



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

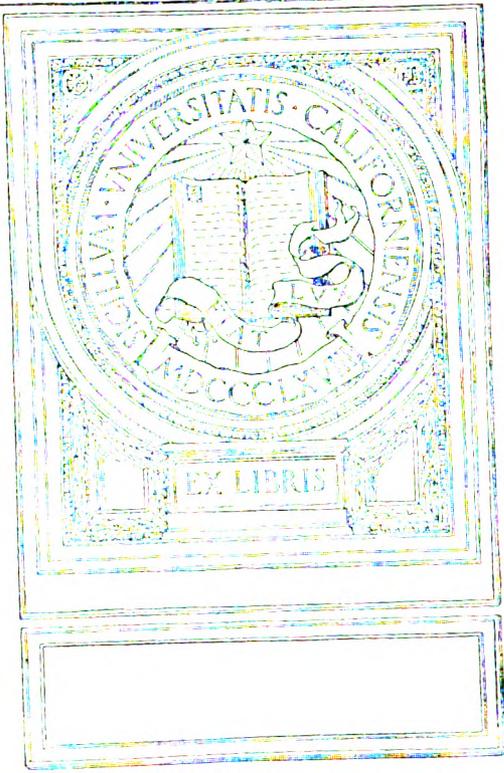
Das Ziel von Google besteht darin, die weltweiten Informationen zu organisieren und allgemein nutzbar und zugänglich zu machen. Google Buchsuche hilft Lesern dabei, die Bücher dieser Welt zu entdecken, und unterstützt Autoren und Verleger dabei, neue Zielgruppen zu erreichen. Den gesamten Buchtext können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

UC-NRLF

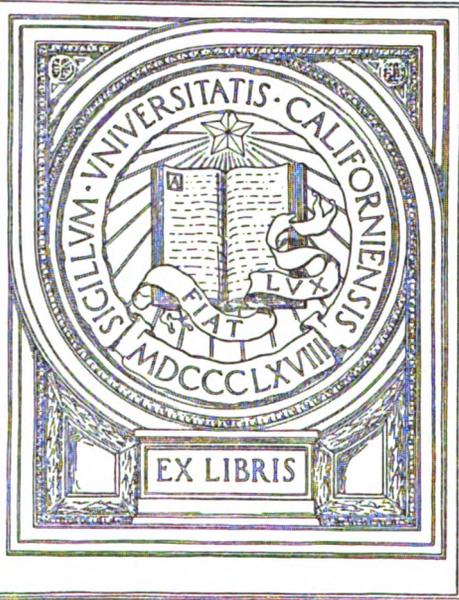


B 3 778 050

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
MEDICAL CENTER LIBRARY
SAN FRANCISCO



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

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Benamati-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., A. Durrig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, J. Feigl-Hamburg, S. Flexner-New York, J. Forsman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin-Dahlem, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, F. Haber-Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger-Groningen, P. Hári-Budapest, E. Häggund-Åbo, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, A. Koch-Göttingen, F. Landolt-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, J. Leeb-New York, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Melsenheimer-Greifswald, L. Michaelis-Berlin, H. Mollsch-Wien, J. Morgenroth-Berlin, E. Münzer-Prag, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-St. Petersburg, A. Scheunert-Berlin, N. Sieber-St. Petersburg, S. P. L. Sørensen-Kopenhagen, K. Spiro-Liestal, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., A. Stutzer-Königsberg i. Pr., K. Suto-Kanazawa, H. v. Tappeiner-München, H. Thoms-Berlin, P. Trendelenburg-Rostock, O. Warburg-Berlin, W. Wlechowaki-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin

Hundertundzwölfter Band



Berlin

Verlag von Julius Springer

1920

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Hüsgen, Hans. Über eine lipotrope Quecksilberverbindung	1
Acél, D. Über die oligodynamische Wirkung der Metalle	23
Feigl, Joh. Über das Vorkommen von Phosphaten im menschlichen Blutserum. XII. Die P-Verteilung, nach den derzeitigen Methoden zur Trennung und Isolierung. Neue Ergebnisse	27
— Bemerkung zur Frage der „Restreduktion“ des Blutes	51
Herzfeld, E. und R. Klinger. Berichtigung und Ergänzung zu unserer Arbeit: „Zur Chemie der Polysaccharide“	55
Weiss, M. Die Farbstoffanalyse des Harnes. II. Das Urochromogen	61
Rosenmann, M. Über Fibrinolyse	98
Schnabel, Alfred. Die Verteilung der China-Alkaloide im Blute .	112
Hausmann, W. und W. Kerl. Zur Kenntnis der oligodynamischen Hämolyse	122
Freund, Ernst und Gisa Kammer. Über biologische Beeinflussung der Haut durch carcinombegünstigende Agentien (wie Tabaksaft, Teer, Ruß)	124
Cohen, Clara. Über die Bildung von Acetaldehyd bei den Umsetzungen von Zucker durch Pilze	139
Neuberg, C., F. F. Nord und E. Wolff. Acetaldehyd als Zwischenstufe bei der Vergärung von Zucker durch <i>B. lactis aerogenes</i>	144
Hahn, Martin und v. Skramlik, Emil. Versuche mit Antigenen und Antikörpern an der überlebenden, künstlich durchströmten Leber. II. Versuche mit Tetanustoxin	151
Löffler, Wilhelm. Zur Kenntnis der Leberfunktion unter experimentell pathologischen Bedingungen	164
Olsen, O. und K. Goette. Über Serumhämolyse und -lipolyse . .	188
Fränkel, Sigmund und Erik Schwarz. Über wasserlösliche Vitamine und gärungsbeschleunigende Verbindungen. I. Methodik der Bestimmung und Darstellung der gärungsbeschleunigenden Substanz aus Hefe und Reiskleie	203
Köhler, Erich. Über Fermentbildung	236
Kochmann, Rudolf. Über Schwefelwasserstoffbildung aus Sulfaten durch Faeces	255
Tröndle, A. Neue Untersuchungen über die Aufnahme von Stoffen in die Zelle	259
Némeç, Antonin. Über Urikase im Samenorganismus	286
Kochmann, M. Quantitative Untersuchungen des Magnesium-, Kalk- und Bariumsulfat-Antagonismus	291
Atzler, Edgar und Fritz Richter. Über die Wärmekapazität des arteriellen und venösen Blutes	310
Färber, E. und F. F. Nord. Die phytochemische Reduktion des Acetols zu optisch-aktivem Propylenglyköl. Nebst Bemerkungen und Versuchen zur Frage des Auftretens sowie der Verarbeitung von Racemkörpern bei Tier und Pflanze von C. Neuberg . . .	313
Autorenverzeichnis	325

Biochemische Zeitschrift

Beiträge
zur chemischen Physiologie und Pathologie

U.S. MEDICAL CENTER LIBRARY

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

JAN 2 1962

San Francisco, 22

unter Mitwirkung von

M. Ascoli - Catania, L. Asher - Bern, G. Bertrand - Paris, A. Bickel - Berlin, F. Blumenthal - Berlin, A. Bonanni - Rom, F. Bottazzi - Neapel, G. Bredig - Karlsruhe i. B., A. Durig - Wien, F. Ehrlich - Breslau, H. v. Euler - Stockholm, J. Feigl - Hamburg, S. Flexner - New York, J. Forsman - Lund, S. Fränkel - Wien, E. Freund - Wien, H. Freundlich - Berlin-Dahlem, E. Friedberger - Greifswald, E. Friedmann - Berlin, O. v. Fürth - Wien, G. Galeotti - Neapel, F. Haber - Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger - Groningen, P. Hári - Budapest, E. Hägglund - Åbo, A. Hefter - Berlin, V. Henri - Paris, V. Henriques - Kopenhagen, W. Houbner - Göttingen, R. Höber - Kiel, M. Jacoby - Berlin, A. Koch - Göttingen, F. Landolt - 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. Melsenheimer - Greifswald, L. Michaelis - Berlin, H. Molisch - Wien, J. Morgenroth - Berlin, E. Münzer - Prag, W. Nernst - Berlin, W. Ostwald - Leipzig, W. Palladin - St. Petersburg, W. Pauli - Wien, R. Pfeiffer - Breslau, E. P. Pick - Wien, J. Pohl - Breslau, Ch. Porcher - Lyon, P. Rona - Berlin, H. Sachs - Heidelberg, S. Salaskin - St. Petersburg, A. Scheunert - Berlin, N. Steber - St. Petersburg, S. P. L. Sörensen - Kopenhagen, K. Spiro - Liestal, E. H. Starling - London, J. Stoklasa - Prag, W. Straub - Freiburg i. B., A. Stutzer - Königsberg i. Pr., K. Suto - Kanazawa, H. v. Tappeln - München, H. Thoms - Berlin, P. Trendelenburg - Rostock, O. Warburg - Berlin, W. Wiechowksi - Prag, A. Wohl - Danzig, J. Wohlgenuth - Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg - Berlin

Hundertundzwölfter Band

Erstes bis drittes Heft

Ausgegeben am 30. November 1920



Berlin

Verlag von Julius Springer

1920

Die **Biochemische Zeitschrift**

erscheint in zwanglosen Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. Der Preis eines jeden Bandes beträgt M. 48.—. Die Biochemische Zeitschrift ist durch jede Buchhandlung sowie durch die unterzeichnete Verlagsbuchhandlung zu beziehen.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als 1½ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens 2 Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Redakteur,

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18. zu richten.

Die Verfasser erhalten 60 Sonderabdrücke ihrer Abhandlungen kostenfrei, weitere gegen Berechnung. Für den 16 seitigen Druckbogen wird ein Honorar von M. 40.— gezahlt.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer

Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

112. Band.	Inhaltsverzeichnis.	1./3. Heft.
		Seite
Hüsgen, Hans.	Über eine lipotrope Quecksilberverbindung	1
Acél, D.	Über die oligodynamische Wirkung der Metalle	23
Feigl, Joh.	Über das Vorkommen von Phosphaten im menschlichen Blutserum. XII. Die P-Verteilung, nach den derzeitigen Methoden zur Trennung und Isolierung. Neue Ergebnisse	27
Feigl, Joh.	Bemerkung zur Frage der „Restreduktion“ des Blutes	51
Herzfeld, E., und R. Klinger.	Berichtigung und Ergänzung zu unserer Arbeit: „Zur Chemie der Polysaccharide“	55
Weiss, M.	Die Farbstoffanalyse des Harnes. II. Das Urochromogen	61
Rosenmann, M.	Über Fibrinolyse	98
Schnabel, Alfred.	Die Verteilung der China-Alkaloide im Blute	112
Hausmann, W., und W. Kerl.	Zur Kenntnis der oligodynamischen Hämolyse	122
Freund, Ernst, und Gisa Kaminer.	Über biologische Beeinflussung der Haut durch carcinombegünstigende Agentien (wie Tabaksaft, Teer, Ruß)	124
Cohen, Clara.	Über die Bildung von Acetaldehyd bei den Umsetzungen von Zucker durch Pilze	139
Neuberg, C., F. F. Nord und C. Wolff.	Acetaldehyd als Zwischenstufe bei der Vergärung von Zucker durch <i>B. lactis aerogenes</i>	144

Über eine lipotrope Quecksilberverbindung.

Von
Hans Hüsgen.

(Aus dem pharmakologischen Institut zu Göttingen.)

(Eingegangen am 4. September 1920.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

In der umfangreichen Literatur über das Verhalten des Quecksilbers im Organismus ist allgemein anerkannt, daß die Nervensubstanz äußerst wenig aufnimmt. Die jüngsten Forscher, Lomholt und Christiansen, sprechen sich auf Grund eigener sorgfältiger Untersuchungen folgendermaßen aus: „Der Gehalt des Gehirns an Hg ist nach 3 recht zuverlässigen Angaben an Patienten recht gering (0,1—0,17 mg). Die Resultate an Kaninchen sind dagegen bedeutend größer, wenn man den Prozentgehalt berücksichtigt. (Dazu ist aber zu bemerken, daß die absoluten Mengen so klein sind, daß das Resultat an sich zweifelhaft sein muß.) Andererseits ist jedoch der Gehalt nicht so gering, daß man, wie einige dies tun, berechtigt wäre, daraus zu schließen, daß die therapeutische Wirkung des Quecksilbers auf die Lues des Zentralnervensystems überhaupt problematisch wäre.“

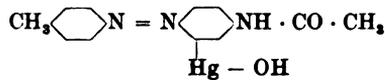
Kurze Zeit vor dem Kriege hat Serono¹⁾ ein Cholesterin-Quecksilberoleat hergestellt, das als Mercuricoleolo zur Anwendung kam. Das Präparat, das eine teigige, salbenartige Konsistenz besitzen und in Äther, Benzol, Chloroform, Ölen und Fetten löslich sein soll, wurde in Mandelöllösung subcutan zu 1 ccm = 10 mg Hg (entsprechend 13,5 mg HgCl₂) angewendet, und zwar von Sanmartino, Mingazzini, Martiani und anderen italienischen Autoren bei Lues, progr. Paralyse und Tabes, angeblich mit gutem Erfolge.

¹⁾ Vgl. Merck, J. B. 1914, S. 379, und Rühl, Dermatol. Wochenschr. 18, 510. 1914.

Die lipide Eigenschaft dieses Präparates läßt das Bestreben erkennen, ein Mittel zu finden, das bei möglichst geringer Schädigung dem Zentralnervensystem näher gebracht werden kann, so daß sich im Gehirn und in der Nervensubstanz Hg in größeren Mengen deponiert, als dies bei den andern Mitteln bisher möglich war, und damit eine Bekämpfung der „metaluetischen“ Erkrankungen aussichtsreicher wird.

Eine Hg-Verbindung ähnlichen Charakters, die gleichfalls in Fett, Äther und Chloroform löslich ist, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Das Präparat ist ein geruchloses, zinnoberrotes Pulver, das unter dem Mikroskop ein Gemenge aus amorphen und nadelförmig-krystallinischen Massen darstellt. Nach Angabe der produzierenden Firma¹⁾ enthält es 30% Hg. Das Präparat löst sich nicht in Wasser, leicht in Chloroform, Ölen, Fetten, teilweise in Äther, schmilzt bei gelindem Erwärmen und hat wahrscheinlich die Formel eines 2 Mercuri-4 Acetanilid-azo-4 toluols



Aus der Formel und der Löslichkeit lassen sich auf Grund der früheren Erfahrungen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit folgende Eigenschaften des Präparates (M A T) voraussehen:

1. bezüglich der Resorption: es ist als unlösliche Substanz zu bezeichnen, wird also langsam resorbiert; an der Applikationsstelle wird subcutan oder intramuskulär ein Depot geschaffen, von wo aus allmähliche Abspaltung von Hg stattfinden kann, und die Möglichkeit einer längeren Einwirkung gegeben.

2. bezüglich der Abspaltung des Hg und demzufolge der Wirksamkeit und Giftigkeit: die einseitige Bindung des Hg am aromatischen Kern erlaubt nach den Arbeiten von Blumenthal, sowie von Schöller und Schrauth den Schluß, daß die Substanz hinreichend wirksam ist;

3. bezüglich der Verteilung im Organismus: die lipotrope Eigenschaft bietet die Möglichkeit einer größeren Anreicherung im Gehirn und in der Nervensubstanz und damit vielleicht auch einer spezifischen Wirkung bei Lues des Nervensystems und progressiver Paralyse.

¹⁾ Saccharin-Fabrik, A.-G., vorm. Fahlberg, List u. Cie., Magdeburg.

Zur Untersuchung des Präparates in Richtung der dritten Voraussage mußte zunächst eine Methode ausfindig gemacht werden, die es ermöglichte, auch noch ganz geringe Mengen von Hg im Gehirn mit Sicherheit festzustellen und quantitativ zu bestimmen. Der oben zitierte Ausspruch von Lomholt läßt die Unsicherheit, die auch er noch gegenüber der von ihm verwendeten Methode empfindet, erkennen. Diese methodische Aufgabe wurde im ersten Teile der vorliegenden Arbeit gelöst.

Zur weiteren Beurteilung des Präparates war eine möglichst genaue Bestimmung der durch Harn und Faeces ausgeschiedenen Hg-Mengen, sodann eine ebenfalls quantitative Bestimmung des in den einzelnen Organen deponierten Hg erforderlich, um einen Vergleich zwischen diesen und den im Gehirn deponierten Hg-Mengen, sowie zu dem Verhalten anderer Quecksilberpräparate ziehen zu können. In dieser Richtung wurden Versuche am Kaninchen angestellt, die im zweiten Teile der Arbeit beschrieben sind.

1. Teil.

Methoden zur Quecksilberbestimmung im Gehirn.

Die im Gehirn vorhandenen Hg-Verbindungen nach Applikation von Hg sind durch chemische oder histochemische Reaktionen nicht ohne weiteres nachweisbar. Wie weit bei Deposition von Hg im Gehirn Verbindungen lipoiden Charakters entstehen, ist von vornherein nicht bestimmt zu sagen. Mindestens ist die Prüfung notwendig, ob in den schwerer destruirbaren Fetten des Gehirns nach Zerstörung der leichter angreifbaren Substanzen noch Hg in gebundener oder gelöster Form verblieben ist. Da diese Frage auf Grund der Ergebnisse von Voruntersuchungen mindestens für unser Präparat bejaht werden mußte, war also bei der Mineralisierung des Gehirns zur Hg-Bestimmung die völlige Destruktion der Fette unbedingt erforderlich. Danach konnte dann auf Grund der bereits vielfach durchgeprüften bekannten analytischen Methoden weiter verfahren werden.

Die von mir gewählte Bestimmungsmethode setzt sich zusammen aus:

1. totaler Destruktion des Gehirns,
2. Elektrolyse,
3. Übertreiben des Hg in eine Capillare,
4. Wägung der Capillare.

Angestrebt wurde Sparsamkeit in Heizung, Material und Zeit, ferner Vermeidung von häufigem Gefäßwechsel zwecks größtmöglicher Genauigkeit.

a) Versachung der Gehirnschubstanz.

Die schwierigste Aufgabe war die vollständige Zerstörung des fettreichen Gehirns ohne Gefahr zu laufen, daß durch lang. einwirkende hohe Temperaturen sich Hg verflüchtigte. In besonderen Versuchen haben Lomholt und Christiansen gezeigt, daß bei der gewöhnlichen Säureversachung Quecksilber verloren geht.

Um ein Urteil zu gewinnen, welche von den bekannten Zerstörungsmethoden am besten zum Ziele führte, wurde versucht die Anwendung von

1. Chlorsäure (40%) + HCl.

2. HCl conc. + Chlorsäure, danach Antiformin.

3. Methode von Lomholt und Christiansen.

4. Verseifung mit alkohol. KOH, Abscheidung der Fettsäuren durch Ansäuern und Aufnahme mit Äther; Trennung der Äther- und Wasserlösung und Zerstörung beider Teile für sich mit Säuregemisch.

5. Zerstörung mit H_2SO_4 (Oleum) + HNO_3 (fumans).

Auf Grund der ausgeführten Versuche kam ich zu dem Entschluß, die Zerstörung nach dem zuletzt angegebenen Verfahren mit Oleum und rauchender Salpetersäure auszuführen, und zwar, weil sie allein die Möglichkeit gibt, die Gehirnschubstanz völlig zu mineralisieren.

Daß in unzerstörten Fetten noch Hg-Mengen vorhanden sein können, haben besondere Versuche ergeben, bei denen $HgCl_2$ oder unsere Azoverbindung der Gehirnschubstanz zugemischt worden war. In einem von diesen, bei dem die Zerstörung mit H_2SO_4 und HNO_3 vorgenommen, ein Teil der Fette aber unzerstört gelassen wurde, fanden sich nach völliger Zerstörung dieses Restfettes für sich noch 1,41 mg Hg von 5,92 mg angewandtem Hg! Bei einem zweiten Versuche fanden sich bei gleicher Methode noch 0,06 mg von 1,32 mg angewandtem Hg. Bei einem dritten Versuche konnte im Fette allein kein Hg nachgewiesen werden, es fehlten aber in der Analyse 0,24 mg Hg von 5,92 mg des angewandten Hg.

Der Ausschluß von Quecksilberverlusten durch Flüchtigkeit gelang mit Hilfe des folgenden Apparates (vgl. Abb. 1).

In dem Kolben A, der wegen der Gefahr des Übersäumens geräumig und aus gutem Jenaer Glas gefertigt sein muß, wurde das zu Brei verrührte Gehirn mit H_2SO_4 -Oleum in kleinen Mengen vermischt, zunächst gelinde erwärmt, bis die Masse anfang, trocken zu werden, dann stärker erhitzt, bis H_2SO_4 -Dämpfe sich zu entwickeln begannen und Verkohlungen eintrat. Dabei mußte

darauf geachtet werden, daß keine trockenen Partikel sich an den Wandungen des Kolbens festsetzten. Dann wurde aus dem eingeschliffenen Trichter mit Glashahn tropfenweise HNO_3 fum. zugegeben. Bei der nun folgenden heftigen Reaktion im Kolben gingen größere Anteile von Fetten durch das Rohr in die Vorlage *C* über. Etwa noch weiter gehende Dämpfe wurden durch den Aufsatz *D* mit Rückflußkühler kondensiert.

Die eingeleitete Reaktion im Kolben wurde nun so lange durch zeitweises Zutropfen von HNO_3 fum. und Erhitzen auf dem Baboblech unterhalten, bis die Flüssigkeit keine festen Bestandteile mehr zeigte und in eine klare hellgelbe Lösung verwandelt war. Nach Erkalten des Kolbens wurde dann der Inhalt der

Vorlage, des Aufsatzes und des Destillationsrohres unter Spülen mit Salpetersäure in den Kolben zurückgebracht und von neuem erhitzt, wobei stets ein allerdings kleiner Teil von Fett wieder in die Vorlage übergang. Dieses Zurückgeben und Erhitzen wurde so lange wiederholt, bis kein Fett

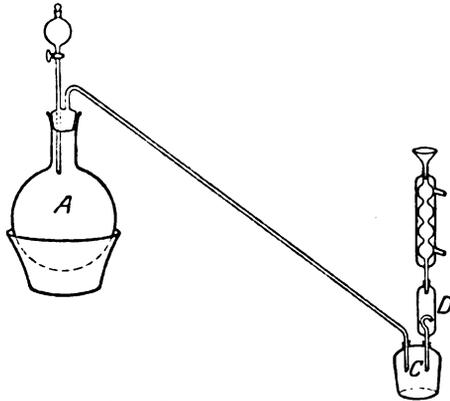


Abb. 1. Zerstörungsapparat Nr. I.

mehr übergang, d. h. alles Fett vollständig zerstört war, was im allgemeinen nach ca. $2\frac{1}{2}$ Stunden der Fall war.

Nun zeigten einzelne Analysen, bei denen die Zerstörung in der eben beschriebenen Weise vorgenommen worden war, daß Teile des angewandten Hg dem Nachweis entgangen waren. Dies konnte u. a. darauf beruhen, daß bei dem wiederholten Zurückgießen der übergegangenen Bestandteile Verluste eingetreten waren; um diese Fehlerquelle auszuschalten, wurde folgender Apparat konstruiert (vgl. Abb. 2).

Die Verkohlung mit H_2SO_4 -Ol. und weitere Behandlung mit HNO_3 fum. wurde so eingeleitet wie vorher beschrieben ist. Die in den aufsteigenden Schenkel des Kühlrohres von etwa 50 cm Länge eintretenden Fettdämpfe kühlten sich hier meist so weit ab, daß sie sich kondensierten und zurückströmten. In der Kugel *C*

kamen sie dann erneut in innige Berührung mit den aufsteigenden heißen HNO_3 -Dämpfen, wodurch ihre Zerstörung fortgesetzt wurde. Der absteigende Teil des Kühlrohres war meist an sich schon so kühl, daß die übergegangenen Teile sich genügend kondensierten, was die Nähe des Kugelkühlers zu dem unteren Abschnitt des absteigenden Rohres begünstigte. Volle Sicherheit gegen Verluste durch Verflüchtigung gab der auf den Sammeltrichter *B* aufgesetzte Kühler, der zugleich auch als Zuflußtrichter für HNO_3 diente, und überdies noch mit Trichter und Glasschälchen oben lose verschlossen wurde. Das Entweichen etwa nicht gekühlter Fett- oder Hg-Dämpfe war durch diese Anordnung mit Sicherheit ausgeschlossen.

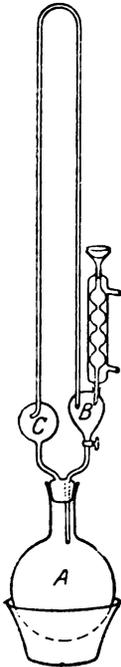


Abb. 2. Zerstörungsapparat Nr. II.

Die sich im Sammeltrichter *B* kondensierende Flüssigkeit wurde von Zeit zu Zeit durch Hahnöffnen in den Kolben zurückgebracht, bis die übergehende Fettmenge sich möglichst verringert hatte, d. h. also nur noch kleine Fetttröpfchen auf der Flüssigkeit im Sammeltrichter schwammen. Dann erhitze man den Kolben so stark, daß möglichst sämtliches Wasser in den Sammeltrichter übergang und ließ den ganzen Apparat vollständig abkühlen. Danach entfernte man den bis auf den Kugelkühler aus einem Stück bestehenden oberen Teil des Apparates vom Kolben und ließ den unteren wässerigen Teil der Kondensflüssigkeit in das zur Elektrolyse bestimmte Gefäß abfließen. Nun setzte man den Apparat wieder zusammen und ließ die Fetteilchen, die zweckmäßig in etwas Äther gelöst werden, in den Kolben zurückfließen, spülte den Trichter mit wenig rauchender Salpetersäure nach und erhitze von neuem den Kolben, worauf (bei Fehlen des Wassers) das Fett sehr bald völlig zerstört war und die Flüssigkeit im Kolben eine klare, hellgelbe Lösung darstellte. Diese Lösung gab man zu dem bereits in das Elektrolysegefäß gegebenen Destillat aus dem Sammeltrichter.

Nach Eingeben von etwa 20—30 ccm Wasser und 0,5 ccm H_2SO_4 wurde der Zerstörungsapparat nochmals kurz erhitzt, um eine Durchspülung des gesamten Apparates vorzunehmen und etwa noch vorhandene Reste gelösten Hg mitzubekommen. Nach

Erkaltenlassen wurde auch diese Flüssigkeit in das Elektrolysegefäß gebracht.

Die saure, klare, hellgelbe Flüssigkeit im Elektrolysegefäß wurde nach völligem Erkalten mit konz. Ammoniak oder 50 proz. Natronlauge abgestumpft¹⁾. Größere Säuremengen sollen aber aus bekannten Gründen in der Elektrolyseflüssigkeit nicht vorhanden sein. Ein Neutralisieren oder gar Alkalisieren muß vermieden werden.

Wie es scheint, bilden sich dann kolloidale Hg-Verbindungen, die auch nach erneutem Ansäuern nicht mehr in echte ionisierte Lösung gehen und dadurch zum Teil der Elektrolyse unzugänglich sind. Wenigstens sprechen einige Beobachtungen für eine solche Vermutung.

Die Flüssigkeit wurde dann auf ein Gesamtvolum von etwa 125—150 ccm gebracht; größere Volumina sind zu vermeiden, da in solchen entsprechend größere Hg-Mengen dem Niederschlag bei der Elektrolyse entgehen können.

b) Elektrolyse.

Die Abscheidung des Hg aus der Aschenlösung erfolgte also stets durch Elektrolyse in schwach saurer Lösung.

Bei den ersten Versuchen wurden Kohlezellen als Anoden und Goldkathoden benutzt; da aber aus der Kohle zu viele störende Verunreinigungen zur Kathode übergingen, ersetzten wir die Kohleanoden durch Platin-Iridiumanoden. Sie bestanden aus einem dicken Draht von ca. 12 ccm Länge aus reinem Platin, der unten eine Platte (1,5 × 0,5 cm) aus Platin-Iridium trug; die Kathoden waren Plättchen aus reinem Golde, von etwa 0,1 g Gewicht (2 cm × 0,2 cm) und waren mit Hilfe kleiner Platinschraubchen an Stromträgern aus reinem Platin befestigt. Diese Stromträger waren oben gehalten von gut vernickelten Klemmen, die zum Schutze gegen die aufsteigenden Säurebläschen gut mit Paraffin überzogen wurden (gelöstes Metall der Klemmen würde die Zuverlässigkeit der Methode verringern). Die Klemmen saßen an einem Metallstativ, an dem sie verschieblich waren.

Als Gefäße wurden zuerst kleine Bechergläser benutzt, dann als zweckmäßiger kurzhalsige Kölbchen aus Jenaer Glas, um Verunreinigung durch Staub usw., sowie zu starke Verdunstung beim Erwärmen auszuschließen.

¹⁾ Hat man viel Säure zur Zerstörung benutzt, so ist 50 proz. NaOH vorzuziehen, um nicht zu große Flüssigkeitsmengen zu erhalten; doch neigt dann die Flüssigkeit infolge der hohen Konzentration leichter zu Krystallisation als bei Anwendung von $\text{NH}_4 \cdot \text{OH}$.

Die Stromspannung betrug 3,5—4 Volt. Als Stromquelle diente ein Akkumulator von 3 oder 4 hintereinandergeschalteten Zellen; der Strom wurde auf 3—4 Elektroden verzweigt, durch Einschaltung von Widerstand die genannte Spannung erzielt und konstant erhalten. Die Temperatur betrug 65—70° C. Die Temperatur ließ sich gut regulieren, indem man die Elektrolysegefäße auf eine mit Asbestauflage versehene gemeinsame Heizplatte stellte, unter der man die Heizquelle beliebig verschieben konnte.

Nun wird aber bei der Spannung von 3,5—4 Volt und der Temperatur von 65—70° nicht bloß Hg abgeschieden, sondern u. a. auch Fe, das nach Smith¹⁾ aus saurer Lösung bei 2—3,5 Volt und 40—65° elektrolitisch quantitativ abgeschieden wird. Daß bei der Elektrolyse der zerstörten Gehirnschubstanz tatsächlich Eisen abgeschieden wurde, haben die Versuche ergeben. Die Lösung des Niederschlags auf der Elektrode zeigte die Fe-Reaktion mit Rhodankalium und die Berlinerblaureaktion. Bei Anwendung von 9,0—10 g Gehirn wurde 0,5 mg und mehr Eisen gefunden. Wir elektrolysierten deshalb bis zur Gewichtskonstanz.

Nach 24stündiger Dauer der Elektrolyse wurde die Gold-elektrode ohne Stromunterbrechung sorgfältig mit reinem H₂O gewaschen, das mehrere Male erneuert wurde.

Der Strom darf nicht unterbrochen werden, damit nicht Teile des Niederschlags durch die anhaftende Säureflüssigkeit wieder gelöst werden. Von einer Waschung mit Alkohol und Äther wurde abgesehen, da solche Waschungen leicht mechanisch Teilchen des Niederschlags entfernen.

Im luftverdünnten Exsiccator, in dem sich gleichzeitig ein offenes Schälchen mit Hg befand, wurde die beladene Goldelektrode ca. 1 Stunde getrocknet und dann auf der analytischen Wage gewogen. Nach dieser ersten Wägung wurde die Elektrode wieder mit dem Strom verbunden und dann in die Flüssigkeit zurückgebracht. Nach ca. 4 Stunden wurde wieder gewogen, stellte sich Zunahme heraus, so mußte weiter elektrolysiert werden, bis Konstanz des Gewichts eintrat, andernfalls schritt man gleich zur Vornahme der genauen Wägung.

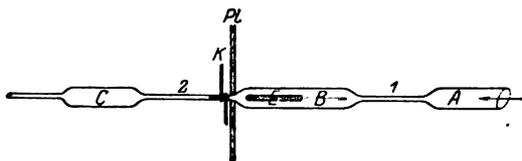
Natürlich kann die Elektrolyse durch Rührung beschleunigt werden, besonders in dem Fall, daß die Elektrolyse bei geringer Spannung (1,5 Volt) und gewöhnlicher Temperatur vorgenommen wird, wie Lomholt sie anwendet. Hat man aber zur Erhaltung einer Temperatur von 65—70° eine Heizung angebracht, so genügt die durch die Erwärmung bewirkte Strömung innerhalb der Flüssigkeit und zeitweises Quirlen mit Glas-

¹⁾ Smith, Quantit. Electrolyse.

rührer, um in der oben angegebenen Zeit zum Ziele zu kommen. Meist war das nahende Ende der Elektrolyse daran zu erkennen, daß die vorher gelbliche Flüssigkeit sich allmählich entfärbte und schließlich farblos war.

c) Wägung.

Wenn die zur Elektrolyse benutzten Elektroden so klein und leicht sind, daß sie auf der Nernstwaage gewogen werden können, geschieht die Wägung, indem man nach der Elektrolyse die gewaschene und kurz getrocknete Elektrode wägt, dann glüht, und nach Entfernung des Hg wieder wägt. Die Differenz gibt das gefundene Hg an. Diese Methode haben Lomholt und Christiansen benutzt und eine Reihe von sehr guten Resultaten damit erzielt, sie bedeutet aber bei nicht tadellos exakter Arbeit immer die Gefahr von Fehlern, sobald sich noch Verunreinigungen von organischen oder flüchtigen Substanzen neben Hg niederschlagen. Da wir nach einer ganzen Anzahl von Vorversuchen die von Lomholt und Christiansen angegebene Konzentrationsfällung (CuSO_4) mit H_2S , die dabei notwendige quantitative Abscheidung und erneute Lösung der Sulfide wenig erfreulich fanden, verzichteten wir darauf und damit auch auf das



E Elektrode, *Pl* Asbestplatte, *K* Kühlfaden. → bezeichnet Richtung des Gas-Stromes.
Abb. 3. Glühcapillare zur Hg-Abscheidung.

kleine Volumen der Elektrolyseflüssigkeit, das allein die Anwendung kleiner Elektroden erlaubt. Wir nahmen daher verhältnismäßig große Elektroden, waren aber dadurch der Möglichkeit beraubt, die direkte Wägung auf der Mikrowaage vorzunehmen und mußten das Quecksilber zwecks Wägung abtrennen.

Die Goldelektrode wurde, nachdem auf der analytischen Waage Konstanz trotz fortgesetzter Elektrolyse festgestellt war, in eine schwer schmelzbare Röhre gebracht, die ausgezogen war, wie Abb. 3 zeigt.

Zuerst wurde *C* und Capillare 2 ausgezogen, dann die Elektrode in *B* eingelegt, schließlich Capillare 1 ausgezogen. Bei *A* wird ein Strom von Luft oder eines indifferenten Gases (H_2) zugeführt, bei *K* ein wassergetränkter Kühlfaden, bei *Pl* eine Asbestplatte angebracht.

Das eintretende Gas wurde gut getrocknet und zunächst einige Zeit ohne Erwärmung in ganz schwachem Strome durchgeleitet. Dann erhitze man erst gelinde, danach stärker bis zum Glühen den Raum von *B*. Dabei muß man so vorgehen, daß man mit

der Flamme schon an der Ansatzstelle der Capillare 1 an *B* beginnt und stets langsam in der Richtung des einströmenden Gases mit der Flamme vorschreitet.

Es muß vermieden werden, daß man zu nahe an die Kühlstelle kommt, da einmal dadurch das Wasser des Kühlfadens erwärmt wird und seinen Zweck nicht mehr erfüllt, dann aber auch das dort bereits zusammengetriebene Hg sich plötzlich völlig verflüchtigen kann, dabei zum Teil aus der Capillare 2 vertrieben, evtl. sogar ganz verjagt wird. Dies zu verhindern, dient die Asbestplatte *Pl*; im äußersten Notfall kann man etwa doch durchgetriebene und im Raume *C* wieder kondensierte Hg-Dämpfe mit gleichem Verfahren in der 3. Capillare wieder zusammenreiben. Die Capillaren, besonders 2, dürfen nicht zu enges Lumen haben, damit ein kondensiertes Quecksilbertröpfchen sie nicht verschließt.

Zum Schlusse, wenn man stärker erhitzt hatte, entfernte man den Brenner, ließ den Gasstrom langsam stärker werden und die Röhre darin erkalten. Dann stellt man den Gasstrom ganz ab, trieb mit möglichst kleiner Flamme langsam (!) von *A* und *C* her kommend etwa noch anderswo als bei *K* befindliches Hg, das man evtl. durch Betrachtung mit Lupe oder Mikroskop entdecken konnte, auf einen möglichst kleinen Raum bei *K* zusammen und schnitt schließlich dieses Stück vorsichtig unter Vermeidung jeden Verlustes ab. Unter dem Mikroskop sah man dann an der Kühlstelle die Hg-Partikelchen in mehr oder weniger großen Tropfen zusammengeflossen. Dies Capillarstück wurde etwa 1 Stunde im Exsiccator bei gleichzeitiger Gegenwart eines Schälchens mit Hg getrocknet, danach auf der Mikrowave gewogen, ausgeglüht und wieder gewogen. Die Differenz ergab die gefundene Menge Quecksilber.

Ich benutzte eine Torsionswaage der Firma Hartmann und Braun in Frankfurt a. M. mit einer Genauigkeit von 0,01 mg.

In einer ganzen Reihe von Versuchen wurden die Elektroden in einseitig zugeschmolzene Röhren, die auf der offenen Seite in eine Capillare ausgezogen waren, gebracht, die bei sonst gleichsinniger Anordnung in elektrischen Öfen erhitzt wurden. Es zeigte sich jedoch, daß beim Erkalten des erhitzten weiten Röhrenteils ein Teil des dampfförmig zurückgebliebenen Hg sich in diesem wieder ansetzte, wodurch die Analyse wertlos wurde. Durchschnittlich wurden nach Kontrollanalysen von einer 5 cm langen und 5 mm weiten Röhre 0,3 mg Hg in Dampfform zurückgehalten.

Um die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der geschilderten Methode zu erproben, wurden folgende Vorversuche angestellt:

Frisch gereinigtes und im Exsiccator getrocknetes Hg wurde in Kapillaren gebracht, die auf der Torsionswaage leer und gefüllt gewogen, dann in dem oben beschriebenen Glühröhrchen sorgfältig geglüht wurden und zwar teilweise in einfachem Luftstrom, teilweise im Wasserstoffstrom. Die aus dem Glühröhrchen geschnittene zweite Kapillare wurde dann in gleicher Weise ebenfalls gewogen.

Die Resultate waren folgende:

Tabelle I.

Nr.	Angew. gefunden		Differenz	Bemerkungen
	mg Hg	mg Hg	mg Hg	
1	4,29	4,26	0,03	im Wasserstoffstrom erhitzt
2	2,12	2,04	0,08	"
3	1,19	1,20	0,01	"
4	4,40	4,41	0,01	"
5	0,50	0,50	0	"
6	0,49	0,48	0,01	"
7	0,14	0,12	0,02	"
8	2,30	2,29	0,01	im Luftstrom erhitzt
9	0,52	0,51	0,01	"
10	0,29	0,29	0	"
11	0,17	0,17	0	"

Auf Grund dieser Resultate hielten wir uns für berechtigt, die Glühmethode als zuverlässig in den Gang der Analyse einzuführen.

Zur Identifizierung des Hg kann man natürlich in bekannter Weise die Reaktion mit Jod unter Bildung der typischen Kristalle des Jodquecksilbers verwenden.

Es muß zugegeben werden, daß die Methode als Ganzes etwas umständlich ist und längere Zeit erfordert. In einer großen Anzahl von Versuchen und Analysen (im Ganzen etwa 200) haben wir die verschiedensten methodischen Modifikationen geprüft, um ein klares Urteil über deren Brauchbarkeit und Zuverlässigkeit gewinnen zu können. Die Nachteile hinsichtlich der Zeit müssen mit in Kauf genommen werden, wo es sich darum handelt, den quantitativen Nachweis von Hg in einem Organ zu führen, wo es bisher mit großer Genauigkeit noch nicht hat festgestellt werden können.

Jedenfalls ist durch die Benutzung des Zerstörungsapparates Nr. 2 der Bedarf an großen Mengen teurer Chemikalien und übermäßig langer Heizdauer gegenüber unseren anfänglichen Versuchen stark reduziert.

Für die Brauchbarkeit der schließlich verwendeten Methode sprechen folgende Analysen:

Tabelle II.

Nr.	Substanz	Zugefügt mg Hg	Gefunden mg Hg	Differenz mg
1	Gehirn + HgCl ₂	5,92	5,88	-0,04
2	"	2,60	2,54	-0,06
3	"	1,50	1,47	-0,03
4	Gehirn + Präparat MAT	0,67	0,60	-0,07
5	"	0,42	0,40	-0,02
6	"	0,26	0,27	+0,01
7	"	0,79	0,75	-0,04
8	"	0,58	0,52	-0,06
9	"	1,58	1,58	0,00
10	"	1,20	1,19	-0,01
11	"	2,60	2,54	-0,06
12	"	2,00	2,00	0,00

2. Teil.

Physiologische Versuche mit Präparat MAT.

Zwecks physiologischer Erprobung des M A T wurde unter Erwärmung eine 20proz. Lösung des Präparates in reinem Olivenöl hergestellt. Diese Lösung hielt sich jedoch nicht bei gewöhnlicher Zimmertemperatur, ein Teil der Verbindung schied sich wieder aus. Nach der 1. Injektion bei Tier Nr. 1 wurde deshalb die Lösung auf einen Gehalt von 10% M A T gebracht, wobei dann 1 ccm 0,1 g M A T also 0,03 g Quecksilber entsprach.

Diese Lösung war bei Körpertemperatur flüssig und blieb auch bei Zimmertemperatur beständig.

Kaninchenversuch 1.

(Vgl. dazu die Zahlenangaben auf Tabelle III.)

5. XI. 1919. 3¹/₂ p. m. Injektion von 1 ccm der 20proz. MAT-lösung unter die Bauchhaut (= 0,06 Hg). Nach der Injektion keine Veränderung im Verhalten des Tieres.

6. XI. 1919. FreBlust gut, Puls 140. An der Injektionsstelle ist eine Verhärtung des Unterhautzellgewebes zu fühlen.

7. XI. 1919. Status idem.

8. XI. 1919. Freßlust hat etwas nachgelassen, Beweglichkeit des Tieres unverändert. Injektion von 2 ccm der 10proz. öligen Tachysanlösung subcutan (obere Bauchgend). Nach der Injektion Tier etwas erregt.

9. bis 10. XI. 1919. Status idem.

11. XI. 1919. Injektion wie 8. XI. Faeces, die bis dahin geformt waren, sind ab 11. XI. dünn, übelriechend.

12. XI. 1919. Tier in seinen Bewegungen gehemmt, Freßlust hat abgenommen. Die Injektionsstellen weisen körnige Infiltrationen auf. Faeces dünn, wässrig, Blutprobe —.

13. XI. 1919. Bewegungen deuten darauf, daß sich das Tier nicht wohl fühlt. Puls ca. 300, Atmung 90, Harn nicht mehr trennbar von den Faeces. 6 $\frac{1}{2}$ p. m. Injektion wie 8. XI. Danach leichte motorische Unruhe, sonst sind die Bewegungen schlaff; intestinale Geräusche werden hörbar.

14. XI. 1919. Tier noch ziemlich beweglich, die Bewegungen aber matt. Nachmittag etwas lebhafter, die hinteren Extremitäten zeigen geringe spastische Symptome.

15. XI. 1919. Tier macht einen kranken Eindruck, Freßlust liegt darnieder, Bewegungen unruhig, dabei gibt das Tier Laute von sich. An der Injektionsstelle vom 14. XI. ist absceßartige Stelle zu fühlen. Puls 240, Atmung 96. Injektion wie 8. XI.

16. XI. 1919. Bewegungen spastisch-ataktisch. Tier sucht immer die dunklen Ecken auf, wo es dann still und scheu sitzen bleibt. Fell sieht ungleichmäßig-struppig aus. Ohren hängen schlaff herunter. Puls 180, Atmung unregelmäßig, ca. 80—90. Mittags gegen 2^h p. m. Exitus.

