ist. Da nun λ diesem Verhältnis proportional ist¹⁾, so verbindet eine solche Gerade auch die Punkte von gleicher λ . In diesem Sinne würde ich diese Linien als Isohydren bezeichnen. Wir wollen sie aber, um nichts vorwegzunehmen, als Isomerizanten bezeichnen, weil sie Punkte verbinden, in denen die prozentische Einteilung der gesamten CO_2 in einen freien und einen gebundenen Anteil die gleiche ist. Die Beobachtung von Straub und Meyer besteht nun darin, daß die geradlinigen Strecken (die „Knicke“) ihrer Kurven unter allen Bedingungen, d. h. unabhängig von der Menge des Hb. und der ursprünglichen Menge NaHCO_3 , stets auf einer Isomerizanten liegen, und zwar immer auf einer und derselben²⁾. Faßt man sie als Isohydre auf, so entspricht sie $p_{\text{H}} = 7,00$.

¹⁾ Ich werde von nun an „Wasserstoffzahl“ nicht mehr mit dem Symbol $[\text{H}]$, sondern λ schreiben.

²⁾ Sie ändert sich nur durch den Zusatz gewisser Elektrolyte ein wenig (St. und M., diese Zeitschr. 98, 228), bleibt aber bei konstantem Gehalt an Elektrolyten stets gleich.

Nach der Darstellung von Str. und M. verlaufen die Isohydren in ihrem ersten, praktisch kaum mehr in Betracht kommenden Teil etwas gekrümmt. Wenn ich richtig verstanden habe, beruht dieser von Str. und M. gezeichnete, gekrümmte Verlauf der Isohydren auf der Anschauung von Hasselbalch (l. c.), daß der Dissoziationsgrad des NaHCO_3 von seiner Konzentration abhängt. Diese Anschauung, die für reine NaHCO_3 -Lösungen natürlich zutreffend ist, ist sehr bedenklich bei Lösungen, in denen eine geringe Menge NaHCO_3 neben einem konstanten Überschuß von NaCl vorhanden ist. Hasselbalch setzt sich über dieses Bedenken in einer kurzen Fußnote hinweg. Nach den bisher geltenden Gesetzen kann unmöglich der Überschuß des NaCl ohne Einfluß auf den Dissoziationsgrad des NaHCO_3 sein, und dieser Einfluß ist wahrscheinlich derart, daß der Dissoziationsgrad des NaHCO_3 nur von der Gesamtkonzentration der Na^+ -Ionen abhängt, also durch Zugabe oder Wegnahme freier CO_2 im Blut nicht merklich geändert wird. Die Isohydren sollten also als gerade Linien gezeichnet werden.

Bei dieser Gelegenheit möchte ich auch darauf hinweisen, daß Hasselbalch in nicht üblicher Weise unter der Dissoziationskonstante der Kohlensäure den Wert $\frac{\frac{1}{2}[\text{CO}_2]}{[\text{H}][\text{HCO}_3']}$ versteht, während gewöhnlich der Wert $\frac{[\text{CO}_2]}{[\text{H}] \cdot [\text{HCO}_3']}$ darunter verstanden wird. Praktisch wird seine Methode dadurch nicht beeinflußt.

Ich benutze auch die Gelegenheit, darauf hinzuweisen, daß Hasselbalch mir irrtümlicherweise zuschreibt, ich hätte ein Gemisch von

Aus dieser Beobachtung schließen die Verfasser folgendes. Mit steigendem Zusatz von CO_2 wird h zunächst vermehrt. Sobald h den Wert $1,0 \cdot 10^{-7}$ erreicht, wird alle weiter zugefügte CO_2 in dem Maße vom Hämoglobin gebunden, daß sich das Verhältnis von freier CO_2 : HCO_3' nicht ändert. Die Kurve muß also jetzt auf einer Isomerizenten verlaufen, im Sinne der Autoren daher auch auf einer Isohydre. Sobald alles Hb. mit 1 Mol. CO_2 abgesättigt ist, verläßt die Kurve die Isomerizente wieder und h steigt. Das Wesentliche ist also die Annahme, daß h sich während des Knickes nicht ändert.

Diese Anschauung stellen sie in Fig. 2¹⁾ in einer anderen Weise graphisch dar. Die Abszisse ist p_{H} , die Ordinate das Verhältnis von freiem undissoziiertem Hb. zu dem gesamten Hb. Die Kurve verläuft dann bis $p_{\text{H}} = 7,00$ unmittelbar auf der Abszisse und steigt dann in rechtwinkligem Knick plötzlich bis zu ihrem Maximalwert 1 in die Höhe. Sie meinen nun, daß dies ganz gegen die Erwartung sei. Sie hatten nämlich erwartet, daß diese Kurve den Verlauf der von mir berechneten Dissoziationsrestkurve eines Ampholyten²⁾ hätte nehmen sollen. Da nun diese auf Grund des Massenwirkungsgesetzes berechnet ist, so schließen sie aus ihrem Befund, daß die Dissoziation des Hb. nicht nach der Regel des Massenwirkungsgesetzes vor sich geht. Sie schließen daraus, daß die elektrische Ladung des Hb. (d. h. das Verhältnis der Hb.-Ionen zum gesamten Hb.) mit steigender h nicht allmählich ansteigt, sondern sprunghaft von 0 auf den Maximalwert steigt. Als Ursache für diese Unstetigkeit betrachten sie die kolloidale Natur des Hb., ohne eine nähere Erklärung dafür geben zu können.

Diese Überlegungen erscheinen mir nicht in vollem Umfange zutreffend. Es sind nämlich die Bedingungen, unter denen meine Dissoziationsrestkurve gilt, hier nicht gegeben. Diese Bedingungen waren nämlich folgende. Z. B.: es befinden sich in der Lösung der Ampholyt A, ferner HCl oder NaOH

CO_2 + NaHCO_3 als Modell für das Blut benutzt. Ich habe es nur als Modell für die Blutflüssigkeit benutzt. („Die Wasserstoffionenkonzentration“, 1914, S. 88). Ich hätte nur — darin hat Hasselbalch recht — gleich darauf hinweisen sollen, daß das Modell für das Vollblut weniger gut gilt als für die Blutflüssigkeit.

¹⁾ l. c. 90.

²⁾ Diese Zeitschr. 33, 182, 1911.

(oder diese beiden zusammen) in wechselnden Mengenverhältnissen, bzw. alle diejenigen Molekulgattungen, die durch Einwirkung dieser 3 Komponenten aufeinander entstehen können, also: H' , OH' , Na' , Cl' , undissoziiertes A , A' , A'' . Es wurde vorausgesetzt, daß Ampholyt-Natrium und Ampholyt-Chlorid sich wie „starke“ Elektrolyte verhalten, d. h. daß diese Salze weitgehend elektrolytisch dissoziiert sind, und daß die Molekulgattungen: undissoziiertes Ampholyt-Natrium und Ampholyt-Chlorid nicht in Betracht gezogen zu werden brauchen. Diese Voraussetzung trifft natürlich streng niemals zu.

Der Dissoziationsrest ϱ , für den die von mir entwickelten Formeln streng zutreffen, hat die Bedeutung

$$\varrho = \frac{A}{A + A' + A''}$$

Der Dissoziationsrest ϱ' , den man in der Wirklichkeit vor sich hat, wenn man den undissoziierten und ungebundenen Teil im Vergleich mit der Gesamtmenge des Ampholyten bestimmt, kann definiert werden als:

$$\varrho' = \frac{A}{A + A' + A'' + ANa + ACl + ANaCl}$$

Nur für den Fall, daß die Summe der drei letzten Glieder des Nenners verschwindend klein gegen die Summe der drei ersten ist, geht ϱ' in ϱ über. Diese Bedingung trifft nun für den von Straub und Meyer untersuchten Fall nicht zu. Das Hämoglobincarbonat ist nicht ein gewöhnlicher starker Elektrolyt. Es ist kaum denkbar, daß das Salz aus einer so schwachen Säure und so schwachen Base in hohem Grade elektrolytisch dissoziiert sein sollte.

Straub und Meyer verfahren also so, als ob die CO_2 , die sie hinzufügen, in der Lösung sich nur als CO_2 (bzw. H_2CO_3) und HCO_3' vorfinde. Von $p_H = 7,00$ an aber kommt ja sicher dazu noch undissoziiertes Hb.-Carbonat. Die Isomerizonten stellen aber die Orte dar, an denen $\frac{CO_2}{HCO_3' + \text{Hb.-Carbonat}}$ gleich ist, während die Isohydren Orte sind, an denen $\frac{CO_2}{HCO_3'}$ gleich ist. Sobald also durch gesteigerte k das Hb. überhaupt bindungsfähig für CO_2 wird, d. h. sobald es nicht mehr allein als Anion

zugegen ist, sind die Isomerizonten keine Isohydren mehr, d. h. p_{H} ist während des Knickes, der auf einer Isomerizonten verläuft, nicht konstant. Also liegen auch in Wahrheit die verschiedenen „beobachteten“ Punkte der Fig. 2¹⁾, wenn sie wirklich eine ρ -Kurve sein soll, nicht senkrecht übereinander, sie entsprechen nicht alle dem $p_{\text{H}} = 7,00$, und der Verlauf der ρ -Kurve ist in Wahrheit nicht sprunghaft, sondern allmählich. Wie weit er sich der theoretischen ρ -Kurve nähert, ist aus den Versuchen gar nicht zu entnehmen; nur das ist sicher, daß er nicht sprunghaft ist.

Es bleibt noch zu erklären, warum diese Knicke überhaupt auf einer Isomerizonten verlaufen, warum das Verhältnis von freier CO_2 zur Summe der Bicarbonationen (d. h. NaHCO_3 + elektrolytisch dissoziiertem Hb.-Carbonat) + dem undissoziierten Hb.-Carbonat, in gewissem Bereich von der Menge der freien CO_2 unabhängig ist, wie die Beobachtung von Straub und Meyer lehrt.

Mit dieser Beobachtung offenbart sich die Tatsache, daß von der gesamten CO_2 in dem Bereich des Knickes stets der gleiche Bruchteil irgendwie gebunden wird. Eine andere Substanz, die CO_2 binden könnte, außer dem Hb., ist nicht vorhanden. Also „bindet“ während des Knickes das Hb. stets einen bestimmten gleichen Bruchteil der zugegebenen CO_2 . Teilt sich nun die hinzugefügte CO_2 in einem auch nur annähernd ähnlichen Verhältnis in freie CO_2 und Hb.-Carbonat, wie unmittelbar vor dem Knick die vorhandene CO_2 sich in freie CO_2 und Bicarbonation geteilt hatte, so sind alle Bedingungen gegeben, daß der Knick auf einer Isomerizonten verlaufen muß. Aber diese ist jetzt keine Isohydre mehr! Vielmehr umspannt dieser Knick von der p_{H} -Skala eine gewisse Stufe vor dem isoelektrischen Punkt bis zu einer Stufe in der gleichen Entfernung hinter dem isoelektrischen Punkt. Während des Knickes steigt also p_{H} von 7,00 über den isoelektrischen Punkt 6,76 bis wahrscheinlich um das gleiche Stück über denselben hinaus, also etwa bis $p_{\text{H}} = 6,53$. Am Schluß des Knickes ist danach p_{H} nicht = 7,00, wie Straub und Meyer meinen, sondern wahrscheinlich = 6,53. Natürlich wird sich bei genügend ge-

¹⁾ Straub und Meyer, diese Zeitschr. 90, 314.

nauer Messung der Knick zu einer etwas sanfteren Kurve abrunden, und man kann keinesfalls wirkliche Unstetigkeiten erwarten.

Mit dieser Darstellung ist es allerdings nicht vereinbar, wenn Straub und Meyer die (von ihnen während des ganzen Knickes für konstant gehaltene) $\lambda = 1 \cdot 10^{-7}$ als die Säuredissoziationskonstante des Hb. ansehen. Diese λ ist vielmehr der mehr oder weniger scharfe Beginn der isoelektrischen Zone, deren Mitte der isoelektrische Punkt ist.

Einige der Schlußfolgerungen, die Straub und Meyer weiterhin auf Grund ihrer Anschauungsweise aus ihren Befunden gezogen haben, bedürfen auf Grund dieser Erörterungen einer Revision. Das wertvolle Tatsachenmaterial, das sie gegeben haben, wird auch bei gründlich veränderter Deutungsweise seinen Nutzen abwerfen, wenn auch nicht in allen Stücken im Sinne der Verfasser.

Der obigen Darstellung habe ich die Anschauung zugrunde gelegt, daß die CO_2 -Hb.-Verbindung einfach ein Carbonat ist. In Anbetracht gewisser Untersuchungen von Willstaetter und Stoll (Unters. über die Assimilation der CO_2 , Berlin 1918, S. 186) könnte man in Betracht ziehen, daß die CO_2 carbaminsäureartig gebunden werde. Ich beobachtete jedoch, daß Hb. in einem Puffer aus $\text{NaHCO}_3 + \text{CO}_2$, dessen λ etwas größer als der isoelektrische Punkt des Hb. ist, kathodisch wandert. Eine Carbaminsäure müßte aber anodisch wandern. Im übrigen würde sich durch diese Annahme nichts Wesentliches an den obigen Erörterungen ändern.

Nachtrag. Will man die neue Ionenaktivitätstheorie von N Bjerrum¹⁾ anwenden, so ergibt sich folgendes. Sicherlich gehört NaHCO_3 zu den „starken Elektrolyten“, die praktisch immer total dissoziiert sind. Vielleicht gilt das auch für die Na- und Cl-Salze der Ampholyte. Dann müßte man alle diejenigen Korrekturen bei der Berechnung von ρ , die wir auf unvollständige Dissoziation dieser Salze bezogen, auf eine Änderung des „Aktivitätsfaktors“ beziehen. Es wird sich noch Gelegenheit bieten, auf diese wichtige Theorie näher einzugehen. Für die vorliegenden Betrachtungen ändert sich am Gesamtergebnis dadurch nichts.

¹⁾ Zeitschr. f. Elektrochem. 24, 321, 1918; Meddelande från k. vetenskapsakademiens Nobelinstitut 5, Nr. 15, 1919.

Beitrag zur Milchsäurespaltung durch kurzwellige Strahlen.

Von
Oskar Baudisch.

(Eingegangen am 30. November 1919.)

Vor längerer Zeit hat Neuberg¹⁾ gezeigt, daß wäßrige Milchsäurelösungen in Gegenwart kleiner Mengen mineralischer Katalysatoren (Eisensulfat, Uranylsulfat usw.) bei Besonnung Acetaldehyd abspalten. Zur Erzielung dieses Effektes genügt die geringe Eisenmenge natürlicher Mineralwässer und selbst-reflektiertes Tageslicht²⁾. Später hat Euler³⁾ mitgeteilt, daß Milchsäure in rein wäßriger Lösung durch die Strahlen einer Quarzquecksilberlampe eine Spaltung in Alkohol und Kohlensäure erleidet. (90^o/_o CO₂ und 10^o/_o eines Gemisches von CO + H₂). Diese Zerlegung findet nach Euler nur dann statt, wenn man in ganz flachen Quarzkölbchen arbeitet, die Entfernung derselben vom Leuchtrohr 5,5 cm beträgt und eine noch ungebrauchte Heraeus'sche Quarzlampe angewendet wird.

Neuberg⁴⁾, der diese Versuche wiederholte, fand bei der Bestrahlung von ⁿ/₁-Milchsäurelösung in einem 250 ccm fassenden Quarzrundkolben bei einer die Erwärmung ausschließenden Leuchtrohrentfernung von 43 cm keine CO₂-Entwicklung. Später hat Schanz⁵⁾ ähnliche Versuche angestellt und will die Resul-

¹⁾ C. Neuberg, diese Zeitschr. 13, 309, 1908; 29, 283, 1910.

²⁾ C. Neuberg, Zeitschr. f. Balneologie. 1913 und 1914.

³⁾ H. v. Euler, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 811, 1911; diese Zeitschr. 39, 410, 1912.

⁴⁾ Diese Zeitschr. 39, 158, 1912.

⁵⁾ Fr. Schanz, Arch. f. d. ges. Physiol. 170, 650, 1918; Arch. f. Ophthalmologie 96, 181, 1918.

tate von Euler bestätigt haben. Schanz, der keine genaue Versuchsanordnung angibt, führt außer CO_2 auch noch Methan an. Die genaue Orientierung über den Zerfall der Milchsäure durch kurzwellige Strahlen, war im Hinblick auf die Neubergschen Arbeiten über den Zerfall von Keto- und Oxy-säuren unter dem Einfluß von Hefe von besonderem Interesse, und so wurde eine genaue Nachprüfung der Eulerschen Angaben in Angriff genommen.

Für die Versuche diente eine noch ungebrauchte Heraeus-sche Quarzquecksilberlampe (250 Volt und 3 bis 5 Amp.). Die angewandte reine Mercksche Milchsäure wurde vorher noch über das mehrfach umkrystallisierte Zinksalz gereinigt. Eine Lösung dieser gereinigten Milchsäure wurde in vier flachen, nach Eulers Angaben von Heraeus verfertigten Quarzkölbchen verteilt, die umgekehrt wurden und in mit Quecksilber gefüllten Schalen eintauchten, so daß sich das gebildete Gas im oberen Teil der flachen Kölbchen ansammelte. Diese standen in einem Abstände von 4 bis 6 cm vom Leuchtrohr entfernt. Es begann schon nach 3- bis 4stündiger Bestrahlung eine perlende Gasentwicklung. Nach 40stündiger Belichtung wurde der Versuch unterbrochen; die Gasmengen wurden vereinigt und die eigentümlich nach alten Weinresten riechende, klare Milchsäurelösung systematisch auf Alkohol untersucht.

Der vereinigte Inhalt der vier Kölbchen wurde unter Eiskühlung mit Calciumcarbonat neutralisiert und hierauf destilliert: Destillat D. Eine Probe davon gab mit Nitroprussidnatrium und Piperidin intensive Acetaldehydreaktion. Ebenso waren die Reaktionen mit ammoniakalischer Silberlösung und die Jodoformprobe stark positiv.

Das Destillat D wurde hierauf mit 2,5 g m-Phenylendiamin¹⁾ versetzt und das Ganze am Energierückflußkühler 1 Stunde gekocht. Dadurch wird der gesamte Acetaldehyd gebunden, während Alkohol unverändert bleibt. Nun wurde abermals destilliert, um den zurückgebliebenen Alkohol in reinem, aldehydfreiem Zustande zu isolieren.

¹⁾ Diese Zeitschr. 98, 150, 1919.

Destillat D1.

Das Destillat D1 gab die Riminische Acetaldehydprobe nicht mehr, trotzdem aber noch deutliche Jodoformreaktion und Reduktion von ammoniakalischer Silberlösung. Das war ein Beweis, daß neben eventuell vorhandenem Alkohol auch noch aldehydartige Verbindungen anwesend waren, die nun in der Kälte durch frisch gefälltes Ag_2O entfernt, d. h. zu Säuren oxydiert werden sollten. Zu dem Zwecke wurde das Destillat D1 30 Stunden mit frisch gefälligtem Ag_2O (aus 6 g AgNO_3) zunächst bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann 2 Stunden auf der Maschine kräftig durchgeschüttelt. Das klare Filtrat wurde abermals destilliert.

Destillat D2.

Das wasserhelle, klare Destillat D2 gibt die Jodoformreaktion und die Reduktion mit ammoniakalischer Silberlösung fast in gleicher Weise wie Destillat D1.

Es war somit die Jodoformreaktion wieder nicht beweisend für die erwartete Anwesenheit von Alkohol, und so wurde versucht, diesen durch Oxydation zu Acetaldehyd mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure nachzuweisen.

Ein Blindversuch mit kochender Beckmannscher Mischung zeigte, daß auf diesem Wege äußerst kleine Mengen Alkohol mit Sicherheit nachweisbar sind. Es wurde also das gesamte Destillat D2 mit einem Gemisch von Kaliumbichromat und konzentrierter Schwefelsäure gekocht und das Destillat aufgefangen. Dieses (Destillat D3) gibt die Riminische Aldehydreaktion nicht, jedoch wird immer noch ammoniakalische Silberlösung reduziert, und die Jodoformprobe fällt deutlich positiv aus. Aus dem negativen Ausfall der Acetaldehydreaktion ist zu ersehen, daß Alkohol in dem Destillat D2 nicht vorhanden gewesen sein kann. Die Silber- und Jodoformreaktionen weisen darauf hin, daß sehr beständige aldehydharzartige Verbindungen¹⁾ immer wieder in das Destillat übergehen und die Anwesenheit von Äthylalkohol vortäuschen.

Ogleich demnach Eulers Alkoholbefund nicht bestätigt werden konnte, habe ich doch noch die auffällige Angabe von

¹⁾ Vgl. A. Franke und E. Pollitzer, Monatsch. 34, 797, 1912.

Schanz nachgeprüft, der bei Belichtung von Milchsäure auch Methan gefunden haben will. Ebenso kontrollierte ich die Behauptung dieses Autors, daß Aceton schon bei einfacher, kurzer Besonnung in verdünnter wäßriger Lösung in Essigsäure und Methan gespalten werde. Wohl ist aus Versuchen von Ciamician und Silber bekannt, daß bei vielmonatlicher intensivster Sonnenbestrahlung Aceton in Methan und Essigsäure zerfallen kann, von einer Tageslichtempfindlichkeit wäßriger reiner Acetonlösungen, wie sie Schanz angibt, kann aber nicht die Rede sein.

Mischt man reines Aceton mit destilliertem Wasser und setzt dieses Gemisch in einem Quarzkolben den Sonnenstrahlen aus, so entweicht lediglich als kleine Blase die darin gelöste Luft. Die so entgaste klare Flüssigkeit ist völlig lichtbeständig. Es konnte bei mehrwöchentlichen Insolationen bei intensivster Juni- und Julisonne keine Gasbildung konstatiert werden.

Die Angabe von Schanz bezüglich der Bildung von Methan bei der Bestrahlung einer verdünnten Milchsäurelösung mit Quarzquecksilberlicht konnte ebenfalls nicht bestätigt werden; die Analyse des Lichtgases ergab außer Kohlensäure nur noch reichliche Mengen von Wasserstoff, aber keine Spur Methan oder Kohlenoxyd.

Den weitgehenden Schlußfolgerungen Schanz' wird man daher mit großer Skepsis gegenüberstehen müssen.

Über das Verhalten des Chinins im Organismus.

Von
Eduard Boecker.

Aus dem Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch“ in Berlin.)

(Eingegangen am 2. Dezember 1919.)

I. Kritische Bemerkungen zu einigen neueren Arbeiten über Chininausscheidung u. ä.

Ein Teil des auf irgendeine Weise dem Organismus einverleibten Chinins, im Mittel etwa $\frac{1}{3}$, wird mit dem Harn ausgeschieden, und zwar handelt es sich bei diesem Ausscheidungsprodukt nach den Feststellungen von Giemsa und Schaubmann(1), Halberkann(2), u. a. um unverändertes Chinin. Eine nennenswerte regelmäßige Zunahme der täglichen Ausscheidung bei fortgesetzter Chininverabfolgung hat sich nicht feststellen lassen [Kleine(3), Giemsa und Schaubmann(1), Schmitz(4)]. Andererseits kommt es in solchen Fällen auch nicht zu einer erheblich vermehrten Chininzerstörung im Sinne einer Chiningewöhnung [Kleine(3)].

In der Kaliumquecksilberjodidprobe (in der Folge einfach als Hg-Probe bezeichnet) besitzen wir ein einfaches und zugleich sehr empfindliches Mittel für den Nachweis des Chinins im Harn und ähnlichen Flüssigkeiten. Die am nativen Harn angestellte Hg-Reaktion ist jedoch eine nur grobqualitative Probe.

Wir müssen es deshalb mit Küster und Wolff(7) u. a. zurückweisen, daß sie, wie es z. B. Warburg(8) getan hat, der Aufstellung von zu vergleichenden Ausscheidungskurven zugrunde gelegt wird. Für derartige Untersuchungen ist es schon nicht zu umgehen, daß das Alkaloid nach einer als einwandfrei erprobten Methode isoliert wird. Dagegen wird man die gravimetrische Bestimmung, die für den Nichtchemiker ihre Klippen hat, in den meisten Fällen, wo es sich um klinische oder chemotherapeutische Untersuchungen handelt, unbeschadet

der wünschenswerten Genauigkeit des Resultates entbehren können. Die von Küster und Wolff der Hg-Methode vorgezogene gravimetrische nach H. H. Meyer [von Hartmann und Zila (9) mitgeteilt und zu umfangreichen Harnuntersuchungen benutzt] zeigt, wie dem von letzteren angeführten Kontrollbeispiel zu entnehmen ist, nicht unbedeutliche Differenzen im Ausfall: Zwei gleiche Portionen (500 ccm) eines künstlich mit Chinin versetzten Urins (5 mg auf 1 l) wurden untersucht und einmal 98%, bei der zweiten Portion 108% des Alkaloids wiedererhalten. Die Resultate der übrigen Kontrolluntersuchungen sind nicht angegeben; man vermißt daher einen Anhaltspunkt dafür, daß die in dem mitgeteilten Beispiel gefundenen Werte einen mittleren Ausfall repräsentieren und nicht etwa einen besonders günstigen. Die schlechten Resultate, die die Hg-Methode bei Küster und Wolff (7) ergab, dürften einmal darauf zurückzuführen sein, daß der Urin vor der Ausschüttelung mit Äther angesalzt, aber nicht alkalisiert wurde. Ferner sind die bei Chininkonzentrationen um 1:20000 herum auftretenden dichten Niederschläge für eine Vergleichung mit bekannten Standardlösungen ungeeignet. Wir haben vielmehr die in verdünnter Salz- oder Schwefelsäure gelösten Rückstände der je nach ihrer Herkunft in verschiedener Weise gereinigten Ätherauszüge der fraglichen chininhaltigen Flüssigkeiten — Blut, Harn usw. — stufenweise bis zum Verschwinden der Hg-Reaktion verdünnt und ihren Alkaloidgehalt durch Feststellung der Reaktionsgrenze einer Standardlösung approximativ berechnet. Die Standardlösungen wurden, soweit es ging, in jedem Versuch benutzt und möglichst von dem gleichen Ausgangsmaterial wie die zu untersuchenden Flüssigkeiten angefertigt. Handelte es sich z. B. um die Bestimmung des Chiningehaltes einer Blutprobe, so wurde ein entsprechendes Quantum der gleichen Blutart mit einer bekannten Chininmenge versetzt, und dann von beiden Blutproben in völlig gleicher Weise die gereinigten sauren Extrakte, an denen die Hg-Probe angestellt werden sollte, hergestellt. Nach unsern Erfahrungen ist die Hg-Methode, in dieser Weise ausgeführt, für unsre Zwecke genügend genau.

Zur Frage der Leistungsfähigkeit der von H. H. Meyer angegebenen, von Hartmann und Zila (9) benutzten gravimetrischen Chininanalyse seien folgende von uns angestellten Versuche mitgeteilt:

Zu 250 ccm Leitungswasser wurden 10 mg von auf konstantes Gewicht getrockneten Chinin. mur. (d. h. 10 ccm einer Lösung 1:1000) und 1 ccm Pferdeserum zugefügt. Eine zweite, ebenso starke Chininlösung wurde mit 0,1 Serum versetzt. Eine dritte und eine vierte Lösung von 12,775 mg Chinin. mur. in 200 ccm dest. Wasser enthielten je 0,6 ccm Kaninchenserum. Die nach der Methode der genannten Autoren ausgeführten Analysen ergaben, auf die Base berechnet, 64,3% bzw. 59%, bzw. 59,4% bzw. 30,6% der zugesetzten Alkaloidmenge. Die kalkzersetzten Tanninniederschläge wurden mit 450 bis 600 ccm heißen Ammoniakwassers durchwaschen, die Wägungen von geübter Hand aus-

geführt. Die beiden ersten Versuche wurden mit andern Reagenzien als die beiden letzten angestellt. Die Methode dürfte somit für eiweißhaltige Urine ohne weitere Nachprüfung nicht anzuwenden sein.

Zur Methodik möchten wir bemerken, daß wir das ammoniakalische Filtrat stets mehrmals nacheinander mit reichlichen Mengen Äther ausgeschüttelt haben. Die Vorschrift lautet (l. c., S. 222): „... und das Filtrat (wird) mit 100 ccm Äther geschüttelt. 50 ccm des Äthers werden in einem Wägegöläschen abgedampft und der nur aus Chininbase bestehende Rückstand getrocknet und gewogen.“ Hiernach könnte es scheinen, als ob sich der Chiningehalt des Filtrates einfach durch Multiplikation des Rückstandgewichtes der 50 ccm mit zwei berechnen ließe. Das ist aber nicht der Fall. Durchschüttelt man ein beliebiges Quantum wäßriger Flüssigkeit mit 100 ccm Äther, so erhält man niemals nach dem Absetzen die gesamten 100 ccm Äther wieder; vielmehr z. B. beim Durchschütteln von 85 ccm wäßriger Flüssigkeit im Mittel etwa 86 ccm Äther, von 170 ccm nur etwa 75,7 ccm. Der Rest des Äthers bleibt in der Flüssigkeit gelöst. Wir durchschütteln einmal 85 ccm, das andre Mal 170 ccm mit Natronlauge schwach alkalisierten Wassers, dem je 19,1625 mg Chinin. mur. (auf konstantes Gewicht getrocknet) zugefügt war, mit je 100 ccm Äther. Indem wir den Versuch zweimal anstellten, konnten wir uns durch Wägung der Rückstände überzeugen, daß der sich absetzende Ätherextrakt stets mit geringen Abweichungen das gesamte Alkaloid aufgenommen hatte. Es war aber im ersteren Falle in 87 (beim zweiten Versuch in 85) ccm Äther, im andern in 76 (im zweiten Versuch 75,5) ccm Äther gelöst. Mithin hatten 50 ccm von dem Extrakt niemals die Hälfte der vorhandenen Chininbase enthalten, sondern stets beträchtlich mehr. Nimmt man daher gemäß der Vorschrift 50 ccm von dem ätherischen Extrakt zur Verdampfung und Wägung des Rückstandes ab, so muß man noch die Gesamtmenge des Extraktes messen und das Gewicht des Rückstandes der 50 ccm auf diese umrechnen — eine unnötig komplizierte und bei der großen Flüchtigkeit des Äthers ungenaue Methode. Es scheint uns daher richtiger, das ammoniakalische Filtrat 2- oder 3mal mit entsprechenden Mengen Äther auszuschütteln, die Ätherextrakte zu vereinigen und den Gesamtrückstand zu wägen.

Cahn-Bronner (5) hat neuerdings dargetan, daß sich die Ausscheidung länger als bisher gemeinhin angenommen wurde, z. B. nach peroraler Gabe von 0,5 g Chinin. mur. 14 bis 17 Tage verfolgen läßt, die enorme Verlängerung der Ausscheidungskurve bei mit subcutanen Injektionen behandelten Pneumonikern, in einem Fall bis zum 127. Tage nach der letzten Gabe, führt er auf langsame Resorption des Chinins aus den bei der Injektion gesetzten subcutanen resp. intramuskulären Depots zurück. Handelt es sich bei den gegen Ende der Ausscheidung vom Organismus eliminierten Chininmengen auch nur mehr um ständig winziger werdende Spuren, so verdient die Feststellung der protrahierten Ausscheidung, namentlich derjenigen nach oraler Gabe, wo sie nämlich nicht durch künstliche Depotbildung erklärt werden kann, vom theoretischen Gesichtspunkt großes Interesse.

Cahn-Bronner (5) gründet seine approximativ quantitativen Chininbestimmungen auf das „mit größter Regelmäßigkeit“ eintretende Verschwinden der Hg-Reaktion bei einer Verdünnung von 1 : 200 000. Wir konnten keine derartige Konstanz der Reaktionsgrenze feststellen und möchten daher von einer Verallgemeinerung einer solchen Berechnungsart abraten. Wir sahen die Reaktion nicht selten bis zu 1 : 400 000 positiv ausfallen. Die Grenzverdünnung dürfte, wie das auch sonst von Ausfällungserscheinungen bekannt ist, von dem Salzgehalt der Lösungsflüssigkeit u. a. abhängig sein. Die durch Aufnahme der gereinigten Atherrückstände von chininhaltigen Flüssigkeiten in 1%iger Schwefelsäure erhaltenen Lösungen weisen allerdings hinsichtlich der Grenzverdünnung ein etwas konstanteres Verhalten auf. Bei 1 : 300 000 erhielten wir sehr oft deutlich positive Reaktion.

Indem die Atherrückstände einer Flüssigkeit oder eines Organs in einem solchen Volumen 1%iger Schwefelsäure aufgelöst wurden, das kleiner als das Volumen des Untersuchungsmaterials war, ist es Cahn-Bronner (5) gelungen, kleinste Alkaloidmengen, bis zu 1 : 40 000 000 im Urin, nachzuweisen. Wir haben dieses Konzentrationsprinzip ebenfalls gelegentlich angewandt, sind jedoch in der Menge der Aufnahmeflüssigkeit für die Chininrückstände nie unter einige Kubikzentimeter heruntergegangen. Man muß die Säure unter Hin- und Herneigen des Verdunstungsgefäßes mit der gesamten Wandfläche desselben bis zur ursprünglichen Reichweite des ätherischen oder alkoholischen Extraktes zwecks gewisser Auflösung des gesamten Rückstandes öfter in Berührung bringen, wobei ständig Tröpfchen von der zurückfließenden Säure hängen bleiben. Das kann aber bei Verwendung von nur 1 ccm zu unkontrollierbaren Ungenauigkeiten führen.

II. Beginn der Chininausscheidung.

Der früheste Zeitpunkt, zu dem sich nach irgendeiner Applikationsweise das Alkaloid im Harn nachweisen läßt, hängt selbstverständlich mit von dem jeweiligen Füllungszustand der Blase ab. Auch dürfte der augenblickliche Sekretionszustand der Nieren von Einfluß sein. Wie Ziemann (6) mitteilt, sah Speiser schon 10 Minuten nach intramuskulärer Injektion von 1 g Chinin-Urethan in 3 ccm Aq. dest. die Ausscheidung beginnen, Cahn-Bronner (5) nach subcutaner Einverleibung nach frühestens 30 Minuten. Wir stellten in dem 10 Minuten nach intramuskulärer Injektion von 1 g Chinin. mur. gelassenen Urin (30 ccm) einer Malariapatientin ca. 1 mg fest. Bei einem andern Patienten, der kurz vor der intramuskulären Einspritzung von 1 g Hydrochin. mur. in 5 ccm NaCl uriniert hatte, fiel die an den nativen Harn angestellte Hg-Probe bei der nach 8 Minuten

gelassenen Portion von 25 ccm negativ, bei der gleichgroßen nach 15 Minuten gelassenen zweiten positiv aus. Bei einem ebenso behandelten Patienten, der aber nicht vorher uriniert und offenbar mehr Urin in der Blase hatte, blieb in den nach 8 und 15 Minuten gelassenen Portionen von 75 ccm die Hg-Trübung aus.

III. Konzentration des Chinins im Blute.

Im Blute lassen sich, nach welcher Art der Applikation es auch sei, zu keiner Zeit im Verhältnis zur beigebrachten nennenswerte Chininmengen nachweisen [Giemsä und Schaudermann(1), Plehn(10), Hartmann und Zila(9) u. a.]. Eine Ausnahme machen nur die unmittelbar nach der intravenösen und subcutanen Injektion vorliegenden Verhältnisse. Das schlagartige Herabsinken der Chininkonzentration im Blute von intravenös behandelten Patienten bis ungefähr zu dem niedrigen Niveau des mehr konstanten Chininspiegels nach peroraler Verabreichung der gleichen Dosis geht aus der mit Hilfe einer Fluorescenzmethode gewonnenen Tabelle XXII von Hartmann und Zila(9) eindrucksvoll hervor.

Wir spritzten 5 Meerschweinchen, deren Blutmenge wir zu $\frac{1}{25}$ des Körpergewichtes annahmen, in 0,5% iger Lösung so viel Chinin. mur. intravenös ein, daß unter der Voraussetzung eines ständigen Verbleibens des gesamten Alkaloids im Blute, in diesem je nach der beigebrachten Dosis eine Konzentration von 1:5700 bis 1:12000 zu erwarten gewesen wäre. In den 5 bzw. 15, 20, 25 oder 75 Minuten nach der Injektion in Zitratbouillon aufgefangenen Blutproben konnte mit der Hg-Methode kein Chinin nachgewiesen werden. Desgleichen nicht bei einem Kaninchen von 2300 g 5 Minuten nach der intravenösen Injektion von 4 ccm einer 0,5% igen Chinin. mur.-Lösung (=20 mg); ferner nicht bei einem Malaria-patienten, der 56 Stunden vorher 1,0 g Chinin. mur. intravenös bekommen hatte. In allen diesen Fällen lag also die Konzentration zum mindesten unter 1:200000. Zur Anstellung der Reaktion wurde das mit Wasser oder Zitratbouillon verdünnte und mit Natronlauge stark alkalisierte Blut mit reichlichen Portionen Äther ausgeschüttelt, die Ätherextrakte in verschiedener Weise gereinigt und die schließlich verbleibenden Rückstände in verdünnter Salz- oder Schwefelsäure aufgenommen. Das Volumen der letzteren entsprach in 5 Fällen demjenigen der nativen Blutprobe; in 2 Fällen konzentrierten wir nach dem von Cahn-Bronner angegebenen Prinzip, ohne aber positive Reaktion zu erzielen, auf $\frac{1}{8}$ resp. $\frac{1}{4}$. Das angewandte Isolationsverfahren arbeitete in 3 Fällen nachgewiesenermaßen genügend quantitativ; die betreffende Methode ist unten beschrieben.

Nebenher sei erwähnt, daß wir in Fortsetzung früherer durch den Krieg abgebrochener Untersuchungen (11) weitere Versuche über den Verbleib des dem Chinin nahe verwandten Optochins im Blute intravenös behandelter Meerschweinchen und Kaninchen angestellt haben.

1. Zwei Kaninchen bekamen so viel Optochin. mur. in 0,25%iger Lösung intravenös eingespritzt, daß die hypothetische Konzentration im Blute — nämlich unter der Voraussetzung eines Verbleibens des gesamten Alkaloids im Blute, dessen Menge zu $\frac{1}{15}$ des Körpergewichtes angenommen wurde — ca. 1 : 7800 betragen mußte. Bei den Tieren wurde nach 50 Minuten je 1,4 ccm Blut entnommen und mit je 0,4 ccm Zitratbouillon vermischt. Diese Blutproben töteten eingesäte Pneumokokken binnen 24 Stunden ab, während eine dem einen der beiden Kaninchen vor der Optochinbehandlung entnommene Zitratblutprobe nicht einmal Entwicklungshemmung ausübte. Kontrollen zur Feststellung der Entwicklungshemmungs- bzw. Abtötungsgrenze des Optochins im Kaninchenzitratblut, wie wir sie früher (11) zur Berechnung des Optochingehaltes im Blute vorbehandelter Tiere benutzten, wurden nicht hergestellt.

2. Ein Kaninchen und ein Meerschweinchen bekamen so viel Optochin. mur. in 0,5%iger Lösung intravenös eingespritzt, daß in beiden Fällen die Anfangskonzentration im Blute ca. 1 : 5900 betragen mußte. Genau 20 Minuten nach der Einspritzung wurde jedem der beiden Tiere eine Blutprobe entnommen, und zwar dem Kaninchen 16 ccm, dem Meerschweinchen 18,5 ccm. Die Blutproben werden mit je 4 ccm Zitratbouillon vermischt. Zur Isolierung des Alkaloids werden sie folgendem, in beiden Fällen genau gleichen Verfahren unterworfen: Verdünnung mit 50 ccm NaCl; Alkalisierung mit 1 ccm NaOH 33%ig; Ausschüttelung mit 200 ccm, darauf noch mit 100 ccm Äther; Ausschüttelung der vereinigten Ätherextrakte mit 100 ccm, darauf noch mit 50 ccm $\frac{1}{10}$ -Salzsäure; Alkalisierung der vereinigten salzsauren Auszüge mit NaOH 33%ig; Ausschüttelung mit 100 ccm, darauf noch mit 50 ccm Äther; Verdampfen der vereinigten Ätherauszüge. Die Rückstände von den 16 ccm Kaninchenblut (K) werden in $16 : 4 = 4$ ccm $\frac{1}{15}$ -Salzsäure, diejenigen von den 18,5 ccm Meerschweinchenblut (M) entsprechend in 3,37 ccm aufgelöst. Resultat der Hg-Probe:

K unverdünnt = +, 2 fach verdünnt = 0,

M 3 fach verdünnt = +, 5 fach verdünnt zunächst = 0, nach 2 Minuten = schwach +

Danach enthält M mindestens 3 mal, vielleicht 4 bis 5 mal so viel Optochin wie K; entsprechend der Reaktionsgrenze einer Standardlösung etwa 1 : 100 000 gegenüber etwa 1 : 400 000 bei K. Der Gehalt im Blute wäre somit bei dem Meerschweinchen auf etwa 1 : 400 000 ($=\frac{1}{400}$), bei dem Kaninchen auf etwa 1 : 1 600 000 ($=\frac{1}{160}$) herabgesunken gewesen.

Wir sehen in dem Ausfall dieses Versuches die Bestätigung eines bereits früher (11) erhobenen Befundes: wir konnten da-

mals mit einer biologischen Versuchsmethode feststellen, daß das Optochin nach intravenöser Injektion beim Meerschweinchen deutlich langsamer aus dem Blute verschwindet als beim Kaninchen. • Das auffallende Maß des neuerdings festgestellten Unterschiedes mag zum Teil auf einseitigem Zusammenwirken individueller Verschiedenheiten und der Ausfallsbreite der angewandten Untersuchungsmethode beruhen.

Übrigens dürfte es sich, nachdem Morgenroth und Ginsberg(12) mit Hilfe eines biologischen Verfahrens festgestellt haben, daß gewisse Chinaalkaloide von den roten Blutkörperchen gespeichert werden — eine Feststellung, die von Schilling und Boecker(13), und von Halberkann(2) mittels anderer Methoden bestätigt wurde, — ganz allgemein empfehlen, bei experimentellen Studien über den Verbleib noch wenig bekannter chemotherapeutischer Mittel im Blute behandelter Menschen und Tiere nicht, wie meist üblich, das Serum, vielmehr das Zitratblut zu untersuchen. Aus der Arbeit von Boecker(11) geht hervor, daß man zu verschiedenen Resultaten gelangt, je nachdem man das Serum oder das Zitratblut von optochinbehandelten Kaninchen untersucht. Dabei können anscheinend nahe verwandte Mittel ein verschiedenes Verhalten aufweisen. Wie wir vermittels einer biologischen und einer optischen Untersuchungsmethode feststellten, wird das Trypaffavin von den roten Blutkörperchen des Pferdes nicht, wenigstens nicht in nennenswertem Grade, gebunden, wohl aber das jenem Mittel, dem 3·6·Diamino — 10·Methylakridiniumchlorid, ähnliche Chemotherapeutikum 3·6·Diaminoakridinsulfat, vielleicht auch das entsprechende Nitrat und die Base. Hierüber wird an anderer Stelle berichtet werden; hinsichtlich der genannten Substanzen und ihrer chemotherapeutischen Wirkung sei auf die Arbeit von Neufeld und Schiemann(14) verwiesen.

IV. Zerstörung des Chinins im Organismus.

Nach dem Ausfall der von Plehn(10) und Grosser(15) an überlebenden Lebern angestellten Durchblutungsversuche ist vorläufig anzunehmen, daß ein Teil des eingeführten Chinins im Organismus zerstört wird.

Ob die Zerstörung *intra vitam* so schnell vor sich geht, wie in jenem Versuch, bleibt dahingestellt. Möglicherweise sind

auch andere Organe und Gewebeelemente beteiligt. In dieser Hinsicht ist es von Interesse, daß nach der Feststellung von Rona (10), Hartmann und Zila (9) u. a. das überlebende Blut, selbst bei Sauerstoffzuführung, nicht imstande ist, Chinin zu zersetzen. Charakteristische Spaltprodukte haben sich bisher nicht nachweisen lassen [vgl. auch die Arbeit von Biberfeld (16)].

V. Bindung des Chinins in Organen und Gewebeelementen.

Gewisse Organe und Gewebeelemente sind imstande, Chinin zu speichern. Es sei kurz auf die diesbezüglichen Befunde von Giemsa und Schaumann (1), Giemsa und Prowazek (17), Giemsa (18), Plehn (10), Morgenroth und Ginsberg (12), Hartmann und Zila (9), Schilling und Boecker (13) und Cahn-Bronner (5) hingewiesen. Dabei verdient die Feststellung von Chinin in Organen von Menschen und Tieren, in deren Blut und Urin sich kein Alkaloid mehr nachweisen ließ, besonderes Interesse.

Giemsa stellte in den Nieren eines an Schwarzwasserfieber verstorbenen Patienten, der 4 Tage vor seinem Tode $9 \times 0,2$ Chinin. mur. per os bekommen hatte, mehr Alkaloid als in den übrigen Organen fest. Möglicherweise ist das ein typischer Befund. Wir untersuchten die Leber und beide Nieren eines Meerschweinchens, das 25 Minuten vor seiner Tötung 1,2 ccm einer 0,5%igen Lösung von Chinin. mur. intravenös eingespritzt bekommen hatte, auf ihren Chiningehalt. Wie ein Kontrollversuch (Zusatz von 1,0 mg Chinin. mur. zu im Mörser hergestelltem Brei der Leber eines normalen Meerschweinchens) lehrte, erhielten wir mit der im Hauptversuch angewandten Isolationsmethode etwa 60% des Chinins aus den Organen zurück. Die 25 g (Leber) resp. 5 g (beide Nieren) schweren Organe wurden genau der gleichen Behandlungsart unterworfen und die gereinigten Rückstände in 25 bzw. 5 ccm 1%iger Schwefelsäure aufgelöst. Der Nierenauszug fluorescierte stark, derjenige aus der Leber nicht. Die Hg-Reaktion fiel bei dem letzteren negativ, dagegen bei dem Nierenauszug positiv, und selbst noch in der 8fachen Verdünnung desselben mit dest. Wasser schwach positiv aus. Die Trübung wurde, wie stets, in ihrem Verhalten bei Erwärmung und Abkühlung geprüft.

Wir suchten der Frage, wodurch die Bindung des Chinins durch Organe und Gewebeelemente bedingt sei, auf folgendem Wege näherzutreten. Nach Traube setzt das Chinin die Oberflächenspannung des Wassers herab; es gehört also zu jenen Substanzen, die die Neigung besitzen, sich an der Oberfläche wäßriger Lösungen anzusammeln. Da nun viele von solchen

Substanzen geringen Haftdruckes für Wasser nachgewiesenermaßen einen sehr großen Haftdruck für Lipoiden besitzen, andererseits aber das Stroma der roten Blutkörperchen ca. 33% Lipoiden enthält, so drängte sich uns bei unseren Versuchen über die Bindung des Chinins an die roten Blutkörperchen die Vermutung auf, daß dieselbe durch die Lipoiden der letzteren zustande käme. Versuche, die Bindung des Alkaloids an Lipoiden in vitro zu studieren, schlugen wegen technischer Schwierigkeiten fehl. Wir experimentierten daher mit Olivenöl, zwar in der willkürlichen Voraussetzung, daß die Triglyceride sich den Lipoiden analog verhalten würden, aber nach dem Vorgang von Baum — als er nämlich den Schwellenwert verschiedener Narkotica mit ihrem Verteilungsquotienten in dem System Fett \times Wasser, anstatt mit demjenigen in Lipoid \times Wasser verglich.

10 ccm einer Lösung von Chinin. mur. in NaCl 1:5000, denen $\frac{1}{4}$ Tropfen Normalnatronlauge zugefügt war, wurden in Zentrifugengläschen mit 10 ccm Öl 1 Minute lang kräftig durchgeschüttelt, die Emulsion 10 Minuten lang stark zentrifugiert, und Öl und leicht milchig getriebene wässrige Lösung durch Pipettierung getrennt. Wäre die Verteilung der Chininbase in dem System Wasser \times Öl gleichmäßig gewesen, hätte im Wasser nunmehr eine Chininkonzentration von 1:10000 (auf Chinin. mur. berechnet) vorliegen müssen. Statt dessen fand sich weniger als ca. $\frac{1}{60}$. Die Versuchsanordnung war nach Art der Kontrolle und Ausführung genau die gleiche wie in dem unten beschriebenen Versuch. Nach Durchschütteln von einer Lösung von 4 mg Chinin. mur. in 18 ccm NaCl mit 2 ccm Öl fand sich in der herauszentrifugierten wässrigen Lösung nur noch $\frac{1}{6}$ bis $\frac{1}{5}$ der Anfangskonzentration.

Verteilung von Chinin. mur. in einem System Öl \times Hammelblut (defibriniertes; da nur 17 ccm Blut zur Verfügung stehen, werden dieselben mit 5 ccm NaCl verlängert):

Zu 9 ccm Blut kommen 1 ccm Chinin. mur. 1:500 in NaCl und darauf 10 ccm Öl = Röhrchen X_1 (1:10000, gleichmäßige Verteilung vorausgesetzt).

Zu 9 ccm Blut kommen 1 ccm NaCl und darauf 10 ccm Öl = K_1 .

X_1 und K_1 werden 1 Minute lang kräftig geschüttelt und darauf nach 5 Minuten langem Stehen 10 Minuten lang kräftig zentrifugiert. Die Gemische sind nunmehr in 3 Schichten sedimentiert: rote Blutkörperchen, Serum, Öl. Zwischen Öl und Serum findet sich ein zartes, aber sahes, weißes, rötlich gesprenkeltes Niederschlaghäutchen (verseiftes Öl?) ausgespannt. Nach Entfernung desselben und Abpipettieren des Öls werden von dem sorgfältig wieder aufgerührten Blut unter Vermeidung einer Beimischung von Resten des nicht gänzlich zu entfernenden Öls je 8 ccm entnommen.

Zu den 8 ccm Blut von K_1 kommen 8 ccm einer Chinin. mur.-Lösung 1:10000 in NaCl = 16 ccm K (1:20000).

Zu den 8 ccm X_1 kommen 8 ccm NaCl = 16 ccm X von fraglichem Chiningehalt (1:20000 bei gleichmäßiger Verteilung des Chinins in Öl und Blut).

X und K werden in folgender völlig gleicher Weise weiter behandelt: Das mit dest. Wasser verdünnte Blut wird unter Vermeidung von Verlusten in den Scheidetrichter übertragen (mehrfaches Nachspülen des Gefäßes mit Wasser und darauf mit Äther). Zufügen von 8 ccm Normalnatronlauge. Umschütteln. Zweimaliges Ausschütteln mit je 50 ccm Äther. Vereinigung der beiden Ätherauszüge im Scheidetrichter. Ausschütteln mit 20 ccm, ein zweites Mal mit 40 ccm $\frac{1}{10}$ -Salsäure. Vereinigung der sauren Auszüge im Scheidetrichter. Starkes Alkalisieren mit Normalnatronlauge. Zweimaliges Ausschütteln mit je 50 ccm Äther. Verdampfen der vereinigten Ätherauszüge. Aufnahme des Rückstandes in 16 cc 1%iger Schwefelsäure. Die Lösung von K fluoresciert sehr stark, diejenige von X nicht. Ausfall der Hg-Probe: X unverdünnt bleibt klar; K 12fach mit dest. Wasser verdünnt wird getrübt, K 15fach verdünnt schwach getrübt. Hieraus folgt

1. Daß die angewandte Chininsolierungsmethode zum mindesten annähernd quantitativ arbeitet; denn die 15fache Verdünnung von K_1 kann nach dem Versuch höchstens 1:800000 enthalten und reagiert dementsprechend noch oben positiv.

2. Daß das Blut X nach der Durchschüttelung weniger als ca. $\frac{1}{15}$ der ursprünglichen Konzentration enthält. Nach den übrigen mitgeteilten Versuchen ist anzunehmen, daß die Herabsetzung des Chiningehaltes noch weit größer war; nach der Versuchsanordnung hätte sie im vorliegenden Fall nur bei Anwendung des Konzentrationsprinzipes von Cahn-Bronner (5) genauer bestimmt werden können.

Bei Durchschüttelung von 27 ccm defibrierten Pferdeblutes, das 1 mg Chinin. mur. enthielt, mit 8 ccm Öl sank der Chiningehalt des Serums auf etwa 1:800000 herab. Bei diesem Versuch wurde die Wiederaufrührung des Blutes nach dem Zentrifugieren unterlassen und nur das Serum untersucht. Da die roten Blutkörperchen Chinin binden, ist zu vermuten, daß der Gesamtgehalt des Blutes etwas höher als der gefundene Wert war.

Nach dem Ausfall der geschilderten Versuche lag der Gedanke nahe, ob nicht auch das Fettgewebe des menschlichen und tierischen Organismus, das bisher daraufhin nicht untersucht worden ist, an der Bindung des Chinins beteiligt sei. Wir untersuchten Fettgewebe

1. von einem Meerschweinchen, das 5 Minuten nach intravenöser Injektion von 1, ccm einer 0,5%igen Lösung von Chinin. mur. in NaCl getötet worden war.

Die vom Netz und der Subcutis gewonnenen 84 g Fett wurden

mit der Schere in kleinste Stückchen zerschnitten und nach Verrühren mit 1 ccm Normalnatronlauge sukzessive einer mehrere Tage währenden Extraktion mit Äther, mit Chloroform bei Zimmertemperatur und bei 50°, wieder mit Äther, darauf mit Salzsäurealkohol unterworfen. Die Chloroformauszüge wurden verdampft, die Rückstände mit Äther ausgewaschen, desgleichen der Rückstand des nach Alkalisierung eingedampften sauren Alkoholauszuges. Die vereinigten Ätherauszüge wurden mit 70, darauf mit 100 ccm $\frac{1}{2}$ -Salzsäure ausgeschüttelt. Die vereinigten sauren Auszüge wurden alkalisiert und zweimal mit 50 ccm Äther ausgeschüttelt, die vereinigten Ätherauszüge wieder mit Salzsäure (75 ccm) ausgeschüttelt. Der salzsaure Auszug wird im Schütteltrichter mit 100 ccm Äther ausgewaschen, nach Entfernung des Äthers alkalisiert und zweimal mit 75 ccm Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherauszüge wurden verdampft und der Rückstand, der aus 34 g = $4 \times 8,5$ g Fett gewonnen war, nach dem Konzentrierungsprinzip von Cahn-Bronner (5), in 8,5 ccm 1%iger Schwefelsäure aufgelöst. Unsere Absicht, einen praktisch fettfreien ätherischen Auszug aus dem Fettgewebe zu erzielen, wurde erreicht; ob die komplizierte Methode quantitativ arbeitete, wurde nicht untersucht, da es lediglich auf einen qualitativen Chininnachweis abgesehen war. Die schwefelsaure Lösung fluorescierte schwach, war wasserklar; sie reagierte auf Hg-Zusatz sofort positiv, in zweifacher Verdünnung mit dest. Wasser nach 2 Minuten schwach positiv (Kontrolle durch Erwärmen und Abkühlen). Das Blut ergab keine positive Reaktion (6 ccm Blut wurden zu 6 ccm schwefelsauren Extraktes verarbeitet), auch nicht hinsichtlich der Fluorescenzprobe.

2. Bei einem mageren Meerschweinchen, demjenigen, in dessen Nieren, bei negativem Befund an Leber und Blut, Chinin nachgewiesen wurde, fanden wir in den 5 ccm des auf ähnliche Weise wie oben erhaltenen schwefelsauren Extraktes der 5 g aus Mesenterium und Subcutis stammenden Fettgewebe ebenfalls Chinin: der klare Extrakt reagierte bei Hg-Zusatz unverdünnt und 2fach mit dest. Wasser verdünnt sofort deutlich positiv (Erwärmungskontrolle). Das Tier war 25 Minuten nach der intravenösen Einspritzung von 1,2 ccm einer 0,5%igen Chininlösung getötet worden.

3. Ein Kaninchen von 2800 g bekam 6 ccm einer 0,5%igen Chinin. mur.-Lösung intravenös eingespritzt. Tötung nach 72 Stunden (!) 20 g Fettgewebe von Subcutis und Bauchhöhle werden in ähnlicher Weise wie oben verarbeitet, und der Rückstand der gereinigten Auszüge in 4 ccm 1%iger Schwefelsäure gelöst. Da sich die klare, nicht fluoreszierende Lösung erst 30 Minuten nach Zusatz des Hg schwach trübte, möchten wir diesen Ausfall nicht als positiv bezeichnen, wenngleich die Trübung bei Erwärmung verschwand, nach Abkühlung wieder auftrat, und andererseits die Kontrollen (Wasser und 1%ige Schwefelsäure je mit ebensoviel Hg versetzt) dauernd klar blieben. Erwähnt sei noch, daß der Blase des getöteten Tieres 6 ccm Urin entnommen wurden; der Ätherextrakt des Urins wurde in 3 ccm 1%iger Schwefelsäure aufgenommen: Hg-Reaktion negativ.

4. 3 Meerschweinchen bekamen 5 mg Chinin. mur. in 0,5%iger Lösung intravenös eingespritzt. Nach 45 Minuten Tötung. Von den 3 Tieren werden zusammen 33 g Fettgewebe gewonnen, hauptsächlich aus der Subcutis des Rückens. Zum Zwecke der Chininisolierung wird das Fettgewebe 24 Stunden mit schwefelsaurem Alkohol, darauf nach Alkalisierung des abfiltrierten Gewebsbreies mehrere Stunden mit Äther, darauf nach Abziehen des Äthers wieder 24 Stunden mit schwefelsaurem Alkohol ausgezogen. Diese Extrakte werden in ähnlicher Weise wie oben in einen gereinigten ätherischen Extrakt vereinigt. Der nach Verdampfen des Äthers verbleibende Rückstand wird in 1,65 com 1%iger Schwefelsäure aufgenommen. (Um die erforderliche starke Konzentrierung zu ermöglichen [20fach!], mußten wir entgegen dem sonst befolgten Prinzip in diesem Falle die Menge der Aufnahmeflüssigkeit sehr klein bemessen.) Thalleiochinreaktion schwach positiv.

An eine quantitative Auswertung der mit unserm gleichsam tastenden Verfahren gewonnenen Resultate ist nicht zu denken; wir begnügen uns mit der Feststellung, daß der qualitative Nachweis von Chinin im Fettgewebe vorbehandelter Tiere möglich ist. Hinsichtlich des negativen oder zweifelhaften Resultates im dritten Versuch sei darauf hingewiesen, daß das Kaninchen 3 Tage vor seiner Tötung pro 100 g Körpergewicht nur etwa 1,1 mg Chinin. mur. erhalten hatte. Bei dem an Schwarzwasserfieber gestorbenen Patienten, in dessen Organen, wie schon erwähnt, Giemsa (18) Chinin nachweisen konnte, betrug die 4 Tage vor dem Tode eingenommene Gesamtdosis pro 100 g dagegen etwa 2,6 mg, aus 70 kg Körpergewicht berechnet.

Durch den Ausfall der im Vorstehenden geschilderten Versuche gewinnt die Vermutung, daß der Lipoid- und Fettgehalt von Organ- und Gewebszellen, roten Blutkörperchen usw. für deren Fähigkeit, Chinin zu speichern, von Bedeutung sein könne, viel für sich. Möglicherweise ist auch der jeweilige Bestand an Fettgewebe für die Verteilung des Chinins im Organismus von Belang. Was den ersten Punkt angeht, so mußte uns auffallen, daß gerade in dem an Cerebrin, Neurin und ähnlichen Substanzen reichen Gehirn und im Rückenmark in den bisher untersuchten Fällen wenig oder überhaupt kein Chinin festgestellt worden ist. Wir haben jedoch durchaus keinen Anhaltspunkt, wie weit die angewandten Isolationsmethoden, die meist an Leber und Nieren erprobt wurden, in Hinsicht der besonderen physikalisch-chemischen Beschaffenheit des Gehirns tauglich waren. Giemsa und Schaumann (1) untersuchten die Organe von 2 Hunden, von denen der eine kurz vor seiner Tötung eine große Chinindosis per os und subcutan, der andere 15 Tage lang täglich 0,3 g Chininbase per os er-

halten hatte und dann nach 3tägiger Pause getötet wurde. Im ersten Fall wurde im Gehirn Chinin festgestellt, in den Nieren dagegen nicht; im anderen war das Resultat ein umgekehrtes. Ob dieser Unterschied durch die Art der Applikation, die verschiedenen Zeiten zwischen Einführung des Chinins und Tötung, vielleicht auch die Größe der Dosis im ersten Fall, oder durch die, wenn auch anscheinend unwesentlich, unterschiedliche Behandlung der Organe bei der Chininisolierung begründet ist, muß dahingestellt bleiben.

VI. Zusammenfassung.

Auf Grund der vorliegenden Untersuchungen sind wir zu der Auffassung gelangt, daß sich das Chinin bei der Resorption im Körper nach Maßgabe seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften wie in einem komplizierten Verteilungssystem verteilt. Die Art und Weise dieser Verteilung und Speicherung, die Befähigung der Leber, Chinin zu zerstören und die eliminierende Tätigkeit der Niere (von der geringfügigen Ausscheidung durch andere Drüsen und mit dem Kot sei hier abgesehen) sind somit die Faktoren, die das Schicksal des Alkaloids im Organismus bestimmen. Im einzelnen ergeben sich je nach der Applikationsart gewisse Verschiedenheiten; vergleiche hierzu die bezüglichen Ausführungen bei Plehn (10).

Nach der intravenösen Injektion sinkt die ursprünglich entsprechend der gegebenen Dosis hohe Konzentration des Chinins im Blute sehr schnell herab, so daß man schon nach wenigen Minuten besonders empfindliche Untersuchungsmethoden (Fluoreszenzmethode oder Konzentrierung des ätherischen Extraktes nach Cahn-Bronner) anwenden muß, wenn man die verbleibenden geringen Spuren nachweisen will. Diese schnelle Abnahme ist nach unsrer Auffassung eine Folge des geringen Haftdruckes des Chinins im Gesamtblute. Die Ausscheidung durch die Nieren und die Zerstörung durch die Leber kommen hier erst in zweiter Linie in Betracht. Diese letzteren Prozesse setzen zwar, wie wir oben für die Nieren bewiesen haben, beim ersten Auftreten von Chinin im Blute ein, würden aber den Chininspiegel im Blute erst nach und nach herabsenken und mehr die Ursache des allmählichen Verschwindens des

Alkaloids aus dem ganzen Körper als der so bald nach der Injektion vorliegenden Armut des Blutes an Chinin sein.

Die Tätigkeit der Leber und Niere läßt sich praktisch in zwei zeitliche Abschnitte einteilen: Bis zur beendeten Verteilung des Chinins im Organismus kreisen infolge des plötzlichen Vorliegens einer hohen, zwar sehr schnell abnehmenden Konzentration beträchtlichere Mengen des Alkaloids im Blute als nach Beendigung dieser Phase, und die beiden Organe sind somit in der Lage, mehr Alkaloid als später aufzuspeichern. Der Grad dieser Aufspeicherung richtet sich, ganz wie bei den übrigen Organen und Geweben, nach der spezifischen Affinität zu dem Medikament. Nur insofern unterscheiden sich Leber und Niere von jenen, als sie sich des gespeicherten Alkaloids durch Zerstörung bzw. Ausscheidung ständig entledigen und so immer neue Anteile desselben aufnehmen können. Ist die Verteilung des Chinins im Organismus beendet, so stehen Leber und Niere nur noch die geringen Mengen, die fernerhin im Blute kreisen, zur Verfügung. In dem Maße, wie sie das jeweils in ihnen befindliche Chinin verarbeiten, speichern sie neue Anteile desselben aus dem Blute auf, das seinerseits dadurch in die Lage versetzt wird, entsprechend dem Verlust neues Chinin aus den Organen aufzunehmen und somit die umspülten Organe und Gewebezellen auszuwaschen. Indem dieser Prozeß, während dessen der Verteilungsquotient des Alkaloids in Organen, Blut, Leber und Niere konstant sein würde, ständig weitergeht, wird die im Organismus vorhandene Gesamtmenge des Chinins, der Gehalt im Blute, in den einzelnen Organen, im ausgeschiedenen Urin immer kleiner, bis schließlich nur noch verschwindende Spuren festgestellt werden können.

Die nach der subcutanen bzw. intramuskulären Applikation des Chinins — beide Applikationsarten seien der Einfachheit halber, vielleicht etwas willkürlich, als gleichzeitig behandelt — vorliegenden Verhältnisse sind durch die Bildung eines Depots an der Injektionsstelle charakterisiert. Zwar muß man annehmen, daß sofort nach der Einspritzung ein beträchtlicher Anteil des Medikaments in die Blutbahn gelangt, möglicherweise infolge des Druckes der eingespritzten Flüssigkeit. Hartmann und Zila (9) stellten im Blute eines Patienten, dem 0,5 g Chinin. mur. intramuskulär eingespritzt worden

war, nach 23 Minuten eine Chininkonzentration von ca. 1:200 000, nach 2 Stunden von ca. 1:800 000 fest. Für diese plötzlich ins Blut gelangenden Anteile des subcutanen oder intramuskulär eingespritzten Chinins dürften die gelegentlich der Besprechung der intravenösen Injektion gemachten Ausführungen ebenfalls zutreffen.

Aus der Arbeit von Cahn und Bronner (5) geht hervor, daß ein Teil des subcutan bzw. intravenös eingespritzten Chinins an der Einspritzungsstelle in Form eines Depots liegen bleibt. Der langsame Abbau dieser Depots manifestiert sich in der enorm verlängerten Kurve der Ausscheidung mit dem Harn. Auch die beim Abbau der Depots ins Blut gelangenden Chininanteile dürften sich dem Verteilungsprinzip entsprechend im Organismus verteilen. Handelt es sich nur noch um verschwindende Spuren des Alkaloids, so dürfte es praktisch darauf hinauskommen, daß sie sofort nach ihrem Eintritt ins Blut von Leber und Nieren abgefangen werden.

Bei der peroralen Verabreichung hält sich der Chininpiegel nach Hartmann und Zila (9) von Anfang an und während mehrerer Stunden annähernd auf der gleichen, im übrigen unbedeutenden Höhe. Man darf daher wohl annehmen, daß die Resorption in diesem Falle so langsam bzw. allmählich vor sich geht, daß der Prozeß der Verteilung des Chinins im Körper mit ihr Schritt halten kann; und eine nennenswerte Konzentration, wie sofort nach der intravenösen Injektion und für die erste Zeit nach der intramuskulären, somit nicht zustande kommen kann. Ob und inwieweit der Umstand, daß das Chinin auf seinem Wege aus dem Darm in den allgemeinen Blutkreislauf die bindende und zerstörende Leber passieren muß, von Bedeutung ist, muß vorläufig dahingestellt bleiben.

Was die Tatsache der je nach der Applikationsweise unterschiedlichen Ausscheidung des Chinins mit dem Harn angeht, so dürfte sie nach der skizzierten Auffassung vorzüglich in der verschiedenen langen Dauer der von Beginn der Resorption bis zur Beendigung der Verteilung währenden Phase ihre Erklärung finden, also jenes Zeitabschnittes, während dessen Leber und Niere größere Chininmengen für ihre spezifische Tätigkeit zur Verfügung stehen als später. Im einzelnen mögen manche besonderen Verhältnisse eine Rolle spielen.

Die von zahlreichen Autoren in verdienstvollen Bemühungen

festgestellten Daten über die Ausscheidungsweise des Chinins nach den verschiedenen Applikationsarten stehen mit der vorliegenden vorläufigen Arbeitshypothese nirgends in einem Gegensatz, der nicht zu überbrücken wäre. Wir sehen davon ab, die vielen Angaben, die sie zu bestätigen scheinen, aufzuzählen. Im übrigen ist zu bedenken, daß jene Daten vorläufig noch zu unzulänglich und vielfach in sich zu unvollständig sind, als daß sie die Grundlage einer zusammenfassenden Anschauungsweise über das Schicksal des Chinins im Organismus bilden könnten. Wie sehr unser Wissen von der Art der Ausscheidung des Chinins trotz der vielen ausgeführten Untersuchungen noch im Fluß ist, zeigt folgendes Beispiel: Nach Mariani (19) und Schmitz (4) ist die Ausscheidung innerhalb der ersten 3 Tage nach subcutaner Injektion kleiner als nach Verabfolgung per os. Giemsa und Schumann (1) stellten dasselbe fest und schlossen hieraus, daß der im Organismus zerstörte Bruchteil des Chinins im ersteren Fall der größere wäre. Wie jedoch nunmehr Cahn-Bronner (5) dargetan hat, ist die Ausscheidung nach der subcutanen Injektion nur verzögert aber nicht verringert, und somit jene Schlußfolgerung hinfällig geworden.

Literaturverzeichnis.

- 1) Arch. f. Schiffs- und Tropenhygiene 11, Beiheft 3, 1907.
- 2) Diese Zeitschr. 95, Heft 1 und 2, 1919.
- 3) Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskr. 88, 458.
- 4) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 56, 801, 1907.
- 5) Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 20, 307, 1919.
- 6) Handb. f. Tropenkrankh. von Wense 5, 374, 1918.
- 7) Berl. klin. Wochenschr. 1919, 123.
- 8) Münch. med. Wochenschr. 65, 591, 1918.
- 9) Arch. f. experim. Pathol. u. Ther. 88, 221, 1918.
- 10) Arch. f. Schiffs- u. Tropenhygiene 13, Beiheft 6, 1909.
- 11) Zeitschr. f. Immunitätsforschung u. experim. Ther. 24, 1915.
- 12) Zeitschr. f. prakt. Augenheilkunde 1918.
- 13) Deutsche med. Wochenschr. 1919, Nr. 25.
- 14) Deutsche med. Wochenschr. 1919, Nr. 31.
- 15) Diese Zeitschr. 8, 98, 1908.
- 16) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 79, 1916.
- 17) Arch. f. Schiffs- u. Tropenhygiene 12, Beiheft 5, 1908.
- 18) Ebendort.
- 19) Atti della Società per gli Studi della Malaria 1904, zitiert nach Cahn-Bronner (5) und Ziemann (6).

Optisch aktive Zimtsäuren und die bei ihrer Bildung nebenher entstehenden Cinnamate der Weinsäure.

Von

Emil Erlenmeyer und Gustav Hilgendorff.

(Aus der biologischen Reichsanstalt zu Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 3. Dezember 1919.)

Die ersten Beobachtungen auf diesem Gebiete haben den Beweis erbracht, daß Moleküle wie das der Zimtsäure unter bestimmten Bedingungen durch den Einfluß einer von asymmetrischen Molekülen ausgehenden richtenden Kraft vorzugsweise in der einen der nach der Theorie Erlenmeyers vorauszu sehenden spiegelbildlichen Konfigurationen eingestellt werden können, deren Überschuß bei einer großen Reihe von Versuchen durch die Bildung von aktivem Zimtsäuredibromid einwandfrei nachgewiesen wurde¹⁾.

Die gemachten Beobachtungen ließen vermuten, daß man unter geeigneten Bedingungen auch stärker aktive Zimtsäurepräparate würde gewinnen können, bei denen sich die Abhängigkeit der beobachteten Aktivität von der Asymmetrie der Moleküle der untersuchten Zimtsäuren durch Analyse und Drehungsvermögen einwandfrei beweisen ließe.

Am nächstliegenden erschien es, dieses Ziel dadurch zu erreichen, daß man das induzierende asymmetrische Molekül unter gleichzeitiger Energiezufuhr in der Form von Wärme auf die zu beeinflussende Zimtsäure zur Einwirkung brachte.

In der ersten Abhandlung über die auf diesem Wege erhaltenen aktiven Zimtsäuren wurden bereits mehrere ihrer Gewinnungsmethoden näher beschrieben²⁾.

¹⁾ Diese Zeitschr. 43, 445, 1912.

²⁾ Diese Zeitschr. 64, 296, 1914.

Unter diesen müssen die Methoden, bei denen die aktive Zimtsäure in der Schmelze lediglich durch die intermolekulare Wirkung der von der Weinsäure ausgehenden asymmetrischen Induktion hervorgebracht wird, unterschieden werden von der Gewinnungsmethode stark aktiver Zimtsäuren durch vorsichtige Verseifung der bei den Schmelzen von Weinsäure mit Zimtsäure oder Zimtsäureanhydrid oder Zimtsäurechlorid sich bildenden Cinnamatgemische, die schon bei der Krystallisation aus heißem Wasser aktive Zimtsäure abspalten. Bei dieser Bildung aktiver Zimtsäuren waren die an Weinsäure gebundenen Zimtsäurereste bei der höheren Temperatur der Schmelze der intramolekularen Wirkung der von der Weinsäure ausgehenden asymmetrischen Orientierung ausgesetzt.

Es erscheint einleuchtend, daß die nach der letzteren Methode gewonnenen aktiven Zimtsäuren am stärksten (bis -20°) drehen, während die durch intermolekulare Wirkung erhaltenen aktiven Zimtsäuren nur ein zwischen 2 und 9° liegendes Drehungsvermögen besaßen.

Beweise für die Abhängigkeit des Drehungsvermögens der beschriebenen aktiven Zimtsäurepräparate von der Anwesenheit molekular asymmetrischer Zimtsäuremoleküle.

Da alle beschriebenen aktiven Zimtsäurepräparate letzten Endes durch Trennung von den gleichzeitig auftretenden, nach der gleichen Richtung drehenden Cinnamatgemischen gewonnen worden sind, so mußte bei der Beweisführung für die Abhängigkeit der Aktivität der beschriebenen Zimtsäuren von der Anwesenheit molekular asymmetrischer Zimtsäuremoleküle auf diese Cinnamatgemische Rücksicht genommen werden, um den Einwurf zu widerlegen, die Aktivität der untersuchten Zimtsäurepräparate könnte durch geringe Mengen noch nicht abgetrennten Cinnamats verursacht sein. Die Berücksichtigung dieser nebenher entstehenden Cinnamate war um so notwendiger, als sich naturgemäß bei unvollständiger Trennung auch Präparate gewinnen ließen, bei denen ein Teil der Aktivität tatsächlich auf Cinnamate zurückzuführen ist, deren Anwesenheit sich sowohl qualitativ durch den Nachweis von Weinsäure als quantitativ durch einen recht erheblichen Fehlbetrag an Kohlenstoff einwandfrei feststellen ließ. Es kann daher nur

bei den Präparaten aktiver Zimtsäure der Beweis für die Abhängigkeit der Aktivität von der Anwesenheit asymmetrischer Zimtsäuremoleküle als schlüssig betrachtet werden, bei denen sich qualitativ keine Weinsäure mehr nachweisen läßt und deren Analyse so genau für Zimtsäure stimmende Werte ergibt, daß die Menge etwa noch nicht abgetrennten Cinnamates weder bei der Analyse noch für das Drehungsvermögen in Betracht kommen kann.

Die bisher aufgefundenen Beweise für die Abhängigkeit des Drehungsvermögens der früher beschriebenen aktiven Zimtsäuren von der Anwesenheit asymmetrischer Zimtsäuremoleküle sind in der Abhandlung „Kritische Betrachtungen über die aktiven Zimtsäuren“ zusammengestellt¹⁾.

Es konnte dort ganz allgemein gezeigt werden, daß es überhaupt nicht möglich ist, durch Mischungen von inaktiver Zimtsäure mit irgendeiner bekannten aktiven Säure Gemenge herzustellen, die bei einheitlichem Charakter und dem Kohlenstoffgehalt der Zimtsäure auch die hohen für die aktive Zimtsäure nachgewiesenen Drehwerte besitzen, da solche zur Herstellung eines Gemenges, das den genannten Bedingungen genügen würde, nötigen Säuren von dem enorm hohen Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -1500^\circ$ nach den bisherigen Erfahrungen nicht bekannt sind und man wohl mit Recht annehmen darf, daß auch in Zukunft so hoch drehende Säuren weder aus natürlichen Quellen noch auf künstlichem Wege zu gewinnen sein werden.

Bei dieser allgemeinen Beweisführung war angenommen worden, daß die Menge der der inaktiven Zimtsäure beige-mengten aktiven Fremdschubstanz 1⁰/₁₀ betrage.

Zur Annahme des Vorhandenseins zum Teil noch viel höher drehender Beimengungen zwingt die spezielle Beweisführung bei den einzelnen Präparaten der früher untersuchten und beschriebenen aktiven Zimtsäuren auf Grund der bei diesen Präparaten erhaltenen Drehwerte und Kohlenstoffzahlen, die nur die Annahme von meist noch kleineren Mengen Fremdschubstanz zulassen.

Bei sieben von den dort angeführten Präparaten müßten

¹⁾ Diese Zeitschr. 74, 137, 1916.
Biochemische Zeitschrift Band 108.

diese durch Cinnamate verunreinigt sein von einem zwischen 1000 bis 2857° liegenden Drehungsvermögen, wenn das Drehungsvermögen auf Fremdsubstanz allein und nicht auf die Anwesenheit molekular asymmetrischer Zimtsäuremoleküle zurückgeführt werden sollte¹⁾.

Da es aber so hochdrehende Körper nicht gibt, so muß naturgemäß der größte Teil der Drehung durch aktive Zimtsäuremoleküle verursacht sein.

Wenn auch die gegebenen Beweisführungen für die selbständige Existenz asymmetrischer, optisch aktiver Zimtsäuremoleküle durchaus zwingend sind, so war es dennoch sehr wertvoll, daß es gelang, durch eingehende vergleichende Trennungen der verschiedenen Schmelzen, bei denen neben aktiver Zimtsäure Cinnamatgemische entstehen, direkt den experimentellen Beweis zu erbringen, daß bei keiner Schmelze eine Substanz von einem höheren Kohlenstoffgehalt als dem der Zimtsäure mit 72,97% Kohlenstoffgehalt gebildet wird. Alle Präparate von diesem Kohlenstoffgehalt, auch die stark aktiven müssen daher wirklich aus Zimtsäuremolekülen der Formel $C_9H_8O_2$ bestehen und können nicht etwa Gemische kohlenstoffreicherer und kohlenstoffärmerer Substanzen verschiedener Zusammensetzung vorstellen. Ferner den Beweis, daß das Maximum des Kohlenstoffgehalts der durch Trennung zu erhaltenen Cinnamatfraktionen den Wert von 64,39%, das ist der für Dicinnamat berechnete, nicht übersteigt, und endlich den Beweis, daß keine der durch Fraktionierung erhaltenen Anteile das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -275^\circ$, das ist das Maximum der Drehung des allein aus der Chloridschmelze erhältlichen kristallisierten Dicinnamates, nur entfernt erreicht.

Es folgt daraus, daß bei keiner der untersuchten Schmelzen irgendeine Substanz entsteht, durch deren Beimengung zu inaktiver Zimtsäure das hohe Drehungsvermögen der beschriebenen Präparate von aktiver Zimtsäure erklärt werden könnte. Die Ursache der Aktivität dieser Präparate kann daher nur in der asymmetrischen Konfiguration der Zimtsäuremoleküle selbst gefunden werden.

¹⁾ Diese Zeitschr. 74, 152, 1916.

Annähernde Feststellung der in den kolloidalen Cinnamatgemischen der verschiedenen Schmelzen von Weinsäure mit Zimtsäurechlorid, Zimtsäureanhydrid und Zimtsäure bei 168 bis 170° erhaltenen Bestandteile durch fraktionierte Trennung und Bestimmung ihres Kohlenstoffgehalts und Drehungsvermögens.

Die Herstellung der genannten Schmelzen wurde bereits in den früheren Abhandlungen beschrieben¹⁾. Die Verarbeitung der Schmelzen zur Scheidung der in ihnen vorhandenen Bestandteile wurde in verschiedener Weise vorgenommen.

Zur Abtrennung der Hauptmenge der Zimtsäure eignet sich am besten das fortgesetzte Ausziehen der getrockneten gepulverten Schmelze mit Ligroin auf dem Wasserbade.

Die Zimtsäuren der ersten Auszüge erwiesen sich stärker aktiv als die der darauf folgenden. Durch das Ausziehen mit Ligroin findet eine Scheidung statt in einen in Ligroin unlöslichen, stark aktiven Rückstand und in Ligroin lösliche aktive Zimtsäure.

Da die aus den ersten Auszügen gewonnenen Zimtsäurepräparate am stärksten aktiv sind, so folgt daraus, daß die Hauptmenge der entstandenen aktiven Zimtsäure als leichtest löslicher Anteil der Schmelze zuerst in Lösung geht.

Um unverändert gebliebene Weinsäure aus dem in Ligroin unlöslichen Rückstand abzuscheiden und zu bestimmen, wird dieser mit Äther behandelt, wobei die Weinsäure zusammen mit etwas krystallisiertem Weinsäuremonocinnamat ungelöst zurückbleibt.

Die in Äther löslichen Substanzen stellen die ihres kolloidalen Charakters wegen durch äußere Merkmale nicht unterscheidbaren Cinnamatgemische vor, deren Verschiedenheiten erst bei der weiteren fraktionierten Trennung deutlich zutage treten.

Die fraktionierte Trennung wurde entweder nach der verschiedenen Löslichkeit der Bestandteile des Cinnamatgemisches in Benzol oder nach der verschiedenen, bei der fraktionierten

¹⁾ Diese Zeitschr. 64, 296, 1914.

Ansäuerung der in Soda gelösten Bestandteile zutage tretenden Säurestärke vorgenommen.

Da die Erfahrung lehrte, daß auch aus den durch Ligroinauszug von Zimtsäure befreiten Cinnamatgemischen bei der fraktionierten Ansäuerung die zuerst in Freiheit gesetzten Anteile noch Zimtsäure enthalten, die oft hartnäckig von den kolloidalen Cinnamaten zurückgehalten wird, so kann man auch die Schmelzen direkt ohne vorheriges Ausziehen mit Ligroin der fraktionierten Ansäuerung unterwerfen.

In anderen Fällen wurden beide Methode der fraktionierten Trennung miteinander kombiniert.

Da die Beschreibung aller ausgeführten fraktionierten Trennungen in allen Einzelheiten zu sehr ermüden würde, so sollen zunächst die bei den Versuchen angewandten Methoden beschrieben und dann die bei den einzelnen Versuchen gewonnenen Resultate der Trennungen in möglichst gedrängter Form zusammengestellt werden.

Fraktioniertes Ausziehen mit Benzol.

Man übergießt die Substanz mit einer bestimmten Menge Benzol, erhitzt mit aufgesetztem Steigerrohr längere Zeit auf dem Wasserbad, gießt dann die Benzollösung von dem Rückstand ab und läßt erkalten. Der Rückstand wird dann aufs neue in der nämlichen Weise mit Benzol ausgezogen. Es kann dies Verfahren fortgesetzt werden, bis kaum mehr etwas in Lösung geht. Die in die Auszüge eingegangenen Substanzmengen werden dann durch Abdampfen des Benzols bestimmt und auf ihre Eigenschaften geprüft.

Trennung durch fraktionierte Ansäuerung.

Die durch Ligroinauszug von der Hauptmenge der Zimtsäure befreiten Cinnamatgemische sind ebenso wie alle bei ca. 168° hergestellten Schmelzen von Zimtsäure, Zimtsäureanhydrid und Zimtsäurechlorid mit Weinsäure in kalter verdünnter Sodalösung unter Kohlensäureentbindung löslich. Der Vorgang der Lösung bedarf allerdings des kolloidalen Charakters der Substanz wegen oft längerer Zeit.

Zur Durchführung der fraktionierten Ansäuerung nimmt man die Lösung am zweckmäßigsten mit $\frac{1}{10}$ -Sodalösung vor

und stellt nach eingetretener Lösung sogleich das Volumen fest. Sodann läßt man bis zur beginnenden Trübung $\frac{1}{10}$ -Salzsäure zufließen. Durch Berechnung erfährt man leicht, wieviel Natrium an organische Säure gebunden sich noch in Lösung befindet. Je nachdem, ob man in zwei oder mehr Fraktionen die an Natrium gebundenen organischen Säuren in Freiheit setzen will, berechnet man die auf jede Fraktion treffende $\frac{1}{10}$ -Salzsäure in Kubikzentimetern.

Nach Zusatz des ersten auf jede Fraktion treffenden Anteils von Salzsäure schüttelt man die dadurch in Freiheit gesetzte organische Säure mit Äther aus und läßt nach der Trennung die ätherische Lösung verdunsten. Der verbleibende Rückstand stellt die 1. Fraktion dar.

Zu der abgetrennten wäßrigen Lösung setzt man sodann den gleichen Anteil von Salzsäure wie eben hinzu und gewinnt in der nämlichen Weise die 2. Fraktion usw.

Man kann natürlich auf diese Weise die Sodalösung in beliebig viele Fraktionen zerlegen. In den meisten Fällen haben wir uns mit der Herstellung von 4 Fraktionen begnügt. Einige Male wurde eine der so erhaltenen Fraktionen aufs neue in zwei oder mehr Fraktionen zerlegt.

Kombination beider Trennungsmethoden.

Auch Kombinationen der beiden beschriebenen Trennungsmethoden, des Benzolauszugs und der fraktionierten Ansäuerung kamen zur Anwendung, indem entweder die durch die Ansäuerungsmethode erhaltenen Fraktionen dem fraktionierten Ausziehen mit Benzol unterworfen wurden oder auf den beim Ausziehen mit Benzol verbleibenden Rückstand die fraktionierte Ansäuerung angewandt wurde.

Durch die geschilderten Trennungsmethoden lassen sich die bei den verschiedenen Schmelzen entstehenden Produkte bis in ihre letzten Bestandteile verfolgen.

Die erhaltenen Resultate liefern den einwandfreien Beweis, daß von allen Bestandteilen die aktive Zimtsäure den höchsten Kohlenstoffgehalt besitzt. Die hochdrehenden aktiven Zimtsäurepräparate von genauest stimmendem Kohlenstoffgehalt müssen daher asymmetrische Zimtsäuremoleküle enthalten.

Von großer Bedeutung für die Beurteilung der bei den

verschiedenen Schmelzen erhaltenen Zimtsäuren war ferner die durch fraktionierte Trennung geförderte Erkenntnis, daß die neben Zimtsäure in den Schmelzen gebildeten Cinnamatgemische untereinander verschieden sind.

Cinnamate.

Die von einer großen Reihe von Fraktionen der Cinnamatgemische sowohl des bei der Zimtsäurechlorid-, als der Zimtsäureanhydrid-, als der Zimtsäureschmelze lieferten Kohlenstoffwerte, die zwischen 55,76^o/_o, dem Kohlenstoffgehalt des Monocinnamates, und 64,39^o/_o, dem Kohlenstoffgehalt des Dicinnamates, liegen. Cinnamate von höherem Kohlenstoffgehalt sind in keiner Schmelze enthalten.

Ein krystallinisches Monocinnamat, das bei der Zimtsäure-Weinsäureschmelze entsteht, konnten wir bereits in unserer ersten und in der kürzlich erschienenen Abhandlung beschreiben¹⁾. Daß bei der Chloridschmelze bei 110° Monocinnamat nicht nachweisbar ist, obwohl es vorübergehend als Zwischenprodukt gebildet werden muß, haben wir in unserer letzten Abhandlung bereits gezeigt²⁾. Der Grund dafür konnte nur in der raschen Umwandlung des jeweils sich bildenden Monocinnamates in Dicinnamat gefunden werden.

In der Zimtsäureanhydridschmelze dagegen ließ sich die Anwesenheit von Monocinnamat zweifelsfrei feststellen, das sich durch seine Löslichkeit in Wasser auch in der Kälte, durch seine geringe Löslichkeit in kaltem Äther, durch seine Schwerlöslichkeit in Chloroform, durch sein niedriges Drehungsvermögen sowie durch seinen hohen Schmelzpunkt leicht erkennen läßt.

Ein zweites krystallisiertes Cinnamat hatten wir zuerst aufgefunden bei der durch Erhitzen von Zimtsäurechlorid und Weinsäure auf 110° erhaltenen Schmelze³⁾. Es entsteht dabei aus einem krystallisierten Anhydrid durch Wasseraufnahme.

Dieses nur bei den Chloridschmelzen zu beobachtende krystallisierte Dicinnamat zeichnet sich durch den ziemlich

¹⁾ Diese Zeitschr. 77, 57, 1916.

²⁾ Diese Zeitschr. 77, 82, 1916.

³⁾ Diese Zeitschr. 77, 78, 1916.

hohen Schmelzpunkt 166 bis 167° und das Drehungsvermögen — 275° aus.

Aus den bei 168 bis 170° ausgeführten Chloridschmelzen läßt sich dieses Dicinnamat durch Ausziehen mit heißem Benzol, in dem es von allen Cinnamaten am leichtesten löslich ist, von den nebenher gebildeten Cinnamaten unschwer trennen und nachweisen.