Tabelle III. Zu Versuch I.

Tag	Injektion MAT mg Hg	Harn- menge ccm	Alb.	im Harn gef. und. Hg mg	Faeces g	Körper- gewicht g	Befinden
5. XI. 19	60	—	—	—	—	2270	normal
6. XI. 19	—	500	—	0,28	30,0	2250	"
7. XI. 19	—	420	—	0,23	25,0	2240	"
8. XI. 19	60	370	—	0,33	20,0	2150	etwas gesteigerte Re- flexerregb.
9. XI. 19	—	290	—	0,67	15,0	2210	keine Veränderung
10. XI. 19	—	390	—	0,51	dünn	2200	"
11. XI. 19	60	300	—	0,52	"	2220	tg. Durchfälle
12. XI. 19	—	360	—	?	"	2150	Bewegungen leicht behindert
13. XI. 19	60	150	leicht +	0,44	"	1900	"
14. XI. 19	—	230	—	0,61	"	1810	Bewegungen matt, spastisch.
15. XI. 19	60	190	leicht +	0,52	"	1740	Motor. Unruhe, krank- hafter Eindruck
16. XI. 19	—	75	leicht +	0,25	"	1690	"
17. XI. 19							†

Sektionsprotokoll von Kaninchen Nr. 1.

An den Injektionsstellen in der Bauchgegend finden sich im Unterhautzellengewebe Reste der orangeroten Injektionsflüssigkeit, und zwar an den frischen Injektionsstellen entschieden mehr als an den älteren. In der Umgebung der betreffenden Stellen findet sich schleimig-sulziges Gewebe, teilweise Höhlenbildung, deren Wände härter sind als die normale Haut. Das Gewebe in der Gegend der Injektionsstellen sowohl wie auch weiter oberhalb nach dem Thorax zu weist Partien mit intensiver Rötung auf (Gefäßneubildung und Injektion).

In der eröffneten Bauchhöhle findet sich mäßig viel blutig-seröse Flüssigkeit. Das Netz ist hyperämisch. Einzelne Darmschlingen sind gebläht, der Inhalt ist bis auf einzelne Stellen im Dickdarm, wo vereinzelte geformte Skybala zu sehen sind, breiig.

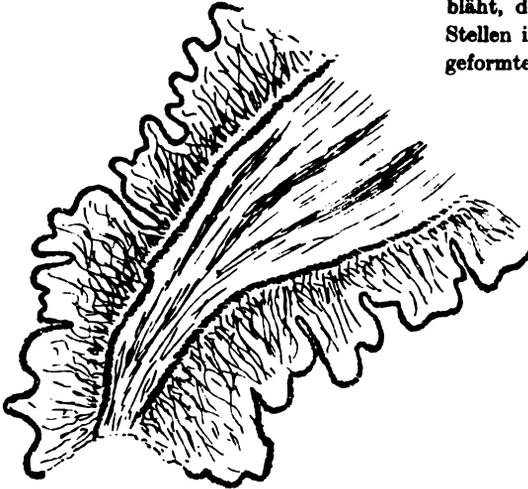


Abb. 4. 1. Defekt in Epithel, Mucosa und Submucosa.

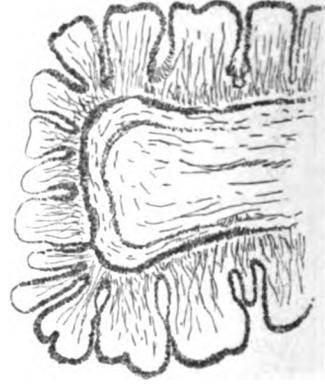


Abb. 5. 2. Defekt in Lam. propr. mucosae und Epithel.

Abb. 4 und 5. Spiralklappe vom Coecum des Kaninchens. (Tier Nr. 1.) † nach 5mal. Injektion von 0,2 MAT (= 5 × 0,06 Hg) subcutan. (Schematische Zeichnungen bei schwacher Vergrößerung.)

Magen normal. In den oberen Abschnitten des Dünndarms zeigen vereinzelte Stellen stärkere Gefäßinjektion, in einem unteren Teile sind solche Stellen häufiger und in größerer Ausdehnung anzutreffen. Vereinzelt sind Drüsen geschwollen, Darmschleimhaut teilweise geschwollen.

Das Coecum weist Veränderungen der Spiralklappe auf. Die Schleimhautoberfläche auf der Höhe der Klappenfalten ist lädiert, vereinzelt verschorft Beläge. Mikroskopisch Defekte in Epithel, Mucosa und Submucosa (vgl. schematisierte Abb. 4 u. 5).

Leber normal. Eine vereinzelte Mesenterialdrüse geschwollen. Lungen intensiv gerötet. Gehirn mäßig hyperämisch.

Außer den lokalen Reizerscheinungen an den Injektionsstellen, der Hyperämie von Netz und Darmabschnitten, Schwellung

der Darmschleimhaut und einer Mesenterialdrüse ist vor allem die Veränderung der Spiralklappe von Bedeutung. Die gefundene Nekrose auf der Höhe der Coecalfalten ist beinahe charakteristisch für Hg-vergiftung (vgl. Justus, J. Rosenbach, Lasarevicz).

Nach E. Kaufmann tritt diese Erscheinung ein, gleichgültig in welcher Form und wie das Quecksilbereinverleibt wird (vgl. ferner darüber Weiler, Elbe).

Abgesehen von dem Sektionsbefund spricht für eine Vergiftung durch Hg die gestörte Harnsekretion (vgl. Kurve Abb. 6).

Nach der 1. Injektion nahm die Harnmenge zu, gleich danach ab, nach

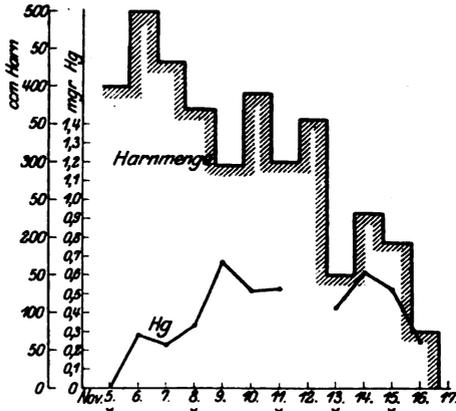
den späteren Injektionen trat ebenfalls kurzer Anstieg der Ausscheidungskurve, dann wieder Absinken ein. Ihre allgemeine Richtung verlief abwärts. Nach Binet kann man diese Abwärtstendenz

als ein Symptom schwerer Hg-vergiftung auffassen; die Urinmenge steigt nach leichter Vergiftung, sie sinkt bei schwerer bis auf 0.

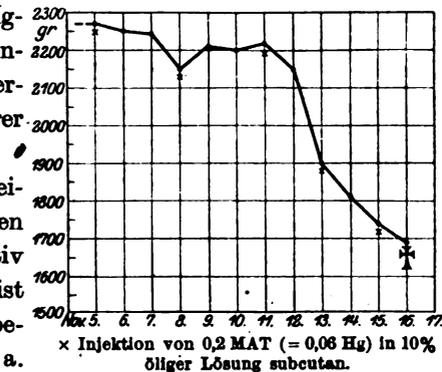
Die Quecksilberausscheidung nahm in den ersten Tagen absolut, nachher auch relativ stark zu. Diese Zunahme ist von Vielen als die Regel bezeichnet worden (vgl. u. a. Welander und Döhring).

Endlich wird eine schwere Intoxikation durch den Gewichtsabsturz (vgl. Kurve Abb. 7) erwiesen.

Die Untersuchungen über die Ausscheidungsverhältnisse in Harn und Faeces des Kaninchens ergaben ein Überwiegen der Quecksilberausscheidung durch die Faeces. Die Faecesportionen



× Injektionstage (je 0,2 g MAT = 0,06 g Hg).
Abb. 6. Hg-Ausscheidungskurve im Harn. (Tier Nr. 1.) Vgl. die gleichseitig ausgeschiedenen Harnmengen.



× Injektion von 0,2 MAT (= 0,06 Hg) in 10% ölliger Lösung subcutan.

Abb. 7. Körpergewichtskurve v. Tier 1.

konnten nur in den ersten Tagen für sich untersucht werden, das Ergebnis dabei war 5,05 mg Hg; nachher waren sie so dünn, daß sie sich mit dem Harn vermengten und daher mit diesem zusammen untersucht wurden. Somit ist also bei den Werten der ab 10. XI. im Harn von Tier 1 gefundenen Hg-mengen teilweise aus den Faeces stammendes Hg miteinbegriffen. Nach dem Tode des Tieres wurde der Rest der noch im Käfig befindlichen Faeces auf Hg untersucht, und es fanden sich darin noch 1,28 mg Hg, so daß im ganzen 6,33 mg Hg in den Faeces nachgewiesen werden konnten, während im Harn (einschl. der aus den beigemengten Faeces stammenden Hg-mengen) nur 4,26 mg Hg gefunden worden sind.

Im übrigen sei darauf hingewiesen, daß die Frage, unter welchen Bedingungen mehr Hg durch Harn oder Faeces ausgeschieden wird, noch nicht hinreichend geklärt ist¹⁾.

Folgende Organe von Tier 1 wurden nach der im 1. Teile der Arbeit beschriebenen Methode auf Hg-gehalt mit dem beigefügten Ergebnis untersucht.

Tabelle IV.

Gehirn (7,5 g)	0,17 mg Hg
Herz (9,0 g)	0,03 „ „
Lunge (12,5 g)	0,12 „ „
Leber (50,0 g)	2,87 „ „
Milz (3,0 g)	0,14 „ „
Galle (4,0 g)	0,08 „ „
Muskulatur (500,0 g)	10,20 „ „
Gewebe an den Injektionsstellen . .	32,38 „ „
Nieren (18,0 g)	2,73 „ „
Harn	4,26 „ „
Faeces	6,33 „ „
<hr/> Gesamtmenge des wiedergefundenen	<hr/> 59,31 mg Hg

Es wurden also alles in allem nur 20% der angewandten Quecksilbermenge wiedergefunden und auch davon noch mehr als die Hälfte an Injektionsstellen. Berücksichtigt man neben diesem Befunde die Tatsache, daß nach allen vorliegenden Versuchen etwa 20 mg Hg in wasserlöslicher Form subkutan als eine Dosis angesehen werden kann, die ein Kaninchen im Laufe einiger

¹⁾ Vgl. darüber Döhring, Bürgi, Winternitz, ferner u. a. die Resultate von Kronfeld, Stein, Riederer, Schneider, Ratner, Lindén.

Tage tötet, so gelangt man zu dem Schlusse, daß das Quecksilber aus dem Präparat M A T nur recht langsam in den Kreislauf der Körpersäfte gelangt.

Kaninchenversuch 2.

7. XI. 1919. Gewicht des Tiers 1800 g. 4^h p. m. Injektion von 2 ccm einer körperwarmen 10proz. MAT-Lösung in Ol. olivar. intraperitoneal (= 0,06 Hg).

Gleich nach der Injektion noch auf dem Versuchstisch streckte das Tier die hinteren Extremitäten lang von sich, zog dieselben aber auf Reiz ruckartig wieder an. Diese Erscheinung ließ sich während 1/2 Stunde dauernd beobachten. Auch sonst Zeichen motorischer Unruhe und erhöhter Erregbarkeit. Das Tier wechselte oft Platz und Stellung, saß bald hockend, bald legte es sich platt hin mit ausgestreckten hinteren Extremitäten; auf jeden Reiz, auch leise Berührung, reagierte es momentan und heftig.

Puls ca. 290. Atmung 64.

Nach 1/2 Stunde ließ die motorische Unruhe etwas nach, vor allem waren die spastischen und paretischen Erscheinungen nicht mehr so ausgesprochen, wohl aber fand sich noch die gesteigerte Reaktion auf Reize, die aber nach einiger Zeit ebenfalls schwächer wurde.

In der Nacht zum 8. XI. Exitus.

Sektionsprotokoll.

Nach Eröffnung der Bauchhöhle zeigt sich das Netz überall mit dem orange gelben Öl der Injektionsflüssigkeit durchsetzt. Außerdem finden sich freie Fetttropfen auf dem Peritoneum wie auch schwimmend auf einem dünnflüssigen leicht sanguinolenten Exsudat von annähernd 10 ccm Menge. Die Oberfläche der Organe wie auch das Netz sind stark injiziert.

[30—40 cm oberhalb der Ileocoecalklappe findet sich eine Invagination des Dünndarms von ungefähr 12—15 cm Länge, das invaginierte Stück ist dunkelviolet gefärbt, das oberhalb sitzende Stück ist auf etwa 20 cm Länge sehr stark injiziert und dunkelrot gefärbt. An vielen Stellen zeigen sich unterhalb der Serosa kleine Blutextravasate, natürlich auch in dem invaginierten Stück. Auch das Coecum zeigt an verschiedenen Stellen, die so gelagert sind, daß sie am frühesten und intensivsten mit dem injizierten MAT-Öl in Berührung kamen, Blutextravasate bis zu Stecknadelkopfgroße. Die große Mesenteriallymphdrüse ist auffallend geschwollen und sowohl auf der Oberfläche wie auch auf dem Durchschnitt abnorm blutig durchsetzt.

Magen stark hyperämisch, Schleimhaut hellbraun, stellenweise auch dunkelrosa gefärbt. — Dünndarmschleimhaut zeigt für eine längere Strecke unterhalb des Magens keine Besonderheiten. Etwa 50 cm unterhalb befindet sich ein Herd mit starker Injektion und capillären Blutungen. Weiter unterhalb Rötung der Schleimhaut, Schwellung von Plaques, dies alles noch weit oberhalb der Invaginationsstelle. Herdweise zeigen sich immer

wieder kleine Blutextravasate. Auch unterhalb der Invagination ist die Darmschleimhaut vielfach abnorm injiziert. In der Nähe der Ileocoecal-klappe ist sie jedoch wieder normal von Aussehen mit Ausnahme der Peyerschen Plaques. Auch die Lymphdrüse an der Valvul. Bauhini ist sehr stark geschwollen. — Dickdarm. Im oberen Teile finden sich keine festen Skybala, sondern nur dünnbreiiger Inhalt. Schleimhaut ist hier von normaler Farbe, nur an einer Stelle, etwa 20 cm unterhalb der Valvula B., kurz vor dem Übergang in den hausternlosen Teil, ist wieder ein Herd abnormer Hyperämie zu sehen.

Caecum: Spiralfalte überall von grauer Farbe, keine Hyperämie, keine Geschwüre, auch nicht auf der übrigen Schleimhaut.

Niere stark hyperämisch, Rinde und Mark wenig verschieden an Färbung; Trübung und Schwellung der Rinde bestehen nicht.

Leber und Lunge: ohne Besonderheiten. Gehirn hyperämisch.

Analysiert wurde nur das Gehirn (7,0 g) mit einem Resultat von 0,27 mg Hg.

Bei diesem Tiere sind besonders die peritonitischen Erscheinungen, die herdweise auftretenden Blutextravasate und Hyperämien in der Bauchhöhle sowie die Invagination in der Ileocoecalgegend bemerkenswert. Dieser Befund sowie das Verhalten des Tieres nach der Injektion sprechen für eine starke lokale Reizwirkung der injizierten Substanz, die sich ja auch im subcutanen Gewebe bei Versuch 1 gezeigt hatte.

Übrigens scheint unter Umständen auch die spezifische Reizung der Darmschleimhaut durch das Quecksilber schlechtweg zur Erzeugung einer Invagination zu genügen; so beschreibt Pauli einen Fall von Invagination bei einem Kaninchen nach Hg-Intoxikation.

Mit größter Wahrscheinlichkeit ist auch der rasche Tod des Tieres nicht auf Quecksilbervergiftung, sondern auf peritonitische Reizung und den Ileus im Besonderen zurückzuführen. Der Vergleich mit Versuch 1 führt zwingend zu diesem Schlusse. Um so mehr ist gerade auch gegenüber den Ergebnissen des Versuchs 1, die eine langsame Aufnahme des Quecksilbers erwiesen, sehr bemerkenswert, daß im Gehirn nach einer Lebensdauer von etwa 12 Stunden schon eine so beträchtliche Menge Hg gefunden wurde. Es darf wohl an die Möglichkeit gedacht werden, daß ein Teil des unzersetzten Präparats M A T infolge seiner Fettlöslichkeit sich als solches im Gehirn abgelagert habe. Die Fähigkeit zur Resorption solcher Substanzen ist ja im Peritoneum unverhältnismäßig viel besser als im subcutanen Gewebe.

Besprechung der Ergebnisse.

Die nach Injektionen von M A T im Gehirn vorgefundenen Quecksilbermengen sind im Verhältnis zu den von andern Untersuchern mitgeteilten Resultaten sehr hoch. Zum Vergleich mögen die Resultate von Riederer, Lomholt und Christiansen, Ludwig und Zillner, Pauli dienen.

Riederer fand bei einem Versuche am Hund nach Anwendung von 2,789 g Calomel per os:

Faeces	2,1175 g HgS = 77% des angew. Hg
Harn	0,0550 g „ = 2% „ „ „
Gehirn, Herz, Lunge, Milz, Pankreas, Hoden, Penis,) Nieren	ca. 800 g 0,0090 g HgS = 2,6 mg Hg pro 100 g = 0,8% d. angew. Hg
Leber (218 g)	0,0140 g „ = 5,7 „ „ „ 100 g = 0,5% „ „ „
Muskeln (2482 g)	0,0114 g „ = 0,4 „ „ „ 100 g = 0,4% „ „ „
	2,2069 g HgS

Die gefundenen 2,2069 g HgS entsprechen 2,2403 g Calomel, es wurden also 80% wiedergefunden, und zwar das meiste (77%) in den Faeces, wovon sicherlich die Hauptmenge nicht gelöst und nicht resorbiert worden war, weiterhin ziemlich viel im Harn (2%); im Gehirn fand sich nur ganz wenig.

Ludwig und Zillner fanden nach Applikation von HgCl₂ per os bei Versuchen am Hunde pro 100,0 Organ mg Hg:

	I. Versuch	II. Versuch	III. Versuch
Gehirn	0	deutl. Spur	unwägb. Menge
Muskel	0,12	0,03	0,14
Leber	1,25	2,15	1,42
beide Nieren	5,6	13,38	9,29
Milz	deutl. Spur	1,54	2,00

Pauli hat am Kaninchen Versuche über Ausscheidung und Verteilung des Hg angestellt und kam zu dem Resultat: „Der Mercur findet sich namentlich in Leber, Pankreas, Lunge, Nieren und Herz, er fehlt fast immer in Gehirn, Rückenmark und Knochen.“

Lomholt und Christiansen haben die Abscheidung in menschlichen Organen untersucht bei 4 Krankheitsfällen, wo die angewandten Mengen Hg unbekannt waren (längere Zeit vorgenommene Injektionen). Sie fanden pro 100 g Organ mg Hg:

Präparat	I. Versuch	II. Versuch	III. Versuch	IV. Versuch
Nieren	6,31	7,00	3,3	1,60
Leber	1,20	3,21	2,45	0,32
Milz	0,60	1,00	0,15	0,43
Herz	0,37	0,3	0,3	0,24
Lunge	0,10	0,57	0,1	0,03
Hirn	0,15	0,17	?	0,10

Bei Kaninchenversuchen fanden dieselben Autoren, nachdem sie verschiedene Hg-Verbindungen intramuskulär injiziert und die Versuchstiere zu bestimmter Zeit getötet hatten, pro 100 g Organ mg Hg:

	I. Versuch	II. Versuch	III. Versuch	IV. Versuch	V. Versuch
Präparat	Hg benz. 2%	Hg benz. 2%	Hg salic. 16%	Calomel. 20%	Ol. ciner.
mg Hg	24,0	37,8	33,5	48,0	154,0
Herz u. Blut.	1,80	0,47	—	1,61	0,89
Lungen . . .	0,75	0,33	0,23	0,25	0,20
Leber	0,77	0,49	1,16	0,37	0,65
Galle	—	0,75	1,67	1,00	1,00
Nieren	3,75	2,20	5,03	2,12	1,75
Muskeln . . .	—	0,14	—	—	—
Hirn	—	0,5	0,75	0,38	0,56
Milz	—	—	—	—	—

Zum Vergleich mit diesen Zahlen sind auf Tabelle V die von mir gefundenen Werte (mg Hg) auf 100 g Organgewicht berechnet. Es zeigt sich, daß die Voraussage erfüllt ist, insofern sich im Gehirn ein Mehrfaches der Quecksilbermengen finden ließ, die in den früheren Versuchen bei Anwendung anderer Präparate nachgewiesen wurden. Allerdings gilt dies nicht nur für das Gehirn allein, sondern auch für andere Organe, vor allem die Muskulatur. Für Leber und Nieren scheinen die von mir ermittelten Werte ebenfalls recht hoch gegenüber den von Lomholt und Christiansen bei Kaninchen angegebenen, weniger gegenüber den in den angeführten Hunderversuchen vorkommenden.

Tabelle V.

Präparat	Kaninchen 1	Kaninchen 2
Herz . . .	0,33	
Lunge . . .	0,96	
Leber . . .	5,74	
Galle . . .	2,00	
Niere . . .	15,17	
Muskel . . .	2,04	
Gehirn . . .	2,27	3,86
Milz	4,67	

Bei sehr chronischen Vergiftungen fand Baldoni in der Leber von Hunden bis 15,6, von Kaninchen bis 15 mg, in den Nieren bis 22 und sogar 47 mg pro 100 g frisches Organ; auch er fand gleichzeitig (freilich in nur einem Versuche) in der Muskulatur kein Quecksilber.

Fraglich muß es natürlich bis auf weiteres bleiben, ob das analytisch ermittelte Hg in unseren Versuchen und denen der

angeführten Autoren in gleicher Form in den Organen vorhanden ist. Wahrscheinlich dürfte sein, daß Hg nach Injektion von M A T wenigstens zum Teil noch in der ursprünglichen organischen Bindung in die Organe wandert. Offenbar besteht die Möglichkeit, daß es erst innerhalb der Organe abgespalten wird.

Trifft diese Annahme zu, so würde also in den Organen selbst, vor allem auch im Zentralnervensystem ein Depot gesetzt werden, aus dem fortwährend wirksames anorganisches Hg gebildet wird. Die „Lipotropie“ der Verbindung bedingt tatsächlich ein Verhalten im Organismus, das gegenüber dem bisher Bekannten neuartig ist. Es darf einstweilen als denkbar betrachtet werden, daß dadurch erweiterte therapeutische Möglichkeiten geschaffen werden könnten.

Freilich dürfte das von mir untersuchte Präparat (M A T) selbst wegen seiner recht erheblichen Reizwirkung für therapeutische Zwecke wenig geeignet sein, doch mag es eine Etappe auf einem Wege bedeuten, der zum Fortschritte führt.

Zusammenfassung.

1. Es wird eine Methode beschrieben, welche die Quecksilberbestimmung im Gehirn unter völliger Mineralisation der Fettsubstanz verlustlos gestattet.

2. Die Untersuchung einer „lipotropen“ Quecksilberverbindung ergibt eine beträchtlich stärkere Aufnahme von Hg im Zentralnervensystem, in der Muskulatur und anderen Organen als nach Zufuhr der gewöhnlichen Quecksilberpräparate.

Literatur.

- Almkvist, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **82**, 221. 1917.
 — Baldoni, Boll. Acc. med. di Roma **31**. 1905. — Binet, Rev. méd. de la suisse rom. 1891. — Blumenthal, Diese Zeitschr. **32**, 59. 1911.
 — Blumenthal, Med. Klin. 1911, S. 1506. — Buchtala, Zeitschr. f. physiol. Chemie **83**, 249. 1913. — Bürgi, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **54**, 439. 1906. — Bürgi, Arch. f. Dermatol. u. Syphilis **79**.
 — Döhring, Arch. f. Dermatol. u. Syphilis **121**. 1915. — Elbe, Virchows Archiv **182**, 445. 1905. — Falkenberg, Virchows Archiv **123**. 1891. — Hofmann, Arch. f. Dermatol. u. Syphilis **105**. 1911. — Jolles Monatshefte f. Chemie **16**, 684. 1895. — Jung u. Schumacher, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **138**, 42. 1899. — Jung u. Schumacher, Zeitschr. f. anal. Chemie 1899, S. 12. — Justus, Citat. lit. Arch. f. Dermatol. u.

Syphilis 75. — Kaufmann, E., Habilitationsschr. Breslau 1888. — Kaufmann, E., Virchows Archiv 15. 1889. — Kaufmann, E., Lehrb. d. Pathol. 1911. — Kionka, Erg. 7. 1902. — Lasarevicz, Inaug.-Diss. Berlin 1879. — Launoy u. Leroux, Compt. rend. de la soc. biol. 54 1483. 1902. — Lehmann, Zeitschr. f. physiol. Chemie 6, 1. — Levi, Inaug.-Diss. Bonn 1889. — Lindén, Arch. f. Dermatol. u. Syphilis 24, 2. Erg.-Heft. — Lomholt u. Christiansen, Diese Zeitschr. 81, 356. 1917. — Lomholt u. Christiansen, Arch. f. Dermatol. u. Syphilis 126. 1918. — Ludwig u. Zillner, Wiener klin. Wochenschr. 1889 u. 1890, Nr. 45, Nr. 28—32. — Merck, J. B. 1914, S. 379. — Pauli, Diss. Greifswald 1874. — Prymers, Inaug.-Diss. Berlin 1870. — Raaschou, Zeitschr. f. anal. Chemie 49, 172. 1910. — Richter, Z. B. 39. 1906. — Riederer, Rep. d. Pharmazie, 17, 267. 1868. — Rosenbach, J., Zeitschr. f. rat. Med. 3, Reihe 33, S. 36. 1861. — Rühl, Dermatol. Wochenschr. 510, 714. 1914. — Schneider, Ber. d. k. Akad. Wien 40, 269. 1860. — Schade, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 1. 1905. — Schöller u. Schrauth, Diese Zeitschr. 33, 383. 1911. — Smith, Quant. Elektrolyse. — Weiler, Virchows Archiv 212, 200. 1913. — Welander, Arch. f. Dermatol. u. Syphilis 82, 163. 1906. — Winternitz, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 25, 225. 1889. — Winternitz, Arch. f. Dermatol. u. Syphilis 1889, S. 783. — XVII. Congrès intern. d. sciences méd. (Ann. de dermatol. et de syph. 1913, Nr. 8, 9 u. 10.)

Über die oligodynamische Wirkung der Metalle.

Von
D. Acél.

(Aus dem hygienischen Institut der Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 21. August 1920.)

Mit der oligodynamischen Wirkung der Metalle befaßte sich seit Nägeli eine ganze Reihe der Autoren.

Die im Jahre 1917 erschienenen Mitteilungen P. Saxls¹⁾ regten eine neue Reihe der Arbeiten an. Einige Autoren nahmen an, daß die Ursache der oligodynamischen Wirkung der Metalle ihre Löslichkeit ist, und daß zum Erreichen dieser Wirkung ganz kleine, chemisch nicht nachweisbare Mengen der Metalle genügen. Saxl akzeptierte diese Ansicht nicht, er erklärte die bakterienvernichtende Fähigkeit der Metalle mit einem sich an der Oberfläche abspielendem Phänomen und nahm eine Fernwirkung der Metalle an.

Auch wir haben die keimtötende Wirkung der Metalle, besonders des Silbers schon vor längerer Zeit untersucht. Die ausführliche Mitteilung unserer Versuche wollen wir hier unterlassen, da diese die bisherigen Erfahrungen bestätigen. So haben wir z. B. festgestellt, daß die keimtötende Wirkung mit der Größe der Oberfläche des Silbers zunimmt (s. dasselbe vom Kupfer zuletzt in einer Mitteilung von A. Streck²⁾); die Silberplatten vermögen ihre keimtötende Wirkung in destilliertem wie in Leitungswasser im Dunkeln sowie bei Licht mit derselben Kraft auszuüben. Mit Silber kann man im Wasser große Mengen Bakterien vernichten, ja, man kann es mit Silber sterilisieren usw.

Die Ursache der keimtötenden Wirkung des Silbers ist dessen Löslichkeit im Wasser. Es gelang uns das auf direktem und indirektem Wege zu beweisen.

Auf direktem Wege so, daß es uns gelang, im Trinkwasser das mit der Silberplatte behandelt war, das Silber nachzuweisen. Der Nachweis des Silbers im Wasser, das durch Silber keimtötend wurde, gelang bisher niemandem. Auch wir konnten es nicht auf dem Wege, wie es bisher die meisten Autoren versuchten, nämlich durch Eindampfen auf ein geringes Volum und Nachweis als Chlorsilber, sondern nur so, daß wir das Wasser,

¹⁾ Wien. klin. Wochenschr. 1917, Nr. 23 u. 31.

²⁾ Hygienische Rundschau 1919, Nr. 20 u. 21.

welches durch Silber bactericid gemacht wurde, in einer weißen Porzellanschale bis zur Trockene verdampften und zum Rückstand einige Tropfen verdünnten Schwefelammoniums gegeben haben. Da entstand am Boden der Porzellanschale eine auf dem weißen Grunde gut sichtbare, mehr oder minder intensive braune resp. braunschwarze Färbung (Silbersulfid). Mit reinem destillierten Wasser genau gleich behandelte Kontrollproben (es wurde auch auf gleiche Qualität der zu den Versuchen dienenden Gefäße geachtet) gaben keinen sich mit Schwefelammonium bräunenden Rückstand.

Diese Färbung allein könnte schon die Anwesenheit von gelöstem Silber genügend beweisen, da die in unseren Versuchen benützten Silberplatten aus chemisch reinem Silber bestanden, und da das benützte destillierte Wasser selbst, wie erwähnt, keine Färbung gab. Der Nachweis des Silbers wurde aber noch sicherer, als es auch gelang, in dem durch Silber bactericid gemachten Wasser — das in einer Porzellanschale gänzlich eingedampft wurde — mit einer verdünnten Lösung von gelbem chromsauren Kali die für Silber charakteristische rötliche Färbung zu erzielen, die deutlich zu erkennen war. In der Kontrollporzellanschale (in der die gleiche Menge des im Versuche benützten und unter ganz gleichen Verhältnissen gehaltenen Wassers eingedampft wurde) war nur die citronengelbe Farbe des verdünnten chromsauren Kalis sichtbar.

Es ist auch gelungen auf indirektem Wege zu beweisen, daß die Ursache der keimtötenden Wirkung das im Wasser gelöste Silber ist. Wenn die bakterienvernichtende Wirkung des Silbers auf dessen Löslichkeit beruht, muß diese Wirkung aufhören, wenn wir das gelöste Silber in eine in Wasser unlösliche Verbindung überführen. Wenn wir also zum Wasser, das mit Silber behandelt wurde, Ammonsulfid geben, entsteht aus dem im Wasser gelösten Silber in Wasser unlösliches (oder mindestens unter den Silberverbindungen am schwersten lösliches) Silbersulfid und somit muß die bactericide Wirkung schwächer werden oder aufhören. Die Einrichtung des Versuches war folgende:

4 gleiche Bechergläser wurden mit je 100 ccm destilliertem Wasser versehen. Im Becherglas Nr. I und II wurden Silberplatten mit 50 qcm Oberfläche gegeben, in Nr. III und IV nichts. Die Gläser standen 48 Stunden lang bei Zimmertemperatur. Nach dieser Zeit wurden die Silberplatten aus dem Glase I und II entfernt. Hierauf wurde in die Gläser II und IV $1\frac{1}{2}$ – $1\frac{1}{2}$ ccm alte, gelbe Ammonsulfidlösung gegossen, gut zusammen-

gemischt, und nach einer halben Stunde wurden alle 4 Gläser mit derselben Menge einer Aufschwemmung von *Bacterium coli* versehen. Zeitweise wurden aus den Gläsern $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{2}$ ccm herausgenommen und mit Agar in Platten gegossen. Nach einem 24stündigen Aufenthalt im Thermostaten (bei 37°) wurden die gewachsenen Kolonien gezählt.

Becherglas Nr. I zeigte, wie das mit Silber behandelte Wasser und Glas die Bakterien vernichten kann.

Becherglas II zeigte, ob man die Wirkung des Silbers dadurch aufheben kann, daß man Ammonsulfid dazugibt.

Becherglas III zeigte die Wirkung des nicht behandelten, destillierten Wassers, und

Becherglas IV, ob die im Glase II vorhandene Ammonsulfidlösung die Bakterien nicht etwa selbst tötet.

Ist unsere vorher angeführte Voraussetzung richtig, so muß das Resultat zeigen, daß nur im Glase I Bakterientötung stattgefunden hat. Das Resultat hat die Voraussetzung vollkommen bestätigt:

	Mit Silber behandeltes Wasser	Mit Silber behandeltes Wasser + Ammon- sulfid	Nicht behandeltes Wasser	Nicht be- handeltes Wasser + Ammon- sulfid
enthielt Colibakterien in 0,5 ccm				
Gleich nach Zugabe der Coli- bacillen	∞	∞	∞	∞
1 $\frac{1}{2}$ Std. nach Zugabe der Coli- bacillen	945	∞	∞	∞
3 Stdn. nach Zugabe der Coli- bacillen	128	∞	∞	∞
8 Stdn. nach Zugabe der Coli- bazillen	keine	∞	∞	∞

Ein ganz gleicher Versuch, der nur darin vom vorigen abweicht, daß die Oberfläche der Silberplatten 70 qcm betrug und die Menge des Wassers 50 ccm, ergab folgendes Resultat:

	Mit Silber behandeltes Wasser	Mit Silber behandeltes Wasser + Ammon- sulfid	Nicht behandeltes Wasser	Nicht be- handeltes Wasser + Ammon- sulfid
enthielt Colibakterien in 0,5 ccm				
Gleich nach Zugabe der Coli- bacillen	∞	∞	∞	∞
1 $\frac{1}{2}$ Std. nach Zugabe der Coli- bacillen	200	∞	∞	∞
3 Stdn. nach Zugabe der Coli- bacillen	140	∞	∞	∞
6 Stdn. nach Zugabe der Coli- bacillen	56	∞	∞	∞
8 Stdn. nach Zugabe der Coli- bacillen	keine	∞	∞	∞

Neuere Versuche von Bechhold¹⁾ beweisen auch, daß die Bakterientötung durch die in Lösung übergegangenen Teile des Silbers verursacht wird.

Er ging von der Überlegung aus, daß, wenn die Ursache der Bakterientötung wirklich die Löslichkeit der Metalle ist, die unlöslichen, oder besser schwerlöslichen Silbersalze im Verhältnisse ihrer Schwerlöslichkeit auf Bakterien wirken müssen. So müssen z. B. das Silberoxalat oder Silberoxyd gemäß ihrer besseren Löslichkeit stärker wirken als das Silberchlorid, und dieses wieder stärker als das Silbersulfid.

Er bestrich kleine, kreisförmige Filterpapierstücke mit verschiedenen Silbersalzen und legte diese auf mit Staphylokokken beimpfte Agarplatten. Nach gewisser Zeit beobachtete er, daß die mit den Silberverbindungen bestrichenen Papierscheibchen ein bakterienfreier Hof umgab. Dieser sterile, bakterienfreie Hof war aber größer dort, wo auf dem Filter eine besserlösliche Silberverbindung aufgestrichen war. So war z. B. um das mit Silbersulfid (als der am wenigsten löslichen Silberverbindung) bestrichene Papier gar kein bakterienfreier Hof, während um das besserlösliche Silberchlorid in einem Versuche ein 10 mm breiter, und um das noch besser lösliche Silberoxyd ein 16,4 mm breiter steriler Hof zu sehen war.

Zusammenfassung.

Es ist uns gelungen, sowohl auf direktem Wege (Nachweis des in Wasser gelösten Silbers) als auch auf indirektem (Ausschalten der Wirkung des Silbers) zu beweisen, daß die Ursache der keimtötenden Wirkung des metallischen Silbers im Wasser keine mystische Fernwirkung, oder ein an der Oberfläche des Metalls sich abspielendes Phänomen ist, sondern ganz einfach an dessen Löslichkeit im Wasser liegt. Die Schlußfolgerungen Bechholds, zu denen er auf anderem Wege gelangt ist, werden also vollinhaltlich bestätigt. Das uns soeben zugekommene Juniheft (Bd. 106) dieser Zeitschrift bringt eine Arbeit von R. Doerr über denselben Gegenstand, die mit unseren Erfahrungen im wesentlichen ebenfalls übereinstimmt. Den von Doerr geforderten endgültigen Beweis dafür, daß die Wirkung des durch Silberkontakt bactericid gewordenen Wassers einer gelösten Silberverbindung zuzuschreiben ist, glauben wir nunmehr einwandfrei erbracht zu haben.

¹⁾ Kolloid-Zeitschr. 25, H. 4. 1919.

Über das Vorkommen von Phosphaten im menschlichen Blutserum. XII.

Die P-Verteilung, nach den derzeitigen Methoden zur Trennung
und Isolierung. Neue Ergebnisse.

Von
Joh. Feigl.

(Aus dem Chemisch-Pathologischen Laboratorium des Allgemeinen Krankenhauses Hamburg-Barmbeck.)

(Eingegangen am 8. September 1920.)

Die neuen Arbeiten über Phosphorverteilung im Blutserum haben eingehendes Studium an den Bestimmungsmethoden der O-Phosphorsäure herausgefordert. Sie sind in dieser Hinsicht, z. T. schöpfend, z. T. sichtlich und präzisierend von Erfolg gewesen.

Die Bestimmungsmethoden selbst sind in allerletzter Zeit, vornehmlich durch Feigl¹⁾ und Kleinmann²⁾, systematisch und zusammenfassend bearbeitet worden. Vergleichende Beurteilung führte auch dazu, für entsprechende Bereiche in den Maßstäben das eine oder andere Prinzip in den Vordergrund zu stellen. Mariott (und Mitarbeiter) haben vorher³⁾, Meigs⁴⁾ sowie Bloor⁵⁾ haben nachher Beiträge geliefert, die der Sache gute Förderung angedeihen ließen. Jones⁶⁾ sowie Greenwald⁷⁾, auf dessen Bemühungen zum guten Teile die heutigen Erträge zurückzuführen

¹⁾ Joh. Feigl Phosphate. VII. Diese Zeitschr. 1918, S. 92, speziell ab S. 30 (4. Juli), daselbst Literatur.

²⁾ H. Kleinmann, Diss. Berlin 1919. Diese Zeitschr. 1919, S. 99, H. 1—6, daselbst vollständige Literatur.

³⁾ W. McKim Mariott (mit Haessler und Howland), Journ. of Biolog. Chem. **18**; **24**. 1916.

⁴⁾ E. B. Meigs und N. R. Blatherwick, Journ. of Biolog. Chem. **33**, **4**. 1918. — Journ. of Biolog. Chem. **36**, 335. 1918.

⁵⁾ W. R. Bloor, Journ. of Biolog. Chem. **36**, 33. 1918. Daselbst weitere (ältere) Literatur.

⁶⁾ W. Jones, Journ. of Biolog. Chem. **25**, 87. 1916.

⁷⁾ J. Greenwald, Journ. of Biolog. Chem. **25**, 431. 1916.

sind, weil sie in jenen den Ausgangspunkt zum weiteren Vordringen fanden, haben gleichfalls die Möglichkeiten der Bestimmung unter verschiedenen Verhältnissen bereichert. Noch am wenigsten nutzbar gemacht ist das von Mariott (mit Haessler und Howland) aufgefundene und durchgebildete Prinzip, über das zur Zeit kein vergleichendes (analytisches) Material zur Hand ist, wenschon die Ergebnisse in entsprechender Gegenüberstellung von Feigl¹⁾ wie von Bloor²⁾ diskutiert wurden. An erste Stelle hat sich das nephelometrische Prinzip (P. Mo-Strychnin-komplex) zu setzen vermocht. Es ist, namentlich durch mühevollen Studien Kleinmanns³⁾, dem später Bloor⁴⁾ noch folgte und durch frühere, mehrjährige Arbeiten amerikanischer Forscher auf einen Grad hoher Exaktheit gehoben worden⁵⁾. Man kennt zur Zeit die Reaktionsbedingungen, übersieht die Abgrenzungen und Störungen und kann sich auf eine exorbitant hohe Empfindlichkeit stützen, die gerade in unserem Arbeitsgebiete entscheidend ist. Man darf sagen, daß dieses Prinzip bisher der allein gangbare Weg der Arbeit in kleinem Maßstabe geblieben ist. Kleinmann hat indes andere Methoden ähnlicher Tauglichkeit teils neu geschaffen (Mo-Ferrocyankalium), teils revidiert, teils exakt ausgearbeitet und für bestimmte Anforderungen zugeschnitten⁶⁾. Es ist also denkbar, mit steigenden Mengen von Ausgangsmaterial das so vorzügliche nephelometrische Prinzip zugunsten anderer zu verlassen. Immerhin ist eben dieses in mehr als einem Sinn unbedingt an die Spitze zu stellen. Seine Betätigung, gänzlich abhängig von der Theorie und Technik nephelometrischer Apparatur, ist durch das neue Instrument⁷⁾ (Feigl-Kleinmann, bei Schmidt und Haensch) zu voller Sicherheit gehoben worden. Möglich scheint nun andererseits, daß der P. Mo-Strychninkomplex zu anderen Anwendungsformen herangezogen werden könne.

Soweit handelt es sich um die analytischen Bestimmungsprinzipien an sich! Sie sind nun naturgemäß nicht allein maßgebend, sondern das System der P-Verteilung bedient sich ihrer aus maßstäblichen Rücksichten. Prinzipiell beherrscht wird es von den Eingriffen, welche Fraktionierung und Isolierung anstreben.

¹⁾ Joh. Feigl, diese Zeitschr. 81, 380. 1917; 83, 81. 1917 und fernere Mitteilungen (s. u.).

²⁾ W. R. Bloor, l. c. ⁵⁾ Einleitung zu Mitt. 2. (Verteilung im Blute), S. 55 ff.

³⁾ l. c. ²⁾ bes. ab. S. 114ff., daselbst vollständige Literatur und Kritik.

⁴⁾ l. c. ⁵⁾ hat unabhängig von Kl. das Reagens neu bearbeitet.

⁵⁾ l. c. ²⁾ s. S. 31, Übersicht bei H. Kleinmann (s. auch Bloor); Joh. Feigl (Phosphate X), diese Zeitschr. 102, 132. 1920 (Nephelometrie und Mikro-Bang).

⁶⁾ l. c. ²⁾ s. S. 27, speziell S. 72ff.; Joh. Feigl, Zentralbl. f. inn. Med. 1920, H. 2.

⁷⁾ l. c. ²⁾ s. S. 27, H. Kleinmann (unter Leitung von Feigl), diese Zeitschr. 99, 115ff. 1919 (s. auch unten).

Die schon genannten Autoren [Greenwald¹⁾ 1915, 1916; Feigl 1915—1920²⁾; Bloor 1915—1920; Mariott u. Mitarb. 1916³⁾] haben hier ergiebig gearbeitet. Feigl hat vergleichende Studien angestellt und dabei eine ziemlich eindringliche Übersicht gegeben; Bloor ist ihm, zum Teil auf anderer Basis, mit schönen Neuerträgen gefolgt. Feigls Vergleichsstudien (1918) haben mancher interessanten Aufklärung die Wege gebahnt, indes sind inzwischen neue Gesichtspunkte aufgetaucht. An Hand dieser ist es geboten, den isolierenden und fraktionierenden Teil der einschlägigen Methodik durchzuarbeiten in einem Grade, der tunlichst dem Ertrage über die Bestimmungsmethoden nicht nachsteht. Man gelangt bei diesem Vorgehen indes in weit schwierigere Verhältnisse.

Es möge daher zunächst, an bisherige Darlegungen anknüpfend und aus ihnen entwickelt, bzw. diese an nötigen Stellen ergänzend, eine Übersicht über die einschlägigen Vorschriften und Erträge folgen, wobei auch noch formalanalytische Begriffe zu berücksichtigen sind.

A. Der älteste Weg, dessen wir auch heute noch bedürfen [moderne, in den derzeitigen Stand gehörige Resultate finden sich bei Greenwald⁴⁾, Feigl⁵⁾, Bloor⁶⁾] ist die Veraschung von Totalserum (Blutkörperchen), sei es nun, daß diese trocken oder auf nassem Wege (z. B. nach Neumann) bewirkt würde. Systematische Blutanalysen der älteren Perioden sind auf diesem Wege vorgegangen; einzelne der ziemlich reichlichen Resultate mögen heute noch von Nutzen sein. Der so ermittelte Gesamt-P spielt in den derzeitigen Forschungen als analytische Kontrollgröße eine wichtige Rolle⁷⁾.

¹⁾ J. Greenwald, Journ. of Biolog. Chem. **21**, 29. 1915. Dazu ebenda **14**, 369. 1913; ferner Amer. Journ. of the med. sciences **147**, 225. 1914, sowie Soc. exp. biol. med. 1915, Jan. Proc. **12**, 71. 1915; ferner Journ. of Biolog. Chem. **26**, 431. 1916.

²⁾ Joh. Feigl, diese Zeitschr. **92**, 1—30. 1918, sowie Tab. 1—XIII, und S. 50 ff. und Schlußsätze; ebendort Angaben über ältere Arbeiten. Ferner Derselbe (Phosphate VIII), diese Zeitschr. **94**, 293. 1919; ferner (Phosphate IX), ebenda S. 304. Bei Beendigung beider Arbeiten (Schluß 1918) lag dem Verf. die Arbeit von W. R. Bloor (Journ. of Biolog. Chem. **36**. 1918, Oktoberheft) nicht vor. Vgl. Schlußsatz S. 303.

³⁾ W. R. McKim Mariott (und Mitarbeiter), l. c.

⁴⁾ l. c.

⁵⁾ l. c.

⁶⁾ W. R. Bloor, l. c. (1918). — Gesamt-P (Vollblut), S. 35; (Plasma) ebenda S. 36; (Körperchen) ebenda 37. Ferner l. c. ¹⁾ s. S. 33 Feigl (Phosphate IX).

⁷⁾ Siehe auch E. B. Meigs, N. R. Blatherwick, C. A. Cary, Journ. of Biolog. Chem. **37**, 5ff. 1918; daselbst genaue Vorschrift der Autoren, daselbst Literatur.

B. An zweite Stelle wird man setzen müssen die einseitige, auf Ausschaltung des P in phosphatidischer Bindung (P, löslich in wasserfreien Solventien) zielende Fraktionierung, die den hinterbleibenden Rest mineralisiert. Gelingt die Isolierung des lipoidischen P streng, so hinterbleibt [Greenwald, Feigl, Bloor¹⁾] trotzdem ein komplexes Gemenge. Zweifellos haben nahezu alle älteren Versuche an dem Punkte Schiffbruch gelitten, daß Alkohol usw. nichtlipoidischen P mitriß. Dieses Mitreißen mag, was man aus Ergebnissen der Literatur vergleichend-kritisch abnehmen kann, den Lipoidanteil relativ wenig beeinflußt haben, während jedoch der abzutrennende mehr oder minder, bis zur Entwertung der Zahlen, falsch erfaßt werden kann. Ein striktes Durcharbeiten stößt jedenfalls auf Schwierigkeiten der verschiedensten Art, da es andererseits möglich ist, daß lipoidisches P abgesprengt und in die fragliche Fraktion (fälschlich) hineinverwiesen werden kann. Anläufe bzw. kritische Bemühungen, mit Ätheralkohol den nichtlipoidischen P intakt zu lassen, dabei den Phosphatid-P voll zu erfassen, sind in analytischen Maßstäben (besonders mikrotechnischer Artung) erst bei Bloor zu finden²⁾. An dieser Stelle setzten Feigls Vergleichsuntersuchungen ein, die der Gegenwertung der Erträge anderer Prinzipien bedurften³⁾. Theoretisch ist es möglich, einen Rückstand, der frei von lipoidischem P ist, in (leicht) saurem Medium hinsichtlich des „säurelöslichen“ zu erschöpfen⁴⁾. Dabei sind hydrolytische Absprengungen von nichtlipoidischem, komplexem (kolloidem) P an sich möglich, während gleichzeitig der Auszug auch krystalloide, nicht o-phosphatartige P-Stoffe einschließen kann⁵⁾. Das skizzierte Prinzip der speziell dem lipoidischen P zugeordneten Fraktionierung ist daher zumeist nur als Vorstufe weiterer (nötiger) Aufteilung anzusehen. Einschlägige Resultate (analytischer Maßstäbe) stammen von Feigl⁶⁾.

Ein bisher wohl noch nicht beschrittener Weg, den geschilderten Gang mit einer weiteren Aufteilung zu kombinieren, bietet sich in dem von Piette und Vila (1920) beschriebenen Verfahren dar⁷⁾. Es zielt auf eine „lückenlose“ Gliederung und „Totalfraktionierung“ der Serumstoffe, kann jedoch nur mit einem größeren Maßstabe (als unsere ana-

¹⁾ l. c.

²⁾ W. R. Bloor (System), Journ. of Biol. Chem. **26**, 577. 1916 (Literatur); 1918, l. c.

³⁾ Joh. Feigl, diese Zeitschr. 1918 (Lipämiearbeiten, II. u. a.). Ferner Derselbe, Cholesterinämie I. Zeitschr. f. d. ges. experim. Med. **178**, XI. 1920. Man hat (Cholesterin) die nicht völligen Erträge gegen den Extraktionsmodus eingewandt (Myers und Wardell u. a.). Vergleichsstudien bei Joh. Feigl, l. c. (Phosphate VII), s. u.

⁴⁾ Bloor (1918); Feigl (1919, Phosphate VIII).

⁵⁾ Von Feigl bereits betont.

⁶⁾ l. c.

⁷⁾ M. Piette und A. Vila, Compt. rend. hebdomadaire des séances de l'Acad. **170**, 24, 1466. 1920. Zentralbl. f. Physiol. (ref. Feigl 1920).

lytischen Methoden ihn bieten) betätigt werden. Wir haben hier auf den ersten Blick ein neues Sonderverfahren, bei genauer Bewertung jedoch eine Modifikation für die generelle Technik unserer Gruppe vor uns.

Die Autoren neutralisieren zunächst Serum sorgfältig unter Tüpfeln, dabei wird eine „Demineralisation“ der festen Stoffe erzielt bzw. angebahnt. Wird ein so neutralisiertes Serum mit Aceton gefällt, so koagulieren (vorübergehend) die Proteine, während Aceton die Lipoide und Fette (daneben die Salze) aufnimmt. Dieses Extrakt wird in vac. getrocknet und dann lipoidfrei gemacht, so daß die „Salze“ hinterbleiben. Bei der Natur der Sache darf von sehr schonenden Arbeitsbedingungen gesprochen werden, von der Notwendigkeit oder dem Nutzen, den die Betätigung dieses Verfahrens als Kontrollmöglichkeit bieten kann, endlich sogar von der Wahrscheinlichkeit, auch bei anderen Objekten (Organmaterial als feine Breie) damit vom Flecke zu kommen. Indes sind im einzelnen nicht alle Bedenken behoben (Lecithalbumine, Reste von lipoidischem P im Rückstand, evtl. Übertritt von organischem P oder Phosphorylen [krystalloidsch] in den Acetonextrakt).

Naturgemäß kann das analytische Vorgehen der Gruppe (B), welches darauf hinzielt, die in nichtwässrigen Solventien löslichen P-Körper exakt zu bestimmen, wie gesagt, auch dazu dienstbar gemacht werden, sie von den P-Körpern, welche unter diesen Bedingungen nicht löslich sind (oder werden), gewissermaßen präperativ, zu trennen. Während erstere Aufgabe (Technik Bloors als Typ) einfach genannt werden darf, ist die zweite das keineswegs, da Komplikationen (s. oben) möglich sind. Solche wechseln mit der Länge des Arbeitsvorganges, welcher das Gleichgewicht verschiebt, Hydrolysen einleiten kann u. a. m. Sonderverhältnisse in der Gruppe (B) müssen einmal zu fraktionierender Extraktion anregen. In analytischen Bedingungen hat J. Bang bei seinem Mikrosystem des Lipämiegebietes dieses Vorgehen aufgegriffen und durchgebildet¹⁾. Nähere Kenntnis des an sich guten Ganges fehlt uns derzeit noch. Es darf auch als sehr diffizil gelten, systematisch die P-Verteilung auf dieser Basis sicherzustellen²⁾. Was die Bestimmung angeht, so hat Feigl³⁾ gezeigt, daß sowohl das Instrument wie auch die Technik der P-Mo-Strychninnephelometrie hier maßstäblich durchaus hinreichen³⁾. Die Fraktionierung nach Bang trennt die in nichtwässrigen Solventien löslichen Stoffe zweistufig (Petroläther; Alkohol, der den lipoidischen P erfaßt). Ferner kann es möglich sein, daß man darauf ausgeht, die Phosphatidfraktion als solche durch Abstufung der Lösungsmittel aufzuteilen. Fortgesetzte Studien über pathologische Lecithinämie (Feigl) haben ergeben, daß man Abweichungen im Verhältnis N : P : Fettsäuren nach spezifischen Löslichkeitsbedingungen analytisch (grob) trennen

¹⁾ J. Bang, diese Zeitschr. **91**, 86, 235. 1918, und unsere derzeitigen Mitteilungen.

²⁾ Versuche des Verf.

³⁾ Joh. Feigl (Phosphate X), diese Zeitschr. **102**, 132. 1920; sowie Zentralbl. f. inn. Med. 1920, H. 2.

kann¹⁾. (System der Lipoidstudien von S. Fraenkel u. a.). Auch die Gegenwertung (P; Oxydationsmethodik Bangs) bietet hier Aufschlüsse²⁾.

So eröffnet uns Gruppe B eine Möglichkeit weiteren Eindringens, indem sie den lipoidischen P bestimmter orientierbar machen kann.

Das Prinzip der Arbeit nach B ist eine Fraktionierung einseitiger Natur. Komplex bleibt der — nach obigem als lipoidfrei gewinnbar geltende — Rückstand. Er enthält (wasserlösliche wie säurelösliche) zum Teil anorganische, zum Teil organische P-Stoffe, aber ferner solche, die P komplex in kolloider Bindung enthalten. Der Rückstand soll bei idealer Fraktionierung enthalten die Phosphate (o-), den kristalloiden Rest — P (Feigl 1917), der bei Bloor (1918) als „otherforms“ (of P-substances) erscheint, ferner den Protein-P (Greenwald, Feigl), der auch andere P-Komplexe einschließen kann (Feigl) (s. unten). In gewissen Fällen muß die Aufteilung der P-Stoffe sich auf den Weg der Gruppe B stützen; es ist aber möglich, die nichtwässerigen Lösungsmittel an anderen Stufen einzusetzen, welche den schwierigen Vorgang der Aufteilung des nichtphosphatidischen Restes bedeutend erleichtern. Diese Verbindung wurde zuerst von Feigl erstrebt und durchgeführt³⁾.

C. Als ungemein fruchtbar auch für andere analytische Aufgaben hat sich das von J. Greenwald eingeführte [1913, 1915⁴⁾], weitergebildete [1919⁵⁾] und von zahlreichen Autoren (s. unten) übernommene⁶⁾

¹⁾ Joh. Feigl (Lecithinämie), diese Zeitschr. **90**, 361. 1918. Derselbe (Lipämie III), diese Zeitschr. **90**, 1. 1918.

²⁾ l. c. ¹⁾ s. S. 33. Destruktiv auftretende Hyperlecithinämie (Peritz Bornstein, Feigl) zeigt eine andere Gliederung (bei Tabes), als alimentäre u. ä.

³⁾ Joh. Feigl, l. c. (Phosphate VIII), suchte zuerst völlig den lipoiden P der Fällung zu entfernen; dem folgte leichte Hydrolyse.

⁴⁾ l. c. (Phosphate VII). Gewisse pathochemische Fälle werden erst durch dieses Vorgehen klar dargestellt, während andere durch die Belastung mit proteinoidem (besser überhaupt: fällbarem) P nicht durchaus zutreffend analysierbar sind.

⁵⁾ J. Greenwald, Journ. of Biolog. Chem. **38**, 439. 1919. Durch Variation der Essigsäure (gegen HCl, HNO₃ u. ä.) kann man ausgezeichnete (was Feigl bestätigt) anorganische Blutanalysen erzielen. Greenwald hat K, Na, Ca u. a. bestimmt. Derselbe, Journ. of pharmacol. a. exp. therapeut. **11**, 281. 1918, sowie ebenda **7**, 37. 1915.

⁶⁾ Phosphate bestimmten (außer Feigl) l. c. R. M. Chapin und W. C. Powick, Journ. of Biolog. Chem. **20**, 97. 1915 (Organe); E. B. Meigs, R. N. Blatherwick, C. A. Cary, Journ. of Biolog. Chem. **39**, 1. 1919; Chloride bestimmen D. D. van Slyke und J. J. Donleavy, Journ. of Biolog. Chem. **37**, 551. 1919. In dieser Arbeit wird die Technik (McLean und van Slyke 1915) ersetzt. Sie bestand in der vorzüglichen Bang-Larssonschen Kohle-Heißkongulationsmethode. Calcium bestimmten J. O. Halverson und O. Bergeim, Journ. of Biolog. Chem. **32**, 159. 1917. Verf. (F.) hat sich bereits aller Verfahren mit bestem Erfolge

Prinzip erwiesen, welches in schwachsauren, wässerigen Lösungen arbeitet. Es fraktioniert bereits wirksamer, schafft zwei große Gruppen, deren Einzelgliedern leichter „beizukommen“ ist und, speziell auch der Lecithinämie größte Dienste leistete [Feigl¹⁾]. Greenwald fand, daß Protein in Pikrinessigsäure quantitativ fälle und den (kolloiden) „lipoidischen P“ mitreißt. Man erhält klare Filtrate, welche den kristalloiden „säurelöslichen P“ quantitativ enthalten. Eingehende Arbeiten mit diesem Trennungsgange führten Feigl, Greenwald, Bloor zur erfolgreichen Aufklärung der kristalloiden Fraktion. Die Arbeit blieb an die Nephelometrie gebunden (s. oben). Greenwald selbst sagte, daß der Niederschlag den „lipoidischen P ganz“ neben sehr geringen Zuschüssen an proteingebundenem P (vorausgesetzt) enthalte. Feigl zeigte, daß man mit dieserart erzielten Werten für „Lecithin“ gute Fortschritte machen könne, weil inzwischen die pathochemische Variabilität der kristalloiden Fraktion erwiesen worden war²⁾ und der Einfluß auf sonstige „Lecithinzahlen“ sich erhärten ließ. Derselbe Autor gelangte (1919) zu festen Zahlenverhältnissen über den proteingebundenen P, indem er den unter B skizzierten, kombinierten Gang auf Grund von Greenwalds Prinzip in Anwendung brachte. Er fand auch (1918), daß man andere fällbare P-Stoffe neben beiden kolloiden Typen unter Umständen anzunehmen habe. Das sei erst in der Gegenwertung der Methoden erörtert. Überhaupt soll hier unter C die Fraktionierung oder weitere analytische Arbeit an den Greenwaldfraktionen nicht zur Darstellung kommen. Diese wurden zunächst als solche rein gewonnen, dann „mineralisiert“ und der P nach obigen formalen Begriffen berechnet und verwertet. Greenwald selbst und die auf seinem Vorgehen weiterbauenden Forscher haben den Komplexcharakter beider Begriffe von allem Anfange her im Auge gehabt. Die schon früher mehrfach beschriebene Technik nach Greenwald ist später, durch Bloor wie durch Feigl relativ abgeändert bzw. umgeformt worden, wobei aber das Prinzip strikte erhalten blieb.

Zunächst kehrte also die Arbeit nach Gruppe C zu der nach Gruppe A zurück, indem jeweils der Total-P beider Fraktionen bestimmt wurde. Die Technik ist eingehend beschrieben³⁾. Bloors Arbeitsweise (1918) sei hier erwähnt⁴⁾.

bedient. Für Ca hat man die Wahl, da auch H. Lyman's Trichloressigsäure ähnlich gute Dienste leistet. Dies Reagens ist von französischen Autoren (Dugardin u. a.) für Chlorion empfohlen worden. Nach Verf. (F.) ist das eine Unsicherheit bringende, unnötige Komplikation gegen obige Technik.

¹⁾ Vgl. Note 5 auf S. 32.

²⁾ l. c. Joh. Feigl Phosphate I d. Zeitschr. 81, 380. 1917. Vortrag ärztl. Verein Hamburg 2. V. u. a. ferner (Phosphate XI. Hyperphosphatämie und Salzretention bei Morbus Brightii) d. Zeitschr. 1920. nach Ergebnissen von 1916, 1917.

³⁾ Joh. Feigl (Phosphate VII) l. c., S. 15ff., 21ff.

⁴⁾ Die 1918 (Oktober) in Amerika erschienene Arbeit Bloors ist in Deutschland kaum referiert worden. Es sind die wichtigsten Einzelheiten

Wir haben es bei der Fraktionierung in wässrig-saurer Lösung mit einer Enteiweißung zu tun, die die organischen Komponenten (s. oben), aber auch Zucker, RN usw. quantitativ ins Filtrat überführt, dabei keine nachweisbaren Spuren Protein in Lösung hält, was jüngst noch Bloor¹⁾ als gute Leistung der Technik hervorhebt. Naturgemäß hat man — zunächst offenbar vom Standpunkte der ins Filtrat gehenden Stoffe (s. oben) aus, das Enteiweißungsmittel variiert. Feigl hat solche Versuche angestellt, auch hinsichtlich der P-Verteilung, mit Trichloressigsäure. Er hat später mit sauren Neutralsalzlösungen gearbeitet¹⁾, ein Vorgehen, das Bloor gleichzeitig durchbildete und in seinem System als vorzüglich geeignet charakterisierte. Diese Technik der sauren Neutralsalzlösung ist handlich. Andere Enteiweißungen (Schenk u. a.) sind bereits durchgeprüft, aber vorläufig vom Verf. verlassen worden, weil besondere Vorteile in den analytischen Maßstäben nicht fühlbar wurden. In größeren Mengenverhältnissen — besonders auch, wenn man sonst Schenkfiltrate (Acetonkörper u. a.) vorzieht —, nimmt man sie evtl. mit Nutzen wahr. Wieweit sie das Prinzip der Trennung zu modifizieren vermögen, könnte nur aus vergleichenden Analysen (die noch fehlen) abgelesen werden. Die P-Verteilung ist mit obigen Reagentien auf günstige, analytische Bedingungen gestellt, bedarf aber weiterer Eingriffe durch Aufteilung der Hauptfraktionen.

D. Die Aufteilung der Fraktion des „lipoidischen“ P (Greenwald), des Niederschlags, der den kolloiden P enthält, setzt Beiordnung oder Eingliederung von Methoden voraus, wie gezeigt wurde. Parallelbestimmungen führen zu rechnerischer Auflösung. Eingliederung ist unter analytischen Vorbedingungen untunlich; wenn etwa „präparativ“ gearbeitet wird, von Erfolg. Das Prinzip ist, oben (B) angedeutet, von Feigl beschrieben worden²⁾. Es gelingt, in fast allen Fällen, den P unter leichter Hydrolyse abzusprengen, ohne daß die ganze Proteinmasse aufgesprengt werden müßte. Auf diesem Wege wurde der „Protein“-P (besser wohl „proteinoide“ P) erstmalig von Feigl aufgeklärt, nachdem die Gegenwertung zweier getrennter Analysengänge Schlußfolgerungen ermöglicht hatte (s. unten).

E. Die Aufteilung der Fraktion des „säurelöslichen“ P (Greenwald), des Filtrats, das den kristalloiden P umfaßt, hat sich verschiedener, direkter wie indirekter Wege bedient. Die Beiordnung anderer Verfahren sei zunächst zurückgestellt, da hier abseits

erst nach Eintreffen des Originals (April 1919) zugänglich gewesen. Heute dürfte der Band des Journ. of Biolog. Chem. (XXXVI) Interessenten genügend erreichbar sein. Deshalb sei, aus Gründen der Raumersparnis, nur das Allerwichtigste gebracht. 1. Saures Ammoniumsulfat, P-frei (höchstens Spuren; Blindversuch.) 15,0 ccm Eisessig zu 1,01 gesättigter wässriger Lösung. Vgl. Feigl, l. c. Phosphate VIII (Februar 1919).

¹⁾ Bloor, l. c., unter „säurelöslicher“ P (Gewinnung aus Blut, S 38. und Plasma, S 39).

²⁾ Feigl, l. c. (Phosphate VIII).

liegende Fraktionsmöglichkeiten herangezogen werden mußten. Den einfachsten Weg hat zuerst Bloor (1918) beschrieben¹⁾, nachdem von Feigl (1915—1919) wie auch von Greenwald (1916) andere kompliziertere gesucht und beschrieben wurden (s. unten). Bloors analytisches System der P-Verteilung im Blut und Plasma charakterisiert sich als exakte Schnellmethode, wird daher zu Vergleichen wie zu beschreibender Anordnung von hohem Werte sein. Bloor gewinnt einen Extrakt (nach C) und bestimmt ebenfalls (nach C) dessen Total-P („säurelöslichen“ P). Auf dasselbe Bestimmungsprinzip gestellt, wird im Extrakte selbst bei beschleunigter Arbeit (!), der „anorganische“ P ermittelt. Die Differenz wird als „otherforms“ geführt. Sie ist der von Feigl seit 1916 bearbeitete Rest-P (des Filtrats); welcher nur kristalloiden P (komplex), minus anorganischen (o-Phosphat) P enthält.

Bloor verlangt schnelle Arbeit, weil während der Bestimmung der anorganische P langsam steigt²⁾. Auch für Vollblut und selbst für Erythrocyten

¹⁾ Beispiel, Vorschrift für Plasma: 3,0 ccm Plasma werden langsam (!) in 200 ccm saure Ammoniumsulfatlösung (2), die sich in einem 25,0 ccm haltenden Stöpselzylinder befindet, eingetragen. Man füllt zur Marke, mischt, läßt 10 Minuten lang, gelegentlich schüttelnd, stehen. Man filtriert, läßt gut ablaufen und drückt vorsichtig, aber gründlich aus. Das Filtrat sei durchaus klar, farblos und eiweißfrei. Bestimmung des anorganischen P (a). 10,0 ccm Filtrat (= 1,2 ccm Plasma) werden in eine 25,0 ccm haltende Meßflasche übertragen und mit Wasser aufgefüllt. Vergleich: 0,09 mg H_3PO_4 und 8,0 ccm Ammonsulfat (dem Versuch nachgebildet) werden zu 25,0 ccm (Meßflasche) ergänzt. Dann folgt die Bestimmung, auf deren Einzelheiten hier verzichtet sei. Erwähnt sei die P-Vergleichslösung, die sich in der ganzen Reihe verwenden läßt. a) Vorratslösung: 0,0834 g reines KH_2PO_4 , gelöst zu 100,0 ccm. b) Gebrauchslösung: 25,0 ccm von a, verdünnt zu 500,0 ccm. 5,0 ccm = 0,15 mg H_3PO_4 (Bloor rechnet nur nach H_3PO_4 , Feigl unabhängig von ihm seit 1919 auch). Die Lösung b verliert bei reinem Wetter schnell an analytischem Werte.

²⁾ Verf. (F.) fand, daß nicht sowohl die saure Reaktion des isolierenden Mediums — allein — die Ursache der unverhältnismäßig schnell sich durchsetzenden Spaltung ist, als der durch Anwesenheit der Komplexbildner gegebene Anreiz zum Übertritt in die anorganische Bindung. Außerdem hat sich gezeigt, daß die Rest-P-Fraktion unter variierten pathochemischen Verhältnissen nicht stets die gleiche Neigung darbietet, in den o-P überzugehen. Das ist auch der Fall, wenn die sonstigen chemischen Konstituenten des Filtrats annähernd gleichen Bau zeigen. Der Schluß auf die Variabilität der Rest-P-Komponenten findet hier Boden und darf sich auf die wechselnden Anlässe stützen, welche zu ihrem Auftreten führen. Der Komplexcharakter des Rest-P ist schon früher betont worden. Sehr wichtig ist in der einen klassischen Arbeit, welche chemisch verwandte Verhältnisse unter den Händen hat, der zum Ausdruck kommende Weg einer Differentialermittlung von komplexem P gegenüber anorganischem P. Embden hat in seinen Studien (l. c.) mit sauren wie alkali-

ist der Weg gangbar. Die in den beiden Medien sehr verwickelten Verhältnisse haben Feigl sowie Bloor unabhängig und gleichzeitig beschrieben (s. unten).

Während nun Bloor die sofort eintretende P-Mo-Strychninreaktion im komplexen Extrakt mit der o-Phosphorsäure bei Gegenwart der Phosphoryle durchführt, haben Greenwald sowie die Feigl, mit Zwischenfällungen erstere isolieren, entfernen, für sich bestimmen und letztere — nach Spaltung — wiederum auf diesem Wege ermitteln wollen. Greenwald, der diese Arbeitsweise begründete (1916), machte an erster Stelle halt, indem er sie dem „gesamten, säurelöslichen P“ (s. oben C) gegenüberstellte¹⁾. Er fällte im Pikrinsäureextrakt mit Mo-Reagens, gewann die atypisch gebaute (Pikrinsäure einschließende, in Alkohol leichter — z. Teil — lösliche) Fällung, die aus Citratgemisch als Mg-Salz ausgefällt, in verschiedenen Formen dieses selbst, gewogen wurde. Auch Mg-Fällungen gewann er aus demselben Extrakte. Feigl, der schon vorher die Frage des Rest-P ins Leben gerufen und die Ergebnisse begründet hatte²⁾, lehnte sich an diese Versuche an, überschritt seinen differentialen Analysengang (s. unten) und arbeitete an Seren, die nach beschreibenden Vorstudien reich an säurelöslichem P, mit absolut und relativ hohem Rest-P, sein mußten, bzw. nach der älteren Technik als solche bestätigt waren³⁾. Die Versuche sind eingehend beschrieben. Die Filtrate wurden autoklaviert evtl. eingeeengt und dann erneut zur Bestimmung der inzwischen abgespaltenen H_3PO_4 auf diese hin quantitativ aufgearbeitet. Losgelöst von der Nephelometrie gelang es hier, mit rund 3,0 mg P der Rest-P-Stufe mikrochemisch (gravimetrisch und titrimetrisch) zu arbeiten. Über die Bedeutung dieser Versuche für die Sicherstellung der Rest-P-Frage, die auf diese Technik verwiesen war, sei unten gesprochen. Es sei aber betont, daß hier makrochemische Mengen (an Serum) zwischen 50,0 ccm und 100,0 ccm Vorbedingung waren, daß mithin jede praktische Anwendung in der Blutanalyse a priori ausgeschlossen war. Ein Vorgehen etwa im Sinne von Bloor wurde derzeit — aus methodisch-prinzipiellen Gründen — nicht angestrebt und die Beweisführung Greenwalds für nicht ausreichend erachtet, auch wurde Wert auf die sichere Durchführung der (alten) Stammmethoden gelegt.

schen Reagentien gefüllt. Ferner hat Heubner gezeigt, daß die Neumannfällung unter Umständen Phosphoryle intakt läßt, also ebenfalls differenziert (l. c.).

¹⁾ J. Greenwald, Journ. of Biol. Chem. **25**, 431 1916 (Literatur), betreffend die Natur des säurelöslichen P im Serum. Pikrinessigsäure 1% E in gesättigter P. 5 Vol. Reagens. 30 Minuten stehenlassen. Mg-Fällung 100,0 Serum in 800,0 Lösung. Am-Pikrat ist in AmCl unlöslich. 95–100° gibt MgAm-Salz + 1/2 aq. 105° gibt MgAm-Salz. Auch MgAm-Salz + 6 aq. ist brauchbar. Pyrosalz wurde mit benutzt. Dialyse.

²⁾ Joh. Feigl (Phosphate II, III, IV, VI), diese Zeitschr. **83**, 81. 1917; **83**, 218. 1917; **84**, 264. 1917; **87**, 237. 1918, sowie der VII. Mitt. l. c.

³⁾ Joh. Feigl, loc. cit.

Immerhin ist derzeit, und erst recht nach obigem, heute einwandfrei auf der Basis der Fraktionierung nach (C) und (E) dargetan worden, daß im Serum unter den kristalloiden Formen der H_3PO_4 der präformiert-anorganische Anteil vom organisch-komplexen getrennt werden konnte. Inzwischen hatten aber andere Autoren die anorganischen Phosphate auf direktem Wege zu bestimmen getrachtet — Versuche, die Feigl dazu dienten, neben diesen im mikrochemischen Analysengange den Rest-P aufzufinden.

F. Die beschriebenen Fraktionierungen, welche sich von (C) ableiten, steigen aus den reichlich vertretenen P-Formen zu den (wesentlich) geringeren herab und haben die „P-Verteilung“ (wie wir seit Feigl, 1917, und mit Bloor sagen dürfen) mehr oder minder zum Gegenstande oder wenigstens im Auge. Aus anderen Voraussetzungen heraus zielte man auf die anorganischen Phosphate. Sie sind aus nativem Serum direkt fällbar, wobei dieses also unter Beiseitelassung der übrigen P-Träger auf Phosphate hin fraktioniert (aufgearbeitet) wird. Die Autoren, welche in diesem Sinn gearbeitet haben, sind W. Mc. Kim Marriott (und Mitarbeiter), Feigl, Greenwald, Meigs, Blatherwick und Cary. Auf diese Arbeiten sei nun eingegangen.

Die Mg-Fällung wurde als Rohisolierung angesprochen, von Greenwald (makrochemisch) weiter gereinigt¹⁾, von Marriott als Vorstufe zur Bestimmung nach den Ferrirhodanidverfahren angesehen²⁾, von Feigl näher untersucht³⁾. Dieser Autor fand, daß man durch erneute Fällung auch in kleinen Mengen eine weitgehende Entfernung mitgerissener Ca-Salze, Purine usw. erzielen könne und benutzte sie als Fraktionierungsmittel zur Isolierung; indem er den ganzen Kreis unter dasselbe Bestimmungsprinzip stellte, nämlich die Nephelometrie⁴⁾. Serum wurde mit gleichem Volumen Wasser verdünnt und mit guten Überschüssen nach der Mg-Methode ausgefällt. Die Fällung wurde in der Kälte vorgenommen, durch Stehen im Eisschrank beendet, zentrifugiert. Es sei erwähnt, daß Feigl den „organischen“ P des Harns auf gleicher Basis analysierte⁵⁾. Auch die Arbeitsmethode Greenwalds weicht nur wenig von dieser Technik ab⁶⁾.

Meigs (und Mitarbeiter) schlossen sich (1919) an diese Vorarbeiten an⁷⁾. 80,0 ccm Plasma, mit 160,0 ccm Wasser verdünnt, mit 80 Tropfen

¹⁾ J. Greenwald, l. c. (1916).

²⁾ W. Mc. Kim Marriott, F. H. Haebler, G. Howland, Journ. of Biol. Chem. **24**, 18. 1916 (s. auch ¹⁾).

³⁾ Joh. Feigl, l. c. (Phosphate II—IV) 1917, sowie Derselbe (Phosphate V), diese Zeitschr. **86**, 396. 1918.

⁴⁾ l. c. ³⁾.

⁵⁾ Joh. Feigl (Organischer P im Harn), diese Zeitschr. **89**, 126. 1918.

⁶⁾ Doppelfällung, nachdem deren erste aus Citratgemisch wiederholt wird; Wägungsformen (s. oben).

⁷⁾ Meigs, Blatherwick, Cary, l. c. (1919), S. 7; bezogen auf Angaben nach J. Greenwald (1916). Die Technik ist hier als Typ des Prin-

0,1 n-HCl versetzt, 4,0 ccm konz. Ammoniumchloridlösung, 1,6 ccm 7,7 proz. Magnesiumchloridlösung, 32,0 ccm 2,8 proz. Ammoniak vermischt, werden über Nacht stehen gelassen (bei 5°). Filtration, Auswaschung usw. gehen der Mo-Fällung vorher. In der Ausführung nach den Autoren für Gesamt-P entworfen, wird die Bestimmung, welche den anorganischen P liefert, beendet (s. dort).

Feigl hat, da diese Mg-Methode in der P-Analyse bestimmt ist. Wichtiges zu leisten, deren Wert erprobt¹⁾. Kleinmann hat mit äußerster Präzision die Fällungsbedingungen durchgearbeitet und sich dahin geäußert, daß der Rest-P jedenfalls nicht aus Defiziterscheinungen auf seiten der Mg-Fällung des anorganischen P erklärbar sei²⁾. Meigs hat seine Methode mit dem Emdenschen Verfahren verglichen und interessante Abweichungen aufgedeckt, deren Verfolgung zum Selbstzweck nach prüfender Kritik zu machen ist³⁾.

Fraktionierung des Plasmas unter Beiseitelassung der übrigen P-Träger, gerichtet auf die o-Phosphorsäure, aber gegründet auf andere Prinzipien, ist bisher nicht angebahnt worden.

G. Die Frage der Aufklärung von Restanteilen in den Hauptfraktionen der P-Verteilung⁴⁾ ist auf Beiordnung zweier oder evtl. mehrerer Methoden angewiesen. Es ist bereits oben mehrfach davon gesprochen worden, daß Feigl den Weg einschlug, die Mg-Fällung (F) für die o-

zips der Mg-Fällung beschrieben, da die anderen schon früher gegeben (Feigl 1917). Verf. (F.) hat mit Befremden gesehen, daß die Herren Meigs, Blatherwick und Cary die einschlägigen Mitteilungen seiner eigenen Studien nicht in die Diskussion aufnehmen. Das wäre besonders bei der Mg-Methode, aber auch bei dem System der P-Verteilung, bei der Diskussion des „Rest-P“-Begriffes dringend geboten. Die Arbeiten des Verf. (F.) gehen in allem über die dort herangezogenen hinaus. Es bleibt Verf. nur die Möglichkeit, an den schlechten Ausgleich des Schrifttums zu denken. Allerdings hat zu einer Zeit, in der Meigs, Blatherwick und Cary ihre Arbeit dem Journ. of Biolog. Chem. einsandten (September 1918), Herr Bloor in seinen stets gründlichen Literaturstudien die Arbeiten des Verf. (F.) in Referaten, wenigstens zum Teil, unter den Händen gehabt (Juli 1918). Aber Herrn J. Greenwald haben in seiner neuesten Arbeit (1919, l. c.) offenbar schon die meisten Originalien zur Verfügung gestanden, wie die Zitate erweisen. Die Diskussion der „Rest-P“-Frage ist daher bei den Herren Meigs, Blatherwick und Cary mehr als unvollständig. Wir werden uns mit den betreffenden Schlußfolgerungen, daher auch mit der Beweisführung, noch eingehend zu beschäftigen haben.

¹⁾ H. Kleinmann (unter Leitung von J. Feigl), l. c. diese Zeitschr. **99**, 25 ff. 1919, speziell S. 29, 31, 32 ff.

²⁾ H. Kleinmann, Diss. Berlin. Vgl. ²⁾.

³⁾ G. Emden, W. Griesbach, E. Schmitz, Zeitschr. f. physiol. Chemie **93**, 1. 1914/15. Vgl. frühere Mitteilungen des Verf.

⁴⁾ „P-Verteilung“ als Begriff der methodischen Aufgaben, findet sich zuerst beim Verf. (F.), später im System Bloor's (1918).

Phosphorsäure zugrunde zu legen, um diese Werte gegen die „säurelöslichen P“ zu verrechnen¹⁾. Nachdem die Nephelometrie als Bestimmungsmethode sichergestellt war und es gelang, den Ertrag der Mg-Fällung aufzuklären, konnte mit rechnerischer Verwertung der Differenz die Frage des „Rest-P“ begründet und gefördert werden. Die Darlegung hierüber sei zunächst zurückgestellt.

Diese Beiordnung zweier Methoden geht von den Voraussetzungen prompter analytischer Arbeit aus, vor allem aber davon aus, im Kreise des kristalloiden P zu bleiben. Sie schlug mit Absicht zwei weiter auseinanderlaufende Bahnen ein. Später hat jedoch Verf. wie auch Greenwald (s. oben) die Fraktionierung des nativen Serums durch Mg-Fällung (F.) an wichtiger Stelle der Beweisführung, um dieser willen, verlassen und die Aufteilung ganz auf den primären Extrakt des säurelöslichen P bezogen. In diesem wurde der anorganische P vom restlichen geschieden. Praktisch mußte dieser Gang zurückstehen, prinzipiell aber war er erfordert, um den „Rest-P“ objektiv (s. oben) ermitteln zu können. Nachdem dieser Versuch geglückt und gezeigt worden war, daß *cet. par.* der „Rest-P“ eine pathochemisch (absolut und relativ) variable Größe sei, war kein Bedenken mehr, den alten Gang in praxi weiter zu benutzen. Immerhin sind die ersten Schlüsse über den Rest-P derzeit sehr reserviert gefaßt worden, obschon eine Reihe gewichtiger Gründe eindeutige Auswertung nahelegten. Zu den in die Diskussion gestellten Bedenken gehörten in erster Linie solche, welche dem hydrolytischen Einfluß des Mg-Ansatzes gerecht zu werden suchten [Abspaltung von lipoidischem, proteinoidem, kristalloid-komplexem P²⁾]; doch wurde auch an Mitreißen einzelner Reste gedacht. Diese Einwände sind heute erneut zu betonen und mit Material zu belegen. Der Einwand unvollständiger Fällung dürfte inzwischen weniger gewichtig erscheinen (s. oben). An die primäre Mg-Fällung, die technisch so geschwind wie möglich gemacht wurde (z. B. in der Übernahme Meigs, s. o.), knüpfen sich also komplexe Verhältnisse. Von dem wichtigsten Teile der Bedenken (Hydrolyse) ist die Übersetzung auf den proteinlipoidfreien Extrakt³⁾, der den „säurelöslichen P“ führt, nicht völlig frei, indes ist nicht mehr soviel abbaufähiger komplexer P vorhanden, dagegen fehlt die Schutzwirkung im vollen Serum.

In Hinsicht auf die Aufteilung des komplexen säurelöslichen P tritt also neben dem genannten Weg (Feigl) der soeben skizzierte, den Greenwald wie Feigl beschritten haben. Letzterer Autor ist nicht der Ansicht, daß strikte Vergleiche beider — auf das Verbleiben im Kreise des kristalloiden P gerichteten — Techniken in den „Rest-P“-Werten wesentlich abweichen; mithin standen nun schon zwei Beweismittel in einer Linie. Durch Bloor (1918) wurde die dritte Möglichkeit durchgebildet und voll ausgebeutet (s. oben). Sie ist technisch ungemein hand-

¹⁾ Joh. Feigl, l. c. (Phosphate I—VII) 1916—1919.

²⁾ Vom Verf. (F.) früher betont. Auch von Meigs (l. c. 1919, S. 8) geltend gemacht.

³⁾ Filtrate lipoidfrei.

licher, bedarf einer weit kürzeren Reaktionszeit (Abkürzung störender hydrolytischer Vorgänge), ist aber andererseits prinzipiell etwas Neues darum, weil sie in saurem Medium arbeitet. Da nun Bloor's neue Werte, die ebenso reichlich (Normen) wie die betreffenden von Feigl vorliegen, diesen wiederum nicht entgegenstehen, haben wir nicht nur drei Einzelmethoden, welche grundsätzlich dasselbe Ergebnis zeitigen, sondern auch zwei getrennte Modi (alkalisches, saures Medium). Es ist demnach leicht ersichtlich, welche Aufgaben die Bemühungen um die fernere Konsolidierung des „Rest-P“ einschließen; um so günstiger steht dieses, als die schleppende Technik der Mg-Methode vielleicht endgültig in praxi (mikroanalytisch) ausgeschaltet werden kann.

Die Beiordnung von Methoden im Gebiete des kristalloiden P zielt bewußtermaßen auf den „Rest-P“ als Begleiter der o-Phosphate. Der Kreis, in dem sich die differentielle Beweisführung bewegt, ist dabei der denkbar kleinste, in sich geschlossen den (gesamten) säurelöslichen P, den Bloor, Feigl, Greenwald — jeder an seinem Orte — in die Darlegung einordneten, zum Kontrollpunkt machend. Größere Komplikationen müssen anderen Beiordnungen innewohnen, weil auch die technische Seite der Aufteilung die relativ einfache Arbeit in wässriger Lösung verläßt und die kleinen Anteile dabei prozentisch mehr zurücktreten. Die Zuordnung von Gesamt-P, fällbarem (lipoidischem) P, säurelöslichem P (Greenwald, Feigl, später auch Bloor) leistet, wenn sie zunächst auf die Restgruppen verzichtet, alles, was erforderlich ist. Die Zuordnung: Gesamt-P, fällbarer P mit Aufteilung zu lipoidischem einerseits, proteinoidem andererseits (Feigl) kann die Grenzen des mikromethodischen Maßstabes nicht einhalten, hat aber zu den erstrebten Erträgen, wenigstens im Prinzip, geführt (Feigl 1919)¹⁾. Die Zuordnung, welche das System der P-Verteilung mit lipoidem, anorganischem, gesamtem, zu lösen trachtet, zieht zu weite Kreise, da sie mehrerer Einzelmethoden bedarf (Meigs, Blatherwick, Cary)²⁾. Nach Erachten des Verf. bleibt, wenn nicht

¹⁾ Joh. Feigl, l. c. (Phosphate VIII) 1919.

²⁾ Meigs (und Mitarbeiter), Tab. I. (Summe der obigen drei Komponenten), l. c. (37, 13ff. 1919).

³⁾ Dieselben haben auch vergleichend (mikro- oder makromethodisch) über Isolierung des lipoiden P (Bloor bzw. Koch-Woods, Literatur, s. dort) gearbeitet. Die Mikrozahlen (nephelometrisch, wobei jedoch F. A. Csonkas neue Beiträge scheinbar ganz fehlen, 1918, 1920) fallen höher aus, als die makrochemisch isolierten Werte. Das hat Verf. übrigens (Phosphate VII, 1918, Lecithinämie 1918, Lipämie Studien 1917—1920) schon nach eingehenden Prüfungen betont und dargelegt. Aber das Urteil über die Isolierung nach Bloor („very nearly correct“; „microextraction decidedly more complete and satisfactory even than very long drawn out gross extractions“ usw.) ist für Verf. doch von hohem, bestätigendem Interesse. Es wirft ein Schlaglicht auf die Kritik, mit der Verf. ältere analytische Arbeiten (u. a. Bornsteins) in die heutigen Ergebnisse ein-

neue Möglichkeiten direkter Arbeit an Plasma sich anbahnen lassen, nur der in der Gruppe C eingeleitete Analysengang, welcher nach Bloor, Feigl, Greenwald die erste große Scheidung vollzieht, um dann — Prinzipielles in größeren Maßstäben anstrebend — an den Fraktionen weiter zu arbeiten.