Die Anwesenheit dieses hochdrehenden krystallinischen Dicinnamates macht es verständlich, daß, wie in der letzten Abhandlung in den drei Tabellen gezeigt wurde, die bei 168 bis 170° erhaltenen Chloridschmelzen soviel höher drehen als die aus den Zimtsäureanhydrid- oder Zimtsäureschmelzen gewonnenen Cinnamatgemische.

Da es nicht gelang, durch Ausziehen der Cinnamatgemische aus den beiden zuletzt genannten Schmelzen mit Benzol dieses charakteristische Dicinnamat abzuscheiden, so muß angenommen werden, daß es bei der Anhydrid- und Zimtsäureschmelze überhaupt nicht gebildet wird und daß die bei diesen Schmelzen erhaltenen kolloidalen Fraktionen vom Kohlenstoffgehalt des Dicinnamats relativ isomere Konfigurationen des Dicinnamats von beträchtlich niedrigerem Drehwert vorstellen.

Wie schon in der ersten Abhandlung über aktive Zimtsäuren gezeigt werden konnte, gelingt es bei der Anhydridschmelze bis zu $[\alpha]_D - 9^\circ$ drehende Zimtsäurepräparate von genauestens für Zimtsäure stimmendem Kohlenstoffgehalt zu gewinnen neben einem etwa 100° drehenden kolloidalen, in Ligroin unlöslichen Cinnamatgemisch¹⁾.

Zum Unterschied von diesem Ergebnis ließ sich aus den Chloridschmelzen nur sehr niedrig, ca. 2 bis 3° drehende Zimtsäure ausziehen trotz des gleichzeitigen Vorhandenseins des am höchsten drehenden Dicinnamates, das nicht nur reichlich in Benzol, sondern auch, wie besondere Versuche ergeben haben, in hochsiedendem Ligroin etwas löslich ist. Dadurch wird aufs neue der Einwand widerlegt, es könnte die Aktivität der beschriebenen Zimtsäurepräparate, zumal der aus der Anhydridschmelze gewonnenen, durch beigemischtetes Cinnamat verursacht sein, und ein weiterer

¹⁾ Diese Zeitschr. 64, 333, 1914.

wichtiger Beweis erhalten für die tatsächliche Entstehung asymmetrischer Zimtsäuremoleküle in den untersuchten Schmelzen.

Cinnamate der Diweinsäure.

Außer den erwähnten kristallisierten Cinnamaten der Weinsäure wurden sowohl bei der Chloridschmelze als der Anhydridschmelze stets auch Fraktionen erhalten, die den Kohlenstoffgehalt 62,5 % besaßen, der einem Tricinnamat der Diweinsäure von der Formel $C_{33}H_{33}O_{14}$ entspricht, das als Monodicinnamat bezeichnet wurde.

Die Auffindung von Fraktionen von einem geringeren Kohlenstoffgehalt als dem des Monodicinnamats und einem höheren Kohlenstoffgehalt als dem des Monocinnamats lassen es nicht unmöglich erscheinen, daß in den Schmelzen noch andere von der Diweinsäure ableitbare Cinnamate von niedrigerem Drehungsvermögen und Kohlenstoffgehalt enthalten sein können.

Dabei erscheint es allerdings zweifelhaft, ob solche Substanzen als primär bei der Schmelze gebildet anzusehen sind oder ob sie erst bei der Fraktionierung aus dem Monodicinnamat unter Austritt von Zimtsäure entstanden gedacht werden müssen.

Zum Unterschied von den beiden erwähnten kristallisierten Cinnamaten sind alle übrigen durch Fraktionierung erhaltenen Cinnamate, deren Kohlenstoffgehalt zwischen dem für Monocinnamat 55,71 % und dem für Dicinnamat 64,39 % berechneten Wert liegt, durchweg amorph und ihre Drehwerte liegen unter 200°.

Bei dem kolloidalen Charakter der durch Fraktionierung zu erhaltenden Cinnamate bieten die Verbrennung und das Drehungsvermögen die einzigen Unterscheidungsmittel.

Da sich nun auch Fraktionen abscheiden ließen, die bei gleichem Kohlenstoffgehalt und gleichem Aussehen ein recht verschiedenes Drehungsvermögen besitzen, so bleibt wohl nur der Schluß zulässig, daß einzelne der Cinnamate in relativ isomeren Modifikationen von verschiedenem Drehungsvermögen und verschiedener Löslichkeit auftreten können, was sich leicht verstehen läßt unter der Annahme, daß die Zimtsäurereste in ihnen bis zu einem verschiedenen Grad in ihrer einen asymmetrischen Konfiguration eingestellt sind. Bei dem vorwiegen-

den kolloidalen Charakter der der Trennung unterworfenen Gemische kann es sich bei den nunmehr folgenden Versuchen nur um die annähernde Feststellung der in den kolloidalen Cinnamatgemischen der verschiedenen Schmelzen enthaltenen Bestandteile durch die fraktionierte Trennung handeln, die jedoch vollkommen genügt, um zu beweisen, daß die getrennten Substanzen tatsächlich durch Wasseraustritt aus Weinsäure- und Zimtsäuremolekülen gebildete Cinnamate sind, deren Kohlenstoffgehalt 64,39%, das ist der für Dicinnamat berechnete, nicht übersteigt, da alle Fraktionen bei der Zersetzung in Weinsäure und Zimtsäure zerfallen.

Da es bisher üblich war, bei der Durchführung von Trennungen organischer Substanzen nur krystallisierende Bestandteile zu berücksichtigen, so stellte die Trennung dieser kolloidalen Cinnamate eine völlig neue Aufgabe vor, die mit den zur Verfügung stehenden Methoden naturgemäß niemals so vollständig zu lösen ist als die Trennung krystallisierter und daher leicht definierbarer Substanzen.

Experimenteller Teil.

Trennung der durch Verschmelzen von Weinsäure mit Zimtsäurechlorid, mit Zimtsäureanhydrid und mit Zimtsäure bei 168 bis 170° entstehenden kolloidalen Substanzen.

Die bei der ersten Chloridschmelze bei 168° erhaltene kolloidale Substanz zeigte, wie in der ersten Abhandlung bereits mitgeteilt wurde, den gleichen Drehwert $[\alpha]_D = -102^\circ$, wie er bei mehreren kolloidalen Substanzen aus Anhydridschmelzen beobachtet worden war¹⁾. Da auch die Kohlenstoffwerte der aus den beiden genannten Schmelzen gewonnenen kolloidalen Substanzen fast genau den für ein Dicinnamat der Weinsäure errechneten Zahlen entsprechen, so lag damals am Anfang der Untersuchung kein Anlaß vor, diese äußerlich nicht unterscheidbaren kolloidalen Substanzen für verschieden zu halten.

Erst bei öfterer Wiederholung beider Schmelzen ergab sich, daß die Chloridschmelze bei 168 bis 170° nur nach längerer Schmelzdauer kolloidale Substanz von einem bei etwa 100°

¹⁾ Diese Zeitschr. 64, 329, 1914.

liegenden Drehungsvermögen liefert. Bei kürzerer Schmelzdauer dagegen werden, wie aus den Tabellen in unserer letzten Abhandlung zu ersehen ist, kolloidale Substanzen mit einer Maximaldrehung von $[\alpha]_D = -163^\circ$ erhalten¹⁾, während der Drehwert der kolloidalen Substanz aus der Anhydridschmelze unter gleichen Bedingungen bei den meisten Versuchen recht erheblich unter 100° gefunden wird und der Drehwert von ca. 100° nur bei wenig Schmelzen erreicht wurde.

Die wiederholt ausgeführten Schmelzen überzeugten uns, daß die hierbei erhaltenen kolloidalen Substanzen trotz der äußeren Ähnlichkeit nicht miteinander identisch sind.

Die im folgenden mitgeteilten Trennungsversuche beweisen vielmehr, daß die äußerlich homogen aussehenden kolloidalen Substanzen in Anteile von verschiedenen Eigenschaften und verschiedener Zusammensetzung zerlegt werden können, die den gefundenen C-Werten nach nur als Gemische von Cinnamaten angesprochen werden können, deren Trennung bei ihrem kolloidalen Charakter und dem dadurch bedingten Fehlen äußerer Unterscheidungsmerkmale naturgemäß außerordentlich erschwert ist.

Die Verschiedenheiten der bei der Anhydridschmelze einerseits und der bei der Chloridschmelze andererseits erhaltenen kolloidalen Cinnamatgemische ergab sich zuerst aus den folgenden beiden fraktionierten Auszugsversuchen mit Benzol.

1. Anhydridschmelze.

Die Trennung der kolloidalen Substanz einer bei 168 bis 170° dargestellten Anhydridschmelze, die nach Abtrennung der Zimtsäure mit Ligroin das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -102^\circ$ (in Soda) aufwies, durch Ausziehen mit Benzol ergab:

in Sodälösung	in Äther
1. Auszug: $[\alpha]_D = -99^\circ$	$[\alpha]_D = -73^\circ$,
2. " $[\alpha]_D = -112^\circ$	$[\alpha]_D = -98,7^\circ$,
Rückstand: $[\alpha]_D = -82^\circ$	$[\alpha]_D = -36,1^\circ$.

2. Chloridschmelze.

Bei der Trennung der kolloidalen Substanz einer 45 Minuten bei 168 bis 170° gehaltenen Chloridschmelze von dem Drehungs-

¹⁾ Diese Zeitschr. 77, 61, 1916.

vermögen $[\alpha]_D = -153^\circ$ in Soda durch Ausziehen mit Benzol wurde dagegen gefunden:

in Sodalösung

1. Auszug: $[\alpha]_D = -151^\circ$,

2. " $[\alpha]_D = -145^\circ$,

3. " $[\alpha]_D = -175^\circ$,

4. " $[\alpha]_D = -183^\circ$,

Rückstand: $[\alpha]_D = -106^\circ$.

Von den beiden Schmelzen gehen höher drehende Anteile in die Benzollösung, während sehr viel weniger drehende kolloidale Bestandteile nach dem Ausziehen mit Benzol ungelöst zurückbleiben.

Weitere Tronnungsversuche mit Chloridschmelzen.

1. Fraktioniertes Ausziehen einer durch Erhitzen auf 168 bis 170° erhaltenen Chloridschmelze mit Benzol.

Um wömöglich eine weitere Aufklärung über die in Benzol löslichen und die in Benzol unlöslichen Bestandteile zu erhalten, wurde die folgende Chloridschmelze der Benzolausziehung unterworfen.

16,66 g Zimtsäurechlorid und 7,59 g Weinsäure wurden zuerst 25 Minuten bei 100 bis 135° und dann 30 Minuten bei 168 bis 170° geschmolzen. 0,20 g der Schmelze in Sodalösung — Vol. 20 com — drehten im 2-dm-Rohr $\alpha = -3,22^\circ$, d. i. $[\alpha]_D = -161^\circ$.

Von dieser Schmelze wurden 17 g 10 mal hintereinander mit Benzol ausgezogen.

In den ersten Benzolauszug von dem Volumen 250 com war die Hauptmenge der Substanz eingegangen, die sich aus der erkalteten Lösung an Wandung und Boden zunächst in kolloidaler Form abschied. Bei längerem Stehen schieden sich jedoch allenthalben weiße krystallinische Drusen ab von dem äußeren Aussehen des krystallinischen Dicinnamats und von dessen Schmelzpunkt 167°. Allmählich nahm der größte Teil der Ausscheidung krystallinische Beschaffenheit an. Es gelang, die krystallinischen Drusen von der Gefäßwand loszulösen. Nach dem Waschen mit wenig Äther und Trocknen bei 110° zeigten sie das Drehungsvermögen in Sodalösung $[\alpha]_D = -265,09^\circ$ und stellten somit krystallisiertes Dicinnamat von nur wenig niedrigerem Drehwert, als wie früher gefunden wurde, dar.

Es ergibt sich daraus, daß in der kolloidalen bei 168 bis 170° hergestellten Chloridschmelze eine beträchtliche Menge des aus primär gebildetem Dicinnamat anhydrid durch Wasseraufnahme entstehenden krystallinischen Dicinnamats enthalten ist, das beim Ausziehen mit heißem Benzol zusammen mit Zimtsäure zuerst in Lösung geht. Die Zimtsäure scheidet sich jedoch erst bei weiterem Verdunsten der Lösung ab. Auch aus den Auszügen 2 und 3 schieden sich beim Stehen Globuliten des krystallinischen Dicinnamats ab.

Die Auszüge 4 bis 10 wurden sogleich eingedampft und die kolloidalen Rückstände in Soda gelöst auf ihr Drehungsvermögen untersucht.

Die für die Auszüge verwendeten Mengen von Benzol schwankten zwischen 100 und 200 ccm.

4. Auszug:	0,0949 g,	Rückstand:	$[\alpha]_D = -139^\circ$,
5. "	0,3010 g,	"	$[\alpha]_D = -176^\circ$,
6. "	0,1450 g,	"	$[\alpha]_D = -165^\circ$,
7. "	0,0678 g,	"	$[\alpha]_D = -153^\circ$,
8. "	0,0351 g,	"	$[\alpha]_D = -153^\circ$,
9. "	0,1029 g,	"	$[\alpha]_D = -165^\circ$,
10. "	0,1251 g,	"	$[\alpha]_D = -160^\circ$.

Der nach 10 mal wiederholtem Ausziehen verbleibende kolloidale Rückstand wurde zur Trennung von unveränderter Weinsäure und einigen Glassplittern in Äther gelöst und die Lösung nach Filtration verdunstet. Es verblieben 3,4 g glasige Substanz, deren Drehung in Soda $[\alpha]_D = -133,60^\circ$ betrug.

0,1440 g bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Substanz gaben 0,3175 g CO_2 und 0,0577 g H_2O .

Berechnet für Monodicinnamat $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$:	C 62,50
	H 4,17
Gefunden:	C 60,13
	H 4,45

Der Versuch lehrt, daß das in der bei 168 bis 170° ausgeführten Chloridschmelze enthaltene krystallinische Dicinnamat vom Schmelzpunkt 167° und dem über 200° liegenden Drehwert am leichtesten in Benzol löslich ist, da es bei den ersten Auszügen in Lösung geht. Die durch die weiteren Auszüge gewonnenen kolloidalen Substanzen drehen beträchtlich unter 200°.

Den tiefsten Drehwert, nämlich $[\alpha]_D = -133^\circ$, zeigt auch bei diesem Versuch der in Benzol schwerst lösliche Rückstand, der nach der Analyse noch kein einheitliches Cinnamat vorstellt.

Von besonderer Wichtigkeit ist die Feststellung, daß man mit Hilfe von Benzol, das in diesem Lösungsmittel am leichtest lösliche krystallisierte Diocinnamat ohne Schwierigkeit von den kolloidalen Anteilen der Schmelze trennen und durch seine Eigenschaften identifizieren kann.

2. Trennung einer bei 168 bis 170° hergestellten Chlorschmelze im Verhältnis 1 Weinsäure auf 2 Chlorid von dem Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -150^\circ$ (in Soda) durch fraktionierte Ansäuerung.

2,4 g dieser Schmelze wurden nach der eingangs angegebenen Methode in 4 Fraktionen zerlegt, deren erste der Hauptmenge nach aus Zimtsäure bestand, während die übrigen drei kolloidaler Natur waren.

	In Ather	In Soda	Analyse
1. Fraktion:	$[\alpha]_D = -36,3^\circ$		—
2. „	$[\alpha]_D = -109^\circ$	—	{ 63,88 C 4,78 H
3. „	$[\alpha]_D = -149^\circ$	$[\alpha]_D = -193^\circ$	—
4. „	$[\alpha]_D = -155^\circ$	$[\alpha]_D = -193^\circ$	{ 62,21 C 4,50 H

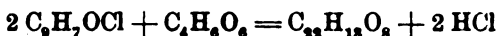
Es berechnet sich für:

Zimtsäure	$C_9H_8O_2$	C 72,97	H 5,41
Weinsäure	$C_4H_6O_6$	C 32,00	H 4,00
Monocinnamat der Diweinsäure	$C_{17}H_{16}O_{12}$	C 49,51	H 3,88
Monocinnamat der Weinsäure	$C_{12}H_{12}O_7$	C 55,71	H 4,29
Dicinnamat der Diweinsäure .	$C_{26}H_{22}O_{18}$	C 57,56	H 4,06
Monodicinnamat	$C_{25}H_{20}O_{14}$	C 62,50	H 4,17
Dicinnamat	$C_{24}H_{18}O_8$	C 64,39	H 4,39

Die Säure der 1. Fraktion — 0,5243 g — wurde mit heißem Ligroin ausgekocht: Ungelöstes Cinnamat 0,1535 g, in ätherischer Lösung gedreht $[\alpha]_D = -85^\circ$; auskrystallisierte Zimtsäure 0,25 g vom Schmelzpunkt 132° und dem Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -4,0^\circ$ in Soda. Es berechnen sich auf die ganze Schmelze ca. 15% Zimtsäure.

Die Säure der Fraktion 2 gab an heißes Ligroin eine nur sehr geringe Menge von Zimtsäure ab.

Bemerkenswert ist die große Menge freier Zimtsäure in der bei 168 bis 170° ausgeführten Zimtsäurechlorid-Weinsäureschmelze bei Anwendung von 2 Molekülen Zimtsäurechlorid und 1 Molekül Weinsäure. Würde die Reaktion nach der Gleichung



lediglich bis zur Bildung von Dicinnamat führen, so wäre das Auftreten von freier Zimtsäure in der Schmelze unmöglich.

Nach der kürzlich mitgeteilten Untersuchung der bei 105 bis 110° durchgeführten Zimtsäurechlorid-Weinsäureschmelze 2:1 findet bereits bei dieser Temperatur eine über das Dicinnamat hinausgehende zu einem Tricinnamat und sodann unter Zimtsäureabspaltung zu Dicinnamatanhydrid führende Reaktion statt, die naturgemäß auch bei den bei 168 bis 170° ausgeführten Schmelzen durchlaufen werden muß. Es wird damit die Anwesenheit der freien Zimtsäure auch bei den bei höherer Temperatur ausgeführten Schmelzen ohne weiteres verständlich.

Die Drehwerte der Fraktionen steigen an. In Sodalösung abgelesen zeigen Fraktion 3 und 4 den höchsten Drehwert $[\alpha]_D = -193^\circ$, während der Drehwert des kristallisierten Dicinnamats -275° beträgt. Nach der Verbrennung durften die Fraktionen 3 und 4 größtenteils aus Monodicinnamat bestehen. Die Bildung dieses Cinnamats kann entweder auf die Umsetzung bei der Schmelze gebildeter Diweinsäure mit Zimtsäure oder auf die Addition von intermediär gebildetem Monocinnamat an Dicinnamatanhydrid oder auf die Verknüpfung zweier Dicinnamatmoleküle unter Austritt eines Moleküls Zimtsäure oder endlich auf Wasserabspaltung aus einem Molekül Dicinnamat und einem Molekül Monocinnamat zurückgeführt werden.

Der Kohlenstoffwert der zweiten Fraktion liegt zwischen dem für Dicinnamat (64,34%) und dem für Monodicinnamat berechneten Wert (62,50%). Nach Auffindung wenn auch nur geringer Mengen von Zimtsäure in dieser Fraktion muß deren Hauptmenge aus einer etwas höher drehenden Substanz von niedrigerem Kohlenstoffgehalt bestehen.

Wenn man auch bei der fraktionierten Trennung solcher Gemenge von kolloidalen Substanzen nicht erwarten darf, zu

Fractionen zu gelangen, deren Einheitlichkeit sich mit Hilfe der uns zur Verfügung stehenden Untersuchungsmethoden beweisen läßt, so zeigt der Versuch doch bereits deutlich, daß man in der Schmelze nicht mit Bestandteilen von außerordentlich hohem Drehungsvermögen oder von einem Kohlenstoffgehalt rechnen kann, der dem der Zimtsäure nahekommt, geschweige denn ihn übertrifft, was auch alle anderen Trennungen bestätigen.

3. Trennung einer bis 168° erhitzten Chloridschmelze 1:2 durch fraktionierte Ansäuerung. Nachweis von rechtsdrehendem Dicinnamatanhydrid.

Eine Schmelze von 1 Mol Weinsäure und 2 Mol Zimtsäurechlorid wurde zuerst eine halbe Stunde bei 105 bis 135° und sodann noch eine halbe Stunde bei 167 bis 168° gehalten. Die etwas bräunlich gefärbte, kolloidale Schmelze drehte in Soda gelöst $[\alpha]_D = -105,6^\circ$.

Zum Nachweis etwa noch nicht aufgespaltenen rechtsdrehenden Dicinnamatanhydrids, das sich, wie in einer früheren Abhandlung gezeigt wurde, in allen bei etwa 105° durchgeführten Schmelzen in beträchtlicher Menge vorfindet, wurden 9,8 g der Schmelze in Äther gelöst und so lange mit einer verdünnten Lösung von Natriumbicarbonat geschüttelt, bis eine Kohlen säureentbindung nicht mehr zu beobachten war.

Die ätherische Lösung — Vol. 60 ccm — drehte im 1-dm-Rohr $\alpha = +0,26^\circ$. Nach dem Verdunsten des Äthers verblieb ein Rückstand von 0,1 g kolloidaler Substanz, wonach sich für die ätherische Lösung das $[\alpha]_D = +260^\circ$ berechnet.

Nach der Gewinnungsweise und der Rechtsdrehung liegt hier also eine geringe Menge rechtsdrehenden Dicinnamatanhydrids in kolloidaler Form vor.

Die Bicarbonatlösung wurde durch Ansäuern mit Salzsäure und darauffolgendem Ausäthern in vier gleiche Fractionen zerlegt:

	in Äther	in Soda	Analyse
1. Fraktion	$[\alpha]_D = -13,5^\circ$	—	—
2. "	$[\alpha]_D = -68,1^\circ$	$[\alpha]_D = -110^\circ$	C 63,22 H 4,56
3. "	$[\alpha]_D = -114,3^\circ$	$[\alpha]_D = -159^\circ$	C 62,80 H 4,40
4. "	$[\alpha]_D = -115,2^\circ$	$[\alpha]_D = -151,5^\circ$	C 60,28 H 4,37

Der Rückstand der ätherischen Lösung der ersten Fraktion wog 2,1 g und war teils krystallinisch, teils glasiger Natur. Durch Auskochen mit heißem Ligroin wurden daraus 1,3 g bei 133° schmelzender Zimtsäure gewonnen vom Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -2,0^\circ$.

Das in Ligroin ungelöst gebliebene kolloidale Cinnamat besaß in Sodalösung gemessen das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -90,0^\circ$.

Unter Berücksichtigung der in der Ligroin-Mutterlauge verbliebenen Zimtsäure erhielten die 9,8 g Schmelze 1,6 g Zimtsäure, d. i. 16,3⁰/₀.

Die beim Verdunsten der ätherischen Lösungen von Fraktion 2 bis 4 verbleibenden Rückstände sind vollständig kolloidaler Natur.

Wie bei der ersten Fraktionierung zeigen die Fraktionen 3 und 4 fast das gleiche Drehungsvermögen. Die dritte Fraktion besitzt annähernd den Kohlenstoffgehalt des Monocinnamats, die vierte Fraktion einen um 2⁰/₀ niedrigeren, was auf das Vorhandensein geringer Mengen unveränderter Weinsäure, die, wie die Erfahrung gelehrt hat, zusammen mit kolloidalen Cinnamaten auch in Äther geht oder von Monocinnamat mit dem Kohlenstoffgehalt von 55,0⁰/₀ hindeutet. Die vierte Fraktion wurde deshalb zur weiteren Untersuchung dreimal mit Benzol ausgezogen. Aus den Benzolauszügen krystallisierte Diocinnamat in der charakteristischen Form von Drusen vom F. P. 164°. Der in Benzol ungelöst gebliebene Teil wurde zur weiteren Scheidung in ätherischer Lösung zweimal mit Wasser zur Aufnahme von etwa vorhandenem Monocinnamat geschüttelt. Nach dem Verjagen des Äthers hinterblieb kolloidales Cinnamat, das in Soda das $[\alpha]_D = -132,0^\circ$ zeigte und bei der Verbrennung 60,80 C und 4,83 H lieferte. Die wäßrigen Auszüge enthielten 0,0353 g teilweise krystallinische Substanz, die das $[\alpha]_D = -25,4^\circ$ in Soda zeigte. Hiernach scheint die Schmelze geringe Mengen des -18° drehenden Monocinnamats enthalten zu haben.

4. Trennung der durch Ansäuerung erhaltenen Fraktionen einer Chloridschmelze durch Ausziehen mit Benzol.

Eine zuerst eine halbe Stunde bei 105 bis 135° und sodann ebenso lange bei 160° gehaltene Chloridschmelze 1:2 zeigte in Sodalösung das Drehungsvermögen $(\alpha)_D = -142^\circ$.

Wie bei dem vorhergehenden Versuch wurde auch diesmal auf die Anwesenheit von Dicinnamatanhydrid geprüft, indem die ätherische Lösung von 7,3 g Schmelze zur Trennung des sauren Cinnamats von dem neutralen Dicinnamatanhydrid mit Bicarbonatlösung bis zum Aufhören der Kohlensäureentwicklung geschüttelt wurde.

Auch diesmal hinterließ die ätherische Lösung eine indifferenten Substanz, die im 1-dm-Rohr — Vol. 60 ccm — $\alpha = +0,70^\circ$ drehte. Da beim Verdunsten der Lösung 0,4 g Substanz zurückblieben, so berechnet sich für c 0,67 und für $[\alpha]_D +104,5^\circ$.

Der rechtsdrehende Rückstand, in feuchtem Äther aufs neue gelöst, zeigte das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -176^\circ$. Durch dieses Verhalten wurde die Anwesenheit einer geringen Menge Dicinnamatanhydrids außer Frage gestellt.

Die Bicarbonatlösung wurde zunächst mit Normal-Salzsäure neutralisiert und sodann durch die nämliche Salzsäure in vier gleichen Fraktionen angesäuert.

Wie bei dem vorhergehenden Versuch bestand auch hier die zuerst in Freiheit gesetzte Fraktion von 1,5 g und dem $[\alpha]_D = -13,5^\circ$ zum größten Teil aus Zimtsäure.

Beim Ausziehen mit Ligroin gingen 1,2 g Zimtsäure vom $[\alpha]_D = -3,2^\circ$ in Lösung. Für die angewandte Substanz berechnen sich danach ca. 16% Zimtsäure. Der in Ligroin unlösliche Rückstand dreht in Soda $[\alpha]_D = -90^\circ$.

Von besonderer Wichtigkeit für die Beurteilung der bei der Chloridschmelze gebildeten Bestandteile sind die kolloidalen Fraktionen 2 bis 4, über deren weitere Trennung die folgende Tabelle Aufschluß gibt:

2. Fraktion.	3. Fraktion.	4. Fraktion.
$[\alpha]_D$ in Äther = $-82,1^\circ$	$[\alpha]_D$ in Äther = $-125,3^\circ$	$[\alpha]_D$ in Äther = $-136,2^\circ$
" " Soda = -118°	" " Soda = -140°	" " Soda = -164°
C = 63,74, H = 4,91.	C = 63,26, H = 4,84.	C = 61,25, H = 4,72.

Von diesen Fraktionen wurden

1,5475 g

1,5694 g

0,8786 g

mit je 50 ccm Benzol ausgekocht und die Auszüge heiß abgesehen. Aus den Lösungen schieden sich aus:

0,1532 g kolloid. Subst.	0,4980 g vorwieg. Drusen des krystall. Dicinnam.	0,2164 g vorwieg. Drusen des krystall. Dicinnam.
$[\alpha]_D$ in Soda = $-181,5^\circ$	$[\alpha]_D$ in Soda = $-192,5^\circ$	$[\alpha]_D$ in Soda = $-192,5^\circ$
nach 2 h = -188°	Keine Zunahme	Keine Zunahme
	Zers. P. = 158 bis 165°	Zers. P. = 164°

Die nach dem Erkalten von den Auscheidungen abgeseenen Benzollösungen hinterließen beim Verdampfen:

2. Fraktion.	3. Fraktion.	4. Fraktion.
0,2808 g kolloid. Subst.	0,1570 g kolloid. Subst.	0,1014 g kolloid. Subst.
$[\alpha]_D$ in Soda = - 121°	$[\alpha]_D$ in Soda = - 161°	$[\alpha]_D$ in Soda = - 166,2°

Die 50 ccm Benzol hatten also insgesamt gelöst:

Von 1,5475 g	Von 1,5694 g	Von 0,8786 g
0,8885 g = ca. 24%	0,6550 g = ca. 41%	0,3178 g = ca. 36%

Durch zwei weitere Benzolanzüge wurden noch in Lösung gebracht:

0,0982 g kolloid. Subst.	0,2624 g zuerst krystall. b. Eindampfen kolloidal	0,0912 g deagl.
$[\alpha]_D$ in Soda = - 120°	$[\alpha]_D$ in Soda = - 165°	$[\alpha]_D$ in Soda = - 154°

Die in Benzol ungelöst gebliebenen kolloidalen Rückstände:

Schm.-P. 120 bis 125°	Schm.-P. 100 bis 105°	Schm.-P. 85 bis 90°
$[\alpha]_D$ in Soda = - 118°	$[\alpha]_D$ in Soda = - 116,5°	$[\alpha]_D$ in Soda = - 106,5°
nach 24 h = - 123,5°	nach 24 h = - 119,0°	nach 24 h = - 103,5°
C 62,08	C 62,28	C 59,28
H 4,26	H 4,32	H 4,38

Für Monodicinnamat $C_{22}H_{20}O_7$ berechnet:

C 62,50
H 4,17

Aus der Tabelle ergibt sich, daß die der Trennung unterworfenene Chloridschmelze der Hauptsache nach aus zwei Cinnamaten besteht, nämlich aus krystallisiertem Dicinnamat und dem kolloidalen Monodicinnamat, dessen Bildung am einfachsten auf die Einwirkung von Monocinnamat auf das primär gebildete Anhydrid des Dicinnamats entsprechend der Gleichung:



zurückgeführt wird.

Das in Benzol reichlich lösliche krystallisierte Dicinnamat ließ sich leicht durch dieses Lösungsmittel aus den Fraktionen 3 und 4 ausziehen, während die 2. Fraktion von diesem Dincinnamat nichts enthält, sich vielmehr durchweg kolloidal erweist.

Die nach dem Ausziehen der drei Fraktionen mit Benzol verbleibenden kolloidalen Rückstände lassen sich nicht unterscheiden. Die Rückstände von Fraktion 2 und 3 zeigen annähernd das gleiche Drehungsvermögen in Soda und geben bei der Analyse die für Monodicinnamat berechneten Werte. Der Rückstand der 4. Fraktion drehte etwas weniger hoch und gab etwas niedrigeren Kohlenstoffgehalt, der, wie die Versuche

lehrten, auf die Anwesenheit von geringen Mengen Weinsäure zurückzuführen ist.

Während von Fraktion 2 nur 24% in Benzollösung gingen, lösten sich von Fraktion 3 ca. 40% und von Fraktion 4 ca. 36% in Benzol.

Da die aus zwei aufeinanderfolgenden Benzolauszügen der Fraktion 2 unter sich und mit dem in Benzol ungelösten Rückstand von der Zusammensetzung $C_{28}H_{28}O_{14}$ das gleiche Drehungsvermögen besitzen, so wird man mit Recht annehmen dürfen, daß die zweite Fraktion aus einheitlichem Monodicinnamat besteht.

Auch die in Benzol unlöslichen Rückstände der Fraktionen 3 und 4 bestehen, wie die Untersuchung lehrte, aus diesem Cinnamat, während die Benzolauszüge dieser beiden Fraktionen neben krystallisiertem Dicinnamat niedriger drehende Cinnamatgemische enthalten.

Der Versuch beweist, daß man trotz der unvollkommenen Methode zu einer Trennung der beiden Hauptbestandteile der Chloridschmelze gelangen kann und daß sich aus dem Gemisch das kolloidale Monodicinnamat in einheitlicher Form gewinnen läßt.

Nach diesem Ergebnis mußte man erwarten, mindestens ebensogut zu dem Monodicinnamat zu gelangen, wenn man die Chloridschmelze zuerst durch Ausziehen mit Benzol von Zimtsäure, Dicinnamat und Dicinnamatanhydrid befreite und sodann den in Benzol schwer löslichen Rückstand durch fraktionierte Ansäuerung zerlegte.

Kombination von Benzolauszug und fraktionierter Ansäuerung.

Versuch 1.

8,33 g Zimtsäurechlorid und 3,75 g Weinsäure wurden zuerst 25 Minuten auf 100 bis 135° und dann noch 30 Minuten auf 168 bis 170° erhitzt.

0,857 g der kolophonumartigen Schmelze vom F. P. 55 bis 80° zeigten in Soda gelöst — Vol. 20 ccm — 2-dm-Rohr, $c = 1,785$, $\alpha = 5,85^\circ$, d. i.

$$[\alpha]_D = -150,0^\circ.$$

Zur Untersuchung des in Benzol unlöslichen Teils der Chloridschmelze wurden 5 g mit Benzol auf dem Wasserbade ausgekocht. Ungelöst blieben 1,0 g kolloidale Substanz, die in Sodalösung $[\alpha]_D = -109,4^\circ$ drehte.

0,1265 g gaben 0,2779 g CO_2 , 0,0494 g H_2O .

Berechnet für Monodicinnamat $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$: C 62,50
 H 4,17
 Gefunden: C 59,91
 H 4,34

Zur weiteren Scheidung wurde der in Benzol ungelöst gebliebene Teil durch fraktionierte Ansäuerung zunächst in die beiden folgenden Fraktionen zerlegt:

	in Äther	in Soda
1. Fraktion:	$[\alpha]_{\text{D}} = -98,5^{\circ}$	$[\alpha]_{\text{D}} = -121,4^{\circ}$
2. " "	$[\alpha]_{\text{D}} = -83,6^{\circ}$	—

Die 2. Fraktion wurde durch Ansäuerung nochmals in zwei gleiche Fraktionen zerlegt, die als 2a und 2b bezeichnet sind.

In Äther	
Fraktion 2a:	$[\alpha]_{\text{D}} = -96,0^{\circ}$
" 2b:	$[\alpha]_{\text{D}} = -93,3^{\circ}$

0,0881 g der Fraktion 2a, bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, gaben 0,2021 g CO_2 und 0,0357 g H_2O .

Berechnet für Monodicinnamat $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$: C 62,50
 H 4,17
 Gefunden: C 62,56
 H 4,50

Der Versuch zeigt, daß man, wie ja zu erwarten war, durch fraktionierte Ansäuerung des in Benzol ungelöst gebliebenen Teils sehr leicht zu der kolloidalen Substanz von dem Drehungsvermögen und dem Kohlenstoffgehalt des Monodicinnamats gelangen kann.

Versuch 2.

Bei Wiederholung des Versuchs wurden 21 g einer in der gleichen Weise wie oben hergestellten Chloridschmelze 4 mal mit Benzol ausgekocht. Beim letzten Auszug ging nur mehr wenig in Lösung.

Von dem ungelöst gebliebenen Rückstand wurden 5 g in Äther gelöst, wobei etwas Weinsäure ungelöst blieb. Mit 100 ccm einer 6,13%igen Bicarbonatlösung ausgeschüttelt, ging die ganze in Äther befindliche Substanz in die Bicarbonatlösung

über. Das Drehungsvermögen des in Bicarbonat gelösten Rückstandes betrug

$$[\alpha]_D = -85,6^\circ.$$

Die Bicarbonatlösung wurde nunmehr mit Salzsäure in drei Fraktionen angesäuert und ausgeäthert und die Fraktion 2 darauf nochmals in die drei Fraktionen A, B, C zerlegt.

Das Resultat der Fraktionierung war das folgende:

	in Äther	in Bicarbonatlösung	Analyse
1. Fraktion:	$[\alpha]_D = -66,7^\circ$	—	—
2. " "	$[\alpha]_D = -92,0^\circ$	$[\alpha]_D = -126,6^\circ$	—
Fraktion A:	$[\alpha]_D = -82,8^\circ$	—	—
" B:	$[\alpha]_D = -100,0^\circ$	—	$\left\{ \begin{array}{l} \text{C } 62,49 \\ \text{H } 4,63 \end{array} \right.$
" C:	$[\alpha]_D = -103,7^\circ$	—	
3. Fraktion:	$[\alpha]_D = -62,0^\circ$	—	—

Auch dieser Versuch zeigt, daß man aus dem in Benzol ungelöst gebliebenen Rückstand vom $[\alpha]_D = -85^\circ$ durch fraktionierte Ansäuerung unter Beseitigung tiefer drehender und kohlenstoffärmerer Bestandteile (Weinsäure und Monocinnamat) zur kolloidalen Fraktion gelangt von der Zusammensetzung 62,49 statt 62,50 C und dem Drehwert des Monodicinnamats (d. i. etwas über 120° an Natrium gebunden).

Die Trennungsversuche beweisen übereinstimmend, daß bei der Chloridschmelze eine größere Menge eines kolloidalen Monodicinnamats gebildet wird und daß durch eingehende Fraktionierung keine Substanz zutage gefördert wird, die mit Zimtsäure gemischt imstande wäre, das hohe Drehungsvermögen der genauestens für Zimtsäure stimmenden aktiven Zimtsäurepräparate zu erklären. Mithin muß bei diesen Präparaten die Aktivität die Folge der asymmetrischen Einstellung der Zimtsäuremoleküle sein.

Während die bei den ersten Trennungen durch Ansäuerung die der Analyse unterworfenen Fraktionen noch Gemische vorstellen, ist es durch Kombination von Ansäuerung und Benzol-auszug möglich gewesen, die Hauptbestandteile der Schmelze, das kristallisierte Dicinnamat und das kolloidale Monodicinnamat, in einheitlicher Form zu gewinnen.

Trennungsergebnisse der bei der Anhydridschmelze entstehenden kolloidalen Cinnamatgemische.

Versuch 1.

3,0 g Weinsäure und 11,1 g Zimtsäureanhydrid wurden nach dem Schmelzen 1 Stunde bei 168° gehalten. Nach dem Erkalten wurde die Schmelze zerkleinert und mehrmals mit Ligroin ausgekocht. Aus Ligroin krystallisierten 3,8 g farblose Zimtsäure vom Schmelzpunkt 132°.

0,3 g in Soda — Vol. 15,0 ccm — $c=2$ drehen im 2-dm-Rohr

$$\alpha = -0,18^\circ,$$

$$\text{d. i. } [\alpha]_D = -4,5^\circ.$$

0,2795 g des in Ligroin ungelöst gebliebenen Cinnamatgemisches in Soda gelöst — Vol. 40 ccm — $c=0,70$ drehen im 2-dm-Rohr

$$\alpha = -0,94^\circ,$$

$$\text{d. i. } [\alpha]_D = -67,1^\circ.$$

Zur Prüfung auf ein etwa vorhandenes Dicinnamatanhydrid wurden 2 g mit Soda und Äther geschüttelt und die ätherische Lösung auf Drehungsvermögen untersucht. Sie war inaktiv. Dicinnamatanhydrid hatte sich demnach nicht gebildet.

4,8 g des vom größten Teil der Zimtsäure befreiten Cinnamatgemisches wurden in Soda gelöst und sodann in der gewöhnlichen Weise in 4 Fraktionen angesäuert und die jeweils in Freiheit gesetzten Cinnamate mit Äther aufgenommen und auf Drehung geprüft:

	in Äther	in Soda	Analyse
1. Fraktion:	$[\alpha]_D = 0$	—	—
2. " "	$[\alpha]_D = -11,8^\circ$	$[\alpha]_D = -57,0^\circ$	—
3. " "	$[\alpha]_D = -62,9^\circ$	$[\alpha]_D = -117,7^\circ$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{C } 62,34 \\ \text{H } 4,44 \end{array} \right.$
4. " "	$[\alpha]_D = -57,3^\circ$	$[\alpha]_D = -107,1^\circ$	

Der Versuch läßt erkennen, daß nicht nur der Drehwert des in Ligroin unlöslichen kolloidalen Cinnamatgemisches aus der Anhydridschmelze, sondern auch der aller seiner Fraktionen viel tiefer liegt als der der kolloidalen Cinnamatgemische und ihrer in gleicher Weise erhaltenen Fraktionen aus den Chloridschmelzen.

Die inaktive 1. Fraktion bestand aus Zimtsäure. Ihre Inaktivität beweist, daß durch die vorhergegangenen Ligroinauszüge alle aktive Zimtsäure abgetrennt worden ist

Die 3. Fraktion besitzt auch hier das höchste Drehungsvermögen und muß ihrem Kohlenstoffgehalt nach vorzugsweise aus einer etwas weniger drehenden Modifikation des Monodicinnamats bestehen, berechnet für Monodicinnamat 62,50 C, 4,17 H.

Die 4. Fraktion zeigt auch hier geringeres Drehungsvermögen und geringeren Kohlenstoffgehalt was auf die Anwesenheit von etwas Monocinnamat und Weinsäure hindeutet.

Versuch 2.

Um festzustellen, was für einen Einfluß die bei der Schmelze angewandte Temperatur und die Schmelzdauer auf die Drehung und die Zusammensetzung der dabei entstehenden Produkte ausübt, wurden 3 g Weinsäure und 11,1 g Zimtsäureanhydrid zuerst geschmolzen, dann 15 Minuten bei 145° gehalten und darauf rasch abgekühlt. Gesamtdauer der Operation 30 Minuten.

Die durch Ausziehen mit Ligroin erhaltene farblose Zimtsäure besaß das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -6^\circ$. Das in Ligroin ungelöst gebliebene Cinnamatgemisch vom $[\alpha]_D = -59,5^\circ$ drehte somit weniger als das der vorigen Schmelze.

Die in der gewöhnlichen Weise vorgenommene fraktionierte Ansäuerung des Cinnamatgemisches in vier gleichen Teilen ergab das folgende Resultat:

	in Äther	in Soda	Analyse
1. Fraktion:	$[\alpha]_D = -5,3^\circ$	—	—
2. "	$[\alpha]_D = -61,3^\circ$	$[\alpha]_D = -112,3^\circ$	{ C 64,01 H 4,58
3. "	$[\alpha]_D = -31,1^\circ$	$[\alpha]_D = -63,6^\circ$	{ C 57,78 H 4,27
4. "	$[\alpha]_D = -5,2^\circ$	$[\alpha]_D = -17,6^\circ$	{ C 54,90 H 4,28

Es zeigt sich, daß hier bereits bei der zweiten Fraktion der höchste Drehwert und der höchste Kohlenstoffgehalt erreicht wird, der dem Kohlenstoffgehalt des Dicinnamats von 64,39% sehr nahe kommt. Trotzdem erscheint es natürlich nicht ausgeschlossen, daß diese kolloidale Fraktion nicht nur noch von der kohlenstoffreicheren Zimtsäure, sondern auch von dem kohlenstoffärmeren Monodicinnamat enthielt.

Die 3. und besonders die 4. Fraktion bestanden wahrscheinlich größtenteils aus einer kolloidalen Modifikation des Monocinnamats. Für Monocinnamat berechnen sich 55,7%

Kohlenstoff. Die früher bei dem krystallisierten Monocinnamat beobachteten Drehwerte liegen in Soda gemessen zwischen 16 bis 18°. Da der Kohlenstoffgehalt der 4. Fraktion noch unter dem des Monocinnamats liegt, so erscheint es wahrscheinlich, daß sie noch eine Spur von Weinsäure enthalten hat.

Versuch 3.

Abweichend von den bei dem eben beschriebenen Versuch angewandten Bedingungen wurden diesmal die gleichen Mengen von Weinsäure und Zimtsäureanhydrid drei volle Stunden auf 140° erhitzt. Bei dieser Temperatur perlt die Schmelze fast gar nicht.

Die durch Ligroin ausgezogene farblose Zimtsäure wog 5,5 g und besaß in verdünnter Soda gelöst das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -4,5^\circ$.

Das in Ligroin ungelöst gebliebene Cinnamatgemisch wurde in Bicarbonat gelöst und durch Salzsäurezusatz die in Wasser schwer löslichen Cinnamate ausgefällt, abfiltriert und auf dem Wasserbade getrocknet. Aus dem wäßrigen Filtrat ließ sich durch Ätherauszug 0,4 g Monocinnamat von dem $[\alpha]_D = -16^\circ$ erhalten.

Auch beim Behandeln der getrockneten Cinnamate mit Äther blieb noch ein ganz kleiner Teil unlöslich, der nach Drehung und Schmelzpunkt noch nicht ganz einheitliches Monocinnamat vorstellt.

Von der ätherischen Lösung wurde der Äther verjagt und der Rückstand zur Entfernung noch eingeschlossener Zimtsäure 2mal mit Ligroin ausgekocht. Der erste Auszug lieferte noch ziemlich viel Zimtsäure, der zweite nur mehr wenig.

Das ungelöst gebliebene Cinnamatgemisch wog 6 g und schmolz unter Blasenbildung bei 94°. Sein Drehungsvermögen in Sodalösung wurde zu

$$[\alpha]_D = -74,4^\circ$$

bestimmt.

5,7 g davon wurden zuerst in Äther gelöst, aus dieser Lösung mit Sodalösung ausgeschüttelt und diese sodann in fünf gleichen Fraktionen angesäuert.

Fraktion 1 bestand aus 1° drehender Zimtsäure, die auch bei dem wiederholten Ausziehen mit Ligroin von den kolloidalen Cinnamaten zurückgehalten worden war.

Die Fraktion 3 wurde noch in drei gleiche Unterfraktionen zerlegt:

	in Äther	in Soda	Analyse
2. Fraktion:	$[\alpha]_D = - 57,4^{\circ}$	—	—
3. " "	$[\alpha]_D = - 79,1^{\circ}$	$[\alpha]_D = - 112,1^{\circ}$	—
Unterfraktion a:	$[\alpha]_D = - 71,2^{\circ}$	—	—
" b:	$[\alpha]_D = - 82,5^{\circ}$	—	—
" c:	$[\alpha]_D = - 116,8^{\circ}$	$[\alpha]_D = - 166,7^{\circ}$	C 62,00 H 4,65
4. Fraktion:	$[\alpha]_D = - 51,0^{\circ}$	—	
5. " "	$[\alpha]_D = - 25,6^{\circ}$	$[\alpha]_D = - 31,1^{\circ}$	C. 56,19 H 4,44

Bei allen ausgeführten Ansäuerungen steigt der Drehwert der aufeinanderfolgenden Fraktionen zuerst an, um dann wieder sehr beträchtlich zu fallen. Es ist deshalb sehr bemerkenswert, daß bei der weiteren Zerlegung der höchstdrehenden 3. Fraktion in drei gleiche Unterfraktionen die Drehwerte der aufeinanderfolgenden Fraktionen stetig steigen bis zu dem Drehwert $[\alpha]_D = - 166,7^{\circ}$. Nach dem Kohlenstoffgehalt von 62,00% muß diese Fraktion der Hauptmenge nach aus einem Monodicycinnamat bestehend betrachtet werden, das sich durch einen höheren Drehwert auszeichnet.

Die 5. Fraktion dürfte nach Analyse und Drehungsvermögen der Hauptmenge nach aus Monocinnamat bestehen.

Versuch 4.

Der in Benzol ungelöst bleibende Anteil der Anhydridschmelze.

Bei diesem Versuche wurden 4,5 g Weinsäure und 16,70 g Zimtsäureanhydrid (1 : 2) zuerst bei 140° geschmolzen und sodann 3 Stunden bei dieser Temperatur gehalten. Die Schmelze perlte nur außerordentlich wenig.

Der Drehungswert der Schmelze, in Sodalösung gemessen, betrug $[\alpha]_D = - 38,0^{\circ}$.

Zur Untersuchung des in Benzol unlöslichen Teils wurden 19,3 g der pulverisierten Schmelze 5 mal mit Benzol ausgezogen. Bei dem letzten Auszug ging nur mehr eine sehr geringe Menge Substanz in Lösung. Von dem in Benzol ungelöst gebliebenen Teil blieb beim Behandeln mit Äther nur eine sehr geringe Menge ungelöst, die nach den bisherigen Erfahrungen

als Monocinnamat anzusprechen ist, während 4 g sich in Äther lösten.

Durch Ausschütteln mit Bicarbonatlösung wurden dem Äther die sauren Cinnamate entzogen.

Die so erhaltene Bicarbonatlösung besaß das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -34^\circ$.

Die Bicarbonatlösung wurde zuerst mit Normal-Salzsäure bis zur Trübung versetzt und sodann durch Zusatz von drei gleichen Teilen Normal-Salzsäure in drei aufeinanderfolgenden Fraktionen angesäuert und die in Freiheit gesetzten Cinnamate mit Äther aufgenommen:

	in Äther	in Bicarbonat	Analyse
1. Fraktion:	$[\alpha]_D = -4,0^\circ$	$[\alpha]_D = -52,9^\circ$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{C } 62,23 \\ \text{H } 4,62 \end{array} \right.$
2. " "	$[\alpha]_D = -14,5^\circ$	$[\alpha]_D = -47,9^\circ$	
3. " "	$[\alpha]_D = -8,0^\circ$	$[\alpha]_D = -22,5^\circ$	—

Es folgt daraus, daß sich auch aus dem in Benzol ungelöst gebliebenen kolloidalen Anteil der Anhydridschmelze durch fraktionierte Ansäuerung ein Teil herausarbeiten läßt von dem Kohlenstoffgehalt des Monodicinnamats, der jedoch sowohl in Äther als an Natrium gebunden sehr viel weniger dreht als die vorher beschriebenen Fraktionen von dem gleichen Kohlenstoffgehalt.

Der Abfall im Drehungsvermögen sowie im Kohlenstoffgehalt der beiden folgenden Fraktionen deutet auf die Anwesenheit des kohlenstoffärmeren und schwächer drehenden Monocinnamats hin.

Versuch 5.

Prüfung einer bei 160° hergestellten Anhydridschmelze auf die Anwesenheit des hochdrehenden krystallinischen Dicinnamats durch Ausziehen mit Benzol.

Die mit der Chloridschmelze ausgeführten Versuche hatten ergeben, daß man aus ihr durch Auskochen mit Benzol leicht das in ihr enthaltene krystallisierte Dicinnamat erhalten kann. Um festzustellen, ob dieses Dicinnamat auch bei der Weinsäure

Zimtsäureanhydridschmelze gebildet wird, wurde das Verfahren auch bei dieser Schmelze in Anwendung gebracht.

11,1 g Zimtsäureanhydrid und 3 g Weinsäure wurden zusammengeschmolzen und die Schmelze nach Beendigung der Reaktion 1 Stunde auf 160° erhitzt.

Zur Entfernung der größten Menge Zimtsäure wurde die Schmelze nach dem Abkühlen pulverisiert und sodann 9 g davon so oft mit Ligroin ausgekocht, bis kaum noch Zimtsäure in Lösung ging.

Zur Prüfung auf krystallisiertes Dicinnamat wurde das in Ligroin ungelöst gebliebene Gemisch mit Benzol ausgekocht. Aus der Benzollösung, die neben Zimtsäure etwa vorhandenes krystallisiertes Dicinnamat aufgenommen haben mußte, schied sich beim Erkalten neben krystallinischer Zimtsäure kolloidale Substanz ab, jedoch nichts von den charakteristischen Drusen des krystallisierten Dicinnamats.

Die nach dem Abgießen der Benzollösung verbleibende Abscheidung wurde zur Entfernung der Zimtsäure mit Ligroin ausgekocht. Der in Ligroin ungelöst gebliebene Rückstand zeigte, in verdünnter Sodalösung gemessen, das niedrige Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -65,5^\circ$.

Beim Einengen der Benzolmutterlauge schied sich noch weitere Zimtsäure ab. Der nach vollständigem Verdunsten zurückbleibende, vorwiegend kolloidale Rückstand enthielt gleichfalls noch Zimtsäure, jedoch nichts von den schon äußerlich leicht erkennbaren Drusen des krystallisierten Dicinnamats. Beim Ausziehen mit Ligroin hinterblieb kolloidale Substanz, die in verdünnter Sodalösung polarisiert das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -146,5^\circ$ zeigte.

Nach den vorher bei der Chloridschmelze gemachten Erfahrungen darf aus diesem Versuch mit Bestimmtheit geschlossen werden, daß das krystallisierte Dicinnamat von dem hohen Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -275^\circ$ bei der Anhydridschmelze nicht gebildet wird.

Untersuchung des in Benzol ungelöst gebliebenen Rückstandes.

Nachweis von Monocinnamat und Weinsäure.

In verdünnter Sodalösung beobachtet, besaß dieser das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -60^\circ$.

Ein Teil davon, ca. 3 g, wurde in Äther gelöst und die Lösung zur Trennung des in Wasser löslichen Monocinnamats 6 mal mit Wasser geschüttelt.

Die 6 wäßrigen Auszüge hinterließen beim Eindampfen ca. 0,4 g größtenteils krystallinische Substanz, die aus Essigäther-Chloroform krystallisiert wurde und sodann einen ungenauen, zwischen 180 bis 195° liegenden Schmelzpunkt zeigte. In Soda gelöst, konnte eine Drehung nicht wahrgenommen werden. Nach dem Ansäuern wurde die in Freiheit gesetzte Substanz mit Essigäther, der sich am besten zur Lösung des Monocinnamats eignet, ausgezogen. Die nach dem Verdunsten zurückbleibende krystallinische Substanz schmolz bei 200° unter Zersetzung und drehte in verdünnter Sodalösung

$$[\alpha]_D = -18,3^\circ$$

und ist auf Grund dieser beiden Merkmale als Monocinnamat gekennzeichnet.

In der wäßrigen, durch Ausschütteln mit Essigäther von Monocinnamat befreiten Lösung ließ sich durch Abscheidung von Weinstein das Vorhandensein von Weinsäure nachweisen. Dadurch wird es auch verständlich, daß das aus Essigäther-Chloroform abgeschiedene Gemisch in Sodalösung keine Drehung erkennen ließ, da die Linksdrehung des Monocinnamats durch die Rechtsdrehung der Weinsäure aufgehoben worden war.

Aus diesem Resultat ergibt sich, daß nicht nur das krystallisierte Monocinnamat, sondern auch Weinsäure von den kolloidalen Cinnamaten sehr hartnäckig zurückgehalten werden können und trotz ihrer geringen Löslichkeit in Äther mit diesen auch in ätherischer Lösung eingehen können.

Prüfung des in Benzol ungelöst gebliebenen Teils auf andere Bestandteile.

Um beim weiteren Ausschütteln des in Benzol ungelöst gebliebenen Teils in ätherischer Lösung mit Wasser die Bildung von Emulsionen zu vermeiden, wurde die ätherische Lösung bei den folgenden drei Ausschüttelungen mit Glaubersalzlösungen geschüttelt und die dadurch in die wäßrige Salzlösung übergegangene Substanz aus dieser mit Essigäther ausgeschüttelt.

Nach dem Verdunsten des Essigäthers hinterblieben 0,4 g

kolloidale Substanz, die bereits unter 100° weich wurde und in verdünnter Sodalösung das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -111^\circ$ aufwies.

Die Verbrennung ergab. 0,1139 g gaben 0,2400 g CO₂, 0,0488 g H₂O.

Berechnet für ein Dicinnamat der Diwein-

säure C₂₀H₂₂O₁₂: 57,56 C
4,06 H

Gefunden: 57,47 C
4,76 H

Danach scheint in dem in Benzol ungelöst bleibenden Teil der Anhydridschmelze Dicinnamat der Diweinsäure enthalten zu sein, das sich in drei strukturisomeren Modifikationen bilden kann. Weinsäure und Monocinnamat kann diese Substanz nicht mehr enthalten.

Nach 9maligem Ausziehen der ätherischen Lösung mit Glaubersalzlösung wurde der Äther verjagt. Der verbleibende kolloidale Rückstand wog 2,4 g und drehte in verdünnter Sodalösung

$$[\alpha]_D = -75^\circ.$$

0,1478 g gaben 0,3369 g CO₂ und 0,0604 g H₂O, entsprechend 62,17 C, 4,54 H.

Berechnet für Monodicinnamat: 62,50 C
4,17 H

2 g dieser Substanz durch Ansäuern ihrer Natriumsalzlösung, im Verhältnis 1:2 in 2 Fraktionen zerlegt, ergaben:

	in Äther	in Soda	Analyse
1. Fraktion: 0,6 g	$[\alpha]_D = -30,7^\circ$	$[\alpha]_D = -78,2^\circ$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{C } 63,95 \\ \text{H } 5,62 \end{array} \right.$
	nach 20 Std. = -87,8°		
2. " "	$[\alpha]_D = -39,6^\circ$	$[\alpha]_D = -81,0^\circ$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{C } 59,34 \\ \text{H } 4,49 \end{array} \right.$
		nach 24 Std. = -93,5°	

Die Fraktionierung der kolloidalen Substanzen der Anhydridschmelze beweist, daß bei dieser Schmelze das charakteristische krystallisierte Dicinnamat vom Schmelzpunkt 166 bis 167° nicht gebildet wird, dagegen läßt sich das Vorhanden-

Ein Teil davon, ca. 3 g, wurde in Äther gelöst und die Lösung zur Trennung des in Wasser löslichen Monocinnamats 6 mal mit Wasser geschüttelt.

Die 6 wäßrigen Auszüge hinterließen beim Eindampfen ca. 0,4 g größtenteils krystallinische Substanz, die aus Essigäther-Chloroform krystallisiert wurde und sodann einen ungenauen, zwischen 180 bis 195° liegenden Schmelzpunkt zeigte. In Soda gelöst, konnte eine Drehung nicht wahrgenommen werden. Nach dem Ansäuern wurde die in Freiheit gesetzte Substanz mit Essigäther, der sich am besten zur Lösung des Monocinnamats eignet, ausgezogen. Die nach dem Verdunsten zurückbleibende krystallinische Substanz schmolz bei 200° unter Zersetzung und drehte in verdünnter Sodalösung

$$[\alpha]_D = -18,3^\circ$$

und ist auf Grund dieser beiden Merkmale als Monocinnamat gekennzeichnet.

In der wäßrigen, durch Ausschütteln mit Essigäther von Monocinnamat befreiten Lösung ließ sich durch Abscheidung von Weinstein das Vorhandensein von Weinsäure nachweisen. Dadurch wird es auch verständlich, daß das aus Essigäther-Chloroform abgeschiedene Gemisch in Sodalösung keine Drehung erkennen ließ, da die Linksdrehung des Monocinnamats durch die Rechtsdrehung der Weinsäure aufgehoben worden war.

Aus diesem Resultat ergibt sich, daß nicht nur das krystallisierte Monocinnamat, sondern auch Weinsäure von den kolloidalen Cinnamaten sehr hartnäckig zurückgehalten werden können und trotz ihrer geringen Löslichkeit in Äther mit diesen auch in ätherischer Lösung eingehen können.

Prüfung des in Benzol ungelöst gebliebenen Teils auf andere Bestandteile.

Um beim weiteren Ausschütteln des in Benzol ungelöst gebliebenen Teils in ätherischer Lösung mit Wasser die Bildung von Emulsionen zu vermeiden, wurde die ätherische Lösung bei den folgenden drei Ausschüttelungen mit Glaubersalzlösungen geschüttelt und die dadurch in die wäßrige Salzlösung übergegangene Substanz aus dieser mit Essigäther ausgeschüttelt.

Nach dem Verdunsten des Essigäthers hinterblieben 0,4 g

Äther — Vol. 10 ccm — gelöst, drehten im 2 m-Rohr $\alpha = +0,08^\circ$, d. i., da $c = 0,02$. $[\alpha]_D = +200^\circ$.

Nach einigen Stunden drehte die gleiche Lösung $\alpha = -0,10^\circ$, d. i. $[\alpha]_D = -250^\circ$.

Hiernach geht das aus dem bei tiefer Temperatur gewonnenen Dicinnamatanhydrid durch Wasseraufnahme bei gewöhnlicher Temperatur gebildete krystallisierte Dicinnamat bei höherem Erhitzen unter Wasserverlust zum Teil wieder in das nach der entgegengesetzten Seite drehende Dicinnamatanhydrid über.

Um festzustellen, ob etwa in der Anhydridschmelze ein Cinnamat enthalten ist, das befähigt ist, beim Erhitzen unter Wasserabspaltung in ein rechtsdrehendes Anhydrid überzugehen, wurde der folgende Versuch angestellt.

1,5 g Weinsäure und 5,56 g Zimtsäureanhydrid wurden zuerst $\frac{3}{4}$ Stunden bei 150° und sodann $\frac{1}{4}$ Stunde bei 167° erhitzt.

Die Schmelze färbte sich allmählich hellgelb unter lebhaftem Perlen.

Nach dem Abkühlen und Pulvern wurde sie mit Ligroin auf dem Wasserbade ausgezogen.

Aus der Ligroinlösung schieden sich 2,6 g Substanz aus, die sich nicht klar in Soda löste. Erst bei längerem Stehen trat vollständige Lösung ein.

Zur Prüfung der Substanz auf die Anwesenheit eines indifferenten rechtsdrehenden Anhydrids wurden 0,5 g der Substanz mit Sodalösung und Äther geschüttelt. Die getrocknete ätherische Lösung hinterließ 0,0156 g krystallinischen Rückstand; die Lösung in Aceton — Vol. 10 ccm — drehte im 1-dm-Rohr

$$c = 0,156, \alpha = +0,21^\circ, [\alpha]_D = +134,7^\circ,$$

also 148° tiefer als die Lösung des zuerst bei der Chloridschmelze bei 105° aufgefundenen krystallisierten Dicinnamatanhydrids.

In feuchter Lösung ging die Rechtsdrehung alsbald in Linksdrehung über.

Wenn der Versuch auch zeigt, daß bei längerem und höherem Erhitzen der Anhydridschmelze rechtsdrehendes indifferentes Cinnamatanhydrid erhalten werden kann, so gelang es doch nicht, das $+282^\circ$ drehende Dicinnamatanhydrid, dem das krystallisierte Dicinnamat $[\alpha]_D = -275^\circ$ entspricht, zu

sein des krystallisierten Monocinnamats in dieser Schmelze einwandfrei nachweisen.

Ferner zeigte es sich, daß keine Fraktion mehr Kohlenstoff enthält, als das Dicinnamat mit 64,39%.

Nur bei einer Fraktion wurde dieser Kohlenstoffgehalt annähernd erreicht, während das Drehungsvermögen dieser Fraktion in Soda fast 200° weniger betrug, als bei krystallisiertem Dicinnamat, nämlich $[\alpha]_D = -78,2^\circ$ statt $[\alpha]_D = -275^\circ$.

Von dem Kohlenstoffgehalt des Monodicinnamats wurden zwei Fraktionen erhalten, die jedoch in ihrem Drehungsvermögen sehr stark voneinander abweichen.

Das eine Präparat zeigte, an Natrium gebunden, das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -52,9^\circ$, das andere dagegen $[\alpha]_D = -166,7^\circ$, während drei Monodicinnamatpräparate aus den Chloridschmelzen ziemlich übereinstimmend etwas über 120° gedreht hatten.

Endlich ist auch mit der Bildung eines beträchtlich weniger drehenden Dicinnamats der Diweinsäure bei der Anhydridschmelze zu rechnen.

Am wichtigsten erscheint der Nachweis, daß alle erhaltenen Fraktionen weit unter 200° drehen und somit nicht als Ursache des hohen Drehungsvermögens der neben diesen kolloidalen Substanzen gebildeten aktiven Zimtsäuren von genauestens für diese Säure stimmendem Kohlenstoffgehalt gelten können.

Versuch 6.

Die Erforschung der bei der Weinsäure-Zimtsäureanhydridschmelze neben den stark aktiven Zimtsäurepräparaten gebildeten Cinnamatgemische hat ergeben, daß bei dieser Schmelze das bei der Chloridschmelze aufgefundene krystallisierte Dicinnamat nicht gebildet wird, wohl aber konnten Fraktionen von viel geringerem Drehungsvermögen erhalten werden, die den Kohlenstoffgehalt eines Dicinnamats besaßen.

Bei einem früher angestellten Versuch wurden 2 g des reinen krystallisierten, aus seinem Anhydrid erhaltenen Dicinnamats $\frac{1}{3}$ Stunde lang auf 167° erhitzt. Die Schmelze perlte ziemlich lebhaft und färbte sich schwach gelblich. In der Kälte blieb die Schmelze durchsichtig. Beim Ausziehen mit hochsiedendem Ligroin ging Substanz in Lösung, die in sternförmig angeordneten Nadeln sich ausschied. 0,002 g, in

Äther — Vol. 10 ccm — gelöst, drehten im 2 m-Rohr $\alpha = +0,08^\circ$, d. i., da $c = 0,02$. $[\alpha]_D = +200^\circ$.

Nach einigen Stunden drehte die gleiche Lösung $\alpha = -0,10^\circ$, d. i. $[\alpha]_D = -250^\circ$.

Hiernach geht das aus dem bei tiefer Temperatur gewonnenen Dicinnamatanhydrid durch Wasseraufnahme bei gewöhnlicher Temperatur gebildete krystallisierte Dicinnamat bei höherem Erhitzen unter Wasserverlust zum Teil wieder in das nach der entgegengesetzten Seite drehende Dicinnamatanhydrid über.

Um festzustellen, ob etwa in der Anhydridschmelze ein Cinnamat enthalten ist, das befähigt ist, beim Erhitzen unter Wasserabspaltung in ein rechtsdrehendes Anhydrid überzugehen, wurde der folgende Versuch angestellt.

1,5 g Weinsäure und 5,56 g Zimtsäureanhydrid wurden zuerst $\frac{3}{4}$ Stunden bei 150° und sodann $\frac{1}{4}$ Stunde bei 167° erhitzt.

Die Schmelze färbte sich allmählich hellgelb unter lebhaftem Perlen.

Nach dem Abkühlen und Pulvern wurde sie mit Ligroin auf dem Wasserbade ausgezogen.

Aus der Ligroinlösung schieden sich 2,6 g Substanz aus, die sich nicht klar in Soda löste. Erst bei längerem Stehen trat vollständige Lösung ein.

Zur Prüfung der Substanz auf die Anwesenheit eines indifferenten rechtsdrehenden Anhydrids wurden 0,5 g der Substanz mit Sodalösung und Äther geschüttelt. Die getrocknete ätherische Lösung hinterließ 0,0156 g krystallinischen Rückstand; die Lösung in Aceton — Vol. 10 ccm — drehte im 1-dm-Rohr

$$c = 0,156, \alpha = +0,21^\circ, [\alpha]_D = +134,7^\circ,$$

also 148° tiefer als die Lösung des zuerst bei der Chloridschmelze bei 105° aufgefundenen krystallisierten Dicinnamatanhydrids.

In feuchter Lösung ging die Rechtsdrehung alsbald in Linksdrehung über.

Wenn der Versuch auch zeigt, daß bei längerem und höherem Erhitzen der Anhydridschmelze rechtsdrehendes indifferentes Cinnamatanhydrid erhalten werden kann, so gelang es doch nicht, das $+282^\circ$ drehende Dicinnamatanhydrid, dem das krystallisierte Dicinnamat $[\alpha]_D = -275^\circ$ entspricht, zu

isolieren, und es erscheint deshalb die Annahme berechtigt, daß es sich um ein Cinnamatanhydrid von anderen Eigenschaften bzw. anderem Drehwert handelt.

Durch Einberufung des Herrn Dr. Hilgendorff zum Militärdienst mußten die Versuche abgebrochen werden.

Ein Vergleich der bei den Chloridschmelzen als bei den Anhydridschmelzen erhaltenen Resultate läßt erkennen, daß beide Schmelzen zu Produkten verschiedener Eigenschaften führen, die jedoch nach ihrem Verhalten und ihrem Kohlenstoffgehalt durchweg als Cinnamate der Weinsäure bzw. Diweinsäure betrachtet werden müssen.

Schon die Veränderung in den Reaktionsbedingungen, Zeit und Temperatur bei den Chloridschmelzen sowohl als bei den Anhydridschmelzen übt einen entschiedenen Einfluß auf die Eigenschaften der sich bildenden Cinnamatgemische aus.

Die kolloidale Natur der meisten Cinnamate macht ein weiteres Eindringen in dieses äußerst schwierige Gebiet fast zur Unmöglichkeit, erübrigt sich aber auch, nachdem durch die ausgeführten Trennungen der Beweis erbracht ist, daß außer Zimtsäure und Cinnamaten mit dem Kohlenstoffmaximum von 64,39% andere Stoffe in der Schmelze nicht enthalten sind; denn es folgt daraus, daß die stark aktiven Zimtsäuren von dem genau auf 72,97% stimmenden Kohlenstoffgehalt nur aus Zimtsäuremolekülen bestehen können, die sich aber auf Grund ihrer starken Aktivität zum großen Teil in einer molekular asymmetrischen Konfiguration befinden müssen.

Von besonderem Interesse ist es ferner, daß die bei der Chloridschmelze sich bildende aktive Zimtsäure nur schwach dreht trotz der gleichzeitigen Bildung von dem hochdrehenden kristallisierten Dicinnamat, das in Benzol und wenig auch in hochsiedendem Ligroin löslich ist, während die bei der Anhydridschmelze erhältliche Zimtsäure stark aktiv ist, obwohl daneben kein in Kohlenwasserstoffen lösliches Dicinnamat gebildet wird.

Es folgt daraus, daß die Aktivität der Zimtsäuren nicht von einem mit in Lösung gegangenen Cinnamat herrühren kann, da sonst die bei der Chloridschmelze erhaltenen Zimtsäuren stärker als die bei der Anhydridschmelze gewonnenen drehen müßten.

Trennungsergebnisse bei den Zimtsäure-Weinsäureschmelzen.

Wie aus den Tabellen in der früheren Abhandlung ersichtlich ist, zeichnen sich die bei der Weinsäure-Zimtsäureschmelze erhältlichen kolloidalen Cinnamatgemische durch die niedrigsten Drehwerte aus. Der Drehwert der Cinnamatgemische bei den Chloridschmelzen erreicht bei den meisten Schmelzen ein $[\alpha]_D$ von 150 bis 160° nach links, der Drehwert der kolloidalen Cinnamatgemische der Anhydridschmelzen erreicht höchstens ein $[\alpha]_D$ von -100°, während der Drehwert der Cinnamatgemische der Zimtsäureschmelzen unter $[\alpha]_D = -50^\circ$ bleibt.

Der hohe Drehwert der Cinnamatgemische aus den Chloridschmelzen ist auf die Anwesenheit größerer Mengen des -275° drehenden krystallisierten Dicinnamats und auf das fast vollständige Fehlen des nur etwa -18° drehenden Monocinnamats zurückzuführen.

Der niedrige Drehwert der Cinnamatgemische aus der Anhydridschmelze muß durch die Abwesenheit des hochdrehenden krystallisierten Dicinnamats und durch die Anwesenheit des niedrigdrehenden Monocinnamats bedingt sein. Wie die ersten Versuche mit dem kolloidalen Cinnamatgemisch aus der Zimtsäureschmelze gezeigt haben, enthalten diese trotz der kolloidalen Beschaffenheit der Substanz eine nicht unbeträchtliche Menge von krystallisiertem Monocinnamat, dessen Trennung durch Auflösen des Cinnamatgemisches in verdünnter Sodalösung, Wiederausfällen der in Wasser schwer löslichen Cinnamate und Ausäthern des auch in kaltem Wasser reichlich löslichen Monocinnamats gelang.

Das auf diesem Wege vom Monocinnamat getrennte, in Wasser schwer lösliche Cinnamatgemisch zeigte nach Entfernung der Zimtsäure durch Ausziehen mit Ligroin in Sodalösung das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -69,6^\circ$ und enthielt nach der Verbrennung 63,31% Kohlenstoff, während für Dicinnamat 64,39% C berechnet ist.

Es war nun von Interesse, nach den bei den kolloidalen Cinnamatgemischen der Chloridschmelze und der Anhydridschmelze erprobten Trennungsmethoden zu versuchen, annähernd die in dem kolloidalen Cinnamatgemisch der Zimtsäureschmelzen enthaltenen Bestandteile zu bestimmen.

Schon nach den früheren Versuchen war in den Cinnamatgemischen aus der Zimtsäureschmelze mit der Anwesenheit beträchtlicher Mengen des niedrigdrehenden Monocinnamats zu rechnen¹⁾, was auch durch den folgenden Trennungsversuch bestätigt wurde.

Versuch 1.

50 g Zimtsäure und 50 g Weinsäure wurden unter dauerndem Umrühren $1\frac{3}{4}$ Stunden auf 170° erhitzt.

Nach raschem Abkühlen wurde die Schmelze mit Äther und Wasser in Lösung gebracht und die ätherische Lösung darauf zur Entfernung der durch die ätherische Lösung noch zurückgehaltenen Weinsäure nochmals mit Wasser geschüttelt.

Die ätherische Schicht hinterließ nach dem Verjagen des Äthers einen Rückstand, der zur Gewinnung der Zimtsäure mit Ligroin auf dem Wasserbade ausgezogen wurde. Die auf diese Weise gewonnene farblose Zimtsäure wog 33 g und besaß, in verdünnter Sodalösung untersucht, das Drehungsvermögen

$$[\alpha]_D = -2,0.$$

Das ungelöst gebliebene Cinnamatgemisch wog 32 g und drehte in verdünnter Sodalösung $[\alpha]_D = -41,5^\circ$. Es wurde bei 138° weich und war bei 179° vollständig geschmolzen, ein Zeichen, daß es nicht unerhebliche Mengen einer höher schmelzenden Substanz enthält. 5 g dieses Cinnamatgemisches wurden mit Äther in der Kälte übergossen. Der kolloidale Anteil ging in Lösung, während 1,2 g, d. i. 24% , einer krystallisierten Substanz zur Abscheidung gelangte, die sich durch ihren Schmelzpunkt 197° und ihre übrigen Eigenschaften als Monocinnamat zu erkennen gab.

Die ätherische Lösung der kolloidalen Substanz besaß das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -43^\circ$, in Sodalösung übergeführt $[\alpha]_D = -50,0^\circ$.

Durch Entfernung des Monocinnamats war also das Drehungsvermögen in Soda um $8,5^\circ$ von $41,5^\circ$ auf 50° gestiegen.

Nunmehr wurden 23,8 g des nämlichen Cinnamatgemisches in der gleichen Weise vom Monocinnamat befreit und der ätherlösliche Teil mit dem aus den 5 g erhaltenen vereinigt. Nach

¹⁾ Diese Zeitschr. 64, 308. 1914.

dem Verjagen des Äthers verblieben etwas über 20 g Substanz, die nach dem Lösen in verdünnter Sodalösung in der beschriebenen Weise in drei aufeinanderfolgenden Fraktionen angesäuert und angeäthert wurden.

	In Äther
1. Fraktion:	$[\alpha]_D = -75,0^\circ$
2. " "	$[\alpha]_D = -15,1^\circ$, krystallinisch F.P. = 195°
3. " "	— " F.P. = 195°

Die 2. und 3. Fraktion bestand aus krystallisiertem Monocinnamat. Die 1. Fraktion enthielt, wie die Extraktion mit Ligroin ergab, noch ca. 12,5% Zimtsäure, der übrige Teil war kolloidaler Natur.

Dieser Versuch ergibt, daß bei der Weinsäure-Zimtsäureschmelze vorzugsweise krystallisiertes Monocinnamat neben kolloidalem Cinnamatgemisch gebildet wird.

Wie bei allen fraktionierten Ansäuerungen wird das Monocinnamat zuletzt in Freiheit gesetzt, während die Zimtsäure zuerst und darauf die kolloidalen Cinnamate frei werden.

Versuch 2.

Aus einer Schmelze von 40 g Weinsäure und 40 g Zimtsäure, die unter Umrühren $1\frac{1}{4}$ Stunden bei 170° gehalten worden war, wurde nach Entfernung der Zimtsäure mit Ligroin durch fraktionierte Ansäuerung nach dem ersten Säuresatz 5,6 g kolloidales Cinnamatgemisch erhalten, das in ätherischer Lösung das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -64,5^\circ$ besaß, während die 2. und 3. Fraktion wieder aus tieferdrehendem Monocinnamat bestanden.

Um den in dem kolloidalen Cinnamatgemisch vom Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -64,5^\circ$ enthaltenen höchstdrehenden Bestandteil herauszuarbeiten, wurden die erhaltenen 5,6 g Cinnamatgemisch aus ihrer Sodalösung wieder in 3 Fraktionen in Freiheit gesetzt. Bei der ersten Ansäuerung wurde noch reichlich Zimtsäure abgeschieden neben kolloidalem Cinnamat.

	In Äther
1. Fraktion 0,9 g krystallinisch:	$[\alpha]_D = -18,8^\circ$
2. " 2,3 g kolloidal:	$[\alpha]_D = -112,6^\circ$
3. " 1,4 g glasig:	$[\alpha]_D = -8,4^\circ$

Nach der geringen Drehung der 3. Fraktion enthält diese noch Monocinnamat vielleicht neben Weinsäure.

Die 2,3 g der 2. Fraktion wurden in der gleichen Weise nochmals in 3 Fraktionen angesäuert.

	In Äther	In Soda
1. Fraktion 0,6 g kolloidal:	$[\alpha]_D = -133,8^\circ$	$[\alpha]_D = -164,0^\circ$
2. " 1,0 g "	$[\alpha]_D = -134,5^\circ$	$[\alpha]_D = -167,3^\circ$
3. " 0,3 g "	$[\alpha]_D = -33,7^\circ$	—

Nach der Analyse enthält die 2. Fraktion 61,30% C und 4,83% H.

Die Drehung der 1. und 2. Fraktion in Sodalösung zeigte nach 24 Stunden eine geringe Abnahme.

Die Sodalösung der 2. Fraktion schied auf Säurezusatz ein zähklebriges Cinnamat ab, das in Chloroform aufgenommen wurde.

Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels hinterblieben 0,6035 g kolloidale Substanz, deren Drehung in verdünnter Sodalösung $[\alpha]_D = -170,2^\circ$, also um 3° mehr als vorher, betrug.

Aus der Sodalösung wurde das Cinnamat aufs neue in Freiheit gesetzt, mit Äther aufgenommen und der beim Verdunsten verbleibende Rückstand zur Prüfung auf etwa noch vorhandene Zimtsäure mit Ligroin ausgekocht. Das Ligroin nahm keine Zimtsäure auf. Das in Ligroin ungelöst gebliebene Cinnamat ergab nach dem Trocknen bis zur Gewichtskonstanz bei der Analyse die folgenden Werte:

0,1311 g gaben 0,3078 g CO_2 und 0,0577 g H_2O

Berechnet für Dicinnamat: 64,39 C

4,39 H

Gefunden: 64,03 C

4,89 H

Die angesäuerte Lösung der zu dem Versuche verwendeten zweiten Fraktion, die den Kohlenstoffgehalt 61,30% und das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -167,3^\circ$ ergeben und aus der sich das in Wasser schwer lösliche kolloidale Cinnamat von dem Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -170,2^\circ$ abgeschieden hatte, wurde nunmehr mit Äther ausgezogen.

Der nach dem Verjagen des Äthers hinterbleibende Rückstand von 0,0567 g drehte in Sodalösung

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

Nach dem Ansäuern der Lösung wurde mit Essigester aus-

geschüttelt. Nach dem Verjagen des Lösungsmittels verblieb ein krystallinischer Rückstand vom Zersetzungspunkt 185 bis 188°.

Durch Drehungsvermögen, Krystallisation und Zersetzungspunkt ist die Substanz als Monocinnamat gekennzeichnet.

Die zweite Fraktion stellt danach ein Gemisch eines kolloidalen Dicinnamats vom Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -170^\circ$ und wenig krystallisierten Monocinnamats vor.

Der Versuch beweist, daß bei der Zimtsäure-Weinsäureschmelze neben viel Monocinnamat auch ein Dicinnamat entsteht, das aber zum Unterschied von dem krystallisierten Dicinnamat der Chloridschmelze kolloidaler Natur ist und um 105° weniger als dieses dreht.

Versuch 3.

Dieser Versuch wurde ausgeführt, um zu entscheiden, ob sich vielleicht aus dem bei der Zimtsäure-Weinsäureschmelze gebildeten Cinnamatgemisch durch Ausziehen mit Benzol das bei der Zimtsäurechlorid-Weinsäureschmelze auf diesem Wege so leicht erhältliche krystallisierte Dicinnamat gewinnen lassen würde.

Eine $1\frac{3}{4}$ Stunden bei 167° gehaltene Zimtsäure-Weinsäureschmelze 1:1 wurde in der gewöhnlichen Weise nach Abtrennung des größten Teils der Zimtsäure auf das im Ligroin unlösliche Cinnamatgemisch verarbeitet, das in ätherischer Lösung das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -27^\circ$, in Soda dagegen $[\alpha]_D = -33,2^\circ$ zeigte.

14 g des erhaltenen Gemisches wurden nunmehr zur Prüfung auf das in Benzol am leichtesten lösliche krystallisierte Dicinnamat mit Benzol auf dem Wasserbade ausgezogen.

Beim Erkalten schied sich eine feinkrystallisierte Substanz ab, die sich jedoch durch Schmelzpunkt und Drehungsvermögen als Monocinnamat zu erkennen gab.

Durch Einengen der Lösung wurden neben insgesamt 3,2 g Zimtsäure vier kolloidale Ausscheidungen gewonnen, deren Drehwert im Soda zu $[\alpha]_D = -40^\circ$, $-52,3^\circ$, -122° und -110° bestimmt wurden, dagegen nicht die Spur des -275° drehenden krystallisierten Dicinnamats.

Die Hauptmenge, d. i. 10 g. des kolloidalen Cinnamatgemisches blieb im Benzol ungelöst und wurde wie folgt weiter verarbeitet.

Beim Übergießen mit kaltem Äther blieb 1 g krystallisierter Substanz vom Zersetzungspunkt 200° und den Eigenschaften des Monocinnamats ungelöst.

Die ätherische Lösung hinterließ 8,5 g Substanz, die in Äther das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -26,3^{\circ}$ besaß.

Zur Entfernung von Zimtsäure wurde der Rückstand nochmals mit Benzol ausgekocht.

Die Benzollösung hinterließ beim Eindampfen einen teils krystallinischen, teils kolloidalen Rückstand, der an Ligroin beim Auskochen noch 2,6 g Zimtsäure abgab, die in Sodalösung das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -4,0^{\circ}$ zeigte, während der in Ligroin ungelöst gebliebene Rückstand in Sodalösung das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -86,4^{\circ}$ besaß.

Der beim Auskochen mit Benzol ungelöst gebliebene Teil des Rückstandes wurde nochmals mit kaltem Äther behandelt, wobei wiederum 0,7 g Monocinnamat ungelöst blieben.

Zur vollständigen Entfernung des auch in kaltem Wasser reichlich löslichen Monocinnamats wurde nunmehr die ätherische Lösung mit dem folgenden Resultat insgesamt 20 mal mit Wasser ausgeschüttelt und die in die wäßrige Lösung übergegangene Substanz durch Eindampfen gewonnen.

Der Rückstand des ersten Auszuges betrug 1,6 g, der des zweiten 0,6 g. Sie stellen ein Gemisch von Weinsäure und Monocinnamat vor. Ein Teil, aus Essigäther und Chloroform krystallisiert, ergab 0,5 g krystallinische Ausscheidung vom Schmelzpunkt 170° und dem Drehungsvermögen in Sodalösung $[\alpha]_D = +24,1^{\circ}$, also Weinsäure.

0,2 g des gleichen Rückstandes wurden mit Wasser und Äther geschüttelt und darauf beide Schichten untersucht.

Die wäßrige Schicht besaß das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = +13,2^{\circ}$, hinterließ beim Eindampfen 0,17 g krystallinische Substanz vom Schmelzpunkt 168° und ließ sich durch die Bildung von Weinstein leicht als Weinsäure charakterisieren.

Die ätherische Lösung hinterließ beim Eindampfen 0,6306 g krystallinische Substanz, die in Sodalösung abgelesen das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -15,9^{\circ}$ und den Schmelzpunkt 200° besaß und stellte somit Monocinnamat vor.

Die Ausschüttelungen 3 bis 11 lieferten zusammen 2,45 g krystallinische Substanz. Beim Umkrystallisieren aus Essigester

schied sich eine bei 197° sich zersetzende Substanz ab, die in Soda $[\alpha]_D = -18,0^\circ$ drehte, mithin aus Monocinnamat bestand.

Da die Bildung von Emulsionen das Ausschütteln der ätherischen Lösung mit Wasser sehr erschwert, so wurden die Ausschüttelungen 10 bis 20 mit einer Glaubersalzlösung vorgenommen, der die in Lösung übergegangenen Substanzen durch wiederholtes Ausschütteln mit Essigester entzogen wurden. Der Essigester wurde sodann auf dem Wasserbade zum Schluß unter Zusatz von etwas Wasser vollständig verjagt.

Während die Ausschüttelungen 10 und 11 noch 0,45 g kristallisierte Substanz lieferten, hinterließen die Ausschüttelungen 11 bis 20 durchweg glasige Substanz, zusammen 0,9 g, die in Sodalösung gedreht $[\alpha]_D = -74,3^\circ$ zeigte.

Daraus war zu schließen, daß nach der elften Ausschüttelung alles Monocinnamat in Lösung gegangen war, da die weiteren Ausschüttelungen bereits nur kolloidales Cinnamat lieferten, das demnach unter den angewandten Bedingungen zum Teil in Wasser löslich ist.

Es wurden deshalb die Ausschüttelungen der ätherischen Lösung des im Benzol unlöslichen Rückstandes nicht mehr weiter fortgesetzt, sondern die in der Lösung befindliche Substanz nach Feststellung des Drehungsvermögens durch Verdunsten des Lösungsmittels gewonnen und ihr Gewicht bestimmt.

Die nach dem Verjagen des Äthers zurückbleibende Substanz war kolloidaler Natur und wog nunmehr 1 g, woraus sich das Drehungsvermögen in Äther $[\alpha]_D = -98,5^\circ$ ergibt.

In Sodalösung gedreht wurde das $[\alpha]_D = -110,5^\circ$ gefunden, das sich nach zweitägigem Stehen nicht änderte.

Die Verbrennung lieferte 66,39 C und 5,16 H. Der für Dicinnamat (64,39 C) zu hohe Kohlenstoffgehalt beruht, wie die weitere Untersuchung lehrte, auf der Anwesenheit der Ausziehung entgangener Zimtsäure.

0,6 g wurden durch fraktionierte Ansäuerung in drei gleiche Teile zerlegt. 1. Fraktion: 0,2 g teils kristallinische, teils kolloidale Substanz. Zur Entfernung der Zimtsäure wurde mit Ligroin ausgekocht. Es schieden sich 0,12 g, d. i. von 0,6 g 24% farblose Zimtsäure ab vom Schmelzpunkt 130° , ungelöst blieben 0,08 g kolloidale Substanz, die in Sodalösung das Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -50,0^\circ$ zeigte.

2. Fraktion: Kolloidale Substanz, unter 100° weich, die in Äther das $[\alpha]_D = -132^{\circ}$, in Sodalösung das $[\alpha]_D = -145^{\circ}$ besaß. Bei der Verbrennung wurde gefunden:

0,1235 g gaben 0,2939 g CO_2 und 0,0535 g H_2O .

Berechnet für Dicinnamat:	Gefunden:
64,39 C	64,90 C
4,39 H	4,81 H.

Diese Fraktion dürfte daher außer einem Cinnamat vom Kohlenstoffgehalt des Dicinnamats nur noch geringe Mengen Zimtsäure eingeschlossen enthalten.

3. Fraktion: Kolloidale Substanz, unter 100° weich, die in Äther gelöst $[\alpha]_D = -156,9^{\circ}$ drehte und bei der Verbrennung 62,30 C und 4,93 H lieferte, während sich für Monodicinnamat 62,50 C und 4,17 H berechnet.

Nach der Analyse kann also ein Monodicinnamat vorliegen, das aus der bei der Schmelze sich bildenden Diweinsäure durch Eintritt von drei Zimtsäurerestern entstanden sein kann.

Aus der in unserer früheren Abhandlung zusammengestellten Tabelle der Drehwerte der bei der Chlorid-, der Anhydrid- und der Zimtsäureschmelze erhaltenen Cinnamate ging hervor, daß diese trotz ihrer äußeren Ähnlichkeit bzw. Nichtunterscheidbarkeit nicht miteinander identisch sein können¹⁾.

Die Chloridschmelzen drehten zwischen 153 bis 163° . Bei längerer Schmelzdauer ging der Drehwert jedoch bis auf ca. 103° herab.