H. Während die Beiordnung mehr oder minder unabhängig gestellter, ferner die Verknüpfung verschiedener Stufen repräsentierender, Methoden der gegebene Weg zur Durchführung der Fraktionierung des gesamten P, zur Schaffung einer P-Verteilung geworden ist, stand die vergleichende Anwendung entsprechender Bestimmungsprinzipien bzw. einzelner Techniken außerhalb. Da, wo die Hilfsmittel der Methodologie eingesetzt werden mußten — also in der Konsolidierung der Ergebnisse — ließen sich vergleichende Prüfungen nicht umgehen. Solche haben, wie oben dargelegt, Feigl einerseits und Greenwald andererseits, endlich etwas abwegig, auch Meigs und seine Mitarbeiter unternommen. Indessen liegt auch schon in den zur Formulierung des „Rest-P“ führenden Studien Feigls implicite ein Teil solcher Vergleichsanwendungen. Nun sind inzwischen zwar die analytischen Methoden durch Feigl, sowie in aller Schärfe durch Kleinmann studiert und charakterisiert worden, aber das Prinzip Marriotts ist nicht mit eingeschlossen worden. Angesichts der fest konsolidierten Nephelometrie durch das P-Mo-Strychninreagens, welches so eingehend wie möglich umschrieben und auf ein neues Präzisionsinstrument bezogen worden ist, wird ein Zwang in dieser Richtung zunächst fortfallen. Aber die Einzelhandhabung der Nephelometrie in Verbindung mit den einleitenden Maßnahmen der Isolierung — z. B. bei Bloors System — enthält doch den Anreiz zu einem Rückschlag in die Revision der Bestimmungsmethoden, um so mehr, als es den Anschein hat, als ob Meigs (und Mitarbeiter, 1919) Studien zu abwegigen, besonderes Eingehen nahelegenden Ergebnissen gediehen sind¹⁾. Für den Kernpunkt der Frage wesentlich ist die Überprüfung der unter (G) entworfenen Mög-

setzte (l. c.). Außerdem spielt dieses Urteil (Meigs und seine Mitarbeiter) ja auch in die zur Zeit sehr umstrittene Isolierung des Cholesterins hinein. Die Äußerungen (Meigs) stehen l. c. S. 8—10. An sie schließt sich die vergleichende Prüfung der Gesamtfettisolierung (S. 10) mit gleichfalls gutem Urteile. Natürlich muß die Bewertung mit den inzwischen herangereiften wichtigen Beiträgen Csonkas verwoben werden. Hierzu siehe Feigls Lipämie-Studien (diese Zeitschr. 1917—1920), sowie desselben Cholesterinämie I u. II, Zeitschr. f. d. ges. experim. Med. 1920. XI.

¹⁾ Meigs (und Mitarbeiter), l. c. 1919, S. 5ff., sowie der Absatz „nature of P-compounds“ usw. mit Diskussion, S. 10—17. Es mag hier im Zusammenhange erwähnt werden, daß die Mg-Methode — auch unter allen Kautelen — die Möglichkeit in sich trägt, den in ihr gesuchten P künstlich zu steigern. Vergleiche zwischen makro- und mikro-technischer Anwendung, die unter Umständen die Verrechnung nach Meigs (Tab. I, Spalte am weitesten rechts „Differenz“) anschaulicher deuten ließen, stehen gleichfalls aus.

lichkeiten. Es soll hier ausdrücklich betont werden, daß Feigl sowie Bloor nicht weit ab vom Urteil Greenwalds zu Ergebnissen gelangten, die in einer Linie liegen, und ferner, daß die Beweisführung für den Rest-P (Feigl 1918) das Prinzip objektiv gesichert hat. Indessen ist Verf. bei voller Würdigung dieser Beiträge — vor sich selbst — geneigt, den auf sehr hohe „Rest-P“-Beträge in gewissermaßen extremen Fällen (s. dort) gefallenen Ton nicht zu stark zu hören, weil hier die Ausschläge *et. par.* ebenfalls extrem hoch und die Maßstäbe gleichfalls große waren¹⁾. Mithin soll sich die Überprüfung auf die Gegenteile beider Gesichtspunkte in eben der Schärfe richten. Bei Vergleichsuntersuchungen der hier vorliegenden Art müssen die auf Hydrolyse tendierenden Bedenken (s. oben), welche die künstliche Verkleinerung des aktuellen „Rest-P“ durch die reaktiven Medien würdigen, den Ausgangspunkt bilden. Versuche, die über die Arbeit an natürlichen Seris hinaus- und auf Experimentieren an chemischen Individuen des Typs der kristalloiden Phosphoryle übergehen, sind bereits im Gange. Sie sollen der Annahme, daß der „Rest-P“ selbst komplex gebaut ist, und daß pathochemische Umstimmungen, dessen Gliederung chemisch, daher auch wohl reaktiv, verschieben können, ab ovo Rechnung tragen. Wichtig ist noch der Ertrag von Vergleichen an der Isolierung des lipoiden P²⁾. Hierhin gehört auch der Gang nach Piette a Vila³⁾, sowie Sichtung der Stufenextraktion Bangs⁴⁾.

Bevor einige der erwähnten Vergleichsergebnisse mitgeteilt werden, sei in Kürze ein Überblick über die derzeit vorliegenden Resultate gegeben. Auch an dieser Stelle wird weitgehend auf eigene und fremde Originalien zu verweisen sein.

I. Anorganischer Phosphor.

A. Mg-Fällung in nativem Serum. Marriott, Haeßler, Howland⁵⁾: 1,0—3,5 mg P für 100,0 ccm Serum (= 3,2—12,0 mg H₂PO₄). In der Pathologie höhere Zahlen.

Greenwald⁶⁾: Werte, die ausnahmslos geringer sind als die entsprechenden für säurelöslichen P.

Beispiel. Mensch: 4,74 mg gegen [4,31, 4,17, 4,18] mg.

Feigl⁷⁾: Werte, die durchweg um so viel niedriger liegen als der S-P, daß die Differenz außerhalb der Fehlergrenzen sich bewegt.

¹⁾ Hierfür werden die Erwägungen unter ¹⁾ S. 41 zutreffen. Rückwirkung auf Embdens klassische Arbeit ist auch möglich.

²⁾ Siehe Phosphate VII (Verf., F.) 1919, S. 50ff., 57, Tabellen, S. 69ff.

³⁾ l. c. (s. oben).

⁴⁾ l. c. (s. oben).

⁵⁾ l. c.

⁶⁾ l. c. (1916).

⁷⁾ l. c. (Phosphate II, III, IV; Vergleichsversuche in V).

Beispiel. Mensch: Norm: 1,0—4,8 mg gegen 1,2—5,7 mg, d.h. 77—92% (Mittel 85%) der komplexen Größe.

Krankheiten: Extreme an 50% bzw. an 95% (s. dort).

Krankheiten: in Vergleichsanalysen

8,0 mg gegen 6,2 mg

8,8 mg gegen 5,0 mg

14,0 mg gegen 10,6 mg

Meigs¹⁾, Blatherwick, Cary: nicht direkt diskutierbar (s. dort Text), aber die Zahlen fallen mut. mut. höher als die der obigen Untersucher.

B. Mg - Fällung in Greenwald - Extrakten. Greenwald²⁾: Werte, die unterhalb des S-P bleiben:

Beispiel. Schaf: 8,58 mg gegen [8,13, 8,04] mg.

Feigl: Werte, die unterhalb des S-P liegen:

Beispiel. Ältere Vergleichsversuche³⁾: Krankheiten:

6,5 mg gegen 5,2 mg,

12,0 mg gegen 8,0 mg.

Neue Versuche⁴⁾: Norm: 2,8—6,0 mg gegen 2,15 gegen 4,7 mg; in Prozenten 66—88 cem S-P.

Krankheiten: u. a.

24,0 mg gegen 20,0 mg,

16,0 mg gegen 10,0 mg,

18,0 mg gegen 17,0 mg.

in Prozenten fallend auf 50, steigend bis 92 cem S-P.

C. Mo - Fällung in Greenwaldextrakten. Greenwald⁵⁾: Werte, die durchweg niedriger als der S-P liegen:

Beispiel. Schaf: [11,00, 11,13, 10,91] mg gegen [10,31, 10,30, 10,32] mg.

Feigl³⁾: Neue Vergleichsversuche. Werte, die durchgehend niedriger fallen. Nur makrochemisch; Technik im ganzen unsicher. Mikrochemische Technik wird z. Z. ausgebildet.

¹⁾ l. c.

²⁾ l. c. (1916).

³⁾ Greenwald; l. c. (1916).

⁴⁾ Joh. Feigl, l. c. (Phosphate I).

⁵⁾ Joh. Feigl, Neue Versuche: 12 Normalfälle ♂. 18 verschiedene Krankheitsfälle, die in dies Programm der Mitteilungen (Phosphate III, IV, VI, XI) hineinpassen; s. dort. Diese, wie auch die späteren neuen Versuche gehören zu anderen (zum Teil anorganische Gesamtanalyse betreffend, zum Teil pathologische Materialien, speziell Salzfunktion bei Morb. Brightij, Muskeldystrophie, Tabes u. a. betreffend) Arbeiten. Unter diesen finden sich auch solche, die körperliche Höchstleistungen betreffen.

D. Arbeitsweise nach Bloor im Bloorextrakt. „Anorganischer P“. Bloor¹⁾: Ausdrücke (Originaldarstellung) als H_3PO_4 : Werte, die durchgehend unter denen für S-P liegen:

Beispiel. Mensch: Norm:

Mittel:	{	10,4 mg gegen	8,7 mg (σ)	}	schematisiert
		12,4 mg gegen	11,2 mg (σ)		
Extrem:	{	9,0 mg gegen	8,0 mg	}	♀
		14,3 mg gegen	13,8 mg		
		Mittel: 11,6 mg gegen	10,6 mg	}	♂
		Extrem: 10,7 mg gegen	6,7 mg		

Feigl²⁾: nach obiger Methode, bestätigend, jedoch anorganischer P relativ etwas niedriger:

Beispiel. Mensch. Norm:

14,0 mg gegen	13,3 mg	}	σ	schem.
8,2 mg gegen	7,6 mg			
12,0 mg gegen	10,4 mg	}	♀	aktuell
14,0 mg gegen	9,7 mg			
9,6 mg gegen	6,6 mg	}	♂	aktuell
9,5 mg gegen	8,9 mg			

In obigen Reihen sind an verschiedensten Materialien, wobei unter den Werten der anorganische P den Ausgangspunkt bildet, der säurelösliche P sowie der restliche P implicite mitgegeben.

Es läßt sich aus obigem eines mit aller Sicherheit ableiten. Durch nahezu alle Beispiele, auf die die verschiedenen Methoden bezogen werden könnten, wird erhärtet, daß der säurelösliche P sich dem organischen überordnet. Die verschiedensten Eingriffe lassen den „Rest-P“, überwiegend frei von Schatten der Fehlergrenzen, als Realbegriff, auftreten. Die alten Ergebnisse des Verf. (F) sind durch ihn selbst, vor allem aber durch fremde, methodisch neu orientierte Arbeit (Bloor) bestätigt. Es hat auch den Anschein, als ob die Erträge — nach der Norm beurteilt — sich sehr gut zur Deckung bringen lassen. Das fällt ganz erheblich ins Gewicht. Da indes dies analytische System Bloors, dem wir die

¹⁾ W. R. Bloor (Verteilung der H_3PO_4 im normalen menschlichen Blute), Journ. of Biol. Chem. **36**, 49. 1918; entlehnt aus Tab. 1.

²⁾ Joh. Feigl, Neue einschlägige Versuche. Hier ist nur die Norm wiedergegeben. Krankheiten sind reichlich durchuntersucht. Siehe auch Vergleiche der Reihe I, Gruppe A und D. Zusatz: Zu den Urteilen, betreffend Greenwalds Methoden, mag bemerkt werden, daß die Fehlergrenzen für die prinzipielle Bewertung mit einbezogen wurden.

so schönen Analysen des Lipämiegebietes, zu einem Wurfe geformt, verdanken, die ältere Technik an Einfachheit, Geschlossenheit und Promptheit überragt, tritt sie für die Praxis an erste Stelle und wird in der Pathochemie große Dienste leisten. Bloor hat uns Werte dieser Art noch nicht vermittelt. Verf. (F) hat in seinen Studien Morbus Brightii, Tabes und Paralyse, Acitaminosen, Muskelerkrankungen, Hungerödem — ferner alimentäre Abwandlungen —, Strahleneinflüsse (mit P. Reinhard und S. Möller), Infektionskrankheiten, Leberschädigungen, Bluterkrankungen, Neubildungen — endlich körperliche Arbeitsansprüche — zum großen Teile früher, doch auch ergänzend jetzt in neuen Arbeiten, einbezogen. Die technische Leistungsfähigkeit des Systems von Bloor hat sich stets bewährt. Die praktische Bedeutung ist von Verf. (F.) schon früher für einen Teil der genannten Erkrankungen angebahnt worden. Jetzt hat Verf. (Mitt. XI) Nierenfunktion bei Morbus Brightii und die „nephritische Acidose“ auf Grund größtenteils älteren Zahlenmaterials zu fördern gesucht, wobei der unmittelbare praktische Wert wohl nicht mehr bezweifelt werden kann. Dabei wurde die Notwendigkeit, die Größen des Systems der P-Verteilung in Beziehung zu setzen zu anderen pathochemisch wichtigen Krystalloiden, erkannt und ihr zu dienen gesucht.

II. Säurelöslicher Phosphor.

Ältere Zahlen sind z. T. in der Gruppe I behandelt, z. T. liegen sie in der einleitenden Arbeit Greenwalds (1915) und in den Mitteilungen Feigls vor. Auf ein näheres Eingehen auf die neusten Stellen sei verzichtet. Bei den Autoren erhebt sich der säurelösliche P bis hinauf zu 20,0 mg (G.) bzw. zu 30,0 mg für 100,0 ccm Serum (nach Bloor in den Ausdruck H_3PO_4 versetzt ca. 65,0 mg bis also nahezu 100,0 mg für 100,0 ccm Serum). In der Norm findet Feigl als allgemeine obere Grenze etwa 4,0 mg S-P (= 13,0 mg H_3PO_4). Sie wird in großen Reihen hin und wieder überschritten und kann dann allenfalls 15,0 mg H_3PO_4 erreichen. Greenwald hatte 4,5 mg S-P (14,0 mg H_3PO_4) namhaft gemacht. Wie ersichtlich, ist — unter Berücksichtigung der doch recht diffizilen Vorbedingungen — vorzügliche Übereinstimmung mit Bloor (1918), der den beiden Untersuchern folgte, festzustellen. Damit dürfte einmal die prinzipielle Gleichwertigkeit der Methoden dargetan, zum anderen der sichere Unterbau für

Anwendung in der Pathologie geschaffen sein. Die unmittelbare Anwendung der Größe S-P hängt dagegen von anderen Faktoren ab. Sie kann weitgehende Abweichungen im Bau zeigen, indem der anorganische P bald hervor-, bald zurücktritt. Das hat zuerst Feigl festgestellt. Mithin wird nur — nach entsprechenden Vorarbeiten — in gewissen pathologischen Kombinationen mit der Komplexgröße gearbeitet werden dürfen.

Sonderversuche, vergleichend nach Greenwald(-Feigl) bzw. nach Bloor ausgearbeitet, haben dargetan, daß in der Norm die größte Abweichung bei exakter Durchführung von 22 Beispielen $\pm 3,2\%$ nicht überschritt. Das Mittel lag bei $\pm 1,8\%$. In weniger zugespitzter Technik (wie sie mit dem Nephelometer von Feigl-Kleimann noch vereinbar), daher der Praxis zugänglich ist, war das Maximum $\pm 5,4\%$, das Mittel $\pm 2,6\%$. Beide Methoden geben dieselbe Genauigkeit. Man kann nach den Beständen an Reagens variieren und wird Bloor den Vorzug geben. Sorgsame Prüfung der Lösungen usw. ist auch für die Praxis streng vonnöten, auch wohl möglich.

In pathologischen Seren ist bei exakter Arbeit der Abfall an Genauigkeit der Einzelmethode, was ja schon früher erörtert wurde, nicht wesentlich, desgleichen in Parallelanordnung. Bei weniger strenger Technik kann die Fehlermöglichkeit jedoch belanglich steigen, da es pathochemische Seren gibt, die, leichter als normale, Störungen mit sich bringen.

III. Lipoider Phosphor.

Feigls, Greenwalds, Bloors Ergebnisse stimmen für die Norm gut überein. In der Pathologie kommen (seltene und begrenzte) Anlässe vor, die die Anwendbarkeit der Prinzipien (Fällung gegen Extraktion) einschränken. Sie sind von Feigl (Phosphate VII) eingehend charakterisiert, hängen vom nicht lipoidischen, fällbaren P und vom Rest-P ab. Der „Rest-P“ kann nach Feigl im Bloorschen Extraktionsgemisch (s. o.) löslich sein. Gemeinhin findet ein Übergreifen des anorganischen P in den lipoidischen (Bloor, Feigl) nicht statt. Als H_3PO_4 ber. findet Bloor (1918) die Extreme 16,0 mg und 29,0 mg für 100 ccm Serum. Greenwald gab (1915) 21,0 mg bis 34,0 mg. Feigls eingehende Zahlen s. Originalien. In Einzelanalysen herrscht

gute Übereinstimmung nach Greenwald und Bloor. Oberste Grenze der Norm 35,0 mg H_3PO_4 (Feigl)¹⁾.

IV. Proteinoider Phosphor.

Seine Stellung im System der Analyse und seine pathochemischen Erscheinungsmöglichkeiten hat Feigl beschrieben, dgl. seine Werte²⁾. In der Norm erreicht er höchst selten einmal 1,0 mg P = 3,2 mg H_3PO_4 , meist erhebt er sich nicht über 0,5 mg P. Er ist nur systematischen und makrochemischen Versuchen erreichbar. In der Pathologie sind bis zu 2,0 mg und höchst selten bis zu 3,0 mg beobachtet worden. Dann mußten komplexe Produkte angenommen werden, die mit den Plättchen und Leukozyten im Zusammenhang standen. Modalitäten in der Technik der Hydrolyse modifizieren seine Absprengbarkeit. Er ist — offenbar uneinheitlich (Pathochemie) — gebunden, z. T. locker, z. T. ziemlich fest. Die Kenntnisse sind erst eingeleitet.

In den klassischen Arbeiten von E. Abderhalden standen (Tierblut) nebeneinander 0,6 mg Nuclein-P; 6,7 mg Lecithin-P; 3,7 mg anorganischer P (d. s. 0,0110 mg Gesamt-P für 1,000 ccm Serum!). Auch der vom Verf. (F.) untersuchte proteinoider P erscheint heute also in einer Neubearbeitung. Meigs lehnt in einer Diskussion die Überschätzung dieser Größe ab.

V. Gesamter Phosphor des Serums.

Bloor, Feigl, Greenwald geben genügend übereinstimmende Zahlen³⁾. Ersterer 24,3 bis 43,5 (35,0) mg, letzterer 30,0 bis 44,0 (37,0) mg. Feigl fand in größeren Reihen die normale Spannweite (Extrem) 22,0 mg und 45,0 mg, Mitte zu 36,0 mg H_3PO_4 für 100,0 ccm Serum. Pathochemische Extreme (Hyperlecithinämie, Hyperphosphatämie, also Komplexe, oft untereinander kompensierte Ursachen) sind z. B. bei Nephritis 180,0 mg. Wie unter A. gesagt, ist dieser — komplexe und daher unspezifische — Begriff die Kontrollgröße für die P-Verteilung und die Stütze bzw. der Anstoß der „Restanteile“ — ersteres z. B. bei der Greenwald - Bloor - Fraktionierung in saurem wässrigen

¹⁾ Joh. Feigl (Physiologische Lecithinämie), diese Zeitschr. **90**, 361. 1918; Derselbe (Lipämie I—VI), ebenda 1918—1920; (Phosphate VII), ebenda 1918, S. 92, speziell von S. 57 an. Vergleiche über Bloor und Greenwald eingehend belegt.

²⁾ Joh. Feigl (Phosphate VIII), l. c.

³⁾ Siehe oben.

Medium ohne weitere Aufteilung — letzteres z. B. bei der Erfüllung letzterer, die den lipoiden einerseits, den anorganischen P einschiebt und dann die Verrechnung der Anteile verlangt. Bei genauer Arbeit mit den Hauptbegriffen (Gegenkontrolle durch den gesamten S-P wie den L-P) ist ein Weiterrechnen in die Fehlergrenzen hinein bis 0,5% durchaus zulässig.

VI. Summation der Restanteile.

Gegründet auf die Einzelstufen der Analysen und auf V. (s. o.) kann man unter normalen Verhältnissen mit 0,7 mg P bis 3,0 mg P in Extremen rechnen, d. h. mit fast 2,0 mg bis fast 10,0 mg H_3PO_4 für 100,0 ccm Serum¹⁾. In der Pathologie kann unter ebenfalls komplexen Bedingungen etwa 10,0 mg und selbst 15,0 mg P erreicht werden, gleich 32,0 mg bis 48,0 mg H_3PO_4 . Doch letztere Zahl ist ein vom Verf. (F.) einmal gesehenes Extrem.

VII. Rest-P (krystalloider, nicht-o-phosphatischer P).

Diese Größe, obzwar implizite eingangs mit berücksichtigt, verlangt besondere Erörterung. Unter ausdrücklicher Rückbeziehung auf die tabellarischen Angaben zur Gruppe I seien zunächst die älteren Ergebnisse des Verf. aufgeführt²⁾. In der Norm kommen 0,2 mg P bis 0,9 mg, nach seitheriger Ergänzung³⁾ auch noch 1,0 mg = 0,60 bis 3,2 mg H_3PO_4 (als Extrem nach derselben Methodik) in Frage. Die Zahlen können mit denen für anorganischen P gekreuzt sein⁴⁾, belegen also schon den varianten Aufbau des säurelöslichen P, dessen Struktur im Mittel etwa 15%, nach den Nachträgen des Verf. etwa 18% [70—95%⁵⁾ gegen ältere Reihe 77—92%] einschließt⁶⁾. An diese Stelle setzen wir, von anderen Versuchen, die kaum einrangierbar sind, abgesehen,

¹⁾ Ebenfalls Mitt. VII; s. Tabelle S. 299.

²⁾ E. Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chemie **23**, 521. 1897; **25**, 65. 1898. Die fraglichen Zahlen sind der von Meigs (und Mitarbeiter) durchgeführten Umrechnung entlehnt; l. c. S. 10, Fußnote. Verf. hat sie bisher in dieser Form nicht benutzt Die Ausführung der Herren Meigs, Blatherwick, Cary ist nun ungemein dankenswert, zeigt sie doch, daß die klassischen Analysen Abderhaldens schon vor langen Jahren die heute ausgearbeiteten Ergebnisse in nuce fast völlig enthalten.

³⁾ Joh. Feigl (Phosphate II), l. c.

⁴⁾ Neue Versuche, etwa 18 Versuche.

⁵⁾ W. R. Bloor, l. c.

Bloors neue Erträge (1918) mit den Extremen 0,0 und 4,0 mg H_3PO_4 , dem Mittelbereich 1,26—1,72 mg H_3PO_4 . Im Prinzip übereinstimmend, sind die Werte Bloors mit weit größeren Ausschlägen ausgestattet¹⁾. Hier müßte die fernere Vergleichsarbeit ansetzen. Pathologische Werte erhielt Feigl mit 3,0 mg, 8,0 mg, selbst 10,0 mg P unter geeigneten krankhaften Bedingungen (s. o.), also rd. 10,0 mg bis rd. 32,0 mg H_3PO_4 zu 20%, selbst 50% des S.-P.

So sehr man auch das Prinzip dieses Begriffes in den methodisch so weit differenten (s. o.) Arbeitsgängen nach Bloor (1918) einerseits, nach Feigl (1915—1920) andererseits gesichert und zur Deckung gebracht erscheint, so wenig verlohnten die weiter eindringenden statistischen Ausbeutungen beider Reihen. Daß sie die Befunde noch näher schließen, und damit die Wahrscheinlichkeit annähernd gleich guter Leistung beider so differenten Arbeitsbedingungen begründet haben, will gegenüber anderen Überlegungen und Erträgen wenig sagen. Wir haben es mit einer methodisch relativ unsicheren Größe zu tun, deren Minimalwerte in den Fehlergrenzen verschwinden, die bei strengst paralleler Arbeit zwar gute Doppelwerte ergibt, die aber anders beleuchtet werden darf, so sicher die meisten Schlußfolgerungen auch vor uns stehen. Zunächst hat sich bei Vergleichen an geeigneten pathologischen Seren gezeigt, daß Bloor und Feigl nicht immer parallel zu gehen brauchen, daß also saures und ammoniakalisches Medium auf verschiedene Zersetzlichkeit stoßen können. Ferner haben sich auch in Doppelanalysen Ergebnisse gezeigt, nach denen die Bloortechnik um 10—30% höheren „Rest-P“ lieferte. Endlich konnten bei kurzfristig wiederholten Serumanalysen an geeigneten Kranken ziemlich große Ausschläge festgestellt werden, was der (auch analytisch begründeten) weiten Variabilität in der Norm vielleicht kombiniert werden darf²⁾. Andere Versuche hatten zum Ziele, an der Stelle der Methoden für den anorganischen P anzugreifen. Bloors Hinweis auf schnelle Arbeit an dem betreffenden Punkte wurde bestätigt, und der Abfall an „Rest-P“ durch Zuwachs im organischem P kurvenmäßig veranschaulicht. Die Mg-Probe wurde bei schrittweise abgebauten

¹⁾ Vgl. die pathologischen Erträge zum Rest-P; I. c. (Phosphate I, III, IV, VI, VII).

²⁾ Joh. Feigl (Phosphate IX), diese Zeitschr. 94, 304. 1919.

Kautelen (nicht mehr Aufbewahrung in der Kälte, längere Dauer des Stehens fertiger Ansätze usw.) erprobt, wozu hyperleucithinaemische Seren sowie solche von leukämischen Fällen dienten. Endlich wurde mit Seren, die Blutzerfallserscheinungen zeigten (Perniciosa, Malaria, Icterus haemolyticus, geeignete Intoxikationen, Bestrahlung usw.) experimentiert, da Feigl gleichzeitig mit Bloor¹⁾ gezeigt hat, daß die Größe „Rest-P“ bzw. „Other Forms“ in den Erythrocyten ohne faßbare Stufen gewaltige Werte (gegen Serum) gibt. In allen diesen Fällen führt die ausgelängte Einwirkung der Mg-Ansätze, aber auch die Bloortechnik zu schrittweisem Anstiege der Werte für den anorganischen P. Das bringt einigermaßen Licht in die Verhältnisse und zeigt die Fehlermöglichkeit von der einen Seite aus. Verf. (F.) möchte sich auf die mit schrittweisem Heranreifen der Erträge über den „Rest-P“ als Glied der „P-Verteilung“ im Serum fortgesetzte Diskussion über den objektiven Gehalt, den praktischen Wert und die Pathologie dieser Größe berufen und ferner auch darauf, daß er unabhängig und gleichzeitig von dem Schöpfer des neuen wertvollen Systems einschlägiger Analysen noch die Beziehungen des P in den Erythrocyten aufklärte. Von diesen aus wird die Pathochemie der Verteilung des P im Blute überhaupt gefördert werden müssen. Die verwickelten Fragen, welche den im Prinzip klargestellten „Rest-P“ des Plasmas nach obigem weiterhin betreffen, sollen teils, wie angedeutet, analytisch, teils (zunächst) in reinen Lösungen krystalloider Phosphorylkomplexe bei ihrem Verhalten gegen die maßgebenden Reaktionen in zuständigen Ansätzen bearbeitet werden²⁾.

Verf. möchte an die Herren Fachgenossen die Bitte richten, ihm weiterhin das Arbeitsgebiet — besonders den angedeuteten Richtungen nach — gütig überlassen zu wollen.

¹⁾ W. R. Bloor, l. c. (1918).

²⁾ Anhangsweise mag der Arbeitsform von A. Costantino gedacht werden, die Verf. an anderer Stelle heranzog (Schenkfiltrate, Ba-Fällung usw.). Arch. Farmacol. sperim. **19**, 307. 1915; Chem. Zentralbl. **2**, 287. 1915. Möglicherweise ist auch das technische Experiment auf Muskelpreßsäfte zu verlegen, wo die Untersuchungen G. Embdens und seiner Schüler auf feste Unterlagen zu bauen gestatten.

Bemerkung zur Frage der „Restreduktion“ des Blutes.

Von
Joh. Feigl.

(Aus dem chemisch-physikalischen Laboratorium des Allgemeinen Krankenhauses Hamburg-Barmbeck.)

(Eingegangen am 11. September 1920.)

Soeben hat R. Ege in dieser Zeitschrift (107, 229. 1920) eine Mitteilung veröffentlicht, die eine wesentliche Bereicherung unserer Kenntnisse über die sog. Restreduktion des Blutes, bezogen speziell auf die Mikro-Bang-Methodik, darstellt. Sie greift dabei erheblich in die Praxis des „Blutzuckerbegriffes“ über. Andererseits fußt sie offenbar auf eingehenden Studien über die betreffende Fachliteratur, was noch mehr zur Geltung käme, wenn dem Leser eine auswärtige Arbeit des Autors zur Hand wäre. Unter Rücksicht auf andere, zum Teil sehr geschätzte Methoden (Bertrand) wird in eingehender Weise die für das Problem so wichtige Vergärungstechnik studiert. Letztere hat bekanntlich in der Hand von Schumm zu ganz verzerrten Vorstellungen geführt, die Griessbach und Straßner eingehend charakterisierten und auf die richtige Bahn zurückleiteten. Es ist wichtig zu erfahren, daß Ege wie Andersen die Stichhaltigkeit des „Bertrand“ („zu geringe Werte“) ablehnen und daß Ege mit Feigl darin übereinstimmt, „Makro“- wie „Mikro“- Bang lieferten im Prinzip die gleichen Restwerte. Dem Streit um die Restreduktion, soweit er auf rein methodenkritischem Boden ausgefochten wurde, ist durch diese, Griessbachs und Straßners Behauptung („die R.-R. sei ein [Kunst-] Produkt des alten Makro-Bang“) unter Zustimmung zu Feigls, auch Schumms Auffassungen endgültig widerlegende Feststellung viel an abwegigen Kontroverspunkten entzogen worden. Nun hatte Feigl früher festgestellt, daß die R.-R. nicht nur weitgehend von den auf Glucose mit ihrer spezifischen Reaktionsfähigkeit zugeschnittenen Bestimmungsmethoden abhängt, sondern, daß diese von der Leistung der vorgängigen Isolierung mit gelenkt, unter Umständen sogar beherrscht würde. Es scheint, als wenn man sich dieses Argumentes wieder mehr bedienen dürfe. Ege stellt eindringlich, wie schon früher Feigl, die Gesamtfrage auf den Standpunkt, daß man die Kenntnis einschlägiger, biologischer Konkurrenten der jeweiligen Reduktion zur Quelle der Diskussion machen müsse. Auf die betreffenden Zusammenstellungen

sei daher nicht eingegangen, ebenso auf die vom Verf. schon früher betonte Systematik der R.-R.-Stoffe, die Ege übersichtlich schildert und seiner Technik unterordnet. Nun bietet aber die ausgezeichnete Arbeit in sich, wie — mittelbar — durch sich, Anlaß ganz besonders für den Verf. (F.), Beiträge zum heutigen Stande zu liefern, die sich aus der Weiterentwicklung der von ihm seinerzeit erstmalig angebahnten, speziell blutchemischen Gesichtspunkte, herleiten. Feigl hat vor kurzem in einer Mitteilung, die unverblümt der „Revision von Methoden wie Werten“ bez. Kreatinin und Kreatin im Blute dient, betont, daß die zum Teil recht gewandelten Erträge zu diesen Fragen eine nicht unbelangliche Revision der R.-R.-Überschläge mit sich bringen würden. Ebenso sei auch das Ausgreifen auf die chemischen Blutbilder des RN-Gebietes unmittelbar zu fordern. Indem auf die diesbezüglichen Resultate hingewiesen wird, zieht Verf. den Schluß, daß nach Folin-Wu, Denis, erst recht nach Greenwald-Mc Guire, unter Bestätigung seiner eigenen Betrachtungen, die früher geschätzte R.-R. wohl doch niedriger eingesetzt werden dürfe¹⁾. Seinerzeit wurden die Werte überschlägig (Maxima, Minima, Mittel) formuliert auf Grund derzeitiger Analysen für die Kreatin Gruppe. An der Konso-

¹⁾ Hinsichtlich der Kreatininämie möchte ich u. a. auf folgendes hinweisen. M. Rosenberg, der ja insofern eine glückliche Hand hatte, als er — im Zusammenhang mit den Studien von Myers, Fine, Lough — die Kreatininämie in der Diagnose zum Ansehen brachte, nimmt zu meinen älteren Ausführungen Stellung. Hauptsache für mich ist, daß er auf der Basis derzeitiger Methoden seine Normalien nun mehr richtig — in Übereinstimmung zu meinen — fixiert. Mir bleibt auch heute noch keine andere Erklärung als die derzeit ausgesprochene Kombination, vornehmlich methodischer, aber auch die Benutzung der Literatur betreffender Art. Inzwischen wird man aber berechtigt sein (wie ich 1916 schrieb, und wie Greenald und Mc Guire 1918 näher ausführten), manche der zu niederen Werte durch unvollständige Extraktion zu erklären. Es ist zweifellos nicht primär Sache des um Anwendung speziell in der Diagnose Bemühten, sondern durchaus nur des biochemischen Methodologen, Verfahren sicherzustellen und zu kritisieren. Immerhin aber mußte Rosenberg, wenn er sich strenger an die Literatur gehalten hätte, schon eher auf die Bedenklichkeit seiner Normalien aufmerksam werden. Rosenbergs pathologische und diagnostische Verdienste zu schmälern, ist deshalb noch kein Grund, was ich auch stets betont habe (s. Literatur). Nun hat aber die fortgesetzte Arbeit führender Methodologen neues zur Kreatininämiefrage beigetragen. Feigl hat die Schwierigkeiten früher hervorgehoben. Durch die vorstehende Kontroverse scheint die fragliche Analyse heute auf festen Füßen zu stehen. Aber die Wandlung der Methoden muß in der Anwendung zur Geltung kommen. Insofern wird Herr Rosenberg — ebenso wie der Verf. (F.) — vor der Aufgabe stehen, sich mit der Erhärtung oder dem Aufgeben bisheriger Erträge ins reine zu setzen. Vgl. hierzu Feigl (Kt. IV), diese Zeitschr. 105, 255. 1920, daselbst Literatur und Werte.

lidierung dieser hat Verf. seither mitgearbeitet, wie mehrfach betont, auch im Dienste der R.-R. Verf. hält im übrigen an seiner derzeitigen Auffassung fest, die Anhalte für die R.-R. aus möglichst guten Werten für die Interferenzen herzuleiten¹⁾. Nur hat er in oft wiederholten Anläufen die Erfahrung bestätigt gefunden, daß man in reinen Lösungen, z. B. für Kreatinin, die Reduktionswerte nach einer bestimmten Methode zwar genügend fassen könne, daß aber einerseits in komplexen, den B.-Z.-Extrakten nachgebildeten, Ansätzen (die also mehrere bis viele Interferenzen führen), von einer Proportionalität, der Summe nach, leider in hinreichendem Grade nichts zu erwarten sei. Auch haben Versuche, mit größeren Einzelmengen Genaueres zu schaffen, von der Verschiebung der Maßstäbe ein natürliches Hindernis gegen den erstrebten Erfolg zu gewärtigen. Es wird sich jetzt darum handeln, die neuen R.-R.-Quoten der R.-N.-Größen, so gut es gehen will, tunlichst weitschichtig zu studieren, wozu auch die Pikratmethode des B.-Z. (Benedict) immer mehr drängt, von der Verf. (F.) ursprünglich schärfere Zuckerreduktionszahlen erwartet hatte. Wenn man nun auch noch nicht streng gezwungen ist, die neuen (indirekten) Kreatininzahlen nach und mit Greenald, trotz ihrer relativen Kleinheit, als Maximalwerte“ anzusehen, so ist doch durch die in diesem Zusammenhange aufgetauchte „chromogene“ Substanz der „Pikratreduktion“ vermutlich ein Faktor, der an der R.-R. der Cu-Methoden (speziell Mikro-Bangs) mitzuhelfen vermag. Es unterliegt wohl nur geringen Zweifeln, daß die R.N.-Stoffe reduzierenden Charakters in etwa mit Eges neuen Werten für die R.-R. normalen Blutes in Einklang gebracht werden können. Nun sind zu den Stoffen, die Feigl seinerzeit unter den Ursachen der R.-R. ins Auge faßte neue hinzugekommen. P. Mayers und Stepps Glucuronsäureversuche, trotz mancher Schwierigkeiten, in besonderen Anlässen (Menthol- und andere Gaben an Tiere) zu bestätigen, haben wir Gelegenheit gehabt. Auch mit Indican, Melanogen, Urobilinogen usw., mit Homögentisinsäure, Polyphenolen, Dioxy-purinen haben wir bereits Befunde erzielt. Dagegen ist es uns bisher nicht genügend gelungen, die auf das Vorkommen von Aldehyd wie von Ameisensäure weisenden Angaben zu bestätigen. Beobachtungen der geschilderten Art sind im Zusammenhange später mitzuteilen. Einfacher hat man es, in der Pathologie gewisse Blutbilder unter dem R.-R.-Gesichtspunkte zu bearbeiten. Obschon auch hier die neuen Werte der KreatinGruppe u. a. hineinspielen, und obschon nebenher andere Faktoren die R.-R. zu heben trachten, bleiben doch die Angaben meiner früheren Arbeit im Prinzip bestehen, wenn schon in praxi modifiziert. Ich habe ja selbst derzeit darauf hingewiesen, daß Morbus Brightii azotämischer Formen steigende Restreduktionen geben könne. Aber — meine Angaben sind derzeit ganz von den Werten für die fraglichen R.N.-Körper aus formuliert worden, daher nur von deren Stichhaltigkeit

¹⁾ Joh. Feigl (Restreduktion und Gesamtreduktion), diese Zeitschr. 77, 189. 1916. Einzelheiten in anderen Mitteilungen verschiedenen Inhalts. Zusammenfassung später.

abhängig. So wertvoll nun auch die Versuche Eges sind, bei experimenteller Urämie die R.-R. bis zu $\frac{1}{3}$ und $\frac{1}{6}$ der Gesamtreduktion zu beschreiben, so sind sie doch letzten Endes nur als Bestätigung meiner auf den R.N.-Komponenten ruhenden Schätzungen anzusehen. Freilich hat Ege sie in aller Schärfe unter seine Technik gestellt und dem Mikrobang eingeordnet. Daß er dabei Wesentliches für die Frage getan hat, sei hervorgehoben. Recht interessant wird es sein, die nach Ege einwandfrei gewonnene R.-R. mit den Schätzungen aus den selbständig gewonnenen Zahlen für die betreffenden R.N.-Stoffe zu vergleichen. Da wir auf diesem Gebiete arbeiten, hoffen wir Beiträge vorlegen zu können. Meines Erachtens hat man nun nach Ege auch die allgemein so hoch gewertete Möglichkeit, kritischen Hyperglykämiefunden näherzutreten. Ich habe solche beschrieben, die scheinbar „Hyperglykämie“ (Pseudhyperglykämie nach Ege) waren.

Schließlich möchte ich aussprechen, daß meine eigenen einschlägigen Arbeiten zu Resultaten führten, die mit denen Eges, Hagedorns, Gad-Andresens, Warburgs prinzipiell so weitgehend übereinstimmen¹⁾, daß ich zu dem gleichen Urteile über die Anschauungen von Falta und Richter-Quittnier gedrängt werde. In bezug auf die Äußerungen Warburgs kann ich nicht umhin, ganz besonders den methodischen Studien von Richter-Quittnier vielerlei Unklarheiten nachzusagen. Näheres ist heute zurückzustellen.

¹⁾ Autoren, diese Zeitschr. 1920. 107, 246, 248, 250, 252. Siehe dazu Joh. Feigl, diese Zeitschr. 1919; Bd. 101, 66. spez. Fußnote.

Berichtigung und Ergänzung zu unserer Arbeit: „Zur Chemie der Polysaccharide.“

Von

E. Herzfeld und R. Klinger.

(Aus dem Chem. Laborat. der Med. Klinik und aus dem Hygiene-Institut der Universität Zürich.)

(Eingegangen am 11. September 1920.)

In den unserer letzten Mitteilung zugrunde liegenden Versuchen haben wir eine Methode angewendet, welche für den Nachweis ganz geringer Traubenzuckermengen besonders geeignet schien. Dieselbe benützt die auch sonst übliche Osazonprobe (mit freier Base und konz. Essigsäure erhalten), die nach wiederholter Extraktion der zu untersuchenden Flüssigkeit mit 96 proz. Alkohol zur Anwendung kam. Eine große Anzahl verschiedener Versuche führte uns zu der Ansicht, daß bei der Einwirkung der sog. Diastasepräparate auf Polysaccharide kein Traubenzucker entstehe. Diese Behauptung können wir auch jetzt jedenfalls in der Hauptsache aufrechterhalten, indem die inzwischen angestellten Versuche auch weiter nur in ganz vereinzelt Fällen geringfügige Mengen von Glucose ergeben haben¹⁾. Wir haben aber zur Zeit, als wir die betreffende Arbeit schrieben, übersehen, daß diese Methode (entgegen unserer Annahme) für den Nachweis kleinerer Maltosemengen vollständig unbrauchbar ist. Erst von etwa 50 mg an tritt in der Regel typische Osazonbildung auf. Wir haben daher eine andere, speziell für den Nachweis von Maltose in der Literatur angegebene Methode herangezogen (Verwendung von HCl-saurem Phenylhydrazin (1 g) und Na-Acetat (1,5 g) zu 10 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit zugesetzt, 90 Min. kochendes Wasserbad, dann Filtration). Es zeigte sich, daß diese

¹⁾ Nur im Serum mancher Tierarten (namentlich Hund, Rind) finden sich Stoffe, welche Stärke bis zu Dextrose aufspalten, in deutlich nachweisbarer Menge.

Methode in der Tat nicht nur für den Nachweis von Glucose, sondern auch von Maltose und selbst von anderen Kohlenhydraten wie Glucosamin usw. weit besser geeignet ist. Diese Feststellung machte es uns zur Pflicht, alle jene Versuche, bei denen kein Abbau von Stärke nachweisbar gewesen war, einer Nachprüfung zu unterziehen.

Hierbei ergab sich nun, daß im Gegensatz zu den mit der früheren Technik ausgeführten Versuchen Maltose in deutlichen Mengen nachweisbar war, sobald Stärke oder Dextrin mit einem Diastasepräparat digeriert wurde. Unsere Behauptung, daß bei der Diastasewirkung kein Zucker auftrete, müssen wir daher als einen durch mangelhafte Technik bedingten Irrtum bezeichnen.

Nachdem durch diese Feststellung erhärtet ist, daß durch die diastischen Stoffe eine Hydrolyse der Polysaccharide tatsächlich herbeigeführt wird, war es von Interesse zu untersuchen, ob dieser Abbau mit der Schnelligkeit und in den Mengenverhältnissen vor sich geht, wie es den in der Literatur verbreiteten Ansichten entspricht. Nach denselben findet ja durch gute Diastasepräparate schon in wenigen Minuten eine Aufspaltung der Stärke bis zu 80 und mehr Prozent statt. Wäre dies der Fall, würde somit eine bestimmte Menge Stärke zum größten Teil in Zucker übergeführt, so war zu erwarten, daß die Maltose nach der Digestion aus dem Gemisch ohne Schwierigkeiten wieder isolierbar und meßbar sein werde. Wir haben daher folgendes Verfahren angewendet um diese Frage zu entscheiden:

Einige Gramm Stärke („lösliche“ oder gereinigte) werden in Wasser gelöst und $\frac{1}{10}$ des Gewichtes an Diastase zugesetzt. Nach der Auflösung der letzteren bleibt das Gemisch 24 Stunden im Brutschrank. Eine mit kleineren Mengen angesetzte zweite Probe gibt dann mit der obenerwähnten Osazonmethode deutliche Maltosereaktion. Das Stärke-Diastasegemisch wird nunmehr mit dem 5–6fachen Volumen absoluten Alkohols versetzt und mit diesem auf dem Wasserbade in einer Porzellanschale eingedampft. Man fügt noch weiteren Alkohol zu, sobald das Flüssigkeitsvolumen stärker eingeengt ist. Diese Alkoholzusätze haben den Zweck, eine Hydrolyse während des Eindampfens zu vermeiden und außerdem ein allzu festes Zusammensintern des Rückstandes zu verhindern, dem letzteren vielmehr eine mehr poröse Struktur zu geben; dadurch soll die spätere Extraktion erleichtert werden. Aus dem gleichen Grunde wird auch der schon trockene Rückstand noch einige Male mit etwas Alkohol versetzt, dieser bis zum Sieden erhitzt und wieder eingedampft. Schließ-

lich wird der Rückstand bis zum konstanten Gewicht auf dem Wasserbad getrocknet und gewogen. Er sollte, wenn die oben erwähnten Angaben richtig wären, zu 80–100% aus Maltose bestehen. Da diese sowie allfällig entstandene andere Mono- oder Di-Saccharide in 96% Alkohol löslich wären, so müßte nach geeigneter Extraktion des Rückstandes mit diesem Lösungsmittel ein entsprechender Gewichtsverlust feststellbar sein. Es ergab sich aber, daß durch 4–5 maliges Auskochen mit genügenden Mengen jeweils erneuerten Alkohols bloß eine Gewichtsabnahme erzielt wird, die sich in weit bescheideneren Grenzen hält. Wir geben im folgenden die Werte an, die bei einer Anzahl derartiger Versuche erhalten wurden:

1. 5 g lösliche Stärke in 100 ccm Wasser gelöst + 0,5 g Diastase (Präparat Prof. Winterstein) stehen 24 Stunden unter Toluol bei 37°. Gewichtsverlust des Rückstandes nach der Extraktion mit siedendem Alkohol: 0,4 g.