Einen sehr viel niedrigeren, höchstens bis 100° ansteigenden Drehwert besaßen die Schmelzen mit Zimtsäureanhydrid, der auch durch längere Schmelzdauer nicht beeinflußt wurde.

Die niedrigsten, zwischen 28° und 42° liegenden Drehwerte wurden bei den aus den Zimtsäureschmelzen herausgearbeiteten Cinnamatgemischen festgestellt.

Die voranstehend mitgeteilten Trennungsversuche der drei Schmelzen haben nun einen besseren Einblick in die Art der Verschiedenheit der Schmelzen ergeben. Das $[\alpha]_D = -275^{\circ}$ drehende, kristallisierte Dicinnamat wird allein bei der Chlorid-

¹⁾ Diese Zeitschr. 77, 61, 1916.

schmelze gebildet. Der soviel höhere Drehwert dieser Schmelze ist mithin der Anwesenheit größerer Mengen dieses Cinnamates zuzuschreiben.

Das am niedrigsten drehende krystallinische Monocinnamat bildet sich in nennenswerter Menge in der Anhydrid- und mehr noch in der Zimtsäureschmelze und ist nur spurenweise in der Chloridschmelze nachweisbar.

Ein kolloidales Monodicinnamat von ziemlich konstantem Drehungsvermögen ($[\alpha]_D = \text{ca. } -120^\circ$) ließ sich unschwer aus den Chloridschmelzen durch die Kombination der beiden in Anwendung gebrachten Trennungsmethoden abscheiden.

Cinnamate des gleichen Kohlenstoffgehaltes, jedoch von höherem Drehwert, konnten bei den Trennungen der Anhydrid- und der Zimtsäureschmelze gewonnen werden. Desgleichen lieferten diese Schmelzen auch kolloidale Fraktionen von dem Kohlenstoffgehalt des Dicinnamats, jedoch von beträchtlich niedrigerem Drehwert als dem des krystallisierten Dicinnamats.

Bei dem fraktionierten Ausziehen der Schmelzen mit Benzol geht zuerst die am leichtesten lösliche Zimtsäure in Lösung. Der in Benzol am schwersten lösliche Rückstand enthält neben unveränderter Weinsäure Monocinnamat und Monodicinnamat, während die höher drehenden Cinnamate nach der Zimtsäure in Lösung gehen.

Bei der fraktionierten Ansäuerung wird bei allen Schmelzen zuerst Zimtsäure und zuletzt Monocinnamat in Freiheit gesetzt, nach der Zimtsäure etwa vorhandenes Monodicinnamat und Gemische von diesem und Cinnamaten vom Kohlenstoffgehalt des Dicinnamats.

In keiner Schmelze ließ sich eine Fraktion von einem höheren Kohlenstoffgehalt als dem des Dicinnamats von 64,39%₀ auffinden, so daß die Zimtsäure mit 72,97%₀ C den kohlenstoffreichsten Bestandteil in allen Schmelzen vorstellt.

Die Aktivität der Fraktionen von diesem Kohlenstoffgehalt kann somit nicht durch Beimengung von Cinnamaten erklärt werden, sondern muß auf die partielle asymmetrische Einstellung der Zimtsäuremoleküle zurückgeführt werden.

Von den durch Schmelzen von Weinsäure mit Zimtsäurechlorid, Zimtsäureanhydrid und Zimtsäure zu erhaltenden aktiven

Zimtsäuren besitzt die durch die Anhydridschmelze gewonnene bei weitem das höchste Drehungsvermögen.

Diese Tatsache verdient eine ganz besondere Beachtung, da die neben Zimtsäure bei dieser Schmelze erhaltenen Cinnamate ein sehr viel geringeres Drehungsvermögen besitzen als die der Chloridschmelze.

Das sehr hohe Drehungsvermögen der bei der Anhydridschmelze gewonnenen Zimtsäure kann daher kaum anders erklärt werden als durch die Annahme, daß die bei der Anhydridschmelze gebildeten Cinnamate ein besonders starkes Induktionsvermögen der Zimtsäure gegenüber besitzen.

Besondere Versuche, deren Beschreibung später folgen wird, haben die Richtigkeit dieser Annahme bestätigt, indem es nicht nur gelang, durch erneutes Schmelzen der aus der Anhydridschmelze gewonnenen Cinnamatgemische mit inaktiver Zimtsäure, sondern auch durch Erhitzen dieser Cinnamate mit inaktiver Zimtsäure in verschiedenen Lösungsmitteln Zimtsäurepräparate mit recht beträchtlichem Drehungsvermögen und genau für Zimtsäure stimmenden Kohlenstoffwerten herzustellen.

Die Gramsche Bakterienfärbung, ihr Wesen und ihre Bedeutung.

Von
Ernst Deußen.

(Mitteilung aus dem Laboratorium für angewandte Chemie und Pharmacie
und aus dem Hygienischen Institut der Universität Leipzig.)

(Eingegangen am 4. Dezember 1919.)

Die Gramsche Bakterienfärbung ist eine dem Mikroskopiker und besonders dem Mediziner wohlbekannte Methode zur Unterscheidung pathogener Bakterien; sie besteht darin, daß das auf einem Deckgläschen oder Objektträger angetrocknete Bakterienmaterial folgeweise je 1 bis 3 Minuten lang mit Carbol- (oder Anilin-) Gentianaviolettlösung, Jodjodkaliumlösung (sog. Lugolschen Lösung) und 96^o/_o (etwa) Weingeist übergossen wird; das Präparat wird hierauf mit Wasser abgespült, mit Fuchsin- oder einer andern Farbstofflösung kurz nachgefärbt und der überschüssige Farbstoff in fließendem Wasser entfernt, worauf das an der Luft getrocknete Präparat mit Hilfe von Kanadabalsam oder eingedicktem Zedernholzöl als Immersionsflüssigkeit mikroskopisch untersucht wird. Bei der Behandlung mit Weingeist behalten die gramfesten (grampositiven) Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, Diphtheriebacillen, Milchsäurebacillen, Hefe u. a. den schwarzblauen oder dunkelblauen Ton der Gramfarbe, bei den gramfreien (gramnegativen) Bakterien (*Kolibacillen*, *Gonokokken* u. a.) wird diese herausgelöst und das Bakterienmaterial nimmt nun die Gegenfärbung des Fuchsins an.

Um die Gramfärbung zu erklären, sind im Laufe der Zeit verschiedenartige Ansichten geäußert worden, von denen aber

einige experimentell unzureichend oder gar nicht begründet wurden.

Nach Unna handelt es sich bei den gramfesten Bakterien um eine an das Gewebe fester haftende chemische Verbindung des Pararosanilinsalzes und des Jods als bei den gramfreien. A. Fischer, der u. a. Albumose durch Kaliumdichromat in Form von kugelförmigen Gebilden, sog. Granula, fällte und sie nach Gram färbte, führt die Gramfestigkeit auf einen größeren Substanzreichtum, der eine größere Adsorptionskraft bedinge, zurück; hiernach wird der Färbungsvorgang rein physikalisch zu erklären versucht. Brudny meint, die plasmolyzierbaren Bakterien seien gramfrei, die nur schwach plasmolyzierbaren dagegen gramfest, während Eisenberg die größere oder geringere Durchlässigkeit des Ektoplasmas, das er sich aus Membran und plasmatischer Rindenschicht zusammengesetzt denkt, für das Maßgebende bei der Färbung hält. Außer den genannten Forschern sind Nikitine, R. und W. Albert, Aronson, Weiß, Gramme, Reichert und Hottinger hervorzuheben. Zum größeren Teile suchen sie die Gramfestigkeit durch das Vorhandensein gramfester Substanzen in den Bakterien zu erklären; es sollen dies stark färbare Eiweißkörper, Macleoproteide, Lipide u. a. m. sein; nach Hottinger bestehen bei den gramfesten Bakterien die gefärbten Nucleoproteidteilchen aus einem mehr oder minder groben Emulsoid, bei den gramfreien aus einem Kolloid von hoher Dispersität. Für die Folgezeit wichtig war die Beobachtung Kruses, daß die gramfesten Bakterien gegen 1% Kalilauge und gegen Trypsinverdauung im allgemeinen weit widerstandsfähiger sind als die gramfreien.

Es sei mir gestattet, meine früheren eingehenden Untersuchungen¹⁾ über die Gramfärbung hier in möglichster Kürze zusammenzufassen.

Aus der Versuchsanordnung ist hervorzuheben, daß mit Ausnahme von Actinomyces und Hefe, die in Form der käuflichen frischen Preßhefe zur Anwendung gelangte, jedesmal frisch übergeimpftes Bakterienmaterial von Schrägagarkulturen benutzt wurde; eine Prüfung des Materials auf Gramfestigkeit fand regelmäßig statt. Die in Jenenser Reagensgläsern oder anderen gut verschließbaren, kleineren Gefäßen angesetzten Bakterienaufschwemmungen wurden wenn möglich täglich sorgsam umgeschüttelt; bei Aufschwemmungen mit Flußsäure wurden Platintiegel, verschlossen mit Gummistopfen, angewendet.

Da von manchen Seiten den „Lipoid“-Verbindungen im Bakterienleibe eine Bedeutung für den positiven Ausfall der Gramreaktion zugesprochen wird, so wurden zu dem Zwecke Aureus, Mycoides und Hefe mit Fettlösungsmitteln wie Chloroform, Äther, Ligroin, außerdem noch mit 67% iger wäßriger Chloralhydratlösung und Schweizers Cellulose reagens, Kupferoxydammoniaklösung, bei Zimmertemperatur zusammengebracht; 67% Chloralhydratlösung ist bekanntlich vorzügliches Lösungsmittel für manche schwerer lösliche Substanzen (Maub). Die genannten Lösungs-

¹⁾ Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. 85, 235.

mittel waren unter den gewählten Versuchsverbindungen ohne Einfluß auf die Gramfestigkeit von Aureus, Mycoides und Hefe.

Die Umwandlung der gramfesten Bakterien Aureus, Mycoides und Hefe in gramfreie durch Säuren vollzog sich gemäß ihrem Dissoziationsgrade: die am stärksten dissoziierten Säuren bewirken die Umwandlung schneller als die mittelstarken und diese schneller als die schwachen Säuren; Erhöhung der Konzentration der Säuren und Erhöhung der angewandten Temperatur beschleunigen die Reaktion.

Von Säuren wurden benutzt: Salzsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure, Oxalsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und n-Buttersäure.

Messende Bestimmungen an Hefe zeigten deutlich, daß die Umwandlung gramfester Zellen in gramfreie abhängig ist von dem Dissoziationsgrade der benutzten Säure, von der Reaktionstemperatur und von der Säurekonzentration, danach kennzeichnet sich dieser Umwandlungsprozeß als ein chemischer. — Da von den Tabellen keine in meiner ersten Abhandlung über diesen Gegenstand veröffentlicht worden ist, möge die über die messenden Versuche mit hier auszugsweise wiedergegeben werden.

Zu den Versuchen gelangte das Hefenmaterial teils ohne jegliche Vorbehandlung teils vorbehandelt zur Anwendung. Die Vorbehandlung bestand darin, daß die benutzte Hefenmenge in wäßriger Aufschwemmung 5 Minuten auf 97° im Wasserbade erhitzt und darauf abzentrifugiert wurde.

Versuchsreihe a mit nicht vorbehandeltem Material.

	Nach 6 Tagen	14 Tg.	22 Tg.	49 Tg.	84 Tg.	
$\frac{1}{8}$ -Salzsäure . . .	60%	70%	100%	—	—	veränd. Zellen
" Schwefelsäure .	30%	45%	50%	100%	—	" "
" Oxalsäure . . .	0–1%	10%	45%	75%	—	" "
" Ameisensäure .	0	0	0	0	2–3%	" "

Versuchsreihe b mit vorbehandeltem Material.

	Nach 7 Tagen	20 Tg.	23 Tg.	48 Tg.	84 Tg.	
$\frac{1}{8}$ -Salzsäure . . .	40%	85%	100%	—	—	veränd. Zellen
" Schwefelsäure .	0	55%	75%	100%	—	" "
" Oxalsäure . . .	0	0	15%	75%	99%	" "
" Ameisensäure .	0	0	0	0–1%	3%	" "

Die Tabelle zeigt deutlich, daß die Zahl der umgewandelten Hefezellen abhängt von dem Dissoziationsgrad der einzelnen Säuren: je geringer dieser ist, desto geringer auch die Umwandlung. Ferner sehen wir, daß erhitztes Hefenmaterial anfänglich eine langsamere Umwandlung erfährt als nicht erhitztes;

erst im weiteren Verlaufe der Säureeinwirkung gleicht sich der Unterschied aus.

Auch andere gramfeste Bakterien wie Diphtherie, Pseudodiphtherie, Subtilis, Milzbrand, Actinomyces, Bulgaricus wurden durch Säuren bei geeigneter Konzentration und geeigneter Temperatur gramfrei. Eine Ausnahme in der Reihe der untersuchten Säuren machte die i-Milchsäure, wovon weiter unten die Rede sein wird.

Durch Kalilauge (0,04 bis 0,5 n) wurden Aureus, Mycoides und Hefe bei geeigneter Konzentration und Temperatur gramfrei, von anderen gramfesten Bakterien wie Diphtherie, Pseudodiphtherie, Subtilis, Milzbrand, Actinomyces und Bulgaricus wurden nur Actinomyces und Bulgaricus unter den obwaltenden Versuchsbedingungen durch Kalilauge gramfrei. Eine so eingehende Untersuchung wie bei Aureus, Mycoides und Hefe wurde nicht vorgenommen.

Von organischen Lösungsmitteln sind die chemisch differenten wie Alkohol und Aceton dadurch ausgezeichnet, daß sie unter geeigneten Versuchsbedingungen Aureus, Mycoides und Hefe gramfrei machen; je höher die hierbei angewandte Temperatur ist, desto schneller vollzieht sich — bei einem und demselben Lösungsmittel — diese Umwandlung; begünstigt wird sie auch durch einen noch nicht genauer festgestellten Gehalt an Wasser. Wasser allein von etwa 97° wirkt in analoger Weise bei Hefe, schwächer bei Mycoides und gar nicht bei Aureus, sofern man als Vergleichsdauer $1\frac{1}{2}$ Stunden zugrunde legt. Der Einfluß der chemisch indifferenten Lösungsmittel wie Benzin, Benzol, Toluol auf die Gramfestigkeit ist unerheblich, wenn man annähernd gleiche Versuchsbedingungen wie bei den differenten Lösungsmitteln anhält; die Einwirkung nimmt aber zu bei Steigerung der Temperatur und mit der Dauer des Versuchs.

Die angeführten Versuche geben keinen Anhalt für die Richtigkeit der Behauptung von Fr. Reichert¹⁾, daß der Verlust der Gramfestigkeit auf eine Extraktion von Lipoiden aus den Bakterienleibern durch organische Lösungsmittel wie Xylol, Benzin, Aceton, Tetrachloräthylen (!) u. a. zurückzuführen ist. Ebenfalls angreifbar ist der Befund von Jobling und Petersen²⁾, daß der Gehalt der Bakterien an ungesättigten Lipoid-

¹⁾ In.-Diss. Heidelberg 1913.

²⁾ Zeitschr. f. Immun. u. exper. Therap. 24, 292, 1915.

verbindungen proportional sei dem Widerstande der Bakterien bei der tryptischen Verdauung. Da Jobling und Petersen ihr Versuchsmaterial einem langandauernden Erhitzen mit organischen Lösungsmitteln (besonders Weingeist) aussetzten, so ist auf Grund vorliegender Arbeit anzunehmen, daß die Zellbestandteile hierbei außer einer physikalischen Lockerung auch eine chemische Änderung erleiden und weiteren chemischen Angriffen leichter zugänglich werden: sie erlagen der darauffolgenden tryptischen Verdauung leichter.

Bei der Gramfärbung von organischen und anorganischen Verbindungen ist voranzuschieken, daß das Material für die Färbung in einen möglichst fein und gut verteilten Zustand gebracht wurde. Die Ergebnisse sind dahin zusammenzufassen, daß Hühnereiweiß, Casein, Sohlenhaut des Hühnereies eine Zwischenstellung zwischen gramfrei und gramfest einnehmen, Nuclein und Nucleinsäure (aus Hefe, Grüblersches Präparat) zum größten Teil gut gramfest sind, während Kieselgur sich gramfrei verhält. Fein verteilter Quarzsand gehört zu den Verbindungen, die so gut wie ungefärbt bleiben, d. h. auch keine Gegenfärbung mit Fuchsin annehmen. Durch Behandlung mit Kalilauge werden Nuclein und besonders Nucleinsäure nach der gramfreien Seite hin beeinflußt. Es wurden auch noch die A. Fischerschen Chromatfällungen von Pepton Witte auf ihre Färbbarkeit nach Gram geprüft¹⁾. Fischer hatte u. a. durch Versuche gezeigt, daß Albumose, durch Kaliumdichromat, Platinchlorid usw. gefällt, sich um so gramfester zeigte, je größer die Granula waren; er schloß hieraus, daß die Gramfestigkeit der Bakterien auf einem größeren Substanzreichtum beruhe, die eine größere Adsorptionskraft für die Farbstoffe bedinge. Fischer führt sonach den Ausfall der Gramreaktion (übrigens auch der anderen Färbungsmethoden) auf die physikalische Beschaffenheit des Substrates zurück. Pepton Witte, bekanntlich zum größten Teile aus Albumose und zum kleinen Teile aus Pepton bestehend, wurde genau nach der Fischerschen Vorschrift in wäßriger Lösung mit dem doppelten Vol. 2,5% Kalium dichrom.-Lösung unter Zusatz von etwas Eisessig gefällt, es wurden hierbei teils gut ausgebildete Granula verschiedener Größe, teils Gerinnsel erhalten. Während A. Fischer angibt, daß „die Gramsche Methode wie mit Kaliumdichromat gefällte Albumose genau nach der Granulagröße sortiert wie die anderen sukzedaneen Doppelfärbungen“, indem die großen Granula der Entfärbung (mit Weingeist) länger widerstehen als die kleineren, fand ich, daß unterschiedlos einmal die großen Granula mehr entfärbt wurden als die kleineren, ein andermal die kleineren mehr als die größeren.

Die Färbung der Zellkerne und Kernteilungsfiguren der Zellkerne und Kernteilungsfiguren von Erbsenkeimen, der Zungenepithelien und der Spermien vom Stier und Menschen ergab folgendes: Bei der Gram-

¹⁾ A. Fischer, Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas, Jena, G. Fischer, 1899.

färbung der fertigen Mikrotomschnitte von Erbsenkeimen zeigten sich Kernkörperchen, Chromatinkörnchen, Chromosomen durchschnittlich schwarzblau und dunkelblau, die Spindelfasern anscheinend nur blau. Von der Substanz, aus welcher Kernkörperchen, Chromatinkörnchen und Chromosomen aufgebaut sind, nimmt man an, daß sie aus Protein- und Nucleinverbindungen besteht, experimentell gesichert ist aber diese Annahme nicht¹⁾.

Die Gramfärbung des größeren Teils der mit Wasser zentrifugierten Epithelien war blau und blaßblau mit dunkelblauen und blauen Kernen, in geringer Menge blaurot und rosa mit blauroten Kernen. Die Einwirkung von 2 bis 4 n-Salzsäure und 0,18 bis 0,36 n-Kalilauge bei 25 und 36° ging in der Weise vor sich, daß die Epithelzellen und deren Kerne in ihrer Gramfestigkeit geschädigt und nach Verlauf von etwa 10 Tagen immer mehr gramfrei wurden; dieser Vorgang vollzog sich bei 36° schneller als bei niedriger Temperatur und bei nicht zentrifugiertem Material. Ganz unbedeutend war die Wirkung der $\frac{1}{1}$ -Kalicarbonatlösung vergleichsweise so schwach wie bei Aureus und Mycoïdes. Ebenso wie Kalilauge die Zellkerne bald zum Verschwinden in den Epithelsellen brachte, wirkte destilliertes Wasser von 97° bei einer Dauer von $\frac{1}{2}$ Stunden; die Epithelsellen erscheinen dann kräftiger blau gefärbt als das Ausgangsmaterial. — Die mikroskopischen Bilder bei nichtzentrifugiertem Materiale waren nicht so klar und deutlich, wahrscheinlich wegen der Anwesenheit der dicklichen Speichelflüssigkeit, welche die Einwirkung des Reagens auf die Epithelsellen wohl verzögerte.

Das Spermienmaterial (beim Stiere das vom Hoden und Nebenhoden) wurde wie in ähnlichen Fällen dieser Arbeit in Jenenser Reagensgläsern angesetzt, und zwar mit Salzsäure ($\frac{1}{10}$, $\frac{1}{1}$ und 2 n) bei 36°, mit Kalilauge (0,04 bis 0,36 n) ebenfalls bei 36°, $\frac{1}{2}$ -Buttersäure bei 25 und 36°, 97° Weingeist bei 36°, Atherweingeist bei 20°. — Die nichtzentrifugierten Spermien zeigten durchschnittlich bei der Gramfärbung ein blässeres Blau als die mit Wasser zentrifugierten. Die Stierspermien wurden im allgemeinen blässer nach Gram gefärbt als die menschlichen, nur der dem Halse anliegende schmal begrenzte Teil des Kopfes der Stierspermien war ziemlich regelmäßig gut gramfest. Die Einwirkung der Salzsäure auf die Spermien des Stiers und des Menschen vollzog sich in der gleichen Weise: Der Kopfinhalt wurde nach kurzer Zeit herausgelöst, wobei Kopfhülse und Schwanzteil ungelöst zurückblieben. Kalilauge löste den Schwanzteil fort, Kopf mit Inhalt blieb erhalten. Bei einem Teil der Stierspermien wurde durch Kalilauge die Blau- und Blaßblaufärbung in Rot übergeführt; im übrigen scheint der hierbei sich abspielende Chemismus etwas verwickelter Natur zu sein. Die Köpfe der menschlichen Spermien wurden sowohl durch Kalilauge wie durch Salzsäure durchschnittlich gramfrei, in geringerem Grade durch die schwach dissoziierte $\frac{1}{2}$ -Buttersäure bei 36°, vereinzelt war auch ein

¹⁾ l. c. S. 296.

Herauslösen des Kopfinhaltes durch diese Säure zu beobachten, die schwache Wirkung wird wohl in der geringen Dissoziation der organischen Säure begründet sein. Bemerkenswert ist noch, daß durch 7stündige Einwirkung von 2% iger Kalilauge (0,36 n) auf die Spermien eine fast klare Lösung entstand, aus der die Spermienköpfe ohne Schwänze durch Ansäuern mit verd. Salzsäure wieder abgeschieden werden konnten, genau so wie es bei analogen Versuchen mit gramfesten Bakterien der Fall war.

Eine längere Aufbewahrung der menschlichen Spermien in Weingeist und in Ätherweingeist bei verschiedenen Temperaturen scheint keine merkliche Änderung in der Färbung hervorzurufen.

Im Anschlusse an die mitgeteilten Versuche muß ich auf die Kosselschen Untersuchungen über die Protamine¹⁾ ganz kurz eingehen. Zur Gewinnung des Protamins schüttelt dieser Forscher das mit Weingeist und mit Äther aus gezogenem Spermienmaterial mit 1% iger Schwefelsäure durch; aus dem schwefelsauren Filtrat ließ sich dann das Protaminsulfat durch Zusatz von Weingeist abscheiden und reinigen; über das mikroskopische Bild der mit H_2SO_4 behandelten Spermien teilt Kossel nichts mit. Die Tatsache, daß verd. Salzsäure (und wohl auch die nur wenig schwächere Schwefelsäure) den Kopfinhalt von Stier- und Menschenspermien herauszulösen imstande ist, während verd. Kalilauge ihn ganz oder fast ganz unberührt läßt, findet sich nirgends in der medizinischen und chemischen Literatur angegeben, worauf ich mit diesen Zeilen darauf hinweisen möchte.

Um meine Annahme zu stützen, daß die Gramfärbung auf chemischer Grundlage beruht und nicht auf physikalischer, wurde nach der bekannten Buchnerschen Methode der Zymasegewinnung das Zellenmaterial, Mycoides und Hefe, mit Quarzsand und Kieselgur feinstens zerrieben, auf Deckgläser angetrocknet und mit Gram gefärbt. Das gleiche geschah mit dem Hefepreßsaft, der genau nach der Buchnerschen Vorschrift²⁾ hergestellt wurde.

Mycoides. Das zerriebene Bakterienmaterial zeigte 2 verschieden färbbare Bestandteile, einen gramfesten und einen gramfreien; es ließen sich guterhaltene gramfeste Teile von Stäbchen erkennen, welche durch den scharfkantigen Quarzsand glatt quer durchschnitten waren. Die der Mycoideskultur anhaftende Schleimschubstanz neigt offensichtlich nach der gramfreien Seite desgleichen Kieselgur, während die Quarzstückchen, auch die kleinsten Splitterchen, fast ungefärbt waren.

Hefe. a) Zerriebene Hefe. Die mikroskopischen Bilder ließen größere, kleinere und kleinste Zellstücke erkennen, von denen sich ein Gutteil gramfest verhielt, während der andere sich in Abstufungen bis zu rot, auch in Form von feinem Gerinnsel, färben ließ. Anhaltspunkte

¹⁾ A. Kossel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 176, 1898; 25, 165; 31, 188; Zeitschr. f. Bakt. 19, 1896.

²⁾ E. und H. Buchner und M. Hahn, Zymasegärung, München-Berlin 1903, S. 58 ff.

für eine Bestätigung der Fischerschen Hypothese, daß die Gramfärbung sich nach der Korngröße richtet oder daß die substanzreicheren Partikelohen durchschnittlich die Gramfärbung länger behalten als substanzärmere, waren nicht zu finden.

b) Hefenpreßsaft, in 4 Fraktionen gewonnen. Alle 4 Fraktionen ergaben beim Antrocknen auf dem Deckglase feinstes und gleichmäßig verteiltes Gerinnsel, von dem der kleinere Teil gramfest (tiefblau bis schwarzblau), der größere gramfrei war. Man hat hier zu beachten, daß in den Hefepreßsaft ziemliche Mengen Kieselsäure, die von der benutzten Kieselgur stammen, übergehen, ferner auch, daß eine geringe chemische Beeinflussung des Bakterienmaterials durch Erwärmung desselben beim Zerreiben mit Sand und Kieselgur stattfindet¹⁾, in der Weise, daß durch die Wärme gramfeste Partikelohen in ihrem färberischen Verhalten ein wenig geschwächt werden können; Anhaltspunkte hierfür bietet vorliegende Arbeit. Färbte man 4 Wochen alten Preßsaft, so war nur rotes, rötliches oder höchstens bläulichrotes, also gramfreies Gerinnsel zu sehen. Nach den in vorliegender Arbeit gemachten Erfahrungen ist diese letztere Erscheinung auf eine allmählich einsetzende Umwandlung der gramfesten Bestandteile des Hefepreßsaftes bei der Aufbewahrung zurückzuführen.

Nach Wróblewski²⁾ sind im Hefepreßsaft hühnereiweißähnliche Stoffe enthalten, die sich durch eine verschieden hohe Koagulationstemperatur auszeichnen; von den Eiweißarten der Zymase wurde eine bei etwa 42°, eine zweite bei 47°, eine dritte bei 60 bis 65° und eine vierte bei 73 bis 78° gefällt; beim Erhitzen der Zymase über 70° hinaus wurden nur geringe Mengen Proteinstoffe niedergeschlagen. Wir haben es also hier mit 2 oder mehreren, wahrscheinlich noch nicht ganz reinen eiweißartigen Verbindungen von verschiedener Koagulationstemperatur zu tun. Ein ähnliches Verhalten gegen Temperatureinflüsse zeigen Bakterien bei der Selbstverdauung, bei der Verdauung mit Trypsin und Pepsin, gegen Kalilauge nach den Untersuchungen von Kruse, Bürgers, Schermann und Schreiber³⁾. Bei der Verdauung in physiol. Kochsalzlösung wurden die durch Hitze vorher abgetöteten Bakterien durchschnittlich nicht aufgelöst, ausgenommen Meningokokken und Milzbrandbacillen; bei *Prodigiosus* trat nach Erhitzung auf 60° keine Auflösung ein, dagegen bei höherer Temperatur und bei 100°. Die Trypsinverdauung, der die gramfreien Bakterien im Gegensatz zu den gramfesten erliegen, läßt gleichfalls auffallende Unterschiede bezüglich der Temperaturhöhe erkennen: die auf 60° erhitzten gramfreien Bakterien wurden durch Trypsin oftmals weniger angegriffen als die auf 100° er-

¹⁾ Vgl. hierzu Macfadyen, Berl. Ber. 33, 2764, 1900.

²⁾ Journ. f. prakt. Chem. 64, 1 u. ff., 1901.

³⁾ Kruse, Münch. med. Wochenschr. 1910 u. 1913. — Kruse, Bürgers, Schermann und Schreiber, Zeitschr. f. Hygiene u. Inf. 70, 126, 1911.

hitzten. Gleiche Erscheinungen traten auch bei der Einwirkung von Pepsinsalzsäure auf. Recht auffällig wurde das Bild bei Anwendung von 1% Kalilauge auf gramfreie Bakterien; hier spielte die Höhe der Temperatur, der sie vorher ausgesetzt waren, eine Rolle. Bei vielen der benutzten gramfreien Bakterien war die Auflösung dann am größten, wenn sie vorher nicht erhitzt waren, und am schwächsten, wenn die Temperatur vorher auf 100° gesteigert war. Lassen sich nicht die von Kruse und Mitarbeitern aufgefundenen Unterschiede am besten auf einen Gehalt von verschiedenartig zusammengesetzten Eiweißsubstanzen in den Bakterienzellen zurückführen? Auch Wróblewski hat es durch seine Versuche wahrscheinlich gemacht, daß in der Zymase eiweißartige Substanzen enthalten sind, die einen verschieden hohen Koagulationspunkt besitzen. Seit langem kennen wir den Bence-Jonesschen Eiweißkörper des Harns, der bei 50 bis 58° koaguliert, um sich bei höherer Temperatur oder auch beim Abkühlen unterhalb von 50° wieder zu lösen. Nehmen wir in den gramfesten und gramfreien Bakterien verschiedenartige Eiweißstoffe, in die große Klasse der Nucleoproteinverbindungen gehörig, an, so lassen sich die erwähnten Unterschiede ziemlich ungezwungen erklären. Die Unterschiede können dadurch hervorgerufen werden, daß die Nucleinverbindungen in den Bakterienzellen chemisch verschieden gebaut sind und deshalb gegen Agenzien sich verschieden verhalten, ferner daß sie verschiedene Koagulationstemperatur besitzen usw. Für meine Annahme sprechen auch die Experimentaluntersuchungen von Levene¹⁾ und von Plimmer²⁾. Levene fand, daß sich die purin- und pyrimidinhaltigen Komplexe der Hefennucleinsäure verschieden gegenüber dem hydrolysierenden Einflusse verd. Mineralsäuren verhalten: die pyrimidinhaltigen Komplexe werden schwieriger, d. h. langsamer hydrolysiert als die purinhaltigen. Plimmer zeigte, daß Nucleinsäure und Nucleinproteine gegen Salzsäure wenig beständig sind, da sie langsam Phosphorsäure abspalten; beständiger sind die sog. Phosphoproteine, Verschieden ist auch die Wirkung von Natronlauge auf Nucleinsäure, Phosphor wird hier nicht aus dem Molekül herausgezogen; deswegen nimmt die Hydrolyse der Nucleinsäure durch Natronlauge eine viel längere Zeit in Anspruch als die mit Salzsäure. Eine gewisse Bedeutung haben Plimmers Versuche mit den einfachen Phosphorsäureestern, dem Glycerophosphorsäureester, Phosphorsäureäthylester und der Hexosephosphorsäure. Säuren wirken langsam hydrolysierend, Alkalien bleiben im allgemeinen ohne Wirkung, nur die Hexosephosphorsäure wird durch Alkali schneller als durch Salzsäure hydrolysiert. Ähnliche Unterschiede in dem Verhalten gegen Salzsäure und Alkali finden wir auch bei den von uns untersuchten Bakterien wieder, so z. B. bei Hefe, Mycoides, Aureus einerseits und Diphtherie, Pseudodiphtherie, Subtilis andererseits gegen Kali; wie verschieden ist die Wirkung von Alkalicarbonaten oder siedendheißem

¹⁾ Berl. Ber. 44, 1027, 1911 u. 45, 608, 1912.

²⁾ Chem. Zentralbl. 2, 1941, 1908; 2, 1180, 1918.

Wasser auf Hefe¹⁾ im Vergleich zu Aureus! Dieses übereinstimmende oder abweichende Verhalten im Reaktionsmechanismus der Gramfärbung führt uns zu der Annahme, daß das Wesen der Gramfestigkeit von Bakterien an das Vorhandensein bestimmter organisch-chemischer Verbindungen im Zellleibe gebunden ist, sie scheinen in das große, nur wenig erforschte Gebiet der Nucleoproteide mit ihren so verschiedenartigen, an dem Molekül hängenden Komplexen und Seitenketten zu gehören. Macht man nun diese Annahme, so lassen sich die meisten der hier und von anderer Seite gemachten Beobachtungen und Erscheinungen ziemlich ungezwungen erklären; besonders der Einfluß der Säuren und Alkali oder auch der von Weingeist, Aceton und Wasser bei höheren Temperaturen; H- oder OH-Ionen treten hier in Wirksamkeit. Findet beispielsweise in manchen Fällen bei Anwendung von Kali keine oder schwache Wirkung statt, so läßt sich dies nach dem jetzigen Stande unserer Kenntnisse dahin deuten, daß es sich hier um festere oder andersgeartete Kerngebilde handelt, ähnlich dem Verhalten pyrimidinhaltiger Kerne im Vergleich zu purinhaltigen. Der Verlust der Gramfestigkeit ist dann auf eine Hydrolyse und Spaltung ester- oder glykosidartiger, primär noch nicht erfaßter Nucleoproteidverbindungen zurückzuführen, deren Spaltstücke gramfrei sind. Unter dieser Voraussetzung sind auch Zwischenstufen im Gramverhalten der Spaltstücke denkbar: je nach der Art der Komplexe und Seitenketten in den Nucleoproteidverbindungen und je nach der chemischen Zusammensetzung der Spaltstücke werden diese sich mehr oder weniger nach Gram färben lassen.

Die Färbungsversuche nach Gram führen zur Frage, welcher von den bekannteren Färbungstheorien wir uns anschließen haben. Sisley²⁾ hat die verschiedenen Theorien 1918 kurz, jedoch nicht vollständig zusammengestellt. Als erste führte er die von N. O. Witt an, wonach die Färbungen als feste Lösungen von Farbe in der Fasersubstanz aufgefaßt werden; er ist ein Vertreter der einen Richtung, die den Färbeprozess als auf Salzbildung beruhend ansieht. Die andere Richtung faßt den Prozeß als Adsorptionserscheinung auf; ein Vertreter ist der oben mehrfach erwähnte A. Fischer. Sisley übersah in seiner Zusammenstellung Unnas Färbungstheorie, deren Bedeutung die Chemiker bislang nicht recht anerkennen wollten. Unna³⁾ hatte 1887 beobachtet, daß Bakterien durch Rosaniline und Pararosanilin verschiedenartig gefärbt werden: man könne mit Hilfe von Bakterien das Pararosanilin und seine Verbindungen vom Rosanilin scharf unterscheiden. In seiner Schrift vertrat Unna, gestützt auf Experimentaluntersuchungen, die Ansicht, daß bei der Gramfärbung die Jodfarbstoffverbindung mehr oder weniger stark an das organische Gewebe gekettet wird je nach der chemischen Ver-

¹⁾ Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. 85, 259.

²⁾ Chem-Zeitg. 1918, 1357 u. 1379.

³⁾ Die Rosaniline u. Pararosaniline, eine bakteriolog. Farbenstudie. Hamburg-Leipzig 1887.

wandtschaft des betr. Gewebes zu dem Jodfarbstoffe, mit der Einschränkung, daß manche Färbungsunterschiede auf physikalische Ursache zurückzuführen sind. N. O. Witt¹⁾ hat s. Z. die Unnasche Schrift recht ungünstig und abfällig beurteilt — ganz zu Unrecht, wie die Folgezeit lehrte. Ich selbst bin auf Grund meiner Versuche zu dem Ergebnisse gekommen, daß wir aus den Färbungstheorien, nach welchen sich die Gramfärbung am einfachsten und ungezwungensten erklären läßt, der Unnaschen der Vorzug zu geben ist.

Neue Versuche.

Zur Einwirkung von Oxysäuren, insbesondere von Milchsäure auf die Gramfestigkeit von Kleinlebewesen.

Bei meiner ersten Veröffentlichung über die Gramsche Bakterienfärbung hatte ich (S. 313) gesagt, daß Aureus, Mycoïdes, Hefe, Diphtherie, Pseudodiphtherie usw. durch Säuren bei geeigneter Konzentration und Temperatur gramfrei werden; eine Ausnahme in der Reihe der untersuchten Säuren machte die Milchsäure (i-). Ich hatte gefunden, daß Aureus durch 10 und 18% Milchsäure selbst bei 36° nur wenig in seiner Gramfestigkeit geschwächt wurde, etwas größer war der Einfluß der Säure auf Hefe, bei Bulgaricus (dem Joghurtbacillus) machten sich Unregelmäßigkeiten folgender Art bemerkbar. 2 n-Milchsäure (18%) wirkte bei 23 und 36¹/₂° erst nach 15 bis 22 Tagen ein, 1,5% wieder hemmten viel schneller, schon nach 3 bis 4 Tagen waren im letzteren Falle die Fäden und Stäbchen fast oder ganz gramfrei. Dies stand mit den übrigen Ergebnissen der Arbeit im Widerspruch, wonach die Umwandlung der Bakterien durch Säuren analog dem Vorgange bei der Inversion des Rohrzuckers durch Säuren erfolgte.

Versuchsordnung.

Bei den früheren Versuchen wurde zumeist für die Probeentnahme eine bestimmte Menge der Bakterienaufschwemmung mit Sodalösung neutralisiert, darauf zentrifugiert, auf Deckgläser verteilt und nach Gram gefärbt. Am Schlusse meiner damaligen Ausführungen (S. 318) betonte ich, daß die sicherste Probeentnahme die wäre, die gut durchmischte

¹⁾ Für Chemiker dürfte es nicht ohne Interesse sein, die Wittsche Kritik in der Chemiker-Zeitung von 1887, Nr. 37, S. 560, zu lesen; es scheint eben schwierig zu sein, auf Grenzgebieten ein gerechtes Urteil zu fällen.

Probe ohne Zentrifugieren auf Deckgläser in dünner Schicht zu verteilen, an der Luft antrocknen zu lassen, Wasserspülung wenn irgend möglich vorzunehmen und dann erst nach Gram zu färben. Diese Methode versagt jedoch bei der Milchsäure, auch dann, wenn die Säure mit Kalio- oder Natriumcarbonat neutralisiert wurde. Erst in einer fast gesättigten Barytlösung wurde ein brauchbares Neutralisationsmittel gefunden. Vergleichende Versuche mit nachfolgender Wasserspülung und ohne eine solche zeigten keine Unterschiede, vorausgesetzt, daß mit Baryt genau neutralisiert war. Folgende Versuchsanordnung wurde eingeschlagen. Benutzt wurde Hefe (Preßhefe und Brauereihefe) und Aureus. Für die Aufschwemmungen dienten diesmal 5 com fassende, ausgedämpfte Glasfläschchen mit eingeriebenem Glasstöpsel. Nach bestimmten Zeiten wurden der gut durchmischten Aufschwemmung einige Tropfen mit einer kleinen Pipette entnommen und mit Barytwasser unter Benutzung von Lackmuspapier genau neutralisiert. Diese gut durchmischten Proben wurden auf sorgsam gereinigten Deckgläsern¹⁾ an der Luft ange- trocknet und nach Gram gefärbt: je 1 Min. Carbolgentiansviolett- und Lugolsche Lösung — $\frac{1}{2}$ Min. 30 Tropfen Alkohol darauf- tröpfeln — Wasserspülung — kurz nachfärben mit verd. Fuchsinlösung. Von Säuren wurden i-Milchsäure und Glykolsäure untersucht, außerdem noch zum Vergleiche die schwach dissoziierte Essigsäure und die etwas stärkere, der Oxalsäure nahestehende Phosphorsäure. Setzt man die Leitfähigkeit der Salzsäure gleich 100, so ordnen sich die genannten Säuren in folgender Weise:

Salzsäure	= 100,0
Phosphorsäure	= 7,0
Glykolsäure	= 1,3
Milchsäure	= 1,0
Essigsäure	= 0,4

Im folgenden ist das Versuchsmateriel tabellarisch wiedergegeben.

Einwirkung von Milchsäure, Glykolsäure, Phosphorsäure und Essigsäure auf Hefe und Aureus.

Hefe:

Milchsäure und Essigsäure bei 35 bis 37°		68 Tagen	72 Tagen
nach 57 Tagen			
2 n-Milchs.	wenige Proz. gramfr.	Hälfte gramfrei und Übergänge	
0,2- "	—	i. d. Hauptsache gut gramfest	
2 n-Essigs.	nur geringfügige Abschwächung	—	i. d. Hauptsache gut gramfest
0,2- "	—		i. d. Hauptsache gramfest, i. Auflös. begr. Zellen

¹⁾ A. a. O. S. 238.

	Glykolsäure bei 35 bis 37°		
	nach 11 Tagen	40 Tagen	59 Tagen
1/1 n-Lösg.	1/4 gramfr. u. Übergg.	—	60 bis 65% gramfrei
0,2- "	größtent. g. gramfest	10 bis 15% gramfrei	50% "

	Milchsäure und Phosphorsäure bei 45°		
	nach 9 Tagen		12 Tagen
2 n-Milchs.	50 bis 60% gramfrei		3/4 gramfrei und Übergg.
0,2- "	35 bis 45% " u. Übergg.		wie nach 9 Tagen
2 n-Phosphor- säure (annäh.)	größerer Teil gramfrei		gramfrei mit gramfesten Punktierungen i. Zellinnern

Vorher erhitztes Material (15 Min. mit Leitungswasser auf 98° erhitzt und zentrifugiert).

	Temperatur: 2 Wochen bei 25°, darauf 36°		
	nach 13 Tagen	40 Tagen	48 Tagen
2 n-Milchs.	kleinere Hälfte gramfrei	die Hälfte gramfrei	größere Hälfte gramfrei

	Aureus			
	(mit Leitungswasser einmal zentrif. Material).			
	Milchsäure, Temp. 1 Woche bei 37 bis 38°, darauf bei 40 bis 44°.			
	nach 7 Tg.	15 Tg.	21 Tg.	36 Tg.
2 n-Lösung	gramfest	größter Teil gramfest	größerer Teil gramfest	gramfeste Kokken, zum größten Teil auf einer dünnen Schicht von roten zerfallenen Kokkenmassen gelagert
0,2 n-Lösung	gramfest	vereinzelt gramfest	ebenso	ebenso, durch kräftigen Dunkelblauton vom 2 n-Milchsäure-Präparat unterschieden

Die Tabelle zeigt vor allem, daß 2 n-Milchsäure Hefe gramfrei machen kann bei 45° schneller und vollständiger als bei Bruttemperatur; ein Einfluß der 0,2 n-Milchsäure bei dieser letzteren Temperatur war nicht zu beobachten, deutlicher wurde er bei 45°, wo über 40% der Zellen ihre Gramfestigkeit mehr oder minder stark einbüßten. Ähnlich verhielt sich die nur um ganz wenig stärkere Glykolsäure, doch machten sich bei der 0,2 n-Lösung mit zunehmender Dauer der Einwirkung (von etwa 40 Tg. an) Unregelmäßigkeiten bemerkbar, die nicht weiter verfolgt wurden. Daß die schwache Essigsäure bei Bruttemperatur fast ganz unwirksam blieb, ferner daß die Phosphorsäure, stärker als Milch- und Glykolsäure dissoziiert, bei 45° schon nach 12 Tagen Hefe gramfrei machte, fügt sich dem Gesamtbilde, das wir von der Wirksamkeit starker und schwächerer

Säuren erhalten haben, zwanglos ein. — Beachtenswert ist der Versuch mit dem vorher auf 98° erhitzten Hefematerialie; man sieht, daß durch diese Vorbehandlung die Zellinhaltsstoffe durch die 2 n-Milchsäure schneller als ohne Vorbehandlung umgewandelt werden — das hat nichts Auffälliges an sich, wenn ich darauf hinweise, daß Erhitzen der Hefe mit Wasser auf 98° allein schon sie gramschwächer macht, je nach der Dauer der Einwirkung. Nicht so deutlich ist das Verhalten von Aureus gegen die 2 n-Milchsäure bei 37 bis 44° ; wegen der Kleinheit der Kokken und besonders wegen des allmählich einsetzenden Zerfalls derselben läßt sich die Umwandlung nur sehr schwer verfolgen. Die gramfesten Kokken nämlich waren auf einer rosa gefärbten dünnen Schicht gelagert, die nach ihrem ganzen Aussehen nur aus zerfallenen Kokken entstanden sein konnte; die Deckglaspräparate der 0,2 n-Milchsäure zeigten diese Erscheinung nicht, waren auch durch einen kräftigeren Dunkelblauton ausgezeichnet.

Bemerkungen zu den Arbeiten von Bial¹⁾ (Antiseptische Funktion des H-Ions), von Johannessohn²⁾ (Einfluß organischer Säuren auf die Hefegärung) und von Paul, Birstein und Reuß³⁾ (Beiträge zur Kinetik der Giftwirkung von gelösten Stoffen); Folgerungen.

M. Bial befaßte sich in seiner Arbeit mit der Einwirkung verdünnter anorganischer und organischer Säuren auf die Vergärung von Traubenzucker durch Hefe und untersuchte im Anschlusse daran auch den Einfluß von Neutralsalzen. Wie Bial fand, entspricht die antiseptische, entwicklungshemmende Kraft der angewandten Säuren bei der Vergärung der Größe ihrer Dissoziation, mithin dem Gehalt an H-Ionen; Neutralsalzzusätze zu den untersuchten Säuren ergaben einen Reaktionsverlauf, der analog der Inversion von Rohrzucker durch verdünnte Säuren bei Zusatz von Neutralsalzen vor sich ging.

Das Hauptergebnis der vorliegenden Arbeit über das Wesen der Gramreaktion ist, daß sich die Umwandlung gramfester

¹⁾ Zeitschr. f. physikal. Chem. 40, 513, 1902.

²⁾ Diese Zeitschr. 47, 97, 1912.

³⁾ Diese Zeitschr. 29, 202, 1910; vgl. auch Zeitschr. f. physikal. Chem. 20, 414, 1896.

Bakterien in gramfreie durch Säuren gemäß deren Dissoziationsgrade vollzieht und auf Zellinhaltsstoffe zurückzuführen ist, die je nach ihrem chemischen Bau durch Säuren und Alkalien einer verschieden starken hydrolytischen Spaltung des Moleküls unterliegen; die in Betracht kommenden Zellinhaltsstoffe gehören aller Wahrscheinlichkeit nach in das große Gebiet der Eiweißstoffe. Es hätte nun nahe gelegen, um diese meine Auffassung weiter zu stützen, die Umwandlung gramfester Bakterien durch Säuren bei Zusatz von Neutralsalzen zu prüfen. Ich unterließ es aus der Überlegung heraus, daß das Gesamtbild an Klarheit einbüßen würde, wie aus folgendem hervorgehen wird. Zu dem Zwecke muß ich des besseren Verständnisses halber auf einige Punkte in den Arbeiten von Bial, Johannessohn und Paul eingehen.

Bial.

Er ließ Hefe auf Traubenzucker bei Gegenwart wechselnder Mengen von Säuren allein und in Verbindung mit Neutralsalzen einwirken und stellte dann die jeweilige Gärintensität der Hefe fest. Seine Schlußfolgerungen sind folgende. Bei den schwachen Konzentrationen von Säuren und Neutralsalzen kommt nur die reine H-Ionenwirkung zur Geltung; gemäß der Dissoziationslehre drängen Zusätze von Neutralsalzen die Dissoziation der betreffenden Säuren zurück und zugleich auch die antiseptische Wirkung der Säuren. Die Anionen der Neutralsalze üben in dieser Verdünnung keine antiseptische Kraft aus. Wenn bei stärkeren Konzentrationen der Neutralsalze diese die antiseptische Kraft der Säuren nicht mehr schwächen, so liegt es nach Bials Ansicht daran, daß Neutralsalze dann selbst antiseptisch wirken. — Von Bials zahlreichen Tabellen will ich die Versuche mit Essigsäure und Natriumacetat und die mit Salzsäure und Chlornatrium auszugsweise anführen.

Bial fand, daß 0,025 n- und 0,1 n-Essigsäure (0,15 und 0,6%) die Gärintensität der Hefe auf $\frac{18}{100}$ und $\frac{9}{100}$ herabsetzte (als Ausgangswert für Hefe $\frac{60}{100}$ angenommen), während Zusätze von 0,7 n-Natriumacetat (5,7%) die Werte auf $\frac{57}{100}$ bzw. $\frac{34}{100}$ ansteigen ließen; bei größeren Zusätzen wie 1,2 n- und 1,5 n-Natriumacetat (9,8 und 12,3%) wurde die Gärintensität gleich Null, welcher Wert auch durch 1,4 Natriumacetat (11,5%) allein erreicht wurde. 0,0166 n-Salzsäure (0,06%) zeigte eine Gärintensität von $\frac{10}{100}$, bei Zusätzen von 0,2 n- und 0,8 n-Chlornatrium (1,2 und 1,8%) gingen wieder die Werte auf $\frac{57}{100}$ herauf, um durch mehr Neutralsalz (7,0 und 10,5%) auf $\frac{9}{100}$ und $\frac{3}{100}$ zu fallen. Zusätze von Chlornatrium allein, wie 0,6 und 5,9% beispielweise hatten keine hemmende Wirkung, erst höhere; durch 11,7% Kochsalz kam die Gärungstätigkeit der Hefe ganz zum Stillstand.

Johannessohn.

Er untersuchte den Einfluß von Ameisensäure und der höheren, wasserlöslichen Homologen, ferner von Natriumformiat und -acetat auf die Hefegärung und kam auf Grund seiner Versuche zu dem Schlusse, daß die Hauptrolle bei der gärungshemmenden Wirkung der Ameisensäure und deren Homologen (bis zur Isovaleriansäure) das nicht dissoziierte Molekül spielt; das Anion ist in der angewandten Konzentration ohne Bedeutung, während das H-Ion einen, wenn auch nicht sehr bedeutenden Faktor bei der Gärungshemmung darstellt. Bezüglich der Zusätze von Natriumformiat und -acetat finden wir bei Johannessohn folgendes Belegmaterial.

Natriumformiat.

- a) $\frac{1}{100}$ - bis $\frac{1}{2,5}$ -Lösung (0,17 bis 2,7%)
 vergären 77 bis 92% des zuges. Zuckers
 $\frac{1}{2,1}$ -Lösung (3,2%) vergären 50% " " "
- b) Ameisensäure¹⁾ + Natriumformiat
 obiger Konzentration vergären 0% " " "

Natriumacetat.

- a) $\frac{1}{11,4}$ - bis $\frac{1}{2,4}$ -Lösung (0,7 bis 3,5%)
 vergären 83 bis 87% " " "
 $\frac{1}{1,2}$ -Lösung (7,0%) vergären 18% " " "
- b) Essigsäure²⁾ + Natriumacetat (0,7
 und 3,5%) vergären 8,7 bis 20% " " "
 Essigsäure + Natriumacetat (7,0%)
 vergären 0% " " "

Paul, Birstein und Reuß.

Die Giftwirkung von Säuren prüften sie an Aureus. Hiernach betrug z. B. die Geschwindigkeitskonstante der Überchlorsäure und Jodwasserstoffsäure um Vielfaches mehr als für Salzsäure, Chlorsäure und Flußsäure. Hieraus schließt Paul, daß die H-Ionenkonzentration bei der Desinfektionswirkung der Säuren nicht allein maßgebend sei, sondern auch ihr Anion. Da dieses nun an und für sich auf Grund von Versuchen mit NaCl, NaNO₃, NaBr. in $\frac{1}{100}$ -Lösungen (demnach bei NaCl z. B. in 0,06% iger Lösung) keine merkliche Giftwirkung besteht, so nimmt er an, daß die Anionen, ohne selbst Desinfizienten zu sein, die Eigenschaft haben, die desinfizierende Wirkung des Wasserstoffions zu beschleunigen. An weiteren Beispielen wurde die größere Giftwirkung der Essig- und Buttersäure in $\frac{1}{2}$ - und schwächeren Lösungen im Vergleiche zur $\frac{1}{100}$ -Salzsäure gezeigt; hierfür seien sowohl die Anionen wie die undissoziierten Moleküle verantwortlich zu machen. Die Werte für die Desinfektionsgeschwindigkeitskonstante von Essig- und Buttersäure kommen

^{1) 2)} Johannessohn benutzte Konzentrationen, die im Kontrollversuche die Gärung vollständig hemmten.

in verdünnten Lösungen einander sehr nahe, weichen dagegen in höheren Konzentrationen stark voneinander ab; die Desinfektionswirkung der Essig- und Buttersäure hält Paul für viel stärker als die der Salzsäure in isohydrischen Lösungen. — Ebenso wie Bial und Johannessen prüfte auch Paul die Desinfektionsgeschwindigkeit von Säuren bei Gegenwart von Neutralsalzen. Als Beispiel sei das Verhalten von Salzsäure und Kaliumnitrat angeführt. $\frac{1}{100}$ -Salpetersäure (0,63%) ergab bei Zusatz von 1 bis 3 Mol KNO_3 (1 und 3%) eine Desinfektionsgeschwindigkeitskonstante von 0,163 und 0,272, durch Erhöhung des KNO_3 -Zusatzes wurde also die Desinfektionswirkung gesteigert. — Folgende Punkte mögen noch aus der Paulschen Arbeit hervorgehoben werden. Bei der Beurteilung der Neutralsalzwirkung auf physiologisch-chemische Reaktionen müsse berücksichtigt werden, daß eine allgemeingültige Erklärung kaum möglich sei. Als ein Beispiel erhöhter Neutralsalzwirkung, die schwierig zu deuten sei, führt Paul das Pheno $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ an, dessen Giftwirkung durch Zusatz von NaCl wesentlich verstärkt wird. Schließlich weist auch Paul auf gewisse Anschauungen in der Physiologie¹⁾ hin, wonach das Eiweiß, das außerhalb des Organismus auftritt, sich wesentlich anders verhalten soll als das im lebendigen Protoplasma vorhandene. Diese Eiweißart des lebendigen Protoplasmas unterscheide sich von der zuerst genannten, die als totes Eiweiß bezeichnet wird, durch eine größere Reaktionsfähigkeit; danach könne im Sinne dieser Hypothese die Abtötung der Zellen als eine Zersetzung des aktiven Protoplasmas aufgefaßt werden.

Fassen wir die wichtigsten Punkte der 3 Arbeiten kurz zusammen! 3,3% Natriumformiat setzt die Vergärung von Zucker auf die Hälfte, 7% Natriumacetat auf 18% herab, 11,5% Natriumacetat, ebenso 11,7% Natriumchlorid heben die Vergärung ganz auf, während ein Zusatz von 0,06% Salzsäure zu 7% Natriumchlorid die Gärintensität auf $\frac{8}{60}$ herabdrückt. Desgleichen lassen Zusätze von 1 bis 3% KNO_3 zu einer 0,63%igen Salpetersäure, die eine Desinfektionsgeschwindigkeitskonstante von 0,134 besitzt, diese bis auf 0,272 ansteigen. Vergewärtigen wir uns nun das Verhalten von Eiweißstoffen²⁾ gegen Salze und Säuren!

Eiweißfällende Salze sind: Natriumchlorid, Natriumsulfat, Natriumacetat, Natriumnitrat, wirksamer sind: Magnesiumsulfat, Calciumchlorid, Calciumnitrat und Kaliumacetat und am wirk-

¹⁾ Verworn, Biogenhypothese, Jena 1903; O. Loew, Chemische Energie der lebendigen Zelle, Stuttgart 1906.

²⁾ Vgl. z. B. F. N. Schulz, Sammlg. ehem. u. ehem.-phys. Vorträge, 11. Stuttgart 1907. Cohnheim, Chemie d. Eiweißkörper, Braunschweig 1904 u. a.

samsten (nach Cohnheim): Ammoniumsulfat und Zinksulfat. Durch Zusatz von Säuren findet schon bei geringen Salzmengen völlige Abscheidung von Eiweißstoffen statt — eine dem Harnanalytiker wohlbekannte Erscheinung. Nach Salkowski wurde z. B. durch Sättigung mit NaCl bei saurer Reaktion alle aktiven Eiweißstoffe gefällt, während bei neutraler Reaktion die Albumine gar nicht, die Globuline nur teilweise durch NaCl ausgesalzen werden. Dagegen ist Ovalbumin in verdünnter wäßriger Ammoniumsulfatlösung leicht löslich, auch noch löslich in einer Ammoniumsulfatlösung, die zur Hälfte gesättigt ist, unlöslich aber in 65⁰/₁₀iger Lösung; in solch konzentrierter Ammoniumsulfatlösung sind fast alle Eiweißstoffe unlöslich, ausgenommen die Peptone und Spaltungsprodukte der Eiweißstoffe. Eiweißfällend, jedoch unter sofortiger chemischer Veränderung der Eiweißstoffe, wirken viele Schwermetallsalze, von denen Kupfer- und Eisenverbindungen, wenn im Überschusse zugesetzt, die Fällungen wieder zum Verschwinden bringen. Durch die bekannten Alkaloidreagenzien, durch Alkohole, Phenole werden Eiweißstoffe gleichfalls gefällt, von den Phenolen ist am wirksamsten die bekannte Carbonsäure, von der oben kurz die Rede war, daß die Desinfektionskraft durch Kochsalzzusatz erhöht wird. Schließlich ist auch die bekannte Tatsache zu erwähnen, daß bei den verschiedenen Eiweißstoffen die Koagulationstemperatur eine verschiedene ist und von dem jeweiligen Salzgehalte abhängt. Hat doch auch Wróblewski¹⁾ durch Versuche es wahrscheinlich gemacht, daß in der Hefezymase eiweißartige Substanzen von verschieden hohem Koagulationspunkte enthalten sind!

Wir haben oben gesehen, daß durch Säuren und Neutralsalze in bestimmten Konzentrationsverhältnissen die Vergärung des Zuckers durch Hefe gehemmt oder auch ganz unterbunden wird. Machen wir nun die Annahme, daß bei diesen Vorgängen die in der Hefezelle enthaltenen Eiweiß- (und Nuclein-)stoffe eine physikalische oder chemische Veränderung erleiden, so dürften die Beobachtungen von Bial und von Johannessohn, daß Zusätze von Natriumacetat in Höhe von 7⁰/₁₀ und mehr, von Natriumformiat von etwa 4⁰/₁₀ an, von Natriumchlorid bei

¹⁾ Journ. f. prakt. Chem. 64, 1, 1901.

9% die Zuckervergärung mehr oder weniger stark hemmen, sich ungezwungen durch das physikalische und chemische Verhalten von Eiweißstoffen gegenüber solchen Reagenzien erklären lassen. Während in schwächeren Konzentrationen von Neutralsalzen die Reaktionsfähigkeit der in den Hefezellen enthaltenen Eiweißstoffe nicht leidet, tritt bei stärkerem Salzzusatze eine Hemmung oder ein Stillstand der chemischen Tätigkeit innerhalb der Zelle ein. Hierbei werden die Eiweißstoffe nach meiner Auffassung physikalisch oder chemisch so stark verändert, daß sie mit dem Zucker nur unvollkommen oder gar nicht mehr in eine chemische Wechselwirkung eintreten können.

Hinsichtlich der Inhaltsstoffe der Aureuskokken sind wir z. Z. noch im Unklaren; es läßt sich aber vermuten, daß auch diese eiweißähnliche Stoffe enthalten. Für die Annahme, daß es Eiweißstoffe sind, die durch einen Salzgehalt von bestimmter Stärke geschädigt werden, spricht z. B. die Beobachtung von Herzfeld und Klinger¹⁾, daß native Bakterien sich wie kolloidale Lösungen bestimmter Eiweißkörper verhalten, indem sie durch schwache Säuren sowohl wie durch Metall- und Neutralsalze ausgeflockt werden. Eine solche Ausflockung kann meines Erachtens nicht ohne Einfluß auf die Lebenstätigkeit der Zelle sein. Und so dürfte die erhöhte Giftwirkung bei Zusätzen von KNO_3 zu 0,63% Salpetersäure auf eine Koagulation oder chemische Veränderung der in Betracht kommenden eiweißartigen Substanzen bei Aureus zurückzuführen sein.

¹⁾ Diese Zeitschr. 83, 228, 1918.

Über die Umsetzungen von primärem Kaliumphosphat mit wachsenden Mengen von Calciumbicarbonat beim Kochen.

Von
Wilhelm Windisch und Walther Dietrich.

(Aus dem wissenschaftlichen Laboratorium des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin.)

(Eingegangen am 10. Dezember 1919.)

Mit 2 Figuren im Text.

In unserer Arbeit „Untersuchungen an Carbonaten und Phosphat-Carbonatgemischen mit oberflächenaktiven Indicatoren saurer und alkalischer Natur“¹⁾ hatten wir unter anderem auch die Umsetzung einer bestimmten Menge von primärem Kaliumphosphat mit steigenden Mengen von Calciumbicarbonat beim Kochen, unter besonderer Berücksichtigung der alkalischen und sauren Eigenschaften des vom entstandenen Niederschlag befreiten Filtrats mit Hilfe der neuen Titrationsmethoden verfolgt.

Es seien noch einmal die darauf bezüglichen Tabellen angeführt:

Einwirkung von $\frac{1}{10}$ -Calciumbicarbonat auf primäres Kaliumphosphat beim Kochen (Kochdauer 5 Minuten; Indicator Eucupin).

1,0 ccm der Calciumbicarbonatlösung entsprachen 0,2 ccm einer $\frac{1}{10}$ -Lösung.

Wasser	$\frac{1}{10}$ -prim. Phosphat		$\frac{1}{10}$ -Ca-Bicarbonat		Eucupinbichlorhydrat	Oberflächen- spannung			
ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm				
50	+	2,2	+	0,0	=	0,0	+	2,5	109,0
50	+	2,2	+	1,0	=	0,2	+	2,5	105,0
50	+	2,2	+	2,0	=	0,4	+	2,5	102,0
49	+	2,2	+	3,0	=	0,6	+	2,5	100,0

¹⁾ Diese Zeitschr. 100, 1920.

Wasser	$\frac{1}{10}$ -prim. Phosphat		$\frac{1}{10}$ -Ca-Bicarbonat		Euкупinbi- chlorhydrat	Ober- flächen- spannung		
	ccm	ccm	ccm	ccm				
48	+	2,2	+	4,0	= 0,8	+	2,5	99,0
47	+	2,2	+	5,0	= 1,0	+	2,5	98,0
46	+	2,2	+	6,0	= 1,2	+	2,5	96,0
45	+	2,2	+	7,0	= 1,4	+	2,5	95,0
44	+	2,2	+	8,0	= 1,6	+	2,5	96,0
43	+	2,2	+	9,0	= 1,8	+	2,5	96,0
42	+	2,2	+	10,0	= 2,0	+	2,5	96,0
41	+	2,2	+	11,0	= 2,2	+	2,5	95,0

Einwirkung von $\frac{1}{10}$ -Calciumbicarbonat auf primäres Kaliumphosphat beim Kochen (Kochdauer 5 Minuten; Indicator Undecylsäure).

Von der Calciumbicarbonatlösung entsprachen 1,0 ccm 0,2 ccm einer $\frac{1}{10}$ -Lösung.

Wasser	$\frac{1}{10}$ prim. Phosphat		$\frac{1}{10}$ -Calcium-bicarbonat		Natrium undecylat	Ober- flächen- spannung		
	ccm	ccm	ccm	ccm				
48	+	2,2	+	0,0	= 0,0	+	5	69,0
48	+	2,2	+	1,0	= 0,2	+	5	87,0
48	+	2,2	+	2,0	= 0,4	+	5	87,0
47	+	2,2	+	3,0	= 0,6	+	5	88,0
46	+	2,2	+	4,0	= 0,8	+	5	90,0
45	+	2,2	+	5,0	= 1,0	+	5	95,0
44	+	2,2	+	6,0	= 1,2	+	5	103,0
43	+	2,2	+	7,0	= 1,4	+	5	105,0
42	+	2,2	+	8,0	= 1,6	+	5	108,0
41	+	2,2	+	9,0	= 1,8	+	5	110,0
40	+	2,2	+	10,0	= 2,0	+	5	112,0
39	+	2,2	+	11,0	= 2,2	+	5	113,0

Über die Einwirkung des Calciumbicarbonats beim Kochen auf primäres Kaliumphosphat schrieben wir damals etwa folgendes:

Bei der Umsetzung einer konstanten Menge primären Phosphats mit steigenden Mengen Calciumbicarbonat zeigt sich, daß innerhalb der angewendeten Konzentrationsverhältnisse die Alkalität des vom Niederschlag befreiten Filtrats, gemessen an den Oberflächenspannungsausschlägen, mit Euкупinbichlorhydrat nicht konstant zunimmt. Nimmt man an, daß sich die Umsetzung zwischen den beiden Salzen nach der folgenden Gleichung abspielt



so müßte, da beim Kochen die Gleichung quantitativ im Sinne des oberen Pfeils verläuft, unter der weiteren Annahme, daß sich das gebildete Calciumphosphat unlöslich ausscheidet und keine alkalischen Wirkungen mehr ausüben kann, bei der Vermehrung des Calciumbicarbonats stets um den gleichen Betrag, wie es in der Tabelle der Fall ist, in der Lösung eine gleiche Vermehrung der Alkalität eintreten; denn wenn sich die Reaktion nach obiger Gleichung abspielt, entsteht stets die gleiche Menge alkalisch reagierendes sekundäres Kaliumphosphat.

Die Vermehrung der Alkalität des Filtrats müßte in der Tat in der angegebenen Weise erfolgen, wenn die Umsetzung der beiden Salze bei obiger Gleichung stehen bleiben würde; das ist aber nicht der Fall, da die Reaktion später bis zum tertiären Calciumphosphat verläuft. Daß die Bildung von tertiärem Erdalkaliphosphat durch eine bestimmte Menge Erdalkalibicarbonat das Filtrat weniger alkalisch macht, als die Umsetzung der bestimmten Menge bis zum sekundären Salz, zeigt die Überlegung, daß im ersten Falle 3 Calciummoleküle 2 Moleküle PO_4 binden, also auch nur eine 2 Molekülen PO_4 entsprechende Menge sekundäres Kaliumphosphat gebildet wird, während im letzteren Falle 3 Moleküle Ca sich auch mit 3 Molekülen PO_4 vereinigen und dementsprechend im zweiten Falle $\frac{2}{3}$ Teile sekundäres Phosphat zu $\frac{1}{3}$ Teilen sekundären Salzes im ersten Falle entstehen.

Man muß annehmen, daß die Umsetzung zwischen primärem Kaliumphosphat und Calciumbicarbonat mit steigender Konzentration des Bicarbonats infolge immer weiterer Abnahme des am Umsetzungsprozeß nicht beteiligten primärem sauren Phosphats und immer weiterer Vermehrung des alkalischen sekundären Phosphats sich immer mehr von der Umsetzung zum sekundären Erdalkaliphosphat in der Richtung zum tertiären Salz verschiebt infolge des immer weiteren Fortschreitens der Alkalität der Lösung.

Nach dieser Überlegung mußte die Alkalität der Lösung mit fortgesetztem Zusatz gleicher Mengen Erdalkalibicarbonats zu einer bestimmten Menge primären Phosphats in immer schwächerem Maße zunehmen, bis der Punkt gekommen ist, wo sämtliches neu hinzugefügte Erdalkalibicarbonat stets infolge der alkalischen Reaktion der Lösung bis zum tertiären

Phosphat umgesetzt wird. Von diesem Moment an mußte die Alkalität gleichmäßig mit der zugesetzten Menge an Bicarbonat zunehmen.

Ging die Umsetzung zwischen primärem Phosphat und Calciumbicarbonat in der Tat in der vermuteten Weise vor sich und findet ein allmählicher Übergang des Niederschlags bei steigendem Zusatz von Bicarbonat zu primärem Phosphat, von sekundärem zu tertiärem Calciumphosphat statt, so mußte sich das feststellen lassen, wenn man den Kalkgehalt der Niederschläge ermittelte; sie mußten prozentual immer kalkreicher werden.

Diese Versuchreihe haben wir im folgenden durchgeführt: Es wurde in folgender Weise verfahren:

2,2 ccm $\frac{2}{10}$ -primäres Kaliumphosphat wurden mit Mengen von Calciumbicarbonat versetzt, die in den aufeinanderfolgenden Versuchen 0,4 ccm, 0,8 ccm, 1,2 ccm usw. bis 6,8 ccm einer $\frac{2}{10}$ -Calciumbicarbonatlösung entsprachen und die Flüssigkeit stets bis zu einem bestimmten Volumen (ca. 50 ccm) aufgefüllt. Dann wurde 5 Minuten gekocht und das verdampfte Wasser durch Auffüllen zum ursprünglichen Volumen ersetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und dann durch dreimaliges Auffüllen des Filters mit kochendem Wasser bis zum Rande gewaschen, so daß die Waschung für jeden Versuch als gleich anzusehen war. Es ließ sich feststellen, daß in keinem Filtrat mehr Calcium vorhanden war. Es mußte sich also sämtliches zugesetzte Calcium, dessen Menge ja bekannt ist, im Niederschlag befinden, so daß damit die absolute Kalkmenge des Niederschlags ohne Analyse bekannt war. Es war demnach nur noch notwendig, im Filtrat den Phosphorsäuregehalt zu bestimmen. Diese wurde nach Lorenz ausgeführt und demnach die Phosphorsäure als Phosphorammoniumolybdat gefällt und gewogen.

Versuch 1 bis 17.

Die folgenden Phosphorsäurezahlen geben den Gehalt des vom Niederschlag befreiten Filtrats an PO_4 an. Von der verwendeten Calciumbicarbonatlösung enthielten 20 ccm 0,0116 g CaO , so daß 2,0 ccm der Lösung fast genau 0,4 ccm einer $\frac{2}{10}$ -Lösung entsprachen.

	Wasser		³ / ₁₀ -prim. Kalium- phosphat		=	³ / ₁₀ -Calcium- bicarbonat	Nieder- schlag	PO ₄
	ccm		ccm			ccm	g	g
1.	48	+	2,2	+	2,0	=	0,4	0,4287 = 0,0187
2.	46	+	2,2	+	4,0	=	0,8	0,3890 = 0,0172
3.	44	+	2,2	+	6,0	=	1,2	0,3728 = 0,0164
4.	42	+	2,2	+	8,0	=	1,6	0,3538 = 0,0147
5.	40	+	2,2	+	10,0	=	2,0	0,3039 = 0,0134
6.	38	+	2,2	+	12,0	=	2,4	0,2784 = 0,0123
7.	36	+	2,2	+	14,0	=	2,8	0,2600 = 0,0112
8.	34	+	2,2	+	16,0	=	3,2	0,2322 = 0,0102
9.	32	+	2,2	+	18,0	=	3,6	0,2095 = 0,0093
10.	30	+	2,2	+	20,0	=	4,0	0,1772 = 0,0078
11.	28	+	2,2	+	22,0	=	4,4	0,1546 = 0,0068
12.	26	+	2,2	+	24,0	=	4,8	0,1040 = 0,0046
13.	24	+	2,2	+	26,0	=	5,2	0,0948 = 0,0042
14.	22	+	2,2	+	28,0	=	5,6	0,0685 = 0,0030
15.	20	+	2,2	+	30,0	=	6,0	0,0465 = 0,0021
16.	18	+	2,2	+	32,0	=	6,4	0,0468 = 0,0021
17.	16	+	2,2	+	34,0	=	6,8	unwägb. Spuren Niederschl.

Versuche 1 bis 11 wurde in einer Versuchsreihe durchgeführt, Versuche 12 bis 17 wurden an einem folgenden Tage mit einer Calciumbicarbonatlösung, bei der 20 ccm 0,0110 g CaO enthielten, ausgeführt.

Mit vorliegendem Zahlenmaterial kann man nun an die Berechnung der Zusammensetzung der Niederschläge und der Filtrate gehen.

Bei allen 17 Versuchen wurde von 2,2 ccm ³/₁₀-primärem Kaliumphosphat ausgegangen. Diese 2,2 ccm enthalten 0,0209 g PO₄ und 0,0086 g K.

Die verwendete Calciumbicarbonatlösung enthielt für die ersten 11 Versuche in 20 ccm Flüssigkeit 0,0116 g CaO oder in 2,0 ccm 0,00083 g Ca.

Um eine Grundlage für die Zusammensetzung obiger Niederschläge zu haben, soll zunächst die Zusammensetzung des primären, sekundären und tertiären Calciumphosphats, wie sie sich nach den Molekulargewichten errechnet, angeführt werden.

$\text{CaH}_2(\text{PO}_4)_2 : \text{PO}_4 = 81,2\%$; $\text{Ca} = 17,1\%$ oder wenn man setzt

$\text{PO}_4 = 100,0\%$; $\text{Ca} = 21,0\%$

$\text{CaHPO}_4 : \text{PO}_4 = 69,8\%$; $\text{Ca} = 29,4\%$ oder wenn man setzt

$\text{PO}_4 = 100,0\%$; $\text{Ca} = 42,1\%$

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 : \text{PO}_4 = 61,3\%$; $\text{Ca} = 38,7\%$ oder wenn man setzt

$\text{PO}_4 = 100,0\%$; $\text{Ca} = 63,1\%$.

Es soll an einem Beispiel der eingeschlagene Berechnungsweg durchgeführt und für die dann folgenden Niederschläge und Filtrate nur das Rechnungsergebnis angeführt werden.

Versuch 1.

2,2 ccm $\frac{1}{10}$ -primäres Kaliumphosphat ($\text{PO}_4 = 0,0209$ g und $\text{K} = 0,0086$ g) waren mit 2,0 ccm Calciumbicarbonatlösung ($\text{Ca} = 0,0008$ g) gekocht und der Niederschlag abfiltriert worden. Im Filtrat ließ sich kein Calcium ermitteln, sondern nach obiger Tabelle nur 0,4287 g Phosphorammoniummolybdat, das 0,0187 g PO_4 enthält.

Der Niederschlag auf dem Filter muß nach diesen Analysenangaben enthalten:

0,0209 g PO_4 — 0,0187 g $\text{PO}_4 = 0,0022$ g PO_4 und 0,0008 g Ca.
Setzt man 0,0022 g $\text{PO}_4 = 100,0$, so ergibt sich für Ca = 36,3.

Der Niederschlag I würde also weniger Calcium enthalten, als reines sekundäres Phosphat, für das Ca = 42,1 beträgt.

Im Filtrat müssen vorhanden sein 0,0187 g PO_4 (analytisch gefunden) und 0,0086 g K (gesamte Kaliumgehalt der 2,2 ccm $\frac{1}{10}$ -primären Kaliumphosphats). Von diesem Kalium muß der größte Teil als primäres und ein kleiner Teil als sekundäres Salz vorhanden sein.

Nehmen wir zunächst an, daß sämtliches, in dem Filtrat vorhandenes PO_4 als KH_2PO_4 vorhanden sei, dann binden 0,0187 g PO_4 nach einer einfachen Rechnung 0,0078 g K. In der Tat befinden sich aber im Filtrat 0,0086 g K, so daß demnach nach dieser Rechnung 0,0008 g K ungebunden bleiben. Diese Menge von 0,0008 g K muß also das zweite Atom K in einem Molekül K_2HPO_4 darstellen, so daß im ganzen 0,0008 g · 2 = 0,0016 g K als K_2HPO_4 vorliegen müssen.

Es gehören zu 0,0016 g K nun 0,0019 g PO_4 nach der Formel K_2HPO_4 .

Im Filtrat vorhanden wären demnach

0,0086 g — 0,0016 g = 0,0070 g K + 0,0187 g — 0,0019 g = 0,0168 g PO_4
als KH_2PO_4 ,

also

0,0070 g K + 0,0168 g $\text{PO}_4 = 0,0238$ g KH_2PO_4 und
0,0016 g K + 0,0019 g $\text{PO}_4 = 0,0035$ g K_2HPO_4 .

Aus bestimmten Gründen rechnen wir die Menge des im Filtrat vorhandenen KH_2PO_4 und K_2HPO_4 in ccm $\frac{1}{10}$ -Lösung der betreffenden Stoffe um. Unter einer $\frac{1}{10}$ - K_2HPO_4 -Lösung wird eine solche verstanden, die $\frac{1}{10}$ Molekulargewicht im Liter gelöst enthält. In derselben Weise ist eine $\frac{1}{10}$ -Lösung von K_2PO_4 aufzufassen.

0,0238 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 1,76$ ccm $\frac{1}{10}$ - KH_2PO_4
0,0035 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 0,20$ ccm $\frac{1}{10}$ - K_2HPO_4 .

Versuch 2.

Niederschlag: 0,0209 g PO_4 — 0,0172 g $\text{PO}_4 = 0,0037$ g PO_4
und Ca = 0,0017 g

$\text{PO}_4 = 100,0$; Ca = 45,9.

Filtrat: 0,0172 g PO_4 und 0,0086 g K.

Das Filtrat enthält nach der Berechnungsweise Versuch 1:
 $0,0056 \text{ g K} + 0,0185 \text{ g PO}_4 = 0,0191 \text{ g KH}_2\text{PO}_4$ und
 $0,0080 \text{ g K} + 0,0087 \text{ g PO}_4 = 0,0087 \text{ g K}_2\text{HPO}_4$.

Es entsprechen

$$0,0191 \text{ g KH}_2\text{PO}_4 = 1,42 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-KH}_2\text{PO}_4$$

$$0,0087 \text{ g K}_2\text{HPO}_4 = 0,89 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{HPO}_4$$

Versuch 3.

Niederschlag: $0,0209 \text{ g PO}_4 - 0,0164 \text{ g PO}_4 = 0,0045 \text{ g PO}_4$
 und $\text{Ca} = 0,0025 \text{ g}$
 $\text{PO}_4 = 100,0; \text{Ca} = 55,5$.

Filtrat: $0,0164 \text{ g PO}_4$ und $0,0086 \text{ g K}$.

Das Filtrat enthält nach der Berechnung:

$$0,0050 \text{ g K} + 0,0120 \text{ g PO}_4 = 0,0170 \text{ g KH}_2\text{PO}_4 \text{ und}$$

$$0,0086 \text{ g K} + 0,0044 \text{ g PO}_4 = 0,0080 \text{ g K}_2\text{HPO}_4$$

Es entsprechen

$$0,0170 \text{ g KH}_2\text{PO}_4 = 1,26 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-KH}_2\text{PO}_4$$

$$0,0080 \text{ g K}_2\text{HPO}_4 = 0,46 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{HPO}_4$$

Versuch 4.

Niederschlag: $0,0209 \text{ g PO}_4 - 0,0147 \text{ g PO}_4 = 0,0062 \text{ g PO}_4$
 und $\text{Ca} = 0,0033 \text{ g}$
 $\text{PO}_4 = 100,0; \text{Ca} = 53,2$.

Filtrat: $0,0147 \text{ g PO}_4$ und $0,0086 \text{ g K}$.

Das Filtrat enthält nach der Berechnung:

$$0,0086 \text{ g K} + 0,0086 \text{ g PO}_4 = 0,0122 \text{ g KH}_2\text{PO}_4 \text{ und}$$

$$0,0050 \text{ g K} + 0,0061 \text{ g PO}_4 = 0,0111 \text{ g K}_2\text{HPO}_4$$

Es entsprechen

$$0,0122 \text{ g KH}_2\text{PO}_4 = 0,90 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-KH}_2\text{PO}_4$$

$$0,0111 \text{ g K}_2\text{HPO}_4 = 0,64 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{HPO}_4$$

Versuch 5.

Niederschlag: $0,0209 \text{ g PO}_4 - 0,0134 \text{ g PO}_4 = 0,0075 \text{ g PO}_4$
 und $\text{Ca} = 0,0042 \text{ g}$
 $\text{PO}_4 = 100,0; \text{Ca} = 56,0$.

Filtrat: $0,0134 \text{ g PO}_4$ und $0,0086 \text{ g K}$.

Das Filtrat enthält nach der Berechnung:

$$0,0024 \text{ g K} + 0,0059 \text{ g PO}_4 = 0,0083 \text{ g KH}_2\text{PO}_4 \text{ und}$$

$$0,0082 \text{ g K} + 0,0075 \text{ g PO}_4 = 0,0137 \text{ g K}_2\text{HPO}_4$$

Es entsprechen

$$0,0083 \text{ g KH}_2\text{PO}_4 = 0,62 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-KH}_2\text{PO}_4$$

$$0,0137 \text{ g K}_2\text{HPO}_4 = 0,79 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{HPO}_4$$

Versuch 6.

Niederschlag: $0,0209 \text{ g PO}_4 - 0,0123 \text{ g PO}_4 = 0,0086 \text{ g PO}_4$
und $\text{Ca} = 0,0050 \text{ g}$

$\text{PO}_4 = 100,0; \text{Ca} = 58,1.$

Filtrat: $0,0123 \text{ g PO}_4$ und $0,0086 \text{ g K}.$

Das Filtrat enthält nach der Berechnung:

$0,0016 \text{ g K} + 0,0038 \text{ g PO}_4 = 0,0054 \text{ g KH}_2\text{PO}_4$ und

$0,0070 \text{ g K} + 0,0085 \text{ g PO}_4 = 0,0155 \text{ g K}_2\text{HPO}_4.$

Es entsprechen

$0,0054 \text{ g KH}_2\text{PO}_4 = 0,40 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-KH}_2\text{PO}_4$

$0,0155 \text{ g K}_2\text{HPO}_4 = 0,89 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{HPO}_4.$

Versuch 7.

Niederschlag: $0,0209 \text{ g PO}_4 - 0,0112 \text{ g PO}_4 = 0,0097 \text{ g PO}_4$
und $\text{Ca} = 0,0058 \text{ g}$

$\text{PO}_4 = 100,0; \text{Ca} = 59,9.$

Filtrat: $0,0112 \text{ g PO}_4$ und $0,0086 \text{ g K}.$

Das Filtrat enthält nach der Berechnung:

$0,0006 \text{ g K} + 0,0015 \text{ g PO}_4 = 0,0021 \text{ g KH}_2\text{PO}_4$ und

$0,0080 \text{ g K} + 0,0097 \text{ g PO}_4 = 0,0177 \text{ g K}_2\text{HPO}_4.$

Es entsprechen

$0,0021 \text{ g KH}_2\text{PO}_4 = 0,15 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-KH}_2\text{PO}_4$

$0,0177 \text{ g K}_2\text{HPO}_4 = 1,02 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{HPO}_4.$

Versuch 8.

Niederschlag: $0,0209 \text{ g PO}_4 - 0,0102 \text{ g PO}_4 = 0,0107 \text{ g PO}_4$
und $\text{Ca} = 0,0066 \text{ g}$

$\text{PO}_4 = 100,0; \text{Ca} = 61,7.$

Filtrat: $0,0102 \text{ g PO}_4$ und $0,0086 \text{ g K}.$

Von diesem Versuch an binden wir zunächst sämtliches PO_4 als K_2HPO_4 an K und rechnen den verbleibenden Rest an K als K_3PO_4 aus.

Das Filtrat enthält nach der Berechnung:

$0,0080 \text{ g K} + 0,0097 \text{ g PO}_4 = 0,0177 \text{ g K}_2\text{HPO}_4$ und

$0,0006 \text{ g K} + 0,0005 \text{ g PO}_4 = 0,0011 \text{ g K}_3\text{PO}_4.$

Es entsprechen

$0,0177 \text{ g K}_2\text{HPO}_4 = 1,02 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{HPO}_4$

$0,0011 \text{ g K}_3\text{PO}_4 = 0,06 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_3\text{PO}_4.$

Versuch 9.

Niederschlag: $0,0209 \text{ g PO}_4 - 0,0093 \text{ g PO}_4 = 0,0116 \text{ g PO}_4$
und $\text{Ca} = 0,0075 \text{ g}$

$\text{PO}_4 = 100,0; \text{Ca} = 64,6.$

Filtrat: $0,0093 \text{ g PO}_4$ und $0,0086 \text{ g K}.$

Das Filtrat enthält nach der Berechnung:

$$0,0059 \text{ g K} + 0,0071 \text{ g PO}_4 = 0,0130 \text{ g K}_2\text{HPO}_4 \text{ und} \\ 0,0027 \text{ g K} + 0,0022 \text{ g PO}_4 = 0,0049 \text{ g K}_2\text{PO}_4.$$

Es entsprechen

$$0,0130 \text{ g K}_2\text{HPO}_4 = 0,75 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{HPO}_4 \\ 0,0049 \text{ g K}_2\text{PO}_4 = 0,23 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{PO}_4.$$

Versuch 10.

Niederschlag: $0,0209 \text{ g PO}_4 - 0,0078 \text{ g PO}_4 = 0,0131 \text{ g PO}_4$
und $\text{Ca} = 0,0083 \text{ g}$
 $\text{PO}_4 = 100,0; \text{Ca} = 68,3.$

Filtrat: $0,0078 \text{ g PO}_4$ und $0,0086 \text{ g K}.$

Das Filtrat enthält nach der Berechnung:

$$0,0020 \text{ g K} + 0,0025 \text{ g PO}_4 = 0,0045 \text{ g K}_2\text{HPO}_4 \text{ und} \\ 0,0066 \text{ g K} + 0,0053 \text{ g PO}_4 = 0,0119 \text{ g K}_2\text{PO}_4.$$

Es entsprechen

$$0,0045 \text{ g K}_2\text{HPO}_4 = 0,26 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{HPO}_4 \\ 0,0119 \text{ g K}_2\text{PO}_4 = 0,55 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{PO}_4.$$

Versuch 11.

Niederschlag: $0,0209 \text{ g PO}_4 - 0,0068 \text{ g PO}_4 = 0,0141 \text{ g PO}_4$
und $\text{Ca} = 0,0091 \text{ g}$
 $\text{PO}_4 = 100,0; \text{Ca} = 64,5.$

Filtrat: $0,0068 \text{ g PO}_4$ und $0,0086 \text{ g K}.$

Von diesem Versuch wird zunächst sämtliches PO_4 als K_2PO_4 an K gebunden und das übrigbleibende K als K_2CO_3 in der Lösung angenommen.

Das Filtrat enthält nach der Berechnung:

$$0,0084 \text{ g K} + 0,0068 \text{ g PO}_4 = 0,0152 \text{ g K}_2\text{PO}_4 \text{ und} \\ 0,0002 \text{ g K} = 0,0003 \text{ g K}_2\text{CO}_3.$$

Es entsprechen

$$0,0152 \text{ g K}_2\text{PO}_4 = 0,71 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{PO}_4 \\ 0,0003 \text{ g K}_2\text{CO}_3 = 0,05 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{CO}_3.$$

Versuch 12.

Niederschlag: $0,0209 \text{ g PO}_4 - 0,0046 \text{ g PO}_4 = 0,0163 \text{ g PO}_4$
und $\text{Ca} = 0,0095 \text{ g}$
 $\text{PO}_4 = 100,0; \text{Ca} = 52,1 (?)$

Filtrat: $0,0046 \text{ g PO}_4$ und $0,0086 \text{ g K}.$

Das Filtrat enthält nach der Berechnung:

$$0,0057 \text{ g K} + 0,0046 \text{ g PO}_4 = 0,0103 \text{ g K}_2\text{PO}_4 \text{ und} \\ 0,0029 \text{ g K} = 0,0051 \text{ g K}_2\text{CO}_3.$$

Es entsprechen

$$\begin{aligned} 0,0108 \text{ g } \text{K}_2\text{PO}_4 &= 0,48 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{PO}_4 \\ 0,0051 \text{ g } \text{K}_2\text{CO}_3 &= 0,74 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{CO}_3. \end{aligned}$$

Versuch 13.

Niederschlag: $0,0209 \text{ g } \text{PO}_4 - 0,0042 \text{ g } \text{PO}_4 = 0,0167 \text{ g } \text{PO}_4$
 und $\text{Ca} = 0,0103 \text{ g}$
 $\text{PO}_4 = 100,0; \text{Ca} = 61,7.$

Filtrat: $0,0042 \text{ g } \text{PO}_4$ und $0,0086 \text{ g } \text{K}.$

Das Filtrat enthält nach der Berechnung:

$$\begin{aligned} 0,0052 \text{ g } \text{K} + 0,0042 \text{ g } \text{PO}_4 &= 0,0094 \text{ g } \text{K}_2\text{PO}_4 \text{ und} \\ 0,0034 \text{ g } \text{K} &= 0,0060 \text{ g } \text{K}_2\text{CO}_3. \end{aligned}$$

Es entsprechen

$$\begin{aligned} 0,0094 \text{ g } \text{K}_2\text{PO}_4 &= 0,44 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{PO}_4 \\ 0,0060 \text{ g } \text{K}_2\text{CO}_3 &= 0,87 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{CO}_3. \end{aligned}$$

Versuch 14.

Niederschlag: $0,0209 \text{ g } \text{PO}_4 - 0,0030 \text{ g } \text{PO}_4 = 0,0179 \text{ g } \text{PO}_4$
 und $\text{Ca} = 0,0111 \text{ g}$
 $\text{PO}_4 = 100,0; \text{Ca} = 61,5.$

Filtrat: $0,0030 \text{ g } \text{PO}_4$ und $0,0086 \text{ g } \text{K}.$

Das Filtrat enthält nach der Berechnung:

$$\begin{aligned} 0,0037 \text{ g } \text{K} + 0,0030 \text{ g } \text{PO}_4 &= 0,0067 \text{ g } \text{K}_2\text{PO}_4 \text{ und} \\ 0,0049 \text{ g } \text{K} &= 0,0087 \text{ g } \text{K}_2\text{CO}_3. \end{aligned}$$

Es entsprechen

$$\begin{aligned} 0,0067 \text{ g } \text{K}_2\text{PO}_4 &= 0,31 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{PO}_4 \\ 0,0087 \text{ g } \text{K}_2\text{CO}_3 &= 1,25 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{CO}_3. \end{aligned}$$

Versuch 15.

Niederschlag: $0,0209 \text{ g } \text{PO}_4 - 0,0021 \text{ g } \text{PO}_4 = 0,0188 \text{ g } \text{PO}_4$
 und $\text{Ca} = 0,0119 \text{ g}$
 $\text{PO}_4 = 100,0; \text{Ca} = 63,3.$

Filtrat: $0,0021 \text{ g } \text{PO}_4$ und $0,0086 \text{ g } \text{K}.$

Das Filtrat enthält nach der Berechnung:

$$\begin{aligned} 0,0026 \text{ g } \text{K} + 0,0011 \text{ g } \text{PO}_4 &= 0,0047 \text{ g } \text{K}_2\text{PO}_4 \text{ und} \\ 0,0060 \text{ g } \text{K} &= 0,0106 \text{ g } \text{K}_2\text{CO}_3. \end{aligned}$$

Es entsprechen

$$\begin{aligned} 0,0047 \text{ g } \text{K}_2\text{PO}_4 &= 0,22 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{PO}_4 \\ 0,0106 \text{ g } \text{K}_2\text{CO}_3 &= 1,54 \text{ ccm } \frac{1}{10}\text{-K}_2\text{CO}_3. \end{aligned}$$

Versuch 16.

Niederschlag: $0,0209 \text{ g } \text{PO}_4 - 0,0021 \text{ g } \text{PO}_4 = 0,0188 \text{ g } \text{PO}_4$
 und $\text{Ca} = 0,0126 \text{ g}$
 $\text{PO}_4 = 100,0; \text{Ca} = 67,0.$

Filtrat wie bei Versuch 15.

Versuch 17.

Niederschlag: 0,0209 g PO_4 — Spuren PO_4 = 0,0209 g PO_4
und Ca = 0,0184 g

PO_4 = 100,0; Ca = 64,1.

Filtrat: Spuren PO_4 und 0,0086 g K.

Das Filtrat enthält nach der Berechnung:

0,0086 g K = 0,0152 g K_2CO_3 .

Es entsprechen

0,0152 g K_2CO_3 = 2,9 ccm $\frac{1}{10}$ - K_2CO_3 .

Nach dieser Zusammenstellung der berechneten Versuchsergebnisse sollen zunächst nur diejenigen der Niederschläge betrachtet werden, insbesondere das Verhältnis PO_4 zu Ca.

Es soll der Gehalt der Niederschläge an Ca, bezogen auf PO_4 = 100,0 der Versuche I bis 17 noch einmal zusammenfassend tabellarisch dargestellt werden.

		PO_4 = 100,0.																
Versuch:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Ca:	36,8	45,9	55,5	58,2	56,0	58,1	59,9	61,7	64,6	63,3	64,5	52,1	61,7	61,5	63,8	67,0	64,1	

Die Versuchsreihe zeigt, daß unsere Annahme, daß mit steigender Menge von Calciumbicarbonat bei der Umsetzung desselben mit primärem Kaliumphosphat die entstehenden Niederschläge immer kalkreicher werden, in der Tat zutrifft. Vom Versuch 9 ab ist die Stelle ungefähr erreicht, wo sich nur noch ungefähr reines tertiäres Erdalkaliphosphat bildet, denn von diesem Punkt an liegt der Kalkgehalt des Niederschlages stets in der Nähe des Gehalts des reinen tertiären Calciumphosphats an Kalk, nämlich um 63,1 herum (den Versuch 12, der einen aus der Reihe fallenden abweichenden Kalkgehalt zeigt, lassen wir zunächst aus unseren Betrachtungen fort). Die geringen Schwankungen im gleichmäßigen Verlauf sind auf die Analysenungenauigkeiten, die sich aus der Versuchsanordnung bei den 17 voneinander unabhängigen Versuchen ergeben müssen, zurückzuführen.

Die Kalkgehalte der Niederschläge, bezogen auf PO_4 = 100,0 sind nun in Fig. 1 als Ordinate, und die zu 2,2 ccm $\frac{1}{10}$ -primärem Kaliumphosphat zugesetzten Calciumbicarbonatmengen, ausgedrückt in $\frac{1}{10}$ ccm, als Abszisse aufgetragen. Was die beiden punktierten Kurvenstellen anbetrifft, so ist das der Ver-

lauf der Kurve, wie er sich nach der Tabelle ergeben würde. Da hier aber scheinbar irgendwelche Unstimmigkeiten vorliegen, die mit unseren späteren Betrachtungen nichts zu tun haben, sind die beiden Punkte 1,6 und 4,8 als nicht vorgenommene

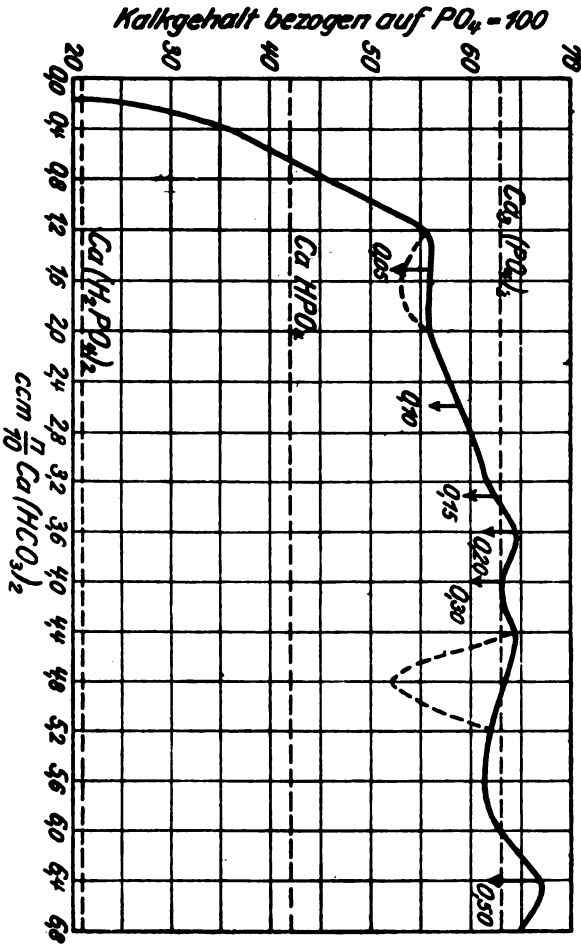


Fig. 1.

Versuche in der Hauptkurve, die vollkommen ausgezogen ist, übergangen worden, und wir werden die beiden Unregelmäßigkeiten, von denen diejenige bei Punkt 1,6 ganz unbedeutend ist, nicht in das Bereich der Betrachtungen ziehen, um so mehr, als nur Versuch 1 bis 11 ein organisches Ganze bilden und Versuch 12 bis 17 nachträglich mit neuen Lösungen ausgeführt

wurden, so daß die größere Unstimmigkeit bei Versuch 12 eventuell auf die Unterbrechung der Versuchereihe zurückzuführen ist.

Es zeigt sich bis zur Kurvenstelle 1,2 ein scharfer Anstieg des Kalkgehalts des Phosphatniederschlags, um dann bis zum Punkte 3,6 in ein ganz allmähliches Ansteigen überzugehen. Von dieser Stelle an kann man die Kurve als gerade Linie ansehen, also damit auch den Kalkgehalt der Niederschläge als konstant betrachten. Die geringen Ausbuchtungen des letzten Kurventeiles schwanken dicht um eine Mittellinie herum, die durch den Kalkgehalt von reinem tertiären Phosphat charakterisiert ist.

Die gesamte Kurve zeigt also durchaus keinen gleichmäßigen Verlauf, sondern es ist deutlich eine kurze Periode starken Ansteigens, eine lange Periode schwachen Ansteigens und eine Periode der Konstanz zu unterscheiden. Es ist nun interessant, daß die Periode des scharfen Anstieges auch mit einer Periode der starken Aciditätsabnahme des Filtrats zusammenfällt und die Periode des schwachen Ansteigens auch mit einer langsamen Abnahme der Acidität der Lösung bis zum vollständigen Verschwinden derselben gemessen mit Natriumundecylat als Indicator verbunden ist. Die darauf bezügliche Tabelle ist in der Einleitung dieser Arbeit schon angeführt worden.

Was die Zusammensetzung der Niederschläge, rein formell betrachtet, angeht, so liegt nur der Kalkgehalt des Versuchs 1 unterhalb der Linie des sekundären Calciumphosphats, d. h. er enthält etwas weniger Kalk als dieses Salz. Der Niederschlag muß also entweder aus einem Gemisch von primärem und sekundärem Calciumphosphat bestehen oder er muß Kaliumphosphat mitgerissen haben.

Der Kalkgehalt der übrigen Niederschläge liegt stets über der Linie des sekundären Calciumphosphats. Sie sind also, solange sie sich noch unter der Linie des tertiären Salzes bewegen, Gemische von sekundärem und tertiärem Erdalkali-phosphat und gehen vom Punkte 3,6 an in reines tertiäres Salz über. Von diesem Punkt an muß auch, wie ohne weiteres verständlich, die Konstanz der Niederschläge an Kalk beginnen.

In einer neuen Versuchsreihe ist nun noch einmal die Alkalität der Filtrate der Versuche 1 bis 17, die also ein viel weiteres Bereich umfassen, als die analoge Versuchstabelle in der Einleitung mit Eucupinbichlorhydrat als Indicator bestimmt worden. Die Versuche wurden so angestellt, daß 2,2 ccm $\frac{1}{10}$ -primäres Kaliumphosphat mit wachsenden Mengen von Calciumbicarbonat gekocht wurden, nach dem Kochen auf das ursprüngliche Volumen (ca. 50 ccm), vor dem Kochen aufgefüllt wurde. Es erfolgte dann die Filtration der heißen Flüssigkeiten ohne Nachwaschen der Niederschläge, und im abgekühlten Filtrat wurde dann nach Zusatz von Eucupinbichlorhydrat die Oberflächenspannung bestimmt.

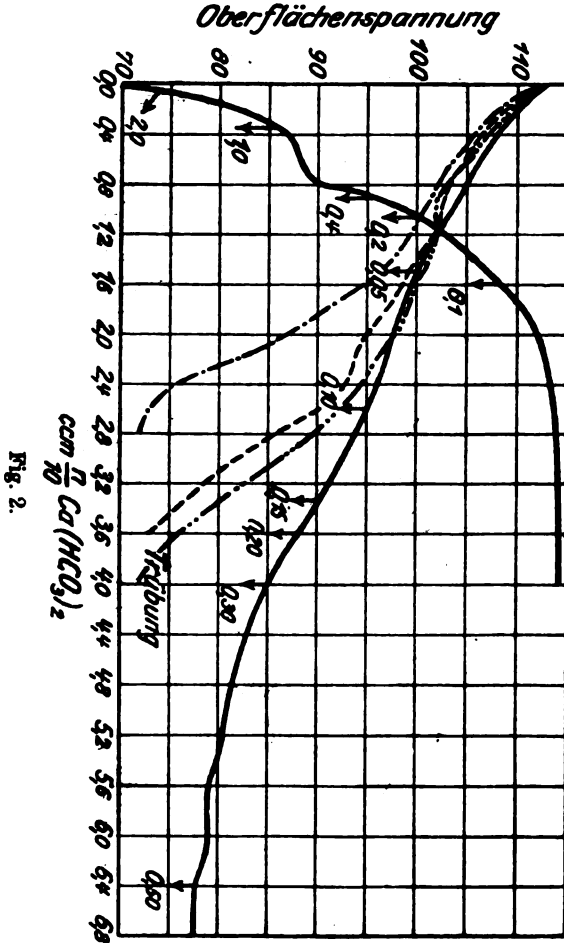
Einwirkung von $\frac{1}{10}$ -Calciumbicarbonat auf primäres Kaliumphosphat (Kochdauer 5 Minuten); Indicator Eucupinbichlorhydrat.

2,2 ccm der Calciumbicarbonatlösung entsprachen 0,4 ccm einer $\frac{1}{10}$ -Lösung.

Wasser	$\frac{1}{10}$ -prim. Phosphat	$\frac{1}{10}$ -Calcium- bicarbonat	Eucupin- bichlorhydrat	Ober- flächen- spannung	
ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	
50,0	+ 2,2	+ 0,0	= 0,0	+ 2,5	113,0
47,7	+ 2,2	+ 2,3	= 0,4	+ 2,5	108,0
45,4	+ 2,2	+ 4,6	= 0,8	+ 2,5	105,0
43,1	+ 2,2	+ 6,9	= 1,2	+ 2,5	102,0
40,8	+ 2,2	+ 9,2	= 1,6	+ 2,5	99,5
38,5	+ 2,2	+ 11,5	= 2,0	+ 2,5	98,0
36,2	+ 2,2	+ 13,8	= 2,4	+ 2,5	96,0
33,9	+ 2,2	+ 16,1	= 2,8	+ 2,5	93,5
31,6	+ 2,2	+ 18,4	= 3,2	+ 2,5	91,0
29,3	+ 2,2	+ 20,7	= 3,6	+ 2,5	88,0
27,0	+ 2,2	+ 23,0	= 4,0	+ 2,5	85,0
24,7	+ 2,2	+ 25,3	= 4,4	+ 2,5	83,0
22,4	+ 2,2	+ 27,6	= 4,8	+ 2,5	81,5
20,1	+ 2,2	+ 29,9	= 5,2	+ 2,5	80,5
17,8	+ 2,2	+ 32,2	= 5,6	+ 2,5	79,0
15,5	+ 2,2	+ 34,5	= 6,0	+ 2,5	79,0
13,2	+ 2,2	+ 36,8	= 6,4	+ 2,5	77,5
10,9	+ 2,2	+ 39,1	= 6,8	+ 2,5	77,5

In der folgenden Fig. 2 ist diese Tabelle als Kurve eingetragen, und zwar ist es die ausgezogene, an der Ordinate oben beginnende Linie.

Die Kurve an und für sich sagt nun noch nichts direkt über die absoluten Werte der Alkalität, die in den Filtraten vorliegt, aus, da, wie schon öfter dargelegt, der Oberflächenspannungsabfall der Lösung durch die ersten Mengen Alkali



vom Wasserwert an sehr stark ist, um mit steigender Alkalität immer mehr nachzulassen. Um aber doch wenigstens vergleichsweise über die Alkalität an den einzelnen Stellen der Kurve Bescheid zu wissen, sind an der Kurve Pfeile angebracht mit den Zahlen 0,05, 0,10 usw. Diese Zahlen entstammen der folgenden Tabelle und sagen demnach folgendes aus:

**Einwirkung von $\frac{1}{10}$ -sekundärem Kaliumphosphat
auf Eucupinbichlorhydrat.**

2,5 ccm Eucupinbichlorhydrat + 50 ccm Wasser.

$\frac{1}{10}$ -sekundäres Phos- phat in ccm.	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,80	0,50	1,00	2,00
Oberflächenspannung	112,0	100,0	95,0	90,0	88,0	85,0	78,0	74,0	71,0

An den Punkten der Kurve, wo sich ein Pfeil befindet, ist also die Alkalität des Filtrates so groß, als wenn sich in demselben die am Ende des Pfeils angegebene Zahl Kubikzentimeter einer $\frac{1}{10}$ -Lösung von sekundärem Kaliumphosphat befinden würden. Damit sind wir nun imstande, die Alkalitätskurve in absoluten Werten zu deuten. Es zeigt sich folgendes:

Bei einem Zusatz zu 2,2 ccm $\frac{1}{10}$ -primärem Kaliumphosphat

$\frac{1}{10}$ -Calcium- bicarbonat ccm	$\frac{1}{10}$ -sekundären Phosphats ccm
1. von 0,0—1,5 steigt die Alkalität der Filtrate	von 0,00—0,005
2. " 1,5—2,6 " " " " " "	0,05—0,10
3. " 2,6—3,8 " " " " " "	0,10—0,15
4. " 3,8—3,6 " " " " " "	0,15—0,20
5. " 3,6—4,0 " " " " " "	0,20—0,30
6. " 4,0—6,4 " " " " " "	0,30—0,50

Es würde demnach für 0,05 ccm $\frac{1}{10}$ -sekundären Phosphats an Alkalitätssteigerung im 1. Kurventeil 1,5 ccm, im 2. Kurventeil 1,1 ccm, im 3. Kurventeil 0,7 ccm, im 4. Kurventeil 0,3 ccm, im 5. Kurventeil 0,2 ccm, und im 6. Kurventeil 0,8 ccm $\frac{1}{10}$ -Calciumbicarbonat verbraucht werden. Diese Zahlen widersprechen scheinbar der von uns früher ausgesprochenen Annahme, daß mit steigendem Zusatz von Bicarbonat die Alkalität der Filtrate nicht proportional den zugesetzten Mengen steigt, sondern größere Mengen immer relativ weniger Alkalität schaffen als kleinere. Dieser Widerspruch ist in der Tat nur scheinbar, wie die ganzen folgenden Ausführungen beweisen werden, denn die absolute Zunahme der Alkalität der Filtrate für immer kleinere Mengen an Bicarbonat nach der Tabelle bedeutet doch eine Verzögerung gegenüber der Alkalitätszunahme, die wirklich eintreten müßte, wenn nicht die oben gemachte Annahme zuträfe. Der Grund liegt darin, daß nicht nur ein alkalischer Körper bei diesen Umsetzungen gebildet (sekundäres Phosphat); sondern auch ein saurer verschwindet (primäres Phosphat), der mit steigenden Mengen an Bicarbonat immer weniger im Überschuß vorhanden

ist und so der an der Umsetzung nicht teilnehmende Anteil immer mehr zurückgeht und damit auch die sauren Eigenschaften des Filtrats, die der Alkalität des sekundären Phosphats entgegenwirken, immer geringer werden.

Auf Grund der Analysenresultate der Niederschläge ist in der großen Tabelle auch die Zusammensetzung der Filtrate an primärem, sekundärem, tertiärem Kaliumphosphat und eventuell Kaliumcarbonat berechnet worden.

Es sind nun Lösungen von uns hergestellt worden mit dem errechneten Gehalt an Phosphaten bzw. Carbonaten und deren Oberflächenspannung nach Zusatz von Eucupinbichlorhydrat bestimmt worden. Diese mußten, wenn nicht andere Momente störend eingriffen, dieselben Oberflächenspannungsverhältnisse zeigen, wie die beim Kochen von primärem Kaliumphosphat mit Calciumbicarbonat erhaltenen Filtrate, also wie die Versuche 1 bis 17, deren Kurve oben angegeben worden ist.

Künstlich zusammengesetzte Filtrate der Versuche 1 bis 17.

	Wasser	$\frac{1}{10}$ -prim. Phosphat	$\frac{1}{10}$ -sek. Phosphat	$\frac{1}{10}$ -tertiär. Phosphat	$\frac{1}{10}$ -Kalium- carbonat	Ober- flächen- spann.		
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm			
	50	+	2,2	+	0,00	+	0,0	112,0
1 a.	50	+	1,76	+	0,20	+	0,00	106,5
2 a.	50	+	1,42	+	0,39	+	0,00	103,5
3 a.	50	+	1,26	+	0,46	+	0,00	102,0
4 a.	50	+	0,90	+	0,64	+	0,00	98,5
5 a.	50	+	0,62	+	0,79	+	0,00	95,0
6 a.	50	+	0,40	+	0,89	+	0,00	93,0
7 a.	50	+	0,15	+	1,02	+	0,00	85,5
8 a.	50	+	0,06	+	1,02	+	0,06	78,5
9 a.	50	+	0,00	+	0,75	+	0,23	73,0
10 a.	50	+	0,00	+	0,26	+	0,55	Trübung

Auch diese Tabelle ist als Kurve (---) in Fig. 2 eingetragen. Es ist ersichtlich, daß dieselbe bis zum Punkte 1,6 etwa sich dicht an die ausgezogene Kurve hält, daß also hier die Alkalität der eigentlichen Filtrate mit der Alkalität der errechneten ziemlich zusammenfällt. Die der natürlichen Filtrate ist allerdings immer etwas geringer als die des künstlichen Gemisches. Von dem Punkt 1,6 ab entfernen sich nun die beiden Kurven immer mehr voneinander, und die künstliche Lösung ist nicht bis zum Punkt 6,8, als dem natürlichen Versuch 17 entsprechend, durchzuführen, da der Alkalitäts-

bereich des Euocupinbichlorhydrats bereits bei Versuch 9a seine Grenze erreicht hat und bei 10a bereits Trübung infolge ausgeschiedener Euocupinbase eintritt. Die Alkalität der natürlichen Filtrate wird also immer geringer, als sie nach der Zusammensetzung des Niederschlags, berechnet aus dem Gehalt an Ca und PO_4 sein dürfte, mit steigenden Mengen Niederschlag. Es ist das nur erklärlich, wenn man annimmt, daß die immer größer werdende Menge Niederschlag von unlöslichem Calciumphosphat immer mehr alkalisch reagierende Körper, die wasserlöslich sind, wie z. B. sekundäres und tertiäres Alkaliphosphat bzw. Carbonat mitreißt, die wir wegen ihrer Wasserlöslichkeit nicht mit in Rechnung setzen konnten, und so aus dem Filtrat entfernt. Ein Auswaschen des Niederschlags fand ja bei unseren Alkalitätsbestimmungen, um eine Verdünnung der Filtrate zu vermeiden, nicht statt. Wenn man das Entstehen des Niederschlags bei der Umsetzung des primären Kaliumphosphats mit dem Calciumbicarbonat beim Kochen beobachtet und die zunächst gallertartige Masse sieht, die die ganze Flüssigkeit bei größeren aufeinander reagierende Mengen erfüllt und erst allmählich nach längerem Kochen sich zusammenballt, kann man sich vorstellen, daß der Niederschlag auch lösliche Körper in größeren Mengen mitnehmen kann.

Nach diesen Ausführungen würde also die künstliche Lösung und damit die gestrichelte Kurve den wahren Verlauf der Alkalität bei der Umsetzung von primärem Phosphat mit Calciumbicarbonat zeigen, während die ausgezogene Kurve einen durch Nebenreaktion gestörten Verlauf darstellt.

Um nun zu zeigen, daß der Verlauf dieser Kurve mit steigenden Mengen von Calciumbicarbonat zu der konstanten Menge von primärem Phosphat immer mehr einer Umsetzung bis zum tertiären Calciumphosphat nahekommmt und nur im Anfang einer solchen bis zum sekundären, wie das ausführlich in der vorigen Arbeit und in der Einleitung dieser Abhandlung angegeben wurde, sind in dem folgenden Schema die Umsetzungen zwischen $\frac{1}{10}$ -primärem Kaliumphosphat und $\frac{1}{10}$ -Calciumbicarbonat so berechnet worden, als ob sie bei der ersten Tabelle selbst bis zum höchsten zugesetzten Kalkgehalt stets bis zum sekundären Calciumphosphat vor

sich gehen, und in der zweiten Tabelle, als ob sie von der kleinsten Menge zugesetzten Bicarbonats an stets bis zum tertiären Calciumphosphat führen.

Tabelle I.

Umsetzung von 2,2 ccm $\frac{1}{10}$ -primärem Kaliumphosphat mit $\frac{1}{10}$ -Calciumcarbonat bis zum sekundären Calciumphosphat.

(Die unterstrichenen Zahlen der Tabelle zeigen, wie sich das Filtrat zusammensetzen würde, wenn die Umsetzung stets im Sinne der Überschrift vor sich gehen würde.)

	$\frac{1}{10}$ - KH_2PO_4		+	$\frac{1}{10}$ - CaCO_3		=	Filtrat		+	Niederschlag	
	ccm			ccm			ccm			ccm	
1b.	2,2	+	0,4	=	<u>1,8</u>	+	<u>0,2</u>	+	0,2		
2b.	2,2	+	0,8	=	<u>1,4</u>	+	<u>0,4</u>	+	0,4		
3b.	2,2	+	1,2	=	<u>1,0</u>	+	<u>0,6</u>	+	0,6		
4b.	2,2	+	1,6	=	<u>0,6</u>	+	<u>0,8</u>	+	0,8		
5b.	2,2	+	2,0	=	<u>0,2</u>	+	<u>1,0</u>	+	1,0		
					$\frac{1}{10}$ - K_2HPO_4						
6b.	2,2	+	2,4	=	<u>0,18</u>	+	<u>0,9</u>	+	1,2		
7b.	2,2	+	2,8	=	<u>0,38</u>	+	<u>0,6</u>	+	1,4		

Tabelle II.

Umsetzung von 2,2 ccm $\frac{1}{10}$ -primärem Kaliumphosphat mit $\frac{1}{10}$ -Calciumcarbonat bis zum tertiären Calciumphosphat.

(Die unterstrichenen Zahlen bedeuten dasselbe wie bei Tabelle I.)

	$\frac{1}{10}$ - KH_2PO_4		+	$\frac{1}{10}$ - CaCO_3		=	Filtrat		+	Niederschlag	
	ccm			ccm			ccm			ccm	
1c.	2,2	+	0,4	=	<u>1,92</u>	+	<u>0,14</u>	+	0,07		
2c.	2,2	+	0,8	=	<u>1,68</u>	+	<u>0,26</u>	+	0,13		
3c.	2,2	+	1,2	=	<u>1,40</u>	+	<u>0,40</u>	+	0,20		
4c.	2,2	+	1,6	=	<u>1,10</u>	+	<u>0,52</u>	+	0,26		
5c.	2,2	+	2,0	=	<u>0,88</u>	+	<u>0,66</u>	+	0,33		
6c.	2,2	+	2,4	=	<u>0,60</u>	+	<u>0,80</u>	+	0,40		
7c.	2,2	+	2,8	=	<u>0,36</u>	+	<u>0,92</u>	+	0,46		
8c.	2,2	+	3,2	=	<u>0,08</u>	+	<u>1,06</u>	+	0,53		
					$\frac{1}{10}$ - K_2PO_4						
9c.	2,2	+	3,6	=	<u>0,18</u>	+	<u>0,90</u>	+	0,60		

In der folgenden Tabelle sind nun die Alkalitätszahlen mit Eucupinbichlorhydrat der nach den unterstrichenen Zahlen der obigen Tabellen künstlich zusammengesetzten Lösungen angeführt, die also die Alkalität von Filtraten darstellen würden, bei denen die Umsetzung zwischen primärem Kaliumphosphat und Calciumbicarbonat einmal bis zum sekundären Erdalkaliphosphat, und das zweite Mal bis zum tertiären Erdalkaliphosphat verlaufen wäre.

Filtrate nach Tabelle I.

Wasser	$\frac{n}{10}\text{-KH}_2\text{PO}_4$	$\frac{n}{10}\text{-K}_2\text{HPO}_4$	Encupin- bichlorhydr.	Oberflächen- spannung			
ccm	ccm	ccm	ccm	ccm			
50	+	2,2	+	0,0	+	2,5	112,0
1 b. 50	+	1,8	+	0,2	+	2,5	106,0
2 b. 50	+	1,4	+	0,4	+	2,5	102,5
3 b. 50	+	1,0	+	0,6	+	2,5	99,5
4 b. 50	+	0,6	+	0,8	+	2,5	94,5
5 b. 50	+	0,2	+	1,0	+	2,5	87,0
		$\frac{n}{10}\text{-K}_2\text{PO}_4$					
6 b. 50	+	0,18	+	0,9	+	2,5	75,5
7 b. 50	+	0,33	+	0,6	+	2,5	72,0 (Trüb.)

Filtrate nach Tabelle II.

Wasser	$\frac{n}{10}\text{-KH}_2\text{PO}_4$	$\frac{n}{10}\text{-K}_2\text{HPO}_4$	Encupin- bichlorhydr.	Oberflächen- spannung			
ccm	ccm	ccm	ccm	ccm			
50	+	2,2	+	0,0	+	2,5	112,0
1 c. 50	+	1,92	+	0,14	+	2,5	107,0
2 c. 50	+	1,68	+	0,26	+	2,5	104,0
3 c. 50	+	1,40	+	0,40	+	2,5	102,5
4 c. 50	+	1,66	+	0,52	+	2,5	100,0
5 c. 50	+	0,88	+	0,66	+	2,5	98,0
6 c. 50	+	0,60	+	0,80	+	2,5	94,5
7 c. 50	+	0,36	+	0,92	+	2,5	89,5
8 c. 50	+	0,08	+	1,06	+	2,5	83,0
		$\frac{n}{10}\text{-K}_2\text{PO}_4$					
9 c. 50	+	0,18	+	0,90	+	2,5	75,5

Die Tabelle I ist nun als Kurve (---) und die Tabelle II als Kurve (-.-.-) auf Fig. 2 eingetragen. Man sieht aus den Kurven ohne weiteres, daß die Umsetzungen der Tabelle II ein viel langsames Ansteigen der Alkalität des Filtrats ergeben als die der Tabelle I. Während die Alkalität, die durch die Oberflächenspannung 72,0 definiert ist, mit der hypothetischen Umsetzung des primären Phosphats mit dem Calciumbicarbonat bis zum sekundären Erdalkaliphosphat schon bei einem Zusatz von 2,8 ccm $\frac{n}{10}$ -Bicarbonat erreicht ist, tritt dieser Punkt bei der hypothetischen Umsetzung erst bei 4,0 ccm $\frac{n}{10}$ -Bicarbonat ein. Es zeigt sich also ein ganz bedeutender Unterschied.

Interessant ist nun das Verhalten der ----Kurve, die die wahre Alkalität der Filtrate angibt, wie sie sich aus der analytisch ermittelten Zusammensetzung der Calciumphosphatniederschläge errechnen läßt.

Man sieht, daß die Kurve sich unseren theoretischen Überlegungen entsprechend und auch der Tatsache folgend, daß die Niederschläge von unlöslichem Calciumphosphat allmählich mit steigendem Zusatz an Calciumbicarbonat immer kalkreicher werden, immer weiter von der Kurve der Umsetzung bis zum sekundären Calciumphosphat ab- und der zum tertiären Calciumphosphat zuwendet. Der Punkt der Alkalität, wo sie sie erreichen würde, liegt außerhalb der Empfindlichkeit des Eucupinbichlorhydrats. Nach Fig. 1 ist allerdings der Punkt der Bildung rein tertiären Calciumphosphats, nämlich 3,6, auch hier schon erreicht. Die ----Kurve und die -.-.-Kurve müßten also schon zusammenfallen, während sie hier nur sehr dicht zusammenliegen.

Zusammenfassung.

1. Es konnte festgestellt werden, daß bei der Umsetzung von primärem Kaliumphosphat mit steigenden Mengen Calciumbicarbonat beim Kochen die entstehenden Niederschläge von unlöslichen Phosphaten immer kalkreicher werden.

2. Die mit Eucupinbichlorhydrat durch Oberflächenspannungsmessung bestimmte Alkalität der Filtrate der bei der Umsetzung nach 1 entstandenen Niederschläge zeigen nicht die Höhe der Alkalität, wie man sie nach der Rechnung erwarten müßte, die man auf Grund der Analyse der Niederschläge aufstellen kann. Es muß diese Erscheinung darauf zurückzuführen sein, daß die Niederschläge lösliche alkalische Verbindungen aus der Flüssigkeit mitreißen.

3. Die aus der Zusammensetzung der Niederschläge von unlöslichen Calciumphosphaten errechnete Zusammensetzung der Filtrate gibt eine Alkalität, mit Eucupinbichlorhydrat gemessen, die ebenfalls zeigt, daß die Umsetzung sich mit steigenden Mengen von Calciumbicarbonat immer mehr vom sekundären Calciumphosphat dem tertiären Calciumphosphat zuwendet.

4. Es ist damit der Beweis erbracht worden, daß in der Tat kleinere Mengen Calciumbicarbonat bei der Umsetzung mit primärem Kaliumphosphat das Filtrat relativ alkalischer machen als größere.

Bemerkungen über die quantitative Bestimmung des Phytins in Pflanzenauszügen.

Von
August Rippel.

(Aus dem agrikulturchemischen und bakteriologischen Institut der Universität Breslau).

(Eingegangen am 16. Dezember 1919.)

Im Anschluß an Untersuchungen über die Nährstoffaufnahme bei der Gerste¹⁾ schien es uns von Interesse zu sein, den Phosphorstoffwechsel zu verfolgen, vornehmlich in Hinsicht auf das Verhalten des Phytins, das ja in allen Pflanzenteilen vorhanden und besonders in den Samen angereichert ist [Posternak²⁾]. Das schien uns nur möglich mit Hilfe einer genauen Bestimmungsmethode zur Trennung des Phytins von der anorganischen Phosphorsäure; eine solche Methode bietet große Schwierigkeiten, da auch in dem Phytin der Phosphor als Phosphorsäure vorhanden ist und sich von der anorganischen in seinen Reaktionen kaum unterscheidet. Wenn auch diese Versuche nicht zum Ziele geführt haben, so kann doch im Anschluß daran auf gewisse Unstimmigkeiten in der bisherigen Literatur hingewiesen und eine gewisse Ergänzung zu den bisher bekannten Eigenschaften des Phytins gegeben werden, was der Zweck dieser Zeilen ist.

Vorerst ein allgemeiner Hinweis: Schulze-Winterstein³⁾ (S.93/9 4

¹⁾ Th. Pfeifer, und A. Rippel, Über den Verlauf der Nährstoffaufnahme und Stoffezeugung bei der Gerstenpflanze. Fühlings landwirtschaftl. Zeitung 68, 81, 1919.

²⁾ S. Posternak, Contribution à l'étude chimique de l'assimilation chlorophyllienne, usw. *Révue générale de botanique* 12, 5, 1900.

³⁾ E. Schulze und E. Winterstein, Über einen phosphorhaltigen Bestandteil der Pflanzensamen. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 22, 90, 1896/97.

Biochemische Zeitschrift Band 103.

und Posternak¹⁾ (S. 10) haben bereits darauf hingewiesen, daß die von Pfeffer²⁾ (S. 475) in den Globoiden der Aleuronkörner aufgefunden Phosphorsäure mit einem organischen Paarling eben dieses Phytin vornehmlich als Calcium-Magnesiumsalz ist. Da in der neueren botanischen Literatur dieser Hinweis zumeist fehlt, so sei hier nochmals darauf aufmerksam gemacht.

Da bekannt ist, daß bei der direkten Fällung der anorganischen Phosphorsäure mit Ammoniummolybdat ein Teil des Phytins mit ausgefällt wird, so wurde versucht, eine gewichtsanalytische Bestimmung durch Ausfällung des Phytins³⁾ vermittels eines Schwermetalles durchzuführen, wobei am geeignetsten die Fällung mit Kupferacetat in essigsaurer Lösung erschien. Kupfer wurde ja gewöhnlich bei der präparativen Darstellung des Phytins verwendet. Essigsäure wurde gewählt mit Rücksicht auf die weitere Fällung mit Ammoniummolybdat, wobei z. B. die Verwendung von Salzsäure störend wirken würde. Es zeigte sich, daß nur bei einer ganz bestimmten Konzentration der Essigsäure und des Kupferacetats (bei zu starker Konzentration des letzteren wird auch die anorganische Phosphorsäure ausgefällt) eine einigermaßen befriedigende Trennung zu erreichen war; sonst bleibt entweder die Kupferphytinverbindung gelöst oder es wird auch anorganische Phosphorsäure mit ausgefällt. Die Übersicht Tabelle I zeigt dies.

Tabelle I.

Je 0,2 g Phytin in 25 ccm 1%iger Essigsäure gelöst, I mit der gleichen Essigsäure auf 200 ccm aufgefüllt, zu II noch 75 ccm dieser Essigsäure hinzugefügt und mit Wasser aufgefüllt, III mit Wasser aufgefüllt. Je 50 ccm unter Zusatz von 10 ccm Wasser bzw. 10 ccm Naphosphatlösung mit 10 ccm Kupferacetatlösung (2,5 g in 100 ccm Wasser) gefällt.

¹⁾ Siehe Anmerkung 2 Seite 163.

²⁾ W. Pfeffer, Untersuchungen über die Proteinkörner und die Bedeutung des Asparagins beim Keimen der Samen. Pringsh. Jahrb. f. wissenschaftl. Botanik 8, 429, 1872.

³⁾ Das verwendete Phytin wurde in entgegenkommender Weise von der Firma Gesellschaft für chemische Industrie, Basel, zur Verfügung gestellt, wofür auch an dieser Stelle unser Dank ausgesprochen sei, ebenso wie Herrn Prof. Dr. Morgen-Hohenheim, von dem wir ebenfalls etwas Phytin erhielten.

Gefunden g P_2O_5 in 0,05 g Phytin (bzw. im Filtrat)			
	+10 ccm Wasser im Cu-Niedersch.	+ 10 ccm Na-Phosphatlösung im Cu-Niedersch.	im Filtrat mit Ammoniummolybd.
I	0,0208	0,0213	0,0206
II	0,0216	0,0222	0,0201
III	0,0221	0,0303	0,0118
	Im Phytin	0,0224	
	Im Na-Phosphat . . .	0,0207	

Das mit Kupfer gefällte Phytin wurde abfiltriert und mit Wasser ausgewaschen. Ein Auswaschen mit der gleichen Essigsäurekonzentration war nicht möglich, da hierdurch wieder Phytin des Niederschlages in Lösung ging, das im Filtrat in Gegenwart des Cu-Überschusses wieder ausfiel. Der Cu-Niederschlag wurde getrocknet und unter Sodazusatz vorsichtig verascht, wiederholt mit etwas Soda aufgenommen, getrocknet und weiter verascht, dann die P_2O_5 wie üblich mit Ammoniummolybdat bestimmt. Man sieht an der ersten Spalte, wie die Kupferfällung des Phytins mit abnehmender Stärke der Essigsäure höher wird¹⁾, daß aber gleichzeitig vorhandene anorganische Phosphorsäure bei schwächerer Essigsäurekonzentration mitgefällt wird (Spalte 2), die dann natürlich im Filtrat zu wenig gefunden wird (Spalte 3). Alles dies zeigt den äußerst labilen Gleichgewichtszustand zwischen Fällung und Lösung.

Gleichwohl schien es nach diesem Versuch aussichtsreich, zunächst bei etwa 0,8% iger Essigsäure die Hauptmenge des Phytins auszufällen und im Filtrat die anorganische P_2O_5 mit Ammoniummolybdat zu bestimmen, gleichzeitig dort die Gesamtphosphorsäure zur Ermittlung des nicht durch Cu und Ammoniummolybdat gefällten Phytins und evtl. einen Korrekturfaktor anzubringen. Das Nähere geht aus dem Versuch Tabelle II hervor. Beim Vorhandensein verschieden großer Mengen anorganischer Phosphorsäure wurden also in beiden Fällen gleiche Phytinmengen nicht richtig erfaßt, nämlich 0,0037 bzw. 0,0032 g P_2O_5 zu viel im Filtrat als anorganische P_2O_5 mit ausgefällt und 0,0013 bzw. 0,0026 g P_2O_5 wurden

¹⁾ Man kann eine noch bessere Ausfällung der Phytinphosphorsäure durch Erhitzen erzielen; doch fällt dann auch die anorganische P_2O_5 aus, was eine Trennung unmöglich macht.

an Phytin im Filtrat nicht gefällt, zusammen 0,0050 bzw. 0,0058 g P_2O_5 . Es hatte also jedenfalls die Einführung eines Korrekturfaktors aussichtsreich erscheinen können.

Tabelle II.

Je 0,1 g Phytin in 50 ccm 1%iger Essigsäure gelöst, 10 bzw. 20 ccm Na-Phosphatlösung hinzugefügt und mit 10 ccm Cu-Acetatlösung (2,5/100) gefällt.

	Gefunden g P_2O_5 10 ccm	Na-Phosphatlösung 20 ccm
Im Cu-Niederschlag	0,0364	0,0861
„ Filtrat mit Ammoniummolybd.	0,0235	0,0429
Zusammen gefunden	0,0599	0,0790
Vorhanden	0,0649	0,0848
(Im Phytin 0,0451 ¹⁾)		
Im Na-Phosphat 0,0198 bzw. 0,0397)		
Zu wenig gef. Phytin	0,0050	0,0058

Jedoch zeigte sich bald, daß dies nur für reine Phytinlösungen gilt. Das geht aus den in Tabelle III mitgeteilten Zahlen hervor, die bei Bestimmung der verschiedenen Phosphorformen in Gerstenkörnern erhalten wurden. Bei dieser Analyse wurden 10 g (2 Bestimmungen) mit absolutem Alkohol wiederholt ausgekocht und darin der Lecithinphosphor bestimmt. (In der Tabelle als P_2O_5 ausgedrückt.) Die lecithinfreie Probe wurde mit 150 ccm 1%iger Essigsäure 24 Stunden unter wiederholtem Umschütteln stehen gelassen, mit Wasser aufgefüllt, abfiltriert; im Filtrat wurde das Phytin mit 10 ccm Cu-Acetat (2,5/100) gefällt, die Fällung abfiltriert, das Filtrat mit Ammoniummolybdat gefällt und so die anorganische P_2O_5 ermittelt. Die Differenz zu der ebenfalls bestimmten Gesamtphosphorsäure im essigsauren Extrakt ergibt die Gesamt- P_2O_5 des Phytins. Der Eiweißphosphor (ebenfalls als P_2O_5 ausgedrückt) ergibt sich aus der Differenz der P_2O_5 des essigsauren Extraktes der als Lecithinphosphor vorhandenen zu der Gesamtphosphorsäure.

¹⁾ Anderes Präparat wie in Tabelle I.

Tabelle III.

100 g Trockensubstanz gemahlener Gerstenkörner enthalten g P_2O_5	
Gesamt	0,988
Lecithin	0,023
Eiweiß	0,579
Gesamt des essigsäuren Extraktes	0,409
Darin mit Cu-Acetat fällbar	0,183
Filtrat der Cu-Fällung mit Ammoniummolybdat	0,120
Gesamt-Phytin also	0,289

Phytinphosphorsäure ist also zu 29,2⁰/₁₀₀ der Gesamt- P_2O_5 in den Gerstenkörnern vorhanden, eine Zahl, die ungefähr mit den Angaben von Vorbrodt¹⁾ übereinstimmt (etwa 35⁰/₁₀₀)

Bei den Gerstenkörnern sind jedoch nur 63,3⁰/₁₀₀ der Phytin- P_2O_5 durch Kupfer ausgefällt worden, obwohl die Essigsäurekonzentration erheblich unter 1⁰/₁₀₀ war, gegen 80,7⁰/₁₀₀ bei Versuch Tabelle II und 92,8⁰/₁₀₀ bei Versuch Tabelle I, I. Das tritt bei Erbsen noch deutlicher hervor: Hier trat mit Kupferacetat im essigsäuren Auszug überhaupt keine Fällung ein. Die Kupfermethode versagt also bei allgemeinerer Anwendung; in dem Falle der Erbsen kommt ihre Anwendung lediglich auf die alte Bestimmung der anorganischen P_2O_5 durch direkte Fällung mit Ammoniummolybdat heraus.

Eine ähnliche Beobachtung teilt Posternak²⁾ (S. 15) von weißer Lupine und Linse mit und führt diese Erscheinung auf die lösende Wirkung von Kohlenhydraten zurück; doch läßt sich die Posternaksche Methode mit der vorliegenden nicht ohne weiteres vergleichen, da dieser Verf. in ammoniakalischer Lösung fällt, auf welche Weise natürlich eine Trennung von der anorganischen nicht zu erreichen ist. Es sind also zwei Möglichkeiten: Einmal könnte das Phytin in den Samen in anderer Form vorliegen, sodann könnte, analog der Annahme Posternaks, an eine Schutzwirkung gewisser Stoffe, nach Art der Schutzkolloide gedacht werden; Dextrose wirkt aber, wie ich mich überzeugt habe, nicht in diesem Sinne. Worauf das verschiedene Verhalten zurückzuführen ist, muß einstweilen dahingestellt bleiben.

Nur in einer Hinsicht könnte die Kupfermethode vielleicht eine gewisse Erleichterung bieten in den Fällen, in denen eine

¹⁾ Wl. Vorbrodt, Untersuchungen über die Phosphorverbindungen in den Pflanzensamen, mit besonderer Berücksichtigung des Phytins. Anzeiger der Akad. d. Wissensch. in Krakau. Mathem.-naturw. Kl. 1910, Reihe A.

²⁾ Zit. S. 183.

Fällung eintritt: Fällt man einen Extrakt, beispielsweise von Lupinen mit Ammoniummolybdat, so entsteht ein voluminöser Niederschlag, der sicher noch alles mögliche andere enthält als nur Phosphorsäure. Man kann sich dadurch helfen, daß man diesen Niederschlag in Ammoniak löst, mit Magnesiamixtur fällt, glüht, wieder löst und die P_2O_5 mit Ammoniummolybdat bestimmt, in ähnlicher Weise, wie es Vorbrodt¹⁾ z. B. als vierfache usw. Fällung bezeichnet. Das ist zweifellos etwas umständlich, und es scheint mir in diesen Fällen die vorherige Fällung mit Kupferacetat in essigsaurer Lösung eine gewisse Hilfe zu bieten. Man darf einen solchen Extrakt auch nicht etwa durch Kochen von Eiweißstoffen usw. befreien, da dann auch das Phytin koaguliert und die Gefahr vorliegt, daß es sich beim Erkalten nicht wieder vollständig löst; das habe ich wenigstens bei reiner Phytinlösung beobachtet.

Hinzu kommt noch, daß nach vorheriger Ausfällung des fällbaren Phytins durch Kupfer im Filtrat bei der Ammoniummolybdatfällung nicht mehr so große Phytinmengen mit ausgefällt werden als wenn die Kupferfällung unterbleibt, wie Versuch Tabelle IV zeigt. In diesem Fall ist also tatsächlich dieses Ergebnis so eindeutig eingetreten, wie es vielleicht nicht immer zu erwarten ist.

Tabelle IV.

Je 0,05 g Phytin in 50 ccm 1%iger Essigsäure gelöst und 15 ccm Na-Phosphatlösung hinzugefügt. I direkt mit Ammoniummolybdat gefällt, II mit 10 ccm Cu-Acetat gefällt, abfiltriert, ausgewaschen, Filtrat mit Ammoniummolybdat gefällt. Beide mit Wasser auf gleiches Volumen (100 ccm) gebracht. III P_2O_5 in 15 ccm Na-Phosphatlösung.

I	0,0828	und	0,0824	g	P_2O_5
II	0,0811	"	0,0811	"	"
III	0,0811				"

Auch andere Metalle als Kupfer sind nicht besser zu gebrauchen; ich beschränke mich darauf, zu erwähnen, daß Silberacetat etwa 10% niedrigere, Bariumacetat gar 80% niedrigere Zahlen gegen Kupferacetat, bei gleicher Essigsäurekonzentration ergaben. Daß eine Ausfällung mit Eisenchlorid in schwach

¹⁾ Zit. S. 167.

salzsaurer Lösung keine befriedigenden Resultate ergibt, hat Heubner¹⁾ gezeigt (S. 420).

Heubner²⁾ hat ferner zur Phytinbestimmung eine Titrationsmethode mit Eisenchlorid und Rhodanammonium bei 0,6%iger Salzsäure angegeben, die für reines Phytin auch recht brauchbare Werte liefert, aber bei Pflanzenextrakten unsicher werden muß, da diese meist gefärbt sind; ein Auszug von getrockneten *Tropidolum*blättern hat z. B. an sich schon eine dunkel rotbraune Färbung. Im übrigen teilt diese Methode die Übelstände der Kupferfällung: nur bei einer ganz bestimmten Konzentration halten sich Löslichkeit der anorganischen und Unlöslichkeit der Phytinphosphorsäure einigermaßen in den Grenzen, die eine annähernde Bestimmung ermöglichen; auch wird die Methode um so unsicherer, je mehr die anorganische Phosphorsäure überwiegt, wie Heubner selbst angibt, ein Fall, der bei Pflanzen, wenn es sich nicht gerade um Samen handelt, fast immer verwirklicht ist.

Die Methode Schulze-Castoro³⁾ der Phytinbestimmung gründet sich (S. 479) „auf die bekannte Tatsache, daß sowohl frisch gefälltes Tricalciumphosphat als auch Dicalciumphosphat in einer neutralen Lösung von Ammoniumcitrat löslich ist“. Es wird mit 1%iger Salzsäure extrahiert, mit CaCl_2 und Ammoniak versetzt und abfiltriert, der Niederschlag in Ammonicitrat gelöst. Aus diesen Angaben müßte man schließen, daß Calciumphytinat in Ammonicitrat unlöslich sei, da sonst ja die ganze Fällung keinen Zweck hätte; das ist aber nicht der Fall, was Schulze entgangen zu sein scheint.

0,1 g Phytin in 50 ccm Essigsäure gelöst und nach Schulze mit CaCl_2 und Ammoniak gefällt und abfiltriert, der Niederschlag in Ammonicitrat gelöst, die klare Lösung verbrannt, ergab 0,0442 g P_2O_5 gegen 0,0451 bei direkter Bestimmung.

Fleischmann⁴⁾ hat (S. 257 ff.) ohne Versuche das gleiche ausgesprochen. Dieser Autor hat Versuche mit Glycerinphosphorsäure gemacht. Nach ihm soll aus der ammonicitrathaltigen Lösung durch Magnesiamixtur nur die anorganische Phosphor-

¹⁾ W. Heubner, Einige Bemerkungen über das Phytin. Diese Zeitschr. 4, 409, 1914.

²⁾ W. Heubner und H. Stadler, Über eine Titrationsmethode zur Bestimmung des Phytins. Diese Zeitschr. 64, 422, 1914.

³⁾ E. Schulze und N. Castoro, Findet man in Pflanzensamen anorganische Phosphate? Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 477, 1904.

⁴⁾ F. Fleischmann, Veränderungen, die bei der Dürreheubereitung im Grase vor sich gehen. Landwirtschaftl. Versuchsstat. 76, 237, 1912.

säure, nicht die Phytinphosphorsäure gefällt werden. Das ist insofern richtig, als aus einer mit Citratmagnesiummischung nach Fleischmann (S. 259) versetzten reinen Phytinlösung (0,1 g in 50 ccm 1%iger Essigsäure gelöst), also ohne Zusatz von anorganischer Phosphorsäure, nach 24 Stunden keine Spur einer Fällung sichtbar ist, nach 48 Stunden allerdings eine, wenn auch äußerst geringfügige, Fällung.

Bei gleichzeitigem Zusatz von anorganischer P_2O_5 dagegen wird bei der Fällung ein erheblicher Teil dieser Phytinphosphorsäure mitgerissen und zwar mit zunehmender Menge anorganischer Phosphorsäure in stärkerem Maße, wie Versuch Tabelle V zeigt:

Tabelle V.

g P_2O_5 bei Fällung mit Citratmagnesiummischung nach Fleischmann.			
10 ccm Na-Phosphatlösung	.	.	0,0202
"	+	0,1 g Phytin	0,0215
20 "	+	0,1 g "	0,0514
(= 0,0257 auf 10 ccm bezogen).			

Auch bei nochmaliger Lösung des Niederschlages und nochmaliger Fällung in gleicher Weise war die Niederschlagsmenge die gleiche; es wurde dabei gefunden in 10 ccm Na-Phosphatlösung: 0,0219 g P_2O_5 . Selbstverständlich wurde der Niederschlag zwischen der Reinigung nicht gegläht. Der Niederschlag sieht normal krystallinisch aus; dies von Fleischmann (S. 259) angegebene Kennzeichen versagt also ebenfalls.

Diese Beobachtung erklärt auch, warum. Vorbrod¹⁾ in verschiedenen Samen durch Magnesiafällung in ammonicitrathaltiger Lösung keine anorganische Phosphorsäure fand, wohl aber nach Zusatz von KH_2PO_4 mehr Phosphorsäure als zugesetzt war, woraus Verf. auf das Vorhandensein mineralischer Phosphorsäure schließt, die ohne Zusatz nicht ausgefallen sei: Nach dem Gesagten ist es selbstverständlich, daß diese „anorganische“ Phosphorsäure lediglich mitausgefällte Phytinphosphorsäure ist.

Die Verbesserung der Methode Schulze-Castoro durch Stutzer²⁾, der den mit $CaCl_2$ und Ammoniak gefällten Niederschlag in Salpetersäure löst und die anorganische Phosphor-

¹⁾ Zit. S. 167.

²⁾ A. Stutzer, Untersuchungen über den Gehalt vegetabilischer Stoffe an Stickstoff, Phosphor und Schwefel in organischer Bindung. Diese Zeitschr. 7, 471, 1908.

säure mit Ammoniummolybdat fällt, bedient sich also gerade der Methode, die Schulze (S. 478) vermeiden wollte, übersieht also den Kernpunkt der Schulzeschen Fragestellung, nämlich die Vermeidung einer evtl. Aufspaltung des Phytins durch die Salpetersäure, bedeutet mithin keine Verbesserung. Darauf hat denn auch später Fingerling¹⁾ aufmerksam gemacht und gefunden, daß durch die Salpetersäure bis zu 40⁰/₀ der Phytinphosphorsäure mit abgespalten werden.

Bei meinen Versuchen Tabelle IV betrug die Abspaltung nur wenig (im höchsten Falle nur 5,9⁰/₀). Allerdings war die Flüssigkeit nicht lange mit Salpetersäure in Berührung: Es wurde die essigsäure Lösung zum Sieden erhitzt, dann einige Tropfen Salpetersäure hinzugefügt bis zur klaren Lösung und gefällt. Aber die Abspaltung von Phytin ist nicht nur von dem Grad der Salpetersäureeinwirkung abhängig, sondern auch vom Phytin selbst. Jegorow²⁾ und Heubner³⁾ haben gefunden, daß frisch bereitetes Phytin mit Ammoniummolybdat keine Fällung gibt, älteres dagegen reagiert. Wie sich das Phytin in den Pflanzen verhält, wissen wir nicht. Es ist aber auch sehr wohl möglich, daß die bei mäßiger Salpetersäureeinwirkung gefundene P₂O₅ auch tatsächlich als anorganische P₂O₅ vorhanden ist. Unverständlich ist aber, wie Fleischmann behaupten kann (S. 262), daß die phytinsäureähnlichen Phosphorverbindungen sich durch die Molybdänfällung nach Lorenz feststellen ließen.

Jedenfalls sind einstweilen noch allzu weitgehende Schlußfolgerungen, wie sie von vielen Autoren an der Hand der mit Molybdänmethode erhaltenen Ergebnisse gezogen werden, sehr mit Vorsicht zu betrachten. Man kann wohl nur so viel sagen, daß alle in verdünnten Säuren lösliche Phosphorsäure, die mit Ammoniummolybdat nicht gefällt wird, ein Minimum der als Phytin (Glycerinphosphorsäure usw.) vorhandenen darstellt. Und diese Methode wird zur Zeit auch noch die einzig in allen Fällen brauchbare Trennungsmethode für Pflanzenauszüge sein.

¹⁾ G. Fingerling und A. Hecking, Zur Frage der quantitativen Trennung der organischen Phosphorverbindungen von den Phosphaten in Futtermitteln. Diese Zeitschr. 37, 452, 1911.

²⁾ M. A. Jegorow, Zur Kenntnis der Eigenschaften des Phytins. Vorl. Mitt. diese Zeitschr. 42, 432, 1912.

³⁾ Zit. S. 169.

Über den „Nährwert“ und die Bedeutung der Nahrungsfette.

Von
Hans Aron.

(Aus der Universitäts-Kinderklinik Breslau.)

(Eingegangen am 17. Dezember 1919.)

Die vor etwa 1 $\frac{1}{2}$ Jahren in dieser Zeitschrift veröffentlichten Darlegungen über den „Nährwert“¹⁾ gaben Salkowski²⁾ sowie v. Gröer³⁾ Anlaß zu eingehenden Ausführungen über die von mir vertretenen Anschauungen. Während beide Forscher meine Auffassung über die besondere Bedeutung gewisser Gruppen von Nahrungsbestandteilen voll zustimmen, auch allgemein den Begriff des „Sondernährwertes“, wie ich ihn aufgestellt habe, anerkennen wollen, erheben sie lebhaft Bedenken gegen diejenigen Sätze, die sich auf die Funktion des Nahrungsfettes beziehen.

Mit vollem Recht konnte Salkowski seiner Zeit einwenden, daß sich meine These: Nahrungsfett ist nicht restlos durch Kohlenhydrat ersetzbar, es enthält gewisse Bestandteile, die der Organismus auf die Dauer nicht entbehren kann, und es gibt deshalb ein Fettminimum, dessen Höhe von der Natur des Nahrungsfettes abhängt, bisher nur auf die Ergebnisse von Tierversuchen stützt, und es fraglich bleibt, ob die aus diesen Versuchen gezogenen Schlußfolgerungen in gleichem Umfange auch für den Menschen Geltung

¹⁾ H. Aron, diese Zeitschr. 92, 211.

²⁾ E. Salkowski, diese Zeitschr. 94, 205.

³⁾ F. v. Gröer, diese Zeitschr. 97, 311.

besitzen. Gerade über diesen wichtigen Punkt will nun v. Gröer Klarheit bringen, indem er zwei junge Säuglinge längere Zeit äußerst fettarm, praktisch fettfrei ernährt. Seine Beobachtungen, die v. Gröer als ersten Versuch systematischer fettarmer Ernährung beim Menschen bezeichnet, ergeben nun tatsächlich, daß es gelingt, „Säuglinge von der Geburt an mindestens über das erste Halbjahr hinaus praktisch fettfrei zu ernähren, wenn das Fett isodynam durch Zucker ersetzt wird“. Soweit ist v. Gröer vollkommen zuzustimmen. Gestatten nun aber seine Beobachtungen, so bemerkenswert sie sind, wirklich den Schluß, „daß praktisch das Fett beim Säugling restlos durch Zucker ersetzt werden kann?“ Sehr richtig sagt v. Gröer selbst: „Es ist theoretisch wohl möglich, daß vielleicht nach einem Jahr fettarmer Ernährung plötzlich Störungen zur Beobachtung kämen, die sich nicht anders als durch Fettmangel erklären ließen.“ Ein genaueres Studium des Versuchsverlaufes und der Krankengeschichten der beiden Gröerschen Fälle lehrt uns, daß diese Erscheinung voraussichtlich schon erheblich früher eingetreten wäre, wenn v. Gröer beide Versuche mit fettfreier Ernährung nicht aus ärztlichen Gründen vorher hätte abbrechen müssen.

v. Gröer selbst berichtet bei dem ersten Kinde: „Nach dem 6. Monat beginnt nun die Gewichtskurve sich zu verflachen, ganz ähnlich wie die Kurven der Aronschen butterlosen Ratten. Es tritt alsbald Gewichtsstillstand mit stärkeren Schwankungen ein, dann eine länger dauernde, langsame Abnahme.“ v. Gröer bezieht dieses Verhalten der Gewichtskurve auf eine bald einsetzende Grippe; nach 270 Tagen fettarmer Kost wurde der Versuch abgebrochen. Bei dem zweiten Kinde kam es nach zuerst großartigem Gedeihen schon am 100. Tage zu Störungen in der Gewichtszunahme; auch diese werden auf eine Grippe und eine mit dieser einhergehende Ernährungsstörung bezogen.

Der Schluß, den ich aus diesen äußerst interessanten Untersuchungen v. Gröers ziehen würde, lautet etwa folgendermaßen: Junge Säuglinge können sich bei praktisch fettfreier Ernährung mehrere Monate anscheinend ungestört entwickeln, dann aber treten Störungen im Gedeihen auf. Fettarm ernährte Kinder sind, wie sich auch bei anderen Gelegenheiten immer

wieder zeigt¹⁾, gegen Infekte wenig widerstandsfähig und werden durch Infektionen besonders stark mitgenommen.

So beweisen diese Beobachtungen v. Gröers meiner Auffassung nach gerade, daß für den menschlichen Säugling hinsichtlich der Bedeutung des Nahrungsfettes vollkommen das Gleiche gilt, wie für die junge, wachsende Ratte, daß deshalb die Übertragung der Ergebnisse meiner Tierversuche auf den Menschen durchaus berechtigt erscheinen muß.

Im vollen Einklang mit diesen Schlußfolgerungen stehen auch die Beobachtungen C. E. Blochs²⁾, der zeigen konnte, daß junge Kinder bei dauernd fettfreier bzw. fettarmer Ernährung schwere Störungen der Gesundheit erleiden. Diese von Bloch als „Dystrophia alipogenetica“ bezeichneten Störungen äußern sich in großer Empfänglichkeit und geringer Widerstandsfähigkeit gegenüber allen Infektionen und dem Auftreten einer zur Keratomalacie führenden Xerophthalmie. Durch die Untersuchungen Blochs wird nun nicht nur der Satz von der Unentbehrlichkeit gewisser Bestandteile der Nahrungsfette, sondern auch die auf Grund der Tierversuche aufgestellte Lehre von der verschiedenen „biologischen Wertigkeit“ der einzelnen Nahrungsfette für den Menschen vollauf bestätigt.

Auf einer Abteilung des Reichshospitals in Kopenhagen wurde den Kindern niemals Butter oder Ei, niemals Sahne oder Vollmilch gegeben oder zur Zubereitung der Speisen benutzt, an Stelle von Vollmilch wurde nur Magermilch oder Buttermilch verwandt, als Fett diente nur eine Pflanzenmargarine. Bei dieser Ernährung traten zahlreiche Xerosefälle auf, während eine entsprechende Abteilung, in der die Kinder auch Vollmilch erhielten, freiblieb. Die Störungen der fettarm, richtiger „lipoidarm“, ernährten Kinder heilten auf Zulage geeigneter Fette, wie Lebertran, aus.

Als eine sehr wertvolle Ergänzung dieser Beobachtungen über die durch fettarme Ernährung bei Kindern hervorgerufenen Störungen sind die Untersuchungen von Rosenthal und Patzeck³⁾ anzusehen, die eine Abnahme des Cholesteringehaltes

¹⁾ Niemann, Berl. klin. Wochenschr. 1919, 777.

²⁾ C. E. Bloch, Jahrb. f. Kinderheilk. 89, 405/441.

³⁾ F. Rosenthal und F. Patzeck, Berl. klin. Wochenschr. 1919, 798.

im Blute und im Blutserum fortgesetzt lipoidarm ernährter Menschen nachweisen konnten. Das Sinken des Cholesterinspiegels im Blute als Indicator einer Lipoidverarmung des Organismus weist wahrscheinlich den Weg des Verständnisses für die geringe Resistenz fettarm ernährter Menschen zumal im Kampf gegen die Tuberkulose.

Die besondere Bedeutung gewisser Bestandteile der Nahrungsfette für die Gesundheit, ihre Unentbehrlichkeit in der Nahrung auch für den Menschen kann bei einer rein energetischen oder quantitativen Betrachtung des Nährwertes nicht berücksichtigt werden. Auch in dem v. Pirquetschen System war bisher für die qualitative Seite des „Nährwertes“, den „Sondernährwert“, kein Platz. Der Standpunkt, den v. Pirquet gerade in der Fettfrage eingenommen hat und der in den Sätzen¹⁾: „Der Mensch kann auch ohne Fett leben,“ „Fett ist überhaupt nicht prinzipiell vom Kohlenhydrat abzutrennen,“ „Fett ist sozusagen nichts anderes als konzentriertes Kohlenhydrat,“ zum Ausdruck kommt, läßt sich nach den eben mitgeteilten Untersuchungen unmöglich aufrecht erhalten. Es ist deshalb mit Freuden zu begrüßen, daß wenigstens Schick²⁾ jetzt neuerdings doch zugibt, „daß man die Frage noch offen lassen muß, ob bei langdauernder fettfreier Ernährung von vielen Kindern Schäden im Sinne der Folgen eines Mangels von akzessorischen Nährstoffen auftreten“.

v. Gröer wendet noch ein, daß nicht die „Nährstoffe“, sondern nur die „Nahrungsmittel“ einen „Sondernährwert“ hätten. Das ist nur eine Definitionsfrage. Ich habe ausdrücklich zwischen „Nahrungsfetten“ (Butter, Schmalz, Öl, Lebertran) und „Fetten im chemischen Sinne“ unterschieden. Die Nahrungsfette enthalten erstens „Fette im chemischen Sinne“ und noch eine Reihe anderer Stoffe, die man synonym als „akzessorische Nährstoffe“, „Begleitstoffe“, „Lipide“ bezeichnen kann. Diese Stoffe sind ebenfalls „Nährstoffe“, wenn man ihre Bedeutung als solche auch allzusehr unterschätzt hat. Es war wohlüberlegt, wenn ich schrieb: „Nahrungsfett“ ist

¹⁾ B. Schick, Das v. Pirquetsche System der Ernährung. Erg. d. inn. Med. u. Kinderheilk. 16.

²⁾ Derselbe, Zeitschr. f. Kinderheilk. 22, 224.

nicht restlos durch Kohlenhydrat ersetzbar;" denn Fett im chemischen Sinne, der „reine Nährstoff“, wie v. Gröer sagt, als Calorienspender mag ersetzbar sein, die anderen Bestandteile des Nahrungsfettes sind es aber nicht. Sie sind die Träger des „Sondernährwertes“ der Nahrungsfette. Darf man ihnen, weil sie nur einen geringen Brönnwert haben, den Charakter als „Nährstoffe“ absprechen?

Wenn ich in meinen Darlegungen die qualitative Seite des „Nährwertes“ so eindringlich betont habe, so hat es mir doch vollkommen fernelegen, die quantitative Seite des Nährwertbegriffes im geringsten zu unterschätzen. Ich habe immer nur darauf hingewiesen, daß neben dem allen organischen Nährstoffen gemeinsamen Brennwert auch ihr „Sondernährwert“ berücksichtigt werden muß. Selbstverständlich, darin stimme ich ganz mit v. Gröer überein, darf und soll der Begriff des „Sondernährwertes“ den Nährwertbegriff nicht ersetzen, sondern nur ergänzen.

Ich wäre auf den „Sondernährwert“ und die Bedeutung der Nahrungsfette nicht noch einmal eingegangen, wenn es sich nicht um eine Frage von allergrößtem praktischen Interesse und außerordentlicher Tragweite für die Volksgesundheit handelte. Noch sind die schweren Schädigungen, die Kriegskost und Hungerblockade hervorgerufen haben, keineswegs behoben, noch ist das Problem einer ausreichenden Ernährung unseres Volkes für die nächste Zukunft nicht gelöst. Ein planvolles, zielbewußtes Handeln ist nur möglich, wenn über die grundlegenden Fragen völlige Klarheit und Einigkeit in der Auffassung herrscht. Eines der wichtigsten Probleme stellt die Versorgung der Bevölkerung, vor allem der Jugend, mit biologisch hochwertigen, lipoidreichen Nahrungsfetten dar. Es muß deshalb den maßgebenden Stellen von den berufenen Forschern und ärztlichen Autoritäten, wie ich es schon in der Kriegszeit versucht habe, immer und immer wieder klar zum Ausdruck gebracht werden:

Der Mensch vermag eine fettfreie oder fettarme Ernährung wohl einige Monate ohne jeden nachweisbaren Schaden zu ertragen, denn der Brennwert des Fettes kann durch anderes Material äquicalorisch er-

setzt werden. Gewisse Bestandteile der Nahrungsfette sind aber für die Gesundheit von weittragendster Bedeutung und können deshalb auf die Dauer in der Nahrung nicht entbehrt werden. Die einzelnen Nahrungsfette sind nicht gleichwertig, da sie einen verschiedenen Gehalt an den für das Leben und die Gesundheit unentbehrlichen Nährstoffen besitzen. Das Fett der Milch, die Butter, kann nicht durch jedes Pflanzenfett, das Eigelbfett nicht durch Schweineschmalz ersetzt werden. Ein leicht beschaffbares, biologisch wertvolles Nahrungsfett, besonders für junge Kinder, ist der Lebertran.

Durch systematische Fütterungsversuche an jungen, wachsenden Tieren (Ratten) ist man in der Lage, die „biologische Wertigkeit“ der einzelnen Nahrungsfette experimentell zu prüfen.

Der Einfluß der Salze auf das Fällungsoptimum des Caseins.

Von

L. Michaelis und Albert v. Szent-Györgyi.

(Eingegangen am 23. Dezember 1919.)

Mit 5 Figuren im Text.

Vor kurzem wurde beschrieben¹⁾, daß die zur Fällung günstigste h (Wasserstoffionenkonzentration) von denaturiertem Eiweiß verschoben wird, wenn man der Lösung außer dem zur Regulierung der h notwendigen Mischung von Natriumacetat und Essigsäure noch ein anderes Salz zufügt. Diese Beobachtung wurde zunächst der Ausgangspunkt für eine Reihe von Untersuchungen über die Adsorption der Elektrolyte an verschiedenartigen Adsorbentien²⁾, die noch fortgesetzt wird. Andererseits soll sie aber auch der Ausgangspunkt für eine Theorie des Ionengleichgewichtes in der Lösung eines Ampholyten bei Gegenwart beliebiger Ionen sein. Die Ableitung dieser Theorie soll demnächst begonnen werden. Heute soll zunächst das Tatsachenmaterial der ersten Arbeit ergänzt werden, um zu zeigen, was für das früher benutzte denaturierte Albumin spezifisch und was allgemein ist. Es wurden deshalb dieselben Untersuchungen am Casein angestellt.

In einer Reihe von Reagensgläsern befand sich eine stets gleich bemessene sehr geringe Menge Casein, eine stets gleich bemessene, sehr geringe, aber im Vergleich zum Casein in molarer Konzentration reichliche, stets gleiche Menge Natriumacetat, und eine steigende Menge von Essigsäure; außerdem

¹⁾ L. Michaelis und P. Rona, diese Zeitschr. 94, 225, 1919.

²⁾ Dieselben, diese Zeitschr. 94, 240; 97, 85; 97, 57, 1919.

eine innerhalb einer einzelnen Versuchsreihe gleich bemessene Menge eines Salzes. Es wurde nunmehr innerhalb einer jeden solchen Reihe für jede Art und Konzentration von Salzen das Fällungsoptimum herausgesucht und die zugehörige h festgestellt, einerseits durch Berechnung, aus der Zusammensetzung des Acetatpuffers, andererseits, um zu kontrollieren, daß das zugefügte Salz keine in Betracht kommende Änderung der h hervorgerufen hat, durch elektrometrische Messung.

Die Gegenwart von Na- und Acetationen war daher in allen unseren Versuchen unvermeidlich, und es mußte daher ebenso wie beim Albumin zuerst der Beweis erbracht werden, daß diese beiden Ionenarten die maximal fallende h nicht merklich verschieben

Diesen Beweis kann man folgendermaßen erbringen: bei allen Ionenarten, die das *Fällungsoptimum verschieben, ist diese Verschiebung natürlich um so größer, in je höherer Konzentration sie zugegen sind. Dies ist theoretisch zu erwarten und wird auch durch unsere folgenden Experimente weitgehend bestätigt. Nun ließ sich für das Acetatpuffergemisch zeigen, daß das Fällungsoptimum stets fast genau bei derselben h liegt, gleichgültig in welcher molaren Konzentration der Acetatpuffer angewendet wird¹⁾. Daraus kann man schließen, daß entweder (wie wir früher meinten) die Affinität der Na⁺ verschwindend klein gegenüber der der H⁺ und gleichzeitig die der Acetationen verschwindend klein gegenüber der der H⁺ ist, oder besser, daß die Affinität der Na annähernd ebenso groß ist, wie die der Acetat⁻, so, daß eine Verschiebung nicht stattfindet. Der Acetatregulator hat also neben seiner die h regulierenden Wirkung noch die Annehmlichkeit, daß die Wirkung seiner Salzionen auf die zur Fällung günstigste h zu vernachlässigen ist.

Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt:

¹⁾ Fig. 4, die oberste Kurve gibt den „Normalversuch“, d. h. Na-Acetat in 0,01 mol Lösung und sonst kein Salz; Die drittletzte Kurve („Acetat“) gibt einen entsprechenden Versuch mit 0,1 mol Acetat; das Fällungsoptimum ist in kaum noch erkennbarer Weise nach rechts verschoben worden. Alle anderen Salze (außer RbCl) wirken wesentlich stärker verschiebend, der Unterschied der maximal fallenden h bei Gegenwart einer 0,01 und 0,1 mol Lösung des Salzes ist viel größer.

Es wurde 1 g fettfreies Casein (nach Hammarsten) in 25 ccm normaler Natriumacetlösung unter leichtem Erwärmen aufgelöst, und die schwach opaleszierende Lösung mit destilliertem Wasser auf 250 ccm aufgefüllt.

Nun wurde eine Reihe von Röhren mit je 9 ccm verschieden konzentrierter Essigsäure angelegt, und zwar so, daß jedes einzelne die Essigsäure in der doppelten Konzentration enthielt, als das vorangehende; nur die erste Röhre enthielt reines Wasser. Die λ dieser ersten Röhre ist nicht im voraus zu berechnen, aber jedenfalls kleiner als die der zweiten, die schon berechenbar ist.

Nun wurden die Röhren mit je 1 ccm einer bestimmten Salzlösung versetzt, umgeschüttelt, dann erst je 1 ccm obiger Lösung von Casein + Na-Acetat hinzugefügt, sofort umgeschüttelt und der Grad der Trübung bzw. Fällung nach einigen Minuten und nach 24 Stunden notiert.

Die Konzentration der Essigsäure wurde so gewählt, daß in allen Reihen (in der Regel mit 10 Röhren) immer das 6. Röhren die Essigsäure und ihr Natronsalz in gleicher Konzentration enthielt. Die λ dieser Röhre war daher $2 \cdot 10^{-5}$, entsprach also ungefähr dem isoelektrischen Punkt des Caseins¹⁾ ($2,4 \cdot 10^{-5}$). Dieses Röhren und das nächst höhere (also $2 \cdot 10^{-5}$ und $4 \cdot 10^{-5}$) stellte im salzfreien Normalversuch (erste Kurve in Fig. 1 bis 5) das Fällungsoptimum dar.

Die Resultate sind in derselben Weise wie in der ersten Arbeit in schematischen Diagrammen dargestellt. Die Abscissen bedeuten p_H . Diese wurde aus der Zusammensetzung des Acetatgemisches berechnet und in sehr zahlreichen Fällen durch Messung mit der Gaskette nachkontrolliert. Es zeigte sich, daß auch in den ungünstigsten Fällen p_H kaum jemals um 0,2 verschieden war von der berechneten, in den meisten Fällen weniger als 0,1. Da der Unterschied von p_H von einem Röhren zum nächsten überall 0,3 beträgt, und der genannte, höchste Unterschied von 0,2 nur in einigen Fällen bei Schwermetallsalzen erreicht wurde, in denen die Verschiebung des Fällungsoptimums sehr bedeutend war, so ergibt sich daraus, daß wir auf den Unterschied der berechneten und wahren λ

¹⁾ L. Michaelis und H. Pechstein, diese Zeitschr. 47, 260, 1919.

in Anbetracht der verhältnismäßig geringen Anforderungen, die wir an diese orientierenden Versuche zu stellen haben, vernachlässigen können.

Betrachten wir zunächst Fig. 1. Hier ist die Wirkung der Chloride verschiedener Metalle in gleicher Konzentration dargestellt. Die Ordinate stellt die Stärke der Flockung dar, in einem schätzungsweisen Maßstab, der jedoch für alle Diagramme vergleichbar gehalten ist. Die oberste Kurve gilt für den Versuch ohne Salzzusatz. Das Flockungsoptimum liegt zwischen p_H 4,7 und 4,4. Es steht in Übereinstimmung mit dem früher von Michaelis und Pechstein beschriebenen Flockungsoptimum bei $p_H = 4,62$.

Man sieht nun, daß alle diese Salze das Flockungsoptimum nach rechts verschieben. Nur RbCl verschiebt nicht. Deutlich verschiebt K, Na und NH_4 ; ein Unterschied zwischen diesen dreien ist nicht erkennbar. Ein wenig stärker noch wirkt Li. Noch bedeutend stärker wirken die zweiwertigen Ionen der Leichtmetalle Ca, Ba, Sr, sowie Mg, die unter sich fast gleich sind. Die Schwermetalle sind hier nicht dargestellt. Ihre Wirkung ist so bedeutend, daß

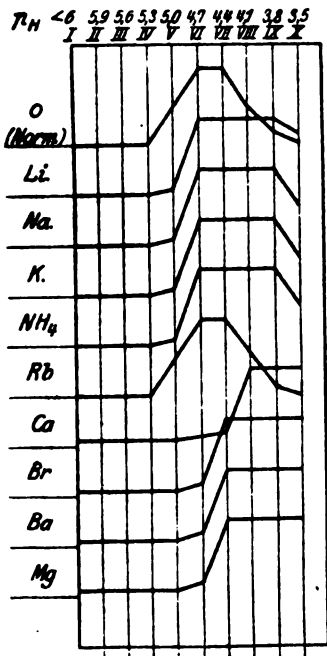


Fig. 1. Alle Salze 0,1 molar.

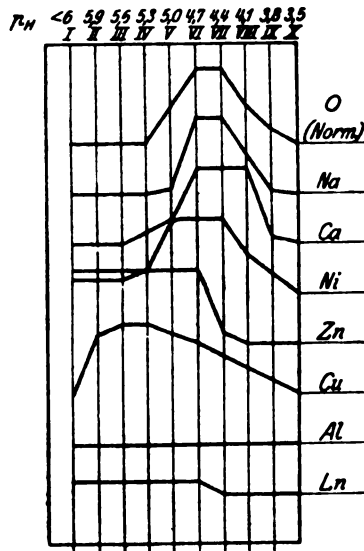
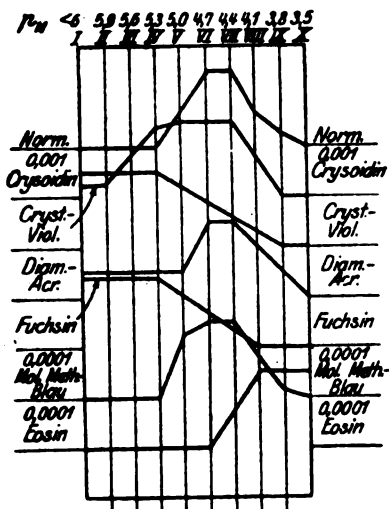
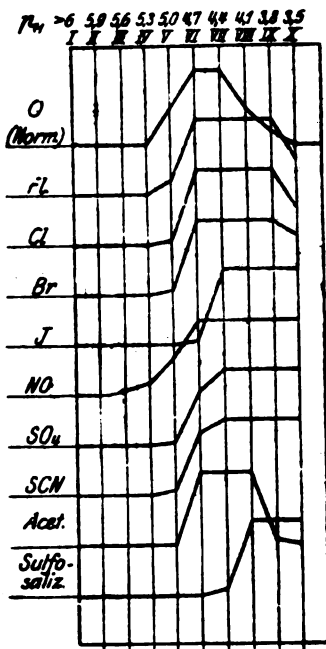
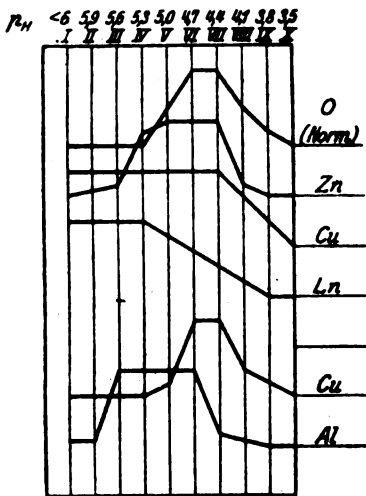


Fig. 2. Alle Salze 0,01 molar.



sie besser an Versuchen mit dünneren Salzlösungen dargestellt werden, um sie mit den Leichtmetallen zu vergleichen. Das wird in Fig. 2 gezeigt. In dieser Konzentration wirkt NaCl noch nicht merklich, CaCl₂ nur eben erkennbar. Dagegen wirkt Ni stark, und zwar im entgegengesetzten Sinne: es verschiebt die ganze Flockung nach links. Viel stärker tut das Zn und Cu. Vom Al kann man in dieser Konzentration nur aussagen, daß es die Flockung ganz verhindert. La tut die fast in demselben Grade, aber

es bleibt immerhin noch so viel Flockung übrig, um sagen zu können, daß es die ganze Flockung nach links verschiebt. Gehen wir mit der Konzentration der Salze noch weiter herunter, so wird (Fig. 3) die Wirkung des Zn⁺⁺ so gering, daß sie nur gerade noch gut erkennbar ist. Cu⁺⁺ wirkt dann aber noch gewaltig. In dieser Konzentration hemmt La⁺⁺⁺ die Flockung nicht mehr bedeutend, und man kann nun erkennen, daß das La⁺⁺⁺ noch stärker verschiebt als Cu⁺⁺. Bei noch höherer Verdünnung (Fig. 3, die unteren Kurven) verschwindet schließlich auch die Wirkung des Cu⁺⁺, aber die des Al⁺⁺⁺ ist noch sehr deutlich.

Bisher wurde nur das Kation variiert. Vergleichen wir jetzt die Na-Salze verschiedener Anionen, so zeigt sich in Fig. 4, daß diese alle das Flockungsoptimum nach rechts verschieben, und zwar in der Reihenfolge $F = Cl < Br < J < CNS$, was die Halogene betrifft. Acetat steht noch vor dem F, es verschiebt fast gar nicht, wie schon oben gesagt wurde, NO₃ steht etwa zwischen Br und J, SO₄ etwa ebenso, und am stärksten von den Anionen dieser Figur verschiebt Sulfosalicylsäureion.

Schließlich wurden noch einige Farbstoffe untersucht, die basischen als Chloride, die sauren als Na-Salze. Man erkennt die ganz gewaltige Wirkung aller Farbstoffe. Die basischen verschieben nach links, die sauren nach rechts. Innerhalb der Farbstoffe aber sind wiederum bedeutende Unterschiede.

Die allgemeinen Resultate sind also folgende: die verschiebende Wirkung eines Salzes hängt sowohl von seinem Anion wie von seinem Kation ab. Sind beide gleich stark wirksam, so tritt keine Verschiebung des Fällungsoptimums ein. Dies wurde 2mal beobachtet, beim RbCl und beim Na-Acetat. In allen anderen Fällen überwiegt die Wirkung des einen Ions.

Kationen	Ca	Li	Na	Rb			Ni	Zn		Cu	La	Methylenblau	Fuchsin
	Ba		K								Al		Krystallviolett
	Sr		NH ₄										
Anionen			Acetat	F	Br	J	SCN			Sulfosalicylsäure			Eosin
				Cl		NO ₃							

Überwiegt die des Kations, so wird das Flockungsoptimum nach der weniger sauren Seite verschoben, und umgekehrt. Die Stärke der Wirksamkeit ist in aufsteigender Reihenfolge die in Tabelle Seite 183 unten stehende:

Die Reihe ist folgendermaßen zu verstehen. Die verschiebende Wirkung eines Salzes setzt sich zusammen aus der seines Kations und der seines Anions. Überwiegt die verschiebende Wirkung des Kations, so liegt die Verschiebung nach der weniger sauren Seite, überwiegt die des Anions, so liegt sie nach der saureren Seite. Die Kationen und Anionen sind so übereinander geordnet, daß Salze, die aus Kation und Anion derselben Vertikalreihe bestehen, nicht verschoben. Also z. B. CaCl_2 verschiebt nach der saureren Seite, Na-Acetat, RbCl verschoben nicht; Na J verschiebt nach der saureren Seite; Ln Cl_2 nach der weniger sauren Seite; Methyleneblauschlorid nach der weniger sauren Seite, Eosin-K nach der saureren Seite usw.

Beim denaturierten Albumin wurde neben der verschiebenden Wirkung auch eine abschwächende Wirkung auf die Fällung in dem jeweiligen Optimum beobachtet. Diese fand sich beim Casein nur für Al und La wieder. Die abschwächende Wirkung von NaCl, Na_2SO_4 , Na-Acetat u. a. ist beim Casein nicht zu erkennen.

Die Deutung dieser Befunde und die Bezugnahme dieser Ionenreihen auf andere bekannte Ionenreihen wird auf breiterer theoretischer Grundlage demnächst begonnen werden.

Über eine Reaktion auf Pyrrol.

Von

E. Salkowski.

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

(Eingegangen am 30. Dezember 1919.)

Gelegentlich von Untersuchungen über menschliches pathologisches Melanin, über die an anderer Stelle berichtet werden wird¹⁾ beobachtete ich, daß das Destillat der angesäuerten Kalisohmelze des Melanins mit p-Dimethylamidobenzaldehyd und Salzsäure eine stark positive Reaktion gab, das aus demselben isolierte Indol, bzw. der Rückstand, der das Indol enthalten mußte, dagegen nur eine verhältnismäßig schwache. Da das Indol ein Pyrrolderivat ist, mit dem Pyrrol die Reaktion auf einen mit Salzsäure angefeuchteten Fichtenspan teilt und das betreffende Destillat nach vorliegenden Angaben Pyrrol enthält, so lag die Vermutung nahe, daß auch das Pyrrol mit dem genannten Aldehyd reagieren und sich so die oben angeführte Differenz erklären möchte. Diese Vermutung bestätigte sich. Naturgemäß tauchte die Frage auf, ob die Reaktion in allen Einzelheiten mit der Indolreaktion übereinstimmt oder sich vielleicht Unterscheidungsmerkmale auffinden lassen möchten. Zur Entscheidung dieser Frage war ein Eingehen auf die verschiedenen Ausführungsformen der Indolreaktion²⁾ erforderlich.

Das zu den Versuchen erforderliche Pyrrol habe ich, da es käuflich nicht zu erhalten war, selbst dargestellt und zwar durch Erhitzen eines innigen Gemisches von bernsteinsäurem

¹⁾ Inzwischen erschienen Virchows Archiv 227, 121, 1920.

²⁾ Nur das freie Indol ist berücksichtigt, nicht das im Tryptophan gebundene.

Ammon mit Zinkstaub unter Vermeidung der Darstellung von Succinimid in Erinnerung daran, daß Neuberg¹⁾ die Pyrrolbildung beim Erhitzen von bernsteinsäurem Ammon mit Zinkstaub als Reaktion zur Feststellung von Bernsteinsäure empfohlen hat. 10 g Bernsteinsäure wurden in das Ammonsalz übergeführt und mit etwa 80 g Zinkstaub in einer kleinen Retorte erhitzt. Dabei gingen mit Wasser ölige Tropfen von Pyrrol über, das durch Schütteln mit Äther in ätherische Lösung übergeführt wurde. Zur Herstellung einer Lösung von bekanntem Gehalt wurde eine kleine Quantität der ätherischen Lösung bei gelinder Wärme verdunstet, der Rückstand gewogen, in wenig Alkohol gelöst und die Lösung in Wasser gegossen und zwar in das annähernd 4000 fache des gewogenen Rückstandes, dann die Verdünnung 1:4000 genau hergestellt. Diese Lösung verhielt sich folgendermaßen.