2. 2 g lösliche Stärke in 20 ccm Wasser + 0,2 g Diastase Kahlbaum; Gewichtsverlust: 0,3 g.

3. 1,2 g lösliche Stärke in 10 ccm Wasser + 12 ccm Speichel. Gewichtsverlust: 0,15 g.

4. 2 g Stärke in 10 ccm Wasser + 10 ccm Rinderserum. Gewichtsverlust: 0,4 g. (Da hier auch die Serumlipoide bei der Extraktion entfernt wurden, so darf der Zuckergehalt des Rückstandes wohl nur auf etwa 0,35 g angesetzt werden.)

Wir sehen also, daß unter den gewählten, der üblichen Versuchsanordnung entsprechenden Mengenverhältnissen von einer Verzuckerung der Stärke bis zu 80 und mehr Prozent nicht die Rede sein kann, da die Mengen der alkohollöslichen Zucker nur 10–20% der verwendeten Stärke betragen. Die Jodreaktion des in etwas Wasser aufgelösten Rückstandes war dagegen stets negativ, also anscheinend eine vollständige Aufspaltung der Stärke eingetreten.

Die verwendeten Diastasen wirken somit nicht in der Weise, wie es für fermentative Umsetzungen ursprünglich als charakteristisch galt, daß nämlich das Ferment immer weitere Mengen des Polysaccharids aufspaltet, ohne selbst verbraucht zu werden. Vielmehr bestehen hier recht ausgesprochene quantitative Beziehungen, die, wie aus den mitgeteilten Mengenverhältnissen hervorgeht, nicht durch Ausbildung von Gleichgewichten erklärbar sind¹⁾, welche die weitere Aufspaltung hemmen, sondern auf der regelrechten Zerstörung der in der Diastase wirksamen Stoffe beruhen müssen.

¹⁾ Man vergleiche die Mengenverhältnisse der 4 mitgeteilten Versuche untereinander!

Es war von Interesse zu untersuchen, ob die nach der Alkohol-Extraktion erhaltenen Rückstände, die, wie erwähnt, bereits jodnegativ reagierten, bei erneuter Einwirkung einer gleichen Diastasemenge sich als besonders empfindlich, d. h. leichter aufspaltbar erweisen würden oder nicht.

Die folgenden Versuche geben hierüber Aufschluß: drei verschiedene Polysaccharide wurden jeweils in der Menge von 1 g mit je 0,1 Diastase Siegfried wie oben angegeben digeriert und die Menge des gebildeten Zuckers gleichfalls in der beschriebenen Weise (Alkoholextraktion) bestimmt. Hierauf wurden die Rückstände abermals in 100 ccm Wasser gelöst und noch einmal mit je 0,1 frischer Diastase digeriert. Die beistehende Tabelle zeigt die nach der ersten und nach der zweiten Diastasebehandlung erhaltenen Zuckerwerte:

	Erste Digestion	Zweite Digestion
Lösliche Stärke (Reis)	0,23 g	0,22 g
Unlösliche Kartoffelstärke	0,25 g	0,27 g
Glykogen	0,23 g	0,25 g

Es ergibt sich, daß die jeweilige Hydrolyse nahezu gleiche Zuckerwerte lieferte, daß somit nur die Menge der zugesetzten Diastase, nicht aber die Beschaffenheit des aufzuspaltenen Polysaccharids maßgebend war. (Daher auch Glykogen trotz seinem viel höheren Dispersitätsgrade nicht stärker aufgespalten wurde als die vollständig unlösliche Kartoffelstärke.)

Aus welcher Art von Polysacchariden bestehen nun die nach derartiger prolongierter Diastaseeinwirkung zurückbleibenden Alkoholrückstände? Wir haben die aus dem zuletzt angeführten Versuch erhaltenen Rückstände in wenig Wasser gelöst, die Lösung mit 33% Kalilauge versetzt und leicht erwärmt, dann mit Alkohol wiederholt gefällt, den Rückstand mit verdünnter Salzsäure neutralisiert und noch einige Male mit Alkohol gewaschen, die schließlich erhaltene, fast schneeweiße Masse ergab in etwas Wasser gelöst und mit Jodlösung versetzt: aus Stärke eine blauviolette, aus Glykogen eine rotbraune Färbung. Entsprechend dem in unserer letzten Mitteilung über die Jodreaktion Gesagten müssen wir annehmen, daß diese Polysaccharide durch die Diastase zwar so hochdispers verteilt wurden, daß sie zunächst keine positive Jodreaktion mehr geben, daß aber nach Zerstörung der diese höhere Dispersität bewirkenden Lösungsvermittler durch die Behandlung mit Lauge die Oberfläche der Dextrin-

teilchen wieder bloßgelegt wird; sie kleben daher bei der Alkohol-fällung aneinander und gehen, wenn wir sie jetzt in Wasser in kolloide Verteilung bringen, nicht mehr in einen so hohen Dispersitätsgrad über, sondern bleiben grob dispers genug, um mit Jod die Dextrin-, ja sogar schon nahezu die Stärkereaktion zu geben.

Dieser Versuch dürfte nicht nur für die Theorie der Jodreaktion von Interesse sein, sondern namentlich auch für die Frage nach der Wirkungsweise der Diastasen; denn er zeigt, daß die Diastasen die Polysaccharide, soweit sie nicht eine wirkliche Hydrolyse derselben bewirken, nur in ihrem Dispersitätsgrad verändern, so daß es möglich ist, das scheinbar verdaute Dextrin usw. durch Wegnahme der Lösungsvermittler wieder in die hochdisperse Ausgangsstufe zurückzuführen.

Die Diastasen beeinflussen somit die Polysaccharide in zweifacher Weise: 1. Indem sie als bloße Lösungsvermittler dieselben in einen höheren Dispersitätsgrad überführen. 2. Indem sie hydrolytische Vorgänge an den durch ihre Anwesenheit mit dem Wasser in Beziehung gesetzten Oberflächen der Teilchen auslösen. Die erste Wirkung haben die Diastasen mit verschiedenen anderen z. T. chemisch einfach gebauten Stoffen gemeinsam, von denen wir in unserer letzten Arbeit namentlich das Formalin, sowie tiefere Eiweiß- und Lipoidspaltprodukte hervorgehoben haben. Die hydrolytisch aktiven Bestandteile der Diastasen sind dagegen komplexer und zugleich viel labiler gebaut, sie sind es, auf welchen die „fermentative“ Funktion dieser Stoffe eigentlich begründet ist. Ihre chemische Natur ist gegenwärtig noch unklar; vermutlich handelt es sich um höhere Spaltstücke der Eiweißkörper oder der Lipoide, die ihre Wirksamkeit nur solange besitzen, als sie nicht selbst aufgespalten sind. Da dieser Zerfall in niedere, unwirksame Bestandteile auch bei der hydrolytischen Aufspaltung der Dextrine stattfindet, werden sie bei der Fermenttätigkeit verbraucht. Sie wirken daher nur quantitativ spaltend und sind gegenüber allen intensiveren Einwirkungen, namentlich im wässrigen Milieu, sehr empfindlich (Labilität dieser „Fermente“).

Die beiden Wirkungsweisen der Diastasen lassen sich durch folgende Versuchsanordnungen getrennt nachweisen: Wenn man eine Diastase-

lösung oder Speichel etwa 5 Minuten zum Kochen erhitzt und dann (nach Abfiltration einer evtl. eingetretenen Ausflockung) mit fallenden Mengen löslicher Stärke digeriert (20 Stunden 37°), so zeigt sich, daß auch jetzt noch die dispersitätssteigernde Wirkung wenigstens teilweise erhalten ist, während eine Zuckerabspaltung nicht mehr eintritt. Bei Verwendung von 1 ccm erhitzten Speichels auf 50 mg löslicher Stärke ist die Jodreaktion vollständig verschwunden, eine unserer Diastasen ergab dagegen in der Menge von 50 mg folgende Reihe:

Mit 50 mg lösl. Stärke noch blaue Jodreaktion
„ 10 „ „ „ rotbraune Färbung
„ 1 „ „ „ keine spezif. Färbung mehr.

Alle Proben waren vollständig zuckerfrei.

Diese Auffassung der Diastasewirkung, speziell die Abtrennung der bloßen Dispersitätserhöhung von der eigentlichen Hydrolyse dürfte für diesen Zweig der Fermentchemie eine wesentliche Klärung bringen, da diese beiden Vorgänge bisher nur ungenügend oder nicht auseinandergelassen wurden. Auf den ersteren geht die fast momentane Wirkung zurück, wie sie bei Einwirkung von Speichel usw. auf gelöste Stärke und ähnliches beobachtet wird (fast sofortiges Verschwinden der Jodreaktion), während die wirkliche Aufspaltung erst allmählich einsetzt und, wie wir gesehen haben, innerhalb weit bescheidener Grenzen bleibt. Aus diesem Grunde möchten wir die in unserer letzten Mitteilung aufgestellte Vermutung auch weiter aufrechterhalten, daß die Polysaccharide im tierischen und pflanzlichen Organismus nicht nur in Form von Zucker zirkulieren, sondern zum großen Teil bereits auf der jodnegativen Dextrinstufe von einer Zelle zur anderen wandern. Denn die fein kolloide Verteilung erfolgt überall schnell, wo reichliche Lösungsvermittler vorhanden sind, viel zu schnell, als daß die weit langsamere Hydrolyse mit ihr gleichen Schritt halten könnte. Die Diffusion tritt aber schon ein, sobald eine gewisse Kleinheit der Teilchen und eine Beziehung ihrer Oberflächen zum Wasser erreicht ist.

Die Farbstoffanalyse des Harnes. II¹⁾.

Das Urochromogen.

Von

M. Weiss (Wien-Gleichenberg.)

(Eingegangen am 13. September 1920.)

Einleitung.

Mit dem Namen „Urochromogen“ habe ich im Jahre 1907²⁾ den Körper bezeichnet, welcher der Ehrlichschen Diazoreaktion zugrunde liegt. Diese Bezeichnung war durch folgende Eigenschaften des Körpers gerechtfertigt: 1. Gab er alle Fällungsreaktionen des Urochroms. 2. Gab er nach seiner Oxydation eine Diazoreaktion, welche zwar noch rote Flüssigkeit, aber schon den weißlichen Schaum der dem Urochrom zukommenden Diazoreaktion aufwies. 3. Trat durch verschiedene Oxydationsmittel eine intensive Gelbfärbung auf, welche dem normalen Urochrom entsprach.

Im Jahre 1910³⁾ habe ich, nachdem als eine der Ursachen der Inkonzanz der Ehrlichschen Reaktion eine Substanz gefunden war, die erst nach dem Stehen im Brutschrank diese Probe deutlich gibt⁴⁾, eine neue Harnreaktion beschrieben, welche auf der unter Punkt 3 beschriebenen Eigenschaft des Urochromogens und seiner Vorstufe beruht. Durch colorimetrische Untersuchungen wurde die Verwandtschaft des Urochromogens mit dem Urochrom erhärtet⁵⁾.

Schon in früheren Untersuchungen⁶⁾ konnte ich die Beziehungen des Urochromogens zum endogenen Eiweißzerfall durch den Befund gleichzeitig vermehrter Neutralschwefelausscheidung sicherstellen. Dieses auch aus der klinischen Beobachtung⁷⁾ sich ergebende Verhalten räumt dem Urochrom und Urochromogen eine besondere Stellung unter den Stoffwechselprodukten ein, indem wir in diesen Körpern rein endogene Schlacken vor uns haben.

1) Siehe diese Zeitschr. **102**, 228. 1920.

2) Beitr. z. Klin. d. Tuberkul. **8**, 177; Wien. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 33.

3) Med. Klin. 1910, Nr. 42.

4) Med. Klin. 1910, Nr. 22.

5) Diese Zeitschr. **30**, 333. 1911.

6) Diese Zeitschr. **27**, 175. 1910.

7) Diese Zeitschr. **30**, 352. 1911.

Durch die quantitative Auswertung der dem Urochromogen zukommenden Gelbfärbung einerseits¹⁾ und der zur Erreichung des Maximums an Färbung andererseits benötigten KMnO_4 -Menge habe ich ein Maß für die Diazoreaktion aufgestellt²⁾. In der letzten Zeit³⁾ glaube ich durch Vergleich mit dem eine ähnliche Diazoreaktion gebenden Tyrosin ein neues und vielleicht besseres Maß für das Urochromogen gefunden zu haben⁴⁾.

Was die chemische Stellung des Urochromogens betrifft, so habe ich, da positive Anhaltspunkte nicht vorlagen, ähnlich wie Ehrlich, Brieger und Clemens per exclusionem arbeiten müssen. In meiner ersten Arbeit⁵⁾ war ich geneigt, den Körper als ein Oxyphenylderivat anzusehen. Doch haben schon Ehrlich und Brieger das Tyrosin und die Oxysäuren ausgeschlossen. Ich habe den Harn auf Histidin⁶⁾ und Tryptophan bzw. Derivate derselben untersucht, konnte aber keine quantitativen Beziehungen zwischen diesen Körpern und dem Urochromogen finden⁷⁾.

Einen Fortschritt in der Urochromogenfrage brachte erst die Anreicherung des Körpers durch die Darstellung seiner Fraktion⁸⁾. Diese erlaubte mit bedeutend konzentrierteren Lösungen zu arbeiten, und Erscheinungen, die in verdünnter Lösung nicht auftraten oder der Beachtung entgingen, waren jetzt infolge der Konzentration sinnfälliger geworden. Da diese Fraktion den Ausgangspunkt für die weiteren Ergebnisse darstellt, so will ich an sie anknüpfen. Wegen der vielfachen Analogien mit dem Urochrom und zum besseren Verständnisse bin ich auch stellenweise auf dieses näher eingegangen⁹⁾.

I. Die Urochromogenfraktion.

Die Urochromogenfraktion wird hergestellt, indem man den Harn nach den in früheren Arbeiten¹⁰⁾ dargelegten Gesichtspunkten zerlegt. Die Fraktion I enthält überwiegend die Farbstoffe der Urobilingruppe, daneben etwas Urochromogen, die Fraktion II fast nur Urochromogen, die Fraktion III ist farblos. Kommt es nur auf die qualitative Prüfung an, so kann man das in der Fraktion I enthaltene Urochromogen, welches höchstens 20% der Gesamtmenge beträgt, vernachlässigen. Bei genauer quantitativer

¹⁾ l. c.

²⁾ Diese Zeitschr. **81**, 341. 1917.

³⁾ Diese Zeitschr. **102**, 228. 1920.

⁴⁾ Wien. Arch. f. innere Med. **1**, 359. 1920.

⁵⁾ Beitr. z. Klin. d. Tuberkul. **8**.

⁶⁾ Diese Zeitschr. **58**, 119. 1913 und **81**, 342. 1917.

⁷⁾ Diese Zeitschr. **102**, 241. 1920.

⁸⁾ l. c.

⁹⁾ Siehe auch Wien. Arch. f. innere Med. **1**, 359. 1920.

¹⁰⁾ Diese Zeitschr. **102** und Arch. f. innere Med. l. c.

Untersuchung fällt man, nachdem die vorgeschriebene Menge Bleiacetat zur Lösung gekommen ist, bis zur Farblosigkeit mit Lauge aus und bringt auf diese Weise die Fraktion I und II vereinigt auf das Filter. Man zerlegt den massigen Niederschlag entweder mit verdünnter H_2SO_4 oder Na_3PO_4 in Substanz, neutralisiert in beiden Fällen bis zu schwach saurer, dann mit $BaCO_3$ bis zu neutraler Reaktion, fügt in einer Reibschale pro 100 ccm 80 g Ammonsulfat hinzu, zerreibt und filtriert nach kurzem Abstehen. Das Filtrat ist praktisch als frei von Farbstoffen der Fraktion I anzusehen und enthält quantitativ das Urochromogen¹⁾.

Den Bleiniederschlag des Urochromogens (Fraktion II) kann man noch durch Umfällen reinigen. Man löst ihn in 5—10 proz. Essigsäure, wobei ein rötlichbrauner, in verdünnter Essigsäure fast unlöslicher Rückstand bleibt. Er besteht aus Teilen der Fraktion I, welche in das Filtrat übergangen und sonst erst bei der Ammonsulfataussalzung beseitigt werden. Löst man diesen Rückstand in verdünnter H_2SO_4 , so kann man leicht durch spektroskopische Untersuchung Urobilin und Uroerythrin nachweisen. Das letztere verrät sich auch durch die starke Reduktion von ammoniakalischer Silbernitratlösung. Außerdem pflegt meistens auch etwas Urochromogen der Lösung zu entgehen. Die essigsäure Lösung fällt man wieder mit Lauge aus, wobei jedoch zu lange Laugenwirkung zu vermeiden ist und filtriert von ungelöst gebliebenen Teilen wieder ab. Soll der Niederschlag bis zum nächsten Tage stehenbleiben, so muß man ihn mit Wasser laugefrei waschen. Die Umfällung kann man 2—3 mal wiederholen und erhält auf diese Weise die Urochromogenfraktion schon in wesentlich reinerem Zustand. Nach Beendigung der Umfällung zerlegt man den Niederschlag, wie früher beschrieben, und salzt mit Ammonsulfat aus.

Je nach der Menge des Ausgangsharnes erhält man eine mehr weniger konzentrierte Urochromogenlösung, an der man die Eigenschaften des Körpers schon gut verfolgen kann.

II. Farbe des Urochromogens.

Die Farbe des Urochromogens ist bei neutraler Reaktion gelbgrün. Sie unterscheidet sich von der Farbe des Urochroms bei gleicher Reaktion durch den grünlichen Ton. Urochrom hat

¹⁾ Das gleiche gilt vom Urochrom.

eine mehr mattgelbe Farbe. Das gleiche kann man auch an den entsprechenden Bleiniederschlägen, besonders nach der Umfällung sehen. Das gelbgrüne Bleisalz des Urochromogens dunkelt an der Oberfläche nach, was man nach 24 Stunden durch Abstreifen der obersten Schicht gut erkennen kann, das mattgelbe Urochromsalz dunkelt auch, aber schon weniger nach. Läßt man einen Bleiniederschlag des Urochromogens längere Zeit insbesondere bei alkalischer Reaktion an der Luft stehen, so wird er mit der Zeit bräunlich, verliert außerordentlich an Löslichkeit in Essigsäure und seine Lösungen haben dann schon an der Ehrlichen und KMnO_4 -Probe Einbuße erlitten oder sie verloren. Diese Veränderung verläuft schon in der Richtung der von mir sogenannten Alkaptochrom- oder, wie ich jetzt genauer sagen kann, Uromelaninbildung, welche sowohl beim Urochromogen wie beim Urochrom auftritt. Läßt man eine ganz klare essigsäure Lösung des Pb-Urochromogens, welche rein gelbgrün ist, einige Wochen stehen, so dunkelt dieselbe nach und es fällt eine dunkelbraune Bleiverbindung aus, welche derselben Umwandlung des Farbstoffes in Uromelanin ihre Entstehung verdankt (s. sp.). Das gleiche gilt vom Urochromblei.

Zum colorimetrischen Vergleich des Urochromogens (und Urochroms) habe ich schon 1911¹⁾, dem Beispiele Klempereers folgend, das Echtgelb herangezogen. Damals wurde eine Lösung von 0,1 g Echtgelb in 20 l H_2O verwendet und die in 100 cm dieser Lösung enthaltene Farbstoffmenge 100 gleichgesetzt. In der Differenz zwischen dem nach Ammonsulfataussalzung und KMnO_4 -Behandlung bis zum Verschwinden der Diazoreaktion oder bis zum Eintritt der maximalen Gelbfärbung erhaltenen Echtgelbwerte und dem gleichen Werte des nativen Harnes nach Ammonsulfataussalzung hatte ich ein Maß für die Diazoreaktion gefunden und folgenden Schluß ziehen dürfen: „Die colorimetrische Untersuchung der Harnes mit positiver Diazoreaktion ergibt, daß zwischen der Intensität der Diazoreaktion nach Ehrlich und der Zunahme des Urochromgehaltes durch die Oxydation eine direkte Proportionalität besteht.“ Als ich dann später²⁾ die Urochromausscheidung allein colorimetrisch untersuchte, erwies sich

¹⁾ Diese Zeitschr. **30**, 345. 1911.

²⁾ Sitzungsbericht d. Wien. Akad. d. Wiss. 3. I. 1913.

diese Echtgelblösung als zu hell gegenüber dem Urochrom, und so habe ich die Zusammensetzung derselben in der Weise abgeändert, daß ich zu obiger Echtgelblösung 5 ccm einer Lösung von 0,1 Bismarckbraun in 5 l H_2O hinzufügte.

Aber auch diese Vergleichsflüssigkeit war noch nicht vollkommen entsprechend, weshalb ich später¹⁾ zu einer Echtgelblösung 1 : 50 000 40 ccm einer Bismarckbraunlösung 1 : 40 000 dazu gab. Zwar gab es Urochromogen- und Urochromfraktionen, die im Colorimeter nach Dubosq oder Authenrieth absolut dieser neuen Vergleichsflüssigkeit entsprachen, aber wieder andere hatten schon bräunlichen Ton und ließen Zweifel an der Richtigkeit der Methode zurück. Wenn auch der colorimetrische Vergleich im großen ganzen einen Parallelismus zwischen dem Farbstoffwerte und der Intensität der Diazoreaktion bzw. $KMnO_4$ -Probe ergab, so war doch kein sicherer Faktor zu gewinnen, der erlaubt hätte zu sagen, daß z. B. immer einem bestimmten Diazowerte eine gleiche Farbstoffmenge entsprach.

Einige Beispiele mögen diese Verhältnisse illustrieren und zugleich zeigen, wie vorgegangen wurde: Patient H. F., Typhusverdacht, Harnmenge pro die 2000 ccm, Diazoreaktion negativ, $KMnO_4$ -Probe fraglich. 500 ccm wurden ausgefällt und zur Urochrom(ogen)-Fraktion verarbeitet. Nach Lösung in Na_3PO_4 , Neutralisation mit H_2SO_4 bis zu schwach saurer, mit $BaCO_3$ bis zu neutraler Reaktion waren 60 ccm, nach Ammonsulfataussatzung 81 ccm vorhanden. Die colorimetrische Bestimmung durch Vergleich mit der zuletzt angeführten Vergleichsflüssigkeit ergab bei ausgezeichneter Vergleichbarkeit im Dubosq $\frac{8}{20}$, daher pro die = $\frac{2000 \cdot 81 \cdot 8}{500} = 260$. Die Diazoreaktion des Ammonsulfatfiltrates war positiv und entsprach nach zweimaliger Verdünnung einer 1:3000 Tyrosinlösung, ihr Diazowert in Tyrosin ausgedrückt daher = $\frac{2000 \cdot 81 \cdot 2 \cdot 1}{500 \cdot 3000} = 0,21$. Die Relation zwischen dem Tyrosinwert der Diazoprobe und dem Echtgelbwerte = $0,21 : 134 = 1 : 60$ (abgerundet).

Andere colorimetrische Bestimmungen ergaben folgende Relationen 0,25:190 = 1:80; 0,58:350 = 1:60; 0,25:120 = 1:50; 0,6:400 = 1:66.

Obgleich ich mich mehrere Jahre mit der Ausarbeitung einer sicheren colorimetrischen Bestimmung der gelben Harnfarbstoffe beschäftigte, so kam ich doch zu keinem brauchbaren Resultate. Die Ursache habe ich erst allmählich erkannt.

Der Hauptgrund für die Unmöglichkeit, einen sicheren Farbstoffwert für das Urochromogen festzustellen, ist, daß dieser

¹⁾ Diese Zeitschr. 102, 233.

Farbstoff (und ebenso auch das Urochrom) selbst seiner Natur nach nicht stabil ist. Schon die Zusätze des Bismarckbrauns zu den Vergleichsflüssigkeiten zeigen, daß in die gelbe bzw. gelbgrüne Farbe dieser Körper ein bräunlicher Ton sich mengen kann. Dieser bräunliche Ton ist schon auf die Umwandlung in einen bräunlichen Farbstoff zurückzuführen. In einer früheren Arbeit¹⁾ habe ich gesagt: „Die Fraktion II kann nur so lange bezüglich ihrer Farbe als Einheit angesehen werden, als darin enthaltenes Alkaptochromogen noch nicht zum Nachdunkeln der Flüssigkeit geführt hat.“ Es war mir damals noch nicht ganz klar, daß das Urochromogen (und Urochrom) selbst dieses Alkaptochromogen darstellen. In den stetig steigenden Bismarckbraunzusätzen zu meinen Vergleichsflüssigkeiten zeigt sich schon das Bestreben, das Nachdunkeln förmlich zu erfassen und einzuholen, was aber nicht möglich war. Denn das Urochromogen kann bei neutraler Reaktion schon innerhalb eines Tages um 50% an Farbenintensität zunehmen und innerhalb 8 Tagen um das Doppelte bis Dreifache, wobei aber auch schon Farbstoff auszufallen beginnt, der eine ganz andere Tinktion als die Vergleichsflüssigkeit besitzt. Dieser Farbstoff ist ein echtes Melanin, worauf ich noch später zurückkomme. Das Nachdunkeln der Lösungen der gelben Farbstoffe (dies tritt naturgemäß beim Urochromogen am deutlichsten hervor) ist auf ihre alkaptochromogenen Eigenschaften, d. h. auf ihre Tendenz zur Bildung dunklerer Oxydationsprodukte, zurückzuführen, die besonders bei alkalischer Reaktion vorhanden ist. Eine Stabilität der gelben Harnfarbstoffe ist erst nach ihrer vollständigen Absättigung mit Sauerstoff erreicht, wobei sie aber schon aus ihrer (besonders mit Ammonsulfat gesättigten) Lösung auszufallen beginnen (Uromelaninbildung).

Eine zweite Ursache der Unbeständigkeit der Urochrom(ogen)farbe liegt in ihrer Abhängigkeit von der Ionenkonzentration. Selbst gleich reagierende Lösungen verhalten sich verschieden, je nach der Menge der in ihnen gelösten Salze. So habe ich nachweisen können, daß durch Ammonsulfataussalzung der Farbstoffwert des Urochromogens um fast $\frac{2}{3}$ abnehmen kann. Eine derartig empfindliche Substanz colorimetrisch zu erfassen, gehört sicherlich zu den schwierigsten Aufgaben.

¹⁾ Diese Zeitschr. 102, 237.

Eine dritte Ursache für den schwankenden Parallelismus zwischen Farbstoff- und Urochromogengehalt kann in Spuren noch nicht beseitigter Farbstoffe der Fraktion I liegen, welche weder spektroskopisch noch anderweitig nachweisbar zu sein brauchen. Geringe Mengen dieser Farbstoffe können auch der Aussalzung durch Ammonsulfat entgehen, und obgleich sie praktisch nicht in Betracht kommen, doch bei der so empfindlichen colorimetrischen Methode einen Fehler bedingen.

Als vierte Ursache kommt in Betracht, daß möglicherweise in der gelben Farbstoff-Fraktion noch andere vielleicht der Nahrung entstammende und durch Ammonsulfat nicht aussalzbare Farbstoffe enthalten sind, die zwar an der Farbe wenig Anteil haben, aber doch in der Colorimetrie zum Ausdruck kommen.

Aus diesen Gründen halte ich die exakte Bestimmung des Urochroms und Urochromogens als solche auf colorimetrischem Wege für ein vergebliches Bemühen. Daß auch beim nativen Harn die Reaktionsverhältnisse bei der Farbe eine Rolle spielen, lehrt die Beobachtung. So pflegen stark saure Diabetesharne, wenn sie (wie bei komplizierender Phthise) gleichzeitig Urochromogen enthalten, blässer zu sein als andere Harne. Vielleicht treten alle diese Verhältnisse beim nativen Harne weniger deutlich hervor, weil ja, wie ich in einer früheren Arbeit¹⁾ ausgeführt habe, das Urochrom(ogen) an der Farbe des Harnes nur einen relativ kleinen Anteil hat.

Das Urochromogen zeigt keinerlei Absorptionsband. Je nach seiner Konzentration absorbiert es mehr weniger vom rechten Ende des Spektrums. Das durch Oxydationsmittel verwandelte Chromogen erweist sich colorimetrisch als absolut identisch mit dem aus normalem Harne dargestellten Urochrom. Schumm²⁾ hat das gleiche durch spektrophotometrische Untersuchung feststellen können.

Die Farbe des Urochromogens ist außerordentlich abhängig von der Reaktion der Flüssigkeit. Fügt man einen Tropfen einer verdünnten Säure zur neutralen Lösung hinzu, so blaßt die Farbe ganz wesentlich ab, ebenso, wie ausgeführt, durch Sättigung mit Ammonsulfat oder einem anderen Salze.

¹⁾ l. c.

²⁾ Farbstoffe und Reaktionen bei Tuberkulose. Hamb. Tub.-Fortbild.-Kurs 1, 143.

Fügt man Alkali hinzu, so tritt eine bedeutende Verstärkung der dem neutralen Urochromogen zukommenden gelbgrünen Farbe auf, welche so charakteristisch ist, daß Klaffen¹⁾ darauf eine neue Harnreaktion aufgebaut hat. Es handelt sich bei dieser Reaktion schon um eine Alkaptonreaktion, d. h. um ein unter O-Aufnahme bei alkalischer Reaktion entstandenes Nachdunkeln. Daher ist diese Farbenänderung durch Alkali nicht mehr ganz reversibel und auch schon von einer Abnahme bzw. bei schwacher Konzentration von einem Verschwinden der Diazo- und KMnO_4 -Probe gefolgt. Die Farbenänderung durch Alkali ist ähnlich, wenn auch nicht so stark wie durch Permanganatzusatz.

Überschichtet man eine Urochromogenlösung mit Alkali und läßt die Probe 24 Stunden stehen, so bildet sich an der Berührungsstelle ein brauner Ring, während die gewöhnliche Alkaliprobe nach dieser Zeit eine deutlich braune Tinktion in der ganzen Flüssigkeit angenommen hat. Fügt man zu einer neutralen oder schwach alkalischen Lösung statt 1 promill. 1 proz. Permanganatlösung, so erhält man sogleich Braunfärbung.

Konzentrierte Urochromogenlösungen geben, wenn sie schon einige Zeit am Lichte gestanden und etwas nachgedunkelt sind, beim Überschichten mit Lauge manchmal schon innerhalb sehr kurzer Zeit Braunfärbung.

Das Urochromogen dunkelt, wie nicht anders zu erwarten, auch beim Eindampfen nach. Dies geschieht schon bei der nativ sauren Reaktion des Harnes. So wurde durch colorimetrische Bestimmung eine Zunahme des Echtygelbwertes durch Eindampfen einer Urochromogenfraktion auf $\frac{1}{3}$ des Volumens von 250 auf 700 festgestellt. Parallel mit dem Nachdunkeln geht die Abnahme der Diazo- und besonders der Permanganatreaktion. Die letztere ist in noch deutlicherer Beziehung zur Farbe der Substanz als die Diazoprobe, die ja, wenn auch schon im Sinne Ehrlichs negativ (rote Flüssigkeit und weißlicher Schaum), noch beim Urochrom vorhanden ist, während dieses bei der KMnO_4 -Probe nur eine geringe Farbenänderung ergibt. Hieraus und aus der Tatsache, daß von mir ein Urochromogen α gefunden wurde, das erst nach der Autolyse die Ehrlichsche, aber doch schon die KMnO_4 -Reaktion gibt, dürfte vielleicht der Schluß gerechtfertigt sein, daß das Kaliumpermanganat an einer anderen Stelle des Urochromogenmoleküls angreift als die Diazobenzolsulfonsäure.

¹⁾ Die Alkalireaktion des Harnes. Med. Klin. 1918, Nr. 38.

III. Die Diazoreaktion.

In der Urochromogenfraktion finden wir die Ehrlichsche Diazoreaktion rein und typisch wieder. Wird die Fraktion I getrennt von der Fraktion II dargestellt, so ist auch in ihr eine, wenn auch schwächere Reaktion zu finden. Diese ist an den durch Ammonsulfat nicht aussalzbaren Teil der Fraktion geknüpft, welcher nichts anderes darstellt als durch Bleiacetat mitgefälltes Urochromogen, was an der Farbe und den sonstigen Reaktionen zu erkennen ist. Der Ammonsulfatniederschlag enthält dagegen kein Urochromogen. Die farblose Fraktion III gibt keinerlei Diazoreaktion.

Die Diazoreaktion, wie sie nach Ehrlich ausgeführt wird, arbeitet mit einer minimalen Menge von Diazobenzolsulfonsäure. Während z. B. für den Nachweis des Histidins¹⁾ die vorgeschriebene Sulfanilsäurelösung (Ac. sulfan. 1,0, Ac. hydr. conc. puri 10,0, Aq. dest. 200,0) mit dem doppelten Quantum $\frac{1}{2}$ proz. NaNO_2 -Lösung diazotiert wird, verwendet man bei der Ehrlichschen Probe nur sehr geringe Mengen NaNO_2 .

Ich diazotiere 24 ccm der Sulfanilsäurelösung mit 1 ccm Natriumnitrit. Diese Lösung enthält nur den 72. Teil NaNO_2 gegenüber der für den Histidinnachweis angewandten. Es reagieren bei der Ehrlichschen Probe nur bestimmte Substanzen mit elektiver Avidität zum Diazoreagens. Unter ihnen nimmt das Urochromogen den ersten Platz ein. Nach ihm beteiligen sich, wenn auch in geringer Menge, auch die Oxysäuren an der Diazoprobe, während die Histidinderivate des Harnes²⁾ gar nicht in der Ehrlichschen Reaktion zum Ausdruck kommen. Störend können in den Verlauf der Diazoreaktion eingreifen das Urobilinogen mit einer eigelben und das Bilirubin mit einer violetten Reaktion, abgesehen von medikamentösen Stoffen, die selbst eine Diazoreaktion geben oder vortäuschen (Opiate, Atophan, Kreosotderivate, Naphthol, Phenolphthalein) oder sie hindern (Tannin).

Die Diazoreaktion führe ich folgendermaßen aus: Zu 5 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit füge ich genau 3 ccm der nach obiger Methode diazotierten Sulfanilsäure und 1 ccm Ammonia pur. liqu. Die positive Ehrlichsche Probe kennzeichnet sich durch

¹⁾ Diese Zeitschr. 58, 119. 1913.

²⁾ l. c.

rote Flüssigkeit mit rein rotem Schaum. Außer dieser positiven hat Ehrlich die sogenannte negative Diazoreaktion beschrieben, welche zwar auch noch rote Flüssigkeit zeigt, aber statt des reinen Rosaschaumes weißlichen, gelblichen oder bräunlichen Schaum gibt. Die erstere Reaktion konnte ich dem Urochromogen zuschreiben, die letztere (soweit nicht Störungen vorliegen) dem Urochrom.

Bei seiner Probe unterscheidet bekanntlich Ehrlich drei Phasen, die primäre, sekundäre und tertiäre Reaktion. Die primäre Reaktion besteht in einer Gelbfärbung beim Zusatz der Diazobenzolsulfonsäure, die sekundäre in der Rotfärbung beim NH_3 -Zusatz, die tertiäre in der Entstehung eines grünlichen bis schwärzlichen Niederschlags in der fertigen Reaktion nach 24stündigem Stehen. Die primäre Reaktion ist nicht charakteristisch für das Urochromogen; man erhält sie sehr häufig auch in normalen Harnen. Sie ist sehr von der Acidität abhängig und bleibt daher bei stärker saurer Reaktion leicht aus. An ihr beteiligen sich auch andere Substanzen des Harnes, wie das Urobilinogen und Tryptophanderivate. Primäre Reaktionen sind auch die von Ehrlich für das Bilirubin beschriebene Diazoreaktion und die sog. Eigelbreaktion des Urobilinogens. Die tertiäre Reaktion besteht im Ausfallen eines dunklen Sedimentes, welches sich mit den Phosphaten und Carbonaten unter gleichzeitigem Verschwinden der Rotfärbung niederschlägt. Ehrlich nennt diesen schwärzlichen Niederschlag eine Farbsäure. Es handelt sich um ein Umwandlungsprodukt des aus dem Urochromogen gebildeten Oxyazofarbstoffes.

Im Verlaufe der auf die Darstellung des Urochromogens gerichteten Bestrebungen gelang es mir, aus sehr gereinigten Fraktionen den Oxyazofarbstoff mittels NaCl zur Abscheidung zu bringen und seine Eigenschaften zu studieren. Zur Analyse reichte die Menge nicht aus. Die in der angegebenen Weise hergestellte intensiv rote Diazoflüssigkeit wurde zu einer heißgesättigten NaCl -Lösung tropfenweise hinzugefügt. Es entstand ein feiner, rötlicher Niederschlag, der sich aber bis zum nächsten Tage grünlich absetzte. Die Flüssigkeit färbte sich auch grüngelb. Der ausgefallene Farbstoff wurde abfiltriert und mit konzentrierter NaCl -Lösung gewaschen. Er zeigte dunkelgrüne Farbe, ähnlich dem Sediment der tertiären Reaktion, war unlöslich in Alkohol

und Wasser, löste sich dagegen mit olivengrüner Farbe in Na_2CO_3 . Diese Lösung trübte sich beim Zusatz von Säure.

Es war daher nicht möglich, den Azofarbstoff unverändert zu gewinnen. Seine Empfindlichkeit ist so groß, daß er sich bald in wässriger Lösung oder Suspension verändert und grünlich wird. In alkoholischer Lösung hält sich dagegen die Diazoreaktion oft überraschend lange.

Zur quantitativen Auswertung der Diazoprobe habe ich mich bemüht, eine Substanz ausfindig zu machen, welche eine ähnliche Diazoreaktion gibt wie das Urochromogen. Zu diesem Zwecke eignet sich Tyrosin sehr gut¹⁾. Tyrosin gibt in einer Verdünnung von 1 : 3000 bei genau gleichem Vorgehen wie mit Urochromogenlösungen eine schön rote Reaktion, deren Schaum zwar etwas weniger rot ist, deren Flüssigkeit aber ausgezeichnet vergleichbar ist mit der Reaktion Ehrlichs. Die Intensität der Diazoreaktion dieser Tyrosinlösung entspricht beiläufig der Ehrlich'schen Skala pos. 2. Der Diazowert der Ehrlich'schen Reaktion wird in Tyrosin ausgedrückt. Hat man einen Harn vor sich, der kräftig positiv reagiert, so kann man versuchen, ihn schon nativ nach Ammonsulfataussalzung unter Berücksichtigung der entstandenen Verdünnung auszuwerten.

Z. B. 1. Tbc. pulm. Tagesharn 1200 ccm, Diazoreaktion positiv 3. 25 ccm werden mit Ammonsulfat in der Reibschale verrieben, filtriert und mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen. -Filtrat = 40 ccm. Von diesen 40 ccm werden 5 ccm mit 3 ccm der nach obiger Vorschrift diazotierten Sulfanilsäure und mit 1 ccm NH_3 versetzt. Die Reaktion ist stärker als die der genau so behandelten Tyrosinlösung 1 : 3000. Daher wird das Ammonsulfatfiltrat zweimal verdünnt und ebenso verfahren. Die Farbe ist jetzt schwächer als die der Vergleichsdiazoreaktion. Die $1\frac{1}{2}$ -fache Verdünnung entspricht genau der Tyrosinreaktion. Der Tyrosinwert dieser positiven Diazoprobe = $\frac{1200 \cdot 40 \cdot 3 \cdot 1}{25 \cdot 2 \cdot 3000} = 0,96$, d. h. 0,96 Tyrosin in 1200 ccm H_2O gelöst würden eine gleich starke Diazoreaktion geben wie dieser Harn.

2. Fieberhafter Zustand. Tbc. ? Tagesharn 1500 ccm, Diazoreaktion negativ, KMnO_4 -Probe ? 300 ccm wurden mit 25 g Pb. acet., nach Lösung desselben mit Lauge bis zur Farblosigkeit versetzt. Der Niederschlag (= Fraktion I + II) wird abfiltriert, gewaschen und mit 20 g Na_3PO_4 in der Reibschale zerlegt, filtriert, bis zu schwach saurer Reaktion neutralisiert und dann mit Ammonsulfat ausgesalzen. Das Filtrat 1500/300

¹⁾ Wien. Arch. f. innere Med. 1. 1920.

entsprechend = 120 ccm. Die qualitative Prüfung auf Diazo- und KMnO_4 -Reaktion ergibt jetzt positiven Ausfall. Die Diazoreaktion ergibt bei $1\frac{1}{4}$ facher Verdünnung gleiche Intensität wie die Tyrosinlösung, daher der Tyrosinwert dieser durch Anreicherung positiv gewordenen Probe

$$= \frac{1500 \cdot 120 \cdot 5 \cdot 1}{300 \cdot 4 \cdot 3000} = 0,25.$$

Die Diazoreaktion des Urochromogens wurde mit der gleichen Reaktion verschiedener Benzolderivate verglichen. Phenol und Guajacol geben nur eine sehr schwache gelbrötliche Färbung, p-Kresol 1 : 1000 gibt eine schwächere Diazoreaktion als Tyrosin 1 : 3000. Pyrocatechusäure reagiert noch schwächer als Guajacol. Dioxyphenylamin (Dopa) gibt eine stärkere Reaktion als Pyrocatechusäure. Hydrochinon gibt keine deutliche Diazoprobe, Brenzcatechin gibt bei einer Konzentration von 0,5 : 1000 eine sehr dunkelrote Reaktion, die aber bei schwächerer Konzentration fast unvermittelt abschneidet. Tyrosin und Paraoxyphenylpropionsäure geben relativ starke Reaktionen.

Die Untersuchung dieser Substanzen hat gezeigt, daß die Intensität der Diazoreaktion nicht so sehr von der Zahl der Hydroxylgruppen abhängt als hauptsächlich von der Länge der Seitenkette. Denn Tyrosin reagiert weit stärker als p-Kresol, ebenso Dioxyphenylalanin weit stärker als Pyrocatechusäure.

In Analogie mit diesen Beispielen und mit den Lehren der Farbstoffchemie, nach welchen mit der Länge der Seitenkette die Intensität der Azofarbstoffe zunimmt, dürfte daraus der Schluß gerechtfertigt sein, daß im Urochromogen eine längere Seitenkette vorhanden ist.