Bei Zusatz einer 2%igen Lösung des Aldehyds in Normal-salzsäure, wie sie Ehrlich ursprünglich angegeben hat, wurde die etwas trübe Lösung schwach rosa, beim Erwärmen prächtig violett, indem sie sich gleichzeitig klärte. War die Lösung vorher erwärmt, so trat die Violettfärbung sofort auf. Ebenso, jedoch etwas schwächer, wirkte Zusatz von Salzsäure von 1,126 D zu der in der Kälte angestellten Reaktion, dagegen blieb die Vermehrung des Zusatzes der Aldehydlösung ohne Einfluß. Vielleicht noch etwas stärker war die Violettfärbung, wenn einige Tropfen Salzsäure hinzugeeetzt und außerdem erwärmt wurden. Der violette Farbstoff ist haltbar, er geht leicht in Amylalkohol über. Diese Lösung — ebenso übrigens auch die Reaktionsmischung selbst — zeigt bei der spektroskopischen Untersuchung einen wenig intensiven und schlecht begrenzten Absorptionstreifen, der etwa den Raum von der Mitte zwischen C und D bis gegen E hin einnimmt. Bei einem irgend erheblichen Zusatz rauchender Salzsäure blaßt die violette Färbung schnell ab. Bei Zusatz des halben Volumens der 2%igen alkoholischen Lösung des Aldehyds und einiger Tropfen Salzsäure nach Steensma²⁾ zur Pyrrolösung trat die Violettfärbung sofort ein. Zusatz einer Spur einer $\frac{1}{2}$ %igen Lösung von

¹⁾ Neuberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 574, 1900/1901.

²⁾ Steensma, Zeitschr. f. physiol. Chem. 47, 25, 1906.

Natriumnitrit (gleichfalls nach Steensma) bewirkte zuerst dunklere Färbung, dann schnelles Abblässen.

Zum Vergleich wurde eine abgewogene Quantität kristallisiertes Indol in wenig Alkohol gelöst und hieraus eine wäßrige Verdünnung von 1:10000 hergestellt. Die Lösung war klar. Die Konzentration wurde von vornherein geringer genommen, weil Vorversuche ergeben hatten, daß Indollösungen stärker reagieren wie Pyrrollösungen.

Es zeigte sich weitgehende Übereinstimmung, auch an der Indollösung konnte festgestellt werden, daß die Reaktion mit der Lösung des Aldehyds in Normalsalzsäure schwach ist durch Erwärmen, sowie durch Salzsäurezusatz verstärkt wird. Als bemerkenswert möchte ich noch hervorheben, daß bei Zusatz von mehr Salzsäure regelmäßig eine Trübung auftrat, die beim Erwärmen verschwand. Die Erscheinungen bei Anwendung der alkoholischen Aldehydlösung + Salzsäure sowie die Wirkung des Nitritzusatzes sind bekannt, der Nitritzusatz wirkt aber nicht so schnell zerstörend wie beim Pyrrol. Auch beim Indol ist der Zusatz von rauchender Salzsäure nicht ohne Einfluß auf die Schönheit der Reaktion: die Violettfärbung wird mehr bläulich, dann mißfarbig.

Zusammenfassend kann man sagen: Pyrrollösung zeigt in dem Verhalten zu p-Dimethylamidobenzaldehyd eine sehr weitgehende Übereinstimmung mit Indollösung, nur ist die Reaktion weniger fein und wird durch rauchende Salzsäure, sowie durch Nitritzusatz stärker beeinflußt wie Indollösung. Jedenfalls aber wird man bei Anstellung der Ehrlichen Reaktion zum Nachweis sehr kleiner Mengen von Indol auf die Möglichkeit des Vorliegens von Pyrrol statt Indol u. U. künftig achten müssen.

Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlen- säurezersetzung in lebenden Zellen. II

Von
Otto Warburg.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 6. Januar 1920.)

Mit 3 Figuren im Text.

Die vorliegende Mitteilung¹⁾ zerfällt in folgende Abschnitte:

I. Photochemische Induktion bei der Assimilation: Intermittierende Bestrahlung bei langer Dauer der Perioden. Einfluß der Intensität der Bestrahlung. Anwachsen der Assimilationsgeschwindigkeit nach langen Dunkelperioden.

II. Einfluß der Sauerstoffkonzentration auf die Assimilation.

III. Die Wirkung der Narkotica auf die Assimilation: Abhängigkeit der Wirkung von der Narkoticumkonzentration. Änderung der Wirkungsstärke innerhalb einer homologen Reihe. Wirkung bei tiefen CO₂-Konzentrationen.

IV. Die Wirkung der Blausäure auf die Assimilation.

V. Die assimilierende Zelle als Photolyt. Physikalisch-chemische Vorbemerkung. Kinetik der Assimilation. Der Primärvorgang. Die Acceptorbildung. Sekundärreaktion und Acceptorbildung.

VI. Reduktion der Salpetersäure in der lebenden Zelle.

¹⁾ Fortsetzung von diese Zeitschr. 100, 230, 1919.

I. Photochemische Induktion.

Bestrahlt man ein Gemisch von Chlor und Wasserstoff, so bildet sich anfangs nur wenig Salzsäure, und erst allmählich steigt die Geschwindigkeit der Salzsäurebildung zu einem konstanten Endwert an. Eine derartige Erscheinung, die vielfach bei photochemischen Vorgängen beobachtet wird, nannten Bunsen und Roscoe „photochemische Induktion“; sie beruht, wie wir heute wissen, nicht auf einer Besonderheit des photochemischen Primärvorgangs, sondern auf sekundären Reaktionen¹⁾, im Fall der Chlorwasserstoffbildung auf der Reaktion der bei Bestrahlung primär²⁾ gebildeten freien Chloratome mit Verunreinigungen des Chlorknallgases.

Bei Fortsetzung der Assimilationsversuche mit intermittierender Bestrahlung zeigte es sich, daß die Erscheinung der photochemischen Induktion auch bei der Assimilation beobachtet wird. Geht man nämlich zu langen Perioden über und vergrößert außerdem die Dunkelperioden im Vergleich zu den Hellperioden, so zersetzt eine bestimmte Menge Strahlung, die im Wechsel mit Dunkelperioden einwirkt, weniger Kohlensäure als bei kontinuierlicher Bestrahlung.

Die Versuche wurden in Carbonatgemischen von 85 Teilen $\frac{m}{10}$ - NaHCO_3 und 15 Teilen $\frac{m}{10}$ - Na_2CO_3 angestellt. Die Kohlensäurekonzentration war somit bei 25° 91×10^{-6} oder so hoch, daß eine Verdopplung die Assimilationsgeschwindigkeit nur unerheblich steigerte. „Hohe“ Bestrahlungsintensität war eine solche von 10000 bis 20000 Lux³⁾, bei der die Assimilation nahezu ihren Maximalwert erreicht hat und etwa das 20fache der Atmung beträgt; „tiefe“ Bestrahlungsintensität war eine solche von 400 bis 800 Lux, bei der die Assimilation etwa gleich der Atmung ist. Bei den Versuchen mit hoher Bestrahlungsintensität waren die Zellsuspensionen so dünn, daß das Licht beim Durchgang durch das Assimilationsgefäß nur um etwa 10⁰/₁₀ geschwächt wurde.

In Tabelle I ist ein Versuch wiedergegeben, in dem die

¹⁾ Burgess u. Chapman, Journ. Chem. Soc. Lond. 89, 1319, 1906. — Luther u. Goldberg, Zeitschr. f. physikal. Chem. 56, 43, 1906.

²⁾ Nernst, Zeitschr. f. Elektrochem. 1918, 335.

³⁾ Eine Bestrahlungsintensität, bei der die Zellen gezüchtet werden können.

Tabelle I.

25°. Hohe Bestrahlungsintensität. 1 mm = 0,7 cmm Sauerstoff.

Gesamtbelichtungszeit in Minuten	Belichtungsart	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel mm	Wenigerleistung des Lichts bei intermittierender Bestrahlung %
10	kontinuierlich	+ 40	
10	{ 1' dunkel 1' hell }	+ 36	10
10	{ 2' dunkel 1' hell }	+ 26	35
10	{ 3' dunkel 1' hell }	+ 18	55
10	{ 4' dunkel 1' hell }	+ 14	65

Tabelle II.

25°. Hohe Bestrahlungsintensität. 1 mm = 0,7 cmm Sauerstoff.

Nr. des Versuchs	Gesamtbelichtungszeit in Minuten	Belichtungsart	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel mm	Wenigerleistung des Lichts bei intermittierender Bestrahlung %
1	10	kontinuierlich	+ 45	78
	10	{ 5' dunkel 1' hell }	+ 12	
2	10	kontinuierlich	+ 45	71
	10	{ 5' dunkel 1' hell }	+ 13	
3	10	kontinuierlich	+ 20	75
	10	{ 5' dunkel 1' hell }	+ 5	
4	10	kontinuierlich	+ 27	85
	10	{ 5' dunkel 1' hell }	+ 4	
5	10	kontinuierlich	+ 26	77
	10	{ 5' dunkel 1' hell }	+ 6	

Dauer der Hellperioden gleich war, und zwar stets gleich einer Minute, während die Dauer der Dunkelperioden zwischen einer und vier Minuten variiert wurde. Der Versuch begann nach vorheriger halbstündiger kontinuierlicher Bestrahlung.

Tabelle II enthält 5 Versuche, in denen auf eine Dunkelperiode von 5 Minuten eine Hellperiode von 1 Minute folgte.

Aus beiden Tabellen ergibt sich, daß eine bestimmte Menge Strahlung nach langer Dunkelperioden weniger leistet als bei kontinuierlicher Einwirkung. Diese Wenigerleistung ist bei der Folge von einer Hellminute und einer Dunkelminute unerheblich, sie beträgt bei einer Verlängerung der Dunkelperioden auf 5 Minuten 70 bis 80% der Leistung bei kontinuierlicher Bestrahlung. Eine Verlängerung der Dunkelperioden über 5 Minuten hinaus hatte, unter sonst gleichen Bedingungen, kein weiteres Herabgehen der Leistung zur Folge.

Die Geschwindigkeit der Assimilation steigt also nach einer langen Dunkelperiode allmählich an. Will man diesen Anstieg direkt messen, so ist es methodisch nicht korrekt, die Druckänderungen am Manometer etwa von Minute zu Minute zu beobachten, da es einiger Zeit bedarf, bis der in der Zelle gebildete Sauerstoff an den Gasraum abgegeben wird. Die Anordnung war deshalb folgende: Nach einer Dunkelperiode von 5 Minuten wurde zunächst 0,5 Minuten bestrahlt, dann verdunkelt und erst nach einigen Dunkelminuten abgelesen, wenn die Druckdifferenz zwischen dem bestrahlten Gefäß und der nicht bestrahlten Kontrolle konstant geworden war. Der Versuch wurde mit Bestrahlungszeiten von 1,0, 1,5, 2,0 und 3,0 Minuten wiederholt, indem der Bestrahlung stets eine Dunkelperiode von 5 Minuten vorausging. Um nach so kurzen Bestrahlungszeiten schon gut meßbare Ausschläge zu erhalten, mußte mit ziemlich dichten Zellsuspensionen gearbeitet werden, die das Licht beim Durchgang durch das Assimilationsgefäß um etwa 75% schwächten. Man erhält so nicht die Kurve für die hohe Intensität der auffallenden Strahlung, sondern für eine mittlere Strahlungsintensität.

Eine Beobachtungsreihe ist in Tabelle III zahlenmäßig, in Fig. 1 graphisch wiedergegeben. Die zunächst kleine Assimilationsgeschwindigkeit erreicht also bei 25° nach etwa 2 Minuten einen konstanten Endwert.

Tabelle III.

25°. Hohe Intensität der auffallenden Strahlung.
1 mm = 0,7 omm Sauerstoff.

Belichtungszeit in Minuten	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm	Sauerstoffproduktion, auf 30' berechnet
0,5	2	2
1,0	7	5
1,5	14	7
2,0	22	8
3,0	38	8

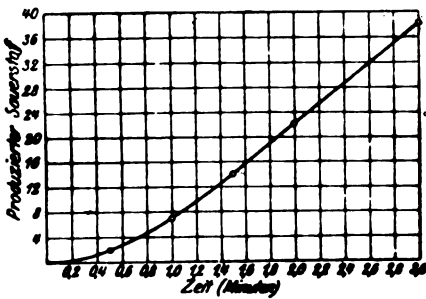


Fig. 1.

Hätte die Induktion bei der Assimilation ähnliche Ursachen wie bei der Chlorknallgasreaktion, so müßte die Induktionszeit um so kürzer sein, je höher die Bestrahlungsintensität. Tabelle IV, in der einige Versuche mit niedriger Bestrahlungsintensität wiedergegeben

Tabelle IV.

25°. Niedrige Bestrahlungsintensität. 1 mm = 0,7 omm Sauerstoff.

Nr. des Versuchs	Gesamtbelichtungszeit in Minuten	Belichtungsart	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm	Wenigerleistung des Lichts bei intermittierender Bestrahlung %
1	10	kontinuierlich	+ 12	—
	10	{ 5' dunkel 1' hell }	+ 11	
2	10	kontinuierlich	+ 18	—
	10	{ 3' dunkel 1' hell }	+ 18	
3	10	kontinuierlich	+ 14	—
	10	{ 5' dunkel 1' hell }	+ 16	

sind, zeigt, daß hier eine Induktion nicht nachzuweisen ist, indem bei intermittierender und kontinuierlicher Bestrahlung innerhalb der Fehlergrenzen gleiche Leistungen gefunden werden. Es geht daraus hervor, daß die Induktion bei der Assimilation in anderer Weise als bei der Chlorknallgasreaktion gedeutet werden muß.

Zusammenfassung.

Bestrahlt man eine vorher verdunkelte Zelle mit hoher Intensität, so steigt die Assimilationsgeschwindigkeit von einem niedrigen Anfangswert im Laufe einiger Minuten auf einen konstanten Endwert.

Bestrahlt man eine vorher verdunkelte Zelle mit niedriger Intensität so ist eine Induktionszeit nicht nachweisbar.

Verdunkelt man eine Zelle nach vorheriger intensiver Bestrahlung, so stellt sich allmählich der inaktive Zustand wieder ein; nach einer Verdunkelungszeit von einer Minute ist die Inaktivierung eben merklich, nach einer Verdunkelungszeit von 5 Minuten ist die Inaktivierung beendet oder das „Dunkelgleichgewicht“ erreicht.

II. Einfluß der Sauerstoffkonzentration auf die Assimilationsgeschwindigkeit.

Bei niedrigen Sauerstoffdrücken verliert eine grüne Zelle die Fähigkeit, Kohlensäure photochemisch zu zersetzen; der kritische Sauerstoffdruck liegt hierbei nach Beobachtungen Willstaettters¹⁾ unter $\frac{1}{1000}$ Atmosphäre.

Abgesehen von dieser Hemmung ergab sich ein weiterer Einfluß des Sauerstoffdruckes, als die Assimilationsgeschwindigkeit bei Sauerstoffdrücken zwischen $\frac{1}{50}$ und 1 Atmosphäre gemessen wurde; und zwar sank die Assimilationsgeschwindigkeit, wenn der Sauerstoffdruck stieg.

Die Versuche waren so angeordnet, daß die Assimilationsgefäße zunächst mit ihren Manometern verbunden wurden und dann die Luft aus dem überstehenden Gasraum und der Manometercapillare, unter lebhaftem Schütteln, durch Gasgemische

¹⁾ Willstaetter u. Stoll, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, Berlin 1918.

verschiedenen Sauerstoffpartialdrucks vertrieben wurde. Der Gesamtgasdruck betrug etwa 1 Atmosphäre, zur Verdünnung des Sauerstoffs diente entweder Stickstoff oder Wasserstoff. Wie immer, so wurde auch hier jeder Versuch doppelt angesetzt, das eine Gefäß diente zur Bestrahlung, das zweite als Dunkelkontrolle. Ein etwaiger Einfluß des Sauerstoffdruckes auf die Atmung fällt so im Resultat der Assimilationsmessung heraus, doch wurde, in Übereinstimmung mit früheren Erfahrungen, niemals eine Beschleunigung der Atmung beobachtet, wenn der Sauerstoffdruck in den angegebenen Grenzen stieg.

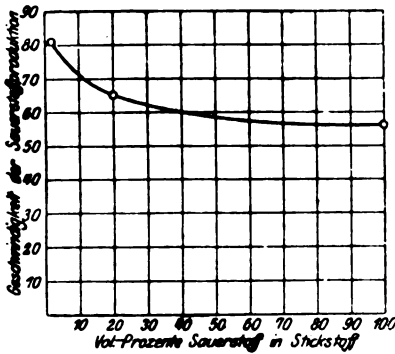


Fig. 2.

Als Suspensionsflüssigkeit diente ein Carbonatgemisch von 85 Teilen $\frac{m}{10}$ - NaHCO_3 und 15 Teilen $\frac{m}{10}$ - Na_2CO_3 , CCO_2 war demnach bei $25^\circ = 91 \times 10^6$ oder sehr hoch; hinsichtlich der „hohen“ und „tiefen“ Bestrahlungsintensitäten gilt das in Abschnitt I Gesagte.

In Fig. 2 ist ein Versuch graphisch wiedergegeben.

Tabelle V.

25° Hohe Bestrahlungsintensität. 1 mm = 0,7 omm Sauerstoff.

Nr. des Versuchs	Volumprozent Sauerstoff	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mmf	Die Verminderung des Sauerstoffpartialdruckes bewirkt eine Beschleunigung der Sauerstoffproduktion um %
1	100%	+ 45	44
	2% in Wasserstoff	+ 65	
2	100%	+ 28	66
	2% in Wasserstoff	+ 46	
3	100%	+ 32	41
	2% in Stickstoff	+ 45	
4	100%	+ 26	73
	2% in Stickstoff	+ 45	

auf der Abszissenachse sind die Volumprocente an Sauerstoff oder die Sauerstoffpartialdrucke abgetragen, die Ordinaten bedeuten die in 30 Minuten beobachteten Druckänderungen (Druckdifferenzen Hell-Dunkel) oder die Geschwindigkeiten der Sauerstoffproduktion. Die Bestrahlungsintensität war hoch. Wie man sieht, sinkt die Geschwindigkeit der Sauerstoffproduktion von 81 auf 55, wenn der Sauerstoffdruck von $\frac{1}{50}$ auf 1 Atmosphäre steigt, und zwar wird der Einfluß des Sauerstoffdruckes mit steigenden Sauerstoffdrucken kleiner.

Tabelle V gibt vier Versuche mit verschiedenem Zellmaterial bei Variation des Sauerstoffdruckes um das 50fache wieder und zeigt, daß der Einfluß des Sauerstoffdruckes quantitativ etwas verschieden ist. Ob der Sauerstoff mit Wasserstoff oder mit Stickstoff verdünnt wird, scheint keine Rolle zu spielen.

Bei niedrigen Bestrahlungsintensitäten war ein deutlicher Einfluß des Sauerstoffdruckes nicht festzustellen (Tabelle VI).

Tabelle VI.

25°. Niedrige Bestrahlungsintensität. 1 mm = 0,7 cmm Sauerstoff.

Nr. des Versuchs	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm in 30 Minuten	
1	2 Vol.-% Sauerstoff in Stickstoff	100 Vol.-% Sauerstoff
	55	58
2	2 Vol.-% Sauerstoff in Stickstoff	20 Vol.-% Sauerstoff in Stickstoff
	73	72

Was die Deutung der Versuche betrifft, so kommen zunächst zwei Möglichkeiten in Betracht. Bei hohen Bestrahlungsintensitäten entstehen die Assimilate in hoher Konzentration und könnten, ehe sie in eine stabile Form übergehen, durch Sauerstoff zu Kohlensäure zurückoxydiert werden. Dies wäre der uninteressantere Fall. Es ist aber auch daran zu denken, daß der Sauerstoff mit dem photochemischen Primärprodukt reagiert, indem er, wie das Kohlensäurederivat, als Acceptor fungiert.

Ein hemmender Einfluß des Sauerstoffs wurde bei vielen photochemischen Vorgängen in vitro beobachtet, z. B. bei der

klassischen photochemischen Reaktion, der Salzsäurebildung aus Chlorknallgas. Nach Luther¹⁾ ist die Hemmung durch Sauerstoff für alle Photochlorierungen, nach Wildermann²⁾ für alle photochemischen Gasreaktionen charakteristisch³⁾.

Wie man sich den Einfluß des Sauerstoffs auch vorstellen mag, immer wird man berücksichtigen, daß sich der assimilatorische Quotient mit wachsenden Sauerstoffdrucken nicht ändert, daß also in der schließlichen Bilanz kein Sauerstoff verschwinden darf.

III. Die Wirkung der Narkotica auf die Assimilation.

1. Beruht die hemmende Wirkung der Narkotica auf einer Veränderung von Grenzflächen und ist diese Veränderung angenähert der Narkoticumkonzentration an den Grenzflächen proportional, so wird für die Abhängigkeit der Wirkung von der Narkoticumkonzentration eine der Freundlich'schen Adsorptionsisotherme⁴⁾ ähnliche Kurve zu erwarten sein. In der Tat erhält man eine derartige Kurve, wenn man die Außenkonzentrationen des Narkoticums Phenylurethan als Abszissen, die Hemmungen der Assimilationsgeschwindigkeit als Ordinaten aufträgt.

Bei den Versuchen wurden die Zellen in Gemischen von 85 Teilen $\frac{m}{10}$ -NaHCO₃ und 15 Teilen $\frac{m}{10}$ -Na₂CO₃ unter Zusatz steigender Phenylurethanmengen suspendiert. Die Temperatur bei der Bestrahlung war 10°, c_{CO₂} somit 76×10^{-6} oder so hoch, daß eine Verdoppelung der CO₂-Konzentration die Assimilationsgeschwindigkeit nur unerheblich steigerte. Die Bestrahlungsintensität betrug etwa 10000 Lux, war also gleichfalls sehr hoch. Bedeutet v_0 die Assimilationsgeschwindigkeit ohne Narkoticum, v_1 die Assimilationsgeschwindigkeit bei der Narkoticumkonzentration c , so ist $\frac{v_0 - v_1}{v_0} \times 100$ die prozentische Hemmung der Assimilationsgeschwindigkeit, die in Fig. 3

¹⁾ Zeitschr. f. physikal. Chem. 56, 43, 1906.

²⁾ Zeitschr. f. physikal. Chem. 42, 313, 1903.

³⁾ Vgl. auch Weigert, „Über Hemmung photochemischer Reaktionen durch Sauerstoff“. Nernst-Festschrift, S. 464.

⁴⁾ Freundlich, Zeitschr. f. physikal. Chem. 57, 385, 1907.

als Ordinate aufgetragen ist. Die Abszissen entsprechen den Außenkonzentrationen an Phenylurethan.

2. Wie in früheren Versuchen die Wirkung¹⁾ auf Atmung und Gärung innerhalb einer homologen Reihe mit der Adsorbierbarkeit zunahm, so stieg, wie zu erwarten war, in ähnlicher Weise die Wirkung auf die Assimilationsgeschwindigkeit. In Tabelle VII sind die Konzentrationen, die eine bestimmte Hemmung der Assimilation bewirken, für die Reihe der Urethane zusam-

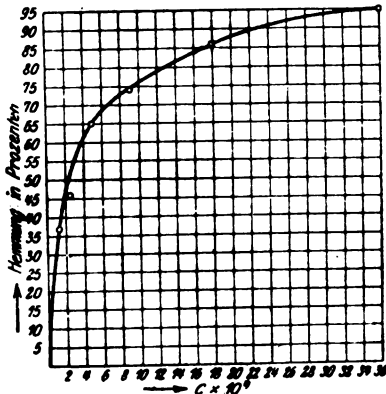


Fig. 8.

Tabelle VII.

25°. Hohe CO₂-Konzentration und hohe Bestrahlungsintensität.

Narkoticum	Assimilations- hemmung von 50% durch Millimole pro Liter	Atmungs- hemmung von 50% durch Millimole pro Liter
Methyl-Urethan .	400	1200
Äthyl-Urethan . .	220	780
Propyl-Urethan .	50	100
Butyl-Urethan(iso)	17	49
Amyl-Urethan(iso)	12	32
Phenyl-Urethan .	0,5	6

mengestellt, daneben die viel höheren Konzentrationen, die die Atmung derselben Zelle um den gleichen Betrag hemmen. Die Tabelle zeigt den bekannten Anstieg der Wirkungstärken, für die Assimilationshemmung vom Anfangsglied bis zum Endglied auf das 800fache.

Die Zahlen sind einer Dissertation von Fräulein Alexandra v. Ranke entnommen (Methode: Anordnung I; Suspensionaffüssigkeit: mit 4 Vol. % CO₂ gesättigte Knopsche Lösung). Sie beziehen sich auf hohe Kohlensäurekonzentrationen und Bestrahlungsintensitäten und zeigen, daß der unter diesen

¹⁾ Asher-Spiro, Ergebnisse der Physiologie. 14, 253, 1914.

Bedingungen maßgebende Teilvorgang der Assimilation eine Reaktion an Grenzflächen ist.

3. Durch Untersuchung der Assimilation unter verschiedenen äußeren Bedingungen ist die Möglichkeit gegeben, Wirkungen auf die einzelnen Teilvorgänge der Assimilation festzustellen. Als verschiedene äußere Bedingungen kommen in erster Linie in Betracht:

hohe CO_2 -Konzentration und hohe Bestrahlungsintensität,

hohe CO_2 -Konzentration und tiefe Bestrahlungsintensität,

tiefe CO_2 -Konzentration und hohe Bestrahlungsintensität.

Die Wirkung der Narkotica in den beiden ersten Fällen wurde bereits verglichen¹⁾ und nicht sehr verschieden gefunden. Die Wirkung im dritten Fall konnte früher nicht festgestellt werden, weil in den Carbonatgemischen niedriger Kohlensäurekonzentration, wohl infolge ihrer hohen OH-Ionenkonzentration, die Narkotica hemmungen vielfach irreversibel waren. Später zeigte sich, daß viele Narkotica auch in stark alkalischen Carbonatgemischen völlig reversibel hemmen, wenn man nicht bei 25°, sondern bei 10° arbeitet und die Versuche nicht länger als 2 Stunden ausdehnt. Die noch bestehende Lücke konnte somit ausgefüllt werden, indem die Wirkung des Phenylurethans bei Kohlensäurekonzentrationen von 76×10^{-6} Molen

Tabelle VIII.

10°. Hohe Intensität der Bestrahlung. 1 mm = 0,7 omm Sauerstoff.

Phenyl- Urethan- Gewichts- prozente	Phenyl- Urethan- Mole pro Liter	Beobachtete Druck- differenz Hell-Dunkel in mm in 60 Minuten *)		Assimilationshemmung in Prozenten	
		$c_{\text{CO}_2} =$ $0,44 \times 10^{-6}$	$c_{\text{CO}_2} =$ 76×10^{-6}	$c_{\text{CO}_2} =$ $0,44 \times 10^{-6}$	$c_{\text{CO}_2} =$ 76×10^{-6}
0	0	38	42		
0,002	$1,2 \times 10^{-4}$	26	24	21	37
0,004	$2,4 \times 10^{-4}$	21	17	36	46
0,008	$4,8 \times 10^{-4}$	18	9	46	65

¹⁾ Vgl. die I. Mitteilung.

²⁾ Da bei der hohen CO_2 -Konzentration die Assimilationsgeschwindigkeit etwa 7 mal so groß, wie bei der niedrigen CO_2 -Konzentration ist (vgl. Mitteil. I), so wurde, um in gleichen Versuchszeiten beobachten zu können, bei tiefer CO_2 -Konzentration mit etwa 7 mal so dichter Zell-suspension gearbeitet, wie bei hoher CO_2 -Konzentration.

pro Liter (85 Teile $\frac{m}{10}$ - NaHCO_3 und 15 Teile $\frac{m}{10}$ - Na_2CO_3) und $0,44 \times 10^{-6}$ Molen pro Liter (15 Teile $\frac{m}{10}$ - NaHCO_3 und 85 Teile $\frac{m}{10}$ - Na_2CO_3) verglichen wurde, unter intensiver Bestrahlung.

In Tabelle VIII ist eine derartige Beobachtungsreihe zusammengestellt. Sie zeigt, daß auch bei tiefsten Kohlensäurekonzentrationen Phenylurethan in ähnlicher Weise wie bei hohen Kohlensäurekonzentrationen wirkt.

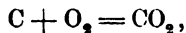
Es ist hieraus zu schließen, daß die Bindung der Kohlensäure eine Grenzflächenreaktion von ähnlicher Empfindlichkeit ist, wie die übrigen im Assimilationsmechanismus verketteten Vorgänge.

IV. Die Wirkung der Blausäure auf die Assimilation.

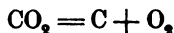
Unter bestimmten Bedingungen hemmt eine $\frac{n}{10000}$ -Blausäurelösung die Assimilation, die nach Entfernung der Blausäure wieder auf ihre normale Höhe steigt. Die Assimilation ist also gegenüber Blausäure recht empfindlich. Im Gegensatz hierzu wird die Sauerstoffatmung selbst durch die hundertfache Blausäurekonzentration, also eine $\frac{n}{100}$ -Lösung, zunächst nicht gehemmt, Sauerstoffaufnahme und Kohlensäureabgabe sind in derartigen Lösungen zunächst größer als in den blausäurefreien Kontrollösungen. Erst nach Stunden beginnt in den konzentrierten Blausäurelösungen ein hemmender Einfluß auf die Atmung merklich zu werden.

An diese Tatsachen, die in der vorhergehenden Arbeit mitgeteilt wurden, schließen die folgenden Versuche an, zu deren Verständnis eine Bemerkung über das Gaswechselgleichgewicht vorausgeschickt sei.

In einfachen Salzlösungen ist der respiratorische und assimilatorische Quotient für unser Versuchsobjekt nahezu gleich 1 Die Gleichung der Atmung kann somit summarisch

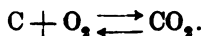


die Gleichung der Assimilation



geschrieben werden.

Bestrahlen wir, so erhalten wir nach der einfachsten Annahme die beiden Vorgänge



In einer CO-haltigen Flüssigkeit überwiegt, je nach der Intensität der Bestrahlung, der Vorgang von links nach rechts oder in umgekehrter Richtung, wird Sauerstoff von der Zelle aufgenommen oder Sauerstoff von der Zelle abgegeben. Bei einer bestimmten Intensität der Bestrahlung sind die Geschwindigkeiten der beiden entgegengesetzten Vorgänge gleich. Es herrscht „Gaswechselgleichgewicht“.

Diese einfache Auffassung ist wahrscheinlich insofern richtig, als die bestrahlte, ebenso wie die verdunkelte Zelle, Sauerstoff aufnimmt und als in der bestrahlten Zelle die Oxydation, thermodynamisch betrachtet, zur Oxydationsstufe der Kohlensäure führt. Die Auffassung ist insofern inkorrekt, als dieses Oxydationsprodukt nicht in allen Fällen Kohlensäure ist.

Der erste Punkt folgt daraus, daß die bestrahlte Zelle wächst, also Arbeit leistet; nichts berechtigt zu der Annahme, in der bestrahlten Zelle könne unter Umgehung der Atmung Wachstumsarbeit gewonnen werden.

Der zweite Punkt folgt aus der Bestrahlungskurve (Abszissen: Bestrahlungsintensitäten. Ordinaten: Geschwindigkeiten der Sauerstoffabspaltung), die im Punkte des Gaswechselgleichgewichts keinen Knick zeigt. Es bedarf mit andern Worten der gleichen Arbeit, um ein Mol veratmeten Sauerstoffs oder ein Mol Sauerstoff aus Kohlensäure abzuspalten.

Der dritte Punkt folgt aus den nachstehend beschriebenen Versuchen mit Blausäure hoher Konzentration.

a) Wirkung steigender Blausäurekonzentrationen bei hoher und konstanter Intensität der Bestrahlung.

Viele Stoffe hemmen die Assimilation völlig; es wird dann von der bestrahlten Zelle ebensoviel Sauerstoff absorbiert wie von der verdunkelten. Irgendeine Besonderheit von dem Zustand an, in dem die Sauerstoffproduktion = der Sauerstoffabsorption, der Sauerstoffwechsel also = Null ist, ist im allgemeinen nicht zu beobachten, wenn man steigende Konzentrationen eines hemmenden Stoffes einwirken läßt.

Auch in blausäurebeladenen Zellen wird zunächst die Sauerstoffproduktion nach Maßgabe der Cyanidkonzentration gehemmt. Ist jedoch der Zustand erreicht, in dem sich bei Bestrahlung Sauerstoffproduktion und Sauerstoffabsorption das Gleich-

gewicht halten und läßt man die Cyanidkonzentration weiter wachsen, so beobachtet man entweder keine oder nur eine sehr geringe Zunahme der Wirkung; das heißt, der Einfluß der Bestrahlung auf den veratmeten Sauerstoff wird auch durch große Cyanidmengen nur wenig gehemmt.

Um dieses Phänomen deutlich zur Anschauung zu bringen, arbeitet man am besten bei niedrigen CO₂-Konzentrationen, bei denen die Assimilation nicht allzugroß gegen die Atmung ist.

Die Zellen wurden in einem Carbonatgemisch von 15 Teilen $\frac{m}{10}$ -NaHCO₃ und 85 Teilen $\frac{m}{10}$ -Na₂CO₃ suspendiert und unter Zusatz steigender Cyanidmengen¹⁾ bei 10° bestrahlt.

Tabelle IX, in der einige Beobachtungen zusammengestellt sind, zeigt, daß die Sauerstoffproduktion schon durch kleine Cyanidkonzentrationen fast völlig gehemmt wird, daß aber,

Tabelle IX.

10° Hohe Bestrahlungsintensität. $c_{CO_2} = 0,4 \times 10^{-4}$
1 mm. = 0,7 omm Sauerstoff.

Nr. des Versuchs	Gesamtkonzentration an Cyanid ¹⁾	Beobachtete Druckänderung in mm in 60 Minuten		Druckdifferenz Hell-Dunkel
		dunkel	bestrahlt	
1	0	- 11	+ 13	24
	$0,8 \times 10^{-4}$	- 13	+ 3	16
	$0,8 \times 10^{-3}$	- 17	- 2	15
2	0	- 16	+ 8	24
	$0,4 \times 10^{-4}$	- 16	+ 3	19
	$0,8 \times 10^{-4}$	- 18	+ 1	19
	$0,8 \times 10^{-3}$	- 25	- 5	20

wenn die Sauerstoffproduktion gehemmt ist, eine weitere Steigerung der Cyanidkonzentration um das 10fache die Lichtwirkung

¹⁾ Die Außenkonzentration an freier HCN berechnet sich aus der H-Ionenkonzentration des Carbonatgemisches, die bei 18° = $2,8 \times 10^{-11}$ gefunden wurde und der Dissoziationskonstante der Blausäure $K_1 = 4,7 \times 10^{-10}$ für 18° zu $0,056 \times C$, wenn C die Gesamtkonzentration an Cyanid bedeutet. Die Konzentration der freien HCN in der Zelle ist hierdurch nicht gegeben, da die H-Ionenkonzentration in der Zelle unbekannt ist. Aus diesem letzteren Grunde ist es zunächst nicht möglich, die Wirkungstärke der Blausäure oder der Cyanidionen bei verschiedenen CO₂-Konzentrationen zu vergleichen.

nicht mehr wesentlich beeinträchtigt. Bei hohen Kohlensäurekonzentrationen, bei denen die Assimilation etwa das 20fache der Atmung beträgt, wird diese Erscheinung leicht übersehen; man kann hier die Assimilation durch Cyanid um 95%, hemmen, während man in den Beispielen unserer Tabelle nur bis zu einer Hemmung von 40% (Versuch 1) oder 20% (Versuch 2) kommt, je nach dem Verhältnis zwischen Assimilation und Atmung in der cyanidfreien Kontrolle.

b) Wirkung hoher Blausäurekonzentrationen bei verschiedener Intensität der Bestrahlung.

Als Lichtquelle diente eine $\frac{1}{3}$ -Wattlampe der Osramwerke, deren Stärke bei normaler Belastung in der Physikalisch-technischen Reichsanstalt zu 3500 Hefner-Kerzen bestimmt war. Durch Änderung der Entfernung zwischen Lichtquelle und Assimilationsgefäß (Anordnung III, Mitteilung I) wurden die Intensitäten der Bestrahlung um etwa das 40fache variiert.

Die Zellen waren in einem Carbonatgemisch von 85 Teilen $\frac{m}{10}$ -NaHCO₃ und 15 Teilen $\frac{m}{10}$ -Na₂CO₃ suspendiert, mit oder ohne Zusatz von Kaliumcyanid. Die Kohlensäurekonzentration war somit 91×10^{-6} oder sehr hoch; der Kohlensäuredruck wurde durch die „Pufferwirkung“ der Carbonate konstant gehalten, so daß die beobachteten Druckänderungen solche des Sauerstoffpartialdrucks waren. Unter Cyanidkonzentration ist die Gesamtkonzentration an Cyanid (Salz + Ionen + undissoziierte Blausäure) verstanden, die Konzentration der Blausäure ist nach der früher gegebenen Formel (Abschnitt VII, erste Mitteilung) berechenbar.

Gleiche Mengen gleichkonzentrierter Zellsuspensionen wurden in Assimilationsgefäße gleichen Rauminhalts und gleicher Form eingefüllt, so daß bei einer bestimmten Intensität der auffallenden Strahlung gleiche Energiemengen absorbiert wurden.

Die Bestrahlungsintensität, bei der Gaswechselgleichgewicht herrschte, wurde durch Vorversuche mit sehr dünnen Zellsuspensionen ermittelt und zu etwa 500 Lux gefunden. Die eigentlichen Versuche wurden dann, um größere Ausschläge zu erhalten, mit dichteren Zellsuspensionen ausgeführt; der Vorversuch gab die Sicherheit, daß bei der Intensität der einfallenden Strahlung entweder Gaswechselgleichgewicht herrschte

oder Sauerstoff von der Zelle aufgenommen wurde. Dieser Punkt ist wesentlich für die Reinheit der Versuchsanordnung.

Tabelle IXa.

25° C_{CO₂} = 91 × 10⁻⁶. 1 mm = 0,6 cmm Sauerstoff.

Nr. des Versuchs	Abstand der Lampe (3500 H. K.) vom Assimilations- gefäß in cm	Ungefähre Beleuchtungsstärke in Lux	Cyanidkonzentra- tion in Molen pro Liter	Dauer des Ver- suchs in Minuten	Abgelesene Druck- änderung Dunkelgefäß	Abgelesene Druck- änderung bestrahltes Gefäß	Unterhalb des Gaswechselgleichge- wichts in 30' abge- spaltener Sauerstoff in mm	Oberhalb des Gaswechselgleichge- wichts in 30' abge- spaltener Sauerstoff in mm
1	285	440	0	30	- 37	- 20	17	
	285	440	1/1000	30	- 49	- 31	18	
	43	19000	0	5	- 2 (+ 3)	+ 74		444
	43	19000	1/1000	30	- 46	+ 16		16
2	285	440	0	30	- 36	- 16	20	
	285	440	1/500	30	- 40	- 23	17	
	43	19000	0	5	- 2 (+ 3)	+ 80		480
	43	19000	1/500	30	- 46	+ 4		4
3	285	440	0	30	- 27	- 11	16	
	285	440	1/500	30	- 34	- 17	17	
	43	19000	0	5	- 2 (+ 3)	+ 49		294
	43	19000	1/500	30	- 29	- 2		0

Die Bestrahlungszeiten waren im allgemeinen 30 Minuten, für die blausäurefreie Kontrolle bei intensiver Bestrahlung 5 Minuten; im letzteren Fall war die Messung der Atmung naturgemäß ungenau. Um bei den kurzdauernden Versuchen die Induktionsperiode vor die Zeit der Messung zu legen, wurde der Versuch erst nach vorheriger 5 Minuten langer Bestrahlung begonnen.

Bei Blausäurekonzentrationen über $\frac{m}{300}$ pro Liter beginnt eine narkotische Wirkung bemerkbar zu werden; da die spezifische Blausäurewirkung dann verdeckt wird, so wurde diese Grenzkonzentration nicht überschritten.

Die Zahlen, die in Tabelle IXa zusammengestellt sind, zeigen, daß $\frac{n}{500}$ -Blausäurelösungen die Sauerstoffabspaltung aus Kohlensäure völlig hemmen, bei der hohen Bestrahlungsintensität von 19000 Lux ist die Zelle nicht mehr im-

stande, einen positiven Druck zu entwickeln. Gleichwohl spaltet eine bestimmte Menge Strahlung niedriger Intensität den veratmeten Sauerstoff aus blausäurebeladenen Zellen mit der gleichen Geschwindigkeit ab, wie aus blausäurefreien Zellen. Hohe Cyanidkonzentrationen lassen also den photochemischen Reaktionsmechanismus an sich — wie aus der Wirkung auf den in der Atmung gebundenen Sauerstoff hervorgeht — intakt, heben aber die photochemische Reaktionsfähigkeit der Kohlensäure auf.

c) $\frac{n}{10000}$ -Blausäurelösungen hemmen die Assimilation bei hoher Intensität der Bestrahlung, sind jedoch ohne Wirkung bei niedriger Intensität der Bestrahlung (Abschnitt VII, Mitteilung I). Nachdem sich in den Versuchen mit hohen Blausäurekonzentrationen gezeigt hatte, daß wir photochemische Vorgänge unterhalb und oberhalb des Gaswechselgleichgewichts zu unterscheiden haben, erschien es erwünscht, die Versuche mit niedrigen Blausäurekonzentrationen daraufhin nachzuprüfen, ob auch hier der Punkt des Gaswechselgleichgewichts das Gebiet der Wirkung von dem der Wirkungslosigkeit trennte. Ersieht man schon aus den früher mitgeteilten Zahlen, daß dies nicht der Fall ist, so gebe ich doch einen kürzlich zur Nachprüfung ausgeführten Versuch wieder, da es sich um eine für das Verständnis der Kohlensäureassimilation grundlegende Tatsache handelt.

Die Bestrahlungsintensität wurde so gewählt, daß in der blausäurefreien Kontrolle das Gaswechselgleichgewicht etwa um den Betrag der Atmung überschritten wurde, die Assimilation also etwa zur Hälfte in der Aufhebung der Atmung, zur Hälfte in Produktion von Sauerstoff aus Kohlensäure bestand.

Als Suspensionsflüssigkeit diente dasselbe Carbonatgemisch, wie in b, die Gesamtkonzentration an Cyanid war $\frac{n}{10000}$.

Aus Tabelle IXb geht hervor, daß eine $\frac{n}{10000}$ -Cyanidlösung, die bei hoher Bestrahlungsintensität um 65% hemmt, bei tiefer Bestrahlungsintensität wirkungslos ist; bei tiefer Bestrahlungsintensität sind die Ausschläge mit und ohne Cyanid 61, eine Zahl, die in beiden Fällen zu einem erheblichen Bruchteil Sauerstoffabspaltung aus Kohlensäure anzeigt. Dieser Bruchteil ist für die blausäurehaltige Zelle etwas kleiner, weil die Atmung durch Blausäure beschleunigt ist.

Tabelle IXb.

25°. C_{CO₂} = 91 × 10⁻⁶. 1 mm = 0,6 cmm Sauerstoff.

Abstand der Lampe (3500 H. K.) in cm	Ungefährer Beleuchtungsstärke in Lux	Cyanidkonzentration in Molen pro Liter	Dauer des Versuchs in Minuten	Abgelesene Druckänderung Dunkelgefäß	Abgelesene Druckänderung bestrahltes Gefäß	Druckdifferenz Heil-Dunkel	Assimilation in 30' in mm
142	1800	0	30	- 29	+ 32	61	61
142	1800	1/10000	30	- 39	+ 22	61	61
43	19000	0	5	- 4	+ 86	90	540
43	19000	1/10000	5	- 5	+ 27	32	192

Es ergibt sich somit, daß hier nicht diejenige Bestrahlungsintensität, bei der Gaswechselgleichgewicht herrscht, das Gebiet der Wirkung von dem der Wirkungslosigkeit trennt, sondern die kritische Bestrahlungsintensität liegt höher. In ⁿ/₁₀₀₀₀-Blausäurelösungen wird mit andern Worten Kohlensäure noch photochemisch gespalten; die Geschwindigkeit dieser Spaltung, die in maximo erreicht werden kann, ist jedoch gegenüber blausäurefreien Zellen herabgesetzt.

Zusammenfassung.

Blausäure hemmt die photochemische Sauerstoffabspaltung aus Kohlensäure, nicht aber die Sauerstoffabspaltung aus Zwischenprodukten der Atmung; denn bei völlig gehemmter Kohlensäurespaltung wird der veratmete Sauerstoff aus blausäurebeladenen Zellen mit der gleichen photochemischen Ausbeute abgespalten, wie aus blausäurefreien Zellen.

Sehen wir von der sehr unwahrscheinlichen Annahme ab, daß Blausäure den Eintritt der Kohlensäure in die Zelle verhindert, so folgt:

1. Kohlensäure wird in der bestrahlten grünen Zelle erst nach einer chemischen Umwandlung reduziert.

2. Die Wirkung der Blausäure auf die Assimilation besteht lediglich darin, daß sie diese Umwandlung hemmt; der photochemische Reduktionsmechanismus an sich wird durch Blausäure nicht beeinflußt.

3. Zwischenprodukte der Atmung können im Gegensatz zur Kohlensäure direkt photochemisch reduziert werden.

4. In der bestrahlten blausäurebeladenen Zelle entsteht keine Atmungskohlensäure.

V. Die assimilierende Zelle als Photolyt

Physikalisch-chemische Vorbemerkung. Wie bei der Elektrolyse sind bei der Photolyse¹⁾ primäre und sekundäre Reaktionen zu unterscheiden. Die Primärreaktion besteht stets in einer Veränderung des absorbierenden Moleküls, die Sekundärreaktionen spielen sich zwischen den photochemischen Primärprodukten untereinander oder zwischen diesen und anderen Bestandteilen des Photolyten ab.

Bei der Photolyse des Bromwasserstoffs²⁾ ist die Primärreaktion $HBr = Br + H$, sekundäre Reaktionen sind $H + HBr = H_2 + Br$, sowie $Br + Br = Br_2$. Bei der Photobromierung des Hexahydrobenzols³⁾ ist die Primärreaktion $Br_2 = Br + Br$, sekundär ist die Reaktion zwischen den freien Bromatomen untereinander und die Reaktion zwischen freien Bromatomen und dem Hexahydrobenzol.

Bestandteile des Photolyten, die mit den photochemischen Primärprodukten reagieren, nennt man Acceptoren. In dem Photolyten Brom + Hexahydrobenzol ist das Hexahydrobenzol der Acceptor.

Die Zahl n der bei Bestrahlung eines Photolyten primär umgewandelten Moleküle fand E. Warburg⁴⁾ in einigen Fällen, in Übereinstimmung mit Einsteins⁴⁾ photochemischem Äquivalentgesetz

$$= \frac{Q}{h\nu}$$

worin $h = 1,56 \times 10^{-24}$, wenn ν die Schwingungszahl der wirkenden Strahlung pro Sekunde, Q die absorbierte Strahlung in Grammcaldorien bedeutet.

Kinetik der Assimilation. Die Assimilation ist keine einfache Photolyse der Kohlensäure.

Der photochemische Primärvorgang, in dem Sauerstoff nicht abgespalten wird, besteht in einer Wirkung auf das Chlorophyllmolekül und führt zur Bildung des photochemischen Primär-

¹⁾ E. Warburg, „Über die Anwendung der Quantenhypothese auf die Photochemie“, Die Naturwissenschaften 1917, Heft 30.

²⁾ E. Warburg, Zusammenfassung in Zeitschr. f. Elektrochemie 26, 54, 1920.

³⁾ Nernst, Zeitschr. f. Elektrochemie 1918, 335.

⁴⁾ Einstein, Annal. d. Physik, 17, 132, 1905; 27, 832, 1912.

produkts. Die Bildungsgeschwindigkeit des photochemischen Primärprodukts ist der in der Zeiteinheit absorbierten Strahlung proportional. Die Konzentration des photochemischen Primärprodukts ist durch die Geschwindigkeit der Bildung und des Verbrauchs bestimmt.

Das photochemische Primärprodukt reagiert in Sekundärreaktionen mit dem Acceptor.

Acceptor ist nicht die Kohlensäure, sondern ein Kohlen säurederivat, das sich in der Zelle in einer Kette von chemischen Reaktionen bildet. Zu dem photochemischen Primärvorgang und den Sekundärreaktionen kommt so in der Zelle eine dritte Klasse von Reaktionen, die der Acceptorbildung. Die Acceptorbildung ist eine Folge freiwillig verlaufender Reaktionen, die ohne Bestrahlung durch Anhäufung der Endprodukte schnell zum Stillstand kommen. Bei Bestrahlung werden diese Endprodukte — die Acceptoren — in der Sekundärreaktion verbraucht, wobei das Dunkelgleichgewicht gestört wird.

Sowohl die Reaktionen, die zur Bildung des Acceptors führen, als auch die Reaktion des Acceptors mit dem photochemischen Primärprodukt sind Reaktionen an Oberflächen und in ihrem Ablauf außerordentlich empfindlich gegenüber Veränderungen des Oberflächenmilieus.

Im Gegensatz zu der Sekundärreaktion wird die Acceptorbildung durch kleine Blausäuremengen gehemmt. Da die Blausäurewirkung wahrscheinlich in einer Überführung von Schwermetallen aus einer wirksamen Form in unwirksame Komplexverbindungen besteht, so ist bei der Acceptorbildung an die Mitwirkung eines Schwermetalls zu denken.

Alle Beeinflussungen der Assimilation in der lebenden Zelle betreffen die Acceptorbildung oder Sekundärreaktionen, eine Beeinflussung der Primärreaktion in der lebenden Zelle dürfte bis jetzt noch nicht beobachtet sein.

Wollte man nach dieser Auffassung eine photochemische Reaktion *in vitro*, etwa die Photochlorierung des Benzols, dem Assimilationsvorgang ähnlich leiten, so würde man das Chlor in der wäßrigen Phase eines heterogenen Systems lösen, in diesem das Benzol in einer Grenzflächenreaktion entstehen lassen und die bei Belichtung gebildeten Chloratome an den Grenzflächen mit dem Benzol zur Reaktion bringen. In diesem

Modell wäre die photochemische Primärreaktion die Spaltung der Chlormoleküle in Chloratome, die Acceptorbildung die Entstehung des Benzols; die Sekundärreaktionen beständen, je nach der Bestrahlungsintensität und der Geschwindigkeit der Benzolbildung, vorwiegend in der Chlorierung des Benzols durch freie Chloratome oder in der Wiedervereinigung der durch Bestrahlung gebildeten Chloratome zu Chlormolekülen.

Fehlt es in dem Modell an Acceptor, so gehen die primär gebildeten freien Chloratome wieder zu Chlormolekülen zusammen oder die Menge des lichtabsorbierenden Stoffes, des Chlors, bleibt konstant. Bei Gegenwart des Acceptors nimmt die Menge des lichtabsorbierenden Stoffes in dem Photolyten ab, indem Chlor in das Benzolmolekül eintritt. Bei der Assimilation bleibt die Menge des lichtabsorbierenden Stoffes, des Chlorophylls, in beiden Fällen, bei Gegenwart und bei Abwesenheit des Acceptors, konstant, wie aus Willstaetter's¹⁾ Chlorophyllbestimmungen vor und nach Bestrahlung folgt. Das Modell unterscheidet sich in diesem wesentlichen Punkt von der lebenden Zelle.

Alle den Primärvorgang betreffenden Hypothesen haben zu berücksichtigen, daß die Bilanz des Assimilationsprozesses $\text{CO}_2 = \text{C} + \text{O}_2$ ist, andere Spaltungen somit im Kreislauf des Assimilationsprozesses wieder rückgängig gemacht werden und in der Summe der Reaktionsgleichungen verschwinden müssen.

Der Primärvorgang. Bestrahlt man eine Zelle mit konstanter Intensität, so wird im photochemischen Primärvorgang in gleichen Zeiten die gleiche Anzahl von Molekülen verändert; gleichwohl ist die Sauerstoffentwicklung, wenn nach Verdunkelung mit konstanter Intensität bestrahlt wird, zunächst klein und steigt erst allmählich zu einem konstanten Endwert an. Diese Erscheinung kann nicht so gedeutet werden, daß sich in der Dunkelperiode Stoffe anhäufen, die den bei Bestrahlung gebildeten Sauerstoff, etwa in *statu nascendi*, zunächst wegfangen; in diesem Fall müßte die Induktionsperiode um so länger sein, je niedriger die Bestrahlungsintensität, während die tatsächlichen Verhältnisse umgekehrt liegen. Vielmehr folgt aus den Beobachtungen über die Induktion, 1) daß

¹⁾ loc. cit.

in dem Primärvorgang kein Sauerstoff abgespalten wird, und 2) daß in dem Primärvorgang keine Stoffe entstehen, die freiwillig (in Dunkelreaktionen) Sauerstoff abspalten. Auch der zweite Punkt ist wichtig; er ergibt sich aus der Anlage der Induktionsversuche, in denen die Lichtwirkung stets nach Verdunkelung, nachdem die Druckdifferenz zwischen dem bestrahlten Gefäß und der Dunkelkontrolle konstant geworden war, abgelesen wurde.

Punkte 1 und 2 sind das einzig Sichere, was sich über den Primärvorgang aussagen läßt; sie machen es wahrscheinlich, daß der Primärvorgang nicht das Kohlensäuremolekül betrifft.

Die Möglichkeit, an eine primäre photochemische Veränderung der Kohlensäure zu denken, war durch eine Beobachtung Willstätters gegeben, nach der sich die Kohlensäure unter gewissen Bedingungen in vitro an das Chlorophyllmolekül anlagert. Andererseits war die quantentheoretische Betrachtungsweise von vornherein der Annahme einer primären Lichtwirkung auf das Kohlensäuremolekül nicht günstig. Nach Einstein¹⁾ wird von einem absorbierenden Molekül stets nur ein Elementarquantum Strahlung aufgenommen; bezeichnen wir das Elementarquantum der wirksamen Strahlung mit $h\nu$, so ist Bedingung für die Zersetzung, worauf E. Warburg²⁾ zuerst aufmerksam machte, $h\nu > \frac{A}{N_0}$; hier bedeutet A die Arbeit, deren es zur Zersetzung eines Grammmoleküls bei der Versuchstemperatur bedarf, N_0 die Avogadro'sche Zahl.

$h\nu$ ist für die assimilatorisch wirkende Wellenlänge $0,77 \mu = 5,99 \times 10^{-20}$.

$\frac{A}{N_0}$ ist für CO₂ = C + O₂ bei Zimmertemperatur³⁾ = $\frac{98000}{6,17 \times 10^{23}} = 15,9 \times 10^{-20}$

für CO₂ = CO + $\frac{1}{2}$ O₂ „ „ „ „ ³⁾ = $\frac{66600}{6,17 \times 10^{23}} = 10,8 \times 10^{-20}$

Die Bedingung $h\nu > \frac{A}{N_0}$ ist also nicht erfüllt oder die beiden einfachen Vorgänge CO₂ = C + O₂ und 2CO₂ = 2CO + O₂ wären als photochemische Primärreaktionen auszuschließen.

Acceptorbildung. Von bestimmten hohen CO₂-Konzentrationen und Bestrahlungsintensitäten an läßt sich die Geschwindigkeit der Assimilation weder durch Erhöhung der CO₂-Konzentration noch durch Erhöhung der Bestrahlungsintensität steigern; unter diesen Bedingungen entspricht einer Tempera-

¹⁾ loc. cit.

²⁾ Sitzungsber. d. Preuß. Akad. d. Wiss., Physik.-mathem. Klasse, 1914, 884.

³⁾ F. Pollitzer, Berechnung chemischer Affinitäten. Stuttgart, 1912.

tursteigerung von 15° auf 25° etwa eine Verdoppelung der Assimilationsgeschwindigkeit. Mit diesen von Blackman¹⁾ gefundenen Tatsachen beginnt die physikalisch-chemische Aufklärung der Assimilation; sie zeigen, daß im Mechanismus der Kohlensäurereduktion eine langsam verlaufende chemische Reaktion eine Rolle spielt.

Es war ein Fortschritt gegenüber früheren Versuchen, daß wir mit isolierten, sehr kleinen Zellen arbeiteten; dank des kurzen Diffusionsweges von der Außenfläche der Zelle bis zu den Reaktionsorten war hier die Nachdiffusion der Kohlensäure, auch bei den niedrigsten Kohlensäurekonzentrationen, als geschwindigkeitsbestimmender Faktor ausgeschaltet. In allen folgenden Überlegungen können wir somit von der Nachdiffusion der Kohlensäure absehen (Abschnitt III, erste Mitteilung).

Der Theorie der Acceptorbildung stelle ich die Tatsachen, auf denen sie beruht, voran. Sie beziehen sich sämtlich auf hohe Intensitäten der Bestrahlung.

1. Nachweis einer chemischen Bindung der Kohlensäure im Mechanismus der Assimilation: Bei niedrigen Kohlensäurekonzentrationen, bei denen die Assimilationsgeschwindigkeit proportional der Kohlensäurekonzentration wächst, entspricht einer Temperaturerhöhung von 5° auf 10° etwa eine Verdopplung der Geschwindigkeit. Für ein Intervall von 10° berechnet sich der hohe, zweifellos „chemische“ Koeffizient von 5 (Abschnitt V, erste Mitteilung).

2. Derselbe Nachweis von anderer Seite: In der bestrahlten blausäurebeladenen Zelle kann Kohlensäure nicht reduziert werden, während der photochemische Reduktionsmechanismus andern Stoffen gegenüber intakt ist (Abschnitt IV, diese Mitteilung).

3. Nachweis einer chemischen Reaktion, deren Geschwindigkeit von der Konzentration der Kohlensäure unabhängig ist: Neben den erwähnten Versuchen Blackmans der Erfolg intermittierender Bestrahlung kurzer Periodendauer. Eine bestimmte Menge absorbierter Strahlung zersetzt mehr Kohlensäure, wenn die Bestrahlung durch kurze Dunkelperioden unterbrochen wird, als bei kontinuierlicher Einwirkung; dies bei hohen

¹⁾ Optima and limiting Factors, *Annals of Botany* 19, 281, 1905.

Kohlensäurekonzentrationen, deren Steigerung die Assimilation nicht beschleunigt (Abschnitt VI, erste Mitteilung).

4. Trägt man die Kohlensäurekonzentrationen als Abszissen, die Geschwindigkeiten der Kohlensäurespaltung als Ordinaten auf, so erhält man eine Kurve, die zunächst geradlinig ansteigt, sich dann allmählich zur Abszissenachse krümmt und schließlich der Abszissenachse parallel wird (Abschnitt III, erste Mitteilung).

Gehen wir von der Form der Kurve aus, so macht sie es wahrscheinlich, daß die beiden im Mechanismus der Assimilation nachgewiesenen Reaktionen in direktem Zusammenhang stehen, sei es, daß auf eine schnell bis zu einem Gleichgewicht (Dissoziationsgleichgewicht) verlaufende Reaktion eine langsame folgt, sei es, daß wir es mit zwei langsam verlaufenden gekoppelten Reaktionen zu tun haben. Ohne zwischen diesen beiden Möglichkeiten schon jetzt eine Entscheidung treffen zu wollen, gebe ich zunächst der zweiten Auffassung den Vorzug, weil die Assimilationsgeschwindigkeit durch einige Stoffe in dem Anfangsteil und dem Endteil der Kurve in verschiedener Weise beeinflusst wird. Wir nehmen also zwei langsam verlaufende gekoppelte Reaktionen an; in diesen soll die Kohlensäure unter intermediärer Bindung an einen Zellbestandteil chemisch verändert werden, das entstehende Endprodukt sei der photochemische Acceptor der Kohlensäureassimilation.

Bezeichnen wir die Gesamtmenge des wirksamen Zellbestandteils mit B , seine jeweilige Menge in freiem Zustand mit x , so ist die in gebundenem Zustand vorhandene Menge $= B - x$. Für die Geschwindigkeiten v_1 und v_2 der gekoppelten Reaktionen erhalten wir im einfachsten Fall

$$v_1 = c_{CO_2} \cdot x k_1 \quad \dots \dots \dots (1)$$

$$v_2 = (B - x) k_2 \quad \dots \dots \dots (2)$$

wo k_1 und k_2 chemische Geschwindigkeitskonstanten bedeuten. Im stationären Zustand ist $v_1 = v_2$, folglich

$$c_{CO_2} x k_1 = (B - x) k_2 \quad \dots \dots \dots (3)$$

Aus (1) und (3) ergibt sich nach Elimination von x die Geschwindigkeit der Assimilation im stationären Zustand

$$v = c_{CO_2} k_1 \frac{B \cdot k_2}{c_{CO_2} k_1 + k_2} \quad \dots \dots \dots (4)$$

eine Gleichung, die die beobachtete Abhängigkeit der Assimilationsgeschwindigkeit von der CO_2 -Konzentration befriedigend wiedergibt. Für kleine Werte von c_{CO_2} wird

$$v = c_{\text{CO}_2} B k_1 \dots \dots \dots (5)$$

oder proportional der CO_2 -Konzentration, für große Werte von c_{CO_2} wird

$$v = B k_2$$

oder unabhängig von der CO_2 -Konzentration.

Es bestimmen also, je nachdem c_{CO_2} groß oder klein ist, verschiedene Reaktionen die Geschwindigkeit der Assimilation.

Sekundärreaktion und Acceptorbildung. Wie in dem Modell der Photochlorierung je nach der Intensität der Bestrahlung die Acceptorbildung oder die Reaktion zwischen Acceptor und freien Chloratomen die Geschwindigkeit der Chlorierung bestimmt, so ist für die Geschwindigkeit der Assimilation bei hoher Intensität der Bestrahlung die Acceptorbildung, bei niedriger Intensität der Bestrahlung die Reaktion zwischen Acceptor und photochemischem Primärprodukt maßgebend.

Die Grundlage dieser Theorie bilden folgende Tatsachen, die sich sämtlich auf hohe CO_2 -Konzentration beziehen:

1. Läßt man bei hoher konstanter Kohlensäurekonzentration die Bestrahlungsintensität wachsen, so steigt die Kurve (Abszissen: Bestrahlungsintensitäten, Ordinaten: Assimilationsgeschwindigkeiten) zunächst geradlinig, krümmt sich dann allmählich zur Abszissenachse und wird schließlich dieser parallel. (Abschnitt IV, erste Mitteilung).

2. Oberflächenaktive Stoffe hemmen die Assimilationsgeschwindigkeit in dem geraden Anfangsteil der Kurve, also bei sehr niedrigen Intensitäten der Bestrahlung; da diese Stoffe die Absorption nicht verändern, so folgt, daß hier nicht nur die Lichtabsorption oder — was dasselbe besagt — der photochemische Primärvorgang für die Geschwindigkeit der Assimilation maßgebend sind, sondern außerdem noch ein chemischer Vorgang an Grenzflächen. (Abschnitt VII, erste Mitteilung.)

3. Hemmt eine bestimmte Blausäurekonzentration die Assimilationsgeschwindigkeit bei intensiver Bestrahlung um 50%, so ist die gleiche Blausäurekonzentration bei schwacher Bestrahlung wirkungslos. Im Verein mit 2. folgt hieraus, daß

bei hohen und tiefen Bestrahlungsintensitäten verschiedene chemische Vorgänge die Geschwindigkeit der Assimilation bestimmen. (Abschnitt III, diese Mitteilung.)

4. Aus den Versuchen mit intermittierender Bestrahlung ergibt sich, daß nach intensiver Bestrahlung Teilvorgänge der Assimilation im Dunkeln noch weitergehen. Ohne Bestrahlung nimmt die Geschwindigkeit dieser Vorgänge im Lauf einer $\frac{1}{100}$ Sekunde schon merklich ab und wird bei längerer Dauer der Dunkelperioden sehr klein. Bei Unterbrechung der Bestrahlung kommt es also schnell zur Einstellung von „Dunkelgleichgewichten (Abschnitt VI, erste Mitteilung).

Bezeichnen wir mit c_A die Konzentration des Acceptors, mit c_i die Konzentration des photochemischen Primärprodukts, die bei niedriger der Bestrahlungsintensität dieser proportional sein soll, so ist die Geschwindigkeit der Assimilation im einfachsten Fall

$$v = c_A c_i k_3 \dots \dots \dots (7)$$

worin k_3 eine chemische Geschwindigkeitskonstante bedeutet.

Der Acceptor bilde sich bei konstanter CO₂-Konzentration mit der konstanten Geschwindigkeit K , die Acceptorbildung sei eine umkehrbare Reaktion, die schon bei kleinen Acceptorkonzentrationen zum Stillstand komme. Wir erhalten dann zunächst ohne Bestrahlung

$$\frac{d c_A}{d t} = K - c_A k_4 \dots \dots \dots (8)$$

oder im „Dunkelgleichgewicht“

$$K = c_A' k_4 \quad \left(\frac{d c_A}{d t} = 0 \right)$$

$$c_A' = \frac{K}{k_4} \dots \dots \dots (9)$$

wenn wir mit c_A' die Acceptorkonzentration im Dunkelgleichgewicht bezeichnen.

Bei Bestrahlung (aus 7 und 8)

$$\frac{d c_A}{d t} = K - c_A k_4 - c_A c_i k_3$$

Im stationären Zustand

$$K = c_A k_4 + c_A c_i k_3 \quad \left(\frac{d c_A}{d t} = 0 \right)$$

$$c_A = \frac{K}{c_i k_3 + k_4} \dots \dots \dots (10)$$

Aus (7) und (10)

$$v = c_i k_3 \frac{K}{c_i k_3 + k_4} \dots \dots \dots (11)$$

eine Gleichung, die das Abhängigkeitsverhältnis zwischen Assimilationsgeschwindigkeit und Bestrahlungsintensität befriedigend wiedergibt. Für kleine Werte von c_i wird

$$v = c_i k_3 \frac{K}{k_4}$$

oder, indem wir $\frac{K}{k_4} = c'_A$ = der Acceptorkonzentration im Dunkelgleichgewicht (Gleichung 9) setzen

$$v = c_i c'_A k_3 \dots \dots \dots (12)$$

das heißt, die Assimilationsgeschwindigkeit ist proportional c_i oder der Intensität der Bestrahlung.

Für große Werte von c_i wird

$$v = K \dots \dots \dots (13)$$

oder unabhängig von der Intensität der Bestrahlung

Diese Auffassung macht es verständlich, daß die Assimilation bei tiefen und hohen Bestrahlungsintensitäten in verschiedener Weise beeinflußt werden kann, indem im ersten Fall die Sekundärreaktion, im zweiten Fall die Acceptorbildung der maßgebende Vorgang ist.

VI. Reduktion der Salpetersäure in der lebenden Zelle.

Nach der im vorhergehenden Abschnitt entwickelten Auffassung ist die Reduktion der Kohlensäure in der bestrahlten grünen Zelle ein sekundärer Vorgang, während der photochemische Primärvorgang, gleichgültig, ob Kohlensäure vorhanden ist oder nicht, in dem bestrahlten Chlorophyllkorn stets derselbe ist. Trifft diese Auffassung zu, so ist zu erwarten, daß bei Bestrahlung nicht nur Kohlensäure, sondern auch andere Stoffe reduziert werden. Von diesem Gesichtspunkt aus wurde eine Reihe sauerstoffreicher organischer und anorganischer Substanzen, unter Ausschluß von Kohlensäure, geprüft.

Bestrahlt man in dem Assimilationsgefäß eine mit Luft gesättigte Zellsuspension, wobei die Suspensionsflüssigkeit etwa

eine $\frac{1}{10}$ -NaCl-Lösung sei, so werden zunächst die kleinen Kohlensäuremengen, die in dem Gasraum, der NaCl-Lösung und der Zelle selbst enthalten sind, in Sauerstoff umgewandelt, ein Vorgang, der in dem angeschlossenen Manometer zum Auftreten eines positiven Drucks führt. Bei geeigneten Abmessungen der Zellmengen, der Gas- und Flüssigkeiteräume, sowie bei hohen Bestrahlungsintensitäten sind diese kleinen Kohlensäuremengen schnell umgewandelt, und man beobachtet nun weiterhin eine ganz geringfügige Sauerstoffentwicklung, die wir als „Restassimilation“ bezeichnen wollen und die, solange die Zelle am Leben ist, nie völlig erlischt.

Neben der Restassimilation bewirkt Bestrahlung die Aufhebung der Atmung; nach der alten Auffassung, indem die Atmungskohlensäure in Sauerstoff und Kohlenstoffhydrat zurückverwandelt wird, nach Abschnitt IV vielleicht in anderer Weise. Diese zweite Wirkung der Bestrahlung führt in dem angeschlossenen Manometer zu keiner Druckänderung, bei einem respiratorischen Quotienten von 1 wird der in der Atmung verbrauchte Sauerstoff quantitativ an den Gasraum wieder abgegeben.

Entsprechend diesen Überlegungen waren die Versuche so angeordnet, daß zwei Assimilationsgefäße mit gleichen Mengen luftgesättigter Zellsuspension beschiikt und mit etwa 10000 Lux bestrahlt wurden; die Suspensionsflüssigkeit in dem einen Assimilationsgefäß war eine indifferente Lösung, etwa eine $\frac{1}{10}$ -Natriumchlorid- oder Kaliumphosphatlösung, die Suspensionsflüssigkeit in dem zweiten Gefäß enthielt die zu prüfende Substanz, deren Reduktion durch eine Mehrausscheidung von Sauerstoff angezeigt werden mußte.

Bei derartigen Versuchen ergab sich zunächst, daß in einer Natriumnitratlösung stets mehr Sauerstoff im Gasraum erschien als in Chlorid-, Sulfat- oder Phosphatlösungen. Die Ausschläge waren jedoch nicht so groß, daß mit Sicherheit auf eine Abspaltung von Sauerstoff aus Nitrat geschlossen werden konnte. Ähnlich geringe Ausschläge, wie mit Nitrat, wurden mit verdünnten Lösungen freier Salpetersäure erhalten. Sehr erheblich wurde die Sauerstoffabscheidung jedoch, als die freie Salpetersäure nicht in Wasser, sondern in $\frac{1}{10}$ -Natriumnitrat

gelöst wurde, wahrscheinlich, weil nicht die Ionen, sondern nur die undissoziierten Säuremoleküle mit einiger Geschwindigkeit in die Zelle eindringen. In $\frac{1}{100}$ -Salpetersäure-, $\frac{1}{10}$ -Natriumnitratlösungen war die Reduktion so lebhaft, daß in 8 Stunden bei 25° etwa 10% des Trockengewichts der Zelle an Sauerstoff abgeschieden wurde. Hierbei blieb die Zelle völlig grün, teilungsfähig und von unverändertem Assimilationsvermögen gegenüber Kohlensäure. Die Herkunft des Sauerstoffs aus Zellbestandteilen erscheint demnach ausgeschlossen. Bei längerer Versuchsdauer ging die Zelle allmählich unter Verfärbung zugrunde.

Die Wirkung auf die Sauerstoffabscheidung sank nur un erheblich, wenn die kurzwelligen Strahlen durch eine Rotzscheibe aus dem Licht der Metallfadenlampe fortgenommen wurden.

Mit der Sauerstoffabspaltung aus der Salpetersäure ist eine Ammoniakabscheidung in die umgebende Flüssigkeit verbunden, wobei jedoch weniger Ammoniak erscheint, als sich, unter Annahme einer quantitativen Reduktion der Salpetersäure zu Ammoniak, aus der Menge des abgespaltenen Sauerstoffs berechnet.

Was den Reaktionsverlauf anbetrifft, so ist es zweifelhaft, ob die Salpetersäure direkt reduziert wird, oder ob sie zunächst in einer durch Bestrahlung beschleunigten Reaktion mit Zellbestandteilen unter Kohlensäurebildung reagiert und die Sauerstoffabspaltung dann auf dem normalen Wege der Kohlensäureassimilation erfolgt. Mit der letzteren Möglichkeit muß gerechnet werden, weil in den salpetersauren Lösungen ohne Bestrahlung stets Kohlensäure abgeschieden wird, deren Sauerstoff wahrscheinlich aus der Salpetersäure stammt, allerdings in sehr viel kleineren Mengen, als es die bei Bestrahlung abgeschiedenen Sauerstoffmengen sind. Die Entscheidung dieser Frage, die nicht ganz einfach ist, muß einer folgenden Mitteilung über Nitratassimilation vorbehalten bleiben,

Einige Beobachtungen über die Sauerstoffabscheidung der bestrahlten Zellen bei Ausschluß von Kohlensäure, in salpetersäurehaltigen und salpetersäurefreien Lösungen, seien schließlich in Tabelle X wiedergegeben.

Tabelle X

25°. Ca. 10000 Lux. 1 mm = 0,88 cmm Sauerstoff.

Nr. des Versuchs	Suspensionsflüssigkeit	Versuchszeit	Beobachtete Druckänderung in mm	Bemerkungen	
1	$\frac{=}{10}\text{-KH}_2\text{PO}_4$	30'	+ 12		
		30'	+ 8		
		30'	+ 3		
	$\frac{=}{10}\text{-NaNO}_3$ $\frac{=}{100}\text{-HNO}_3$ }	30'	+ 101		
		30'	+ 100		
		30'	+ 82		
2	$\frac{=}{10}\text{-KH}_2\text{PO}_4$	30'	+ 8		
		30'	+ 5		
		30' ¹⁾	+ 2		
	$\frac{=}{10}\text{-NaNO}_3$ $\frac{=}{100}\text{-HNO}_3$ }	30'	+ 111		
		30'	+ 115		
		30' ¹⁾	+ 72		
3	$\frac{=}{10}\text{-KH}_2\text{PO}_4$	30'	+ 3		
		30'	+ 3		
	$\frac{=}{10}\text{-NaNO}_3$ $\frac{=}{100}\text{-HNO}_3$ }	30'	+ 57		Mit Rotscheibe ²⁾
		30'	+ 61		Ohne Rotscheibe
4	$\frac{=}{10}\text{-NaCl}$	100'	+ 30		
	$\frac{=}{10}\text{-NaCl}, \frac{=}{100}\text{-HCl}$	100'	+ 37		
	$\frac{=}{10}\text{-NaCl}, \frac{=}{100}\text{-HCl}$	100'	+ 36		
	$\frac{=}{10}\text{-NaNO}_3, \frac{=}{100}\text{-HNO}_3$	100'	+ 510		

¹⁾ Nach dazwischen liegender 5 stündiger Bestrahlung.²⁾ Rotfilter von Schott & Gen., Jena, F 4512, 1 mm dick, praktisch undurchlässig für Wellenlängen unter 610 $\mu\mu$.

Herrn Erwin Negelein spreche ich auch hier für seine
Mitarbeit meinen Dank aus.

Zur Kenntnis der alkaloidischen Bestandteile der Reiskleie.

Von
Franz Hofmeister.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

(Eingegangen am 8. Januar 1920.)

Die ausschließliche Zufuhr von geschliffenem Reis führt bei Vögeln, wie zuerst Eijkman gezeigt hat, zu einer der Beriberi entsprechenden tödlichen Erkrankung. Durch Beifügung von sehr kleinen Mengen bestimmter Extrakte aus Reiskleie, Hefe, Adzukibohnen usw. gelingt es, das Auftreten der Erkrankung zu verhüten, beziehungsweise die hervorgegerufenen Krankheitserscheinungen in überraschend kurzer Zeit zum Verschwinden zu bringen. Den dabei wirksamen, die nervösen Symptome in auffälliger Weise beeinflussenden, aber sonst wenig bekannten Bestandteil hat man als antineuritische Prinzip (auch Beriberivitamin, Antineuritin, Eutonin) bezeichnet.

Begreiflicherweise ist die chemische Natur dieses Bestandteils Gegenstand eifrigster Forschung, ohne daß es bisher gelungen wäre, zu einer befriedigenden Charakterisierung zu gelangen. Ja es kann noch fraglich erscheinen, ob es sich bei dem verschiedenen Ausgangsmaterial um denselben wirksamen Stoff handelt.

In bezug auf das Antineuritin der Reiskleie liegen ausführlichere Angaben einerseits von Casimir Funk, andererseits von Suzuki, Shimamura und Otake vor.

Funk¹⁾ stellte aus den sauren alkoholischen Auszügen der Reiskleie durch Fällung mit Phosphorwolframsäure, Zerlegung des Niederschlags mit Baryt, Fällung der wäßrigen Lösung mit Silbernitrat und

¹⁾ Funk, Die Vitamine. Wiesbaden 1914. S. 80.

Barythydrat nach der von Kossel zur Isolierung des Histidins benutzten Methode einen alkaloidähnlichen Stoff dar, der in Dosen von 4 bis 5 mg bei Tauben ausgesprochene antineuritische Wirkung besaß. Die Analyse der möglichst rein dargestellten Substanz ergab zunächst Werte, die der Formel $C_{20}H_{20}N_2O_6$ entsprachen. Indes stellte sich bei weiterer Untersuchung heraus, daß die analysierten Präparate der Hauptsache nach aus Nicotinsäure ($C_6H_5NO_2$) bestanden. Ob die Eigenschaften, die Funk seinem „Vitamin“ zuschreibt, auch dem eigentlich wirksamen Stoff zukommen, bleibt danach zweifelhaft.

Suzuki, Shimamura und Otake¹⁾ erhielten durch Fällung von Reiskleieextrakt mit Phosphorwolframsäure, Pikrinsäure oder Gerbsäure sehr wirksame Präparate. Sie isolierten daraus als Pikrat einen Oryzamin genannten Körper, den sie für das wirksame Prinzip ansahen. Eine Analyse konnte der geringen Ausbeute wegen nicht ausgeführt werden. Bei der Hydrolyse des nicht ganz reinen Produkts wurden zwei krystallisierende Säuren $C_{12}H_{12}N_2O_6$ und $C_{10}H_8NO_4$, neben Cholin, Traubenzucker und Nicotinsäure erhalten.

So viel geht aus diesen Befunden hervor, daß das Antineuritin alkaloidische Natur besitzt oder doch in den Alkaloidfraktionen erhalten wird. Daß eine befriedigende Charakterisierung nicht erzielt wurde, lag anscheinend an der überaus geringen Ausbeute. So erhielt Funk aus 380 kg Reiskleie schließlich nur 2,5 g noch unreines „Vitamin“. Dabei war in allen bisher vorliegenden Versuchen die Wirkung der möglichst gereinigten Substanz sehr viel schwächer als jene des entsprechenden Ausgangsmaterials.

Zur Erklärung dieses Verhaltens hat man verschiedene Momente herangezogen. Einmal gelingt die Extraktion des Antineuritins aus dem Ausgangsmaterial nur unvollständig. Vermutlich ist es darin zum Teil in Form einer den Extraktionsmitteln nicht zugänglichen Vorstufe — Schaumann vermutet ein Phosphatid — enthalten. Sodann haftet es Niederschlägen verschiedener Art (doch nicht allen) durch Adsorption hartnäckig an (Chamberlain und Vedder²⁾, Cooper³⁾, Seidell⁴⁾, Voegtlin und Seidell⁵⁾, Harden und Zilva⁶⁾). Die Wirk-

¹⁾ Suzuki, Shimamura und Otake, diese Zeitschr. 48, 89, 1912.

²⁾ Chamberlain and Vedder, Philipp. Journ. of Science 6, 251, 1911.

³⁾ E. A. Cooper, Biochem. Journ. 7, 268, 1918.

⁴⁾ Seidell, U. S. A. Public Health Reports 31, 366, 1916.

⁵⁾ Voegtlin and Seidell, Journ. of Biol. Chemistry 26, 431, 1916.

⁶⁾ Harden and Zilva, Biochemical Journ. 12, 93, 1918.

samkeit aus den Extrakten sich abscheidender Stoffe könnte sonach von anhaftendem Antineuritin bedingt sein und beim Reinigen, z. B. durch Umkrystallisieren, verloren gehen. Endlich ist daran zu denken, daß das Antineuritin bei den unvermeidlichen chemischen Prozeduren in eine unwirksame Form übergehen kann. In der Tat verliert es mehrfachen Angaben zufolge in neutraler Lösung, beim Erhitzen auf 130°, in alkalischer Lösung schon beim Stehen in der Kälte seine Wirkung.

Bei einer in Gemeinschaft mit Dr. Masahiko Tanaka ausgeführten Untersuchung, die auf die chemische Charakterisierung des Antineuritins gerichtet war, hatten wir reichlich Gelegenheit, diese Schwierigkeiten kennen und überwinden zu lernen. Leider setzte bei Kriegsausbruch die Internierung meines vortrefflichen, unermüdlichen Mitarbeiters, das Verbot, im Festungsbereich die geeigneten Versuchstiere (Tauben) zu halten, später die Unmöglichkeit, Reiskleie und polierten Reis in genügender Menge zu beschaffen, der Unterwuchung ein vorzeitiges Ende. Da inzwischen durch den Übergang Straßburgs in französische Hände sehr fraglich geworden ist, ob wir wieder in die Lage kommen, die abgebrochene Arbeit gemeinsam weiterzuführen, erlaube ich mir, vorläufig ein Teilergebnis, die Isolierung eines der wirksamen Substanz nahestehenden Körpers mitzuteilen.

Als Ausgangsmaterial diente käufliches Reisfutttermehl¹⁾. Aus diesem wurden durch Extraktions- und Fällungsmittel verschiedene Extrakte und Präparate dargestellt, deren Wirksamkeit in Hunderten von Versuchen durch Darreichung an mit poliertem Reis gefütterte und ausgesprochene Beriberisymptome darbietende Tauben geprüft wurde. Als den wirksamen Bestandteil enthaltend wurden nur jene Präparate angesprochen, die in kleinen, meist 5 bis 10 mg nicht übersteigenden Dosen die Krankheitssymptome binnen 24 Stunden und für 8 bis 10 Tage — trotz Fortdauer der Ernährung mit poliertem Reis — zum Verschwinden brachten²⁾.

¹⁾ Bezogen von der Reis- und Handels-Aktiengesellschaft in Bremen.

²⁾ Näheres über die bei solchen Versuchen einzuhaltenden Bedingungen vgl. meine zusammenfassende Darstellung „Über qualitativ unzureichende Ernährung“ in den „Ergebnissen der Physiologie“, herausgegeben von Asher und Spiro, 16. Jahrg. S. 521, 524, 573. Hier auch die einschlägige, mir bis Ende 1917 zugängliche Literatur.

In Verfolgung dieses mühevollen Weges gelangten wir zur Isolierung eines alkaloidischen Körpers, den ich vorläufig Oridin nennen will. Nach Darstellung und Wirkungsweise hatten wir die längste Zeit Grund, diesen Körper für das gesuchte anti-neuritische Prinzip zu halten, bis sich zum Schluß zu unserer Enttäuschung das analysenreine Produkt im Tierversuch als unwirksam erwies.

Die Darstellung des sehr wirksamen Hydrochlorids geschah in folgender Weise: Reisfuttermehl wird 3 mal mit etwa dem doppelten Volumen 80%igen Alkohols unter anhaltendem Schütteln auf der Schüttelmaschine extrahiert, die filtrierte Flüssigkeit durch Destillation im Vakuum und Luftdurchleiten von Alkohol befreit, der sirupöse Rückstand bis zu einem Gehalt von 8% HCl mit Salzsäure angesäuert, das ausfallende Fettsäuregemenge im Scheidetrichter mit Äther ausgeschüttelt, sodann die von Äther durch einen Luftstrom befreite wäßrige Lösung bei niederer Temperatur zum dicken Sirup eingeengt. Zur Entfernung kolloidaler Beimengungen empfiehlt es sich, den Sirup nochmals mit 80%igem Alkohol aufzunehmen. Nach Verjagen des Alkohols wird die klare wäßrige Lösung mit Natriumcarbonat schwach alkalisch gemacht — stärkere Alkalescenz ist sorgfältig zu vermeiden — und mit nach Kraut bereiteter Jodwismutkaliumlösung unter stetem Umrühren ausgefällt. Dabei ist das Auftreten irgend stärkerer saurer Reaktion zu vermeiden, da sonst wirksame Substanz mit ausfällt. Der schmutzig graugelbe Niederschlag (Cholinfraktion) wird nach etwa 5 stündigem Stehen abgesaugt, das Filtrat mit einem Zehntel des Volumens an 20%iger Salzsäure versetzt und mit der Jodwismutkaliumlösung langsam unter gutem Umrühren vollständig ausgefällt. Der pulverige, schön ziegel- bis purpuro-rote Niederschlag (Oridinfraktion) wird scharf abgesaugt, in einer geräumigen Reibschale mit Silbercarbonat sorgfältig verrieben und sofort nach Zerlegung aufs Filter gebracht. Das etwas alkalisch reagierende, silberhaltige Filtrat wird sogleich mit Salzsäure schwach sauer gemacht; dann nach Absetzen des Silberchlorids abfiltriert und im Vakuum bei niederer Temperatur nahe zur Trockne gebracht. Es erstarrt dann zu einer wenig gefärbten, zerfließlichen, strahligen Krystallmasse.

Aus dem so erhaltenen Rohhydrochlorid, das in Dosen

von 5 bis 10 mg Lähmungs- und Krampferscheinungen beriberi-kranker Tauben prompt für 8 bis 10 Tage zum Verschwinden brachte, wurde mit Goldchlorid ein schön gelber, zunächst amorph, dann rasch krystallinisch werdender Niederschlag erhalten, der sich, aus kochendem Wasser umkrystallisiert, in Plättchen und flachen Prismen ausschied. Die Menge des so erhaltenen Chloraurats entsprach anscheinend der des verwendeten Hydrochlorids. Der Schmelzpunkt lag bei $273,5^{\circ}$ und stieg beim Umkrystallisieren aus heißem Wasser allmählich bis 277° (n-korr.). Die Analysen der erhaltenen Präparate ergaben eine Zusammensetzung, die annähernd der Formel $C_8H_{11}NO_2 \cdot HCl \cdot AuCl_3$ entsprach.

Berechnet:	C 18,18,	H 2,65,	N 8,07,	Au 48,14,	Cl 81,02
Gefunden: Präparat I:	" 18,60,	" 3,19,	" 8,28,	" 48,81,	" —
" II:	" —	" —	" —	" 48,78,	" —
" III:	" 18,67,	" 2,95,	" 8,26,	" 44,26,	" 80,56
	" 18,82,	" 3,02,	" —	" 44,12,	" —

Der zu hohe Kohlenstoffgehalt wies auf Beimengung einer kohlenstoffreicheren Substanz hin. In der Tat hinterließen die Kryställchen beim Auflösen unter dem Mikroskop ein äußerst zartes, aber doch erkennbares Skelett, vermutlich von einem kolloidalen Kohlenhydrat herrührend. Es wurde daher das Goldsalz durch Ausfällen mit Schwefelwasserstoff in das Hydrochlorid zurückverwandelt, und dieses durch Umkrystallisieren gereinigt. Durch mechanisches Auslesen größerer, völlig farbloser Prismen wurde ein aschefreies Präparat erhalten, das bei 240° schmolz und bei der Analyse folgende Werte lieferte.

4,604 mg Substanz:	6,48 mg CO_2 ,	3,12 mg H_2O ,	0,062 mg Asche.
6,325 " "	5,87 " $AgCl$,	0,117 mg Asche.	
4,112 " "	0,826 ccm N (18° ,	712 mm).	

Oridinhydrochlorid. $C_8H_{11}NO_2 \cdot HCl$.

Ber.: C 39,07, H 7,87, N 9,14, Cl 23,09.

Gefunden (aschefrei ber.): C 38,62, H 7,69, N 8,71, Cl 23,39.

Das aus diesem Hydrochlorid neuerdings dargestellte Goldsalz gab dann zur Formel genau stimmende Werte:

7,52 mg Substanz:	8,66 mg CO_2 ,	1,755 mg H_2O ,	8,245 mg Au.
4,62 " "	0,127 ccm N (16° ,	740 mm).	
9,24 " "	11,65 mg $AgCl$,	8,985 mg Au.	
0,0750 g "	0,0329 g Au.		

Oridinchloraurat. $C_8H_{11}NO_2 \cdot HCl \cdot AuCl_3$.

Ber.: C 18,13, H 2,65, N 3,07, Au 43,14, Cl 31,02.

Gefunden: C 18,27, H 2,61, N 3,13, Au 43,15, 43,08, 43,19, Cl 31,15.

Aus dem Hydrochlorid wurde durch Entfernen des Chlors die freie Base dargestellt. Sie wurde beim Eindunsten über Schwefelsäure als weiße pulverige, etwas hygroscopische Masse von sehr schwach saurer Reaktion erhalten. Sehr leicht löslich in Wasser, wenig löslich in kaltem, gut in kochendem absoluten Alkohol; aus der alkoholischen Lösung durch Äther in Kryställchen ausfallend. Beim Erhitzen auf dem Platinblech schmilzt sie und zersetzt sich dann unter Entwicklung stark alkalisch reagierender, ausgesprochen nach Pyridin riechender Dämpfe. Die wäßrige Lösung gibt Fällungen mit Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Jodwismutkalium, Goldchlorid, nicht mit Bromwasser, Platinchlorid und Quecksilberchlorid. Der Phosphorwolframsäureniederschlag löst sich nicht oder schwer in kochendem Wasser, wohl aber in Aceton. Die wäßrige Lösung löst nicht Kupfercarbonat, gibt keine Farbenreaktion mit Eisensalzen. Isonitril- und Senfölektion fehlen. Mit Natronlauge erhitzt, entwickelt die Lösung keine alkalischen Dämpfe, wohl aber, wenn sie vorher einige Minuten mit Jodwasserstoff und Phosphor gekocht worden war. Mit Kalkhydrat erhitzt, entwickelt die freie Base, ebenso das Hydrochlorid und Chloraurat starken Pyridingeruch. Daneben ist Fichtenspanreaktion wie bei Pyrrolderivaten nachweisbar, stärker bei den noch unvollkommen gereinigten Fraktionen, schwach bei den reinsten Produkten. Mit Formaldehyd und Schwefelsäure keine Färbung, ebensowenig beim Erhitzen mit Salpetersäure und nachträglichem Natronzusatz.

2,865 mg Substanz: 0,296 ccm N (18°, 735 mm).

Oridin. $C_8H_{11}NO_2$. Berechnet: N 11,98.

Gefunden: „ 11,75.

Das Oridin ist mit dem Betain und Valin isomer. Seinem Verhalten nach steht es zur Pyridin- bzw. zur Piperidingruppe in Beziehung. Es könnte ein Dioxypiperidin sein, doch ist das zur Zeit nur eine Vermutung.

Ebenso zurückhaltend möchte ich mich über seine Beziehung zu dem „Antineuritin“ aussprechen. Wenn das Rohhydrochlorid bei Überführung in analysenreine Substanz seine

Wirkung einbüßte, so ist zunächst an zwei Möglichkeiten zu denken. Entweder es enthielt neben Oridinhydrochlorid die anti-neuritische Substanz (deren Wirksamkeit dann noch viel höher eingeschätzt werden müßte) als Beimengung, und diese wurde bei der Reinigung entfernt, oder es bestand in der Tat ursprünglich aus dem Hydrochlorid des Antineuritins, das aber durch die nachfolgenden Prozeduren seine Wirksamkeit einbüßte.

Die letztere Annahme würde annähernd einer von Williams¹⁾ geäußerten Vermutung entsprechen. Williams glaubte nämlich beobachtet zu haben, daß Lösungen von α -Oxypyridin, 2.4.6-Trioxypyridin und 2.3.4-Trioxypyridin, wenn frisch bereitet, bei beriberikranken Tauben ausgesprochene Heilwirkung entfalten, nicht aber nach 5- bis 6 tägigem Stehen oder nach dem Kochen. Er vermutet, daß beim Beriberivitamin Ähnliches vorliegt. Indessen haben Harden und Zilva²⁾ Williams' Angaben über die Wirkung des α -Oxypyridins nicht bestätigen können.

Eine dritte Möglichkeit, daß die wirksame Substanz durch Adsorption an Niederschläge verloren geht, dürfte bei unserer Darstellungsmethode kaum in Frage kommen.

Da ich neuerdings hoffen kann, die abgebrochene Untersuchung wieder in Angriff zu nehmen, glaube ich auf die Frage, ob das Oridin als Umwandlungsprodukt des Antineuritins anzusehen ist oder nicht, bald eine entscheidende Antwort geben zu können.

Die Ausführung der vorliegenden Untersuchung, die sehr zahlreiche Tierversuche und die Verwendung von großen Mengen Ausgangsmaterial und kostspieligen Chemikalien notwendig machte, wurde durch eine mir von der Deutschen Kolonialgesellschaft gewährte Subvention in dankenswerter Weise gefördert.

Würzburg, am 4. Januar 1920.

¹⁾ R. R. Williams. Journ. of Biol. Chemistry 25, 437, 1916.

²⁾ Harden und Zilva, The Biochem. Journ. 11, 172, 1917.

Theoretische Untersuchungen über den Dissoziationszustand der Ampholyte¹⁾.

I. Teil.

Die Wirkung einwertiger Ionen bei Vernachlässigung aller kolloidalen Erscheinungen.

Von

L. Michaelis.

(Eingegangen am 8. Januar 1920.)

Mit 8 Figuren im Text.

In dem Bestreben, die Reaktionen der Eiweißkörper, Fermente und sonstiger Kolloide soweit als irgend möglich auf die gewöhnlichen und anerkannten Gesetze der allgemeinen Chemie zurückzuführen und nicht ohne zwingenden Grund nach neuen Gesetzen zu suchen, die in keinem Zusammenhang mit den alten stehen, habe ich in früheren Arbeiten diese Gesetze in einer Form dargestellt, die mir für diesen Zweck möglichst geeignet schien. Insbesondere galt es, die Gesetze der elektrolytischen Dissoziation der Ampholyte in eine geeignete Form zu kleiden²⁾. Ich ging von den Begriffen des Dissoziationsgrades, des Dissoziationsrestes und des isoelektrischen Punktes aus. Diese Begriffe wurden als Funktionen der Wasserstoffzahl dargestellt, wobei die verschiedenen Dissoziationskonstanten die Parameter bildeten. Alle anderen Ionenarten, die sonst noch in der Lösung vorhanden sind, wurden vernachlässigt. Der Reichweite dieser Gesetze ist dadurch eine natürliche Grenze gesetzt, daß die Vernachlässigung aller an-

¹⁾ Fortsetzung der Arbeit in dieser Zeitschr. 33, 182, 1911.

²⁾ Zusammenstellung der Theorie in L. Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin, Jul. Springer 1914.

deren Ionenarten nur eine Grenzbedingung darstellt, nämlich für den Fall, daß die anderen, in Wirklichkeit niemals vermeidbaren Ionenarten entweder in äußerst geringer Konzentration zugegen waren, oder daß ihre Affinität zu dem Ampholyten verschwindend klein war. In letzter Zeit¹⁾ wurde nunmehr begonnen, diese Grenzbedingung fallen zu lassen und die anderen Ionen mitzubersichtigen. Bisher wurden einige experimentelle Tatsachen und einige orientierende theoretische Überlegungen gegeben, und es soll nunmehr mit dem Versuch begonnen werden, eine rationelle Theorie zunächst für echte Lösungen abzuleiten, in dem Vertrauen, daß durch sie wiederum die experimentelle Arbeit gefördert werden wird.

Zu diesem Zweck denken wir uns ein chemisches System von folgender allgemeiner Zusammensetzung gegeben. Es enthalte in sehr verdünnter Lösung einen Ampholyten, dessen Dissoziationszustand unter der Einwirkung anderer Ionen betrachtet werden soll. In der Lösung befinden sich außer dem Ampholyten ein beliebiger anderer Elektrolyt, eine Säure, Base oder ein Salz oder ein Gemisch von solchen. Alle Ionen dieser Elektrolyte sollen Affinität zu dem Ampholyten haben. Die Konzentration des Ampholyten sei so gering, daß durch Bindung der anderen Ionen an den Ampholyten die Konzentration der anderen Ionen nicht wesentlich geändert wird. Bei den H- und OH-Ionen ist diese Bedingung durch Anwendung von Puffern leicht zu erreichen, und die anderen Ionenarten seien in relativ so großer Konzentration gegeben, daß ihre Konzentration durch ihre teilweise Bindung an den Ampholyten nicht merklich geändert wird. Da ja, wie ich in den erwähnten früheren Arbeiten zeigte, die Affinität der allermeisten anderen Ionenarten zu den Ampholyten viel kleiner ist als die der H- und OH-Ionen, so erfordern ja praktisch auch nur relativ höhere Ionenkonzentrationen eine Korrektur der ursprünglichen Theorie, und wir können die gestellten Bedingungen als praktisch genügend realisierbar ansehen, um sie zunächst zum Ausgangspunkt der Theorie zu machen. Im übrigen wird es leicht sein, die gewonnenen Gesetze später für die Fälle, in denen diese Bedingungen nicht mehr genügend zutreffen, umzudenken.

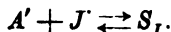
¹⁾ L. Michaelis und Rona, diese Zeitschr. 94, 225, 1919; L. Michaelis und A. v. Szent-Györgyi, diese Zeitschr. 103, 178, 1920.

2. Unsere Aufgabe ist es, unter diesen Bedingungen den Dissoziationszustand des Ampholyten zu betrachten und ihn als Funktion der Konzentration aller gleichzeitig gelösten Elektrolyte darzustellen. Sei der Ampholyt \mathfrak{A} in der Gesamtkonzentration α , seine undissoziierten, freien Moleküle A in der Konzentration a , seine Ionen A^+ und A^- in den Konzentrationen a^+ und a^- gegeben, so unterscheiden wir folgende Funktionen:

1. $\frac{a}{\alpha} = \rho$ oder den Dissoziationsrest,
2. $\frac{a^+}{\alpha} = \alpha^+$ oder den Kationendissoziationsgrad,
3. $\frac{a^-}{\alpha} = \alpha^-$ oder den Anionendissoziationsgrad,
4. JP , den isoelektrischen Punkt.

Es werde die Konzentration der H^+ -Ionen mit h bezeichnet, die der OH^- -Ionen mit oh . Die ersten drei Größen sind Funktionen von h , mit den Dissoziationskonstanten k_a und k_b des Ampholyten als Parametern, die vierte ist eine für den Ampholyten charakteristische Konstante und ist eine Funktion dieser Parameter und der Dissoziationskonstante des Wassers k_w . Die erweiterten Bedingungen bestehen nun darin, daß noch eine positive Ionenart J (z. B. Na^+) und eine negative Ionenart J^- (z. B. Cl^-) in der Lösung sei. Infolgedessen treten als neue Zustände des Ampholyten die Molekülverbindungen Ampholytchlorid, S_I , und Ampholytnatrium, S_{II} , sowie Ampholyt-Natriumchlorid, S_{III} , hinzu, oder das Anionensalz, das Kationensalz und das Anionkationensalz; sie haben die Konzentrationen s_I , s_{II} und s_{III} .

Nehmen wir zunächst der Einfachheit halber an, die Säuredissoziationskonstante k_a habe einen ganz bestimmten Wert, sagen wir 10^{-7} , und k_b sei ∞ , der Ampholyt sei also einfach eine schwache Säure. Dann kommt als neue Molekülbindung nur hinzu das Salz dieser Säure mit dem Ion J^- . Dieses Salz S_I habe die Konzentration s_I . Es bildet sich nach der chemischen Gleichung



(Wir bezeichnen Molekülverbindungen mit einem großen Buch-

staben, ihre Konzentrationen mit dem entsprechenden kleinen Buchstaben.) Dann ist

$$a' \cdot i'' = k_I \cdot s_I.$$

Wir setzen hier die Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes für diese Salzbildung voraus. Dazu haben wir nicht ohne weiteres ein Recht; bekanntlich ist k_1 keine Konstante, sobald das Salz sehr stark elektrolytisch dissoziiert ist, d. h. sobald k_1 sehr groß wird (etwa $> 10^{-3}$). Trotzdem brauchen wir uns nicht zu scheuen, das Massenwirkungsgesetz auf alle Fälle anzuwenden, aus folgendem Grunde. Ist k_1 sehr groß, so ist ja das entstandene Salz neben seinen Ionen stets nur in sehr geringer Menge vorhanden, und die ganze Korrektur, die durch die Gegenwart des Ions J' notwendig wird, ist so unbedeutend, daß es praktisch nichts ausmacht, wenn wir das ideale Massenwirkungsgesetz statt des wahren anwenden; je kleiner k_1 , um so mehr fällt die Verschiebung des Ionengleichgewichts durch die Anwesenheit von J' in Betracht, aber um so genauer gilt auch das ideale Massenwirkungsgesetz. Wir können dieses daher praktisch immer anwenden.

Wir haben nun folgende zwei Ionengleichgewichte:

$$a' \cdot h' = k_a a \quad \dots \dots \dots (1)$$

$$a' \cdot i'' = k_I s_I \quad \dots \dots \dots (2)$$

Bezeichnen wir nun die Gesamtkonzentration des auf seinen Dissoziationszustand zu untersuchenden Ampholyten, zunächst also der zu untersuchenden Säure, mit a , so daß

$$a = a + a' + s_I \quad \dots \dots \dots (3)$$

so ist

$$(a - a - s_I) \cdot h' = k_a a \quad \dots \dots \dots (1a)$$

$$(a - a - s_I) \cdot i'' = k_I s_I \quad \dots \dots \dots (2a)$$

Aus (1a) folgt

$$a = \frac{h' (a - s_I)}{h' + k_a} \quad \dots \dots \dots (1b)$$

Aus (2a) folgt

$$a = \frac{i'' (a - a)}{i'' + k_I} \quad \dots \dots \dots (2b)$$

Aus (1b) und (2b) folgt

$$\frac{a}{a} = \varrho = \frac{k_I \cdot h'}{k_I \cdot h' + k_a \cdot i'' + k_a \cdot k_I} \quad \dots \dots \dots (I)$$

$\frac{a}{a}$, das Verhältnis der undissoziierten und ungebundenen Säuremenge zur Gesamtmenge der Säure, können wir als den „Dissoziationsrest“, ϱ , bezeichnen. Für $i' = 0$ geht er in den gewöhnlichen Dissoziationsrest ϱ_0 über, wie er früher abgeleitet wurde:

$$\varrho_0 = \frac{k'}{k' + k_s}$$

Fragen wir nach dem Bruch $\frac{a'}{a}$, dem Dissoziationsgrad a' , so ergibt sich aus (1) durch Einsetzen des soeben gefundenen Wertes für a aus (1b)

$$\frac{a'}{a} = a' = \frac{k_s \cdot k_I}{k_I k' + k_s i' + k_s \cdot k_I} \quad \dots \dots \text{(II)}$$

Und der Bruch $\frac{s}{a}$, der „Salzgrad“, σ ergibt sich nunmehr aus (3):

$$\sigma = \frac{k_s \cdot i'}{k_I k' + k_s i' + k_s \cdot k_I} \quad \dots \dots \dots \text{(III)}$$

3. Wenn man nun die Kurven ϱ , a' und σ sämtlich als Funktion von k' berechnet und graphisch als Funktion von p_h darstellt, so erhält man je nach der Wahl der Parameter die nebenstehenden Diagramme. k_s ist überall = 10^{-7} gesetzt. In Fig. 1, 2, 3 ist $i' = 0,1$ gesetzt; k_I ist in den je 5 Kurven jedes Diagramms = 0,001; 0,01; 0,1; 1; ∞ gesetzt. Die Vergleichskurve ohne Salzzusatz ist identisch mit der für $k_I = \infty$, denn das bedeutet, daß die Säure nichts von dem zugesetzten Kation bindet. Hier zeigt sich der Einfluß von k_I , der Dissoziationskonstante des Salzes. Ist diese = ∞ , so gelten für ϱ und a die Kurven wie ohne Salzzusatz. σ ist stets = 0. Ist $k_I = 1$, so wird die ϱ -Kurve nach links, die a -Kurve nach rechts verschoben, und es entsteht eine flache σ -Kurve. Wird k_I noch kleiner, 0,1 usw., so sind die Abweichungen in demselben Sinne, nur noch größer. Es ist zu bemerken, wie stark der Unterschied der a - und σ -Kurve für $k_I = 1$ und 0,1 ist. Das bedeutet: hat das zugefügte Ion eine sehr schwache Affinität zur Säure (etwa Na), so ist unter allen Umständen nur sehr wenig undissoziiertes Na-Salz vorhanden; wächst die Affi-

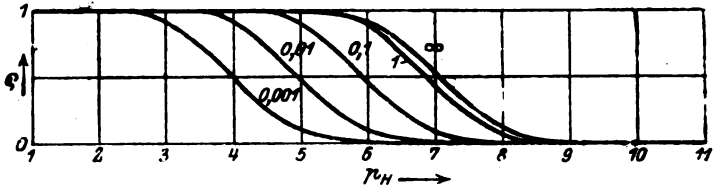


Fig. 1.

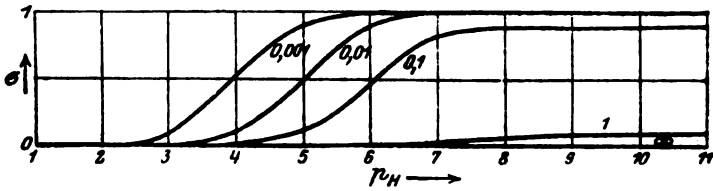


Fig. 2.

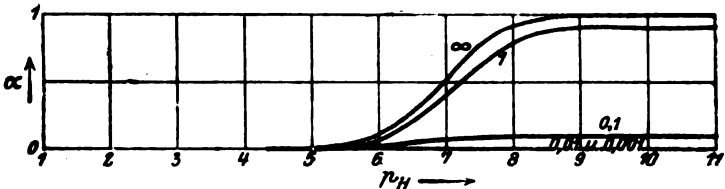


Fig. 3.

Fig. 1, 2, 3. Die Funktionen ρ (Dissoziationsrest), σ (Salzgrad), α (Dissoziationsgrad) einer Säure mit der Dissoziationskonstante $k_a = 10^{-7}$ bei Anwesenheit eines Neutralsalzes mit einem einwertigen Kation in der Konzentration 0,1, unter der Annahme, daß aus der Säure und diesem Kation sich ein Salz bildet, dessen Dissoziationskonstante k_1 den an jeder Kurve angeschriebenen Wert hat.

nität, so tritt ziemlich plötzlich eine große Menge undissoziiertes Salz auf.

In den bisherigen Diagrammen wurde die Menge des zugefügten Ions konstant in der Konzentration 0,1 molar gehalten. Wir wollen jetzt k_a wieder konstant $= 10^{-7}$, aber $k_1 = 10^{-2}$ festhalten, und sehen, welchen Einfluß die Konzentration des Ions i hat. Die Diagramme Fig. 4, 5, 6 zeigen, in welcher

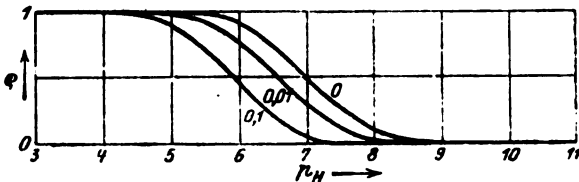


Fig. 4.

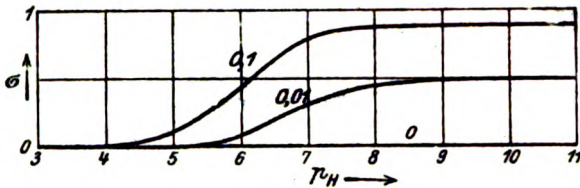


Fig. 5.

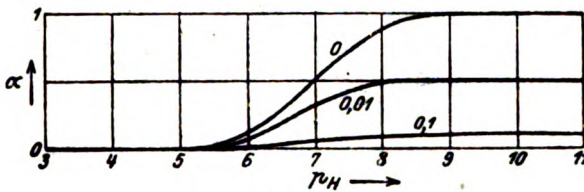


Fig. 6.

Fig. 4, 5, 6. Die Funktionen ϱ , σ , α einer Säure mit der Dissoziationskonstante $k_a = 10^{-7}$ bei Anwesenheit eines Salzes mit einwertigem Kation in der an die Kurven angeschriebenen Konzentration, wenn die Säure mit diesem Kation ein Salz bildet, dessen Dissoziationskonstante $k_I = 10^{-2}$ ist.

Weise der Einfluß von Ionen von nicht zu hoher, aber doch schon deutlicher Affinität von ihrer Konzentration abhängig ist. Es ist klar, daß der Einfluß der Konzentration viel geringer ist, wenn das Ion entweder eine sehr hohe oder eine sehr niedere Affinität zu der Säure hat.

Halten wir drittens h' , i' und k_I konstant und fragen nach dem Einfluß von k_a , so ergibt sich aus (4), daß ϱ sich nicht ändert, wenn

$$m k_I h = k_I h + k_a i + k_a k_I,$$

wo m eine beliebige Zahl bedeutet, oder wenn, wie eine einfache Rechnung ergibt,

$$\frac{h'}{1 + \frac{k_a}{k_I} i} = \frac{1}{m - 1}$$

Wenn wir h' und i' konstant halten, d. h. wenn wir mit einem bestimmten Puffergemisch und mit einer bestimmten Salzkonzentration arbeiten, so bleibt der Dissoziationszustand des Ampholyten der gleiche, wenn k_a/k_I gleich bleibt.

4. Wir betrachteten bisher den Ampholyten in seiner Eigenschaft als Säure mit verschwindend kleiner Basennatur; mutatis

mutandis gelten dieselben Gesetze für einen Ampholyten als Base mit verschwindend kleiner Säurenatur. Wir müssen jetzt noch die Gesetze erweitern für einen beliebigen Ampholyten. bei dem sowohl k_a wie k_b einen endlichen Wert haben.

Wir bezeichnen mit

a die Gesamtkonzentration des Ampholyten,

a die Konzentration der undissoziierten und ungebundenen Moleküle desselben,

a' und a'' die Konzentration der beiden Ionen des Ampholyten,

s_I und s_{II} die Konzentration des undissoziierten Salzes, das der Ampholyt in seiner Eigenschaft als Säure und als Base bildet (z. B. s_I Eiweiß-Na; s_{II} Eiweißchlorid),

k_a und k_b die beiden Dissoziationskonstanten des Ampholyten als Säure und Base,

k_I und k_{II} die Dissoziationskonstanten der beiden Ampholytsalze, k_I desjenigen mit dem Metallkation, k_{II} des mit dem Säureanion,

k_w die Dissoziationskonstante des Wassers.

Hierzu kommen noch folgende Größen, die wir zunächst vernachlässigen werden:

s_{III} die Konzentration des Salzes, daß durch Vereinigung des Ampholyten gleichzeitig mit dem Anion und Kation eines Salzes entsteht, des „Anion-Kation-Ampholytsalzes“,

k_{III} die Dissoziationskonstante dieses Salzes.

Wir definieren nun

$$\frac{a}{a} = \rho \text{ der Dissoziationsrest,}$$

$$\left. \begin{aligned} \frac{a'}{a} = \alpha \\ \frac{a''}{a} = \alpha' \end{aligned} \right\} \text{der Kationen- bzw. Anionen-} \\ \text{Dissoziationsgrad,}$$

$$\left. \begin{aligned} \frac{s_I}{a} = \sigma_I \\ \frac{s_{II}}{a} = \sigma_{II} \end{aligned} \right\} \text{der Kationen- bzw. Anionen-} \\ \text{Salzgrad,}$$

$$\frac{s_{III}}{\alpha} = \sigma_{III} \text{ der Anionkation-Salzgrad.}$$

σ_{III} wird also zunächst $= 0$ gesetzt, d. h. k_{III} wird $= \infty$ gesetzt.

In vielen Fällen können diese Funktionen graphisch ermittelt werden. Die Konstruktion ist folgendermaßen. Man konstruiert zunächst die Kurven unter der Fiktion, daß der

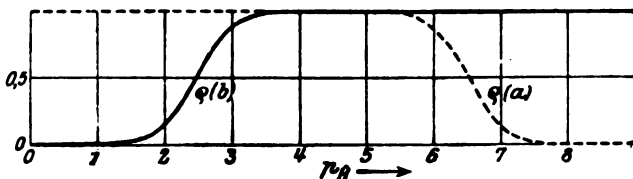


Fig. 7. Konstruktion der ζ -Kurve eines Ampholyten aus der $\zeta_{(a)}$ - und $\zeta_{(b)}$ -Kurve.

Ampholyt nur eine Säure mit der Konstanten k_a sei, und so dann eine Kurve unter der Fiktion, daß er nur eine Base mit der Konstanten k_b sei. Man erhalte beispielsweise auf diesem Wege (Fig. 7) für ζ das eine Mal die Kurve $\zeta_{(a)}$, das andere Mal $\zeta_{(b)}$ ($k_a = 5 \cdot 10^{-9}$, $k_b = 3 \cdot 10^{-12}$). Liegen nun die S-förmigen Teile der beiden Kurven soweit auseinander, wie es die Figur zeigt, so erhalten wir mit einer praktisch vollkommen befriedigenden Annäherung die Kurve des wahren ζ , wenn wir $\zeta_{(b)}$ vom Anfang bis zum Schnittpunkt mit $\zeta_{(a)}$ verfolgen und dann $\zeta_{(a)}$ weiter verfolgen. In den meisten Fällen genügt diese einfache Konstruktion; wie ich früher gezeigt habe, liegen die in Frage kommenden Schenkel von $\zeta_{(a)}$ und $\zeta_{(b)}$ immer dann genügend weit auseinander, wenn $k_a \cdot k_b < \text{etwa } 10^{-15}$ ist, und das trifft für so gut wie alle wirklich in der Natur vorkommenden Ampholyte zu. Bei Gegenwart stark bindungsfähiger Ionen können die beiden Kurven einander allerdings näher rücken und sich merklich unterhalb der Ordinatenhöhe 1 kreuzen. Dann ist diese einfache Konstruktion nicht mehr ganz zutreffend. Aber das wichtigste an derselben bleibt doch brauchbar; der isoelektrische Punkt entspricht auch dann dem Kreuzungspunkt der Kurven. Dieser liegt nämlich bei dem Maximalwert von ζ , und dieses Maximum entspricht stets dem Kreuzungspunkt. Sein absoluter Betrag ist freilich etwas kleiner als der graphisch

erhaltene. Wir werden ihn weiter unten genau berechnen lernen. Alle Funktionen der Ampholytdissoziation, die im isoelektrischen Punkt entweder nahezu = 0 oder nahezu = 1 sind, lassen sich auf die soeben beschriebene Weise graphisch aus den rechten und linken Schenkeln der sich kreuzenden Einzelkurven zusammensetzen. Ist diese Bedingung nicht erfüllt, so fallen die Kurven nicht mehr ganz richtig aus, aber sie bleiben streng mit den wahren Funktionen sympat, d. h. sie fallen oder steigen mit den wahren Funktionen in jedem Punkte in gleichem Sinne und haben an gleicher Stelle ihr Maximum und Minimum.

5. Da die Abweichungen noch dazu in den meisten Fällen nicht bedeutend sind, können diese konstruierten Kurven ein brauchbarer Ersatz für die wahren Funktionen sein; denn diese sind überaus umständlich zu berechnen und unhandlich; mit einer Ausnahme: die Funktion ρ ist verhältnismäßig einfach. Sie ist aber auch die wichtigste Funktion, weil sie für die Definition des isoelektrischen Punktes gebraucht wird.

Wenn wir zunächst wieder annehmen, daß ein Anionkationsalz sich nicht bildet, können wir ρ folgendermaßen ableiten.

Wir legen folgende Gleichungen zugrunde:

$$a' \cdot h' = k_a \cdot a \quad \dots \dots \dots (1)$$

$$a' \cdot o h' = k_b \cdot a \quad \dots \dots \dots (2)$$

$$a' \cdot i' = k_I \cdot s_I \quad \dots \dots \dots (3)$$

$$a' \cdot i'' = k_{II} \cdot s_{II} \quad \dots \dots \dots (4)$$

$$a + a' + a'' + s_I + s_{II} = a \quad \dots \dots \dots (5)$$

$$h' \cdot o h' = k_w \quad \dots \dots \dots (6)$$

Aus (1) und (5) folgt:

$$(a - a - a' - s_I - s_{II}) \cdot h' = k_a \cdot a.$$

Setzen wir für a' , s_I , s_{II} ihre Werte aus (2) (3) (4) ein, so ergibt sich

$$\left(a - a - \frac{k_b}{k_w} \cdot a \cdot h - \frac{a' \cdot i'}{k_I} - \frac{a' \cdot i''}{k_{II}} \right) \cdot h' = k_a \cdot a.$$

Eliminieren wir a' und a'' mittelst (1) und (2), so wird

$$\left(a - a - \frac{k_b}{k_w} \cdot a \cdot h - \frac{k_a}{k_I} \cdot a \cdot i' - \frac{k_b}{k_w} \cdot a \cdot h \cdot i'' \right) \cdot h' = k_a \cdot a.$$

Hieraus folgt

$$\frac{\alpha}{a} = \varrho = \frac{1}{1 + \frac{k_b}{k_w} \cdot k \left(1 + \frac{i'}{k_{II}}\right) + \frac{k_a}{k} \left(1 + \frac{i''}{k_I}\right)}. \quad \text{(IV)}$$

6. Von großem Interesse ist es nun, festzustellen, bei welcher k der Wert von ϱ ein Maximum hat. Dieses Maximum ist bei Abwesenheit von Salzen identisch mit dem isoelektrischen Punkt. Bei Salzgegenwart, wo es außer den undissoziierten freien Ampholytenmolekülen auch noch andere ungeladene Moleküle, nämlich die beiden Salze des Ampholyten, gibt, ist das Maximum von ϱ allerdings nicht mit demjenigen Punkt identisch, den man als isoelektrischen Punkt definieren muß, d. h. mit demjenigen Punkt, wo die Konzentration der positiven Ampholytionen gleich der negativen Ampholytionen ist. Aber suchen wir zunächst das Maximum von ϱ .

Um das Maximum zu finden, brauchen wir nur ϱ nach k zu differenzieren und den Differentialquotienten = 0 zu setzen.

Leichter ist es, $\frac{1}{\varrho}$ nach k zu differenzieren. So erhalten wir

das Minimum von $\frac{1}{\varrho}$, was mit dem Maximum von ϱ identisch ist. Führt man diese einfache Rechnung aus, so ergibt sich:

$$\frac{d\left(\frac{1}{\varrho}\right)}{dk} = \frac{k_b}{k_w} \left(1 + \frac{i'}{k_{II}}\right) - \frac{1}{k^2} \cdot k_a \left(1 + \frac{i''}{k_I}\right).$$

Setzen wir $\frac{d\frac{1}{\varrho}}{dk} = 0$ und lösen die Gleichung nach k auf, so erhalten wir diejenige k , die das Maximum von ϱ charakterisiert.

So erhält man

$$k_{\text{für } \varrho_{\text{max}}} = \sqrt{\frac{k_a \cdot k_w \cdot \left(1 + \frac{i''}{k_I}\right)}{k_b \cdot \left(1 + \frac{i'}{k_{II}}\right)}}. \quad \text{(V)}$$

Ist $i' = i'' = 0$, so geht die Gleichung in die früher von mir entwickelte Formel des isoelektrischen Punktes bei Abwesenheit fremder Ionen über:

$$JP = \sqrt{\frac{k_a \cdot k_w}{k_b}}$$

Aber auch wenn $i = i'$ und $k_I = k_{II}$ ist, d. h. wenn der fremde Elektrolyt ein Salz (nicht eine Säure oder eine Base) ist, und sein Anion und sein Kation gleiche Affinität zum Ampholyten haben, geht ϱ_{max} ebenfalls in JP über. Das heißt also: Ein Salz, dessen beide Ionen zum Eiweiß gleiche Affinität haben und das in beliebiger Konzentration zugegen ist, verschiebt das ϱ -Maximum nicht aus dem isoelektrischen Punkt.

Um eine Anschauung zu geben, wie groß die Verschiebung von k für ϱ_{max} durch Salze zu erwarten ist, ist folgende Tabelle gegeben. Es werden folgende Bedingungen zugrunde gelegt. Es sei zunächst $i = i'$, was ja den natürlichen Bedingungen fast stets entspricht. Es sei ferner gegeben:

$$k_a = 10^{-7}, k_b = 10^{-9}, k_w = 10^{-14}, k_I = 1.$$

Wenn wir nun noch für k_{II} und $i = i'$ verschiedene Werte zu Grunde legen, so ergeben sich für p_H des ϱ_{max} die (nicht eingeklammerten) Zahlen der Tabelle.

ϱ_{max} selbst wird durch Salze verkleinert. Wir können es berechnen, wenn wir in die ϱ -Formel für k den Wert k für ϱ_{max} einsetzen; dann ist

$$\varrho_{max} = \frac{1}{1 + 2 \sqrt{\frac{k_a k_b}{k_w} \cdot \left(1 + \frac{i}{k_I}\right) \left(1 + \frac{i'}{k_{II}}\right)}} \dots \dots \text{(VI)}$$

Für $i = i' = 0$ geht dies in den früher für ϱ_{max} ohne

Salze abgeleiteten Wert über $\varrho_{max} = \frac{1}{1 + 2 \sqrt{\frac{k_a \cdot k_b}{k_w}}}$.

Die entsprechenden Werte für ϱ_{max} unter denselben Bedingungen wie für p_H für ϱ_{max} sind in der Tabelle die eingeklammerten Zahlen.

	I $k_{II} = 1$	II $k_{II} = 0,1$	III $k_{II} = 0,01$	IV $k_{II} = 0,001$	V $k_{II} = 10^{-9}$ (d. h. = k_a)
$i = 0$	6,000 (0,838)	6,000 (0,838)	6,000 (0,838)	6,000 (0,838)	6,000 (0,838)
$i = 0,001$	6,000 (0,838)	6,002 (0,838)	6,020 (0,825)	6,154 (0,786)	8,000 (0,048)
$i = 0,01$	6,000 (0,831)	6,019 (0,823)	6,149 (0,778)	6,519 (0,601)	8,498 (0,015)
$i = 0,1$	6,000 (0,821)	6,230 (0,771)	6,500 (0,590)	6,982 (0,334)	8,980 (0,005)

7. Während in salzreicher Lösung die undissoziierten und ungebundenen Moleküle des Ampholyten eine geradezu ausschlaggebende Rolle für die Charakterisierung des Zustands des Ampholyten haben, und der Maximalwert für ρ praktisch fast vollkommen seinen denkbar höchsten Wert, nämlich 1, erreicht, kann in salzhaltigen Lösungen selbst der maximale Wert von ρ sehr erheblich unter 1 bleiben, ja unter Umständen nur ein verschwindender Bruchteil von 1 sein. (Siehe Tabelle, Kolumne V). Um hiervon eine Anschauung zu geben, wollen wir folgende graphische Darstellung wählen. (Fig. 8.) Gegeben sei ein Am-

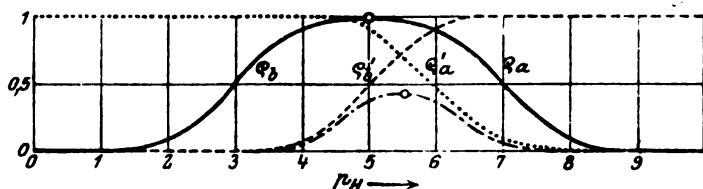


Fig. 8. Verschiebung des Maximums von ρ bei einem Ampholyten bei Gegenwart eines Neutralsalzes aus zwei einwertigen Ionen; das Salz des Ampholyten mit dem Anion habe die Dissoziationskonstante $k_I = 0,1$, mit dem Kation die Dissoziationskonstante $k_{II} = 0,01$.

pholyt mit den Konstanten $k_a = 10^{-7}$, $k_b = 10^{-11}$. Wir zeichnen zunächst die ρ -Kurve einer Säure mit $k_a = 10^{-7}$ (Fig. 8, ρ_a), sodann die einer Base mit der Konstanten 10^{-11} (d. h. $k_w/k_b = 10^{-2}$; Fig. 8, ρ_b).

Da diese beiden Kurven sich in einem Punkte schneiden, an dem die Ordinate praktisch = 1 ist, kann man in der oben angegebenen Weise die ρ -Kurve für den Ampholyten aus den sich kreuzenden Schenkeln von ρ_a und ρ_b zusammensetzen. Jetzt fügen wir ein Salz in der Konzentration 0,1 hinzu; die Dissoziationskonstante desjenigen Ampholytsalzes, das mit dem Kation des zugefügten Salzes gebildet wird, k_I , sei 0,1, die Konstante des Ampholytsalzes, das mit dem zugefügten Anion gebildet wird, k_{II} sei = 0,01. Hierdurch wird, wie wir aus Fig. 1 entnehmen können, ρ_a nach ρ'_a und ρ_b nach ρ'_b verschoben. Diese Kurven überkreuzen sich an einem Punkt, dessen Ordinate weit kleiner als 1 ist. Wir können daher das ρ' für den Ampholyten nicht ohne weiteres aus den sich kreuzenden Schenkeln zusammensetzen, sondern müssen die Kurve stark nach unten

abrunden, so daß sie etwa die Form wie in Fig. 8 erhält. Wir sehen hier erstens, daß das Maximum kaum 0,5 ist, zweitens, daß es nach der Seite des Ampholytsalzes mit der größeren Dissoziationskonstante verschoben ist. Beide Ionen des zugefügten Salzes „schieben“ gleichsam ϱ_{\max} von sich weg, aber das zum Ampholyten stärker affine Ion schiebt es stärker weg.

8. Von besonders großem Interesse ist nun noch eine andere Funktion. Durch quantitative Überführungsversuche könnte man feststellen, wieviel von dem Ampholyten bei gegebenem Potentialgefälle in der Zeiteinheit in der Richtung des Stromes transportiert wird, wobei eine gegen den Strom wandernde Menge negativ gerechnet wird. Ist der Ampholyt nur in Form von Kationen vorhanden, so ist seine Überführung die maximale. Im allgemeinen wird nur ein Bruchteil dieser maximalen Menge übergeführt; diesen Bruchteil nennen wir den Ladungsgrad, λ , des Ampholyten.

Es muß sein

$$\lambda = a' - a''.$$

λ kann positiv oder negativ sein. Diese wichtige Funktion ist verhältnismäßig einfach zu berechnen. Nach (2) ist nämlich

$a' = \frac{a \cdot k_b}{o h'}$, nach (3) ist $a'' = \frac{a \cdot k_a}{h}$. Folglich ist

$$\frac{a' - a''}{a} = a' - a'' = \lambda = \varrho \left(\frac{k_b}{o h'} - \frac{k_a}{h} \right).$$

Führen wir den Wert von ϱ aus (7) ein, so wird

$$\lambda = \frac{\frac{k_b \cdot h'}{k_w} - \frac{k_a}{h}}{\frac{k_b \cdot h'}{k_w} \left(1 + \frac{i'}{k_{II}} \right) + \frac{k_a}{h} \left(1 + \frac{i'}{k_j} \right)} \quad \dots \quad \text{(VII)}$$

Ist entweder $i' = i'' = 0$ oder $k_{II} = k_j = \infty$, d. h. ist entweder die Menge der fremden Ionen verschwindend klein, oder ist ihre Affinität zu dem Ampholyten verschwindend klein, so geht die Gleichung über in die einfache Form

$$\lambda_0 = \frac{\frac{k_b \cdot h}{k_w} - \frac{k_a}{h}}{\frac{k_b \cdot h}{k_w} + \frac{k_a}{h}} = \frac{\frac{k_b}{oh'} - \frac{k_a}{h}}{\frac{k_b}{oh'} + \frac{k_a}{h}} \dots \dots \dots \text{(VIII)}$$

λ schwankt zwischen 0 (im isoelektrischen Punkt) und ± 1 .

Wandert der Ampholyt gar nicht oder nach beiden Seiten gleich stark, so ist $\lambda = 0$. Als isoelektrischen Punkt müssen wir diejenige h' definieren, für welche $\lambda = 0$ ist. Setzen wir λ in (VII) = 0, so ergibt sich

$$JP = \sqrt{\frac{k_a}{k_b} k_w}$$

Also dasselbe Resultat, das ich früher für den isoelektrischen Punkt eines Ampholyten bei Abwesenheit von Salzen erhalten hatte. Salze verschieben also den isoelektrischen Punkt nicht, und wenn ich in den letzten Arbeiten¹⁾ gezeigt habe, daß Salze das Fällungsoptimum verschieben, so folgt daraus, daß dieses Fällungsoptimum bei Salzgegenwart nicht dem isoelektrischen Punkt zu entsprechen braucht.

Das Fällungsoptimum kann daher nur diejenige h' sein, bei der die schwerlöslichste der verschiedenen Molekulgattungen ihre maximale Konzentration haben würde, wenn sie gelöst bliebe.

Die Theorie des Fällungsoptimums bedarf einer eigenen theoretischen Untersuchung, und erst nach Abschluß einer solchen werden wir die Früchte aus den früher mitgeteilten experimentellen Befunden ziehen können. Sie sind es, die für die physikalische Zustandsänderung der Kolloide am wichtigsten sind.

9. Ferner haben die Funktionen σ_I und σ_{II} ein großes praktisches Interesse. Sie geben an, wieviel von dem Ampholyten als undissoziiertes Salz mit einer Base und mit einer Säure vorhanden ist.

σ_I können wir folgendermaßen entwickeln. Aus (3) und (1) S. 234 folgt

¹⁾ Diese Zeitschr. 94. 225 und in diesem Bande.

$$s_I = \frac{k_a \cdot i' \cdot a}{k_I \cdot h}$$

also

$$\sigma_I = \frac{s_I}{a} = \frac{k_a \cdot i' \cdot a}{k_I \cdot h} \cdot \frac{a}{a} = \frac{k_a \cdot i'}{k_I \cdot h} \cdot a$$

$$\sigma_I = \frac{k_a \cdot i'}{k_I \left[h^2 \cdot \frac{k_b}{k_w} \left(1 + \frac{i'}{k_{II}} \right) + h + k_a \left(1 + \frac{i'}{k_I} \right) \right]} \quad (\text{IX})$$

In dieser Funktion kommt h nur im Nenner vor. Sie hat kein Maximum oder Minimum bei endlicher h , sondern sie steigt unaufhörlich, wenn h fällt und umgekehrt, die Funktion σ_I ist h umgekehrt symbat. σ_I steigt also dauernd mit abnehmender Acidität. Ist nun das Metallsalz des Ampholyten die unlösliche Molekulgattung, so liegt das Fällungsoptimum bei extrem alkalischer Reaktion.

σ_{II} ist ganz entsprechend:

$$\sigma_{II} = \frac{k_b \cdot i'}{k_{II} \left[o h^2 \cdot \frac{k_a}{k_w} \left(1 + \frac{i'}{k_I} \right) + o h' + k_b \left(1 + \frac{i'}{k_{II}} \right) \right]} \quad (\text{X})$$

Das Salz des Ampholyten mit einem Anion bildet sich also um so vollständiger, je saurer die Reaktion ist, und wenn es unlöslich ist, liegt sein Fällungsoptimum bei extrem saurer Reaktion.

Und umgekehrt: Finden wir bei variierter h ein Fällungsoptimum bei einer bestimmten h , so ist der undissoziierte, ungebundene Ampholyt die unlösliche Molekulgattung; finden wir dauernde Zunahme der Fällung mit zunehmender Alkalität, so ist das Salz des Ampholyten mit einem Kation der unlösliche Körper, finden wir dauernde Zunahme der Fällung mit zunehmender Acidität, so ist das Salz des Ampholyten mit einem Anion der unlösliche Körper.

10. Wir müssen noch folgenden Fall in Betracht ziehen. Es mögen sich neben dem Ampholyten zwei verschiedene Kationen J_1 und J_2 in den Konzentrationen i'_1 und i'_2 und mit dem Dissoziationskonstanten ihres Ampholytsalzes k_{I_1} und k_{I_2} befinden. Dieser Fall hat dann ein besonderes Interesse, wenn das Salz S_{I_1} löslich, S_{I_2} unlöslich ist. Der Fall kommt praktisch z. B. vor, wenn wir die h durch eine Reihe von

Acetatpuffern mit konstantem Gehalt an Natriumacetat festlegen und irgend ein Salz zufügen. Um die Verhältnisse zu überblicken, müssen wir die Funktion $\frac{s_{II}}{a}$ entwickeln. Betrachten wir den Ampholyten einfach als Säure, so ist

$$a' \cdot i'_1 = k_{I_1} \cdot s_{I_1},$$

$$a' \cdot i'_2 = k_{I_2} \cdot s_{I_2}.$$

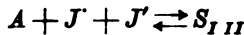
Daraus folgt

$$\frac{s_{I_2}}{s_{II_1}} = \frac{i'_1}{i'_2} \cdot \frac{k_{I_2}}{k_{I_1}} \dots \dots \dots (XI)$$

Ist also i'_1 und i'_2 jedes für sich konstant, so bilden sich unabhängig von der k die beiden Salze immer in einem bestimmten Mengenverhältnis zueinander. Die Lage des Fällungsoptimums des schwerlöslichen Salzes wird daher durch die Gegenwart des leichtlöslichen nicht verschoben, wenn man das Verhältnis $i'_1 : i'_2$ während der Änderung der k konstant hält. Und handelt es sich um das Salz des Ampholyten mit einem Anion, gilt dasselbe, wenn man $i'_1 : i'_2$ konstant hält.

Diese Regeln müssen beachtet werden, wenn man mit Ampholytlösungen arbeitet, die außer dem Salz noch ein Puffergemisch enthalten, das ja stets ein zweites Salz enthält.

Schließlich müssen wir noch den Fall in Betracht ziehen, daß auch eine merkliche Menge Anionkationsalz sich bildet. Da es sich nach der Reaktionsgleichung



bildet, so muß die Gleichgewichtsbedingung sein:

$$a \cdot i^3 = k_{III} \cdot s_{III}.$$

Wir bezeichnen hier mit i die Konzentration von J oder von J' , die beide ja in praktisch vorkommenden Fällen immer gleich sein müssen. Bei einem total dissoziiertem Salz ist i also einfach die Salzkonzentration. Wird durch die Bildung von S_{III} nur wenig von J verbraucht, so ist also s_{III} immer proportional a . Es ist sehr wohl möglich, daß das Anionkationsalz in manchen Fällen quantitativ eine Rolle spielt. Die Löslichkeit der Globuline in Salzen, selbst beim isoelektrischen Punkt, würde sich vielleicht, wenn auch nicht notwendigerweise, aus einer solchen Reaktion erklären. Ihre quantitative Einbeziehung in die Theorie ist aber so schwierig, daß man sich

erst dann zur Berechnung derselben entschließen wird, wenn sich experimentell die Notwendigkeit herausstellt. Aber selbst in Berücksichtigung der Salzlöslichkeit des Globulins liegen durchaus noch keine zwingenden Gründe für die Annahme einer bedeutenden Bildung des Anionkationsalzes vor. Die Löslichkeit des Globulins in ClNa könnte man ebensogut dadurch erklären, daß sich gleichzeitig Globulinchlorid und Globulinnatrium bildet. Ich lasse deshalb diese Molekül-gattung für die analytische Formulierung noch außer Betracht und möchte nur noch hervorheben, daß die Lage von ρ_{\max} des isoelektrischen Punktes durch sie nicht verändert wird, und alle Funktionen, die ohne sie berechnet sind, durchaus Punkt für Punkt symmetrisch sind mit denjenigen, die mit ihrer Berücksichtigung berechnet werden könnten.

Versuchen wir, den Inhalt der wesentlichsten Ergebnisse zusammenzufassen, so ergibt sich folgendes:

Der Dissoziationszustand einer Säure, einer Base oder eines Ampholyten wird durch die Anwesenheit von Ionen beeinflusst, wenn Affinität zu ihnen besteht, infolge der Salzbildung. Außer dem Dissoziationsgrad und dem Dissoziationsrest muß man noch den „Salzgrad“ in Rechnung ziehen. Die letztere Funktion hat eine neue charakteristische Form; die beiden ersten werden durch Salzgegenwart verschoben und mehr oder weniger deformiert. Der isoelektrische Punkt eines Ampholyten braucht bei Gegenwart von Salzen nicht mehr identisch zu sein mit dem Maximum des Dissoziationsrestes; er muß vielmehr als diejenige λ definiert werden, bei welcher der „Ladungsgrad“ = 0 ist. Diese Funktion wird definiert als die Summe der im elektrischen Strom nach der Kathode wandernden Ionenmenge, im Verhältnis zu der unter gleichen Bedingungen zur Kathode wandernden Ionenmenge für den Fall, daß der Ampholyt nur in Form von Kationen zugegen ist; zur Anode wandernde Ionenmengen werden dabei negativ gerechnet. Alle Betrachtungen gelten zunächst nur für echte Lösungen.

Vergleichende Untersuchungen über die hämolytische Wirkung einiger Chlorderivate des Methans, Äthans und Äthylens.

Von
W. Plötz.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin
[Direktor: Geheimrat Professor Dr. Heffter].)

(Eingegangen am 9. Januar 1920.)

Das Bekanntwerden mehrfacher Todesfälle bei der Anwendung des Chloroforms als allgemeines Anästhetikum hatte seit seiner Einführung in die ärztliche Praxis durch Simpson im Jahre 1847 für lange Zeit immer von neuem den Wunsch nach einem qualitativ gleichwertigen Körper von weniger toxischer Wirkung wach erhalten. In dieser Hoffnung wurden zahlreiche chemische Verwandte unter den Chlor- und Bromderivaten des Methans und Äthans versucht: unter ihnen nenne ich das Dichlormethan, Äthylenchlorid und Äthylidenchlorid. Jene Verbindungen decken sich nach Eigenschaften und pharmakologischer Wirkung im wesentlichen mit dem Chloroform. Wenn die Chloroformnarkose auch heute noch in seltenen Ausnahmen tödlich verläuft, so müssen diese Ausgänge, wie sie besonders bei Beginn der Narkose ohne befriedigende Erklärung beobachtet werden, wohl als unvermeidliche Zufälle hingenommen werden. Andererseits haben gerade die so gefürchteten toxischen Wirkungen des Chloroforms zu vielen eingehenden Studien Anlaß gegeben, und der genauen Würdigung ihrer Ergebnisse, verbunden mit einer stetig verfeinerten Technik, ist es zu danken, wenn im allgemeinen heutzutage die Gefahren bei der Anwendung des Chloroforms zur allgemeinen Anästhesie

als beseitigt gelten können. Nicht zum wenigsten ist dieser Umstand, daß man es gelernt hat, die üblen Zufälle bei der Narkose hintanzuhalten, auch die Ursache dafür, daß das Chloroform den Wettstreit mit immer neu auftauchenden Konkurrenzprodukten stets zu seinen Gunsten entschied.

Dagegen ist um die Wende dieses Jahrhunderts von der chemischen Industrie die praktische Brauchbarkeit einiger chlorierter Kohlenwasserstoffe für besondere technische Bedürfnisse erkannt, und ihre spezifisch nützlichen Eigenschaften haben ihnen sehr bald ein ausgedehnteres Anwendungsgebiet geschaffen. Sie haben sich in der Extraktionstechnik, in der Lack- und Farbenindustrie, sowie als Lösungsmittel für Fette, Öle, Harze u. dgl. eingeführt. Von der sozialen und fabrikyhygienischen Seite betrachtet, beanspruchen diese Körper bei ihrer größeren oder geringeren Schädlichkeit für den Organismus auch erneutes wissenschaftliches Interesse. Ich habe unter diesem Gesichtspunkte einige der hierher gehörigen Körper in ihrem Verhalten gegen rote Blutkörperchen untersucht. Es sollte speziell die hämolytische Wirkung der hier in Frage kommenden Chlorverbindungen verglichen und festgestellt werden, ob die Zahl der Halogenatome im Molekül die hämolytische Wirkung erhöht. In bezug auf die narkotische Wirkung wird allgemein angenommen, daß mit dem Eintritt von Chloratomen in das Molekül ihre Wirksamkeit auf das Zentralnervensystem zunimmt. So schreibt z. B. S. Fränkel¹⁾: „Die narkotische Wirkung des Chloroforms ist chemisch lediglich auf den Chlorgehalt zu beziehen; auch eine vergleichende Betrachtung der folgenden Reihe beweist dies:

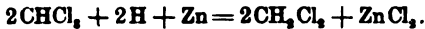
Methan CH_4 ist wirkungslos,
 Methylchlorid CH_3Cl schwach narkotisch,
 Methylenbichlorid CH_2Cl_2 stärker narkotisch,
 Chloroform CHCl_3 narkotisch,
 Tetrachlorkohlenstoff CCl_4 narkotisch.

In dieser Reihe steigt die Intensität der narkotischen Wirkungen und ebenso die Nachhaltigkeit derselben mit der Zunahme der Chloratome.“

¹⁾ Sigmund Fränkel, Die Arzneimittelsynthese, 4. Aufl. Berlin 1919, 455.

Ich stelle zunächst das, was in der Literatur über die hier untersuchten Körper bekannt und für meine Arbeit von einigem Wert ist, kurz voran.

Das Dichlormethan oder Methylenchlorid CH_2Cl_2 stellt sich dem Chloroform unmittelbar zur Seite. 1867 wurde es von Richardson¹⁾ als Anästheticum empfohlen und längere Zeit in England dem Chloroform vorgezogen. Reines Methylenchlorid wurde zuerst von Pannhoff²⁾ untersucht. Methylenchlorid ruft analog dem Chloroform ein Exzitationsstadium hervor und wirkt verlangsamen auf Atmung und Herzaktion, jedoch mit dem Unterschiede, daß diese deletäre Wirkung beim Chloroform sich schneller und stärker ausprägt. Das Dichlormethan wird aus Chloroform durch reduzierende Mittel (meist Zink) dargestellt, indem man allmählich Salzsäure auf ein Gemisch von Zink, Alkohol und Chloroform aufgießen läßt. Die Reaktion geht in der Hauptsache vor sich nach der Gleichung:



Der Alkohol dient nur dazu, um eine allzu stürmische Einwirkung des Wasserstoffs in statu nascendi zu vermeiden: $\text{Zn} + 2\text{HCl} = \text{ZnCl}_2 + 2\text{H}$.

Das Dichlormethan bildet eine farblose, chloroformartig riechende Flüssigkeit vom spez. Gew. 1,3222, ihr Siedepunkt liegt bei 40 bis 41°.

Simpson³⁾ entdeckte die anästhesierende Eigenschaft des Tetrachlormethans (Tetrachlorkohlenstoff), CCl_4 . Nach Untersuchungen von Smith⁴⁾, Sanson und Nunneley⁵⁾ soll es für leichte Narkosen brauchbar sein, bei längerer Anwendung gefährlich werden, da seine therapeutische Wirkungsbreite zu gering ist. Während es Heuslers⁶⁾ Angaben zufolge für die Atmung besonders gefährlich ist, beobachteten die Engländer vornehmlich Herzwirkung. In der Technik findet es Verwendung vorwiegend als Lösungsmittel. K. B. Lehmann⁷⁾ berichtet 2 Fälle, die bei seiner Verwendung toxische Wirkungen veranlaßt haben. Der Symptomenkomplex bei Intoxikationen ähnelt durchaus dem nach Chloroform beobachteten. Tetrachlormethan ist teilweise unter dem Namen „Benziniform“ im Handel. Die fabrikmäßige Darstellung erfolgt nach zwei Methoden. Entweder leitet man Chlor in Schwefelkohlenstoff

¹⁾ Richardson, Med. Times and Gaz. 1867, Nr. 908, zitiert n. Hermann, Lehrb. d. experim. Toxikologie. Berlin 1874, 277.

²⁾ W. Pannhoff, Inaug.-Diss. Leipzig 1881.

³⁾ Simpson, Med. Times 1865, Nr. 807, zitiert nach Hermann, Lehrb. d. experim. Toxikologie. Berlin 1874, 277.

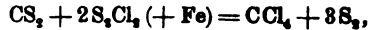
⁴⁾ Protheroe Smith, Lancet 1867, 792, zitiert n. A. J. Kunkel, Handb. d. Toxikologie. Jena 1899, 452.

⁵⁾ Sanson u. Nunneley, Brit. med. Journ. 1867, Nr. 349, zitiert n. Hermann, Lehrb. d. experim. Toxikologie. Berlin 1874, 277.

⁶⁾ O. Heusler, Inaug.-Diss. Bonn 1891.

⁷⁾ K. B. Lehmann, Arch. f. Hygiene 74, 1911.

und trennt das entstehende CCl_4 und S_2Cl_2 durch fraktionierte Destillation oder man gewinnt es nach der Formel



wohei das Eisen nur als Kontaksubstanz wirksam ist. Beide Verfahren bieten nach Lehmanns Mitteilungen (s. a. O.) im chemischen Großbetriebe keine Schädigungen für die Arbeiter. Das Tetrachlormethan ist eine wasserhelle Flüssigkeit von chloroformähnlichem Geruch, die bei 76 bis 77° siedet. Sein spezifisches Gewicht beträgt 1,5947.

Äthylidenchlorid $\text{CH}_2 \cdot \text{CHCl}_2$ ist auch am Menschen als Inhalationsanästheticum versucht worden. Indessen ist der angeblich geringen Herzwirkung gegenüber dem Chloroform widersprochen. Die hierdurch beobachteten üblen Zufälle und die starke Exzitation haben das Mittel wieder in Vergessenheit geraten lassen. Über die technische Verwendung dieses Körpers ist in der Literatur nichts bekannt. Er wird jetzt als Nebenprodukt bei der Chloralbereitung gewonnen. Sein spezifisches Gewicht beträgt 1,1750, der Siedepunkt liegt bei 59°.

Isomer mit diesem Körper ist das symmetrische Dichloräthan oder Äthylendichlorid $\text{CH}_2\text{Cl} \cdot \text{CH}_2\text{Cl}$, das sich von dem vorigen nicht nur durch seinen Aufbau, sondern auch in seinen Eigenschaften und Wirkungen unterscheidet. Der Dampf des Dichloräthan verursacht Hornhauttrübungen¹⁾. Die Darstellung erfolgt aus Äthylen und Chlor. Spezifisches Gewicht = 1,2521. Die farblose chloroformartig riechende Flüssigkeit siedet bei 83,5°.

Von besonderer Bedeutung ist das Acetylentetrachlorid oder Tetrachloräthan, $\text{CHCl}_2 \cdot \text{CHCl}_2$. Diese teils chloroform- und mehr campherartige Flüssigkeit siedet bei 147°, hat ein spezifisches Gewicht von 1,6002 und wird dargestellt aus Acetylen und Chlor unter Verwendung von Eisen als Kontaksubstanz: $\text{C}_2\text{H}_2 + \text{Cl}_2 = \text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$. Seines hohen Siedepunktes wegen eignet es sich nicht für Extraktionszwecke. Hingegen steht es als Lösungsmittel für Harze, Kautschuk in seinen technisch besonders wertvollen Eigenschaften bis jetzt unübertroffen da und dient, da es weder brennbar noch explosiv ist, als Ersatz für das feuergefährliche Benzin, Benzol, Terpentin usw. zur Herstellung von Lacken. Diese mittels Acetylentetrachlorid hergestellten Lacke lassen sich nach den Mitteilungen Lederers²⁾ „ausgezeichnet auftragen und verstreichen, ohne dabei Ränder und Streifen zu bilden; sie decken vorzüglich und liefern, selbst bei feuchter Atmosphäre verdunstet, dauerhafte Schichten von hohem Glanz“. Zur Auflösung der Zelluloseacetate, die ein Imprägnierungsmittel „*κατ' ἐξοχήν*“ für Stoffe aller Art darstellen und sich deshalb in hervorragender Weise für die Herstellung wasserdichter Überzüge eignen, kommt neben dem Acetylentetrachlorid ausschließlich das Chlo-

¹⁾ R. Dubois, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 107, 482, 1888; 108, 191, 1889.

²⁾ Panas, ebendas. 107, 921, 1888.

³⁾ Leonh. Lederer, Chem. Centralbl. 2, 1544, 1906.

reform in Frage. Außer seinem hohen Preise verlangt es besondere Schutzvorrichtungen für die Arbeiter, während der hohe Siedepunkt von 147° beim Acetylentetrachlorid ein offenes Arbeiten mit diesem Körper als unschädlich gestatten sollte. Vor allem aber schädigte bei den chloroformhaltenden Lacken die niedergeschlagene Luftfeuchtigkeit Haltbarkeit und Glanz der erzielten Lackschicht.

Hatte Lehmann in seinen „experimentellen Studien über den Einfluß technisch und hygienisch wichtiger Gase und Dämpfe auf den Organismus“ schon 1911 eine sehr viel größere Giftigkeit des Tetrachloräthans gegenüber anderen gechlorten Kohlenwasserstoffen gefunden und gerade das offene Hantieren¹⁾ mit diesem Körper nach dem Begriff der ein- und zweiphasigen Giftigkeit an der Narkose gemessen als 3- bis 4mal so gefährlich berechnet wie das mit Perchloräthylen — nach anderer Angabe²⁾ wirkt es doppelt so stark narkotisch wie Trichloräthylen; Veley³⁾ hat seine Giftigkeit 4mal so groß gefunden wie die des Chloroforms, — so nahm die Industrie diese Erfahrungen nicht zum Anlaß, trotz nachgewiesener Gefährlichkeit auf ein Mittel zu verzichten, für das nach ihrer Kenntnis ein gleichwertiger Ersatz nicht vorhanden war. Das um so mehr, als es sich in der Flugzeugtechnik um einen Zweig unserer Industrie handelte, der kurz vor und besonders im Anfange des Krieges ausschlaggebende Bedeutung hatte. In den Flugzeugfabriken wurden nach Grimms⁴⁾ Feststellungen Flügel und teilweise auch Körper der Flugzeuge mit Stoff bespannt und auf diese Flächen ein Lack, eben eine in Acetylentetrachlorid gelöste Zelluloseverbindung, aufgetragen. Der Lack „imprägnierte den Stoff vollständig, bildete eine glatte Oberfläche, was zur Vermeidung jeder unnötigen Reibung beim Durchschneiden der Luft notwendig ist, und bewirkte Wetterbeständigkeit, Wasser- und Luftundurchlässigkeit“. Diese zu jener Zeit umfangreiche Verwendung des Acetylentetrachlorids führte 1914 zu den ersten bekannt gewordenen gewerblichen Vergiftungen durch diesen Körper. Wie Grimm (a. a. O.) berichtet, waren damals in einer der größten Flugzeugfabriken von 15 mit dem Imprägnieren unmittelbar beschäftigten Lackierern alle bis auf einen Mann krank. Zwei von diesen starben sogar infolge der Einwirkung des Acetylentetrachlorids. Mit Bezug auf einen dieser Fälle sagt Grimm: „Es ist besonders bezeichnend für die Giftigkeit der Substanz, daß ein zweimaliges Arbeiten von je 2 Wochen mit einem dazwischen liegenden Intervall von 14 Tagen genügt hat, um den Mann nach einem Monat zu töten“.

¹⁾ K. B. Lehmann, Arch. f. Hygiene 74, 59, 1911.

²⁾ Chemische Fabriken Griesheim-Elektron-Frankfurt a. M., Acetylentetrachlorid und seine Derivate als Lösungs- und Extraktionsmittel. Chem.-Zeitg. 21, 256, 1908.

³⁾ Veley, Proc. Roy. Soc., London 1910, Jan.

⁴⁾ V. Grimm, A. Heffter und G. Joachimoglu, Gewerbliche Vergiftungen in Flugzeugfabriken, Vierteljahrschrift f. gerichtl. Medizin und öffentl. Sanitätswesen 49, 2. Suppl., 161, 1914.

Diese Beobachtungen in praxi haben Heffter und Joachimoglu (a. a. O.) zu eingehenderen Versuchen zur Kenntnis der bis dahin wenig studierten pharmakologischen Wirkung des Tetrachloräthans angeregt. Es zeigten sich hierbei stets die gleichen Vergiftungssymptome, gleichgültig, ob die giftigen Dämpfe eingeatmet oder der flüssige Körper subcutan injiziert wurde. Gleichzeitig wurde die Möglichkeit einer percutanen Aufnahme des Giftes wahrscheinlich gemacht. Von der Narkose abgesehen, ist die Giftwirkung im besonderen gekennzeichnet durch Gewichtsabnahme bis zu 30% des Körpergewichts bei Beginn des Tierversuches, durch Erbrechen, Durchfälle, das regelmäßige Auftreten von Eiweiß und Gallenfarbstoff im Harn, bisweilen auch von Hämoglobinurie. Das Blut ist im Sinne der Oligocythämie verändert. Aus den Sektionsbefunden ist die starke Fettinfiltration der Leber und Blutungen in den verschiedensten Organen (Magen, Darm, Blasen-schleimhaut, Herzmuskulatur) bemerkenswert. Heffter und Joachimoglu kommen zu dem Ergebnis, daß das Tetrachloräthan ein Stoffwechsellgift ist, das zu intensiven Organverfettungen führt, in seiner pharmakologischen Wirkung dem Chloroform sehr ähnlich ist und sich im wesentlichen nur quantitativ unterscheidet. Nach ihnen wirkt es 7,8mal stärker hämolyzierend als Chloroform.

Hexachloräthan, $\text{CCl}_2 \cdot \text{CCl}_2$, ist ein krystallinischer Körper von campherartigem Geruch. Der Schmelzpunkt liegt bei 185° , sein spezifisches Gewicht beträgt 2,091. Die Substanz besitzt gegenwärtig mehr theoretisches Interesse. Ihre Darstellung erfolgt aus Tetrachlormethan, unter das bei 70° oberflächlich amalgamiertes Aluminium gebracht wird, oder durch Zusammenbringen von Chlor und Acetylen bei Quarzquecksilberlampenlicht (als Katalysator) und Anwendung von 400% der theoretisch berechneten Menge Chlor:



Das Acetylendichlorid, Dichloräthylen $\begin{array}{c} \text{CHCl} \\ \parallel \\ \text{CHCl} \end{array}$ ist flüssig, chloroform-ähnlich riechend und siedet bei 55° . Spezifisches Gewicht = 1,25. Es wird durch Erhitzen von symmetrischem Tetrachloräthan mit Zinkstaub gewonnen:



In der Medizin wird Acetylendichlorid als Dioform¹⁾ an Stelle des Chloroforms für die Narkose empfohlen, ist jedoch am Menschen noch nicht genügend geprüft.

Zwei letal verlaufene Fälle raten nach Fränkel zur Vorsicht. Technisch findet der Körper Verwendung als Lösungs- und Extraktionsmittel für Fette und Öle.

Als Konkurrenzprodukt des Tetrachlorkohlenstoffs wird das Tri-

¹⁾ Villinger, Arch. f. klin. Chir. 1907, Nr. 3. — Wittgenstein, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 82, 235, 1918.

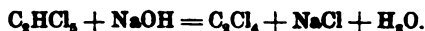
chloräthylen $\text{CHCl}_2\text{-CCl}_2$, hergestellt, das durch alkalische Verseifung aus Tetrachloräthan gewonnen wird:



Der Körper wird in neuerer Zeit, da er weder brennbar noch explosiv und völlig ungefährlich ist, überall da empfohlen, wo die bisher gebräuchlichen, wegen ihrer Entzündlichkeit aber gefährlichen Lösungs- und Extraktionsmittel nicht verwendet werden dürfen. Deshalb wird es als Ersatz für Benzin, Benzol, Schwefelkohlenstoff u. a. in der Extraktionstechnik, für die Entfettung von Schaf- und Baumwolle, für chemische Wäschereien, zur Entfettung der Abfälle und Rückstände der Fisch-, Leder-, Leim- und Stearinindustrie sowie zur Gewinnung von Schwefel aus schwefelhaltigen Rückständen und zur Gewinnung von Ölen und Fetten aus Ölrückständen, Palmkernen, Raps und dergl. empfohlen.

Das Trichloräthylen ist eine leicht bewegliche chloroformähnliche Flüssigkeit, die bei 88° siedet. Sein spezifisches Gewicht beträgt 1,47. Nach angestellten Tierversuchen übertrifft die narkotische Wirkung des Trichloräthylens die des Tetrachlorkohlenstoffs um das Mehrfache¹⁾.

Perchloräthylen, Tetrachloräthylen C_2Cl_4 wird technisch durch alkalische Verseifung von Pentachloräthan dargestellt:



Die wasserklare Flüssigkeit hat eigenartigen, teils an Chloroform, teils an Campher erinnernden Geruch und siedet bei 121° . Spezifisches Gewicht = 1,619. Seine Giftigkeit ist nach Lehmanns (a. a. O.) Angabe gering. Verwendung findet es als Lösungsmittel für Fette und Öle sowie in der Extraktionstechnik vornehmlich für Stoffe, die höhere Temperaturen erfordern.

Dem Tetrachloräthan in Eigenschaften und Verwendung ähnlich ist das Pentachloräthan C_5HCl_5 . Seine Darstellung geschieht in der beim Hexachloräthan bereits angegebenen Form, indem Chlor und Acetylen bei Quarzquecksilberlampenlicht zusammengebracht werden. Unter Anwendung von 110%, der theoretisch berechneten Menge Chlor ergibt sich folgende Umsetzung:



Der flüssige Körper siedet bei 159° , sein spezifisches Gewicht beträgt 1,6926. Auch er dient vorwiegend als Lösungsmittel in der Lack- und Farbenindustrie und zur Entfettung von Metallgegenständen in der Metallindustrie.

Soweit über die Wirkungsweise dieser chemischen Körper Untersuchungen vorliegen, beschränken sie sich fast ausschließlich darauf, ihre Eigenschaften am Tierexperiment zu studieren

¹⁾ Chemische Fabriken Griseheim-Elektron-Frankfurt a. M., Acetylen-tetrachlorid und seine Derivate als Lösungs- und Extraktionsmittel, Chem.-Zeitg. 21, 256, 1908.

und ihre eventuelle Gefährlichkeit aus der erkennbaren Schädigung wichtiger animaler Funktionen und der lebenswichtigen Vorgänge, Respiration und Herzaktion, herzuleiten. Daß damit ihre physiologische Wirkung sich nicht zu erschöpfen braucht, lehrt das Beispiel des Chloroforms. Seine Fähigkeit, Blut lackfarben zu machen, die den meisten Narkoticis der Fettreihe eigen ist, habe ich benutzt, um unter gleichen Bedingungen die obengenannten Körper in ihrem Verhalten gegen rote Blutkörperchen zu prüfen. Innerhalb jeder Versuchsreihe mußten sich so quantitative, untereinander vergleichbare Feststellungen über die Giftigkeit der untersuchten Verbindungen gewinnen lassen.

Die chemischen Körper wurden in ausreichender Reinheit von C. A. F. Kahlbaum, Berlin, und E. Merck, Darmstadt, bezogen. Das von Dr. Alexander Wacker zur Verfügung gestellte Trichloräthylen und Pentachloräthylen mußten, um eventuelle, für sich hämolytisch wirkende Verunreinigungen auszuschließen, vor dem Gebrauch durch einfache Destillation gereinigt werden.

Die Wasserlöslichkeit dieser Verbindungen ist durchgehend gering; sie war für einige von ihnen noch nicht bekannt. Soweit sie bereits bestimmt war, wurde sie unter Anlehnung an die Literaturangaben empirisch in der Weise gefunden, daß ein Liter destillierten Wassers mit einer abgemessenen Menge der betreffenden Substanz 2 Stunden lang geschüttelt und dann beobachtet wurde, ob diese vollkommen in Lösung gegangen war oder nicht. Mit vermehrter oder verminderter Menge wurden dann diese Versuche so lange wiederholt, bis die Grenzkonzentration erreicht war. Als Sättigungswert wurde die höchste, sich gerade noch klar lösende Menge an Substanz im Liter angenommen. Diese Ausgangslösungen wurden auf einen Kochsalzgehalt von 0,9% gebracht und aus ihnen durch entsprechende Zusätze von NaCl-Lösung die aus den Tabellen (Spalte 1 und 2) ersichtlichen, stufenweise ansteigenden Verdünnungen hergestellt. Jedes Röhrchen enthielt 3 ccm Lösung (+ 1 ccm Blutkörperchenaufschwemmung). Beim Dichloräthylen (Tabelle XI) beträgt der Gehalt an Substanz ungefähr 1,0 ccm im Liter. Genau ließ er sich nicht ermitteln, da es sich bei ihm um einen leicht zersetzlichen Körper handelt. Beim Stehen

der Lösung erhielt ich stets einen geringen Niederschlag, der sich als Chlorverbindung erwies.

Zu meinen Hämolyseversuchen verwandte ich teils im Institut selbstgewonnenes Meerschweinchenblut, teils Rinderblut, das vom Schlachthof frisch bezogen wurde. Von dem defibrinierten Blut wurden 5 ccm durch sorgfältiges Zentrifugieren gewaschen und dann mit physiologischer Kochsalzlösung auf 100 ccm aufgefüllt. Jedem Röhrchen wurde 1 ccm dieser 5%igen Blutverdünnung zugesetzt, das Röhrchen geschüttelt und nach 15', 2^h und 24^h beobachtet.

Der Grad der während dieser Zeitabschnitte eingetretenen Hämolyse wurde danach beurteilt, ob die Schrift eines hinter den Reagensglasänder gehaltenen Zeitungsblattes mehr oder weniger deutlich erkannt werden konnte. Dementsprechend wurde die vollständige Lyse mit +++, die unvollständige Lyse mit ++ und eine leichte Lyse mit + bezeichnet.

Bei allen Versuchen betrug die Zimmertemperatur 18 bis 20°.

Tabelle I.

1. Versuch mit Dichlormethan CH₂Cl₂.

Meerschweinchenblut.

(28. VII. 1919.)

Siedepunkt = 40 bis 41°

Mol. Gew. = 84,94

Spez. Gew. = 1,322

NaCl-Lösung 0,9% ccm	CH ₂ Cl ₂ -Lösg. 10:1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentr. der Lösg. in Gew.-%	Mole im Liter	Tropfenzahl ¹⁾ Stalagm. I n. Traube	Tropfenzahl ²⁾ Stalagm. II n. Traube	Hämolyse nach		
							15'	2 ^h	24 ^h
—	3,0	1	0,99	0,117	18,74	52,46	—	+++	+++
0,5	2,5	1	0,83	0,097	18,68	—	—	+++	+++
1,0	2,0	1	0,66	0,078	18,35	—	—	—	+++
1,5	1,5	1	0,50	0,058	18,29	—	—	—	+++
2,0	1,0	1	0,33	0,039	18,20	—	—	—	+
3,0	—	1	—	—	(18,02)	52,09	—	—	—

1) Näheres über die in Spalte 6 und 7 zusammengestellten stalagmetrischen Versuche findet sich S. 266 ff.

Tabelle II.

1. Versuch mit Chloroform CHCl_3 .

Meerschweinchenblut.

(28. VII. 1919.)

Siedepunkt = 60 bis 62°

Mol. Gew. = 119,39

Spez. Gew. = 1,489

NaCl-Lösung 0,9% ccm	CHCl_3 -Lösung 5:1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentr. der Lösung in Gew.-%	Mole im Liter	Tropfenzahl Stalagn. I n. Traube	Tropfenzahl Stalagn. II n. Traube	Hämolyse nach		
							15'	2 ^a	24 ^a
—	3,0	1	0,56	0,047	18,83	52,84	+	+++	+++
0,5	2,5	1	0,47	0,089	18,75	52,56	—	+++	+++
1,0	2,0	1	0,37	0,081	18,67	52,46	—	+	+++
1,5	1,5	1	0,29	0,024	18,59	52,57	—	—	++
2,0	1,0	1	0,19	0,016	18,46	52,30	—	—	+
3,0	—	1	—	—	(18,02)	(52,09)	—	—	—

Tabelle III.

1. Versuch mit Tetrachlormethan CCl_4 .

Meerschweinchenblut.

(28. VII. 1919.)

Siedepunkt = 76 bis 77°

Mol. Gew. = 153,84

Spez. Gew. = 1,5947

NaCl-Lösung 0,9% ccm	CCl_4 -Lösung 0,5:1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-%	Mole im Liter	Tropfenzahl Stalagn. II n. Traube	Hämolyse nach		
						15'	2 ^a	24 ^a
—	3,0	1	0,06	0,004	52,10	—	—	++
0,5	2,5	1	0,05	0,0032	—	—	—	++
1,0	2,0	1	0,04	0,0026	—	—	—	+++ (?)
1,5	1,5	1	0,03	0,0020	—	—	—	—
3,0	—	1	—	—	52,09	—	—	—

Tabelle IV.

1. Versuch mit Äthylenchlorid $\begin{matrix} \text{CH}_2\text{Cl} \\ | \\ \text{CH}_2\text{Cl} \end{matrix}$.

Meerschweinchenblut.

(28. VII. 1919.)

Siedepunkt = 83,5°

Mol. Gew. = 98,95

Spez. Gew. = 1,2521

NaCl-Lösung ccm	C ₂ H ₄ Cl ₂ -Lsg. 6,8 : 1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentr. der Lsg. in Gew.-%	Mole im Liter	Tropfenzahl Stalagn. I n. Traube	Tropfenzahl Stalagn. II n. Traube	Hämolyse nach		
							15'	2 ^h	24 ^h
—	8,0	1	0,64	0,065	19,62	54,82	—	+	+++
0,5	2,5	1	0,53	0,054	19,25	—	—	—	++
1,0	2,0	1	0,43	0,043	19,16	—	—	—	—
3,0	—	1	—	—	(18,02)	(52,09)	—	—	—

Tabelle V.

1. Versuch mit Äthylendichlorid $\begin{matrix} \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CHCl}_2 \end{matrix}$.

Meerschweinchenblut.

(28. VII. 1919.)

Siedepunkt = 59°

Mol. Gew. = 98,95

Spez. Gew. = 1,175

NaCl-Lösung 0,9% ccm	C ₂ H ₄ Cl ₂ -Lsg. 3,5 : 1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-%	Mole im Liter	Tropfenzahl Stalagn. II n. Traube	Hämolyse nach		
						15'	2 ^h	24 ^h
—	3,0	1	0,31	0,031	52,82	—	+	+++
0,5	2,5	1	0,26	0,027	—	—	—	++
1,0	2,0	1	0,21	0,021	—	—	—	—
3,0	—	1	—	—	(52,09)	—	—	—

Tabelle VI.

1. Versuch mit Acetylantetrachlorid $\begin{matrix} \text{CHCl}_2 \\ | \\ \text{CHCl}_2 \end{matrix}$

Meerschweinchenblut.

(28. VII. 1919.)

Siedepunkt = 147°

Mol. Gew. = 167,9

Spez. Gew. = 1,6002

NaCl-Lösung 0,9%	C ₂ H ₃ Cl ₅ -Lösung. 1,25 : 1000	Blut 5%	Konzentr. der Lösung in Gew.-%	Mole im Liter	Tropfenzahl Stalagm. I n. Traube	Tropfenzahl Stalagm. II n. Traube	Hämolyse nach		
							ccm	ccm	ccm
—	3,0	1	0,15	0,0089	18,95	53,77	+++	+++	+++
0,5	2,5	1	0,125	0,0075	18,78	—	—	+++	+++
1,0	2,0	1	0,10	0,006	18,70	—	—	+	+++
1,5	1,5	1	0,075	0,0045	18,64	—	—	—	+++
2,0	1,0	1	0,05	0,003	18,60	—	—	—	+
3,0	—	1	—	—	(18,02)	(52,09)	—	—	—

Tabelle VII.

1. Versuch mit Hexachloräthan $\begin{matrix} \text{OCl}_2 \\ | \\ \text{CCl}_2 \end{matrix}$

Meerschweinchenblut.

(28. VII. 1919.)

Schmelzpt. = 185°

Mol. Gew. = 236,76

Spez. Gew. = 2,091

NaCl-Lösung 0,9%	C ₂ Cl ₆ -Lösung 0,01 : 1000	Blut 5%	Konzentr. der Lösung in Gew.-%	Mole im Liter	Tropfenzahl Stalagm. I n. Traube	Tropfenzahl Stalagm. II n. Traube	Hämolyse nach		
							ccm	ccm	ccm
—	3,0	1	0,0016	0,000066	18,16	52,26	—	—	+(?)
0,5	2,5	1	0,0013	0,000055	18,15	—	—	—	—
1,0	2,0	1	0,0010	0,000044	18,14	—	—	—	—
3,0	—	1	—	—	(18,02)	52,09	—	—	—

Tabelle VIII.

2. Versuch mit Dichlormethan CH_2Cl_2 .

Frisches Rinderblut.

(27. IX. 1919.)

Siedepunkt = 40 bis 41°

Mol. Gew. = 84,94

Spez. Gew. = 1,3222

NaCl-Lösung 0,9% ccm	CH_2Cl_2 - Lösung 10 : 1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew. %	Mole im Liter	Hämolyse nach		
					15'	2 ^h	24 ^h
—	3,0	1	0,99	0,117	++	+++	+++
0,5	2,5	1	0,83	0,097	+	+++	+++
1,0	2,0	1	0,66	0,078	—	+++	+++
1,5	1,5	1	0,50	0,058	—	+	+++
2,0	1,0	1	0,33	0,039	—	—	++
2,5	0,5	1	0,17	0,019	—	—	—
2,8	0,2	1	0,07	0,008	—	—	—
3,0	—	1	—	—	—	—	—

Tabelle IX.

2. Versuch mit Chloroform CHCl_3 .

Frisches Rinderblut.

(27. IX. 1919.)

Siedepunkt = 60 bis 62°

Mol. Gew. = 119,39

Spez. Gew. = 1,489

NaCl-Lösung 0,9% ccm	CHCl_3 Lösung 5 : 1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew. %	Mole im Liter	Hämolyse nach		
					15'	2 ^h	24 ^h
—	3,0	1	0,56	0,047	+	++	+++
0,5	2,5	1	0,47	0,039	—	+	+++
1,0	2,0	1	0,37	0,031	—	—	+++
1,5	1,5	1	0,29	0,024	—	—	++
2,0	1,0	1	0,19	0,016	—	—	+
2,5	0,5	1	0,09	0,008	—	—	—
2,8	0,2	1	0,04	0,003	—	—	—
3,0	—	1	—	—	—	—	—

Tabelle X.

2. Versuch mit Tetrachlormethan CCl_4 .

Frisches Rinderblut.

(27. IX. 1919.)

Siedepunkt = 76 bis 77°

Mol. Gew. = 158,84

Spez. Gew. = 1,5947

NaCl-Lösung 0,9% ccm	CCl_4 - Lösung 0,5:1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-%	Mole im Liter	Hämolyse nach		
					15'	2 ^h	24 ^h
—	3,0	1	0,06	0,004	—	—	+++
0,5	2,5	1	0,05	0,0032	—	—	+++
1,0	2,0	1	0,04	0,0026	—	—	+++
1,5	1,5	1	0,03	0,0020	—	—	+++
2,0	1,0	1	0,02	0,0018	—	—	++
2,5	0,5	1	0,01	0,0006	—	—	—
2,8	0,2	1	0,004	0,0003	—	—	—
3,0	—	1	—	—	—	—	—

Tabelle XI.

1. Versuch mit Acetylendichlorid $\begin{matrix} \text{CHCl} \\ \parallel \\ \text{CHCl} \end{matrix}$.

Frisches Rinderblut.

(27. IX. 1919.)

Siedepunkt = 55°

Mol. Gew. = 96,94

Spez. Gew. = 1,25

NaCl-Lösung 0,9% ccm	$\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_2$ -Lösung ca. 1,0:1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-%	Mole im Liter	Tropfenzahl Stalagn. II n. Traube	Hämolyse nach		
						15'	2 ^h	24 ^h
—	3,0	1	0,0094	0,0097	52,24	—	—	—
0,5	2,5	1	0,0078	0,0081	—	—	—	—
1,0	2,0	1	0,0063	0,0065	—	—	—	—
3,0	—	1	—	—	(52,09)	—	—	—

Tabelle XII.

1. Versuch mit Tetrachloräthylen $\begin{matrix} \text{CCl}_4 \\ || \\ \text{CCl}_2 \end{matrix}$

Frisches Rinderblut.

(27. IX. 1919.)

Siedepunkt = 121°

Mol. Gew. = 165,84

Spez. Gew. = 1,619

NaCl-Lösung 0,9% ccm	C ₂ Cl ₄ -Lösung 0,05 : 1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-%	Mole im Liter	Tropfenzahl Stalagn. II n. Traube	Hämolyse nach		
						15'	2 ^h	24 ^h
—	3,0	1	0,006	0,00037	52,20	—	—	—
0,5	2,5	1	0,0051	0,00031	—	—	—	—
3,0	—	1	—	—	(52,09)	—	—	—

Tabelle XIII.

2. Versuch mit Äthylenchlorid $\begin{matrix} \text{CH}_2\text{Cl} \\ | \\ \text{CH}_2\text{Cl} \end{matrix}$

Frisches Rinderblut.

(27. IX. 1919.)

Siedepunkt = 83,5°

Mol. Gew. = 98,95

Spez. Gew. = 1,2521

NaCl- Lösung 0,9% ccm	C ₂ H ₄ Cl ₂ - Lösung 6,8 : 1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-%	Mole im Liter	Hämolyse nach		
					15'	2 ^h	24 ^h
—	3,0	1	0,64	0,065	—	+++	+++
0,5	2,5	1	0,53	0,054	—	+	+++
1,0	2,0	1	0,43	0,043	—	—	+++
1,5	1,5	1	0,32	0,032	—	—	++
2,0	1,0	1	0,21	0,022	—	—	—
3,0	—	—	—	—	—	—	—

Tabelle XIV.

2. Versuch mit Athylenchlorid $\begin{array}{l} \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CHCl}_2 \end{array}$

Frisches Rinderblut.

(27. IX. 1919.)

Siedepunkt = 59°

Mol. Gew. = 98,95

Spez. Gew. = 1,175

NaCl- Lösung 0,9% ccm	C ₂ H ₂ Cl ₂ - Lösung 3,5 : 1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-% %	Mole im Liter	Hämolyse nach		
					15'	2 ^h	24 ^h
—	3,0	1	0,31	0,031	—	+	+++
0,5	2,5	1	0,26	0,027	—	—	+++
1,0	2,0	1	0,21	0,021	—	—	+++
1,5	1,5	1	0,15	0,016	—	—	+
3,0	—	—	—	—	—	—	—

Tabelle XV.

2. Versuch mit Acetylentetrachlorid $\begin{array}{l} \text{CHCl}_2 \\ | \\ \text{CHCl}_2 \end{array}$

Frisches Rinderblut.

(27. IX. 1919.)

Siedepunkt = 147°

Mol. Gew. = 167,9

Spez. Gew. = 1,6002

NaCl- Lösung 0,9% ccm	C ₂ H ₂ Cl ₄ - Lösung 1,25 : 1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-% %	Mole im Liter	Hämolyse nach		
					15'	2 ^h	24 ^h
—	3,0	1	0,15	0,0089	+	+++	+++
0,5	2,5	1	0,125	0,0075	—	++	+++
1,0	2,0	1	0,10	0,006	—	+	+++
1,5	1,5	1	0,075	0,0045	—	—	+++
2,0	1,0	1	0,05	0,003	—	—	+++
2,5	0,5	1	0,025	0,0015	—	—	++
2,8	0,2	1	0,01	0,0006	—	—	—
3,0	—	—	—	—	—	—	—

Tabelle XVI.

2. Versuch mit Hexachloräthan $\begin{matrix} \text{CCl}_2 \\ | \\ \text{CCl}_2 \end{matrix}$

Frisches Rinderblut.

(27. IX. 1919.)

Schmelzsp. = 185°
Mol. Gew. = 286,76
Spez. Gew. = 2,091

NaCl- Lösung 0,9% ccm	C ₆ Cl ₁₂ - Lösung 0,01 : 1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-% —	Mole im Liter —	Hämolyse nach		
					15'	2 ^h	24 ^h
—	8,0	1	0,0016	0,000066	—	—	—
0,5	2,5	1	0,0013	0,000055	—	—	—
3,0	—	—	—	—	—	—	—

Tabelle XVII.

3. Versuch mit Dichlormethan CH₂Cl₂.

Frisches Rinderblut.

(2. X. 1919.)

Siedepunkt = 40 bis 41°
Mol. Gew. = 84,94
Spez. Gew. = 1,3222

NaCl- Lösung 0,9% ccm	CH ₂ Cl ₂ - Lösung 10 : 1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-% —	Mole im Liter —	Hämolyse nach		
					15'	2 ^h	30 ^h
—	8,0	1	0,99	0,117	—	+++	+++
0,5	2,5	1	0,83	0,097	—	++	+++
1,0	2,0	1	0,66	0,078	—	—	+++
1,5	1,5	1	0,50	0,058	—	—	+++
2,0	1,0	1	0,33	0,039	—	—	++
2,5	0,5	1	0,17	0,019	—	—	+
2,8	0,2	1	0,07	0,008	—	—	—
3,0	—	—	—	—	—	—	—

Tabelle XVIII.

3. Versuch mit Chloroform CHCl_3 .

Frisches Rinderblut.

(2. X. 1919.)