Über die Quantität der bei der Ehrlichschen Probe reagierenden Urochromogenmenge habe ich mir eine Vorstellung zu bilden gesucht, indem ich die Abnahme des Tyrosin-Diazowertes beim Stehen schwach saurer Urochromogenlösungen im Lichte in Relation setzte mit der Menge des ausgefallenen Uromelanins (s. später). Hierbei ergab sich, daß 0,16 Uromelanin einem Tyrosinwerte von 1,0 entsprechen oder daß die Empfindlichkeit der Diazoreaktion des Urochromogens etwa 6mal größer ist als die des Tyrosins.

IV. Die Kaliumpermanganatreaktion.

Die KMnO_4 -Probe besteht in einer intensiven Gelbfärbung, welche man in auch mehrfach verdünnten Urochromogenlösungen

erhält, wenn man zu ungefähr 3 ccm 1—2 Tropfen einer reinen 1 promill. Permanganatlösung hinzufügt. Je reiner die Urochromogenlösung ist, desto charakteristischer fällt diese Reaktion aus. Ihre Farbe ist ausgesprochen gelbgrün und wurde von mir als kanariengelb bezeichnet. Sie ist ähnlich, wenn auch stärker als die Farbenveränderung des Urochromogens durch Alkalizusatz. Beide Proben verdanken der Oxydation des Urochromogens ihre Entstehung. Daß auch bei der KMnO_4 -Wirkung die Anwesenheit von Kationen eine ausschlaggebende Rolle spielt, beweist der Umstand, daß schon schwaches Ansäuern die Permanganatprobe völlig unterbindet. Auf diese Tatsache hat Klaf ten¹⁾ eine sehr gut verwendbare Kontrollprobe für das Urochromogen aufgebaut.

Im nativen Harn kann Urobilinogen mitunter zu einer Verwechslung mit Urochromogen bei der KMnO_4 -Probe Anlaß geben. Für diese Fälle habe ich die Ammonsulfataussalzung angegeben, welche auch das durch Abblassen mit dem Permanganat reagierende Bilirubin²⁾ praktisch völlig ausschaltet. Klaf ten³⁾ empfiehlt, mit 1—2 Tropfen verdünnter Essigsäure anzusäuern und die KMnO_4 -Probe dann nochmals anzustellen. Fehlt jetzt die Gelbfärbung, so hat es sich um Urochromogen gehandelt, tritt sie wie früher auf, so lag Urobilinogen vor.

Durch diese Kriterien wird man wohl immer in der Lage sein, eine zweifelhafte Permanganatreaktion im Harn zu beurteilen. Wo sehr geringe Urochromogenmengen vorhanden sind, kann manchmal die Entscheidung mit dem nativen Harn unmöglich sein. Dann empfiehlt es sich, eine Anreicherung vorzunehmen, indem man einige hundert Kubikzentimeter auf die Fraktion II verarbeitet und mit dieser die Reaktionen anstellt.

Übereinstimmend mit den Befunden sorgfältiger Beobachter über die Ehrlichsche Probe handelt es sich auch bei der Permanganatprobe um eine absolut pathologische Reaktion. Die Angaben, daß gelegentlich die Reaktion auch im normalen Harn gefunden wird, sind, wie schon Rhein⁴⁾ betont, auf unzureichende Technik, insbesondere auf die Verwechslung mit Urobilinogen

¹⁾ Med. Klin. 1920, Nr. 32.

²⁾ Wien. klin. Wochenschr. 1916, Nr. 15.

³⁾ Med. Klin. 1920. I. c.

⁴⁾ Münch. med. Wochenschr. 1915, Nr. 22.

zurückzuführen, welches ein häufiger normaler Bestandteil des Harnes ist. Daher kommt dem Urochromogennachweis immer, möge er schon im nativen oder erst im angereicherten Harn gelingen, eine pathognomonische Bedeutung zu, was man vom Urobilinogen nicht sagen kann. Sache des Beobachters ist es, diesen Befund mit dem Krankheitsbild in Einklang zu bringen.

Die KMnO_4 -Probe bildet, wie auch eine Reihe von Nachuntersuchungen [Cottin¹⁾, Rhein²⁾, Schnitter³⁾, Klasten⁴⁾, Levy⁵⁾ Heflebower⁶⁾, Tecon und Aimard⁷⁾] ergeben hat, einen vollständigen Ersatz für die Diazoreaktion. Sie ist geringeren Fehlerquellen unterworfen als diese. Während Diazoreaktion durch viele medikamentös zugeführte Stoffe im Harn entstehen kann, habe ich bisher kein einziges Mal eine solche Fehlerquelle bei der Permanganatprobe finden können.

Die dreifache Verdünnung bei dieser Probe schaltet Störungen aus, welche im unverdünnten Harn die Ehrlichsche Reaktion durch Interferenz der roten mit braunen oder gelben Färbungen undeutlich machen können. Die mitunter vorkommende Vorstufe, das Urochromogen α , gibt an sich noch keine positive Diazoreaktion, wohl aber Permanganatprobe. Es entfallen daher einige Fehler, welche bei der Diazoreaktion unvermeidlich sind, bei Anwendung der KMnO_4 -Probe. Beide Proben können und sollen im Zweifel aneinander kontrolliert werden. Bei richtiger Ausführung wird man niemals eine unerklärliche Unstimmigkeit finden. Da die Permanganatprobe die spezifischere und empfindlichere Probe ist, so darf sie vor der Ehrlichschen den Vorrang beanspruchen.

Was den quantitativen Nachweis des Urochromogens mittels der Permanganat-Titrierung betrifft, so setze ich, wenn auch Parallelismus mit der Diazoreaktion vorhanden war, doch Zweifel in die Richtigkeit der absoluten Werte. Zwar hat das Kaliumpermanganat eine elektive Avidität zum Urochromogen, welche bewirkt, daß in einer solchen Fülle von sauerstoffgerigen Substanzen, wie sie der Harn darstellt, die minimale Menge von 3 Tropfen einer 1 promill. Lösung sofort in Reaktion tritt, doch

¹⁾ Münch. med. Wochenschr. 1914, Nr. 49.

²⁾ l. c.

³⁾ Amer. Journ. of the med. sciences 1912.

⁴⁾ Revue méd. de la Suisse Romande 1913. 20. VIII.

⁵⁾ Zeitschr. f. Tuberkulose 21, 234. 1913.

⁶⁾ Dtsch. med. Wochenschr. 1915, Nr. 41.

⁷⁾ Paris méd. 1913, Nr. 52.

nehmen wohl auch andere sauerstoffgerige Substanzen des Harnes immer einen Teil des KMnO_4 in Anspruch. Dies zeigte sich sehr deutlich, als statt des Ammonsulfatfiltrates des nativen Harnes mit Urochromogenfraktionen der KMnO_4 -Titer bestimmt wurde. Die von anderen sauerstoffgerigen Substanzen gereinigte Fraktion gab einen weit niedrigeren Permanganatwert. Wenn auch der Wert dieser Fraktion dem absoluten sehr nahe stehen dürfte, so ist doch ein sicheres Kriterium hierfür nicht gegeben. Vielleicht gelingt es aber bei weiterer Beschäftigung mit der Frage, in dieser Richtung weiter zu kommen. Deshalb sei das Verfahren, wie ich es zuletzt geübt habe, hier kurz skizziert:

Etwa 20 ccm der Urochromogenfraktion werden nach Aussalzung mit reinem Ammonsulfat (welches nicht selbst KMnO_4 reduzieren darf) mit H_2O so lange verdünnt, bis die Reaktion der früher erwähnten Diazoreaktion von Tyrosin 1:3000 entspricht. Damit hat man den Diazowert als Tyrosin zunächst kennen gelernt. Nun werden etwa 6 gleich tiefe graduierte Röhren mit je 5 ccm der Verdünnung beschickt und aus einer Burette eine genau auf Oxalsäure eingestellte KMnO_4 -Lösung (1 ccm = 0,001 Oxals.) in der Weise zufließen gelassen, daß man von 0,1 ccm — etwa 0,6 ccm hinzufügt. Solange unoxydiertes Urochromogen vorhanden ist, nimmt die charakteristische Gelbfärbung deutlich zu, um dann später gleich zu bleiben oder auch abzunehmen. Glaubt man am Ende der Titration angelangt zu sein, so stellt man die Diazoprobe, wie früher beschrieben, an und erkennt am Verschwinden jeder Rotfärbung, daß alles Urochromogen oxydiert ist.

Z. B. Urochromogenfraktion aus 1200/400 nach Ammonsulfataussalzung = 120 ccm. $2\frac{1}{2}$ -fache Verdünnung ergibt Gleichheit mit der Diazoreaktion des Tyrosin 1:3000, daher Tyrosinwert dieser positiven Reaktion = $\frac{1200 \cdot 120 \cdot 5 \cdot 1}{400 \cdot 2 \cdot 3000} = 0,30$ pro die. Die KMnO_4 -Titrierung ergab Verschwinden der Diazoreaktion obiger $2\frac{1}{2}$ -facher Verdünnung beim Hinzufügen von 0,3 ccm zu 5 ccm der Verdünnung. KMnO_4 -Wert in Oxals. ausgedrückt = $\frac{1200 \cdot 120 \cdot 0,3 \cdot 1}{400 \cdot 5 \cdot 1000} = 0,054$ pro die.

Von Fehlerquellen bei der KMnO_4 -Titrierung sei angeführt die reichlichere Anwesenheit von Oxyssäuren, welche aber auch im Diazowerte mitbestimmt werden. Da ihre Menge meist eine sehr geringe ist, so wurde dieser Fehler vernachlässigt. Sie sind gegen Permanganat widerstandsfähiger als das Urochromogen. Hieraus könnten sich Unstimmigkeiten der Reaktion beider Werte ergeben. Ich habe in einer früheren Arbeit¹⁾ vorgeschlagen, die Oxyssäuren mittels Ätherextraktion vor der Bestimmung des Diazowertes aufzunehmen.

¹⁾ Wien. Arch. f. innere Med. 1920.

Auch nachdem jede Diazoreaktion schon verschwunden ist, reduziert die Lösung noch deutlich KMnO_4 und blaßt nur langsam ab. Die hohe Reduktionsfähigkeit des Urochromogens (Ähnliches gilt vom Urochrom) zeichnet diesen Körper gegenüber den anderen Farbstoffen des Harnes aus, insbesondere jenen der roten Fraktion (Urobilin, Bilirubin und Uroerythrin). Durch KMnO_4 und H_2SO_4 in der Hitze läßt sich eine Urochromogenlösung schließlich völlig entfärben.

Ähnlich wie die Diazoreaktion wurde auch die Permanganatprobe bei verschiedenen Phenolderivaten untersucht. Leichte Gelbfärbung beim Zusatz von einigen Tropfen 1 promill. KMnO_4 -Lösung findet man beim p-Kresol, Tyrosin, bei den aromatischen Oxysäuren, beim Guajacol. Dioxyphenylalanin gibt ebenso wie Adrenalin rötliche, Brenzcatechin smaragdgrüne Färbung.

Von den Phenolderivaten stehen Orthokresol und Hydrochinon in bezug auf ihre Permanganatreaktion dem Urochromogen am nächsten. Orthokresol gibt jedoch keine Farbenänderung mit NH_3 , dagegen Hydrochinon und Dioxyphenylalanin sehr ausgesprochen.

V. Die Silberreduktion.

Dem Urochromogen kommt die Fähigkeit zu, eine ammoniakalische 10 proz. Silbernitratlösung schon in der Kälte zu reduzieren. Je reinere Fraktionen man vor sich hat und je mehr die Störung durch andere ausfallende Substanzen zurücktritt, um so deutlicher ist diese Reaktion. Wir finden sie in der Urochromogenfraktion (Fraktion II), wenn auch mitunter langsam auftretend, immer vor. Es war mir lange nicht klar, ob die in verschiedenen Harnfraktionen gefundene Silberreduktion einem oder mehreren Körpern zukommt. Nunmehr habe ich zwei verschiedene Harnfarbstoffe schärfer herausheben können, welche diese Reaktion geben. Der eine ist das Uroerythrin, der andere das Urochromogen. Das Uroerythrin findet sich vorzüglich in der Fraktion I. Dementsprechend ist in dieser Fraktion immer eine Silberreduktion vorhanden und um so stärker, je mehr Uroerythrin da ist. Aber auch die Fraktion II gab mir vor der Ammonsulfataussalzung diese Probe in exquisiter Weise. Erst als festgestellt werden konnte, daß das Uroerythrin durch Ammonsulfat nicht nur ausgesalzen wird, sondern auch seine Ag-Reduk-

tion verliert, konnte an die Differenzierung dieser Probe geschritten werden. Da im Ammonsulfatfiltrate diazopositiver Fraktionen die Silberprobe immer gefunden wurde, da ferner diese Probe in der gleichen Fraktion normaler Harnes meist negativ war und da mit dem Nachdunkeln der Fraktionen und der Umwandlung des Urochromogens in Uromelanin auch die Silberprobe zurücktrat resp. verschwand, konnte nicht mehr daran gezweifelt werden, daß auch dem Urochromogen die Fähigkeit der Silberreduktion zukäme. Dies wurde vollends bewiesen bei der Darstellung des Urochromogens (s. später).

Das Uroerythrin ist kein Alkaptonchromogen, d. h. es dunkelt nicht durch Alkaliwirkung unter Sauerstoffaufnahme nach. Dadurch unterscheidet es sich nebst den anderen Kriterien vom Urochromogen.

Die Fraktionierung zahlreicher pathologischer Harnes hat jedoch ergeben, daß außer den genannten, Silber schon in der Kälte reduzierenden Stoffen auch noch andere Körper mit der gleichen Eigenschaft im Harnes vorkommen können. Dem Urobilinogen kommt nur eine recht geringe Reduktionskraft zu. Dagegen scheinen Phenolderivate bei manchen schweren Tuberkulosen im Harnes vorzukommen, die ausgesprochene Alkaptonchromogene, dabei aber mit dem Urochromogen nicht identisch sind. Diese Harnes fallen durch ihr Nachdunkeln auf. Da meistens in ihnen auch Urochromogen vorkommt, so ist die Trennung von diesem schwierig. Eigene Versuche haben ergeben, daß keine Identität mit der Hydrochinonessigsäure besteht, daß also Alkaptonurie im engeren Sinne des Wortes nicht vorliegt.

VI. Das Uromelanin.

Mit dem Namen Uromelanin hat Thudichum¹⁾ einen braunen, aus seinem Urochrom hervorgegangenen Farbstoff bezeichnet. Durch hinlänglich langes Kochen einer sauren Urochromlösung erhielt er drei unlösliche Substanzen, die sich nach Zusatz von Wasser in braunen Klumpen absetzten. Beim Behandeln dieses Bodensatzes mit Alkohol blieb ein braunes, in Lauge lösliches und daraus durch Essigsäure fällbares Pulver, das Uromelanin, zurück. Seit Thudichum sind verschiedene Uromelanine beschrieben worden [Ploss²⁾, Dombrowski³⁾], die sich aber alle, wie das Uromelanin Thudichums erst beim Kochen mit Säuren

¹⁾ Journ. f. prakt. Chemie **194**, 257. 1868.

²⁾ Zeitschr. f. physiolog. Chemie **8**, 89. 1883.

³⁾ Zeitschr. f. physiolog. Chemie **62**. 1909.

abscheiden. Sie sind also keine eigentlichen Melanine, sondern Melanoidine (Schmiedeberg), welche man aus verschiedenen Substanzen beim Kochen mit Säuren erhält. Auf die Schwierigkeit, diese Melanoidine zu einer sicheren Grundlage weiterer Untersuchungen zu machen, hat erst jüngst Salkowski¹⁾ hingewiesen.

Das von mir dargestellte Uromelanin unterscheidet sich völlig von den bisher aus dem Harn gewonnenen, indem es sich spontan ohne den Einfluß von Säure und Hitze nur beim Stehen im Lichte abscheidet.

Läßt man eine neutrale Urochromogenfraktion, die mit Ammonsulfat ausgesalzen wurde, im Lichte stehen, so dunkelt die Flüssigkeit nach und verliert allmählich ihre charakteristische gelbgrüne Farbe. Anfangs ist es noch möglich, mit der Echtgelblösung colorimetrisch zu vergleichen und kann man Zunahme des Farbstoffwertes bis zum Doppelten konstatieren, später überwiegt der braune Ton in der Farbe so sehr, daß ein Vergleich nicht mehr möglich ist. Gleichzeitig beginnt die ursprünglich ganz klare Flüssigkeit ein braunes Sediment abzuscheiden. Ebenso wie die Farbe der Flüssigkeit sich ändert, tritt die KMnO_4 -Probe zurück, welche schließlich vollständig verschwinden kann. Die Diazoreaktion Ehrlichs kann lange ihre Reinheit behalten; später verliert sie den Rosaschaum und nähert sich dadurch der gleichen Reaktion des Urochroms. Die Verfolgung der quantitativen Verhältnisse ergibt mit dem Nachdunkeln Abnahme des in Tyrosin ausgedrückten Diazo- und des KMnO_4 -Wertes.

Das Nachdunkeln und Ausfallen der dunklen Substanz findet von der Oberfläche aus statt. Überschichtet man eine schwach saure, mit Ammonsulfat gesättigte Urochromogenlösung, die sich schon im Nachdunkeln befindet, mit einigen Tropfen Lauge, so sieht man schon nach wenigen Minuten die oberste Schicht dunkelbraun gefärbt und durch Ausscheidung von Melanin getrübt. Das Uromelanin hat ein spezifisches Gewicht, welches dem einer konzentrierten Ammonsulfatlösung (1,26) sehr nahe stehen muß; denn es bleibt lange in der Flüssigkeit schwebend und setzt sich erst im Laufe von Tagen bis Wochen gut ab. Ein ähnliches Verhalten, wenn auch quantitativ weniger ausgesprochen,

¹⁾ Virchows Archiv 227, 121. 1920.

findet man bei analogen Lösungen des Urochroms, dessen Uromelanin gleiche Farbe und gleiche Fällungsreaktionen zeigt, wie das aus dem Urochromogen entstandene. Die Uromelaninbildung erfolgt rascher im Lichte als im Dunklen, daher im Sommer besser als im Winter.

Aus dem Urochromogen, welches durch Ammonsulfat im Gegensatz zu den Farbstoffen der Urobilin-Gruppe von Haus aus nicht aussalzbar ist, bildet sich somit beim Stehen im Lichte und unter dem Einfluß von Sauerstoff ein dunkleres Produkt, das aus der konzentrierten Ammonsulfatlösung spontan ausfällt, daher in ihr unlöslich geworden ist. Dieser Körper ist wohl mit Sicherheit als ein Oxydationsprodukt aufzufassen. Seine Beziehung zum Urochromogen ergibt die Verfolgung der KMnO_4 - und Diazoprobe und gleiches Verhalten von auf anderem Wege dargestelltem Urochromogen. Die Oxydation des Urochromogens zum Uromelanin findet über das Urochrom statt. Dies kann man sowohl durch Farbenvergleich wie durch die Gleichartigkeit der Diazoreaktion schon nachgedunkelter Urochromogenlösungen mit der Urochromdiazoreaktion beweisen.

Das ausgefallene Uromelanin läßt sich abfiltrieren und durch Waschen mit konzentrierter Ammonsulfatlösung von anderen Harnbestandteilen befreien. Es hat eine dunkelbraune Farbe, ist in verdünnten Säuren nicht löslich, dagegen sehr gut in Alkalien. Wäscht man Uromelanin auf dem Filter mit Ammonsulfatlösung, dann mit verdünnter Schwefelsäure (etwa 1 proz.), hierauf zur Entfernung der letzteren mit H_2O , so geht das Waschwasser zunächst farblos durch; erst wenn die Säure völlig ausgewaschen ist, beginnt destilliertes Wasser das Uromelanin zu lösen¹⁾. Löst man das ausgefallene Uromelanin in 5 proz. Na_2CO_3 , so erhält man eine tief dunkelbraune Lösung. Versetzt man diese Lösung tropfenweise mit 10 proz. Schwefel- oder Essigsäure, so fällt das Uromelanin in dunkelbraunen Flocken aus. Das Uromelanin ist in absolutem Alkohol unlöslich. Es läßt sich auf diese Weise von anderen Farbstoffen (Urobilin) und vom Urochromogen selbst, welches noch alkohollöslich ist, befreien. Ebenso ist das Uromelanin in Äther vollkommen unlöslich. In

¹⁾ Gleiches Verhalten haben Salkowski und seine Schüler bei ihrem aus der Darmschleimhaut dargestellten Melanin festgestellt.

seinen wesentlichsten Eigenschaften, Alkoholunlöslichkeit und Fällbarkeit durch Säuren, zeigt es Übereinstimmung mit dem Uromelanin Thudichums.

Filtriert man von dem durch Säurezusatz ausgefallenen Uromelanin ab, so zeigt die Farbe des Filtrates außerordentliche Ähnlichkeit mit Urochromlösungen. Stellt man mit einem solchen Filtrat nach Neutralisation eine Diazoprobe an, so kann der Farbenton derselben noch sehr häufig dem der Urochromdiazoreaktion entsprechen. Manchmal erhält man auch noch mit alkalischer Uromelaninlösung eine Diazoprobe von in der Regel negativem Typus. Diese rührt von mitgerissenen Teilen des Urochrom(ogen)s her.

Schon früher wurde erwähnt, daß aus einer essigsauren Blei-Urochromogenlösung mit dem Nachdunkeln ein brauner Körper ausfällt. Dies ist die Pb-Verbindung des Uromelanins, welche in verdünnter Essigsäure schon unlöslich ist, sich daher aus der ursprünglich ganz klaren gelben Flüssigkeit abscheidet. In konzentrierter Essigsäure löst sich das Pb-Uromelanin und fällt daraus durch Wasser wieder aus. Ebenso kann das Pb-Uromelanin in Na_2CO_3 gelöst und im Filtrat das Uromelanin wieder durch Säure gefällt werden. Genau so verhalten sich auch Pb-Urochromlösungen in Essigsäure. Das Ausfallen des Pigments ist ein langsames, braucht daher oft Wochen bis Monate, ohne selbst nach Jahren vollständig zu sein.

Mit dem in verdünnter Essigsäure sehr gut löslichen gewordenen Pb-Urochromogen vollzieht sich daher die gleiche Änderung wie mit dem Urochromogen in konz. Ammonsulfatlösung beim Stehen im Lichte. Es verwandelt sich in eine dunklere, im Lösungsmittel nunmehr unlösliche Verbindung.

Das gleiche sieht man an durch Hg-Acetatfällung bei saurer Reaktion dargestelltem Urochromogen nach Zerlegung mit H_2S . In solchen Lösungen wurde von mir wiederholt eine auffallende Abnahme des Diazowertes konstatiert. Versuche, das Urochromogen durch Hg-Acetatfällung und Zerlegung mit H_2S darzustellen, ergaben stets Verlust an Urochromogen. Jetzt kann ich sagen, daß dieser Verlust auf die wahrscheinlich schon unter dem Einfluß des Hg-Acetat vor sich gehende Oxydation des Körpers und Bildung von Uromelanin, welches im Hg-Sulfid zurückbleibt,

zurückzuführen ist. Auf diesem Wege dargestellte Urochromogenlösungen dunkeln im Lichte rasch nach und fällt alsbald Uromelanin auch ohne Ammonsulfataussalzung beim Stehen aus.

Der gleiche Vorgang dürfte bei der Bildung des Urochroms nach Dombrowski¹⁾ stattfinden. Die Kupferacetatfällung ist ja, wie Dombrowski selbst zugibt, erst eine Folge der Oxydation des Urochroms und es erscheint in Analogie mit der Hg-Acetatfällung ungezwungen, bei beiden gleiche Änderungen anzunehmen. Es konnte nun in der Tat in nach Dombrowskis Vorschrift hergestellten Urochromlösungen durch Säurezusatz eine Fällung erzeugt werden, welche, ohne vollständig zu sein, doch einen Körper von gleichen Eigenschaften wie das Uromelanin ergab.

Schon bei der Beschäftigung mit dem Urochrom²⁾ habe ich nachgewiesen, daß das ursprünglich in Essigsäure sehr gut lösliche Pb-Urochrom, wenn eine Hg-Acetatfällung eingeschoben wird, diese Löslichkeit verliert und ein nunmehr in Essigsäure unlösliches Pb-Salz bildet. Diese Eigenschaft kommt nun von Haus aus dem Urochrom Dombrowskis zu. Es erscheint daher im Lichte meiner Untersuchungen ungezwungen, dieses Urochrom als ein schon dem Uromelanin nahestehendes oder mit ihm teilweise identisches Oxydationsprodukt des gelben Harnfarbstoffs anzusprechen, für welches irgendeine besondere spezifische Fällbarkeit durch Cu-Acetat ebensowenig besteht wie durch Hg-Acetat. Die Cu-Acetatfällung kann daher kein Kriterium der Reinheit des Urochroms bilden und die Schlüsse, welche Dombrowski aus seinem auf diesem Wege dargestellten Farbstoff in bezug auf die Zusammensetzung und Abstammung gezogen hat, können daher nicht unangefochten bleiben [s. auch Liebermann³⁾, Hohlweg, Salomonson und Mancini⁴⁾].

Aus allen Urochromogenlösungen kann beim Stehen Uromelanin ausfallen. Ich habe jedoch die mit Ammonsulfat ausgesalzene Urochromogenlösung zur Darstellung des Uromelanins gewählt, weil die Umwandlung des ursprünglich in konzentrierter

¹⁾ Zeitschr. f. physiolog. Chemie **54**, 188. 1907/08 und Compt. rend. de l'Acad. des Sc. **145**, 575. 1907.

²⁾ Sitzungsbericht d. Akad. d. Wiss. in Wien **122**. Abt. III, Januar 1913.

³⁾ Zeitschr. f. physiolog. Chemie **52**, 129. 1907.

⁴⁾ Diese Zeitschr. **13**, 199. 1908.

Ammonsulfatlösung ausgezeichnet löslichen Urochromogens in das darin unlösliche Uromelanin eine spezifische Reaktion darstellt.

Die in verdünnter H_2SO_4 gelöste klare Fraktion I setzt häufig beim Stehen im Lichte auch ein Sediment ab. Dasselbe besteht hauptsächlich aus Urobilin, wie die spektroskopische Untersuchung zeigt und nur insoweit als Urochromogen in diese Fraktion mitgerissen wurde, auch aus Uromelanin. Das Filtrat von der mit Ammonsulfat ausgesalzene Fraktion I besteht, wie auseinandergesetzt, überwiegend aus Urochromogen. Dieses kann im Laufe der Zeit gleichfalls Uromelanin absetzen. Der aus der Fraktion I ausgefallene Urobilinniederschlag löst sich auch sehr gut in Alkalien und gibt mit Säure gleichfalls einen Niederschlag wie das Uromelanin. Er unterscheidet sich aber von diesem 1. durch seine leichtere Löslichkeit beim Waschen mit verdünnter Säure, 2. durch seine rote Farbe, 3. durch das spektroskopische Verhalten, 4. durch seine ausgezeichnete Löslichkeit in Alkohol.

Zur Darstellung des Uromelanins bin ich von möglichst reinen Urochromogenlösungen ausgegangen. Es wurden 4 Liter eines stark diazopositiven Harns zunächst mit neutralem Pb-Acetat ausgefällt, das Filtrat mit Lauge versetzt, der Niederschlag gut gewaschen und dreimal durch Lösung in 10 proz. Essigsäure und neuerlichen Laugenzusatz umgefällt. Es wurde, um beigemengte Farbstoffe der Urobilingruppe zu beseitigen, auf kleine Urochromogenverluste bei der Lösung und Umfällung nicht geachtet. Der schließlich erhaltene gelbgrüne Niederschlag wurde in verdünnter H_2SO_4 gelöst, bis zu schwach saurer Reaktion neutralisiert und mit Ammonsulfat ausgesalzen. Das Filtrat war rein gelbgrün, zeigte auch in 10 cm Tiefe keinerlei Absorptionsband, gab keine Aldehydreaktion nach Ehrlich, konnte also nach allen Kriterien kein Urobilin(ogen) enthalten.

Das ganz klare Ammonsulfatfiltrat entsprach in seiner Färbung vorzüglich der Echtgelblösung. Seine Diazo- und $KMnO_4$ -Probe waren außerordentlich intensiv. Die Flüssigkeitsmenge betrug 400 ccm, der colorimetrische Wert 636, der Tyrosinwert 0,93, der $KMnO_4$ -Titer 0,220.

Die Uromelaninbildung erfolgte, da der Versuch im Monate Februar angesetzt wurde, nur sehr langsam, erst als sonnige Tage auftraten, rascher. Nach 6 Wochen wurde das ausgeschiedene Uromelanin abfiltriert, mit Ammonsulfatwasser, dann mit verdünnter Schwefelsäure (1 proz.) gewaschen, das Filter über Nacht in einer kleinen Menge 5 proz. Na_2CO_3 -Lösung gelassen, am näch-

sten Tage filtriert und das Filtrat durch tropfenweisen Zusatz von 10 proz. H_2SO_4 gefällt. Der Niederschlag wurde auf ein kleines bis zur Gewichtskonstanz getrocknetes und gewogenes Filter gebracht, mit verdünnter Essigsäure gewaschen, bis Barytwasser keine Trübung des Waschwassers ergab, an der Luft getrocknet, hierauf mit abs. Alkohol und Äther wiederholt gewaschen, im Exsiccator getrocknet und gewogen. Es wurden erhalten 0,055 g Uromelanin. Im Filtrat von der Uromelaninausscheidung wurde der Diazowert gegenüber früher bestimmt und eine Verminderung um 0,4 festgestellt. Daraus konnte berechnet werden, daß einem Diazowerte von 1,0 ein Uromelaninwert von 0,14 entspreche. Der $KMnO_4$ -Titer dieses Filtrates betrug 0,120, hatte also gleichfalls abgenommen.

Das klare Hauptfiltrat wurde mit einigen Tropfen Lauge versetzt, die Reaktion war danach noch sauer. Die neuerliche Abscheidung von Uromelanin begann in dieser schwächer sauren Lösung relativ bald. Nach 3 Wochen wurde wieder abfiltriert und eine weitere Abnahme des Diazo- und $KMnO_4$ -Wertes festgestellt. Die abgewogene Uromelaninmenge betrug 0,018 g. Der Diazowert verminderte sich um 0,1. Daher entsprachen einem Diazowerte von 1,0, 0,18 Uromelanin. Im Mittel aus beiden Bestimmungen entsprachen somit 0,16 Uromelanin einem Diazowerte von 1,0.

Die Empfindlichkeit der Diazoreaktion des Urochromogens ist daher etwa 6mal so groß als die des Tyrosins, d. h. es würde, wenn kein großer Unterschied zwischen dem Urochromogen und dem Uromelanin im Molekulargewicht angenommen wird, schon 0,16 g Urochromogen eine gleich starke Diazoreaktion geben wie 1,0 Tyrosin in derselben Menge Wassers gelöst.

Die Färbekraft des Uromelanins ist eine sehr starke. Eine schwach alkalische Lösung mit einem Gehalt von 1 : 5000 ist kräftig braun. Es entzieht sich der genauen Beurteilung, um wie viel die Färbekraft des Uromelanins stärker ist als die des Urochromogens oder Urochroms, weil ja beide Körper ganz verschieden tingiert sind. Nach colorimetrischen Vergleichen zwischen Uromelaninlösungen und nachgedunkelten Urochromlösungen, in denen wegen des Verschwindens der Diazoprobe und der Farbgleichheit schon eine Umwandlung in Uromelanin an-

genommen werden mußte, ist die normale Urochromausscheidung (in Uromelanin ausgedrückt) nicht hoch und dürfte weit unter 0,1 g liegen, bleibt also unter dem Werte, den wir bisher als normal ansahen (0,5) stark zurück. Die Urochromogenausscheidung (auch in Uromelanin ausgedrückt) kann weit höher sein als die Urochromausscheidung. Nach dem Diazowerte beurteilt wäre eine Uromelaninausscheidung von 0,16 pro die schon als relativ hoch anzusehen.

Die Versuche der chemischen Charakterisierung des Uromelanins erfolgten im engsten Anschluß an das Urochromogen und wird auf dieses verwiesen. Besonderes Augenmerk wurde der Frage zugewendet, ob das Uromelanin organisch gebundenen Schwefel enthalte. Es gelang bei verschiedenen Versuchen niemals, durch Alkali abspaltbaren S im Uromelanin nachzuweisen, ebensowenig wie in genügend gereinigtem Urochromogen. Das Uromelanin gibt auch bei der Zinkstaubdestillation keine Pyrrolreaktion. Seine Diazoreaktion ist nur sehr verwaschen rötlich oder überhaupt nur gelb, die $KMnO_4$ -Probe völlig negativ. Durch $KMnO_4$ und H_2SO_4 in der Hitze blaßt es völlig ab. Das Uromelanin gibt im Gegensatz zum Urochrom und Urochromogen keine Xanthoproteinreaktion mehr; die chromogene Tendenz dieser Körper hat sich daher schon im Nachdunkeln völlig erschöpft. Es gibt auch, ebensowenig wie seine Muttersubstanzen, keine Adamkiewicz-Liebermannsche, keine Biuret- und keine Millonsche Reaktion. Die Silberreduktion geht ihm ebenso ab wie dem Urochrom, im Gegensatz zum Urochromogen.

Zur Analyse gelangte ein Uromelaninpräparat, welches in der oben beschriebenen Weise dargestellt wurde (Uromelanin I). Die quantitative C- und H-Bestimmung¹⁾ nach Pregl ergab:

1. 7,62 mg: 10,87 mg CO_2 , 3,035 mg H_2O .
2. 6,99 mg: 9,82 mg CO_2 , 2,715 mg H_2O ; ferner 0,72 mg Asche.

Hieraus folgt in 100 Teilen:

- | | | |
|------------|--------|------------------|
| 1. C 38,92 | H 4,46 | Asche vorhanden. |
| 2. C 38,34 | H 4,35 | Asche ca. 10%. |

Die Mikro-Dumas-Bestimmung nach Pregl lieferte:

2,815 mg: 0,1617 ccm N (T. = 26°, C = 744 mm), daher N in 100 Teilen = 6,46%.

Einen Schmelzpunkt hatte die Substanz nicht, sie versintert beim Erwärmen ohne zu schmelzen.

¹⁾ Die Mikrobestimmung verdanke ich Herrn Dr. Ernst Philippi, Vorstand des chemischen Laboratoriums der Wiener Allgemeinen Poliklinik.

Die Untersuchung auf organisch gebundenen Schwefel ergab nach der Verbrennung mit Soda und Salpeter positiven Ausfall der Barytprobe, während im Filtrat nach Lösung des Uromelanins und Fällung mit HCl keine Schwefelsäure nachweisbar war. Die Menge des Schwefels war recht gering. Eine quantitative Mikrobestimmung des Schwefels wurde nicht ausgeführt. Die Frage nach dem Vorhandensein oder Fehlen organisch gebundenen Schwefels im Urochromogen muß vorläufig noch offen bleiben. Die Verbrennung einer größeren Uromelaninmenge ist zur Entscheidung dieser wichtigen Frage notwendig.

VII. Darstellung und Charakterisierung des Urochromogens.

Bei den Darstellungsversuchen des Urochromogens bin ich von der Fraktion II ausgegangen. Allen Darstellungen lag zunächst das Bestreben zugrunde, Wärmeinwirkung auszuschalten, um ein möglichst unverändertes Urochromogen zu erhalten. Die Abgrenzung des Urochrom(ogen)s von den anderen Bestandteilen des Harns ist noch keine genügend scharfe. Daher war es bisher nicht einmal möglich, die Grundeigenschaften des Körpers mit Sicherheit festzulegen. In dieser Richtung brachte die neuerliche Beschäftigung mit dem Gegenstande einen Fortschritt. Einige der wesentlichsten Reaktionen des Urochromogens wurden schon berührt.

a) Urochromogendarstellung durch Ammonsulfataussalzung und Ätherfällung der alkoholischen Lösung.

Die mit Ammonsulfat ausgesalzene Fraktion II diazopositiver Harn wurde nach Garrod mit 95 proz. Alkohol ausgeschüttelt, indem auf 3 Teile Flüssigkeit 1 Teil Alkohol kam. Der Alkohol nimmt einen großen Teil des Farbstoffs auf und scheidet sich beim Stehen scharf von der übrigen Flüssigkeit ab. Aus etwa 10 l Harn stammende Extrakte wurden gesammelt. Die Flüssigkeit dunkelt im Laufe der Zeit nach, ihre Diazoreaktion bleibt jedoch lange unverändert. Die KMnO_4 -Probe läßt sich mit alkoholischer Lösung nicht so gut anstellen wie mit wässriger. Läßt man aber bei Zimmertemperatur abdunsten und nimmt den Rückstand in H_2O auf, so erhält man diese Reaktion rein.

Um dieses alkoholische Extrakt für die Fällung mit Äther vorzubereiten, wurden verschiedene Versuche unternommen, ihm

das beigemengte Wasser zu entziehen. Abdampfen durch Wärme bis zur Trockne wurde nicht angewendet, weil derartige Versuche schon die leichte Oxydierbarkeit des Urochromogens ergeben hatten. Deshalb habe ich verschiedene Trocknungsmittel versucht, so ausgeglühtes CuSO_4 und CaCl_2 . Bei beiden war eine Wiedergewinnung des Urochromogens in alkoholischer Lösung nicht mehr möglich. Denn in demselben Maße wie der Alkohol das Wasser verliert, fällt das Cu resp. Ca-Salz aus, entsprechend der dem Urochrom(ogen) zukommenden Eigenschaft, in Alkohol unlösliche Cu- und Ca-Salze zu bilden. Nimmt man das ausgefallene Cu-Salz in H_2O auf, so erhält man nach Zerlegung mit H_2S keine deutliche Diazoreaktion mehr. Reiner pflegt noch die Lösung des Ca-Salzes zu reagieren. Doch stört auch hier das mit in Lösung gegangene CaCl_2 . Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde ausgeglühtes Na_2SO_4 zum Trocknen des Alkohols verwendet. Dieses entzieht der Flüssigkeit Wasser, doch erhält man keine absolut wasserfreie alkoholische Lösung. Außerdem ist wochenlanges Stehen notwendig, wodurch das Urochromogen schon zu leiden pflegt. Es setzt sich in der Regel schon Uromelanin aus der nachgedunkelten Flüssigkeit ab. Immerhin war es möglich auf diesem Wege eine alkoholische Flüssigkeit zu erhalten, welche noch reine Diazoreaktion gab. Diese wurde mit dem 4fachen Volumen absoluten Äthers gefällt. Der Farbstoff setzte sich nicht ganz trocken, sondern schmierig ab. Der Äther wurde abgegossen und der Rückstand längere Zeit im Exsiccator getrocknet, hierauf noch einmal in abs. Alkohol aufgenommen und wieder mit Äther gefällt. Der Farbstoff schied sich in trocknen braunen Klumpen ab. Die braungelbe wässrige Lösung gab aber schon die Diazoreaktion nicht mehr ganz rein, die KMnO_4 -Probe sehr schwach und die Ag-Reduktion träge. Der Schaum der Diazoreaktion war weißlich, die Flüssigkeit intensiv rot.

Diese wässrige Lösung entsprach ihrer Darstellung nach dem Urochromogen, enthielt aber diesen Körper nicht mehr unverändert. Es wurde nun untersucht, wie sich diese wässrige Lösung gegen Ammonsulfat verhalte. Hierbei ergab sich, daß Ammonsulfat nunmehr den größten Teil des Farbstoffs niederschlägt. Das Filtrat hatte noch den gelbgrünen Stich des reinen Urochromogens und gab eine Diazo- und KMnO_4 -Probe, die noch als positiv anzusprechen waren.

Urochromogen wird ebenso wie Urochrom von Haus aus durch Ammonsulfat nicht ausgesalzen. Darauf beruht ja die Darstellung nach Garrod. Das hier erhaltene Endprodukt war aber zum größten Teile durch Ammonsulfat aussalzbar. Es mußte somit während der Darstellung eine Veränderung vor sich gegangen sein, welche zur Bildung eines nunmehr in konz. Ammonsulfatlösung nicht mehr löslichen Körpers führte. Diese Änderung entspricht vollkommen dem Ausfallen des Uromelanins aus der mit Ammonsulfat gesättigten Urochromogenlösung beim längeren Stehen. Die weitere Prüfung dieses durch Ammonsulfat ausgesalzenen Farbstoffs ergab in allen Reaktionen Identität mit dem Uromelanin. Der Niederschlag wurde mit gesättigter Ammonsulfatlösung und mit verdünnter H_2SO_4 gewaschen, hierauf in einer geringen Menge Na_2CO_3 gelöst. Die dunkelbraune Lösung gab kaum eine Diazo-, keine $KMnO_4$ -, keine Ag-Reaktion mehr und wurde durch Säurezusatz in braunen Flocken gefällt, welche alkohol- und ätherunlöslich waren.

Das in seiner Farbe noch dem Urochromogen nahestehende Filtrat nach Ammonsulfataussalzung, welches noch Diazo- und $KMnO_4$ -Probe gab, blieb stehen, um zu beobachten, welche Veränderungen mit ihm vorgehen würden. Es dunkelte nach und schied nach etwa einer Woche schon ein braunes Sediment ab, das in allen seinen Eigenschaften dem Uromelanin entsprach.

Das Urochrom (ogen) wird von Haus aus durch Pb-Acetat bei saurer Reaktion nur in Spuren gefällt. Es war von Interesse zu untersuchen, wie sich die wässrige Lösung dieses durch Ätherfällung dargestellten Farbstoffs verhalten würde. Durch Pb-Acetat wurde nunmehr der größte Teil des Farbstoffs niedergeschlagen. Das Filtrat entsprach seiner Farbe, Diazo- und $KMnO_4$ -Reaktion nach, genau wie das Ammonsulfatfiltrat, nach dem Urochromogen, der durch Na_2CO_3 zerlegte Pb-Niederschlag aber dem Uromelanin.

Mit auf die gleiche Weise dargestelltem Urochrom aus normalem Harn wurden dieselben Ergebnisse in bezug auf die Änderung der Ammonsulfat- und Bleiacetatfällbarkeit erhalten. Auch hier war das ursprünglich in gesättigter Ammonsulfatlösung sehr gut lösliche Urochrom im Laufe der Darstellung zu einem darin überwiegend unlöslichen

Körper geworden, welcher in allen Reaktionen schon dem Uromelanin entsprach.

Es kann somit keinem Zweifel unterliegen, daß die Labilität des Urochromogens (und Urochroms) eine derartige ist, daß man seine Reaktionen nicht als feststehend betrachten kann. Dieser Farbstoff befindet sich in einer kontinuierlichen Änderung, so daß im Endprodukt schon eine völlige Umkehrung der Ausgangseigenschaften vorhanden sein kann. Während das unveränderte Urochromogen (ebenso wie das Urochrom) durch Ammonsulfat nicht aussalzbar ist und durch Pb - Acetat nur in Spuren gefällt wird, in Alkohol sehr gut löslich ist, gibt sein Oxydationsprodukt, das Uromelanin, gerade die entgegengesetzten Eigenschaften. Diese besonderen Umstände haben die Verfolgung des die Diazoreaktion Ehrlichs verursachenden Körper so schwierig und seine Darstellung beinahe unmöglich gemacht. Denn es ist begreiflich, daß ein derartiger Körper dem Untersucher während der Darstellung förmlich unter den Händen verschwinden muß.

b) Darstellung des Urochromogens als Barytsalz.