Siedepunkt = 60 bis 62°

Mol. Gew. = 119,89

Spez. Gew. = 1,489

NaCl- Lösung 0,9% ccm	CHCl_3 - Lösung 5:1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-%	Mole im Liter	Hämolyse nach		
					15'	2 ^h	30 ^h
—	3,0	1	0,56	0,047	+	+++	+++
0,5	2,5	1	0,47	0,089	—	+++	+++
1,0	2,0	1	0,37	0,081	—	++	+++
1,5	1,5	1	0,29	0,024	—	+	+++
2,0	1,0	1	0,19	0,016	—	—	+++
2,5	0,5	1	0,09	0,008	—	—	++
2,8	0,2	1	0,04	0,003	—	—	—
3,0	—	—	—	—	—	—	—

Tabelle XIX.

3. Versuch mit Tetrachlormethan CCl_4 .

Frisches Rinderblut.

(2. X. 1919.)

Siedepunkt = 76 bis 77°

Mol. Gew. = 158,84

Spez. Gew. = 1,5947

NaCl- Lösung 0,9% ccm	CCl_4 - Lösung 0,5:1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-%	Mole im Liter	Hämolyse nach		
					15'	2 ^h	30 ^h
—	3,0	1	0,06	0,004	—	++	+++
0,5	2,5	1	0,05	0,0032	—	+	+++
1,0	2,0	1	0,04	0,0026	—	—	+++
1,5	1,5	1	0,03	0,0020	—	—	+++
2,0	1,0	1	0,02	0,0013	—	—	+++
2,5	0,5	1	0,01	0,0006	—	—	++
2,8	0,2	1	0,004	0,0003	—	—	—
3,0	—	—	—	—	—	—	—

Tabelle XX.

8. Versuch mit Äthylenchlorid $\begin{matrix} \text{CH}_2\text{Cl} \\ | \\ \text{CH}_2\text{Cl} \end{matrix}$.

Frisches Rinderblut.

(2. X. 1919.)

Siedepunkt = 83,5°

Mol. Gew. = 98,95

Spez. Gew. = 1,2521

NaCl-Lösung 0,9°/o ccm	C ₂ H ₄ Cl ₂ -Lösung 6,8 : 1000 ccm	Blut 5°/o ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-°/o	Mole im Liter	Hämolyse nach		
					15'	2 ^h	30 ^h
—	3,0	1	0,64	0,065	—	+++	+++
0,5	2,5	1	0,53	0,054	—	+++	+++
1,0	2,0	1	0,43	0,043	—	+	+++
1,5	1,5	1	0,32	0,032	—	—	+++
2,0	1,0	1	0,21	0,022	—	—	++
2,5	0,5	1	0,11	0,011	—	—	—
2,8	0,2	1	0,04	0,004	—	—	—
3,0	—	—	—	—	—	—	—

Tabelle XXI.

8. Versuch mit Äthylidenchlorid $\begin{matrix} \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CHCl}_2 \end{matrix}$.

Frisches Rinderblut.

(2. X. 1919.)

Siedepunkt = 59°

Mol. Gew. = 98,95

Spez. Gew. = 1,175

NaCl-Lösung 0,9°/o ccm	C ₂ H ₄ Cl ₂ -Lösung 8,5 : 1000 ccm	Blut 5°/o ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-°/o	Mole im Liter	Hämolyse nach		
					15'	2 ^h	30 ^h
—	3,0	1	0,81	0,031	—	++	+++
0,5	2,5	1	0,26	0,027	—	+	+++
1,0	2,0	1	0,21	0,021	—	—	+++
1,5	1,5	1	0,15	0,016	—	—	+++
2,0	1,0	1	0,10	0,010	—	—	++
2,5	0,5	1	0,05	0,005	—	—	—
2,8	0,2	1	0,02	0,002	—	—	—
3,0	—	—	—	—	—	—	—

18°

Tabelle XXII.

8. Versuch mit Acetylentetrachlorid $\begin{array}{l} \text{CHCl}_3 \\ | \\ \text{CHCl}_3 \end{array}$

Frisches Rinderblut.

(2. X. 1919.)

Siedepunkt = 147°

Mol. Gew. = 167,9

Spez. Gew. = 1,6002.

NaCl- Lösung 0,9% ccm	C ₂ H ₂ Cl ₄ - Lösung 1,25 : 1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-%	Mole im Liter	Hämolyse nach		
					15'	2 ^h	24 ^h
—	8,0	1	0,15	0,0069	—	+++	+++
0,5	2,5	1	0,125	0,0075	—	++	+++
1,0	2,0	1	0,10	0,006	—	—	+++
1,5	1,5	1	0,075	0,0045	—	—	+++
2,0	1,0	1	0,05	0,003	—	—	+++
2,5	0,5	1	0,025	0,0015	—	—	++
2,8	0,2	1	0,01	0,0006	—	—	—
3,0	—	—	—	—	—	—	—

Tabelle XXIII.

1. Versuch mit Trichloräthylen $\begin{array}{l} \text{CHCl}_3 \\ || \\ \text{CCl}_2 \end{array}$

Meerschweinchenblut.

(6. XI. 1919.)

Siedepunkt = 88°

Spez. Gew. = 1,47

Mol. Gew. = 181,86

NaCl- Lösung 0,9% ccm	C ₂ HCl ₃ - Lösung 0,8 : 1000 ccm	Blut 5% ccm	Konz. der Lösung in Gew.-%	Mole im Liter	Tropfenzahl Stalagn. II. nach Traube	Hämolyse nach		
						15'	2 ^h	24 ^h
—	8,0	1	0,088	0,0067	52,15	—	—	+
0,5	2,5	1	0,074	0,0056	—	—	—	—
3,0	—	—	—	—	52,09	—	—	—

Tabelle XXIV.

1. Versuch mit Pentachloräthan C_2HCl_5 .

Meerschweinchenblut.

(6. XI. 1919.)

Siedepunkt = 159°

Spez. Gew. = 1,6926

Mol. Gew. = 202,26

NaCl- Lösung 0,9% ccm	C_2HCl_5 - Lösung 0,1 : 1000 ccm	Blut 5% ccm	Konz. der Lösung in Gew.-%	Mole im Liter	Tropfenzahl Stalagn. II. nach Traube	Hämolyse nach		
						15'	2 ^h	24 ^h
—	3,0	1	0,0127	0,00063	52,21	—	—	—
0,5	2,5	1	0,0108	0,00052	—	—	—	—
3,0	—	—	—	—	52,09	—	—	—

Die kritische Betrachtung dieser tabellarisch zusammengestellten Versuche zeigt, daß die hämolytische Kraft beim Penta- und Hexachloräthan, sowie den Äthylenderivaten in der höchsten anwendbaren Konzentration nicht zur Geltung kommt. Von den übrigen Körpern wirkt Dichlormethan am schwächsten, Tetrachlormethan am stärksten hämolytisch; dazwischen reihen sich der wachsenden Wirksamkeit entsprechend die beiden Isomeren Äthylenchlorid und Äthylidenchlorid, das Chloroform und Acetylentetrachlorid ein. Vergleichbar sind natürlich nur die Zahlenwerte der Grammmoleküle im Liter. In den angestellten 4 Versuchsreihen ergeben sich für die jeweilige Grenzkonzentration der einzelnen Verdünnungen, in der komplette oder wenigstens doch noch einwandfrei als solche kenntliche Lyse auftritt, nur annähernd übereinstimmende Werte. Diese Unterschiede lassen sich wohl hinreichend erklären durch die kaum zu umgehenden Fehler teils der Beobachtung, teils beim Pipettieren. Im mittelbaren Zusammenhange mit diesem Umstande ist die erstrebte Konzentration der angewandten Verdünnungen nicht immer absolut die gleiche. Bei der Beurteilung der eingetretenen Lyse müssen daher notwendig Differenzen entstehen, weil bei den folgenden Versuchen eventuell der nächst höhere oder niedrigere Zahlenwert als im ersten Versuch berücksichtigt werden mußte. Die scheinbare Ungenauigkeit ist belanglos, wenn man erwägt, daß die von mir angewandten Verdünnungen schon in gewisser Weise willkürlich festgelegt sind, indem ich noch dazwischenliegende und eventuell

hämolytisch wirksame Konzentrationen ausgeschlossen und damit von vornherein auf absolute Zahlen verzichtet habe. Diese sind nur relative Größen, dem Vergleich unter sich dienend.

Übersichtstabelle A.

Substanz	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4		Hämolyt. Zahl (mittlerer Wert)
	Hämolyt. Grenzwert Mol. i. Ltr.	Hämolyt. Zahl	Hämolyt. Grenzwert Mol. i. Ltr.	Hämolyt. Zahl	Hämolyt. Grenzwert Mol. i. Ltr.	Hämolyt. Zahl	Hämolyt. Grenzwert Mol. i. Ltr.	Hämolyt. Zahl	
CHCl ₃	0,024	1	0,024	1	0,0078	1	0,024	1	1
CH ₂ Cl ₂	0,058	0,42	0,039	0,63	0,039	0,2			0,42
CCl ₄	0,003	8,1	0,0013	18,8	0,0006	18			10,5
.....									
CH ₂ Cl · CH ₂ Cl	0,054	0,45	0,032	0,76	0,022	0,36			0,52
CH ₃ · CHCl ₂	0,027	0,9	0,021	1,16	0,010	0,78			0,95
C ₂ H ₂ Cl ₄	0,005	4,9	0,0015	16,3	0,0015	5,2	0,003	8	6
C ₂ HCl ₅							0,0006 (Keine Lyse)		(40)
.....									
C ₂ Cl ₆	0,00007 (Keine Lyse)		0,00007 (Keine Lyse)						(348)
.....									
C ₂ H ₂ Cl ₂			0,01 (Keine Lyse)						(2,4)
.....									
C ₂ HCl ₃							0,007 (Keine Lyse)		(3,4)
.....									
C ₂ Cl ₄			0,0004 (Keine Lyse)						(61)

Die Übersichtstabelle A ist durch ihre Betrachtung ohne weiteres verständlich: sie stellt das Ergebnis meiner Versuche, die äußersten hämolysierend wirkenden molekularen Konzentrationen zusammen. Um die Wirkungsstärke der einzelnen Körper stärker zur Anschauung zu bringen und ihre Vergleichung untereinander zu erleichtern, habe ich die hämolytische Grenzkonzentration des Chloroforms gleich 1 gesetzt und als hämolytische Zahl bezeichnet. Als mittlere Werte für die theoretische Giftigkeit der untersuchten Substanzen lassen sich aus den 4 Versuchen alsdann die in der letzten Spalte der Tabelle aufgeführten relativen Zahlen berechnen. Bei Versuch 3 betrug die Beobachtungszeit 30 Stunden (gegenüber 24 Stunden sonst), woraus die durchgehend geringeren molekularen Konzentrationen

resultieren. Unter sich bleiben diese natürlich vergleichbar. Vergleichsweise geben die eingeklammerten Zahlen beim Penta- und Hexachloräthan und den Äthylenverbindungen die entsprechenden Werte, berechnet aus den angewandten stärksten molekularen Konzentrationen, wieder, falls diese zur Auflösung der roten Blutkörperchen geführt hätten.

In bezug auf das Tetrachloräthan findet sich mit dem Resultat Heffters und Joachimoglus befriedigende Übereinstimmung. Das Tetrachlormethan hingegen erweist sich hämolytisch etwa um das 10fache wirksamer im Gegensatz zu Lehmann, der seine Giftigkeit, allerdings an der Narkose gemessen, nur etwa halb so groß wie beim Chloroform gefunden hatte. Eine Erklärung für diese auffällige Differenz habe ich nicht finden können.

Die hämolytische Unwirksamkeit der Abkömmlinge des Äthylens ist wohl in der geringen Wasserlöslichkeit begründet, die diese Verbindungen für die Untersuchungen nach der eingeschlagenen Methode ungeeignet macht, z. T. scheinen sie aber auch an sich von geringerer Wirksamkeit gegenüber roten Blutkörperchen zu sein.

Übersichtstabelle B.

Substanz	Mol. Gew.	Siedepunkt °C	Cl %	Wasserlöslichkeit pro Liter g	Molek. Grenzkon- zentration (mittlere Werte)
Dichlormethan	84,94	40—41	84,5	13,22	0,045
Chloroform	119,39	60—62	89,1	7,445	0,019
Tetrachlormethan . . .	153,84	76—77	92,19	0,8	0,0016
Äthylenchlorid	98,95	83,5	71,66	8,51	0,086
Äthylidenchlorid . . .	98,95	59	71,66	4,11	0,019
Acetyltetrachlorid . .	167,9	147	84,5	2,0	0,008
Pentachloräthan . . .	202,26	159	87,64	0,17	(0,0006)
Hexachloräthan	236,76	185 (Schmelz- punkt)	89,86	0,01	(0,00007)
Acetyldichlorid . . .	96,94	59	73,16	1,25	(0,01)
Trichloräthylen	181,36	88	80,96	1,18	(0,007)
Tetrachloräthylen . . .	165,84	121	85,49	0,08	(0,0004)

Die Übersichtstabelle B enthält die Substanzen geordnet nach ihrer Stellung in den homologen Reihen. Auf die Derivate des Methans folgen die des Äthans und Äthylens. Vergleicht

man die physikalischen Konstanten mit der hämolytischen Wirkung (Mole im Liter), so ergeben sich auch hier seit langem bekannte Beziehungen, indem nämlich bei den Substanzen homologer Reihen dem Ansteigen der Molekulargewichte und des Siedepunktes, aber bei gleichzeitiger Abnahme ihrer Löslichkeit in Wasser, die zunehmende Wirksamkeit parallel geht. Eine Unstimmigkeit in bezug auf den Siedepunkt zeigt sich nur bei den Isomeren, Äthylen- und Äthylidenchlorid. Die Zahlen der Chlorprocente sollen die früher erwähnte Beziehung zwischen Wirkung und chemischer Konstitution andeuten.

Im Zusammenhang der physikalischen Eigenschaften mit der pharmakologischen Wirksamkeit habe ich die von Traube gefundenen Beziehungen zwischen Oberflächenspannung wie narkotischer und hämolytischer Kraft für meine Versuche zu verwerten getrachtet. Traube hat bekanntlich, ausgehend von seiner Auffassung der osmotischen Vorgänge der Zellen, im Gegensatz zur Lipoidtheorie Overtons und H. Meyers, dargestellt, daß das ursächliche Moment für die Wirksamkeit eines Narkoticums nicht in der Lipoidlöslichkeit der Zellen, als vielmehr in physikalischen Kräften an den Grenzflächen zwischen wäßriger Lösung und Luft, resp. wäßriger Lösung und Lipoid gelegen ist. Diese Kräfte werden hauptsächlich durch die Oberflächenaktivität oder den Haftdruck repräsentiert. Letzterer ist nach ihm identisch mit der physiologischen Wirksamkeit einer Substanz: so daß die Eigenschaft aller indifferenten Narkotica, die Oberflächenspannung des Wassers herabzusetzen, im gleichen Verhältnis wächst, wie die narkotische und hämolytische Kraft.

Zur Prüfung dieser Beziehung bei den untersuchten Körpern suchte ich die Oberflächenspannung der wäßrigen Lösungen nach der Tropfmethode zu bestimmen. Ich benutzte dazu zwei Stalagmometer nach Traube, von denen das eine für Wasser und NaCl-Lösung die Tropfenzahl 18,02, das andere 52,09 Tropfen ergab. Das Ergebnis der stalagmometrischen Versuche ist in den Tabellen I bis VII, XI und XII, XXIII und XXIV enthalten. Wie die oberflächliche Betrachtung lehrt, fügen sich die gewonnenen Tropfenzahlen untereinander harmonisch ein, in dem Sinne, daß der stärkeren Konzentration ein höherer Wert zukommt als der geringeren; in ersterer erweist sich

also der Haftdruck, wie Traube es ausgedrückt hat, als „ge-lockert“, die Oberflächenspannung als erniedrigt. Indessen halte ich es für die Beurteilung der Methode bei den hier untersuchten Substanzen für notwendig, darauf aufmerksam zu machen, daß die notierten Tropfenzahlen mittlere, aus drei nahe zusammenliegenden Resultaten berechnete Werte sind, zu deren Auffindung ich oft erst vielfache, bisweilen 12 bis 15 Versuche anstellen mußte, bis ich dem vorher gewonnenen Nachbarwert sich anfügende Zahlen erhielt. Von Stufe zu Stufe ändert sich die Tropfenzahl erst in der ersten bzw. zweiten Dezimale. Die Tropfendifferenz bei der angewandt stärksten und schwächsten Konzentration beträgt beim Chloroform etwa $\frac{1}{3}$ Tropfen, beim stärker capillaraktiven Tetrachloräthan 1,68 und bei dem noch stärker capillaraktiven Äthylenchlorid 2,2 Tropfen. Bei Vergleich der Werte für das Stalagmometer I und II, die etwa im Verhältnis 1:3 stehen müssen, habe ich mich überzeugt, daß die mit dem ersteren gefundenen Werte noch etwas zu hoch sind. Die Ablesung und damit die rechnerische Bestimmung leidet ebensowohl unter den kleineren Abmessungen dieses Stalagmometers wie vor allem unter der Capillaraktivität der untersuchten Substanzen. Bei den übrigen Körpern habe ich mich alsdann darauf beschränkt, die Tropfenzahl der gesättigten Lösungen und ihre eventuelle Differenz gegenüber derjenigen des Wassers zu ermitteln. Die stalagmometrische Methode ergibt für diese Körper, auch für die stark hämolytisch wirkenden, ein negatives Resultat.

Traube¹⁾ selbst berichtet über stalagmometrische Versuche mit Chloroform und erklärt die auch von ihm zu groß gefundenen Werte der Oberflächenspannung damit, daß „bei Chloroform und anderen derartigen flüchtigen Stoffen aus der Oberfläche wegen des großen Dampfdrucks ständig Substanz in die benachbarte Luft (oder sonstige Phase) diosmiert“. Weiterhin sollen „capillaraktive Stoffe wie Chloroform usw., die sich namentlich an den Oberflächen der einzelnen Phasen anreichern, Reaktionen zum Stillstand bringen“. Die Richtigkeit

¹⁾ J. Traube, Theorie der Osmose und Narkose. Arch. f. d. ges. Physiol. 165, 541; J. Traube, Theorie der Narkose. Arch. f. d. ges. Physiol. 158, 276.

dieser Hypothesen vorausgesetzt, mußte a priori anzunehmen sein, daß eine wäßrige Lösung von Chloroform und ebenso auch von Tetrachloräthan, das als Narkoticum der Fettreihe ja auch zu den capillaraktiven Stoffen gehören muß, nach dem Durchgange durch ein Stalagmometer überhaupt keine oder eine doch merklich abgeschwächte hämolytische Kraft aufweist gegenüber einer Lösung, die das Stalagmometer nicht passiert hat. Auf Grund dieser Überlegung habe ich Chloroform und Acetylentetrachlorid miteinander verglichen.

Tabelle XXV.

Versuch mit Chloroform. CHCl_3 .

Meerschweinchenblut.

(6. XI. 19.)

Siedepunkt = 60 bis 62°

Mol. Gew. = 119,39

Spez. Gew. = 1,489

NaCl-Lösung 0,9% ccm	CHCl_3 - Lösung 5:1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-%	Mole im Liter	Hämolyse nach		
					15'	2 ^h	24 ^h
—	3,0	1	0,56	0,047	—	+++	+++
0,5	2,5	1	0,47	0,089	—	+++	+++
1,0	2,0	1	0,37	0,0812	—	+	+++
1,5	1,5	1	0,29	0,0244	—	—	++
2,0	1,0	1	0,19	0,0156	—	—	—

Tabelle XXVI.

Versuch mit Chloroform nach Durchgang durch das Stalagmometer.

Meerschweinchenblut.

(6. XI. 19.)

NaCl-Lösung 0,9% ccm	CHCl_3 - Lösung 5:1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-%	Mole im Liter	Hämolyse nach		
					15'	2 ^h	24 ^h
—	3,0	1	0,56	0,047	—	—	++
0,5	2,5	1	0,47	0,089	—	—	—

Tabelle XXVII.

Versuch mit Acetylentetrachlorid $C_2H_2Cl_4$.

Meerschweinchenblut.

(6. XI. 19.)

Siedepunkt = 147°

Mol. Gew. = 167,9

Spez. Gew. = 1,66002

NaCl- Lösung 0,9% ccm	$C_2H_2Cl_4$ - Lösung 1,25 : 1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-% %	Mole im Liter	Hämolyse nach		
					15'	2 ^h	24 ^h
—	3,0	1	0,15	0,0089	+++	+++	+++
0,5	2,5	1	0,125	0,0075	—	+++	+++
1,0	2,0	1	0,10	0,006	—	++	+++
1,5	1,5	1	0,075	0,0045	—	—	+++
2,0	1,0	1	0,05	0,003	—	—	+++
2,5	0,5	1	0,025	0,0015	—	—	+
2,8	0,2	1	0,01	0,0006	—	—	—

Tabelle XXVIII.

Versuch mit Acetylentetrachlorid nach Durchgang durch das Stalag-
mometer.

Meerschweinchenblut.

(6. XI. 19.)

NaCl- Lösung 0,9% ccm	$C_2H_2Cl_4$ - Lösung 1,25 : 1000 ccm	Blut 5% ccm	Konzentration der Lösung in Gew.-% %	Mole im Liter	Hämolyse nach		
					15'	2 ^h	24 ^h
—	3,0	1	0,15	0,0089	—	++	+++
0,5	2,5	1	0,12	0,0075	—	+	+++
1,0	2,0	1	0,10	0,006	—	—	+++
1,5	1,5	1	0,075	0,0045	—	—	+++
2,0	1,0	1	0,05	0,003	—	—	+
2,5	0,5	1	0,025	0,0015	—	—	—

Die Versuchsanordnung ist den früheren Versuchen analog, nur daß bei dem entsprechenden Gegenversuch die Verdünnungen sofort aus der erst durch das Stalagmometer gegangenen Stammlösung hergestellt wurden. Das Ergebnis ist interessant.

Während beim Chloroformversuch eine Abnahme der Wirksamkeit konstatiert wird, bleibt beim Tetrachloräthan die Wirkung auf rote Blutkörperchen unverändert, gleichgültig, ob die wäßrige Lösung das Stalagmometer passiert hat oder nicht.

Wenn der Siedepunkt auch gut doppelt so hoch ist wie beim Chloroform, und damit der Übertritt von Substanz aus der Grenzschicht in die benachbarte Luft geringer ist (obwohl Siedepunkt und Dampfspannung nicht immer parallel gehen), so bleibt trotzdem die nach der gefundenen Tropfenzahl vorhandene Erniedrigung der Oberflächenspannung doch so auffällig hinter der pharmakologischen Wirkung zurück, daß man hier einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Haftdruck und Wirksamkeit des Stoffes im Sinne Traube nicht allein nicht annehmen kann, sondern geradezu negieren muß.

Zusammenfassung.

1. Die untersuchten Verbindungen verändern das Protoplasma lebender Blutkörperchen derart, daß das Hämoglobin in Lösung geht. Das Ausbleiben der hämolytischen Wirkung beim Penta- und Hexachloräthan, sowie den Derivaten des Äthylens wird mit der geringen Wasserlöslichkeit dieser Substanzen erklärt, die unterhalb der hämolytisch wirkenden molekularen Konzentration gelegen ist.

2. Die hämolytische Wirksamkeit der Verbindungen ist innerhalb der betreffenden homologen Reihe proportional dem steigenden Molekulargewicht, bzw. dem Eintritt von Cl-Atomen ins Molekül. Im Durchschnitt berechnet sich aus den Versuchen die hämolytische Wirksamkeit der Verbindungen wie folgt: CH_3Cl , 0,42, CHCl_3 , 1, CCl_4 , 10,5, $\text{CH}_2\text{Cl}\cdot\text{CH}_2\text{Cl}$, 0,52, $\text{CH}_2\cdot\text{CHCl}_2$, 0,95, $\text{C}_2\text{H}_5\text{Cl}$, 6.

3. Stalagmometrische Versuche, die zur Nachprüfung der Beziehungen zwischen Haftdruck (Oberflächenspannung) und pharmakologischer (hämolytischer) Wirkung angestellt wurden, ergaben negative Resultate.

Die Traubesche Theorie kann demnach auf die hier in Frage kommenden Körper nicht angewandt werden.

Über die Lichtabsorption des Methämoglobins in neutraler und soda-alkalischer Lösung.

Von
Paul Hári.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 5. September 1919.)

Mit 2 Figuren im Text.

Die Versuche, über die nachfolgend berichtet werden soll, hatten den Zweck, das Spektrum des Methämoglobins aus demselben Gesichtspunkt und mit derselben Methodik zu prüfen, wie dies bei der Untersuchung des Oxyhämoglobins in einer früheren Mitteilung¹⁾ geschah.

I. Versuchseinrichtung.

Apparatur.

Der Apparat, der zur Verwendung kam, war das von Martens und Grünbaum verbesserte Königsche Spektrophotometer (mit der großen Beleuchtungsvorrichtung), über das ich vor kurzem berichtet habe²⁾. Bloß in einer einzigen Versuchreihe benützte ich den ursprünglichen Königschen Apparat, der auch zu den Versuchen in meiner ersten Mitteilung gedient hatte.

Als Lichtquelle diente Auersches Gasglühlicht. Die Breite des Okularspaltes wurde genau so wie in meiner zweiterwähnten Mitteilung, also annähernd genau so wie es Hüfner seinerzeit vorgeschlagen hatte, genommen. Der Eintrittspalt war in der Regel 0,1 mm, bloß bei Ab-

¹⁾ P. Hári, Beiträge zur Lichtabsorption des Oxyhämoglobins. Diese Zeitschr. 82, 229, 1917.

²⁾ P. Hári, Ist das Absorptionsverhältnis (Vierordt) ein von der Art des verwendeten Apparats (Spektrophotometer) unabhängiger, charakteristischer Wert? diese Zeitschr. 95, 266, 1919.

lösungen in Blau 0,2 mm breit. Die zu untersuchende Lösung wurde in Röhren von meistens 20, manchmal auch in solche von 50 mm Länge eingefüllt; in einigen Fällen mußte die Schichtdicke von 20 mm noch durch Einlegen der Glasklötze von 10 mm Höhe, auf die Hälfte reduziert werden.

Die untersuchten Farbstofflösungen.

Die Untersuchungen wurden teils an neutralen, teils an soda-alkalischen Lösungen angestellt.

A. Neutrale Lösungen. 1. Rein wäßrige Lösungen von Blut oder krystallisiertem Oxyhämoglobin wurden mit rotem Blutlaugensalz (fürderhin und in den Tabellen mit „F.C.K.“ bezeichnet) versetzt, und sofort untersucht.

2. Mit F.C.K. versetzte rein wäßrige Lösungen von krystallisiertem Oxyhämoglobin wurden längere Zeit dialysiert und dann erst untersucht.

3. Eine neutrale Lösung von Methämoglobin wurde auf die bekannte Weise erzeugt und zur Krystallisation gebracht. Die Trennung der Krystalle von der Mutterlange erfolgte in einem Teile der Versuche durch Absaugen, wobei aber ein großer Teil der Krystalle, namentlich beim Waschen derselben, wieder in Lösung ging; eine bessere Ausbeute konnte durch Zentrifugieren erzielt werden. Die feucht erhaltene Krystallmasse wurde in destilliertem Wasser gelöst und die Lösung der Untersuchung zugeführt.

B. Soda-alkalische Lösungen. Die oben sub 1 und 2 erwähnten neutralen Lösungen wurden durch Zusatz einer zu 0,1 % Gehalt berechneten Menge von reinstem kohlensauren Natrium (aus Natr. bicarbon.) in alkalische verwandelt; die oben sub 3 angeführten Methämoglobinkrystalle wurden in einer 0,1 %igen Lösung von kohlensaurem Natrium gelöst.

Konzentrationsbestimmung der Farbstofflösungen.

Die Konzentration der Farbstofflösung wurde in einem Teile der Versuche durch Eindampfen eines genau abgemessenen Volumens derselben und Trocknen des Rückstandes im Vakuum-trockenschrank bei 60 bis 70° bestimmt. In anderen Versuchen, in denen einfach mit F.C.K. versetzte Lösungen von Oxyhämoglobin zur Verwendung kamen, konnte die Konzentration der so entstandenen Methämoglobinlösung der der ursprüng-

lichen Oxyhämoglobinlösung (nach entsprechender Korrektur für den Zusatz der F.C.K.-Lösung) gleichgestellt und die Konzentration der Oxyhämoglobinlösung auf Grund der Gleichung $c = e \cdot A$ berechnet werden. Hierzu bedurfte es nur einer (dem F.C.K.-Zusatz vorangehenden) Bestimmung des Extinktionskoeffizienten (e) an beiden von Hüfner vorgeschlagenen Spektralstellen, die dann mit den entsprechenden Absorptionsverhältnissen (A) an den betreffenden Spektralstellen multipliziert wurden. Für die Konstanten A nahm ich die verbesserten Werte an, die aus den in meiner ersten Mitteilung beschriebenen Versuchen sich ergaben.

Berechnung der Ablesungen.

Die Ablesungen wurden vorgenommen einmal wenn die Röhre mit der Farbstofflösung rechts, die mit dem Lösungsmittel (destilliertes Wasser oder 0,1%ige Lösung von kohlensaurem Natrium, oder eine dieser Flüssigkeiten mit F.C.K. versetzt) links gelagert war (α); ein zweites Mal, nachdem die Röhren vertauscht wurden (β). Beide Male wurde in allen 4 Quadranten abgelesen, diese Ablesungen je dreimal wiederholt und aus den insgesamt je 12 Ablesungen (nach entsprechender Umformung) je ein Mittelwert für α und β gezogen. Dann ergab $\frac{\log \lg \beta - \log \lg \alpha}{d}$ den gesuchten Extinktionskoeffizienten, wobei d = Schichtdicke in cm.

Bewertung des Extinktionskoeffizienten.

Die an verschiedenen konzentrierten Lösungen längs möglich langer Strecken des sichtbaren Spektrums erhaltenen Extinktionskoeffizienten habe ich, wie ich dies in meiner erst-erwähnten Mitteilung vorschlug und durchführte, auf die einheitliche Konzentration von 0,1% des Farbstoffgehaltes reduziert. Diese von mir als „spezifische Extinktionskoeffizienten“ bezeichneten Werte, die ich für je einen Spektralausschnitt an den verschiedenen von mir untersuchten Lösungen erhalten habe, sind für die betreffende Spektralstelle charakteristisch.

II. Meine Versuchsergebnisse.

In Tabelle I sind die spezifischen Extinktionskoeffizienten zusammengestellt, die ich an einer Reihe von neutralen und soda-alkalischen Methämoglobinlösungen für eine ganze Reihe von Spektralausschnitten erhielt; desgleichen auch die Mittel-

Spezifische Extinktions-Koeffizienten der neutralen Lösungen									
Spektral-Ausschnitt	Krystallisiertes Pferdehämoglobin 50; neutrale Lösung mit F.C.K. versetzt; dann dialysiert			Krystall. Pferdehämoglobin 51; neutrale Lösung mit F.C.K. versetzt; dann 8 Tage dialysiert. Lösung 4, 5 und 6	Krystall. Hunde-methämoglobin 44 Lösung a/2	Krystall. Hunde-methämoglobin 55 Lösung b/1 und b/3	Mittelwerte (ohne 4)	Enderblutkörperchen; soda-alkalische Lösung mit F.C.K. versetzt; sofort untersucht	
	7 Tage lang; Lösung 6 und 7	13 Tage lang; Lösung 10 u. 11 a	19 Tage lang; Lösung 12 u. 13						1
665,6—649,0	0,0694	0,0657	0,0679	0,0597			0,0677		
659,8—643,4			0,0994				0,0994		
653,7—638,3	0,146	0,186	0,189	0,127		0,142	0,141		
648,3—633,1			0,183		0,188 ¹⁾		0,183		
645,3—630,5			0,206				0,206		
642,7—628,1	0,229		0,217	0,208	0,224 ²⁾	0,216	0,221		
641,7—627,2						0,222	0,222		
640,7—626,2						0,229	0,229		
640,2—625,7			0,228			0,233	0,230		
637,6—623,2			0,237			0,236	0,236		
635,2—621,1			0,22 ²⁾		0,241 ¹⁾	0,235	0,232		
632,5—618,5	0,232	0,220	0,220	0,207		0,229	0,224		
628,9—615,1					0,218		0,218		
627,5—613,7			0,206			0,217	0,211		
622,6—609,2	0,196		0,190	0,170	0,204	0,197	0,197		
617,9—604,9					0,184 ²⁾	0,185	0,185		
613,1—600,7	0,168		0,170	0,154		0,180	0,173		
610,4—597,9					0,177		0,177		
608,7—596,4						0,178	0,178		
604,4—592,4	0,165		0,171	0,150	0,178	0,176	0,172		
600,2—588,8					0,176 ²⁾	0,177	0,177		
595,9—584,7	0,170		0,186	0,155		0,184	0,180		
592,0—580,9					0,183 ¹⁾	0,192	0,187		
588,3—577,5	0,186		0,210	0,166	0,206 ²⁾	0,198	0,200		
584,2—574,0						0,199	0,199		

Die Konzentration der untersuchten Lösungen betrug:

- In Stab 1 und 2 oberhalb der Doppellinie 0,180, unterhalb derselben 0,0722^o/_o.
 " " 8 oberhalb der Doppellinie 0,148, unterhalb derselben 0,074^o/_o.
 " " 4 oberhalb der ersten Doppellinie 0,662, oberhalb der zweiten 0,331, unterhalb der zweiten 0,221^o/_o.
 " " 5 durchgehends 0,267^o/_o.
 " " 6 oberhalb der Doppellinie 0,188, unterhalb derselben 0,094^o/_o.
 " " 7 durchgehends 0,0667^o/_o.

¹⁾ Der Spektralausschnitt war um ca. 1 μ violettwärts verschoben.

²⁾ Der Spektralausschnitt war um ca. 1 μ rotwärts verschoben.

I

Spezifische Extinktions-Koeffizienten der soda-alkalischen Lösungen

Krystallisiert. Pferdehämoglobin 50; neutrale Lösung mit F.C.K. ⁴ versetzt				Krystallisiertes Pferdehämoglobin 51; neutrale Lösung mit F.C.K. versetzt		Krystall. Hunde-methämoglobin 44; Lösung 6	Krystall. Hunde-methämoglobin 55; Lösung b/2	Krystall. Hunde-methämoglobin 56	Mittelwerte ohne 8, 13 und 14
dann dialysiert			alkalisiert und sofort untersucht	3 Tage dialysiert, dann alkalisiert					
ohne Dialyse alkalisiert u. 2 Tage am Eis stehen gelassen; Lösung 4	7 Tage lang; alkalisiert; Lösung 8 und 9	13 Tage lang; alkalisiert; Lösung 11 b			14 Tage lang; alkalisiert; Lösung 14 und 15				
8	9	10	11	Lösung 3	Lösung 7 und 8	14	15	16	
	0,0607				0,0386				0,0607
	0,0655				0,0531			0,0858	0,0756
	0,106				0,0765			0,129	0,117
	0,149				0,118		0,125	0,180	0,151
	<u>0,212</u>		0,191		0,181		0,189	0,221	0,208
	0,306		0,276		0,271	⁴⁾ 0,265	0,282	0,292	0,289
	0,377	0,377			<u>0,347</u>	0,288 0,336		0,347	0,367
³⁾ 0,356	0,423	0,416		0,400	0,339	0,378		0,385	0,406
0,389	0,479	0,472		0,466	0,449	0,426		0,436	0,465

Die Konzentration der untersuchten Lösungen betrug:

- In Stab 8 durchgehends 0,0483 %.
- " " 9 oberhalb der Doppellinie 0,181, unterhalb derselben 0,0905 %.
- " " 10 durchgehends 0,0722 %.
- " " 11 oberhalb der Doppellinie 0,148, unterhalb derselben 0,0295 %.
- " " 12 durchgehends 0,0593 %.
- " " 13 oberhalb der Doppellinie 0,331, unterhalb derselben 0,166 %.
- " " 14 durchgehends 0,0979 %.
- " " 15 " 0,188 %.
- " " 16 " 0,0812 %.

³⁾ Die alkalische Lösung hat 4 Tage im Eisschrank gestanden.

⁴⁾ Die alkalische Lösung hat 30 Stunden im Eisschrank gestanden.

Spezifische Extinktions-Koeffizienten der neutralen Lösungen								Rinderblutkörperchen; soda-alkalische Lösung mit F.C.K. versetzt; sofort untersucht	
Spektral- Ausschnitt	Krystallisiertes Pferde- hämoglobin 50; neutrale Lösung mit F.C.K. versetzt; dann dialysiert			Krystall. Pferdehämoglobin 51; neutrale Lösung mit F.C.K. versetzt; dann dialysiert, Lösung 4, 5 und 6	Krystall. Hunde- methämoglobin 44 Lösung a/2	Krystall. Hunde- methämoglobin 55 Lösung b/1 und b/3	Mittel- werte (ohne 4)		
	7 Tage lang; Lösung 6 und 7	13 Tage lang; Lösung 10 u. 11 a	19 Tage lang; Lösung 12 u. 13						1
582,8—572,4					0,210		0,210		
580,3—570,0	0,192		0,228	0,169	0,201	0,226	0,215		
578,0—567,6					0,205 ²⁾		0,201		
573,5—563,5	0,196		0,234	0,174	0,209		0,212		
568,6—558,5							0,209		
566,5—557,0	0,203		0,246	0,183		0,231	0,227		
565,6—556,1	0,212	0,218	0,245	0,185	0,218	0,224	0,223		
564,0—554,0					0,215		0,215 ¹⁾		
559,6—551,0	0,226		0,272	0,202			0,249		
555,0—545,6					0,257		0,257		
553,5—544,8	0,275		0,313	0,243			0,294		
550,6—541,6					0,284		0,284		
547,3—539,0	0,318		0,358	0,281	0,311		0,329		
541,4—533,7	0,357	0,356	0,392	0,305	0,344	0,361	0,362		
541,3—533,6	0,356		0,388	0,314		0,378	0,373		
538,4—530,1					0,361		0,361		
535,9—528,4	0,383		0,416	0,346	0,374 ²⁾		0,391		
530,7—523,3	0,409		0,438	0,372	0,388	0,425	0,415		
525,5—518,2	0,433		0,457	0,402	0,401 ¹⁾		0,430		
524,0—516,3					0,425		0,425		
520,0—513,6	0,469		0,484	0,429	0,455	0,494	0,475		
517,0—509,9					0,480		0,480		
515,6—508,9	0,501		0,516	0,465			0,508	0,405	
513,9—506,9					0,474 ²⁾				
511,1—504,6	0,526		0,532			0,557	0,538	0,426	
510,5—504,0					0,474 ²⁾				
506,4—500,4			0,540				0,540	0,427	
502,3—496,2			0,549			0,552	0,550	0,420	
498,1—492,2			0,538				0,538	0,441	
494,0—488,3			0,529				0,529	0,480	
490,1—484,7			0,515				0,515	0,495	
486,2—481,1			0,494				0,494	0,505	

werte, die für jeden Spektralausschnitt aus den verschiedenen Beobachtungsreihen gezogen werden konnten.

In diese Mittelwertberechnung konnten die Beobachtungsreihe 4

- 1) Der Spektralausschnitt war um ca. 1μ violettwärts verschoben.
 2) Der Spektralausschnitt war um ca. 1μ rotwärts verschoben.
 3) Ablesungen unsicher.

(Fortsetzung).

Spezifische Extinktions-Koeffizienten der soda-alkalischen Lösungen

Krystallisiert. Pferdehäoglobin 50; neutrale Lösung mit F.C.K. versetzt				Krystallisiertes Pferdehäoglobin 51; neutrale Lösung mit F.C.K. versetzt		Krystall. Hunde-methämoglobin 44; Lösung 6	Krystall. Hunde-methämoglobin 55; Lösung b/2	Krystall. Hunde-methämoglobin 56	Mittelwerte ohne 8, 13 und 14
ohne Dialyse alkalisiert u. 2 Tage am Eis stehen gelassen; Lösung 4	dann dialysiert			alkalisiert sofort untersucht Lösung 3	3 Tage dialysiert; dann alkalisiert Lösung 7 und 8				
	7 Tage lang; alkalisiert; Lösung 8 und 9	13 Tage lang; alkalisiert; Lösung 11/6	14 Tage lang; alkalisiert; Lösung 14 und 15						
8	9	10	11	12	13	14	15	16	
0,409	0,505	0,509		0,499	0,480	0,459		0,466	0,495
0,408	0,486	0,485		0,490	0,461	0,479 0,471 0,475		0,470	0,483
0,403	0,476	0,476		0,480	0,437		0,477	0,458	0,473
0,412	0,486	0,469	0,478	0,477	0,441	0,479 0,465	0,483	0,465	0,476
0,418	0,497	0,489		0,486	0,451	0,501	0,493	0,467	0,486
0,456	0,540	0,537		0,531	0,493	0,546 0,575	0,544	0,513	0,533
0,476	0,579	0,569		0,575	0,539		0,574	0,541	0,567
0,486	0,587 0,581	0,579 0,571	0,575	0,584	0,548 0,536		0,588	0,571 0,543	0,581 0,565
	0,554 0,504			0,531 0,495	0,507 0,461	0,523 0,506		0,529 0,497	0,538 0,499
0,426				0,458	0,417	0,493 0,463		0,486	0,472
0,423				0,441	0,402	0,459 0,406		0,453	0,447
0,406				0,428		0,420		0,466	0,433
0,410				0,426					0,426
									0,427 0,420 0,441 0,480 0,514 0,515

(neutrale Lösung) und die Beobachtungsreihen 8, 13 und 14 (alkalische Lösungen) nicht einbezogen werden, nicht weil die an ihnen erhaltenen Werte streckenweise stark aus der Reihe der übrigen springen, sondern weil mir der Grund dieser Abweichung, wenn auch nachträglich, klar geworden ist. So hatte z. B. die alkalische Lösung, die in allen übrigen Reihen sofort nach der Alkalisierung untersucht wurde, in Reihe 8 zwei Tage lang, in Reihe 14 30 Stunden im Eiskasten gestanden; daß aber während dieser Zeit eine nachweisbare Änderung in der Lichtabsorption

der Lösung eintreten mußte, soll weiter unten ausführlich erörtert werden. In Reihe 4 und 13 mußte eine Verunreinigung stattgefunden haben, die sich in beiden Reihen darum offenbarte, weil es sich um dieselbe Farbstofflösung handelte, die erst im neutralen Zustande (Reihe 4) und dann nach erfolgter Alkalisierung (Reihe 13) untersucht wurde.

Die so erhaltenen Mittelwerte habe ich als Ordinaten, die Wellenlängen als Abszissen in ein Koordinatensystem eingetragen und die Schnittpunkte zu Kurven vereinigt, die in der nachstehenden Figur zu sehen sind. Diese Kurven geben Aufschluß sowohl über die Stellen der Absorptionsmaxima, die bei der einfachen spektroskopischen Beobachtung als Absorptionsstreifen erscheinen, als auch über das quantitative Verhalten der Lichtabsorption in den verschiedenen Spektralbereichen. Die bekannte Tatsache, daß sich neutrale und alkalische Lösungen von Methämoglobin bezüglich ihrer Lichtabsorption durchaus verschieden verhalten, geht aus den Figuren 1 und 2 besonders klar hervor. Hierüber soll noch weiter unten die Rede sein.

A. Die Absorptionsmaxima im Spektrum der neutralen Lösungen.

Vom Spektrum einer neutralen Lösung von Methämoglobin wird angegeben, daß es drei, resp. auch vier Absorptionsstreifen enthalte.

Das Maximum der Absorption in Rot wurde von früheren Autoren an folgenden Stellen gefunden:

Jäderholm ¹⁾	bei 631 $\mu\mu$
Bertin-Sans ²⁾	" 633 "
Dittrich ³⁾	" 632 "
Formanek ⁴⁾	" 634 "
Lewin, Miethe und Stenger ⁵⁾	" 626 "
Rost, Franz und Heise ⁶⁾	" 634 "

¹⁾ Axel Jäderholm, Studien über Methämoglobin. Zeitschr. f. Biologie 20, 423, 1884.

²⁾ Zitiert bei Dittrich (s. unten) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 106, 1243.

³⁾ Paul Dittrich, Über methämoglobinbildende Gifte. Arch. für Pharmak. u. Patholog. 29, 1892.

⁴⁾ J. Formanek, Über die Absorptionsspektren des Blutfarbstoffes. Zeitschr. f. analyt. Chem. 40, 1901.

⁵⁾ L. Lewin, A. Miethe und E. Stenger, Über die durch Photographie nachweisbaren spektralen Eigenschaften des Blutfarbstoffes und anderer Farbstoffe des tierischen Körpers. Arch. f. d. ges. Physiologie 118, 1907.

⁶⁾ E. Rost, Fr. Franz und R. Heise, Beiträge zur Photographie der Blutspektren. Arbeiten a. d. kaiserl. Gesundheitsamt 32, 1909.

Wie aus den Daten meiner Beobachtungsreihen 3 und 6 (Tabelle I), in denen die Ablesungen am dichtesten waren, hervorgeht, fand ich das Maximum in dem zwischen 637,6 und 623,2 $\mu\mu$ gelegenen Spektralausschnitt, also etwa bei 630,4 $\mu\mu$, was mit dem ältesten Jäderholmschen Befund am besten übereinstimmt. Da in den von obiger Stelle rot- resp. violettwärts gelegenen Spektralausschnittes 640,2 bis 625,7 resp. 635,2 bis 621,1, d. h. bei 633,0 resp. 628,1 $\mu\mu$ die Absorption laut meiner Reihe 3 wesentlich, laut meiner Reihe 6 allerdings nur um ein Weniges geringer ist als an der erwähnten, dazwischen gelegenen Stelle 630,4, läßt sich mit Bestimmtheit sagen, daß die wahre Stelle des Maximums nur unweit von 630,4 gelegen sein kann, und wenn sie von dieser überhaupt abweicht, die Abweichung rotwärts weniger als 2,6, violettwärts weniger als 7,3 $\mu\mu$ betragen muß.

Über das Maximum der Absorption in Blau liegen nur wenige Angaben vor. Jäderholm und Bartin-Sans fanden dasselbe bei 500, Formanek bei 500,8, Lewin, Miethe und Stenger bei 499 $\mu\mu$. Auch Rost, Franz und Heise fanden einen Streifen in Blau, während Dittrich ihn überhaupt in Abrede stellt.

Laut den Ergebnissen meiner allerdings vereinzelt geliebeneren Versuchsreihe, die sich auf diesen Spektralbereich erstreckte, befindet sich das Maximum in Blau im Spektralausschnitt 502,3 bis 496,2 $\mu\mu$, also in guter Übereinstimmung mit obigen Angaben bei etwa 499,2 $\mu\mu$.

Die beiden Maxima der Absorption in Gelb und Grün. Seit jeher strittig sind die beiden mittleren Absorptionsstreifen der neutralen Methämoglobinlösungen, die bereits 1877 von Jäderholm¹⁾ beschrieben, von späteren Autoren mehr oder minder stark befunden und fast durchgehends einer Beimischung von Oxyhämoglobin zugeschrieben wurden, indem bloß Ziemke und Müller²⁾, da sie diese Streifen auch an Lösungen von kristallisiertem Methämoglobin konstatierten, dieselben als dem Methämoglobin selbst angehörend ansahen.

Rost, Franz und Heise schließen sich der großen Mehrheit der Autoren an, indem sie besonders betonen, daß, wenn sie mit F.C.K.

¹⁾ Axel Jäderholm, Untersuchungen über den Blutfarbstoff und seine Derivate. Zeitschr. f. Biol. 13, 1877.

²⁾ E. Ziemke und Franz Müller, Beiträge zur Spektroskopie des Blutes. Arch. f. [Anat. u.] Physiol. 1901, Supplementband.

versetztes Blut untersuchten, die beiden mittleren, dem Oxyhämoglobin angehörenden Streifen nur bei äußerster Konzentration der Lösung zu sehen waren, aber um so schärfer hervortraten, je weniger F.C.K. verwendet wurde, also je unvollkommener die Umwandlung in Methämoglobin war.

Aus alledem ließe sich also folgern, daß eine wirklich reine, neutrale Lösung von Methämoglobin nur zwei Absorptionsmaxima, und zwar in Rot und in Blau, enthält, während die beiden mittleren Maxima, als dem Oxyhämoglobin angehörend, fehlen. Dies kann ich durch meine Beobachtungsreihen voll bestätigen. Es nimmt nämlich die Absorption, nachdem sie von dem S. 278 erwähnten Maximum in Rot heruntergestiegen war, von etwa 590 $\mu\mu$ angefangen erst allmählich, dann aber rascher zu, um weiter in ununterbrochenem Anstieg das S. 279 erwähnte Maximum in Blau zu erreichen. Von einem Maximum oder gar von zwei Maxima, die zwischen Rot und Blau, also in Gelb resp. auch in Grün gelagert wären und den beiden mittleren Streifen entsprächen, ist jedoch keine Spur zu sehen, außer man wollte einzelne aus der Reihe springende Beobachtungspunkte (s. Fig. 1), die offenbar von Beobachtungsfehlern herrühren, als solche ansehen.

B. Die Absorptionsmaxima im Spektrum der alkalischen Lösungen von Methämoglobin.

Von den meisten Autoren werden im Spektrum einer alkalischen Lösung von Methämoglobin 3, von einigen Autoren 4 Absorptionsstreifen beschrieben.

Maximum der Absorption in Rot. Wird eine neutrale Lösung von Methämoglobin alkalisch gemacht, so tritt nach Jäderholm (1877) an Stelle des Streifens bei 631 $\mu\mu$ ein neuer, mehr violettwärts gelegener Streifen auf, den er mit „ π “ bezeichnet und dessen Stelle in einer zweiten Mitteilung¹⁾ (1880) bei 604, in einer dritten Mitteilung bei 602 $\mu\mu$ angibt. Lewin, Miethe und Stenger fanden denselben Streifen bei 608 $\mu\mu$, und auch Rost, Franz und Heise sprechen von einem Streifen in Rot. Ferner gibt bereits Jäderholm (1884) an, daß in alkalischen Lösungen von Methämoglobin ein Schatten zu sehen ist, der den Streifen in Rot mit dem in Gelb (s. weiter unten) verbindet. Dieser

¹⁾ Axel Jäderholm, Über Methämoglobin. Zeitschr. f. Biol. 16, 1880.

Schatten wird auch von Hüfner und Külz¹⁾, und auch von Araki²⁾ beschrieben. Daß einzelne Autoren ihn nicht sahen, rührt nach Ziemke und Müller davon her, daß sie in allzu verdünnten Lösungen beobachtet hatten.

Laut meinen Beobachtungen ist in soda-alkalischen Lösungen von Methämoglobin ein Absorptionsmaximum in Rot nicht vorhanden, wenn man von dem aus der Reihe springenden Beobachtungspunkt (s. Fig. 1) violettwärts von

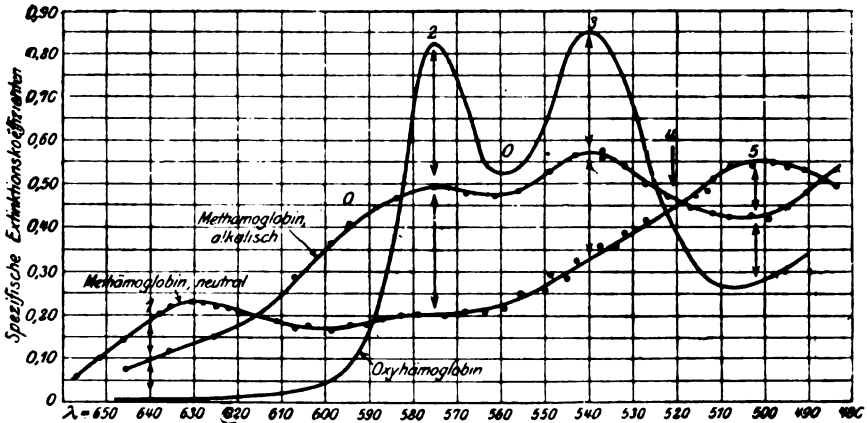


Fig. 1.

600 $\mu\mu$ absieht, an dem ich die Kurve vorbeizog und der wahrscheinlich von Beobachtungsfehlern herrührt. Wohl aber fand ich entsprechend dem oben erwähnten Schatten eine vom roten Ende des Spektrums angefangen erst langsamer, dann etwas rascher zunehmende Absorption, die weiterhin ununterbrochen und beinahe gleichmäßig bis zu dem weiter unten zu beschreibenden Maximum in Gelb ansteigt.

Maximum der Absorption in Blau. Während die weitaus meisten der bereits erwähnten Autoren nichts von einem Streifen in Blau sahen, geben Lewin, Miethe und Stenger die Stelle desselben bei 493 $\mu\mu$ an; auch Rost Franz und Heise sprechen von einem Streifen in Violett.

Meine eigenen Erfahrungen hierüber sind recht spärlich,

¹⁾ G. Hüfner und Richard Külz, Über den Sauerstoffgehalt des Methämoglobins. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 7, 1883.

²⁾ Trasaburo Araki, Über den Blutfarbstoff und seine näheren Umwandlungsprodukte. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 14, 1890.

was angesichts der Schwierigkeiten der Beobachtung in Blau begreiflich ist. Anders als in sehr verdünnten Lösungen läßt sich nämlich hier überhaupt nicht ablesen, demzufolge sind aber auch die Ausschläge recht geringe, und durch die relative Größe der unvermeidlichen Ablesungsfehler⁴ auch entsprechend unsicher. Soweit aus einer einzigen Beobachtungsreihe (Nr. 7), die brauchbare Resultate lieferte, sich folgern läßt, kann ich nur so viel aussagen, daß nach dem Abstieg vom Maximum in Grün (s. weiter unten) eine neue Zunahme der Absorption bei etwa 500 $\mu\mu$ ansetzt, die bis zu dem von mir erreichten Ende des Spektrums immerfort noch zunimmt.

Die beiden Maxima in Grün und in Gelb. Daß die in alkalischen Lösungen von Methämoglobin sichtbaren beiden mittleren Streifen, die genau an der Stelle der bekannten Streifen des Oxhämoglobins liegen, nicht dem Methämoglobin selbst angehören, sondern von mitanwesendem Oxyhämoglobin herrühren, wird von den meisten Autoren angedeutet oder direkt behauptet. So spricht zwar Jäderholm vorerst nur davon, daß die beiden mittleren Streifen der neutralen Lösung nach der Alkalisierung ihre Stelle beibehalten; während Araki bereits betont, daß dieselben von beigemischem Oxyhämoglobin herrühren, Formanek gar vollends direkt von einer durch den Alkalizusatz bedingten Rückverwandlung des Methämoglobins in Oxhämoglobin spricht. (Auch Lewin, Miethe und Stenger finden einen Unterschied in der Lage dieser beiden Streifen, je nachdem es sich um eine neutrale oder alkalische Lösung handelt, indem im letzteren Falle die Maxima der Lichtabsorption etwas rotwärts verschoben sind.)

In der Fig. 1 erscheint es direkt zwingend klar, daß die beiden mittleren Maxima nur von Oxyhämoglobin herrühren können, das in der alkalischen Lösung des Methämoglobins mit diesem gleichzeitig vorhanden ist; beweisend hierfür ist auch die zwischen beide Maxima gelagerte charakteristische Depression, wenn sie auch seichter ist, als dem Oxyhämoglobin allein zukäme. Auf welche Weise dieser eigentümliche Verlauf der Kurve zustande kommt, davon soll weiter unten noch gesprochen werden.

C. Absorptionsverhältnisse des Methämoglobins und deren Quotienten an beiden von Hüfner angegebenen Spektralstellen.

An den beiden Stellen des Spektrums (2. Streifen in Grün und Zwischenraum zwischen beiden Streifen), an denen Hüfner seine grundlegenden Untersuchungen über das Oxyhämoglobin ausgeführt hatte ist die Kenntnis der Absorptionsverhältnisse (Vierordt) und deren Quotienten von besonderer Wichtigkeit, da einerseits in diesem Spektralgebiet am schärfsten abgelesen werden kann, andererseits der Unterschied in der Absorption an beiden Stellen prägnant genug und je nach der Art des untersuchten Hämoglobins resp. dessen Derivate so charakteristisch für den betreffenden Farbstoff ist, daß hieraus Schlüsse in qualitativer und quantitativer Hinsicht gezogen werden können.

Die Feststellung der genannten Konstanten des Methämoglobins wurde zwar bereits von Hüfner und Otto¹⁾, dann von Otto²⁾, sowie auch von Hüfner und Külz³⁾ versucht; da jedoch diese Beobachtungen an Spektralstellen erhalten wurden, die von dem später von Hüfner vorgeschlagenen, und darum auch von mir verwendeten nicht unwesentlich abweichen, können sie in unseren weiteren Betrachtungen nicht berücksichtigt werden.

Die Konstanten der neutralen Lösungen. Außer den soeben genannten Arbeiten, die sich überwiegend auf neutrale Lösungen des Methämoglobins beziehen, die jedoch aus den obengenannten Gründen nicht in Betracht kommen können, ist es eigentlich nur eine einzige Angabe Bürkers⁴⁾ aus seinen bisher ausführlich noch nicht mitgeteilten Versuchen, die sich auf diesen Gegenstand bezieht.

Bürker erhielt nämlich als Quotienten der Extinktionskoeffizienten der Spektralgebiete 534,0 bis 542,0 und 556,5 bis 564,5 $\mu\mu$ den Wert 1,58, also genau dasselbe, was Hüfner

¹⁾ G. Hüfner und J. Otto, Über kristallisiertes Methämoglobin. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 7, 1882 bis 1883.

²⁾ Jac. G. Otto, Studien über das Methämoglobin. *Arch. f. d. ges. Physiologie* 31, 1883.

³⁾ l. c.

⁴⁾ K. Bürker in Tigerstedts *Handbuch der physiol. Methodik* 2. erste Hälfte, S. 200.

in seinen späteren Arbeiten für soda-alkalische Lösungen von Oxyhämoglobin gefunden hatte.

Meine Versuchareihen ergaben nachfolgende in Tabelle II zusammengestellte Werte:

Tabelle II.

Spezifische Extinktionskoeffizienten und Absorptionsverhältnisse neutraler Lösungen von Methämoglobin.

Untersuchte Lösung	Konzentrat. der untersuchten Lösung ‰	Spezifischer Extinktionskoeffizient $\times 10^3$		Absorptionsverhältnis $\times 10^3$		a,b
		bei 565,6 bis 556,1 $\mu\mu$	bei 541,4 bis 533,7 $\mu\mu$	bei 565,6 bis 556,1 $\mu\mu$ (a)	bei 541,4 bis 533,7 $\mu\mu$ (b)	
Pferdeblutkörperchenlösung 52 mit F.C.K. versetzt . .	0,0738	236	384	424	260	1,638
Pferdehämoglobin 50, neutrale Lösung mit F.C.K. versetzt und 7 Tage lang dialysiert (Lösung 7)	0,0722	212	357	472	280	1,633
Dasselbe 13 Tage lang dialy- siert (Lösung 11/a)	0,0722	218	356	460	281	1,635
Dasselbe 19 Tage lang dialy- siert (Lösung 12)	0,148	245	392	409	255	1,604
			Mittelwerte: 417		272	1,641
Krystallis. Hundemethämoglo- bin 44 (Lösung a/1)	0,0667	231	386	432	259	1,671
Krystallis. Hundemethämoglo- bin 55, durch Zentrifugieren erhaltene Fraktion (Lösung b/1)	0,188	224	361	447	277	1,611
Eine zweite Lösung derselben Fraktion (Lösung b/3) . .	0,0938	208	347	481	288	1,671
Krystallisiertes Hundemethä- moglobin 55, durch Filtrieren erhaltene Fraktion (Lö- sung a/1)	0,089	216	355	464	281	1,647
			Mittelwerte: 456		276	1,650

Wenn man von der Lösung 52 absieht, in der eine mit F.C.K. versetzte Blutkörperchenlösung untersucht wurde, die also nicht unbedingt einwandfrei ist, läßt die Übereinstimmung der Ergebnisse der beiden anderen Versuchsgruppen nichts zu wünschen übrig, und man kann als definitiven Mittelwert für eine neutrale Lösung von Methämoglobin folgende Werte annehmen:

für das Absorptionsverhältnis bei 565,6 bis 566,1 $\mu\mu$ **0,00451**
 " " " " 541,4 " 533,7 " **0,00374**
 " den Quotienten **1,645**

Der Wert des Quotienten ist, wie ersichtlich erheblich größer als der von Bürker mitgeteilte.

Die Konstanten der alkalischen Lösungen. Diesbezügliche Untersuchungen hat v. Zeynek¹⁾ ausgeführt. Seine Ergebnisse seien nachfolgend zusammengestellt.

In	Absorptionsverhältnis $\times 10^6$		den Quotienten
	bei 565,0 bis 554,0 $\mu\mu$	bei 542,5 bis 531,5 $\mu\mu$	
3 Versuchen an Rinderblut, das mit F.C.K. versetzt war . .	208	177	1,176
16 Versuchen an Pferd methä- moglobin	205	173	1,187
14 Versuchen an Schweinemet- hämoglobin	210	178	1,183

Sehen wir von den Versuchen ab, in denen einfach Blut mit F.C.K. versetzt war, so ergeben sich als Mittelwerte für die Absorptionsverhältnisse 0,002075 resp. 0,001755 und für den Quotienten 1,185,

In den 16 Versuchsreihen, die mir hierüber zur Verfügung stehen, erhielt ich nachfolgende in Tabelle III zusammengestellte Werte.

Sehen wir von den Versuchen 1 und 2, in denen einfach mit F.C.K. versetztes Blut untersucht wurde, wieder ab, so kann man als Mittelwert für die soda-alkalische Lösung von Methämoglobin folgende Werte annehmen:

für das Absorptionsverhältnis bei 565,6 bis 566,1 $\mu\mu$ **0,002095**
 " " " " 541,4 " 533,7 " **0,001735**
 " den Quotienten **1,215**

Die Übereinstimmung zwischen den von Zeynek und mir für die Absorptionsverhältnisse erhaltenen Werte ist als recht gut zu bezeichnen, indem mein Wert im Zwischenraum zwischen

¹⁾ Richard v. Zeynek, Neue Beobachtungen und Versuche über das Methämoglobin und seine Bildungsweise. Arch. f. [Anat. u.] Physiol. 1899.

Tabelle III.

Spezifische Extinktionskoeffizienten und Absorptionsverhältnisse soda-alkalischer Lösungen von Methämoglobin.

Untersuchte Lösung	Konzentrat. der unter- suchten Lösung %	Spezifischer Ex- tinktionskoeffizient $\times 10^4$		Absorptionsver- hältnis $\times 10^4$		a/b
		bei 565,6 bis 556,1 $\mu\mu$	bei 541,4 bis 533,7 $\mu\mu$	bei 565,6	bei 541,4	
				bis 556,1 $\mu\mu$ (a)	bis 533,7 $\mu\mu$ (b)	
1 Pferdeblutkörperchenlösung 52, mit F.C.K. versetzt, soda-alkalisch gemachte (Lösung 2/o)	0,0738	469	579	213	172	1,238
2 Hundeblood 50, verdünnt, wie Nr. 1 behandelt (Lösung 3)	0,101	443	535	226	187	1,209
				Mittelwerte: 219		179
3 Pferdehäoglobin 50, Lösung wie Nr. 1 behandelt (Lösung 4)	0,0483	458	565	218	177	1,235
4 Eine andere Lösung desselben Häoglobins, ebenso behandelt (Lösung 5)	0,0935	492	594	203	168	1,209
5 Eine dritte Lösung desselben Häoglobins mit F.C.K. versetzt, dialysiert, soda-alkalisch gemacht (Lösung 9)	0,0902	486	587	206	170	1,207
6 Eine andere Verdünnung desselben Dialysates (Lösung 11/b)	0,0722	469	579	213	178	1,234
7 Eine dritte Verdünnung desselben Dialysates (Lösung 15)	0,0295	478	575	209	174	1,201
8 Pferdehäoglobin 51, wie Nr. 1 behandelt (Lösung 3)	0,0598	477	584	210	171	1,224
9 Hundehäoglobin 55, wie Nr. 1 behandelt (Lösung 1/b)	0,0779	477	588	210	171	1,223
10 Eine andere Lösung desselben Häoglobins, ebenso behandelt (Lösung 2/b)	0,0456	455	538	219	186	1,182
11 Eine dritte Lösung desselben Häoglobins, ebenso behandelt (Lösung 2)	0,0795	487	591	205	169	1,213
				Mittelwerte: 210		173
12 Krystallisiertes Hundemethämoglobin 44 (Lösung b)	0,0979	471	575	212	174	1,219
13 Krystallisiertes Hundemethämoglobin 55, durch Zentrifugieren erhaltene Fraktion (Lösung b/2)	0,188	483	588	207	170	1,217
14 Eine zweite Lösung derselben Fraktion (Lösung b/4)	0,0938	511	619	196	161	1,213
15 Dasselbe Methämoglobin, durch Filtrieren erhaltene Fraktion (Lösung a/2)	0,089	469	566	213	177	1,205
16 Krystallisiertes Hundemethämoglobin 56 (Lösung b/2)	0,0812	465	571	215	175	1,229
				Mittelwerte: 209		172
						1,217

beiden Streifen um 1⁰/₀ größer, am 2. Streifen in Grün um nicht ganze 2⁰/₀ geringer ist; den beiden entgegengesetzten Unterschieden entsprechend ist der von mir erhaltene Quotient um beinahe 3⁰/₀ größer als der Zeyneksche. Der genannte Unterschied von 1⁰/₀ im Zwischenraum kann immerhin noch als von den noch zulässigen und kaum vermeidlichen Versuchsfehlern herrührend erachtet werden; weniger wahrscheinlich ist dies für die größere Differenz am 2. Streifen in Grün anzunehmen, um so eher, da hier eine andere, gut begründete Erklärung gegeben werden kann, bezüglich deren ich auf meine öfters erwähnte erste Mitteilung verweisen muß.

Ich habe nämlich seinerzeit gefunden, daß der Quotient der Absorptionsverhältnisse im Zwischenraum, und am 2. Streifen in Grün in ganz frisch, sofort nach der Herstellung untersuchten soda-alkalischen Lösungen von Oxyhämoglobin nicht, wie Hüfner seinerzeit angab, 1,58 beträgt, sondern etwas über 1,60, und daß ich aber jenen niedrigen Wert an solchen Lösungen erhalten habe, die weniger bis 24 Stunden gestanden hatten, also nicht sofort nach Herstellung der Lösung untersucht wurden. Ich habe dort auch nachweisen können, daß diese im Laufe der Tage stufenweise Abnahme des Wertes des Quotienten davon herrührt, daß die Absorption am 2. Streifen in Grün rascher, oft weit rascher, abnimmt als im Zwischenraum.

In analoger Weise verhalten sich auch soda-alkalische Lösungen von Methämoglobin, von denen ich einige nicht nur sofort nach Herstellung der Lösung, sondern nachher noch wiederholt im Verlaufe der nächsten Stunden oder Tage untersucht hatte. Von den in nächstehender Tabelle IV zusammengestellten Fällen ist der obenanstehende am lehrreichsten.

So, wie ich für den Quotienten an Lösungen von Oxyhämoglobin einen höheren Wert als Hüfner erhielt, wenn ich die Lösungen sofort nach ihrer Herstellung untersuchte, war auch der an soda-alkalischen Methämoglobinlösungen von mir gefundene Wert des Quotienten höher, wenn die Lösung für sich untersucht wurde, und zwar aus dem Grunde, weil die Absorption auch in diesen Lösungen am 2. Streifen in Grün rascher abnimmt als im Zwischenraum zwischen beiden Streifen. Bezüglich obiger Tabelle IV sei noch bemerkt: Erstens, daß hier die Extinktionskoeffizienten angegeben sind, daher

Tabelle IV.

Veränderung der Extinktionskoeffizienten und deren Quotienten in alkalischen und neutralen Lösungen von Methämoglobin während der Aufbewahrung derselben.

	Untersuchte Lösung	Spektalbereiche: a (in Grün) bei 41,4 bis 533,7 $\mu\mu$; b (im Zwischen- raum bei 565,6 bis 566,1 $\mu\mu$)	Sofort nach der Alkalisierung untersucht	5 bis 6 Stunden später untersucht	24 Stunden später untersucht	48 Stunden später untersucht	65 Stunden später untersucht					
soda-alkalische Lösungen	Pferdehäoglobin 50, neutrale Lösung mit F.C.K. versetzt, soda-alkalisch gemacht (Lösung 4)	a . . . b . . .	0,273 0,221	1,235	0,255 0,211	1,212	0,245 0,207	1,184	0,234 0,199	1,177	0,227 0,191	1,184
	Eine andere Lösung desselben Häoglobins; ebenso behandelt (Lösung 5)	a . . . b . . .	0,556 0,400	1,209	0,522 0,436	1,195	0,543 0,433	1,253				
	Pferdehäoglobin 51, wie Nr. 50 behandelt (Lösung 3)	a . . . b . . .	0,346 0,283	1,224			0,315 0,265	1,189	0,302 0,260	1,160		
	Dasselbe Häoglobin, nach dem Versetzen mit F.C.K. drei Tage lang dialysiert, dann soda-alkalisch gemacht (Lösung 8)	a . . . b . . .	0,906 0,730	1,241			0,817 0,678	1,206				
	Hundeblut 55, wie Nr. 50 behandelt (Lösung 3)	a . . . b . . .	0,539 0,446	1,209	0,482 0,421	1,145						
	Hundemethämoglobin 55 (Lösung b/2)	a . . . b . . .	1,102 0,906	1,217	1,058 0,880	1,202	1,039 0,860	1,208				
neutrale Lösungen	Pferdehäoglobin 50, nach Versetzen der neutralen Lösung mit F.C.R. 19 Tage lang dialysiert (Lösung 12)	a . . . b . . .	0,579 0,361	1,604			0,573 0,362	1,581				
	Krystallisiertes Hundemethämoglobin 55 (Lösung b/3)	a . . . b . . .	0,326 0,195	1,671			0,329 0,195	1,686	0,345 0,215	1,612		

selbstverständlich nicht der Quotient $\frac{\text{Zwischenraum}}{\text{Grün}}$, sondern umgekehrt $\frac{\text{Grün}}{\text{Zwischenraum}}$ figuriert. Zweitens, daß, wie aus den beiden untersten Reihen der Tabelle IV zu ersehen ist, die Abnahme der Lichtabsorption während des Stehens bloß an

soda-alkalischen Lösungen des Methämoglobins, jedoch nicht auch an neutralen zu konstatieren war.

Über die Beschaffenheit des Methämoglobins in seiner sogenannten alkalischen Lösung. Der Umstand, daß, wie vorangehend gezeigt wurde, eine neutrale und eine alkalische Lösung von Methämoglobin das Licht wesentlich anders absorbieren, läßt unmittelbar folgern, daß die beiden Flüssigkeiten sich nicht bloß in der Art des Lösungsmittels unterscheiden, sondern auch in dem Zustande, in dem sich das Gelöste befindet; ja daß der Unterschied in letzterem ein tiefgreifender sein muß. Aus dem, was S. 280 kurz angeführt war, geht auch schon hervor, um welche Veränderung es sich handeln kann, die das Methämoglobin unter der Einwirkung des Alkalis erleidet. Es wird nämlich von den Autoren durchweg zugegeben, daß die beiden mittleren Streifen einer alkalischen Lösung von Methämoglobin genau an den Stellen liegen wie in einer Lösung von Oxyhämoglobin; ferner wird von manchen Autoren angedeutet, von anderen sogar direkt gesagt, daß das Methämoglobin beim Lösen in Alkali in Oxyhämoglobin rückverwandelt wird.

Die Kurven der spezifischen (auf 0,1% Konzentration bezogenen) Extinktionskoeffizienten der dreierlei Farbstofflösungen zeigen in der Fig. 1 einen so charakteristischen Verlauf, daß hieraus weitgehende Schlüsse auf die Zustandsänderung des in Alkali gelösten Methämoglobins gezogen werden können. An den fünf Stellen, die in der Fig. 1 mit je einem Pfeil bezeichnet sind, verläuft die Kurve des alkalischen Methämoglobins annähernd symmetrisch zwischen den Kurven des Oxyhämoglobins und des neutralen Methämoglobins. Bei den Pfeilen 1 und 5 verläuft die Oxyhämoglobinkurve unten, die des neutralen Methämoglobins oben; bei den Pfeilen 2 und 3 umgekehrt die Oxyhämoglobinkurve hoch oben, die des neutralen Methämoglobins tief unten: an allen vier Stellen schiebt sich die Kurve des alkalischen Methämoglobins symmetrisch zwischen die beiden anderen. An der Stelle des Pfeiles 4 kreuzen sich die Kurven des Oxyhämoglobins und des neutralen Methämoglobins; beinahe genau dort erfolgt auch die Kreuzung dieser beiden Kurven mit der des alkalischen Methämoglobins.

Mit anderen Worten: der Mittelwert des spezifischen

Extinktionskoeffizienten der Oxyhämoglobin- und neutralen Methämoglobinlösung ergibt an den genannten Spektralstellen und in der Nähe derselben annähernd genau die Extinktionskoeffizienten der alkalischen Methämoglobinlösung. Die Kurve der letzteren verläuft demnach so, wie die einer Lösung, die Oxyhämoglobin und neutrales Methämoglobin in der gleichen Konzentration von je $0,05\%$ enthält, woraus sich dann eine Gesamtkonzentration von $0,1\%$ ergibt; woraus sich weiter ergeben würde, daß bei der Alkalisierung einer Methämoglobinlösung jeweils etwa die Hälfte des Methämoglobins in Oxyhämoglobin rückverwandelt wird.

An 2 anderen mit je einem Kreis bezeichneten Stellen in Fig. 1, im Zwischenraum zwischen den beiden Oxyhämoglobinstreifen, besonders aber rotwärts vom 1. Streifen (in Gelb), im Gebiete des sogenannten Vorschlagschattens, verläuft die Kurve des alkalischen Methämoglobins höher als der Mittel-lage zwischen Oxyhämoglobin und Methämoglobin entspräche. Es muß also die alkalische Lösung des Methämoglobins außer dem Oxyhämoglobin noch eine lichtabsorbierende Substanz enthalten, die das Licht an den mit den Pfeilen bezeichneten Stellen annähernd so stark wie Oxyhämoglobin, hingegen an den mit den Kreisen bezeichneten Stellen weit stärker absorbiert.

Um diese Verhältnisse klarer zu machen, habe ich in nachstehender Fig. 2 einmal die bereits in Fig. 1 dargestellte Kurve des alkalischen Methämoglobins aufgetragen, daneben aber auch eine Kurve der Lichtabsorption einer Lösung kon-

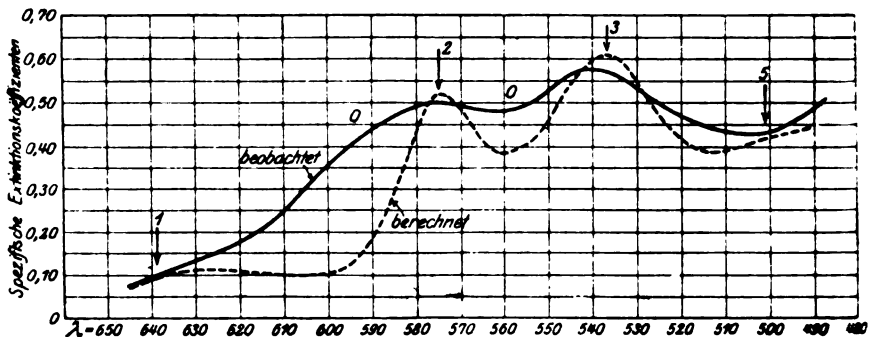


Fig. 2.

struiert, die je 0,05% Methämoglobin und Oxyhämoglobin enthält. Die Kongruenz an den erstgenannten mit Pfeilen bezeichneten, die Divergenz an den mit den Ringen bezeichneten Stellen springt hier sehr klar ins Auge.

Ohne den Ergebnissen der Versuche, die hierüber noch im Gange, jedoch noch lange nicht abgeschlossen sind, vorgreifen zu wollen, sei bloß auf die Wahrscheinlichkeit hingewiesen, daß der Ausdruck alkalische Methämoglobinlösung nur mit dem Vorbehalte wird gebraucht werden dürfen, daß in derselben neben Methämoglobin und Oxyhämoglobin vielleicht auch andere Derivate von Hämoglobin enthalten sind.

Die Ergebnisse dieser Versuche lauten kurz zusammengefaßt:

1. Die Lichtabsorption neutraler sowohl wie soda-alkalischer Lösungen von Methämoglobin wird über eine große Strecke des sichtbaren Spektrums festgestellt.

2. An neutralen Lösungen des Methämoglobins beträgt das Absorptionsverhältnis bei 565,6 bis 556,1 $\mu\mu$ 0,00451, bei 541,4 bis 533,7 $\mu\mu$ 0,00274; der Quotient dieser Werte aber 1,645.

3. An soda-alkalischen Lösungen des Methämoglobins hat das Absorptionsverhältnis bei 565,6 bis 556,1 $\mu\mu$ den Wert 0,002095, bei 541,4 bis 533,7 $\mu\mu$ 0,001725; der Quotient der Werte ist gleich 1,215.

4. Der tiefgreifende Unterschied im spektralen Verhalten des Methämoglobins, je nachdem man es in neutraler oder in soda-alkalischer Lösung untersucht wird dadurch edingt, daß das Methämoglobin bei Alkalisierung seiner Lösung zu einem sehr ansehnlichen Teil in Oxyhämoglobin rückverwandelt, wahrscheinlich auch in andere Hämoglobinderivate verwandelt war.

Bestimmung des durch Urease zersetzten Harnstoffs aus der CO₂-Komponente des Zersetzungsproduktes.

Von
S. Partos.

(Aus dem physiolog.-chem. Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 6. September 1919.)

Mit 1 Figur im Text.

Die Bestimmung des Harnstoffes aus dem durch Einwirkung von Urease entstandenen kohlensauren Ammonium bedeutet zweifellos einen sehr großen Fortschritt, und die titrimetrische Bestimmung des basischen Anteils des kohlensauren Ammoniums hat schon öfters Anwendung gefunden. Nun dürfte es für manche, namentlich wissenschaftliche Zwecke erwünscht sein, den Harnstoffgehalt im Harn oder in anderen Körperflüssigkeiten nicht bloß durch Bestimmung der basischen Komponente zu ermitteln, sondern der Kontrolle halber auch durch Bestimmung der Kohlensäurekomponente des Umwandlungsproduktes. Ja, für praktische Zwecke erscheint es vielleicht direkt erwünscht, eine Methode zu finden, in der der Praktiker den immerhin in Betracht kommenden Schwierigkeiten enthoben ist, die aus der unerläßlichen Forderung nach einer Normallösung von tadellosem Titer erwachsen.

Diesem Zwecke dienlich erscheint mir ein von mir konstruierter Apparat, in dem die Vorteile des Lohnsteinschen Saccharimeters und des Barcroftschen Blutgasbestimmungapparates vereint sind, denn auf diese Weise konnte sowohl die Umwandlung des Harnstoffes in kohlensaures Ammonium als auch die Entbindung der Kohlensäure in einem während der ganzen Dauer der beiden Prozesse luftdicht verschlossenem Raume vorgenommen werden.

Beschreibung des Apparates.

Der Apparat besteht 1. aus einem U-förmigen Rohr mit zwei ungleich langen Schenkeln und 2. aus einem zylindrischen Aufsatz, der in das obere Ende des kürzeren Schenkels des U-Rohres genau eingeschliffen,

demselben aufsitzt. Der längere, oben offene Schenkel *a* des U-Rohres trägt eine Skala, am besten aus einem Streifen Millimeterpapier. Der kürzere Schenkel *b* des U-Rohres, ist zu einer Hohlkugel *c* erweitert, deren verschmälertes oberer Halsteil *d* ähnlich wie die Barocroftsche Blutgasbirne, etwa in der Mitte ihrer Höhe seitlich ausgebogen ist, so daß ihre abgeschliffene innere Fläche daselbst rinnenförmig vertieft ist (*e*). In dieses Hohlstück genau eingeschliffen ist das untere Ende des Ansatzstückes *f*, bestehend aus einem Hohlzylinder, der oben durch einen eingeschliffenen hohlen Glasstopfen *g* verschlossen werden kann. In der Achse des Hohlzylinders verläuft ein etwa 1,5 cm fassendes Röhrchen, das oben offen und frei steht, unten abgelenkt und mit dem unteren ebenfalls offenen Ende in die Wand des Hohlzylinders eingeschmolzen ist. Diese untere Mündung des Röhrchens liegt genau in der Höhe des oberen Endes der erwähnten Rinne *e*. Wird das gut eingefettete Ansatzstück in den Halsteil so eingesetzt, daß die untere

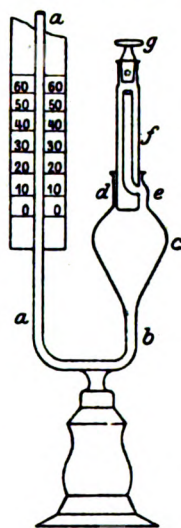


Fig. 1.

Mündung des axialen Röhrchens nicht auf die Rinne des Halsteiles, sondern rechts oder links von dieser Stelle auf den Glasschliff stößt, so läßt sich das Röhrchen mit Schwefelsäure füllen, die erst dann in die unten befindliche Hohlkugel abläuft, wenn durch Herumdrehen des Ansatzstückes die untere Mündung des Röhrchens und die Rinne einander gegenüberstehen.

Das obere Ende des Ansatzstückes ist an einer Stelle ihrer Seitenwand durchbohrt, desgleichen auch der eingeschliffene Glasstopfen; sind diese beiden Bohrungen einander zugekehrt, so steht der Hohlraum der Kugel mit der äußeren Luft in Verbindung, hingegen luftdicht gegeneinander abgeschlossen, wenn der Stopfen herumgedreht wird.

Kalibrierung des Apparates.

In den Apparat wird so viel Quecksilber eingegossen, daß die zu zersetzende Flüssigkeit nachher eben noch Platz in der Hohlkugel über dem Quecksilber finde. (Nach erfolgter Kalibrierung muß diese Quecksilbermenge wie auch der Volumen der zu zersetzenden Flüssigkeit bei weiterem Gebrauch dieses Apparates ein für allemal beibehalten werden!) Die Kalibrierung wird so vorgenommen, daß man von Lösungen von reinstem kohlen-sauren Natrium (aus doppelkohlen-saurem Natrium), dessen Konzentration ge-

nauestens bekannt ist, jedesmal eine genau gekannte Menge (1 ccm) aus einer kalibrierten Pipette in die Hohlkugel über das Quecksilber fließen läßt; sodann das gut eingefettete Ansatzstück auf den Kugelhals so aufsetzt, daß das axiale Röhrchen blind an den Halschliff aufstößt und in das Röhrchen 1,5 ccm 30%iger Schwefelsäure mittels einer dünn ausgezogenen Glasröhre einfüllt. Nun wird der eingefettete Glasstopfen in das obere Ende des Ansatzstückes eingesetzt, so herumgedreht, daß die Bohrungen einander gegenüberstehen, und die Höhe des Quecksilberniveaus im längeren Schenkel des U-Rohres am Millimeterpapier abgelesen. Diese Stelle ist der Nullpunkt des Apparates. Jetzt wird durch Herumdrehen des Glasstopfens der Apparat verschlossen, dann auch das Ansatzstück herumgedreht, demzufolge die Schwefelsäure zum kohlen-sauren Natrium herunterfließt, worauf alsbald die Kohlensäure-entwicklung ansetzt und das Quecksilber im längeren Schenkel des U-Rohres erst rascher, dann langsamer ansteigt. Durch vorsichtiges Rütteln und Drehen des Apparates wird das Emponsteigen zahlreicher, an der Glaswand oder unter der Oberfläche der Flüssigkeit haftender Kohlensäurebläschen beschleunigt. Findet ein weiterer Anstieg des Quecksilbers nicht mehr statt, so wird dessen Niveau wieder abgelesen und der Abstand gegen den Nullpunkt notiert.

Nach einer Reihe von Versuchen mit Lösungen von verschiedener Konzentration wird erstens berechnet, wieviel Kohlensäure in jedem Versuche in Freiheit gesetzt wurde, zweitens das Verhältnis zwischen Steighöhe des Quecksilbers und der entbundenen Kohlensäure festgestellt.

An einem der von mir benutzten Apparate erhielt ich folgende in nachfolgender Tabelle I verzeichneten Werte.

Tabelle I.

Entbundene Kohlensäure mg	Quecksilber- anstieg mm	1 mm Quecksilberanstieg bedeutet entbundene Kohlensäure mg
0,444	6,1	0,072
0,821	11,5	0,071
1,50	21,4	0,070
1,82	25,3	0,072
3,86	52,2	0,070
6,55	88,2	0,074
10,64	144,8	0,073

Mittelwert 0,718

Hieraus ließ sich berechnen, daß 1 mm Quecksilberanstieg 0,0979 mg Harnstoff bedeutet.

Sowohl an diesem Apparat, wie auch an mehreren anderen von mir kalibrierten, hat es den Anschein, daß größere CO_2 -Mengen ein relativ geringerer Quecksilberanstieg entspricht, demzufolge dann die aus 1 mm Hg zu berechnende CO_2 -Menge nicht längst der ganzen Skala eine gleiche, sondern umso höher ist, je höher das Quecksilber angestiegen

war. Dies dürfte weniger durch Undichtigkeiten der Glasschliffe, als dadurch bedingt sein, daß von der CO_2 durch die — wenn auch saure — Flüssigkeit umso mehr absorbiert wird, je größer die CO_2 -Tension über der Flüssigkeit ist. Man wird die Wahl haben, entweder mit einem Mittelwert, wie er am Fuße der Tabelle I berechnet ist, zu arbeiten, oder die entsprechenden Werte der Kalibrierungstabelle selbst, eventuell durch Interpolation, zu entnehmen.

Reinigung des Apparates.

Es darf nicht unerwähnt bleiben, daß auf die Reinigung des Apparates nach jeder Benutzung sorgsam geachtet werden muß. In der Hohlkugel, namentlich zwischen der Wand derselben und dem Quecksilber, können Säuretröpfchen zurückbleiben, die die Wirkung des Fermentes in einem nächsten Versuch schwächen oder vollends verhindern können. Das Zurückbleiben der Säurespuren kann am besten verhindert werden, wenn man dem Wasser, daß zur Spülung der Hohlkugel dient, etwas Bariumchloridlösung zusetzt und hierdurch die Schwefelsäure zum Ausfällen bringt. Der Niederschlag, sowie die Reste von Bariumchlorid werden durch weiteres Spülen mit Wasser hinausgeschwemmt

Prüfung des Fermentes.

Vor allem handelt es sich darum, festzustellen, ob das Fermentpräparat aus den mir leider bloß in spärlicher Menge zur Verfügung stehenden Sojabohnen auch entsprechend wirksam sei, und durch dasselbe Harnstoff quantitativ zersetzt würde. Es wurde eine Harnstofflösung von genau bekannter Konzentration hergestellt; 1 oder 2 ccm derselben, mit einer Messerspitze voll des nach Hahn und Sophra¹⁾ hergestellten Fermentes und mit 0,07 g Kochsalz versetzt, und mit 10 ccm Wasser verdünnt. (In den ersten vier der nachfolgend zusammengestellten Versuche wurde nach der Originalvorschrift von A. Hahn und Sophra auch je 1 Tropfen Natronlauge hinzugefügt.) Nach Ablauf von 20 Stunden wurde mit $\frac{2}{10}$ -Salzsäure und Methylorange als Indicator titriert (der Umschlag von Orange gegen Rot bot allerdings einige Schwierigkeiten), wobei die Säuremenge, die von nativem Harn allein gebunden wurde, natürlich in Abrechnung kam. Nachstehend (Tabelle II) seien einige dieser Bestimmungen mitgeteilt.

¹⁾ A. Hahn und J. Sophra. Deutsche med. Wochenschr. 1914, I, Nr. 9.

Tabelle II.

Harnstoff zersetzt	Verbrauchte $\frac{1}{10}$ -HCl	Harnstoff aus dem Titrationsergebnis berechnet
g	ccm	g
0,0233	8,04	0,0241
0,0233	7,88	0,0236
0,0233	7,88	0,0236
0,0233	7,88	0,0236
0,0465	15,62	0,0469
0,0465	15,62	0,0469
0,0233	7,80	0,0234
0,0465	15,40	0,0462

Mit diesem Ferment wurden nun in dem oben beschriebenen Apparat in mehreren Versuchen je 1 ccm einer Harnstofflösung von bekannter Konzentration zersetzt, dasselbe 20 Stunden lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen, die Kohlensäure in Freiheit gesetzt, der Anstieg des Quecksilbers am Millimeterpapier abgelesen und aus dem Kaliber, 1 mm = 0,0979 mg Harnstoff, das Endergebnis berechnet.