Das Urochromogen bzw. Urochrom konnte im Barytsirup und in der Proteinsäurefraktion des Harns gefunden werden. Ausgehend von dieser bekannten Eigenschaft habe ich versucht, in einem Teil der über Na_2SO_4 getrockneten alkoholischen Flüssigkeit durch Zusatz von Barytwasser eine Fällung des Körpers als Barytsalz zu erzielen. Auf diese Weise wurde ein Niederschlag von dunkelolivengrüner Farbe erhalten, welcher zum Teil wasserlöslich war, zum Teil aber erst durch Zusatz von verdünnter H_2SO_4 oder von Na_2CO_3 gelöst werden konnte. Die wässrige Lösung entsprach in ihrer Farbe vollständig dem Urochrom, gab eine Ehrlichsche Diazoreaktion mit weißlichem Schaume, schwache KMnO_4 - und Silberreaktion. Wenn auch die Menge des ausgefallenen Barytsalzes verhältnismäßig gering war, so waren doch die Beziehungen dieses Salzes zum Urochromogen nicht zu verkennen. Die alkoholische, mit Barytwasser versetzte Flüssigkeit blieb während des ganzen Sommers stehen. Sie hatte bis zum Herbst ein dunkles Sediment abgesetzt, welches jetzt fast gar

nicht in H_2O löslich war, keine Diazoreaktion mehr gab und in seiner Farbe und seinen Reaktionen sich als Uromelanin erwies.

Der durch Ätherfällung der alkoholischen Lösung erhaltene Körper (Urochrom nach Garrod) konnte noch nicht als genügend differenziert betrachtet werden; denn die Ätherfällung hebt das Urochrom(ogen) nicht genug scharf von den anderen Farbstoffen des Harns ab, welche fast durchweg die gleiche Eigenschaft besitzen. Die Fällung als Barytsalz war schon charakteristischer. Es wurde daher versucht mit der Lösung dieses Salzes den Grundeigenschaften des Urochromogens näherzukommen. Während der äthergefällte Körper meistens noch das Chromogen des Uroreins zu enthalten pflegt, daher auch die Adamkiewicz-Liebermannsche Probe gibt, fehlte diese Reaktion beim Barytsalze vollständig. Der Versuch durch Kochen mit Alkali oder durch die Siegfriedsche Probe mit Bleipapier organisch gebundenen Schwefel nachzuweisen, fiel negativ aus. Die Xanthoproteinreaktion war stark positiv. Die Millonsche Probe war in der von mir angegebenen Modifikation¹⁾ beim Barytsalz, ebenso wie auch immer beim äthergefällten Farbstoff positiv.

Der Befund der positiven Millonschen Probe war bei der Beschäftigung mit der Frage der Zugehörigkeit des Urochromogens eher verwirrend als fördernd. Es wurde lange daran gedacht, daß der die Diazoreaktion verursachende Körper ein Tyrosinderivat von besonderer Empfindlichkeit sei. Doch konnte diese Anschauung nicht aufrechterhalten werden. Es zeigte sich, daß Phenolverbindungen das Urochromogen sehr hartnäckig begleiten, daß sie in der Urochromogenfraktion, in dem mit Äther und durch Barytwasser gefällten Körper anwesend sind, ohne doch eigentlich zur Diazoreaktion in Beziehung zu stehen.

Eine Urochromogenfraktion, in welcher der Diazowert und der Wert der Phenole²⁾ genau bestimmt wurde, wurde der zweimaligen Destillation in 5proz. H_2SO_4 unterzogen. der Rückstand wurde noch mit Äther extrahiert, neutralisiert mit H_2O auf das ursprüngliche Volumen gebracht und wieder der Diazo- und Phenolwert als Tyrosin bestimmt. Die Diazo-, $KMnO_4$ - und Silberreaktionen waren unverändert, der Diazowert gleich dem der Ausgangslöslichkeit, dagegen war die Millonsche Reaktion und der ihr entsprechende Phenolwert fast völlig im Destillat und im Ätherextrakt des

¹⁾ Diese Zeitschr. 97, 170. 1919.

²⁾ Colorimetrische Phenolbestimmung im Harn. Diese Zeitschr. Im Druck.

Rückstandes zu finden. Daraus ergab sich, daß dem Urochromogen selbst keine Millonsche Reaktion und daher kein Tyrosinkern zu komme. Das Urochromogen erwies sich ferner als widerstandsfähig bei der hydrolytischen Spaltung in 5 proz. H_2SO_4 . Das gleiche konnte aber auch bei der Hydrolyse mit 20 proz. H_2SO_4 festgestellt werden. Der Diazowert wurde nach der Hydrolyse und Neutralisation unverändert wiedergefunden.

Mit der durch Ätherfällung erhaltenen Substanz wurde derselbe Versuch unternommen. Auch hier konnte der größte Teil des Phenolwertes im Destillat gefunden werden. Besonders deutlich aber wurde es, daß die Millonsche Reaktion nicht zum Farbstoff gehöre, als seine wässrige Lösung durch Ammonsulfat fast völlig entfärbt und der Phenolwert im Niederschlag und im Filtrat bestimmt wurde. Das schwach gefärbte Filtrat enthielt den ganzen Phenolwert, während der Niederschlag keine Millonsche Reaktion mehr gab. Dasselbe Ergebnis hatte die Differenzierung mit Pb-Acetat.

c) Darstellung des Urochromogens durch Ausfallen beim Eindampfen.

Es war aber wünschenswert, alle Befunde noch an einem Präparat zu erhärten, welches noch rein die beiden für das Urochromogen charakteristischen Reaktionen — Diazo- und $KMnO_4$ -Probe — gab. Es wurde daher versucht, durch Umfällen gereinigte Fraktion II nach Ammonsulfataussalzung durch Abdampfen am Wasserbade bei schwach saurer Reaktion zu konzentrieren. Hierbei schieden sich olivengrüne Schüppchen aus, welche abfiltriert und mit Ammonsulfatwasser gewaschen wurden. Sie lösten sich sehr gut in Wasser und Alkohol, gaben noch ganz rein die Ehrlichsche, schon etwas schwächer, aber noch rein die $KMnO_4$ -Probe und Ag-Reduktion. Durch Behandeln mit absolutem Alkohol konnte vom mitausgeschiedenen Ammonsulfat abgetrennt werden.

Die absolut alkoholische Urochromogenlösung ergab, in der Wärme abgedunstet, einen bräunlichen Rückstand. Dieser erwies sich jetzt als nur teilweise in absolutem Alkohol und Wasser löslich. Die erhaltene alkoholische Lösung wurde wieder abgedampft. Der Rückstand war wieder nur teilweise in absolutem Alkohol und Wasser löslich. Die Wiederholung ergab dasselbe Resultat.

Es vollzog sich somit hier mit einem nach seiner Darstellung und seinen Reaktionen als Urochromogen anzusprechenden Körper unter den Augen des Beobachters jene Änderung, die der Uromelaninbildung

zugrunde liegt, d. h. die Umwandlung eines in Alkohol und Wasser gut löslichen Körpers in eine alkoholunlösliche und in Wasser wenig lösliche dunklere Substanz. In Na_2CO_3 war der Rückstand gut löslich und daraus durch Säure fällbar. Diazo-, KMnO_4 - und Ag-Reaktion waren aber nunmehr negativ geworden.

d) Spontane Fällung des Urochromogens mit Uromelanin.

Läßt man eine mit Ammonsulfat gesättigte Fraktion II stehen, so fällt, wie früher auseinandergesetzt wurde, das Uromelanin aus. Dies ist besonders bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion der Fall. Wenn die Reaktion der Flüssigkeit sauer war, so fällt mit dem Uromelanin gleichzeitig Urochromogen aus, welches alle charakteristischen Reaktionen des Körpers noch gibt, also Diazo-, Permanganat- und Silberprobe. Den noch wenig veränderten Farbstoff erkennt man an olivengrüner Farbe und an seiner guten Löslichkeit in Alkohol und Wasser. Beim Stehen verwandelt sich dieses Urochromogen in alkalischer Lösung alsbald in Uromelanin.

Das bei der Darstellung nach c) oder d) ausgefallene Urochromogen verhält sich in seinen Reaktionen gleich. Durch Hg-Sulfatzusatz¹⁾ entsteht beim Erhitzen fleischfarbiger Niederschlag, welcher mit NaNO_2 dunkelrot wird; die überstehende Flüssigkeit ist farblos (negative Millonprobe). Die Adamkiewicz-Liebermannsche Probe ist negativ, ebenso die Biuretreaktion. In keinem Falle war durch Alkali abspaltbarer Schwefel nachweisbar. Bei der Zinkstaubdestillation entsteht kein Körper, der einen mit dem Ehrlichschen Aldehyd getränkten Papierstreifen rötet. Der Körper ist daher kein Pyrrolderivat. Urochromogen löst Kupferoxyd und gibt beim Kochen mit Alkali roten Kupferoxydulniederschlag²⁾. Die Xanthoproteinreaktion fällt in allen Urochrom(ogen)präparaten sehr intensiv aus. Sie ist die einzige Farbenreaktion, welche für die Zugehörigkeit des Urochromogens verwertet werden konnte. Diese Reaktion kommt bekanntlich unter den Eiweißderivaten dem Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan zu. Da Tyrosin wegen der negativen Millonschen, Tryptophan

¹⁾ Diese Zeitschr. **97**, 170. 1919.

²⁾ In dieser Beziehung verhält es sich ähnlich dem Uroerythrin. Demgegenüber hat Urobilinogen nur eine recht schwache Reduktionskraft.

wegen der fehlenden Adamkiewicz-Liebermannschen Probe ausgeschlossen werden mußten, so blieb nur noch Phenylalanin übrig, zu welchem das Urochromogen in Beziehung stehen konnte.

Nachdem sich so per exclusionem der Hinweis auf das Phenylalanin ergeben hatte, wurde versucht, durch andere Reaktionen diese Beziehung zu stützen oder zu entkräften. Phenylalanin gibt beim Kochen mit 25 proz. H_2SO_4 und einem Körnchen Kaliumbichromat den charakteristischen Geruch nach Phenacetaldehyd. Durch die Phenacetaldehydgeruchsprobe haben Abderhalden und Pregl¹⁾ im Harn Phenylalaninderivate festgestellt in einer Gruppe von Körpern, die dem Urochrom(ogen) jedenfalls sehr nahe stehen. Ich habe die Phenacetaldehydprobe zunächst mit reinem Phenylalanin angestellt und denselben charakteristischen Geruch bei allen Urochromogenfraktionen und insbesondere auch beim spontan ausgefallenen Urochromogen und im Urochrom wieder gefunden. Das Uromelanin gibt bei dieser Probe einen schon minder charakteristischen Geruch, was offenbar auf die mit der Oxydation verbundene Desintegrierung des Körpers zurückzuführen ist.

Das Urochromogen hat schon an und für sich einen eigenartigen Geruch. Ich habe in einer früheren Arbeit diesen Geruch als phenolartig bezeichnet. Ich möchte nach eingehender Beschäftigung mit dieser Frage diese Verhältnisse folgendermaßen charakterisieren: Das Urochromogen hat einen durchdringenden aromatischen Geruch. Er entspricht vollständig dem sog. urinösen Geruch und hat in den spontan ausgefallenen Substanzen eine recht starke Intensität. Ähnlich, wenn auch vielleicht etwas schwächer, riecht das Urochrom. Bei der Umwandlung in Uromelanin tritt der charakteristische Geruch stark zurück. Es verstopft sich daher bei der Oxydation offenbar die den eigentümlichen Geruch bedingende Atomgruppe.

Nach der dem Urochromogen zukommenden Diazoreaktion, bei welcher ein Oxyazofarbstoff entsteht, trägt der Körper mindestens eine HO-Gruppe. Phenole, in welchen die Para- oder eine der beiden Orthostellungen unbesetzt ist, geben Oxyazokörper von meist intensiv roter oder rotgelber Farbe²⁾. Da für

¹⁾ Zeitschr. f. physiolog. Chemie **46**, 19. 1905.

²⁾ Nölting und Kohn, Ber. **17**, 358. Anmerk. 1884.

das Zustandekommen der Diazoreaktion das Hydroxyl am Phenolring sitzen muß, so dürfte das Vorkommen der Phenolgruppe im Urochromogen als gesichert anzusehen sein. Nach dem früher Auseinandergesetzten ist ferner eine längere Seitenkette als Ursache der hohen Empfindlichkeit der Ehrlichschen Reaktion anzusehen. Wir müssen somit im Urochromogen eine freie HO-Gruppe und eine längere Seitenkette annehmen. Diese beiden Gruppen können in der Ortho- oder Parastellung zueinander stehen.

Zur Entscheidung dieser Frage wurde die FeCl_3 -Reaktion des Urochromogens herangezogen. Diese verhält sich folgendermaßen: Saure Urochromogenlösungen geben, ähnlich wie Phenol, keine Eisenchloridreaktion, schwach saure eine olivengrünliche, neutrale oder alkalische eine ausgesprochen rote Reaktion. Nach Meyer¹⁾ färben sich Derivate des Brenzcatechins mit FeCl_3 grünlich. Gegen die Parastellung würde das Fehlen der Millonprobe sprechen, obzwar das Hydrochinon als p-Dioxybenzol auch keine Millonsche Reaktion gibt.

Die Silberreduktion läßt sich schwer für die Konstitutionsermittlung verwerten. Brenzcatechin und Hydrochinon reduzieren beide sehr stark. Jedenfalls sind ungesättigte Gruppen auch im Urochromogen an dieser Reaktion beteiligt.

Die KMnO_4 - und die Alkalireaktion sprechen im gleichen Sinne. Es handelt sich beim Urochromogen um eine exquisit sauerstoffempfindliche und durch Sauerstoffaufnahme Farbstoff bildende (chromogene) Substanz. Unter den Phenolderivaten fand ich eine ähnliche Empfindlichkeit nur bei den Orthoverbindungen und beim Hydrochinon. Wenn wir das Paradioxybenzol, welches keine Diazoreaktion gibt, ausschalten können, so würde sich das Urochromogen mit größerer Wahrscheinlichkeit als ein Orthoderivat ansprechen lassen. Unter den Orthoverbindungen des Phenols ist im allgemeinen die chromogene Tendenz ausgesprochener als bei den Paraverbindungen. Wir haben es aber vielleicht beim Urochromogen nicht nur mit zwei am Phenolring hängenden Gruppen zu tun, sondern es könnten noch weitere Atomkomplexe vorhanden sein, welche der außerordentlichen Reaktivität des Körpers

¹⁾ Konstitutionsermittlung. Springer Berlin 1903, S. 302.

zugrunde liegen. Daß das Urochromogen den Charakter einer Säure hat, wurde schon in früheren Arbeiten dargelegt und geht auch aus dem in dieser Arbeit geschilderten Verhalten deutlich hervor.

Die Eigenschaften des Urochromogens lassen sich zusammengefaßt folgendermaßen beschreiben: Es ist eine Säure mit ausgesprochen salzbildnerischer Fähigkeit, wasser- und alkohollöslich, dagegen ätherunlöslich. Die Erdalkalisalze sind alkohol-, die Metallsalze auch wasserunlöslich. Es ist auf Grund der Xanthoproteinreaktion und der Phenacetaldehydprobe als Phenylalaninderivat anzusprechen, trägt auf Grund der Diazoreaktion mindestens eine Hydroxylgruppe, die sich im Hinblick auf die grünliche FeCl_3 - und auf das Fehlen der Millonischen Reaktion höchstwahrscheinlich zur Alaninkette in Orthostellung befindet. Auf Grund der KMnO_4 -, Alkali- und Silberreaktion dürfte es jedoch noch weitere Atomgruppen besitzen, die der hohen chromogenen Tendenz des Körpers zugrunde liegen. Es verwandelt sich durch O-Aufnahme, wobei zunächst die mit der KMnO_4 -, Alkali- und Silberreaktion zusammenhängende Gruppe oxydiert wird, in das stärker gefärbte Urochrom, welches schon eine Diazoreaktion von geringerer Intensität gibt und geht schließlich, ebenso wie das normale Urochrom, in das sehr wenig reaktive Uromelanin über. Das Uromelanin stellt das sauerstoffgesättigte Endprodukt sowohl des pathologischen Urochromogens wie des physiologischen Urochroms dar.

VIII. Ursprung und Beziehungen des Urochromogens.

Die klinische Beobachtung lehrt, daß das Urochromogen ausschließlich mit dem endogenen Stoffwechsel zusammenhängt. Dasselbe ergibt die Verfolgung des physiologischen Urochroms¹⁾. Im Gegensatz zur Auffassung Dombrowskis²⁾ von seinem Urochrom ergab sich bei mir keinerlei Beziehung zur Nahrungsaufnahme. Wir haben es somit bei diesen Farbstoffen

¹⁾ Sitzungsbericht d. Wien. Akad. d. Wiss. I. c.

²⁾ I. c. und Browinski und Dombrowski. Journ. de Physiol. et de Pathol. génér. 1908, Nr. 5.

mit intermediären, ausschließlich dem Gewebszerfall entstammenden Stoffwechselprodukten zu tun. Der Nachweis, daß es sich beim Urochromogen (Urochrom) um ein Phenylalaninderivat mit ausgesprochen chromogener Tendenz handelt, die bis zur Bildung eines echten Melanins geht, bringt es in Beziehung zu den Alkaptonkörpern. Seitdem nachgewiesen werden konnte, daß Tyrosin und Phenylalanin beim Alkaptonuriker auch als Alkapton ausgeschieden wird, ist man geneigt, diesen oder einen ihm nahestehenden Körper als Zwischenprodukt im Tyrosin- und Phenylalaninstoffwechsel anzusehen, welches beim normalen Menschen völlig abgebaut, beim Alkaptonuriker jedoch zur Ausscheidung gelangt. Im Urochrom und Urochromogen haben wir zwar anders als die Hydrochinonessigsäure konstituierte Körper vor uns, welche aber einen Phenylalaninkern enthalten und auch alkaptonbildend sind. Vielleicht ist diese Tatsache geeignet, einen Beitrag zu dieser Frage zu liefern.

Das Material, aus welchem das Urochrom(ogen) entsteht, ist nunmehr schärfer umgrenzt. Es kommen nur die beiden Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin oder Derivate derselben in Betracht. In meiner ersten Arbeit über das Urochromogen¹⁾ habe ich in Anlehnung an die damals herrschende Anschauung von der Verwandtschaft zwischen Urobilin und Urochrom diesen Körper auch als ein Derivat der roten Blutkörperchen angesehen. Es war in groben Zügen ein Parallelismus zwischen dem Zerfall der Erythrocyten und der Diazoreaktion nachzuweisen. Die genaue Verfolgung des Gegenstandes hat jedoch diese Anschauung nicht zu stützen vermocht. Insbesondere ergab sich aus der histologischen Untersuchung des Blutes²⁾ kein Anhaltspunkt für ihre Richtigkeit. Ferner hat die quantitative Verfolgung der Urobilinausscheidung (mittels einer noch nicht veröffentlichten Methodik) beim Gesunden und beim schweren Phthisiker keine Stütze für die Abstammung des Urochromogens aus dem Hämoglobin ergeben. Während ein gesunder Mensch im Stuhl und im Harn zusammen etwa 0,400 g Urobilin ausschied, war diese Menge beim Phthisiker mit Urochromogenurie nicht nur nicht größer, sondern betrug nur 0,290 g.

¹⁾ Beitr. z. Klin. d. Tuberkul. 8, 177.

²⁾ Wien. med. Wochenschr. 1914, Nr. 4.

Die einzige histologisch auffallende Veränderung in den Blutaussstrichen schwerer Phthisiker betraf die Degeneration und Zerstörung der Leukocyten. Kernfragmente und Schollen, in Auflösung begriffene Leukocyten und Leukocyten mit schlecht färbbaren, chromatinarmen oder pyknotischen Kernen, ein stark nach links verschobenes Arnetisches Blutbild waren eine regelmäßige Begleiterscheinung der Urochromogenausscheidung im Harn. Geissler¹⁾ hat die Ursache der Ehrlichschen Reaktion auf Leukocytenzerfall zurückgeführt. In genauen Untersuchungen konnte Sawelieff²⁾ während des Typhus Parallelismus zwischen Widal, Leukopenie und Diazoreaktion feststellen.

Wahrscheinlich beteiligen sich Zerfallsprodukte der Leukocyten an der Bildung des Urochromogens. Jedoch sie als alleinige Quelle derselben anzusprechen, liegt kein Grund vor. Vielmehr dürften sie nur im Rahmen ausgedehnterer degenerativer Vorgänge im Organismus an der Bildung dieses Körpers teilnehmen. Als Bildungsmaterial war ich später geneigt³⁾, Kernsubstanzen anzusehen. Diese Anschauung, zunächst nahegelegt durch die histologische Blutuntersuchung, dann durch die vor allem im Krankheitsbilde der Tuberkulose zum Ausdruck kommende vitale Dignität des Urochromogens, ferner durch die innige Beziehung zum endogenen Stoffwechsel, erfährt nunmehr eine weitere Stütze durch den Nachweis, daß das Urochrom(ogen) die Muttersubstanz eines echten Melanins ist und damit in enge Beziehung zum Pigment tritt.

Nach den ausgedehnten und gründlichen Untersuchungen von Jarisch, Rössle, Szily, des Zoologen Hertwig und seiner Schüler und insbesondere von Meirowsky⁴⁾ ist der Ursprung des Pigments in den Kern zu verlegen. Dieses merkwürdige Zusammentreffen anscheinend so weit auseinanderliegender Körper — der Muttersubstanz des Pigments und des Urochromogens — in ihrem Endprodukt spricht für verwandtschaftliche Beziehungen zwischen beiden und dürften ihre Quellen, wenn nicht identisch, so doch nahe beieinander gelegen sein.

1) Wratsch 1898, S. 244.

2) Inaug.-Diss. St. Petersburg 1900.

3) Med. Klin. 1912, Nr. 52.

4) Über den Ursprung des melanotischen Pigments der Haut und des Auges. Klinkhardt, Leipzig 1908. Lit. daselbst.

Als Entstehungsort hat man seit langem sowohl für das Urochrom¹⁾ wie für das Urochromogen²⁾ die Niere in Betracht gezogen. Keine der Körperflüssigkeiten, kein Organ im Extrakt gibt Diazo- oder Urochromogenreaktion. Nierenschädigungen im Verlaufe der Tuberkulose geben Anlaß zum Verschwinden der Diazoreaktion. Bei der Schrumpfniere wird der Harn sehr urochromarm³⁾. Unter diesen Umständen dürfte die Annahme gerechtfertigt sein, daß die Niere die Bildungsstätte des Urochrom(ogens) ist und diesen Farbstoff als spezifisches Sekret aus zugeführten Kernschlacken bildet, ähnlich wie die Leber aus dem zugeführten Hämatin das Bilirubin. Wissen wir ja doch, daß der Niere auch sonst — wie in der Hippursäurebildung — eine besondere Rolle beim Abbau der aromatischen Substanzen zukommt.

Diese Auffassung erscheint vielleicht auch darum ungewollungen, weil ein mit der Niere in enger Beziehung stehendes Organ, die Nebenniere, in ihrem spezifischen Sekret, dem Adrenalin, sowohl in konstitutioneller Beziehung wie auch im Hinblick auf die Fähigkeit der Melaninbildung Beziehungen zum Urochrom(ogen) aufweist.

Warum die Niere unter bestimmten pathologischen Verhältnissen statt des physiologischen Urochroms die niedrigere Oxydationsstufe, das Urochromogen, bildet, läßt sich in Konsequenz der von mir gefundenen Tatsachen und bisher entwickelten Anschauungen⁴⁾ nur durch toxische Schädigung und Störung der inneren Verbrennung erklären. Hierbei muß ich es offen lassen, ob diese Oxydationsstörung in den Zellstoffwechsel des Gesamtorganismus oder nur in die Nieren zu verlegen ist.

¹⁾ Klemperer, Berl. klin. Wochenschr. 1903, S. 313.

²⁾ Geissler, l. c., Delbos Thèse Paris 1903 und Malys J. B. 1903, S. 985, M. Weiss, l. c.

³⁾ Stepp, Münch. med. Wochenschr. 1918, Nr. 21.

⁴⁾ Münch. med. Wochenschr. 1911, Nr. 25.

Über Fibrinolyse.

Von

M. Rosenmann.

(Aus dem chemischen Laboratorium Rudolfstiftung, Wien.)

(Eingegangen am 15. September 1920.)

Das Studium der Fibrinolyse ist sowohl für den physiologischen Chemiker als für den Pathologen von hohem Interesse. Denn wir erwarten mit Recht durch Aufdeckung der Vorgänge, die sich bei der Fibrinolyse abspielen, etwas über die Natur des Fibrinogens und Fibrins und damit über das ganze trotz zahlreicher Arbeiten noch ganz in Dunkel gehüllte Gerinnungsproblem zu erfahren. — Noch wichtiger erscheint die ganze Frage für den Pathologen, denn das Fibrin, das bei verschiedenen Entzündungen ausgeschieden wird, ist ja immer der Vorläufer der bindegewebigen Organisation, die offenbar dort eintritt, wo das Fibrin nicht bald gelöst wird. So werden z. B. Thromben dann rasch resorbiert, wenn die Fibrinolyse gesteigert ist, wie dies bei der Phosphorvergiftung von Jacoby¹⁾ nachgewiesen wurde. — Je nach der mehr oder weniger rasch eintretenden Fibrinolyse heilen Entzündungen der serösen Häute ohne oder mit Verwachsungen und Schwartenbildung. Es sei hier besonders an die fibrinösen Entzündungen des Perikards und der Pleura erinnert. Die verlangsamte oder ausbleibende Fibrinolyse des fibrinösen Exsudates bei croupöser Pneumonie führt zur Indurativpneumonie.

Vieles scheint dafür zu sprechen, daß auch bei der Tuberkulose das Vorwiegen der Zerfallsvorgänge (käsige Einschmelzung, Kaverne) oder der der plastischen Organisation (schieferige Induration) zum guten Teile auf Rechnung der Fibrinolyse zu setzen ist. Denn einerseits findet man, wie noch später des näheren ausgeführt werden soll, bei der plastischen Form der Tuberkulose tatsächlich die Fibrinolyse stark hemmende Körper, andererseits kann man in Tuberkeln Fibrinnetze nachweisen, die dann in

Fibrinoidbalken umgewandelt werden*). Die Untersuchungen über das Verhalten des Serums der verschiedenen Formen der Tuberkulose, die diese Anschauung stützen sollen, sind erst im Gange.

Bevor wir aber an das Problem der Fibrinolyse näher herantreten, wollen wir uns zunächst in groben Zügen mit einigen Arbeiten, die diese Frage behandeln, vertraut machen.

Salkowski²⁾ hat als erster beobachtet, daß, wenn man infiziertes Fibrin in Chloroformwasser stehenläßt, nach einiger Zeit Fibrinolyse eintritt **). Nach Hammarsten³⁾ kann man Fibrin durch verdünnte Säuren und Alkalien zur Quellung und dann nach einiger Zeit zur Lösung bringen. H. Rulot⁴⁾ hat aus Pferdeblutplasma leukocytenfreies und leukocytenhaltiges Fibrin dargestellt und es 4 resp. 15 Tage in 2 proz. NaFl- oder NaCl-Lösung + Chloroform bei 38–40° gelassen.

Nach dieser Zeit hat er den N der Gesamteiweißkörper, der gerinnbaren und nicht gerinnbaren nach Kjeldahl bestimmt, während nun aus dem leukocytenfreien Fibrin kein ungerinnbares Eiweiß sich bildete, war mehr als die Hälfte des leukocytenhaltigen Fibrins in Form ungerinnbarer Eiweißstoffe. Die Autolyse des leukocytenhaltigen Fibrins erfolgt nach Rulot rascher in konzentrierten Salzlösungen. Rulot glaubt daher, daß die Autolyse des leukocytenhaltigen Fibrins durch ein Ferment erfolge, das durch Desaggregation der Leukocyten durch die Salze frei werde. A. Dastre⁵⁾ glaubt, daß die Verdauung des Fibrins in Salzlösungen weder auf aus dem Organismus noch auf aus dem Blute stammenden Fermente beruhe und daß sie auch nicht auf die Einwirkung von Mikroorganismen zurückzuführen sei. Als Beweis führt Dastre an, daß bei der Verdauung durch Salzlösungen nie Tyrosin, sondern nur Proteosen und Peptone als Endprodukte auftreten. Derselbe Autor berichtet⁶⁾ ferner über Autolyseversuche mit rohem Fibrin, das er in Salzlösungen (15 proz. NaCl, 2 proz. Nafl) einige Wochen bei Zimmertemperatur oder einige Tage bei 40° digeriert. Es trat nicht nur eine Lösung des Fibrins, sondern auch eine Spaltung in Proteosen und Peptone ein. Nach Dastre bewirken auch Lösungen von derselben Konzentration, wie sie im Körper vorkommen, nach mehreren Wochen Autolyse⁷⁾. Nolf⁸⁾ erzeugte aus ausgewaschenem Schweinefibrin durch Verdauung resp. Autolyse ein peptisches, pankreatisches und leukocytäres Propepton. In der ersten Zeit der aseptischen Autolyse des Fibrins (manchmal schon nach 8 Tagen) beobachtete Verfasser die Tryptophanreaktion. Verbleibt das Fibrin mehrere Monate im Brutschrank in Kochsalzwasser bei 2 proz. NaFl, so finden sich geringe Mengen von Leucin und Tyrosin. Die Autolyse rührt also von einem Ferment her, das näher dem Trypsin als dem Pepsin ist.

Nolf berichtet dann⁹⁾ über fibrinolytische Versuche mit Propeptan. In vitro hindert das Propeptan stets etwas die Fibrinolyse. Die intravenöse Einspritzung beim nüchternen Hunde, dessen Leber exstirpiert wurde,

*) Aschoff, Lehrbuch der pathologischen Anatomie I, S. 560.

***) Siehe auch van der Marck¹⁰⁾, der dasselbe mit reinem Fibrin erzielte.

erzeugt stets eine vorübergehende Fibrinolyse. In vitro begünstigt diese Lösung die Fibrinolyse. Nach Hasse¹⁰⁾ wandelt sich der geronnene Faserstoff durch Berührung mit Eiter zu einer blaßgelben klebrigen Flüssigkeit um. Fr. Erben¹¹⁾ setzte das Blut von einer lieno-myelogenen Leukämie der Autolyse aus, fällte es dann mit Alkohol und extrahierte den Niederschlag mit Glycerin und konnte mit 5 g des Extraktes in 3 promill. Soda-lösung eine große Fibrinflocke innerhalb 48^h genau so zur Lösung bringen wie mittels Trypsin. In dem Autolysat hat Erben Peptone und Albumosen nachgewiesen. Mit normalem Blut oder mit Blut einer lymphatischen Leukämie gelangen diese Versuche nicht. Fr. Müller¹²⁾ hat gemeinsam mit Simon die Lyse der pneumonischen Infiltrate studiert und festgestellt, daß dieselbe im Stadium der grauen Hepatisation durch ein leukocytäres tryptisches Ferment geschieht. In neuerer Zeit hat Hekma¹³⁾ gefunden, daß man durch schwache Alkalien und Säuren das Fibrin in Lösung und dann wieder durch Trombin zur Gerinnung bringen kann. E. Herzfeld und R. Klinger¹⁴⁾ fanden dagegen, daß, wenn man aus Rinderoxalatplasma gewonnenes Fibrin durch Alkalien wieder in Lösung bringt, die Gerinnung durch Thrombinzusatz nach vorhergehender Neutralisation nicht mehr gelingt.

In folgenden Versuchen galt es zunächst die Bedingungen der Fibrinolyse in Salzlösungen genauer kennenzulernen, bevor dieselbe mit anderen Körpern versucht wurde. Verwendet wurde frisches natives Pferdefibrin.

Versuch 1: In Eprovette Ia und Ib kommen 5 ccm 0,6 proz. NaCl-Lösung, in Eprovette 2a und 2b 5 ccm 8 proz. NaCl. Als Antisepticum wird Toluol verwendet. In die 4 Eprovetten wird je eine ungefähr gleich große Fibrinflocke gegeben. Eprovette 1a und 2a werden bei einer Temperatur von ca. 12—15° belassen, Eprovette 1b und 2b kommt in den Brutschrank.

Tabelle I.

	Temperatur	Antisepticum	Fibrin	Resultate nach einer Beobachtungszeit von		
				18 ^h	42 ^h	66 ^h
Ia. 0,6 proz. NaCl	12°—15°	Toluol	natives Pferdefibrin	—	—	+
Ib. 0,6 proz. NaCl	37°	"	"	—	+	++
IIa. 8 proz. NaCl	12°—15°	"	"	+	++	+++
IIb. 8 proz. NaCl	37°	"	"	++	+++	+++

Dieser Versuch lehrt uns übereinstimmend mit den Angaben Rulots und Dastres, daß Fibrin sowohl bei Zimmertemperatur als bei 37° in Lösung zu bringen ist und daß die Fibrinolyse in konzentrierten Salzlösungen viel rascher erfolgt. Im Gegensatz

jedoch zu den Angaben der genannten Autoren zeigt dieser Versuch, daß die Fibrinolyse bei 8proz. NaCl-Lösung schon nach 18^h bei Körpertemperatur und nach ca. 2 Tagen bei Zimmertemperatur eintritt, daß auch bei 0,6proz. Kochsalzlösung die Fibrinolyse bei Körpertemperatur schon nach 1¹/₂ Tagen und bei Zimmertemperatur nach 2¹/₂ Tagen eingetreten ist. Allerdings ist ein gut Teil der Fibrinolyse in diesem Versuch auf Konto des Toluols zu setzen, das, wie aus verschiedenen Versuchen sich zu ergeben scheint*), die Fibrinolyse fördert. Da, wie aus diesem Versuch zu ersehen ist, das native Fibrin leicht in Lösung zu bringen ist, und um jedenfalls Leukocytenwirkung auszuschließen, wurde für die weiteren Versuche ein leukocytenfreies festes Fibrin aus einem mit Na-Oxalicum gewonnenem Pferdeplasma dargestellt.

Pferdeblut wird in einer 1proz. Na-Oxalatlösung aufgefangen, gut geschüttelt und dann auf 24^h in den Eiskasten gestellt, bis sich auf dem roten Bodensatz eine weiße Schicht von Leukocyten absetzt. Die darüberstehende klare Flüssigkeit wird jetzt abgeschüttelt und dann in mit Natriumoxalat ausgewaschenen Zentrifugengläsern 2 mal zentrifugiert. Hierauf wird das Plasma noch mehrmals filtriert und zur Darstellung von Fibrin verwendet. Die Gerinnung wurde mittels Calciumchlorid erzeugt, wobei noch vorher das Optimum der zuzusetzenden Calciummenge durch Titration bestimmt wurde. Zu diesem Behufe werden 6 Eprouvetten mit je 5 ccm Plasma gefüllt und aufsteigend von 2—7 gtt 10proz. Calciumchlorid zugefügt und durch Schütteln gut vermischt. Das Optimum liegt dort, wo die Gerinnung am frühesten eintritt und wo sie am stärksten ist, was durch leichtes Schütteln festgestellt werden kann. Die Gerinnung tritt bei Laboratoriumstemperatur in ca. 15—20^h auf, wobei nur ein Teil des Plasmas geronnen ist und erst nach ca. 3^h ist das ganze oder wenigstens der größte Teil des Fibrinogens in Fibrin übergeführt. Nachdem so die Menge Calciumchlorid festgestellt ist, wird das Plasma durch einen Zylinder abgemessen, mit der entsprechenden optimalen Calciumchloridmenge versetzt, gut durchgemischt, in ca. 1 m lange Glasröhren aufgesaugt, zugestopft und in horizontaler Lage der Gerinnung überlassen. Auf diese Weise hat man gleichmäßige Verteilung resp. Mengen des Fibrins gesichert. Nach 24^h wird das Fibrin auf eine

*) Es konnte nämlich die Wahrnehmung gemacht werden, daß bei Gegenwart von Toluol die Fibrinolyse, namentlich des leukocytenhaltigen Fibrins, früher eintrat als dort wo das Toluol nicht verwendet wurde. Dieselbe Beobachtung wurde mit Fibrin in destilliertem Wasser mit und ohne Toluol gemacht. Während das Fibrin in destilliertem Wasser bei Abwesenheit von Toluol lange ungelöst blieb, zerfiel dasselbe in destilliertem Wasser + Toluol viel früher. Dieselbe Wirkung hatte das Menthol. Diese Versuche wurden alle bei 37° ausgeführt.

reine Korkplatte ausgeschüttelt und 24–36^h unter der strömenden Wasserleitung gewaschen. Das Fibrin wurde deshalb so lange in den Röhren belassen, weil es sich herausstellte, daß bei zu frühem Herausschütteln das Fibrin nicht genügend fest war. Dieses Fibrin nennen wir im folgenden immer Plasmafibrin.

Man erhält so resistente, schneeweiße Fibrinzyylinder, die eine für praktische Zwecke genug gleichmäßige Dosierung gestatten. Wichtig ist es, einwandfreies frisches Plasma zu verwenden. Denn ein Plasma, in dem bereits Gerinnsel vorhanden sind, gibt ein weniger resistentes der Autolyse leicht verfallendes Fibrin. Das so gewonnene Fibrin wird nun in dem Eiskaeten aufbewahrt und ist für einige Tage verwendungsfähig; nach längerer Zeit verliert auch dieses Fibrin seine Resistenz und damit seine Verwendbarkeit zu einwandfreien Fibrinolyseversuchen.

Im Laufe der weiteren Versuche mußte auf das Toluol als Antisepticum, das, wie bereits erwähnt, die Fibrinolyse beeinflusst, verzichtet werden. Das Phenol erwies sich übereinstimmend mit früheren Befunden¹²⁾ als ein die Fibrinolyse hemmender Körper. Am besten erwies sich destilliertes Wasser, leider ist dies aus begrifflichen Gründen nicht verwendbar. So mußte das Auslaugen mit NaFl in 1–2proz. Lösung gefunden werden.

Dieses Plasmafibrin wird nun verwendet zur Beantwortung der Frage: Wie verhalten sich die einzelnen Salzlösungen gegenüber frischem leukocytenfreien Fibrin. 2. Wie verhält sich destilliertes Wasser gegen dasselbe. 3. Wie verhält sich NaFl gegenüber älterem Fibrin (ca. 2 Wochen alt). 4. Wie verhält sich destilliertes Wasser gegen älteres Fibrin.

Tabelle II.

Salz	Konzentration	Temperatur	Menge	Art des Fibrins	18 ^h	42 ^h	66 ^h	90 ^h	114 ^h	138 ^h
NaCl . .	8%	37°	5 ccm	fr. Pla-mafibrin	—	—	—	—	—	+
	4%	37°	5 ccm	" "	—	—	—	—	+	+
	2%	37°	5 ccm	" "	—	—	—	—	+	+
	0,8%	37°	5 ccm	" "	—	—	—	+	+	+
NaFl . .	4%	37°	5 ccm	" "	—	—	—	—	—	+
	2%	37°	5 ccm	" "	—	—	—	—	+	+
	1%	37°	5 ccm	" "	—	—	—	—	+	+
	1/3%	37°	5 ccm	" "	—	—	—	—	+	+
Natr. citr.	2%	37°	5 ccm	" "	—	—	—	—	—	—
Na ₂ SO ₄ . .	2%	37°	5 ccm	" "	—	—	—	+	+	+
Na ₂ (COO) ₂	2%	37°	5 ccm	" "	—	—	—	—	—	—
K ₂ SO ₄ . .	2%	37°	5 ccm	" "	—	—	—	+	+	+
H ₂ O dest.	—	37°	5 ccm	" "	—	—	—	—	—	—
NaFl . . .	2%	37°	5 ccm	alt. Plasmafibrin	—	+	+	+	+	+
H ₂ O dest.	—	37°	5 ccm	" "	—	—	—	—	—	—

*) Bakterienwirkung.

**) Bakterienwirkung.

Aus dieser Tabelle ist zu ersehen, daß die Art der Salzlösung, die man für die Fibrinolyse verwendet, nicht gleichgültig ist.

Das NaFl ist wohl auch nicht das ideale, ich möchte sagen, unparteiische Mittel für Fibrinolyseversuche. Gleichwohl ist es doch das einzige unter diesen Salzen, das genug antiseptisch wirkt.

Es scheint aber nicht die Beziehung der Salze zum Calcium im Fibrin der maßgebende Faktor für die Fibrinolyse zu sein, denn die Sulfate und das NaFl verhalten sich anders als das Na-Oxalat und Na-Citrat. Interessant ist das Verhalten des destillierten Wassers.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Rulot zeigt sich auch in diesem Versuche, daß das 8 proz. NaCl auf Plasmafibrin nicht jene Wirkung hat wie auf natives Fibrin.

Nachdem auf diese Weise ein Urteil über den Grad der Fibrinolyse und die Resistenz des Fibrins und damit ein verlässliches Reagens auf Fibrinolyse geschaffen war, konnte nun die Frage erörtert werden: Gibt es eine bestimmte (spezifische) fibrinolytisch wirkende Substanz und wo ist sie zu finden? Es wurde wohl von manchen Autoren, wie oben erwähnt, die Fibrinolyse als fermentativer Prozeß aufgefaßt. Aber dieser Ansicht steht die oben begründete Dastres gegenüber, daß die Fibrinolyse kein fermentativer Prozeß sei*). Außerdem wurde das vermutete fibrinolytisch wirkende Ferment von keinem Autor nachgewiesen; denn, angenommen, daß das Fibrin bei der croupösen Pneumonie (wie Fr. Müller und Simons behaupten) durch ein leukocytäres tryptisches Ferment verdaut wird, so ist das doch noch lange kein Grund anzunehmen, daß dies auch beim normalen Fibrin der Fall ist. Im Gegenteil scheint es nach Erben, daß im normalen Blute die Leukocytewirkung für die Autolyse ganz insuffizient ist. Dazu kommt noch der von vielen Autoren beobachtete und durch die eigene Wahrnehmung bestätigte Umstand, daß die Fibrinolyse keineswegs an das Vorhandensein von Leukocytan gebunden ist, daß vielmehr auch das leukocytanfreie Fibrin nach einiger Zeit der Autolyse verfällt.

Es galt daher zunächst nachzuschauen, ob 1. in den Fällen, wo die Fibrinolyse eintritt, auch tatsächlich fibrinolytische Fermente nachweisbar sind und ob 2. dort wo die Fibrinbildung ausbleibt, dies nicht etwa einer fibrinolytisch wirkenden Substanz zuzuschreiben ist.

*) Siehe auch Hekma¹⁸⁾, Herzfeld und Klinger²⁰⁾.

Von den verschiedenen Versuchen sei hier als Beispiel für den ersten Typus das Autolysat von nativem Pferdefibrin und als Beispiel für den zweiten Typus der Preßsaft, gewonnen von mit physiologischer Kochsalzlösung verriebener lobulär pneumonischer Lunge, wo bekanntlich das Exsudat meist nicht zu Fibrin gerinnt, angeführt. Es wurde die Wirkung dieser Flüssigkeiten auf ein frisches leukocytenfreies Fibrin (Plasmafibrin = Pl.F.) verfolgt, um zu sehen, ob das Autolysat resp. das lobulär pneumonische Pressat die Fibrinolyse beschleunigt.

Versuchstechnik.

1. Fibrinolytische Lösung. Natives Pferdefibrin wird einen Tag lang unter der Wasserleitung gewaschen, dann mit so viel 8proz. NaCl versetzt, daß die Flüssigkeit das Fibrin ganz überdeckt, Toluol darübergeschichtet und mit einem Glasstab gut verrührt.

Schon nach einigen Stunden beginnt die Fibrinolyse, kenntlich an der Trübung der Flüssigkeit, und bereits nach 24^h ist bei Laboratoriumstemperatur die Fibrinolyse fast vollständig. Das Ganze wird noch 24^h bei Laboratoriumstemperatur gelassen, dann auf 2 Tage in den Eiskasten gestellt. Jetzt ist die Lösung zur Verwendung bereit.

Die fibrinolytische Wirkung steigt in den ersten Tagen an, nach ca. 3 Wochen beginnt sie zu sinken, um nach ca. 8 Wochen vollständig zu verschwinden.

2. Lobulärpneumonisches Pressat. Von einer lobulär pneumonisch veränderten menschlichen Lunge werden die infiltrierten Herde mit einer Schere herausgeschnitten, zerkleinert und mit Quarzsand verrieben. Das Ganze wird dann zur Hälfte mit 0,6proz. Kochsalzlösung verdünnt, mit Toluol versetzt und 24^h bei Laboratoriumstemperatur gelassen. Hierauf wird das Ganze durch eine Kompresse durchgepreßt, so daß in der Kompresse nur der Quarzsand und das Lungengewebe zurückbleiben. Das Pressat wird dann in den Eiskasten gegeben.