Nachstehend seien einige der ausgeführten Bestimmungen mitgeteilt. (Tabelle III.)

Tabelle III.

Harnstoff in den Apparat eingeführt	Quecksilber- anstieg	Harnstoff aus dem Quecksilber- anstieg berechnet
mg	mm	mg
5,66	57,0	5,58
5,65	57,9	5,66
10,8	112,8	11,0
9,60	98,0	9,59
12,0	122,0	11,9

Da nach der Angabe von D. D. van Slyke usw.¹⁾ durch das Acetonverfahren dargestellte Urease bereits nach 20 Minuten vollständige Spaltung des Harnstoffs bewirken soll, habe ich aus einer weiteren Menge von Sojabohnen das Ferment nach diesem Verfahren hergestellt und allerdings nach 4 Stunden — jedoch nicht eher — vollkommene Spaltung erhalten.

¹⁾ D. D. van Slyke, Gotth. Zacharias und Glenn E. Cullen, Deutsche med. Wochenschr. 1914, I, Nr. 24.

Harnstoff in den Apparat eingeführt mg	Versuchs- dauer Stdn.	Quecksilber- anstieg mm	Harnstoff aus dem Quecksilberanstieg berechnet mg
1,65	0,33	125,8	1,23
1,65	1	144,0	1,41
1,65	2	159,2	1,56
1,65	14	162,7	1,59
6,61	4	67,2	6,58
5,65	4	57,0	5,67

Doch ist es wiederholt vorgekommen, daß das mit dem Acetonverfahren hergestellte Verfahren aus mir vorläufig unbekanntem Gründen versagte, während das mit dem Salzsäureverfahren erhaltene stets verläßlich blieb.

Harnstoffbestimmung im Harn.

Da sich die Urease als wirksam und der Apparat zur Bestimmung des Harnstoffs verwendbar erwies, ging ich nun daran, denselben zur Harnstoffbestimmung im Harn zu verwenden. Zunächst habe ich mich davon überzeugt, daß Harnstoff, einem Harn von bekanntem Harnstoffgehalte zugesetzt, mit dem bereits bewährten Titrationsverfahren genau bestimmt werden kann.

Ursprünglicher Harnstoffgehalt mg	Zugesetzter Harnstoff mg	Gesamter Harnstoffgehalt	
		berechnet mg	gefunden mg
1,77	2,34	4,11	4,12
5,04	6,02	11,06	10,9

Dann wurde in einer Reihe von Versuchen der Harnstoff in je zwei abgemessenen Portionen desselben Harns, nach dem Zersetzen des Harnstoffs durch Urease einerseits, durch das Titrationsverfahren andererseits, in meinem Apparat festgestellt. (In den letzten Versuchen mußte natürlich die CO₂-Menge in Abzug gebracht werden, die der native Harn, im Apparat mit Schwefelsäure versetzt, liefert.)

Verbrauchte ^{1/10} Salzsäure ab- züglich d. Säure- bindung d. Harns	Quecksilber- anstieg abzüglich des Wertes im nativen Harn	Harnstoffgehalt berechnet	
		aus dem Titrations- ergebnis	aus dem Queck- silberanstieg
ccm	mm	mg	mg
4,38	136,9—6,0	13,1	12,8
3,08	93,5—0	9,24	9,15
2,55	77,8—0	7,57	7,56
2,98	91,3—0	8,95	8,93

Wie ersichtlich, war die Übereinstimmung meistens eine vorzügliche

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. Paul Hári ausgeführt.

Schweflige Säure und Hefegärung.

Von
Erik Hägglund.

(Eingegangen am 17. Januar 1920.)

Mit 2 Figuren im Text.

Die praktischen Untersuchungen über Sulfitablaugenvergärung hatten mich Anfang 1914 veranlaßt, im allgemeinen die Einwirkung der schwefligen Säure und ihre Salze auf die Gärung der lebenden Hefe näher zu untersuchen. Die Versuche wurden jedoch nach einiger Zeit abgebrochen, da ich durch andere Arbeiten ganz in Anspruch genommen war. Die Resultate dieser Untersuchungen wurden damals nicht veröffentlicht, da sie noch nicht als abgeschlossen galten. Das ist auch jetzt noch nicht der Fall. Die in der letzten Zeit veröffentlichten so bedeutenden Arbeiten von Neuberg über die Sulfitgärung bzw. die praktischen Erfolge von Connstein und Lüdecke haben mich aber veranlaßt, die schon früher ausgeführten Versuche, die einen anderen Zweck verfolgt haben, obwohl noch unvollständig, mitzuteilen.

Es ist festgestellt, daß bei der Einwirkung von Säuren und Basen auf die Hefegärung, die aktivierende bzw. schwächende Wirkung in vielen Fällen ausschließlich auf den Gehalt der Lösung an Wasserstoff- bzw. Hydroxylionen, in anderen Fällen aber der undissoziierten Verbindung oder anderen Ionen zugeschrieben war.

Um diese Sache etwas eingehender zu studieren, habe ich zuerst als Beispiel die schweflige Säure gewählt. Auch in ziemlich verdünnten Lösungen ist diese Säure zu einem beträchtlichen Teil undissoziiert. Um gesondert die Anionen-

wirkung zu studieren wurden Versuche mit neutralem Natriumsulfit ausgeführt.

Die Arbeitsweise war kurz folgende:

Im Erlenmeyerkölbchen von 100 ccm wurden 20 ccm 10%ige Lösung von Glucose „Kahlbaum“ und 5 ccm Säure bzw. Salzlösung eingeführt. Darauf wurde Kohlensäure bis zur Sättigung während einiger Minuten durchgeleitet. Die Kolben wurden geschüttelt. In jedem Kolben wurde 1 g Reihefe, R. XII des Instituts für Gärungsgewerbe, eingeführt. Als Parallelversuch wurde immer ein Kolben mit Wasserzusatz, also ohne Säure oder Salz, angesetzt. Die Gärung geschah bei 30°. Die Temperaturschwankung während des Versuches betrug höchstens 0.1°. Die Geschwindigkeit der Gärung, die bei einem Unterdruck von etwa 10 ccm Quecksilber geschah, wurde durch Auffangen der Kohlensäure in Büretten über Quecksilber genau verfolgt. Vor der Ablesung wurden die Kolben geschüttelt, um etwa eintretende Übersättigungen zu vermeiden. Diese Methode dürfte die geeignetste sein, um die Gärungsgeschwindigkeit zu verfolgen, da die feinsten Verschiedenheiten der Gärungen beobachtet werden können.

Wenn die Ablesungen des Kohlensäurevolumens mit v und v_1 bei den Zeiten t und t_1 bezeichnet werden, so ist die Gärungsgeschwindigkeit $\frac{v_1 - v}{t_1 - t}$, die für die Zeit $\frac{t + t_1}{2}$ gelten kann. Die relative Gärungsgeschwindigkeit ist das Verhältnis zwischen den Gärungsgeschwindigkeiten mit und ohne Zusatz.

Schweflige Säure.

Tabelle I.

Zeit in Min.	ccm Kohlensäure			Gärungsgeschwindigkeit				Relative Gär.-Geschw.	
	Ohne Zusatz	I 0,020 n	VI 0,002 n	Zeit in Min.	Ohne Zusatz	I	VI	I	VI
64	55,6	1,8	34,8	32	0,87	0,03	0,54	0,03	0,62
121	108,0	1,8	84,9	92	0,92	0,00	0,89	0,00	0,96
195	172,0	1,8	149,7	158	0,88	0,00	0,88	0,00	1,00
262	226,0	1,8	201,9	278	0,80	0,00	0,76	0,00	0,95
342	288,8	1,8	257,4	302	0,72	0,00	0,69	0,00	0,96

Tabelle II.

Zeit in Min.	oom Kohlensäure			Gärungsgeschwindigkeit				Relative Gär.-Geschw.	
	Ohne Zusatz	II 0,010 n	IV 0,005 n	Zeit in Min.	Ohne Zusatz	II	IV	II	IV
88	69,4	5,5	12,8	44	0,79	0,08	0,15	0,10	0,19
188	158,4	7,0	25,6	189	0,89	0,02	0,13	0,02	0,14
245	205,6	7,2	50,6	216	0,82	0,00	0,44	0,00	0,54
380	267,0	7,2	109,6	287	0,72	0,00	0,69	0,00	0,96
401	312,2	7,2	159,5	365	0,68	0,00	0,73	0,00	1,16
465	359,5	7,2	208,6	488	0,58	0,00	0,70	0,00	1,21
540	396,7	7,2	245,7	502	0,50	0,00	0,56	0,00	1,12

Tabelle III.

Zeit in Min.	oom Kohlensäure			Gärungsgeschwindigkeit				Relative Gär.-Geschw.		
	Ohne Zusatz	III 0,007 n	V 0,008 n	Zeit in Min.	Ohne Zusatz	III	V	I	II	V
91	71,4	10,0	48,5	45	0,78	0,11	0,58	0,14	0,68	
159	140,5	13,0	120,7	125	1,02	0,04	1,06	0,04	1,04	
224	190,5	13,0	171,2	192	0,77	0,00	0,78	0,00	1,01	
299	250,1	13,0	282,6	261	0,81	0,00	0,82	0,00	1,01	
367	295,5	13,0	276,2	388	0,67	0,00	0,64	0,00	0,96	
458	349,5	13,0	327,0	410	0,68	0,00	0,59	0,00	0,94	

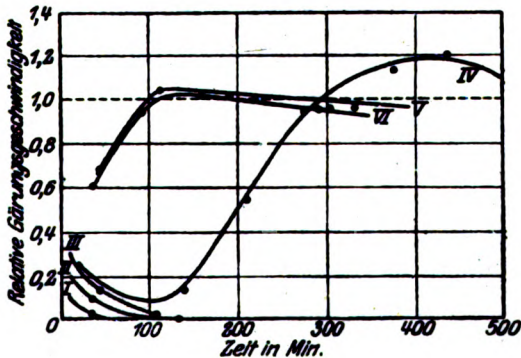


Fig. 1.

Die Resultate der Tabellen I bis III sind in Fig. 1 graphisch dargestellt. Die Konzentration der schwefligen Säure bewegte sich in den Grenzen 0,002 bis 0,020 äquivalentnormal, d. h. 0,032 bis 0,64 g im Liter. Bei einer Hefemenge von 1 g wurde die Gärung innerhalb kurzer Zeit bei 0,007 n-SO₂ gehemmt, während bei einer SO₂-Menge, entsprechend 0,005 n zunächst eine erhebliche Schwächung der Gärtätigkeit der Hefe eintritt, später aber eine sprunghafte Steigerung derselben erfolgt. Dieses Bild wurde immer wahrgenommen bei Stoffen, die als ausgesprochene Hefegifte zu betrachten sind, z. B. Buttersäure. Bemerkenswert ist ferner auch die Tatsache, daß die Grenzen zwischen vollständiger Hemmung und Aktivierung so eng aneinander liegen. Da die gärungshemmende Wirkung der Wasserstoffionen erst bei wesentlich höheren Konzentrationen eintritt, so muß sie auf dem Anion bzw. den undissoziierten Teil zurückgeführt werden. Um diese Sache aufzuklären, wurden einige Gärungsversuche mit neutralem Natriumsulfit gemacht. Die Resultate dieser Versuche sind in den Tabellen IV bis VI enthalten.

Tabelle IV.

Zeit in Min.	ccm Kohlensäure			Gärungsgeschwindigkeit				Relative Gär.-Geschw.	
	Ohne Zusatz	I 0,2 n	V 0,004 n	Zeit in Min.	Ohne Zusatz	I	V	I	V
71	62,4	7,9	63,0	35	0,88	0,11	0,89	0,12	1,01
138	125,5	26,8	126,6	104	0,94	0,28	0,95	0,30	1,01
191	175,0	48,0	176,2	164	0,93	0,40	0,93	0,43	1,00
241	215,2	66,1	214,8	216	0,80	0,36	0,77	0,45	0,96
291	246,4	83,3	245,0	266	0,62	0,34	0,60	0,55	0,97

Tabelle V.

Zeit in Min.	ccm Kohlensäure			Gärungsgeschwindigkeit				Relative Gär.-Geschw.	
	Ohne Zusatz	II 0,1 n	IV 0,004 n	Zeit in Min.	Ohne Zusatz	II	IV	II	IV
66	68,5	16,4	64,5	33	1,04	0,25	0,98	0,24	0,94
140	142,4	35,8	143,1	103	1,00	0,26	1,01	0,26	1,01
200	194,4	52,4	198,9	170	0,87	0,28	0,93	0,32	1,07
263	240,8	74,0	250,3	231	0,74	0,34	0,81	0,46	1,00
319	279,6	97,6	297,3	291	0,69	0,42	0,84	0,61	1,22
379	314,5	127,0	338,6	349	0,58	0,49	0,69	0,84	1,19

Tabelle VI.

Zeit in Min.	ccm Kohlensäure		Gärungsgeschwindigkeit			Rel. Gär- Geschw.
	Ohne Zusatz	III 0,02 n	Zeit in Min.	Ohne Zusatz	III	III
60	50,6	38,2	30	0,84	0,64	0,76
120	106,9	91,3	90	0,94	0,89	0,85
180	160,6	150,6	150	0,90	0,99	1,10
240	207,7	206,4	210	0,79	0,93	1,18
300	250,5	258,1	270	0,71	0,86	1,21

Die Versuche wurden genau so ausgeführt wie oben. Nach Zusatz von reinstem Natriumsulfit wurde durch den Kohlen säurestrom eventuell vorhandenes überschüssiges Alkali gebunden. Die Normalität der Lösungen bezieht sich auf das Äquivalentgewicht.

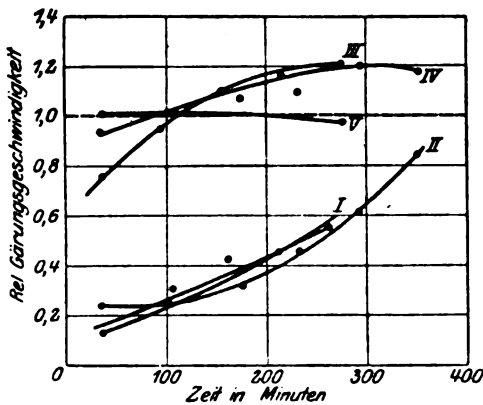


Fig. 2.

Die Ergebnisse der Tabellen IV bis VI sind in Fig. 2 graphisch zusammengestellt. Im wesentlichen begegnet uns hier dasselbe Bild wie in Fig. 1. Eine hemmende Wirkung des neutralen Sulfites auf die Gärung bei genügend großem Zusatz ist deutlich. Diese Hemmung könnte man den Anionen zuschreiben. Vergleicht man die Versuche mit schwefliger Säure und Sulfit, so findet man, daß erst bei 15facher Konzentration

von Sulfit eine anfängliche Hemmung von derselben Größe wie beim Zusatz von SO_2 entsteht. Aber während in diesem Falle mehrfach ein vollständiges Aufhören der Gärung eintrat, geschieht das bei Sulfitzusatz nicht. Es ist also klar, daß die Giftwirkung der schwefligen Säure nur zum geringen Teil auf die Anionen zurückzuführen ist. — Die Hefe hat eine große Anpassungsfähigkeit gegen Sulfit. Die Hemmung ist ja bei größerem Zusatz sehr stark, aber im Verlauf der Gärung steigt die relative Gärungsgeschwindigkeit sehr rasch und erreicht beinahe den Wert von reiner Gärung. Bei kleineren Zusätzen war eine recht kräftige Aktivierung der Gärtätigkeit bemerkbar. Diese Sache war ja recht sonderbar, und veranlaßte mich einige Versuche zu machen, um zu sehen, ob nicht hier vielleicht eine reine Salzwirkung vorlag. Es wurden deshalb einige Versuche mit Kaliumsulfat gemacht, in welchem Falle anzunehmen war, daß eine besondere Giftwirkung nicht eintreten würde. Die Resultate der Versuche ergeben sich aus den Tabellen VII und VIII.

K_2SO_4
Tabelle VII.

Zeit in Min.	ccm Kohlensäure			Gärungsgeschwindigkeit				Relative Gär.-Geschw	
	Ohne Zusatz	II 0,02 n	I 0,2 n	Zeit in Min.	Ohne Zusatz	II	I	II	I
68	54,0	68,0	72,4	81	0,86	1,00	1,15	1,16	1,24
128	99,4	127,8	189,1	98	0,92	1,08	1,11	1,17	1,21
198	162,7	200,8	218,7	160	0,84	0,97	1,06	1,15	1,26
265	220,4	268,1	291,1	231	0,78	0,87	0,94	1,19	1,29
308	258,4	305,1	331,5	286	0,77	0,86	0,94	1,12	1,22
378	297,7	354,8	384,9	348	0,68	0,71	0,76	1,12	1,21

Tabelle VIII.

Zeit in Min.	ccm Kohlensäure		Gärungsgeschwindigkeit			Rel. Gär.- Geschw.
	Ohne Zusatz	III 0,1 n	Zeit in in.	Ohne Zusatz	III	III
58	58,8	59,6	29	0,98	1,03	1,11
124	128,2	144,0	86	0,98	1,11	1,18
211	193,2	216,0	172	0,84	0,94	1,12
286	246,1	281,4	248	0,71	0,87	1,22
348	287,9	384,9	317	0,67	0,86	1,28

In keinem Falle konnte also eine Hemmung der Gärtätigkeit beobachtet werden. Ganz im Gegenteil trat in allen Fällen eine starke Steigerung der Gärgeschwindigkeit ein. Sie betrug bei einer Konzentration von 0,2 n- K_2SO_4 durchschnittlich 25 %.

Die gärungsbeschleunigende Wirkung von Neutralsalzen hatte schon Euler¹⁾ beobachtet. Nach Euler handelt es sich hier wahrscheinlich um Adsorptionsercheinungen. Die aktivierende Wirkung von kleineren Mengen Sulfit dürfte ähnlichen Grund haben.

Zusammenfassung.

1. Die Giftwirkung der schwefligen Säure auf die Hefegärung ist im wesentlichen dem undissoziierten Teil zuzuschreiben. Bei einer Hefemenge von 1 g in 25 ccm Lösung tritt vollständige Hemmung der Gärtätigkeit ein bei einer Konzentration der schwefligen Säure entsprechend 0,007 äquivalentnormale Lösung, während bei 0,005 n die anfangs eintretende Hemmung rapide zu einer Steigerung der Gärtätigkeit der Hefe übergeht.

2. Natriumsulfit wirkt im Vergleich zu Kaliumsulfat hemmend auf die Gärung. Die durch Sulfitzusatz im Anfang eintretende Verzögerung der Gärung ist vorübergehend.

5. Kaliumsulfat beschleunigt die Gärung. In 0,2 normaler Lösung war die Steigerung etwa 25 %.

¹⁾ Euler und Cassel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 86, 122, 1918.

Die Permeabilität der roten Blutkörper für den Traubenzucker.

Von
M. Bönninger.

(Aus der inneren Abteilung des Krankenhauses Berlin-Pankow.)

(Eingegangen am 20. Januar 1920.)

Mit 1 Figur im Text.

Über die Impermeabilität der roten Blutkörper für Traubenzucker herrscht bei den Vertretern der physikalischen Chemie keine Meinungsverschiedenheit (Gryns, Hedin, Koeppel, Hamburger, Höber). Klinische und chemische Arbeiten über den Gegenstand haben nicht ein so einheitliches Resultat ergeben. Ich gehe an dieser Stelle nicht näher darauf ein und möchte hier nur kurz über Versuche berichten, die die Durchlässigkeit der menschlichen Blutkörper für den Traubenzucker mit den Methoden der physikalischen Chemie eindeutig dartun.

Als sinnfälligstes Zeichen der Permeabilität für eine Substanz gilt mit Recht die Auflösung der Blutkörper in blutisotonischer Lösung derselben. Nun kann man schon bei Zimmertemperatur bei einer ungefähr isotonischen Traubenzuckerlösung (5,2 ‰) nach 24 Stunden zuweilen eine deutliche Hämolyse beobachten. Bei 37° erfolgt diese meistens schon in etwa 1 Stunde und ist in etwa 3 Stunden total.

Davon kann man sich leicht überzeugen, wenn man in etwa 2 ccm Traubenzuckerlösung einen Tropfen Blut im Reagenzglas zusetzt und dasselbe in den Brutschrank bringt.

Will man genau den Beginn der Hämolyse feststellen, empfehle ich folgende Methode.

Eine Reihe von kleinen Reagenzgläsern werden mit je 2 ccm

einer isotonischen Lösung von Traubenzucker beschickt und in ein Wasserbad von bestimmter Temperatur gebracht. Nach etwa $\frac{1}{2}$ Stunde läßt man 0,02 ccm¹⁾ Blut einfließen und schüttelt um. Nun läßt man in bestimmten Zeiträumen ein kleines Quantum der Blutkörpersuspensionen in eine U-förmiggebogene Glaskapillare einfließen und zentrifugiert. Man erkennt leicht die erste Rotfärbung.

Dieses Verfahren hat den großen Vorteil, daß die Temperatur der Suspensionen konstant bleibt, man also beliebig oft eine Probe anstellen kann. Die Sedimentierung erfolgt auch in einer Wasserzentrifuge fast momentan. Zentrifugiert man in den Zentrifugengläsern, so kühlt sich die Flüssigkeit in kürzester Zeit stark ab und man muß länger zentrifugieren, ehe die Blutkörper sich abgesetzt haben.

Von zahlreichen Versuchen führe ich eine Reihe hier an. Das Blut wurde verschiedenen Kranken aus der Fingerbeere entnommen. Wasserbad 37 bis 38°.

	Nach 45 Min.	60 Min.	90 Min.	2 Std.	3 Std.
I. Spur schwach	+	+	++	noch starke Trübung	
II. 0	0	Spur	+	noch deutl. Trübung	
III. Spur	+	++	+++	total	
IV. 0	0	++	+++	"	
V. 0	0	++	+++	"	
VI. 0	0	++	+++	"	

Zur Kontrolle wurden ähnliche Versuche mit Rohrzucker, Milchzucker und Kochsalzlösungen in annähernd isotonischen Lösungen angestellt.

Keine von diesen erzeugte in 24 Stunden Hämolyse bei Bluttemperatur. Damit ist natürlich nicht bewiesen, daß diese Substanzen nicht in die Blutkörper eindringen. Ferner wurde zum Vergleich der Einfluß der Temperatur auf die Chlorammoniumhämolyse studiert. Auch diese kommt zunächst sicherlich dadurch zustande, daß das Chlorammonium in die Blutkörper eindringt. Sie ist ebenfalls in hohem Maße von der Temperatur abhängig:

¹⁾ Man kann dazu die Pipette des Sahli'schen Hämometers verwenden.

2%ige ClNaH_4 -Lösung.

	nach 5 Min.	10 Min.			
bei 40°	+	+++			
	nach 1 Std.	5 Min.	90 Min.	105 Min.	120 Min.
bei ca. 14°	0	Spur	++	+++	++++
bei 0°	nach 10 Std.	0,	nach 20 Std.	fast total.	

Ein Unterschied ist insofern zu bemerken, als bei dem Chlorammonium die Hämolyse offenbar eine starke Beschleunigung erfährt. Nachdem die Hämolyse einmal eingesetzt, verläuft sie außerordentlich schnell. Vielleicht kommt hier die Giftwirkung des Ammoniums zum Ausdruck.

Gegen die Deutung der Versuche läßt sich, soweit ich sehe, kein Einwand machen. Daß der Traubenzucker eine chemisch-hämolytische Wirkung auf die Blutkörper ausüben könnte, braucht wohl kaum widerlegt zu werden.

Immerhin habe ich auch einen Versuch mit hypertonischer Traubenzuckerlösung (8%ig) gemacht. In 24 Stunden trat bei Bruttemperatur nur eine Spur von Hämolyse auf, während dasselbe Blut in 5,2%iger Traubenzuckerlösung nach 3 Stunden völlig gelöst war.

Eine bakterielle Einwirkung ist bei der kurzen Zeit wohl ausgeschlossen. Ich habe mich jedoch auch davon überzeugt, daß in sterilen Lösungen die Hämolyse völlig gleich verläuft.

Wie die obigen Untersuchungsergebnisse zeigen, ist der Eintritt der Hämolyse bei verschiedenen Menschen verschieden. So sehen wir bei Nr. 2 eine deutliche Verzögerung, während bei Nr. 1 die Hämolyse zwar früh beginnt, dann aber auffällig langsam fortschreitet.

Darf man nun aus der Schnelligkeit des Beginns der Hämolyse einen Rückschluß auf die Permeabilität machen? Eine genaue Parallelität ist ja nicht zu erwarten, da der Austritt des Hämoglobins sicherlich auch von der Resistenz der Blutkörper abhängig ist. Es wäre von Interesse, die in der üblichen Weise bestimmte Resistenz gegenüber hypotonischen Lösungen mit der „Resistenz“ gegenüber isotonischen Traubenzuckerlösungen zu vergleichen. Immerhin kann man wohl sagen, daß die Schnelligkeit des Eindringens des Traubenzuckers von maßgebendem Einfluß auf den Eintritt der Hämolyse sein muß.

Es ist mir bisher nicht gelungen, einen Grund für die

Verschiedenheit der Permeabilität bei verschiedenen Menschen herauszufinden. Diese Untersuchungen werden fortgesetzt.

Verglichen wurde Blut von nüchternen Leuten mit dem von anderen, und es scheint, daß die Blutkörper der ersteren zumeist eine geringere Durchlässigkeit haben.

Arteriell und venöses Blut zeigte keinen Unterschied.

Wenn der Zucker in die Blutkörper eindringt, so müßte die bisherige Meinung, daß die Blutkörper in isotonischen Traubenzuckerlösungen dasselbe Volumen haben wie ursprünglich, irrig sein. Meine zahlreichen diesbezüglichen Versuche haben ergeben, daß sich in der Tat das Volumen der Blut-

körper in einem isotonischen Traubenzucker vergrößert. Entsprechend den oben wiedergegebenen Resultaten kann man eine konstante Größe überhaupt nicht angeben. Zentrifugiert man sofort nach der Mischung, so ist das Volumen wenig vergrößert; im Laufe von 24 Stunden findet dann eine sehr erhebliche Vergrößerung statt.

Diese Versuche wurden an- gestellt mit dem von mir an- gegebenen, hier abgebildeten Volummeter mit Ansatz¹⁾. Für derartige Untersuchungen sind diese Röhren besonders ge- eignet, da man dieselben Blut- körper immer wieder zentrifu- gieren und mit derselben oder auch einer anderen Lösung mi- schen kann.

Es wird zunächst das na- türliche Blutkörpervolumen de- fibrinierten Blutes bestimmt, dann der Ansatz mit Trauben- zuckerlösung beschickt und nun das Blut in die Lösung hinein-

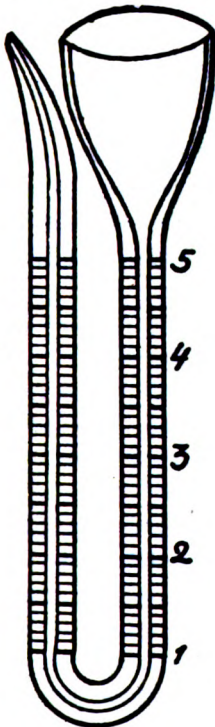


Fig. 1.

¹⁾ Kongreß f. inn. Med. 1910.

geblasen. Dann wird nach verschiedenen Zeiten das Volumen bestimmt. Selbstverständlich ist die Temperatur zu berücksichtigen.

Ich füge ein paar Versuche hier an (mit defibriniertem Blut):

1.			
Ursprüngliches Volumen	47%	,	
5,2%ige kalte Traubenzuckerlösung	52%	,	
" warme	"	"	56%.
2.			
Ursprüngliches Volumen	54%	,	
Traubenzuckerlösung sofort bei 9°	63,5%	,	
" nach 24 Std. "	"	"	83%! keine Hämolyse.

Weiterhin wären andere Blutarten mit der gleichen Methodik zu untersuchen. Es dürfte wohl keinem Zweifel unterliegen, daß sie sich sehr verschieden verhalten. So sind von verschiedenen Untersuchern die Blutkörper des Kaninchens zuckerfrei gefunden worden¹⁾. Danach wäre zu vermuten, daß diese unter den gleichen Bedingungen nicht von Traubenzuckerlösungen gelöst werden. Auch die Hundebutkörper scheinen weniger durchlässig für Traubenzucker zu sein, da hier die Unterschiede des Zuckergehalts von Plasma und Blutkörper sehr viel größer sind wie beim Menschen²⁾.

Wenige Untersuchungen an Kaninchen-, Meerschweinchen- und Hammelblut haben in der Tat ergeben, daß die Resistenz der Blutkörper gegenüber 5,2%iger Traubenzuckerlösung bei diesen Tieren eine ganz erheblich größere ist.

Kaninchen- und Hammelblutkörper³⁾ zeigten nach 24 Stunden (bei 37°) keine Spur von Hämolyse; bei den Meerschweinchenblutkörpern wurde eine geringe Hämolyse nach 24 Stunden festgestellt.

Dieses verschiedene Verhalten der Blutkörper verschiedener Säugetiere gegenüber dem Traubenzucker ist ein merkwürdiger Befund, der zu umfassenderen Untersuchungen auffordert.

Wie weit lassen sich nun die Versuchsergebnisse auf das strömende Blut übertragen? Sind die Erfahrungen der Klinik

¹⁾ Lyttkens u. Sandgren, diese Zeitschr. 26, u. A.

²⁾ Rona u. Takahashi, diese Zeitschr. 30.

³⁾ Diese waren vorher mit isotonischer NaCl-Lösung gewaschen.

und der physiologischen Chemie mit dieser physikalischen Durchlässigkeit zu erklären? Mein ziemlich großes Material über diesen Gegenstand werde ich an anderer Stelle publizieren. Hier nur so viel. Alle die widersprechenden Angaben der Literatur über die Verteilung des Zuckers auf Blutkörper und Plasma sind allerdings nicht zu vereinen. Die Ergebnisse Lyttkens und Sandgrens¹⁾ widersprechen zu sehr den fast aller übrigen Autoren. Sie scheinen mir auch in sich widerspruchsvoll. Wie erklären die Autoren, daß bei einer Aderlaß-hyperglykämie die reduzierende Substanz der nicht zuckerhaltigen Blutkörper von 0,039 auf 0,287 gestiegen ist? Dagegen lassen sich die Befunde der meisten anderen Autoren zum größten Teil wenigstens sehr wohl mit meinen obigen Untersuchungsergebnissen in Einklang bringen. Die Permeabilität der Blutkörper für Traubenzucker ist eine beschränkte und der Zucker dringt nur langsam in die Blutkörper ein. Da nun besonders bei den Belastungsversuchen der Zuckerspiegel im Plasma sich sehr schnell ändert, so können die Blutkörper natürlich zuweilen mehr, zuweilen weniger Zucker enthalten als jenes.

Sodann ist wohl in den Blutkörpern eine fortwährende, wenn auch geringe Glykolyse anzunehmen. Auf jeden Fall muß diese in den Blutkörpern eine ganz andere Rolle spielen wie im Plasma, da hier ein fortwährendes Zu- und Abströmen in die Gewebe und aus denselben vor sich geht. Bei geringem Zuckergehalt des Plasmas könnte die Glykolyse in den Blutkörpern größer sein als der Nachstrom aus dem Plasma und die Blutkörper würden so zuckerarm werden.

Wie wir weiter gesehen haben, daß die Blutkörper verschiedener Menschen sich in ihrer Permeabilität nicht gleich verhalten, so kann es nicht wundern daß die Untersuchungsergebnisse betreffs Verteilung des Blutzuckers auf Blutkörper und Plasma sehr verschieden ausfallen müssen.

¹⁾ a. a. O. u. diese Zeitschr. 31, 36.

Über die angebliche Inaktivierung des d-Mannita.

Von

Marta Ehrlich.

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

(Eingegangen am 29. November 1919.)

Vor einiger Zeit hat Adolf Grün¹⁾ außerordentlich interessante Beobachtungen über die Komplexverbindungen der mehrwertigen Alkohole mitgeteilt. Er hat insbesondere an den Alkoholen der Zuckerreihe gezeigt, daß die Verbindungen derselben mit Basen, die man früher wohl hauptsächlich als Alkoholate betrachtet hatte, Komplexgebilde im Sinne der Wernerschen Koordinationslehre darstellen. Zu diesem Schluß gelangte Grün unter anderem durch Verfolgung der eigentümlichen Drehungsverhältnisse, die die Metallverbindungen der Zuckeralkohole aufweisen. Beispielsweise zeigten die Barium- und Strontiumhydroxydverbindungen des Mannits eine Linksdrehung, die wesentlich höher war, als die reiner Mannitlösungen von relativ gleichen Konzentrationen.

Als der Autor an Stelle der Erdalkalihydroxyde Salze, und zwar Chlorbarium, Calciumnitrat oder Strontiumnitrat verwendete, war das Ergebnis wiederum ein anderes. Nach den Angaben von Grün zeigten die Lösungen von Mannit mit den genannten Salzen ein Verhalten, das „ohne Analogie“ da steht. Sämtliche Lösungen von Mannit mit den Erdalkalisalzen waren optisch inaktiv. „Es war nicht etwa eine scheinbare Inaktivierung erfolgt, d. h. eine durch Umkehrung des Drehungsinnes hervorgerufene Verminderung der Drehungen auf so kleine Werte, daß diese sich der Beobachtung entzogen. Eine Polarisierung der Strontiumnitrat-Mannitlösung im 400 mm-Rohr ergab das gleiche negative Resultat; daraus geht hervor, daß

¹⁾ Ad. Grün, Monatsh. f. Chem. 87, 205, 1916.

durch den Salzzusatz nicht etwa bloß eine Verringerung der Drehung der Mannitlösung, sondern vollkommene Inaktivierung erfolgte. Nunmehr mußte ermittelt werden, ob der Mannit nach der Entfernung der Salze wieder optische Aktivität zeigt. Zu diesem Zwecke wurde die Strontiumnitrat-Mannitlösung mit wenig Aceton geschüttelt, der ausgefallene Mannit abgesaugt, mit Alkohol gewaschen und in ungefähr 5%iger wäßriger Lösung polarisiert. Die Lösung war inaktiv. Eine nur 4%ige Lösung des gleichen Mannita, der zur Darstellung der Lösungen verwendet worden war, zeigte hingegen die normale Linksdrehung.

Demnach war in der Strontiumnitrat-Mannitlösung Inaktivierung des Mannits eingetreten.“

Diese Mitteilung von Grün beansprucht ein bedeutendes Interesse; wäre danach eins der wichtigsten Probleme der Chemie und Physiologie der Kohlenhydrate gelöst, das der Racemisierung einer optisch aktiven Verbindung aus der Kohlenhydratreihe beim Zusammentreffen mit anorganischen Salzen. Für die so schwer zugängliche inaktive Mannose und die ganze Schar der von ihr sich ableitenden Verbindungen sowie für die aus ihr so leicht erhältlichen Derivate der l-Mannose-Reihe wäre die Grünsche Darstellung von inaktivem Mannit eine Fundgrube.

Aus diesem Grunde habe ich versucht, die so bequem erscheinende Gewinnung von inaktivem Mannit auszuführen. Dabei hielt ich mich genau in allen Einzelheiten an die vom Autor für die Bereitung von inaktivem Mannit gegebenen Beispiele.

Leider konnte ich dabei nur den 1. Teil der Grünschen Beobachtungen bestätigen, nämlich daß die Auflösung des Erdalkalisalzes in Mannitlösung eine Flüssigkeit ohne erkennbares Drehungsvermögen lieferte. Dagegen war der aus der Strontiumnitrat-Mannitlösung nach Vorschrift mit Aceton wieder ausgefällte Mannit vollständig der angewandte gewöhnliche d-Mannit.

Bekanntlich ist die Drehung des Mannits sehr gering: $[\alpha]_D = -0,25^\circ$. Deshalb verwendet man zur Feststellung des polarimetrischen Effektes die Erhöhung des Drehungsvermögens, die bei Zusatz von Borsäure oder borsäuren Salzen eintritt. Nach der Vorschrift von Vignon¹⁾ stellt man zweckmäßig

¹⁾ Vignon. A. Ch. [5] 2, 440.

eine Lösung her, die in 100 ccm 12,8 g wasserfreien Borax (= 24,2 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) und 10,0 g Mannit enthält. Diese Lösung zeigt dann die spezifische Drehung von $[\alpha]_D = +22,5^\circ$.

Verfährt man ebenso mit dem aus Strontiumnitrat-Mannitlösung wiedergewonnenen, von den letzten Spuren Strontiumnitrat durch nochmaliges Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol befreiten Mannit, so erhält man eine stark optisch aktive Flüssigkeit.

Zu den Versuchen wurde eine Lösung angewandt, die in 10 ccm 0,500 g wiedergewonnenen Mannit und 1,210 g Borax enthielt. Eine Lösung von genau gleicher Konzentration wurde aus vorher umkrystallisiertem gewöhnlichen Mannit hergestellt. Beide Substanzen waren gleichmäßig bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Sie zeigten auch den gleichen Schmelzpunkt = 166° , der in der Mischprobe keine Depression erfuhr.

Die Drehungen wurden vollkommen übereinstimmend gefunden. Im ersten Falle beobachtete ich eine Rechtsdrehung im 2 dm-Rohr von $+2,34^\circ$, im zweiten Fall von $+2,36^\circ$. Der Versuch ist mehrfach mit dem gleichen Erfolge ausgeführt. Auch eine Zeitreaktion ist nicht im Spiele; man kann nämlich die Mannit-Sr(NO_3)₂-Lösungen wochenlang aufbewahren, ohne daß die Mannitkomponente ihre Aktivität einbüßt. Daraus ergibt sich, daß die minimale natürliche Drehung des Mannits an sich den Irrtum bei A. Grün verschuldet hat.

Eine Inaktivierung des Mannits ist ja in hohem Grade auch deshalb unwahrscheinlich, weil im allgemeinen eine Inaktivierung bei Verbindungen mit mehreren asymmetrischen Kohlenstoffatomen überhaupt nicht gelingt. Von den Umlagerungen, die hierzu notwendig wären, spielen sich in der Zuckergruppe nur solche am 2. Kohlenstoffatom ab, sowohl bei den Zuckern selbst wie bei den entsprechenden Säuren. Wenn überhaupt bei den Hexiten eine derartige Reaktion möglich wäre, so könnte sie nur vom Mannit zum Sorbit bzw. bei Veränderung am gleichwertigen 5. Kohlenstoffatom auch zum Idit führen. Tatsächlich aber findet keinerlei Veränderung statt. Der bekannte Platzwechsel scheint an einen elektro-negativen Charakter der endständigen Gruppe geknüpft zu sein.

Phytochemische Reduktion von o-Nitrobenzaldehyd.

Von
F. F. Nord.

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

(Eingegangen am 19. Dezember 1919.)

Die Möglichkeit einer phytochemischen Umwandlung der Nitro-, Nitroso- und Hydroxylaminogruppen in die Amino- gruppe sowie des Aldehydrestes in den Alkoholrest haben zum erstenmal in den Jahren 1911 bis 1914 Neuberg und Mitarbeiter¹⁾ an mehreren durchsichtigen Beispielen dargetan; sie haben zugleich auf die sich ergebenden Beziehungen dieser Vorgänge zu der Nitrataassimilation der Pflanzen hingewiesen. Sie haben auf Grund ihrer Versuche der Annahme Ausdruck gegeben, daß eine direkte Reduktion der Nitro- zur Amino- gruppe sehr unwahrscheinlich ist und die Berechtigung dieser Anschauung auch dadurch erhärtet, daß sie im Laufe ihrer grundlegenden Untersuchungen über die phytochemischen Reduktionsleistungen der Hefe zeigten, wie die denkbaren Zwischenstufen bei der Reduktion von Nitrobenzol unter der Einwirkung arbeitender Hefe oder der von ihr abgetrennten Enzyme zu Anilin werden. Dabei handelt es sich bemerkenswerterweise um dieselben Durchgangsglieder, über die, nach den klassischen Untersuchungen Habers²⁾ die elektrolytische Reduktion und nach des Verfassers³⁾ Befunden auch die katalytische Hydrierung führt.

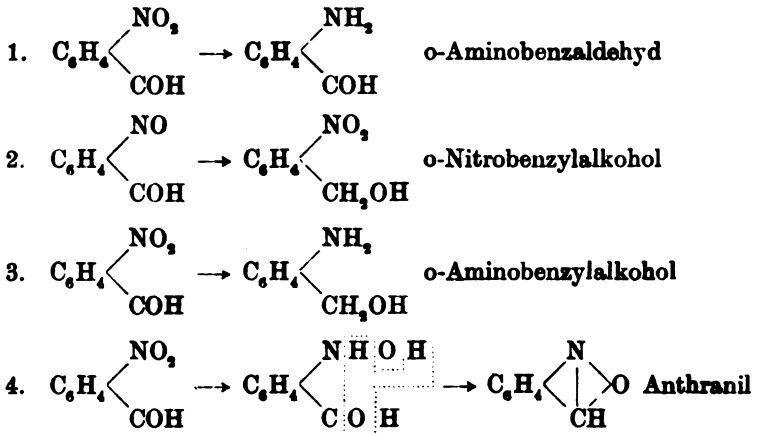
¹⁾ C. Neuberg und Mitarbeiter, diese Zeitschr. 1911 bis 1914.

²⁾ F. Haber, Zeitschr. El. Chem. 4, 506, 1898; 5, 77, 1898. — Zeitschr. Ang. 1900, 433. — Ph. Ch. 32, 198, 271, 1901; 47, 257, 1904.

³⁾ F. F. Nord, Ber. 52, 1705, 1919.

Es war nun von Interesse, festzustellen, welche der möglichen Reduktionsstufen erhalten werden könnte, wenn eine Substanz von der vielseitigen Angreifbarkeit des *o*-Nitrobenzaldehyds der phytochemischen Reduktion unterworfen wird. Im tierischen Organismus (im Körper des Kaninchens) wird diese Verbindung zu einem kleinen Teil zu *o*-Nitrobenzoesäure oxydiert, während die Hauptmenge (ca. 90%) vollkommener Zerstörung anheimfällt¹⁾.

Wegen der Anwesenheit zweier reaktionsfähiger Substituenten des CHO- und NO₂-Restes, von denen jeder einzelne sich der phytochemischen Reduktion grundsätzlich als zugänglich erwiesen hat, war sozusagen ein Wettstreit dieser Gruppen um die Erlangung des bei der biologischen Hydrierung wirkenden Wasserstoffs zu erwarten, als dessen Folge die Entstehung verschiedenartiger Reaktionsprodukte zu vermuten war:



Von den nach obigem Schema möglichen Verbindungen habe ich bei wiederholten Versuchen immer eindeutig nur den *o*-Nitrobenzylalkohol, aber in verhältnismäßig geringer Ausbeute, isolieren können.

Die Reduktionsversuche sind im wesentlichen nach den bisherigen, bei der Einwirkung gärender Hefe auf die verschiedenartigsten Körperklassen gemachten Erfahrungen durchgeführt worden. Bei Anwendung einer alkoholischen Lösung des *o*-Nitrobenzaldehyds konnte die schwierigere Angreifbarkeit

¹⁾ R. Cohn, Ber. 25, 2463, 1892; H. 17, 293, 1898.

des festen Körpers überwunden werden, wobei allerdings zugleich die nicht unerhebliche schädigende Wirkung auf die Hefezellen stärker zur Geltung kam. Die Ausbeuten an o-Nitrobenzylalkohol betrugen 2 bzw. 1 g bei Verwendung von 19 bzw. 10 g o-Nitrobenzaldehyd.

Bei der Aufarbeitung des Gärgutes wurde auf die mögliche Entstehung von Anthranil jedesmal Rücksicht genommen; doch konnte diese Substanz — wie bereits erwähnt — unter den angewandten Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Es wurden zwar stark pflanzenbasenartig riechende, stickstoffhaltige Produkte bei der Zerlegung des Reaktionsgemisches erhalten, die jedoch die für Anthranil charakteristische Fällbarkeit durch Sublimat vermissen ließen.

Versuche.

Zu je einem in flotter Gärung befindlichen, auf 40° erwärmten Gemische von 3000 ccm Leitungswasser, 300 g Zucker und 300 g Hefe (Rasse M des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin) bzw. 2000 ccm Leitungswasser, 200 g Zucker und 200 g Hefe wurde eine warme Lösung von 19 bzw. 10 g o-Nitrobenzaldehyd (Schmelzpunkt 46°) in 120 bzw. 50 ccm Alkohol tropfenweise und unter fortwährendem Umschütteln des Gärgefäßes hinzugefügt. In beiden Fällen schien — infolge Giftigkeit der Substanz für die vorhandene Hefenmenge — die zulässige Konzentration des Aldehyds überschritten worden zu sein, da die Gärung nach kurzer Zeit vollkommen erlosch. Zur Herabminderung der Giftwirkung wurden die Ansätze nach gutem Umschütteln halbiert; jede Hälfte wurde mit der gleichen Menge lauwarmen Leitungswassers verdünnt und mit 200 bzw. 100 g frischer Hefe versetzt. Nachdem sich die Gäransätze während 24stündigen Stehens im Brutschrank bei 37° vollkommen erholt hatten, wurden nach weiteren 3 Tagen abermals je 100 g Zucker und ebensoviel Hefe hinzugegeben. Nach dieser Zeit wurde auch eine deutliche Vergilbung der Ansätze wahrgenommen. Bei weiterer Digestion von 2 Tagen ging der Gärakt zu Ende; Fehlingsche bzw. Ostsche Lösung wurden nicht mehr reduziert.

Um die möglichen Reaktionsprodukte isolieren zu können, wurden die ausgegorenen Maischen in einer Kupferblase zu-

nächst ohne jeglichen Zusatz einer Wasserdampfdestillation unterworfen; so konnte außer Alkohol das Anthranil von allen übrigen nicht oder schwer flüchtigen Substanzen gegebenenfalls abgetrennt werden. Im Wasserdampfdestillat konnte auch mit Hilfe der Nitroprussidnatriumreaktion die vermehrte Bildung von Acetaldehyd nachgewiesen werden, dessen Auftreten mit der Erklärung der Vorgänge gemäß früheren¹⁾ diesbezüglichen Erörterungen im Einklange steht.

Erhalten wurde bei der Wasserdampfdestillation ein Rückstand *R* und ein Destillat *D*.

Das Destillat *D* wurde mit Äther extrahiert, der Auszug über frisch geglühtem Natriumsulfat gründlich getrocknet und der Äther schließlich am achtkugeligen Birektifikator abgetrieben. Es resultierten einige Kubikzentimeter eines braun gefärbten Öles, das auch nach mehrtägigem Stehen nicht erstarrte; bei Vakuumdestillation dieser Flüssigkeit ging ein bei 24 mm Druck zwischen 156 bis 160° siedendes, schwach gelb gefärbtes Öl über, das sauer reagierte und stark stickstoffhaltig war, aber in wäßriger Suspension mit Sublimatlösung keinen Niederschlag gab.

Rückstand *R* wurde nunmehr mit Natriumbicarbonat alkalisch gemacht und abermals der Wasserdampfdestillation unterworfen: Rückstand *R 1* und Destillat *D 1*.

Nachdem auch das Destillat *D 1* in der oben beschriebenen Weise behandelt war, hinterblieben Spuren eines braun gefärbten Öles, das beim Stehen erstarrte.

Alsdann wurde der Rückstand *R 1* mit Äther ausgezogen. Die Verarbeitung des Ätherextraktes erfolgte in bekannter Weise und lieferte eine größere Menge eines gleichfalls bald erstarrenden Öles. In ihm war dieselbe Substanz enthalten wie im Rückstande des Destillationsauszuges *D 1*, indem bei der sehr lange fortgesetzten Behandlung mit Wasserdampf sich Spuren verflüchtigen. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Wasser wurden feine weiße Nadeln erhalten, die nach dem Waschen mit Petroläther als *o*-Nitrobenzylalkohol identifiziert werden konnten und die scharf bei 74° schmolzen.

¹⁾ C. Neuberg und F. F. Nord, Ber. 52, 2241, 1919.

0,0817 g Substanz gaben 0,1646 g CO_2 und 0,0382 g H_2O .
 $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2(153)$ ber. 54,90% C, 4,58% H;
 gef. 54,94% C, 5,19% H.

Bei der Einwirkung von pflanzlichen Zellen, von Hefe, auf den o-Nitrobenzaldehyd sind, ganz ähnlich wie beim Schicksal dieser Substanz im Tierkörper, nur 10% in Form einer definierten Verbindung, des o-Nitrobenzylalkohols, wiedergewonnen worden. Weitere Umwandlungsprodukte stecken offenbar in den zuvor erwähnten öligen Erzeugnissen. Daß die Reduktion sich — jedenfalls bei einem Teile der Verbindung — nur auf die Aldehydgruppe erstreckt, steht mit der Erfahrung im Einklange, daß die phytochemische Hydrierung des COH-Restes leichter erfolgt als die der NO_2 -Gruppe.

Weitere Erfahrungen über die Bildung und Bedeutung der Fructosediphosphorsäure im Stoffwechsel der Hefe.

Von
Carl Neuberg.

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

Vor einiger Zeit haben Neuberg, Färber, Levite und Schwenk¹⁾ in einer ausführlichen Untersuchung eine Reihe von Tatsachen mitgeteilt, die eine erneute Prüfung mancher Anschauungen über die biologische Bedeutung der sogen. Hexosediphosphorsäure nahelegen. Wir hatten zunächst die Widersprüche behoben, die hinsichtlich der Grundlage, der Zusammensetzung der fraglichen Verbindung, bestanden.

Während Harden und Young die Substanz als Fructose-diphosphat betrachtet hatten, hielt sie A. v. Lebedew anfangs für eine Hexosemonophosphorsäure, erkannte aber später das Vorliegen eines Hexosediphosphorsäureesters an. Demgegenüber hatte sie L. Iwanoff für eine Triosemonophosphorsäure erklärt; v. Euler und seine Mitarbeiter haben die Ansicht ausgesprochen, daß der Kohlenhydratphosphorsäureester wohl z. T. aus Triosemonophosphorsäure, vermutlich Dioxyacetonphosphorsäure, bestünde. Unsere Untersuchungen führten zu einer Bestätigung und Erweiterung der Ansicht von Harden und Young. Die als Salz abgeschiedene Verbindung erwies sich als Diphosphorsäureester des Fruchtzuckers. Insbesondere konnten wir mit Hilfe einer neuen Methode, die eine Erkennung und Bestimmung selbst sehr kleiner Mengen von Triosen

¹⁾ C. Neuberg, E. Färber, A. Levite und E. Schwenk, diese Zeitschr. 83, 244, 1917; dort auch alle hier in Betracht kommenden Literaturangaben.

gestattet, einen Abkömmling der 3-Kohlenstoffzucker in unseren Präparaten nicht auffinden.

Die Klärung gerade dieses Punktes könnte, wie wir schon früher bemerkt haben, in gewisser Hinsicht von Bedeutung für das Gärungsproblem werden. Denn wenn der Ester ganz oder teilweise aus dem Triosederivat bestehen würde, so könnte darin eine Stütze für die öfter geäußerte, aber experimentell unbegründete Anschauung liegen, daß der Abbau der Hexosen über die Stufe der 3-Kohlenstoffzucker führe. Da im Fructosediphosphat bisher kein Trioseabkömmling einwandfrei nachgewiesen ist, da ferner die Triosen selbst überhaupt nicht der Veresterung mit Phosphaten fähig sein dürften (Harden und Young, v. Euler und Kullberg, Gambarjan, Neuberg und Mitarbeiter) und nach den übereinstimmenden Ergebnissen von Harden, Young, Slator sowie Neuberg nebst Mitarbeitern auch nicht der typischen alkoholischen Zuckerspaltung unterliegen, so ist die Triosentheorie der Gärung bis auf weiteres zurückzustellen.

Später hat Neuberg¹⁾ noch auf unmittelbare Weise gezeigt, daß der Ester Fructosediphosphat ist; er läßt sich nämlich durch partielle Hydrolyse zur Fruchtzuckermonophosphorsäure abbauen. In dieser ist das Verhältnis von Kohlenstoff zu Phosphor = $C_6:P_1$ und zahlenmäßig eindeutig bestimmbar, während eine analytische Entscheidung zwischen den Daten für Hexosediphosphat ($C_6:P_2$) und Triosemonophosphat ($C_3:P_1$) nicht angängig war.

Zu derselben Frage hat sich seitdem v. Euler²⁾ folgendermaßen geäußert: „Durch die schönen Versuche von Neuberg, Färber, Levite und Schwenk über die Spaltung des Zymophosphates kann das Ergebnis Hardens und Youngs, daß Fructosediphosphat vorliegt, nunmehr wohl als bewiesen angesehen werden.“ Er fügt hinzu: „Der von uns als Triosemonophosphat angesprochene Körper stellt ja nie etwas anderes dar als eine geringe Beimengung zum Hauptprodukt.... Die relative Menge der von mir beobachteten geringen Beimengung, die ich allerdings nie isolieren konnte, ist aber von der Natur der angewandten Hefe recht abhängig.“

Auf alle Fälle gibt es Hefen — und uns sind nur solche

¹⁾ C. Neuberg, diese Zeitschr. 88, 432, 1918.

²⁾ H. v. Euler, diese Zeitschr. 86, 341, 1918.

bekannt geworden —, mit denen man in der Trockenform Fructozuckerdiphosphorsäure ohne Beimengung von Triosemonophosphat erhält; und da es sich dabei um Hefen handelt, die in frischem Zustande typisch, ohne jede Abweichung, die normale Gärung bewirken, so liegt bislang kein Anhaltspunkt dafür vor, daß die biochemische Phosphorylierung mit dem Auftreten eines Zwischenproduktes aus der 3-Kohlenstoffreihe einhergehen muß, und es ist un-
aufgeklärt inwieweit jene Synthese etwas mit dem Zuckerabbau zu tun hat.

Für diese auch schon früher von uns besprochene und noch weiter (s. u.) zu erörternde Frage, welche Rolle die Fructosediphosphorsäure bei der normalen alkoholischen Zuckerspaltung spielt, ist der Bildungsmechanismus dieser Substanz von ausschlaggebender Bedeutung. Neuberg, Färber, Levite und Schwenk (l. c.) hatten dargetan, daß mit den uns zur Verfügung stehenden deutschen Hefen in frischem Zustande allgemein keine quantitative, sondern — wenn überhaupt — eine höchst mäßige Veresterung (zu 5 bis 8%) zu erzielen war, während die gleichen Hefen nach vorausgegangener Umwandlung in Dauerpräparate bis zu 97% phosphorylierten. Hinsichtlich des Mißerfolges mit den frischen Hefen hatten wir¹⁾ folgendes bemerkt: „Bei Ansätzen nach Euler²⁾, bei

¹⁾ C. Neuberg, Diese Zeitschr. 83, 253, 1917.

²⁾ Der Autor scheint, wie wir seiner Mitteilung mit Heintze (Zeitschr. f. physiol. Chem. 102, 258, 1918) entnehmen müssen, leider mißverstanden zu haben, worauf es uns ankommt. Zu unserem diese Zeitschr. 83, 252, 1917 angeführten Satz: „Doch haben . . . hervorgehoben, daß auch frische Hefe dazu (d. h. zur Gewinnung der Hexosediphosphorsäure) geeignet ist, und die gleiche Angabe hat in neuerer Zeit Euler gemacht“ äußert er nämlich folgendes: „Tatsächlich haben Euler und Johansson gerade im Gegenteil gezeigt, daß frische Hefe in einigermäßen nennenswertem Grad nur dann verestert, wenn Protoplasmagifte wie Toluol zugesetzt werden.“ In der Mitteilung Neubergs und seiner Mitarbeiter steht aber ausdrücklich wenige Zeilen weiter (diese Zeitschr. 83, 253): „Bei Ansätzen nach Euler, bei denen . . . Rohrzucker. . . mit abgepreßter Hefe und . . . Dinatriumphosphat in Gegenwart von 1 ccm Toluol zusammengebracht wurden, war das Ergebnis ungefähr das gleiche (nämlich negative). Das Protoplasmagift Toluol begünstigt etwas die Veresterung.“ Den Toluolzusatz haben wir also gemacht, aber trotzdem keine Phosphory-

denen 100 g Rohrzucker in 280 ccm H_2O mit 150 g abgepreßter Hefe und mit 80 g Dinatriumphosphat in 300 ccm Wasser in Gegenwart von 1 ccm Toluol zusammengebracht wurden, war das Ergebnis ungefähr das gleiche, d. h. Veresterung trat (nur) zu 5 bis 8% ein.“

Der Umstand, daß die ausgetrockneten, demnach in einen abnormen Zustand versetzten Hefen und ebenso Hefensäfte und Zymin, also allgemein stark geschädigte oder tote Hefezellen bzw. zellfreies Material, praktisch quantitativ phosphorylieren, während die gleichen Hefen in frischer Form versagen, führte uns zu der vermutungsweise geäußerten Ansicht, daß in der Massenproduktion von Hexosediphosphat eher ein pathologisches als physiologisches Geschehnis vorliege, bei dem der normalerweise in mäßigem Umfange eintretende und mit dem Aktivatorensystem¹⁾ in Beziehung stehende Vorgang der Phosphatbindung unter dem Einflusse der entfesselten Enzymkräfte zur Hauptreaktion werde. Von diesem Gesichtspunkte aus die Frage nach der Bedeutung der Fructosediphosphorsäure für den normalen Zuckerumsatz zu betrachten, gibt auch eine Beobachtung von O. Meyerhof²⁾ Anlaß; gemäß dieser scheint die Hauptaufgabe des Zymophosphates in einer Regulierung der Gärgeschwindigkeit zu liegen, wozu Spuren ausreichen.

Erfreulicherweise dürften keine wesentlichen Unterschiede zwischen Eulers und unseren tatsächlichen Befunden mehr bestehen, nachdem auch ihm³⁾ typische Hefesorten bekannt geworden sind, denen die Fähigkeit zur Phosphorylierung abgeht. Und für dazu geeignete teilt er mit: „daß die Hefen 2 Tage vorher eine Vergärung durchmachten in 6%iger Rohrzuckerlösung, die 2% Dinatriumphosphat enthielt“.

Also für die Erzielung der Phosphatbindung in erheblichem Umfange scheint eine Vorbehandlung, eine Art Gewöhnung der lebenden Hefen an phosphorsaure Salze,

lierung wie Euler erzielt. — Übrigens gibt er neuerdings (diese Zeitschr. 86, 340, 1918) eine Vorschrift zur Darstellung von Hexosediphosphat mit frischer Hefe an, in der das Toluol in der Tat fehlt.

¹⁾ C. Neuberg, diese Zeitschr. 88, 202, 1918.

²⁾ O. Meyerhof, H. 102, 191, 1918.

³⁾ H. v. Euler, diese Zeitschr. 86, 327, 1918.

empfehlenswert zu sein, und bestimmte Hefen bleiben auch dann veresterungsunfähig.

Mit diesen verschiedenen Feststellungen scheint uns aber einstweilen die Lehre von der grundsätzlichen Bedeutung der Fructosediphosphorsäure für den Eintritt der eigentlichen Zuckerspaltung in ihrer bisherigen Form nicht vollständig und nicht ohne einen gewissen Zwang vereinbar zu sein.

Außer unseren früher mitgeteilten Erfahrungen verfügen wir über weitere, die wohl geeignet sind, uns in dieser Auffassung zu bestärken.

Auf die protokollarische Wiedergabe unserer neuen Versuche mit Oberhefen, die wiederum keine Phosphorylierung bewirkten, glauben wir verzichten zu können. Denn betreffs dieser herrscht jetzt zwischen uns und Euler (diese Zeitschr. 86, 339, 1918) Übereinstimmung darin, daß sie in toluolisiertem frischem Zustande zur Veresterung von Phosphat mit Zucker im allgemeinen nicht befähigt sind; und für eine Torulahefe, die in ihrem Verhalten ganz den gewöhnlichen Kulturhefen glich, insbesondere wie diese Alkohol und Kohlensäure lieferte, hat bemerkenswerterweise neuerdings O. Svanberg¹⁾ gleichfalls kein Phosphatbindungsvermögen konstatieren können.

Es steht also fest, daß es eine ganze Klasse typischer Hefen, nämlich die obergärigen, gibt, die regelrecht vergären, aber nicht nachweisbar Fructosediphosphorsäure bilden.

Ein gleiches gilt aber auch zum mindesten für eine Anzahl Unterhefen.

Im Herbst 1913 hatten wir Gelegenheit, die zu vielen wissenschaftlichen Untersuchungen benutzte untergärige Bierhefe von Schroder in München in frischem Zustande zu verwenden. Wir beabsichtigten mit ihr eine Wiederholung der interessanten Versuche Euler und Johanssons²⁾ über die Phosphatase. Von den dabei erzielten Ergebnissen kommen hier die Resultate folgender Ansätze in Betracht, die genau nach

¹⁾ O. Svanberg, Ch. C. 19, I/II, 97. Wism. Teil.

²⁾ H. v. Euler u. D. Johansson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 80 175, 1912; 85, 192, 1913

II.

6 Kölblchen wurden jedes mit 20,0 ccm 20%iger Traubenzuckerlösung, mit 20 ccm 10%iger Dinatriumphosphatlösung, mit 3 g der in die Dauerform übergeführten gleichen Hefe sowie mit 0,6 ccm Toluol versetzt.

Wiederum wurde nach je einer Stunde der Inhalt eines Kölblchens filtriert und in je 5 ccm klarem Filtrat die freie Phosphorsäure unter den üblichen Vorsichtsmaßregeln ermittelt. Wir fanden:

		Mg ₃ P ₂ O ₈
in 5 ccm ursprünglicher Lösung		0,0790 g
" " " der	" nach 1 Std.	0,0798 "
" " " "	" " 2 "	0,0839 " ¹⁾
" " " "	" " 3 "	0,0580 "
" " " "	" " 4 "	0,0296 "
" " " "	" " 5 "	0,0108 "

Nach Überführung in den trockenen Zustand trat also kräftige Veresterung ein, zu der die frische Hefe auch nicht andeutungsweise imstande gewesen war.

Obgleich das Verhalten der getrockneten Münchener Hefe die synthetisierende Fähigkeit deutlich erkennen ließ, haben wir doch der Möglichkeit Rechnung tragen wollen, daß ihr Gehalt an Veresterungsferment relativ gering sein konnte, und haben den gleichen Ansatz (III) mit der dreifachen Menge frischer Hefe und zwecks Hemmung der Gärungen mit der dreifachen Toluolquantität vorgenommen.

III.

In 11 Erlenmeyerkolben wurden je 20,0 ccm 20%ige Glukoselösung + 20 ccm 10%ige Dinatriumphosphatlösung mit 18 g frischer Münchener Hefe und mit 0,6 ccm Toluol versetzt. Das Gemisch war mit Kohlendioxyd gesättigt.

¹⁾ Die anfängliche Zunahme des freien Phosphates findet in dem Austritt von phosphorsauren Salzen aus der getrockneten Hefe ihre Erklärung. Es erfolgt gewissermaßen eine Bildung von Hefemacerationsaft; in diesem haben Neuberg und Färber (diese Zeitschr. 78, 250, 1916) 1,06% P₂O₅ gefunden, einen Wert, der mit dem für Hefepressäfte ermittelten Phosphorgehalt im Einklange steht.

						Mg ₂ P ₂ O ₇
Aus 5 ccm ursprüngl. Lösung wurden erhalten						0,0771 g
" " " der " " " nach 1 Std.						0,0780 "
" " " " " " " 2 "						0,0798 "
" " " " " " " 3 "						0,0804 "
" " " " " " " 4 "						0,0797 "
" " " " " " " 5 "						0,0790 "
" " " " " " " 6 "						0,0790 "
" " " " " " " 7 "						0,0795 "
" " " " " " " 10 "						0,0807 "
" " " " " " " 11 "						0,0811 "
" " " " " " " 26 "						0,0787 "

Der Erfolg blieb also abermals völlig versagt.

Auch Herabsetzung des Wärmegrades auf Zimmertemperatur sowie Erhöhung auf 35° änderten an dem prinzipiellen Verhalten hier und im folgenden nichts, ebensowenig wie Variationen der Hefenmengen; von der Wiedergabe dieser, wie gesagt, ebenfalls negativen Versuche nehmen wir Abstand.

Ganz gleichsinnig fielen die Versuche aus, die wir mit der oft verwendeten Berliner Unterhefe M des Instituts für Gärungsgewerbe im Frühjahr 1914 ausführten. Auch hier waren die Ansätze mit der einfachen (IV) und dreifachen (V) Menge der frischen Hefe ergebnislos, während ihnen andererseits das gut gelungene Experiment (VI) mit dem zuvor getrockneten Hefematerial gegenübersteht.

IV bis VI.

	IV. 11 Kölbchen m. je 20 ccm 20% iger Traubenz.-Lsg., 20 ccm 10% iger Dinatrium- phosphatlös., 6g frische Hefem., 0,2 ccm Toluol	V. 11 Kölbchen m. je 20 ccm 20% iger Traubenz.-Lsg., 20 ccm 10% iger Dinatrium- phosphatlös., 18g frisch. Hefem., 0,2 ccm Toluol	VI. 12 Kölbchen m. je 20 ccm 20% iger Traubenz.-Lsg., 20 ccm 10% iger Dinatrium- phosphatlös., 2g getrock. Hefe M. 0,6 ccm Toluol
	Mg ₂ P ₂ O ₇	Mg ₂ P ₂ O ₇	Mg ₂ P ₂ O ₇
Aus 5 ccm ursprüngl. Lös. wurden erhalten	0,0756 g	0,0778 g	0,0802 g
" " " der " " " nach 1 Std.	0,0766 "	0,0786 "	0,0850 "
" " " " " " " 2 "	0,0781 "	0,0798 "	0,0847 "
" " " " " " " 3 "	0,0786 "	0,0792 "	0,0816 "
" " " " " " " 4 "	0,0767 "	0,0790 "	0,0708 "
" " " " " " " 5 "	0,0772 "	0,0798 "	0,0586 "
" " " " " " " 6 "	0,0778 "	0,0808 "	0,0502 "
" " " " " " " 7 "	0,0784 "	0,0805 "	0,0418 "
" " " " " " " 10 "	0,0771 "	0,0797 "	0,0230 "
" " " " " " " 11 "	0,0770 "	0,0810 "	} in Verlust geraten.
" " " " " " " 26 "	0,0795 "	0,0816 "	

Daraus ergibt sich wiederum, daß — wie fast regelmäßig die Oberhefen — auch deutsche Unterhefen¹⁾ der Fähigkeit ermangeln können, im frischen Zustande und in Gegenwart von Toluol eine nachweisbare Menge Zuckerphosphorsäureester zu bilden. Dieselben Hefen bewirken jedoch regelrecht die alkoholische Gärung und erlangen nach Überführung in die Trockenform auch das Phosphorylierungsvermögen. Die betreffenden Versuche sind mit Hefen aus dem Jahre 1913 und vom Frühjahr 1914 ausgeführt. Eine „Kriegsernährung“ der Hefen kann also nicht herangezogen werden.

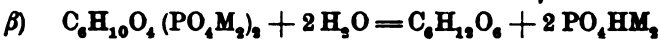
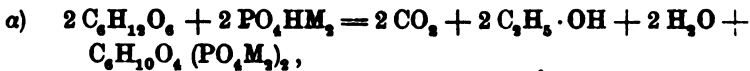
Gegen unsere erwähnte Ansicht (s. S. 323), daß jene Fructosediphosphatbildung, die in Gegenwart einer unnatürlichen Menge anorganischen Phosphats²⁾ und mittels des in einen abnormen Zustand versetzten Hefenmaterials eintritt, wohl auch vom Standpunkte einer pathologischen Erscheinung gewürdigt zu werden verdient, führten Euler und Heintze (l. c.) einige Literaturangaben über die allgemeine Bedeutung der Phosphate für den Kohlenhydratumsatz hauptsächlich beim Tier an und verwiesen auf die Beobachtung einer quantitativen Beziehung zwischen Gärkraft und Phosphatzusatz. Ob ein über eine Analogie herausgehender Zusammenhang der Tierexperimente, zu denen Embdens und seiner Mitarbeiter interessante Ergebnisse am Muskel gehören, mit der hier behandelten Frage besteht, läßt sich gegenwärtig schwer übersehen. Den zweiten Punkt kann man nicht für entscheidend halten, solange der Beweis für die allgemeine Gültigkeit des vorausgesetzten Zusammenhanges aussteht. Unsere Versuche (s. S. 325 u. f.) geben keine Stütze ab für die Annahme einer sichtbaren Verknüpfung

¹⁾ Schwedische Unterhefen scheinen selbst in der Trockenform nicht immer glatt zu phosphorylieren, z. B. nicht die Hefe H, die untergärig ist. Von ihr wird angegeben, daß sie nach dem Trocknen und Extrahieren mit Wasser einen Saft lieferte, der — im Gegensatz zu den meistens veresterungsfähig befundenen Auszügen untergäriger Trockenhefen — Glucose nicht in üblicher Weise veresterte, sondern erst nach gewissen Vorbehandlungen des Zuckers (H. v. Euler und H. Ohlén, diese Zeitschr. 37, 813, 1911).

²⁾ Dasselbe hat überdies eine Abänderung des gewöhnlichen Gärungsverlaufs zur Folge. S. S. 333.

von Gärung und Phosphatbindung. Das gilt, wie wir ausdrücklich betonen möchten, für den normalen Vorgang, für den Gärakt mit frischen Hefen, auf den allein sich unsere Betrachtungen bisher beziehen.

Für die Gärung mit nicht lebenden Hefepräparaten haben bekanntlich Harden und Young die zwei Gleichungen



aufgestellt. Sie besagen, daß die alkoholische Zuckerspaltung jedes Moleküls Hexose mit der Veresterung eines zweiten Zuckermoleküls verbunden ist und daß dann durch ein im Hefematerial enthaltenes Ferment, die Phosphatase, wieder freies Phosphat und gärfähiger Zucker erzeugt wird.

Andererseits wird nach Euler und Ohlsén (l.c.) die Veresterung durch ein selbständiges Enzym, die Phosphatase, besorgt. Dieses Ferment ist nach ihren Angaben von der Zymase abtrennbar, indem sich Hefenextrakte darstellen lassen, die Hexose mit phosphorsaurem Salz verestern, ohne daß gleichzeitig Alkohol und Kohlensäure überhaupt entstehen. Allerdings war das synthetisierende Enzym nicht von allen Hefen ablösbar.

Diesen von Euler angenommenen Vorgang einer unabhängigen Phosphorylierung ohne Vergärung halten freilich A. v. Lebedew¹⁾ und A. Harden²⁾ für unbewiesen, wie uns scheint, ohne hinreichenden Grund. Man kann in der Beobachtung von Euler und Ohlsén eine starke Stütze für die Annahme erblicken, daß Bindung von Zucker an Phosphat und seine Vergärung nicht zwei unweigerlich miteinander verknüpfte Reaktionen sind. Denn es ist klar, daß wenn Veresterung ohne alkoholische Zuckerspaltung möglich ist, nicht zugleich die Forderung erfüllt sein kann, daß die Phosphorylierung eines Zuckermoleküls tatsächlich die Vergärung des zweiten bedingt. Dieser Gesichtspunkt ist, soweit wir sehen, bisher nicht genügend gewürdigt.

Scheint somit einerseits Veresterung ohne Gärung einzu-

¹⁾ A. v. Lebedew, diese Zeitschr. 39, 155, 1912.

²⁾ A. Harden, Monogr. S. 57 u. 58.

treten, so findet andererseits der umgekehrte Vorgang, Zuckerzerlegung ohne nachweisbare Phosphatbindung, statt. Zwar glauben v. Euler und Johansson (l. c.) die Verkettung beider Prozesse auch für die Umsetzung des Zuckers durch frische Hefe gezeigt zu haben, aber zweifelsohne gibt es Fälle, in denen für den normalen Gärakt diese Folgerung nicht ohne weiteres gezogen werden kann. Wir berichten darüber weiter unten. Die Beweisführung der schwedischen Forscher war folgende gewesen.

Ermittelten sie die Menge der entwickelten Äquivalente Kohlendioxyd und des gebundenen Phosphates, so stellte sich bei Benutzung von leblosem Hefenmaterial nach einiger Zeit das Verhältnis $PO_4 : CO_2 = 1$ ein. Bei Anführung der Versuche mit lebender Hefe, die jedoch nur in Gegenwart von Toluol verwendbar war, erreichte der Quotient auf der Höhe des Versuches höchstens den Wert 0,59 bzw. 0,78. Er bleibt also bis 40% hinter dem theoretischen zurück. Trotzdem erblicken die Autoren hierin eine befriedigende Übereinstimmung (mit der Hilfshypothese, daß die Abweichung durch den Verlauf der Reaktion in Gegenwart eines großen Überschusses an Zucker bedingt gewesen sei).

Man braucht nicht in Erörterungen über die Zulässigkeit jener Aushilfsannahme einzutreten, nicht auf das bis mehr als 40% reichende Defizit einzugehen und auch nicht die Frage zu erwägen, ob die Ausführung des Versuches in Gegenwart von Toluol¹⁾ etwa Bedingungen schafft, unter denen überhaupt nicht mehr von normal lebender Hefe die Rede ist, sondern mindestens eine teilweise Überführung der Zellen in einen der Trockenform verwandten ungewöhnlichen Zustand angenommen werden muß. Denn unsere diesbezüglichen Experimente fielen ganz eindeutig aus: wir beschränken uns dabei auf die Wiedergabe von Versuchen, die genau nach den Angaben von Euler und Johansson angestellt worden sind.

¹⁾ Über den Einfluß des Toluols auf die alkoholische Gärung mit frischen Hefen kann man z. B. einiges der Mitteilung von C. Neuberg und F. F. Nord (diese Zeitschr. 67, 12) entnehmen. Die Angabe (Euler und Johansson, H. 85, 204), daß allgemein Toluol gerade die Phosphatase stark hemme, bestreitet jüngst O. Meyerhof. (ebendas. 162. 221).

Wir finden bei Zusatz von phosphorsauren Salzen eine, wenn auch mäßig rasche Vergärung ohne jede nachweisbare Veresterung¹⁾ (Versuch VII und VIII). Versuch IX zeigt, daß unter sonst gleichen Bedingungen, aber in Abwesenheit von Phosphat, die Zuckerspaltung schneller erfolgt.

VII.

Erlenmeyerkölbchen mit Gärverschuß wurden mit je 6 g frischer Hefe M (untergärig) und 10 ccm 40% iger Rohrzuckerlösung sowie mit 0,2 ccm Toluol beschickt und $\frac{1}{2}$ Stunde stehen gelassen. Dann wurden 10 ccm einer 20% igen Lösung von $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12 \text{H}_2\text{O}$ hinzugefügt. Fortlaufend nach den angegebenen Zeiten wurde durch Zusatz von je 20 ccm $\frac{2}{3}$ -Ammoniak die Einwirkung unterbrochen und in je 5 ccm klaren Filtrats die vorhandene Phosphatmenge bestimmt. Die Versuchstemperatur war 27,5°.

	Gesamtmenge entwickelter CO_2 in g	Aus 5 ccm erhaltene Menge $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ in g
Nach 0 Minuten	0,000	0,0768
" 2 Stunden	0,048	0,0786
" 4 "	0,077	0,0790
" 6 "	0,120	0,0773
" 8 "	0,205	0,0808
" 15 "	0,409	0,0794

VIII.

Derselbe Versuch wurde mit 40% iger Traubenzuckerlösung wiederholt und hatte den gleichen Erfolg.

	Gesamtmenge entwickelter CO_2 in g	Aus 5 ccm erhaltene Menge $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ in g
Nach 0 Minuten	0,000	0,0777
" 2 Stunden	0,080	0,0802
" 4 "	0,077	0,0806
" 6 "	0,113	0,0786
" 8 "	0,182	0,0790
" 15 "	0,432	0,0787

¹⁾ Dieses Ergebnis bildet zugleich eine Bestätigung für den Ausfall der zuvor mitgeteilten Versuche; nach den daraus bekannten Eigenschaften der Hefe M war der Befund zu erwarten. Die Versuche liegen zeitlich mehr als ein Jahr auseinander und lehren daher, daß sich das biochemische Verhalten der betreffenden Hefensorte nicht geändert hatte.

IX.

Der entsprechende Versuch mit Rohrzucker, aber ohne Phosphatzusatz ergab:

	Gesamtmenge entwickelter CO ₂ in g
Nach 2 Stunden	0,142
" 4 "	0,310
" 6 "	0,694
" 8 "	1,075
" 16 "	1,440

Demnach setzt der natürliche Vorgang, die Vergärung ohne Phosphatbeigabe, viel schneller ein und schreitet rascher fort. Der Grad der Vergärung hängt von der Gärkraft ab, die von der verwendeten Hefensorte in Gegenwart des Toluols entfaltet wird. Der Zucker verschwindet jedenfalls in den phosphathaltigen Gemischen langsamer. Die Erfahrung, daß ein Zusatz phosphorsaurer Salze keineswegs stets die Gärung fördert, ist schon früher von A. Slator¹⁾, E. Buchner und J. Meisenheimer²⁾ sowie von K. Djenab und C. Neuberg³⁾ gemacht worden, während nach O. Meyerhof (l. c. S. 198) bei der unter bestimmten Bedingungen beeinflussbaren Anfangbeschleunigung der Gärung durch Phosphat jedes andere Salz genau so wirken kann.

Wir fügen hinzu, daß die zu den Versuchen VII, VIII und IX benutzte Unterhefe M nach Überführung in die Trockenform in typischer Weise Phosphorylierung hervorrief.

Der Zusammenhang von Phosphatbindung und Vergärung ließ sich also für den normalen Akt, die alkoholische Zuckerspaltung mittels lebender Hefen, nicht beweisen. Dazu kommt, daß Oberhefen fast ausnahmslos, Unterhefen mindestens häufig den Umsatz der Kohlenhydrate herbeiführen, ohne daß selbst in Gegenwart von reichlich Phosphaten eine Veresterung der letzteren erkennbar ist. Nach den vorliegenden Erfahrungen wird die Fructosediphosphorsäure von lebender Hefe weder er-

¹⁾ A. Slator, Journ. Chem. Soc. 93, 217, 1908.

²⁾ E. Buchner und J. Meisenheimer, Ber. 43, 1795, 1910.

³⁾ K. Djenab und C. Neuberg, diese Zeitschr. 82, 391, 1917.

zeugt noch zerlegt noch vergoren. Das trifft¹⁾ für die freie Estersäure, ihre löslichen und unlöslichen Salze zu, einerlei ob Ober- oder Unterhefen angewendet und natürliche oder künstliche Aktivatoren hinzugegeben werden. Für das negative Ergebnis kann auch keine Giftigkeit des Hexosediphosphates verantwortlich gemacht werden¹⁾. Bemerkenswert ist, daß die viel komplizierter gebaute Rohrzuckerphosphorsäure, wie K. Djenab und C. Neuberg²⁾ zeigten, durch frische Hefe unter Phosphatabspaltung vergoren wird; dem schließt sich nach neuen Versuchen die Raffinosephosphorsäure an, die trotz ihres erheblich höheren Molekulargewichts jedenfalls von Unterhefen umgesetzt wird.

Als wesentlich für die Bedeutung, die man dem Zuckerphosphorsäureester zuerkennen will, ist schließlich folgender Umstand in Betracht zu ziehen. Unter den Bedingungen, bei denen die Hefe gegebenenfalls Hexosediphosphorsäure synthetisieren kann, d. h. nach Zufügung von reichlich Phosphat, verläuft die Vergärung gar nicht in gewöhnlicher Weise³⁾. Es wird nämlich weniger Alkohol und Kohlendioxyd erzeugt als in der Norm; denn ein Teil des Zuckers zerfällt nach der sog. 3. Vergärungsform: $2\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{H}_2\text{O} = \text{CH}_3 \cdot \text{COOH} + 2\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2 + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 2\text{CO}_2$ unter Bildung von Essigsäure und Glycerin. Diese Spaltung geht vor sich, einerlei ob man sekundäres Phosphat oder ein Gemisch von Mono- und Dinatriumphosphat anwendet, wie es auch bei der Gewinnung von Zymophosphat geschieht. Die phosphorsauren Salze gehören zu den wirksamsten Erregern der 3. Vergärungsform.

Wie sich nun auch die Rolle des Esters im Stoffwechsel der Hefen aufhellen mag, es wird zunächst kaum als ein Zwischenprodukt der Hexosenspaltung gelten dürfen. Denn der phosphorylierte Kohlenhydratanteil ist auch nach den Anschauungen von Harden und Young gar nicht in den Abbau einbezogen, vielmehr wird aus ihm erst der freie 6-Kohlenstoffzucker zurückgebildet und darauf vergoren.

¹⁾ C. Neuberg, E. Färber, A. Levite u. E. Schwenk, l. c.

²⁾ K. Djenab u. C. Neuberg, l. c.

³⁾ C. Neuberg u. E. Färber, diese Zeitschr. 78, 238, 1916; C. Neuberg u. J. Hirsch, ebenda 100, 304, 1919.

Zusammenfassung.

1. Hinsichtlich der Frage nach einer Bedeutung der Fructose-diphosphorsäure für die normale Gärung ist die Klärung des Punktes von Belang, ob das Hexosebiphosphat nennenswerte Mengen von Abbaustufen des Zuckers in Form von Triosen enthält. In Übereinstimmung mit Harden und Young sowie mit den Angaben von Neuberg, Färber, Levite und Schwenk ergab auch die Untersuchung neuer Präparate keinen Anhaltspunkt für ein solches Vorliegen von Derivaten der 3-Kohlenstoffzucker. Jedenfalls scheint eine Phosphorylierung von Hexosen ohne Bildung eines Triosenderivates möglich zu sein.

2. Für die Erwägung, ob das Hexosediphosphat als ein physiologisches oder in gewissem Sinne vielleicht pathologisches Produkt gelten kann, ist die Feststellung wichtig, ob der Ester in erheblicher Menge nur mit abgetötetem Hefematerial, also bei entfesselten Enzymkräften, oder auch mit frischer Hefe entsteht. Wir zeigen, daß typische Unterhefen in frischer Form bei Gegenwart von Toluol nicht die geringste Phosphatbindung zuwege bringen, während dieselben Hefen nach Überführung in den Trockenzustand glatt phosphorylieren. Die Versuche sind 1913 und im Frühjahr 1914 vorgenommen, so daß ein etwaiger Einfluß der Kriegsernährung auf das Verhalten der Hefen nicht in Betracht kommt. Entsprechende Beobachtungen an anderen Heferassen hatten wir 1917 schon mitgeteilt; hinsichtlich der obergärigen Hefen besteht mit Euler nunmehr völlige Übereinstimmung, indem uns der Autor darin beipflichtet, daß bei Oberhefen in der Regel keine Phosphatveresterung wahrnehmbar ist.

3. Bei der Vergärung mittels frischer Hefe war keine Abhängigkeit von einer gleichzeitigen Phosphorylierung zu erkennen, vielmehr fanden wir unter den dafür empfohlenen Bedingungen Umsetzung des Zuckers, ohne daß eine Veresterung überhaupt angedeutet gewesen wäre.

Demnach ist Vergärung ohne nachweisbare Phosphorylierung (sowie nach Euler und Ohlsén auch der umgekehrte Vorgang: Phosphatbindung ohne Zuckerspaltung) möglich. Zahlreichen frischen ober- und untergärigen Hefen geht die Fähig-

keit zur Erzeugung des Phosphorsäureesters ab. Ferner erfolgt unter der Einwirkung größerer Phosphatmengen, in deren Gegenwart man allein den Zuckerphosphorsäureester unter bestimmten, ungewöhnlichen Bedingungen gewinnen kann, der Umsatz des Zuckers gar nicht in der üblichen Weise nach der ersten Vergärungsform, sondern nach der dritten. Nach alledem liegt der Anteil der Phosphorylierung noch nicht klar zutage, und man wird, ohne eine Bedeutung des Vorganges in Abrede stellen zu wollen, doch kaum behaupten können, daß in der Fructosediphosphorsäure die zwangsläufige Bindungsform des Zuckers beim normalen Gärakt festgestellt worden ist. Auch ein Zusammenhang der Veresterung mit dem eigentlichen Abbau ist nicht durchsichtig; denn das phosphorylierte Zuckermolekül ist ja in die Spaltung keineswegs einbezogen, sondern soll immer wieder Hexose zurückergeben. Bei alle dem darf durchaus nicht der spezifische Einfluß des Phosphations verkannt werden, den Harden und Young für das Zustandekommen der zellfreien Gärung im allgemeinen sowie Hagman¹⁾ und Neuberg und Schwenk²⁾ für die Betätigung des Kofermentes dargetan haben.

¹⁾ S. Hagman, diese Zeitschr. 69, 419, 1915.

²⁾ C. Neuberg und E. Schwenk, diese Zeitschr. 71, 188, 1915.

Autorenverzeichnis.

- Aron, Hans. Über den „Nährwert“ und die Bedeutung der Nahrungsfette. S. 172.
- Baudisch, Oskar. Beitrag zur Milchsäurespaltung durch kurzwellige Strahlen. S. 59.
- Boecker, Eduard. Über das Verhalten des Chinins im Organismus. S. 68.
- Bönniger, M. Die Permeabilität der roten Blutkörper für den Traubenzucker. S. 806.
- Deußen, Ernst. Die Gramsche Bakterienfärbung, ihr Wesen und ihre Bedeutung. S. 128.
- Dietrich, Walther, s. Windisch.
- Ehrlich, Marta. Über die angebliche Inaktivierung des d-Mannits. S. 312.
- Erlenmeyer, Emil, und Gustav Hilgendorff. Optisch aktive Zimtsäuren und die bei ihrer Bildung nebenher entstehenden Cinnamate der Weinsäure. S. 79.
- Hägglund, Erik. Schweflige Säure und Hefegärung. S. 299.
- Hári, Paul. Über die Lichtabsorption des Methämoglobins in neutraler und soda-alkalischer Lösung. S. 271.
- Hilgendorff, Gustav, s. Erlenmeyer.
- Hofmeister, Franz. Zur Kenntnis der alkaloidischen Bestandteile der Reizkleie. S. 218.
- Joachimoglu, G. Ein Thermostat mit elektromagnetischer Reguliervorrichtung und elektrischer Heizung. S. 49.
- Lesser, E. J. Über das Wesen des Pankreasdiabetes. (Die Änderung der diastatischen Wirksamkeit der Leber und die Unbeeinflussbarkeit der glykolytischen Fähigkeit des Muskels durch Pankreasextirpation beim Frosch.) S. 1.
- Michaelis, L., s. Rona.
- Über die Analyse des CO_2 -Gleichgewichts im Blute nach H. Straub und K. Meyer. S. 58.
- Michaelis, L. Theoretische Untersuchungen über den Dissoziationszustand der Ampholyte. I. Teil. Die Wirkung einwertiger Ionen bei Vernachlässigung aller kolloidalen Erscheinungen. S. 225.
- und Albert v. Szent-Györgyi. Der Einfluß der Salze auf das Fällungsoptimum des Caseins. S. 178.
- Neuberg, Carl. Weitere Erfahrungen über die Bildung und Bedeutung der Fructosediphosphorsäure im Stoffwechsel der Hefe. S. 320.
- Nord, F. F. Phytochemische Reduktion von o-Nitrobenzaldehyd. S. 315.
- Partos, S. Bestimmung des durch Urease zersetzten Harnstoffs aus der CO_2 -Komponente des Zersetzungsproduktes. S. 292.
- Plötz, W. Vergleichende Untersuchungen über die hämolytische Wirkung einiger Chloridivate des Methans, Äthans und Äthylens. S. 243.
- Rippel, August. Bemerkungen über die quantitative Bestimmung des Phytins in Pflanzenauszügen. S. 163.
- Rona, P., und L. Michaelis. Das Adsorptionsvermögen der Cellulose; nebst Bemerkungen über die elektrometrische Mikroanalyse des Chlor. S. 19.
- Rosenbaum, S. Untersuchungen über Abwehrfermente. S. 30.
- Salkowski, E. Über eine Reaktion auf Pyrrol. S. 185.
- Szent-Györgyi, Albert v., s. Michaelis.
- Warburg, Otto. Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen. II. S. 188.
- Windisch, Wilkefm, und Walther Dietrich. Über die Umsetzungen von primärem Kaliumphosphat mit wachsenden Mengen von Calciumbicarbonat beim Kochen. S. 142.

STACKS

141705