Für die fibrinolytischen Versuche wurde sowohl von 1. als von 2. je 0,3–0,5 verwendet.

Versuch 3: In folgendem Versuch wurde auch einmal das Exsudat von croupöser Pneumonie im Stadium der roten und grauen Hepatisation, in derselben Art zubereitet wie 2., verwendet.

Es wurden 4 Eprouvetten mit je 5 ccm 1proz. NaFl, eine Eprouvette mit 5 ccm 8proz. NaCl gefüllt, dann wurden zu Eprouvette a) 0,5 ccm vom Pressat der croupösen Pneumonie, zu Eprouvette b) 0,5 ccm lobulärpneumonischen Pressates, zu Eprouvette c) 0,5 ccm vom Fibrinautolysat zugefügt. Eprouvette d) enthält zur Kontrolle nur 2proz. NaFl. Zum Schluß kam in alle 5 Eprouvetten je ein gleich großes Stück Plasmafibrins. Die Eprouvetten wurden gut aufgeschüttelt, in den Brutofen gestellt und alle 12^h kontrolliert.

Tabelle III.

Fibrinol. Substanz	Lösungs- mittel	Fibrin	Tempe- ratur	18 ^h	42 ^h	66 ^h	90 ^h	114 ^h
a) Croup. pneum. Pressat 0,5 ccm	1 proz. NaFl	Plasma- fibrin	37°	—	—	—	—	+
b) Lobul. pneum. Pressat 0,5 ccm	1 „ NaFl	„	37°	—	+	+	+	+
c) FibrinAutolys. 0,5 ccm	1 „ NaFl	„	37°	+	+	+	+	+
d) Kontrolle .	1 „ NaFl	„	37°	—	—	—	+	+
	8 „ NaCl	„	37°	—	—	—	—	+

Aus diesem Versuch ergibt sich, daß das Autolysat des nativen Pferdefibrins fibrinolytisch wirkt, genau so wie das lobulär-pneumonische Pressat, das wohl diesmal etwas schwächer wirkte als das erstere. Die Wirkung des croupös pneumonischen Pressates blieb aus. Die Ursache dieser Erscheinung wird noch näher verfolgt werden; vielleicht sind die Verhältnisse bei weiter vorgeschrittenem croupös pneumonischen Prozeß anders.

In anderen Versuchsreihen, die diese Ergebnisse bestätigten, konnte manchmal eine raschere Wirkung des lobulär pneumonischen Pressates beobachtet werden.

Damit war nun zunächst nachgewiesen, daß wirklich sowohl bei der Fibrinolyse als bei der Lobulärpneumonie irgend ein fibrinolytisch wirksames Agens beteiligt ist. Weitere Untersuchungen zeigten, daß der fibrinolytische Körper durch Alkohol fällbar ist. An der Reindarstellung des fibrinolytischen Körpers wird noch gearbeitet.

Bevor aber der Bericht über die weiteren Versuche fortgesetzt wird, muß noch auf eine Frage eingegangen werden, die für die Wertung dieser Versuche von prinzipieller Bedeutung ist. Der Umstand nämlich, daß die Fibrinolyse mit einem Autolysat vorgenommen wurde, das immerhin einige Leukocyten enthält, könnte leicht zum Einwand benützt werden, daß es sich hier um eine tryptische Leukocytenwirkung im Sinne von E. Müller und Jochmann handeln könnte. Denn bekanntlich haben Müller und Jochmann¹⁶⁾ mit Blut von Kranken mit myeloider Leukämie bei 50—60° binnen einiger Stunden Proteolyse an der Löfflerplatte beobachtet. Jochmann¹⁸⁾ hat mit Eiter oder mit einem daraus gewonnenen Extrakt Lungenstückchen und querstreifte Muskelfasern nach einigen Tagen Bebrütung bei 55° zur Verdauung gebracht. Aber schon von vornherein würde neben

den schon früher angeführten Gründen gegen die Identifizierung beider Wirkungen der Umstand sprechen, daß die Wirkung des Leukocytenfermentes bei einer Temperatur beobachtet wurde, bei der der fibrinolytische Körper, wie sich im Laufe der Versuche herausgestellt hat, unwirksam wird.

Um jedoch für alle Fälle gesichert zu sein, habe ich mir ein Autolysat von Eiter, der durch Punktion aus einer abscedierenden Mastitis gewonnen wurde, in derselben Weise hergestellt wie das Fibrinautolysat (10 proz. Kochsalzlösung + Toluol). Davon machte ich mir Verdünnungen von 1 : 10 bis 1 : 320 in 1 proz. NaFl. Genau dieselben Verdünnungen bereitete ich mir vom Fibrinautolysat und verglich nun die fibrinolytische Wirkung beider Substanzen. Denn es war zu erwarten, daß, wenn die Fibrinolyse eine tryptische Verdauung durch die im nativen Fibrin eingeschlossenen Leukocyten ist, der reine Eiter doch bedeutend wirksamer sein wird als das nur wenige Leukocyten enthaltende Fibrin.

Tabelle IV.

	Verdünnung	1 proz. Nafl.	Temperatur*)	Fibrin	24 ^h	48 ^h	72 ^h	96 ^h
Eiter-Autolysat in 10 proz. NaCl	1 : 10	5 ccm	Laborat.-Temperatur	frisches Plasmafibrin	—	+	+	+
	1 : 20	5 ccm		„ „	—	—	+	+
	1 : 40	5 ccm		„ „	—	—	±	+
	1 : 80	5 ccm		„ „	—	—	—	—
	1 : 160	5 ccm		„ „	—	—	—	—
	1 : 320	5 ccm		„ „	—	—	—	—
Fibrin-Autolysat in 8 proz. NaCl	1 : 10	5 ccm		„ „	—	—	+	+
	1 : 20	5 ccm		„ „	—	—	+	+
	1 : 40	5 ccm		„ „	—	—	+	+
	1 : 80	5 ccm		„ „	—	—	±	+
	1 : 160	5 ccm		„ „	—	—	—	—
Kontrolle	—	5 ccm		„ „	„ „	—	—	—

*) Am zweiten Tage kam das Ganze auf 24^h in den Brutofen.

Aus dieser Tabelle ist zu ersehen, daß die fibrinolytische Wirkung des Fibrinautolysats in gar keinem Verhältnisse zu den im Fibrin enthaltenen Leukocyten steht, ja daß sogar das Fibrinautolysat in einer geringeren Konzentration als der reine Eiter wirksam ist.

Ferner konnte ich im Laufe der Versuche die Wahrnehmung machen, daß bei Gegenwart von Na₂CO₃ in den fibrinolytischen

Lösungen die Fibrinolyse ausblieb. Das sprach natürlich gegen die tryptische Natur des Fibrinautolysats. Um nun den prinzipiellen Unterschied zwischen der tryptischen Proteolyse des Eiters und der fibrinolytischen Wirkung des Fibrinautolysats klar zu demonstrieren, wurde folgender Versuch gemacht:

Versuch 5: 4 Epruvetten werden mit je 5 ccm 1 proz. NaFl gefüllt; in Epruvette a) kommt 0,5 ccm Natriumcarbonatlösung, ebenso in Epruvette b), dann wird zur Epruvette a) 0,1 ccm autolysierten Eiters (1:50), zur Epruvette b) 0,5 ccm fibrinolytischer Lösung zugefügt. Zur Kontrolle wird Epruvette c) mit 0,5 ccm fibrinolytischer Lösung beschiekt. Epruvette d) enthält nur 1 proz. NaFl.

Tabelle V.

Fibrinolyt. Substanz	Verdünnung	Lösungsmittel	Temperatur*)	Fibrin	24h	48h	72h	
a) Eiter-Autolysat .	1:50	5 ccm 1% NaFl + 0,5 4% Na ₂ CO ₃	Labor.-Temp.	fr. Plasmafib.	—	+	+	
b) Fibrin-Autolysat	1:10	5 cm ³ 1% NaFl + 0,5 4% Na ₂ CO ₃		„	„	—	—	—
c) Fibrin-Autolysat	1:10	5 ccm 1% NaFl		„	„	—	+	+
d) Kontrolle	—	5 cm ³ 1% NaFl		„	„	—	—	—

*) Nach 24^h kam das Ganze auf einen Tag in den Brutofen.

Aus diesem Versuche ist der Unterschied zwischen der tryptischen Wirkung des Eiters und der rein fibrinolytischen Wirkung des Fibrinolysins, wie wir die hypothetische Substanz vorläufig nennen wollen, ganz eindeutig zu ersehen. Denn während das Fibrinolsin bei Gegenwart von 0,4 proz. Na₂CO₃ unwirksam ist, ist die Wirksamkeit des Eiters bei Gegenwart von Na₂CO₃, wie es bei einem tryptischen Ferment selbstverständlich ist, gesteigert.

Als weiteren Beleg für die verschiedene Natur beider Körper kann das verschiedene Verhalten bei Erhitzung auf 60° angeführt werden.

Versuch 6: Eiter und fibrinolytische Lösung werden gleichzeitig eine halbe Stunde und dann eine ganze Stunde auf 60° im Wasserbad erhitzt, dann in entsprechenden in den früheren Versuchen bereits ermittelten wirksamen Mengen einer 1 proz. NaFl-Lösung zugefügt. Als Kontrolle werden 1. eine nicht inaktivierte fibrinolytische Lösung in derselben Konzentration, 2. eine 1 proz. NaFl-Lösung allein verwendet.

Während der Eiter auf 60° erhitzt seine volle Wirksamkeit behält, verliert das Fibrinolsin, eine halbe Stunde auf 60° erhitzt, seine fibrinolytische Wirkung oder mit anderen Worten das tryptische Ferment des Eiters ist bei 60° thermostabil, das Fibrinolsin thermolabil.

Tabelle VI.

Fibrinolyt. Substanz	Verdünnung	Lösungsmittel	Temperatur	Inaktivierungszeit	Fibrin	24 ^h	48 ^h	72 ^h	96 ^h
a) Eiter-Autolys.	1:20	1proz. NaFl	Temp.	1/2 ^h auf 60°	Plasmafibr.	—	+	+	+
b) Eiter-Autolys.	1:10	"	Labor. Temp.	1 ^h auf 60°	"	—?	+	+	+
c) Fibrin-Autolys.	1:10	"		1/2 ^h auf 60°	"	—	—	—	—
d) Fibrin-Autolys.	1:10	"		1 ^h auf 60°	"	—	—	—	—
e) Fibrin-Autolys.	1:10	"		—	"	—	+	+	+
f) Kontrolle . . .	—	"		—	"	"	—	—	—

Im Laufe der weiteren Versuche wurden verschiedene Körper auf ihre etwaige fibrinolytische Wirkung untersucht, so unter anderem auch Menstrualblut, Galle, gewöhnliches und tuberkulöses pleuritisches Exsudat. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen in der nächsten Mitteilung Erwähnung finden, vorläufig seien nur die Versuche mit tuberkulösem pleuritischen Exsudat kurz mitgeteilt.

Läßt man tuberkulöses pleuritisches Exsudat auf frisches Plasmafibrin einwirken, so bleibt die Fibrinolyse aus und das Fibrin ist noch zu einer Zeit ungelöst, in der das zur Kontrolle in 1proz. NaFl aufgestellte Fibrin längst autolysiert ist. Ja, auch wenn man älteres leicht autolysables Fibrin verwendet, von dem ein Stückchen in 1proz. NaFl und ein anderes in tuberkulöses pleuritisches Exsudat + 1proz. NaFl gegeben wird, bleibt in der Eprouvette mit pleuritischen Exsudat die Fibrinolyse aus, während sie in der Eprouvette mit 1proz. NaFl allein schon nach 18^h eintritt.

Es war nun durchaus der Schluß berechtigt, daß das tuberkulöse Exsudat die Fibrinolyse hemmt. Um das nachzuweisen, wurde folgender Versuch gemacht.

Versuch 7: Es wurden 4 Eprouvetten mit je 5 ccm 1proz. NaFl gefüllt; in die erste Eprouvette kam 0,5 ccm fibrinolytischer Lösung, in die zweite Eprouvette 0,5 ccm fibrinolytischer Lösung + 1 ccm tuberkulöses Pleuraexsudat, in die dritte Eprouvette 1 ccm Pleuraexsudat allein und in die vierte Eprouvette, in der sich nur 1proz. NaFl befand, diente zur Kontrolle.

Tabelle VII.

Substanzen	Lösungsmittel	Temperatur	Fibrin	24 ^h	48 ^h	71 ^h	96 ^h
Fibrin-Autolysat 0,5	1proz. NaFl	37°	Plasmafibrin	+	+	+	+
Tbc. pl. Exsudat 1,0 + Fibrom-Autolysat 0,5	"	37°	"	—	—	—	—
Tbc. pl. Exsudat 1,0	"	37°	"	—	—	—	—
Kontrolle	"	37°	"	—	—	—	+

Dieser Versuch zeigt, daß das tuberkulöse pleuritische Exsudat die Fibrinolyse tatsächlich hemmt. Dieser Versuch ent-

kräftet auch den etwaigen Einwurf, daß in den früheren Versuchen die Fibrinolyse eine Bakterienwirkung sein könnte, denn in diesem Fall müßte ja auch in der Eprouvette 2, in der sich tuberkulöses Exsudat neben demselben Fibrinautolysat wie in Eprouvette 1 befand, die Fibrinolyse eingetreten sein. Allerdings ist von vornherein eine Bakterienwirkung unwahrscheinlich, da das als Lösungsmittel verwendete 1 proz. NaFl ein genugstarkes Antiseptikum ist.

Es sei noch erwähnt, daß alle diese Versuche mehrere Male mit demselben Resultat wiederholt wurden.

Der Umstand, daß im tuberkulös pleuritischen Exsudat ein antifibrinolytischer Körper vorhanden ist, erklärt uns auch, warum gerade bei der tuberkulösen Pleuritis so starke Schwarten gebildet werden, denn die Behinderung der Fibrinolyse muß die Organisation des ganzen fibrinösen Exsudates zur Folge haben. Es legt diese Überlegung den Gedanken nahe, durch Zufuhr von Fibrinolysin entweder in den Pleuraraum oder parenteral der Schwartenbildung zu steuern.

Über Versuche mit Trypsin resp. mit Leukocytenextrakt kalte Abscesse zur Heilung zu bringen berichtet Jochmann¹⁷⁾ im Handbuch von Kolle und Wassermann. Jochmann geht von der Überlegung aus, daß in den kalten Abscessen die Resorption behindert ist, weil dort die tryptische Wirkung der Leukocyten nicht da ist; denn wir haben es dort mit einem fast reinen lymphocytären Eiter zu tun. Die günstige Wirkung der Jodoform-Glycerinbehandlung wäre auf die leukocytenanlockende Wirkung dieses Mittels zurückzuführen. Jochmann empfiehlt daher das Trypsin überall dort, wo bis jetzt die Jodoformbehandlung dominierte. Baetzner²²⁾ behandelte mit Trypsin erfolgreich Gelenk- und Knochentuberkulose. Nach unseren Erfahrungen würde es sich hauptsächlich darum handeln, in Fällen wo der Ausgang in Organisation des fibrinösen Exsudates unerwünscht ist, wie z. B. bei der fibrinösen Perikarditis, Pleuritis, croupösen Pneumonie usw. dem Körper Fibrinolysin einzuverleiben und ihm so bei der Lösung des Fibrins behilflich zu sein.

Die entgegengesetzten Gesichtspunkte würden bei der Behandlung mit dem der Fibrinolyse hemmenden Körper maßgebend sein.

Müller und Peiser²¹⁾ haben heiße Eiterungen mit Hydrocelen- resp. Ascitesflüssigkeit behandelt, die einen großen Anti-

fermentgehalt besitzen und die Einschmelzung behindern sollen. Aus den eingangs erwähnten Gründen wäre in den Fällen von ulceröser Phthise der Versuch begründet, durch einen die Fibrinolyse hemmenden Körper den Zerfall zu verhindern, mit anderen Worten, in diesen Fällen dem Körper Antifibrinolytin einzuverleiben. Dafür würde auch der Umstand sprechen, daß die Fälle von Polyserositis resp. von Exsudaten der einzelnen Serosateilen meist mit der fibrösen Form der Tuberkulose kombiniert sind. Die therapeutischen Versuche mit den genannten Substanzen werden, sobald deren Reindarstellung durchgeführt sein wird, unternommen werden und sollen dann unter anderem der Gegenstand der nächsten Mitteilung sein.

Dem Herrn Vorstand des Laboratoriums, Herrn Prof. E. Freund, spreche ich hiermit meinen Dank für die überaus liebenswürdige Unterstützung aus, die er mir bei der Ausführung der Versuche zuteil werden ließ.

Zusammenfassung.

I. Esgelang, aus dem Fibrin autolysate eine durch Alkohol fällbare fibrinolytisch wirkende Substanz nachzuweisen (Fibrinolytin).

II. Dasselbe gelang mit einem Pressat aus lobulärpneumonischen Lungenherden.

III. Die fibrinolytische Substanz unterscheidet sich von dem von Erben, Müller und Jochmann aus Leukocyten dargestellten tryptischen Ferment a) durch ihre Thermolabilität bei $\frac{1}{2}$ bis 1stündiger Erwärmung auf 60° . b) Daß sie bei Gegenwart von 0,4proz. Sodalösung unwirksam ist. c) Daß ihre Wirksamkeit nicht im Verhältnis zur geringen im Fibrin enthaltenen Leukocytenzahl steht.

IV. In dem Exsudat von tuberkulöser Serositis ist eine die Fibrinolyse stark hemmende Substanz nachweisbar*).

V. Bei nativem Fibrin sind in Übereinstimmung mit den Befunden anderer Autoren konzentrierte Salzlösungen wirksamer als nichtkonzentrierte.

VI. Im Gegensatz zu den Befunden anderer Autoren konnte sowohl bei nativem als bei Plasmafibrin die Fibrinolyse in einer viel kürzeren Zeit beobachtet werden.

*) Es wurde neben pleuritischen Exsudat auch tuberkulöse Ascitesflüssigkeit verwendet.

VII. Es ist ein Unterschied im Verhalten der verschiedenen Salzlösungen bei der Autolyse des Fibrins, wobei aber die fibrinolytische Wirkung der verschiedenen Salze nicht parallel ist den unlöslichen Calciumverbindungen, die die Anionen dieser Salze mit dem Calciumion eingehen.

VIII. Das Vorhandensein einer spezifischen fibrinolytischen Substanz sowie eines die Fibrinolyse hemmenden Körpers läßt mit Rücksicht auf die wichtige Rolle, die gerade das Fibrin bei verschiedenen Entzündungen spielt, die Hoffnung begründet erscheinen, mit Hilfe der genannten Körper die pathologischen Prozesse in der einen oder anderen Richtung beeinflussen zu können.

Literatur.

- 1) Jacoby, Über die Beziehungen der Leber und Blutveränderung bei Phosphorvergiftung zur Autolyse. *Zeitschr. f. phys. Chemie* **30**. 1906. —
 2) Salkowski, E., *Zeitschr. f. Biologie*. XXV. *Zeitschr. f. phys. Chemie*. XXVII. — 3) Hammarsten, *Lehrb. d. physiol. Chemie*. VII. Auflage, S. 243. — 4) Malys Jahresberichte f. Tierchemie 1904, S. 254. —
 5) Dastre, A., *Zentralbl. f. Physiol.* VIII. 819, ref. in *Malys Jahresberichten f. Tierchemie* 1894. — 6) Dastre, A., *Arch. de physiol.* **26**, 441—471. —
 7) Dastre, A., *Compt. rend.* **121**, 589. — 8) Nolf, P., *Stud. d. biol. Eigenschaften verschiedener aus demselben Eiweißstoffe entstammender Präpeptone*. Ref. in *Malys Jahresberichten f. Tierchemie* 1902, S. 52. —
 9) Nolf, P., ref. in *Malys Jahresberichten f. Tierchemie* 1905, S. 193. —
 10) Hasse, zit. nach Nothnagels spez. Pathologie **14**, 28, I. Teil. — 11) Eiben, Fr., Über d. Ursachen d. Peptonbildung im Leukämieblut. *Wien. klin. Wochenschr.* 1903, S. 1215—18; 1902, S. 276. — 12) Zit. nach Ueber, *Klin. path. Bedeutung d. Autolyse*. *Berl. klin. Wochenschr.* 1903, Nr. 9. —
 13) Hekma, diese *Zeitschr.* **62** u. **63**. — 14) Herzfeld, E., und R. Klinger, *Studium der Eiweißkörper*. diese *Zeitschr.* **83**, 228—236. —
 15) Perutz, A., und M. Rosenmann, diese *Zeitschr.* **30**. — 16) Müller, E., und G. Jochmann, *Verhandl. d. Kongresses f. inn. Med.* **29**, 1556—77. —
 17) Jochmann, G., *Leukocytenfermente und Antifermente*. *Handb. d. path. Mikroorganismen von Kolle und Wassermann*, S. 1300—26. —
 18) Jochmann, G., *Zur Bedeutung des proteolyt. Leukocytenfermentes f. d. path. Physiologie*. *Virchows Archiv* **194**. — 19) l. c. — 20) l. c. —
 21) Müller und Peiser, *Beitr. z. klin. Chir.* **60**, H. 1/2. — 22) Baetzner, *Arch. f. klin. Chir.* 1911. — 23) Zit. nach *Jahresberichten f. Tierchemie* **23**.
-

Die Verteilung der China-Alkaloide im Blute.¹⁾

Von
Alfred Schnabel.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Basel.)

(Eingegangen am 18. September 1920.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Die Frage der Verteilung und des Schicksals der Chinaalkaloide im Blute ist von mehreren Forschern studiert worden. Die erzielten Ergebnisse waren nicht eindeutig, was hauptsächlich auf die Unzulänglichkeit der angewandten Untersuchungsmethoden zurückzuführen ist. Angesichts der Kleinheit der Alkaloidmengen, die bei derartigen Untersuchungen unter den für den menschlichen und tierischen Organismus in Betracht kommenden Verhältnissen zu bestimmen sind, kann es nicht wundernehmen, daß die gewichtsanalytischen Methoden nicht vollkommen zufriedenstellende Resultate ergeben haben.

Giemsa und Schumann, die sich mit dieser Frage zuerst beschäftigten, fanden bei peroraler Zufuhr des Chinins beim Hunde, daß das Alkaloid wohl im Serum, nicht aber in den roten Blutkörperchen zu finden sei, und zwar betrug die Konzentration nach ihrer Berechnung 1 : 2 000 000. Nocht, der den Chiningehalt indirekt durch die hämolytische Wirkung dieses Alkaloids menschlichen Erythrocyten gegenüber bestimmte, konnte auf diese Weise feststellen, daß der größere Teil des Chinins durch die Erythrocyten gebunden wird. Die Ergebnisse neuerer Untersuchungen bestätigen diesen letzteren Befund.

Besonders waren es die sogenannten biologischen Bestimmungsverfahren, die ohne Zweifel ergeben haben, daß die Chinaalkaloide von den Erythrocyten gebunden werden. Morgenroth bediente sich zu diesem Zwecke zuerst der Fähigkeit des Chinins, die Kaninchencornea anästhetisch machen zu können. Aus dem Umstande, daß eine Chininlösung in defibriertem Blute nicht die rechnungsgemäß erwartete anästhesierende Wirkung

¹⁾ Vortrag gehalten auf dem Kongreß der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft in Neuchâtel, am 29. VIII. 1920.

zeigte, dürfte von diesem Autor der Schluß gezogen werden, daß das Alkaloid von den Erythrocyten gespeichert wird. Eine Bestätigung dieses Befundes konnte Morgenroth auch durch Heranziehung der wachstumshemmenden Wirkung des Optochins Pneumokokken gegenüber erbringen. Auch Halberkann hat neuerdings auf gewichtsanalytischem Wege feststellen können, daß das Chinin, im Reagensglas zu defibriniertem Blut hinzugefügt, bis zu 50% von den Erythrocyten gebunden wird. Schilling und Boecker erhielten ähnliche Resultate mittels eines Verfahrens, bei dem die Grenzverdünnung des Chinins festgestellt wird, die mit Kaliumjodmercurat noch eine Opalescenz zeigt.

Diesen Ergebnissen neuerer Untersuchungen stehen nur vereinzelte gegenüber, die gegen die Speicherung der Chinaalkaloide in den Erythrocyten sprechen. So berichten Hartmann und Zila — allerdings nur auf Grund einer einzigen Bestimmung —, daß ihr Befund nicht für eine Fixierung des Chinins in den roten Blutkörperchen spreche. Diese Autoren bedienten sich eines eigens zu diesem Zwecke ausgearbeiteten Bestimmungsverfahrens, bei dem das Chinin durch Fluorescenz ermittelt wird.

Während man bei Reagensglasversuchen die Alkaloidkonzentration beliebig wählen kann, so daß sie der Leistungsfähigkeit der angewandten Methode entspricht, entfällt dieser Vorteil zum großen Teil bei Versuchen im lebenden Organismus. Hier sind die zu bestimmenden Mengen nach übereinstimmenden Erfahrungen verschiedener Autoren so klein, daß nur sehr empfindliche Bestimmungsmethoden Aussicht auf Erfolg bieten können. Die Ergebnisse der Bestimmungen sowohl im Vollblut als auch im Serum der untersuchten Menschen und Tiere zeigen, daß schon kurz nach der intravenösen Applikation dieser Substanzen nur ganz minimale Mengen nachweisbar sind. So fanden Hartmann und Zila, daß schon 5 Minuten nach der intravenösen Injektion von Chinin 60—90% der injizierten Menge aus dem Blute verschwunden sind. Boecker brachte Meerschweinchen und Kaninchen Optochin intravenös bei und fand bei Kaninchen 10 Minuten nach der Applikation nicht einmal eine Optochinkonzentration 1 : 300 000, obzwar soviel von diesem Alkaloid eingespritzt wurde, daß eine Verdünnung 1 : 6300 bis 1 : 8000 resultieren sollte; beim Meerschweinchen fand er nach 30 Minuten eine Konzentration über 1 : 300 000. Auch Moore erhielt nach Injektion von 0,02—0,075 g Optochin pro kg Körpergewicht beim Kaninchen nach 5 Minuten nur noch Konzentrationen bis 1 : 500 000.

Es ist aus diesen Resultaten zu ersehen, daß systematische Untersuchungen dieser Art nur mit einem Verfahren ausgeführt werden können, dessen Leistungsfähigkeit über die erwähnten Verdünnungen hinausgeht. Eine solche Methode stand mir zur Verfügung.

In einer früher erschienenen Arbeit¹⁾ wurde von mir ein Verfahren beschrieben, welches gestattet, relativ sehr dünne Lösungen

¹⁾ Diese Zeitschr. 108, H. 4/6.

von Optochin qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Das Verfahren beruht auf zwei biologischen Erscheinungen, und zwar auf der Fähigkeit der Pneumokokken, Methylenblau zu einer farblosen Verbindung zu reduzieren, und auf der Eigenschaft des Optochins, auch in sehr schwachen Lösungen dieses Reduktionsvermögen aufzuheben oder zu verzögern. Auf diese Weise war es möglich, millionenfache Optochinverdünnungen quantitativ und hundertmillionenfache und unter Umständen auch milliardenfache qualitativ zu bestimmen. Mit diesem Verfahren wurden nun eine Reihe von Tierexperimenten an Meerschweinchen und Kaninchen und Reagensglasversuche mit dem Blute von Menschen und Tieren ausgeführt. Die Tierexperimente ergaben überraschende Resultate, vielleicht dank dem Umstande, daß die Bestimmung des Optochins nur im Serum erfolgte.

Aus äußeren Gründen kam nur das Blutserum und nicht das Vollblut für die Ermittlung des Optochingehaltes in Betracht. Versuche, dieses Alkaloid auch im Vollblut zu bestimmen, waren nicht erfolgreich, da der Farbton des Methylenblaus durch den Blutfarbstoff stark beeinträchtigt wurde und weil es sich nicht um eine wirkliche Lösung, sondern um eine Speicherung des Optochins in den Erythrocyten handelt.

Versuch 1: Ein unbehandeltes Meerschweinchen von 470 g Körpergewicht bekommt nach Freilegung der Vena jugularis interna 2 ccm einer 1 promill. Lösung von Optochinum hydrochloricum in physiologischer Kochsalzlösung intravenös eingespritzt. In Abständen von 7, 33, 60 und 90 Minuten werden durch Herzpunktion jedesmal ca. 2 ccm Blut gewonnen.

Ein Teil desselben wird sofort abzentrifugiert, der andere zuerst defibriniert und dann zentrifugiert. Das Serum der verschiedenen Blutproben wird auf den Gehalt an Optochin untersucht.

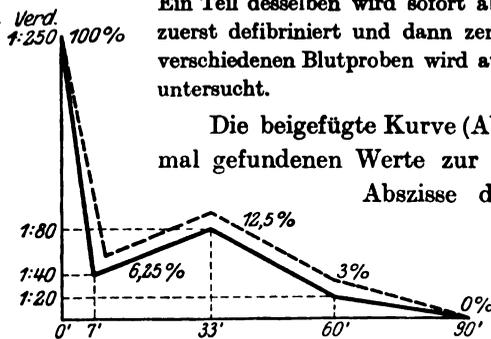


Abb. 1.

Die beigefügte Kurve (Abb. 1) bringt die jedesmal gefundenen Werte zur Anschauung. Auf der Abszisse des Systems sind die Zeiten, auf der Ordinate die Verdünnungen, in denen die Serumproben hemmen bzw. hemmen

sollen, eingetragen. Berechnet man die hypothetische Blutmenge mit $\frac{1}{15}$ des Körpergewichtes, also mit ca. 30 ccm, dann sollte die Konzen-

tration des Optochins nach der Injektion einer 1 promill. Lösung bei gleichmäßiger Verteilung im Blute 1 : 16 000 betragen. Während aber eine gleichzeitig untersuchte Kontrollösung des Optochins 1 : 16 000 noch 250 mal verdünnt die Reduktion hemmt, vermag die nach 7 Minuten erhaltene Serumprobe nur in einer 40fachen Verdünnung zu hemmen, obzwar die angenommene Optochinkonzentration im Blute ebenfalls in einer 250fachen Verdünnung noch wirken sollte. Es sind also nach 7 Minuten nur ca. 6,25% der injizierten Optochinmenge im Serum nachweisbar. Dagegen hemmt die nach 33 Minuten gewonnene Serumprobe auch in einer zweimal schwächeren Konzentration (1 : 80) als die nach 7 Minuten; es waren also zu dieser Zeit ca. 12,5% vom Alkaloid im Blutserum vorhanden. Dieser Anstieg trägt nicht etwa die Merkmale des Zufälligen; wie aus weiteren Versuchen zu sehen sein wird, tritt er regelmäßig und zwar vielfach noch deutlicher auf. Nach 60 Minuten sind nur 3% des Alkaloids im Serum nachweisbar und nach 90 Minuten nichts mehr, wenn die Bestimmung bei 37° C ausgeführt wurde. Bei Zimmertemperatur (20° C) war auch nach dieser Zeit das Optochin qualitativ zu finden. Die gestrichelte Kurve entspricht der Alkaloidbestimmung nach vorherigem Defibrinieren und weist leichterhöhte Werte auf. Letztere Erscheinung, die bereits Halberkann gesehen hat, hängt anscheinend mit der Speicherung des Optochins in den Erythrocyten und der geringen Abgabe des Alkaloids beim Schütteln zusammen, worauf noch weiter unten eingegangen werden wird.

Versuch 2: Ein ebenfalls unbehandeltes Meerschweinchen von 440 g Körpergewicht erhält auf gleiche Art 1,5 ccm einer 1,5 pro mill. Optochinlösung intravenös eingeprikt. Die hypothetische Blutmenge beträgt ca. 30 ccm, die resultierende Verdünnung 1 : 31 500. Die nach 5, 20, 55 und 80 Minuten durch Herzpunktion erhaltenen Blutproben zeigen einen Optochingehalt laut beigegebener Kurve (Abb. 2).

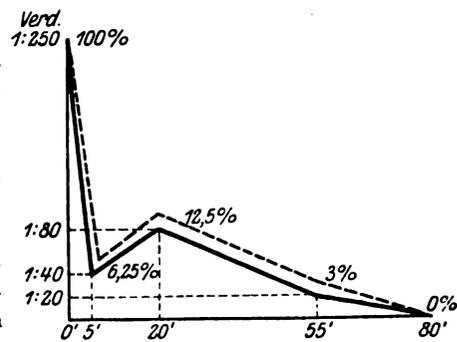


Abb. 2.

Eine Optochinlösung 1 : 31 500, also von gleicher Konzentration wie die nach der Injektion resultierende, hemmt noch,

wenn man sie 250fach verdünnt. Nach 5 Minuten enthält das Blutserum nur soviel Optochin, daß es bloß in einer 40fachen Verdünnung zu hemmen imstande ist, also ca. 6,25%, nach 20 Minuten 12,5%, nach 55 Minuten 3% und nach 80 Minuten ist nur bei Zimmertemperatur das Optochin qualitativ nachweisbar. Auch zeigt das durch vorheriges Defibrinieren erhaltene Serum einen etwas erhöhten Optochinspiegel. Die Kurve bietet eine deutliche Ähnlichkeit mit Abb. 1, was auf die wenig verschiedenen Körpergewichte und die relativ fast gleiche injizierte Optochinmenge zurückzuführen ist. Auch hier der deutliche Anstieg nach vorausgegangenem Abfall.

Der folgende Versuch zeigt noch deutlicher die allmähliche Zunahme des Optochingehaltes im Serum nach dem anfänglichen Sinken.

Versuch 3: Einem unbehandelten Meerschweinchen von 390 g Körpergewicht werden 2 ccm einer Optochinlösung 1:500 intravenös eingespritzt. Bei einer hypothetischen Blutmenge von 26 ccm beträgt die resultierende Verdünnung 1:7000. Herzpunktionen werden nach 5, 15, 30 und 45 Minuten ausgeführt, die jedesmal 1 ccm betragende Blutprobe stehengelassen, nach der Gerinnung der Blutkuchen entfernt und das klar zentrifugierte Serum untersucht. Eine der ursprünglichen Optochinkonzentration im Meerschweinchenblute entsprechende Lösung 1:7000 hemmt noch 1120 mal verdünnt. Die nach 5 Minuten entnommene Blutprobe zeigt einen Optochingehalt von 3,5%. Nach 15 Minuten steigt der Optochingehalt auf 7% und nach 30 Minuten auf 14%. Nach 45 Minuten sind kaum 2% nachweisbar. Die dazugehörige Kurve

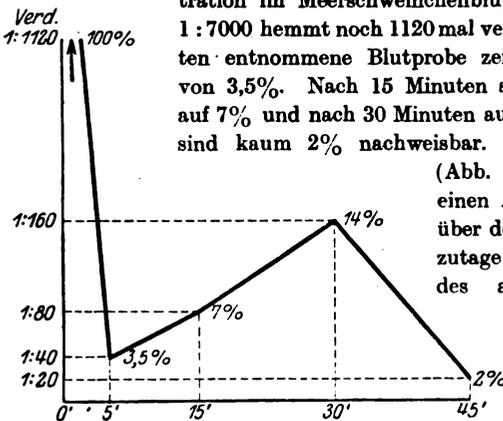


Abb. 8.

(Abb. 3) zeigt also ebenfalls einen Anstieg, der aber gegenüber den ersten zwei noch klarer zutage tritt, und zwar wegen des allmählichen Ansteigens, zuerst nach 15 Minuten auf das Doppelte und nach 30 Minuten auf das Vierfache der zuerst ermittelten Optochinmenge.

Nun seien zwei analoge Versuche bei Kaninchen angeführt.

Versuch 4: Ein unbehandeltes Tier von 1070 g Körpergewicht bekommt 6 ccm einer Optochinlösung 1:500 in eine Ohrvene eingespritzt. Da die hypothetisch berechnete Blutmenge ca. 70 ccm beträgt, so resultiert eine Alkaloidverdünnung von 1:6000. Aus der Ohrvene des unbehandelten

Ohres werden in Abständen von 5, 10, 40, 50 und 60 Minuten nach der Injektion Blutproben entnommen. Die durch Gerinnen gewonnenen Sera enthalten Optochinmengen, die in der Kurve (Abb. 4) veranschaulicht sind. Eine gleichzeitig untersuchte Optochinlösung 1 : 6000 hemmt die Entfärbung des Methylenblaus durch Pneumokokken noch in einer weiteren Verdünnung 1 : 1300, die nach 5 Minuten entnommene Blutprobe übt jedoch nur in einer 40fachen Verdünnung eine Wirkung aus, sie enthält also nur ca. 3% der ursprünglichen Optochinmenge. Schon nach 10 Minuten enthält das untersuchte Serum

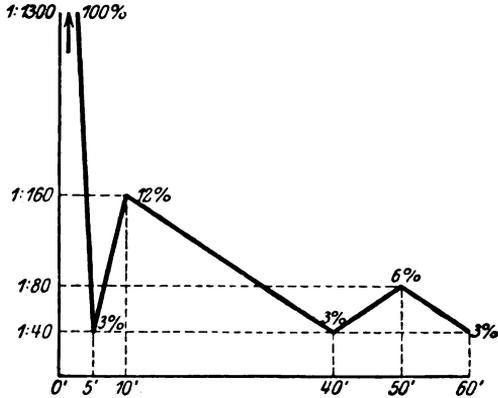


Abb. 4.

ein 4 mal größeres Optochinquantum, also ca. 12%; nach 40 Minuten sind es nur 3%, nach 50 Minuten 6% und nach 60 Minuten wieder 3%.

Der hier zutage tretende zweite Anstieg tritt zwar nicht regelmäßig auf, wurde jedoch nicht selten beobachtet.

Versuch 5: Einem Kaninchen von 1100 g Körpergewicht werden 6 ccm einer Optochinlösung 1 : 500 intravenös eingespritzt. Die nach der Injektion resultierende Verdünnung im Blute — die Blutmenge $\frac{1}{15}$ des Körpergewichtes, d. h. ca. 75 ccm gleichgesetzt — beträgt ca. 1 : 7000. Die Blutentnahme aus der Ohrvene erfolgt nach 5, 10, 40, 65, 90 und 120 Minuten. Nach der Gerinnung wird das Serum jeweils abzentrifugiert und untersucht. Die nach 5 Minuten gewonnene Blutprobe hemmt nur in einer 20fachen Verdünnung, während die angenommene Optochinkonzentration 1 : 7000 in einem Kontrollversuch noch 1500fach verdünnt, also in einer Konzentration 1 : 10 500 000, die Reduktion deutlich verzögert; es sind also im Serum nach 5 Minuten nur 1,33% des eingeführten Optochins enthalten. Nach 10 Minuten findet sich 4 mal soviel, also 5,32%, nach 40 Minuten 2,86%, nach 65 Minuten 1,33%, nach 90 Minuten ebensoviel und nach 2 Stunden ist kein Optochin mehr nachweisbar (Abb. 5).

Die mitgeteilten Versuche, die nur einen Teil der von mir ausgeführten darstellen, zeigen, daß der Optochinspiegel im Blutserum einen merkwürdigen Verlauf nimmt: kurz nach der Injektion fällt der Optochingehalt im Serum steil ab, steigt dann deutlich an und fällt dann wieder bis zum Nullpunkt. Da die von anderen Autoren (Hartmann und Zila) im Vollblut der untersuchten Tiere ermittelten Alkaloidmengen diesen sonderbaren Verlauf vermissen ließen, lag es nahe, diese auffallende Erschei-

nung im Blutserum auf das besondere Verteilungsverhältnis des Optochins zwischen Erythrocyten und Serum zurückzuführen. Tatsächlich ergaben Reagensglasversuche, die sich auf die Verteilung des Optochins zwischen Erythrocyten und Blutserum bezogen, eine Erklärung für die tierexperimentellen Ergebnisse.

Versuch 6: 6 Röhren mit je 1,4 ccm defibriertem Menschenblut werden mit je 0,1 ccm einer Optochinlösung 1 : 500 gemischt und in die Brutkammer bei 37° C gestellt. Die resultierende Optochinverdünnung beträgt mindestens 1 : 22 500. Nach 2, 5, 15, 30, 45 und 60 Minuten wird je ein Röhren zentrifugiert und das klare Serum auf seinen Optochingehalt untersucht. Eine frisch hergestellte Optochinlösung 1 : 22 500 wirkt reduktionshemmend, auch wenn sie noch 160-

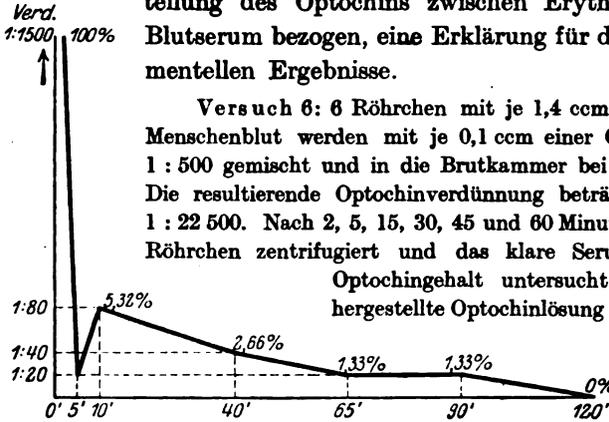


Abb. 5.

fach verdünnt wird; die 2 Minuten bei 37° C gestandene Blutprobe hemmt nur in einer 80fachen Verdünnung, sie zeigt also einen Optochingehalt in abzentrifugiertem Serum, der nur halb so groß ist wie der erwartete. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die erwartete Optochinkonzentration noch höher sein müßte, da das tatsächliche Lösungsmittelvolumen in jedem Röhren nicht 1,4 ccm

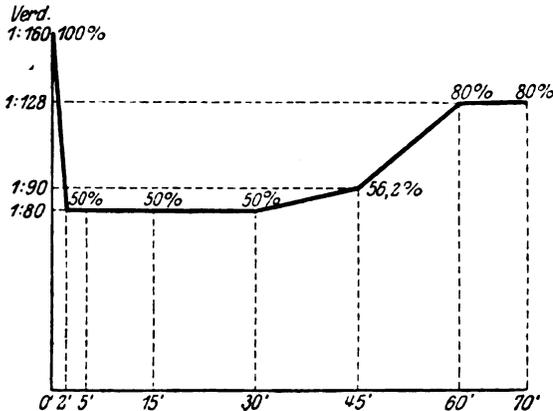


Abb. 6.

beträgt, sondern weniger, entsprechend der durch das Erythrocytenvolumen bedingten Differenz. Nach 5, 15 und 30 Minuten verbleibt der Optochinspiegel auf gleicher Höhe, beträgt also nur ca. 50% des erwarteten, wie die Untersuchung der einzelnen Blutproben nach diesen Zeiten ergibt; nach 45 Minuten und noch mehr nach 60 Minuten steigt der Optochingehalt deutlich an (Abb. 6).

Ähnliche Resultate ergaben Versuche mit dem defibrinierten Blute von Kaninchen, Meerschweinchen und Hammeln.

Die Abnahme des Alkaloidgehaltes im Blutserum in Gegenwart von Erythrocyten ist eine, wie bereits erwähnt, von verschiedenen Autoren schon beobachtete, auf physikalische oder chemische Vorgänge zurückgeführte Erscheinung und beruht auf einer Aufnahme des Alkaloids durch die roten Blutkörperchen. Nach meinen Beobachtungen handelt es sich dabei wahrscheinlich um den physikalischen Vorgang der Adsorption von Optochin durch die Erythrocyten. Dafür spricht der Umstand, daß auch chemisch ganz indifferente Substanzen, wie Tierkohle, das Optochin zu adsorbieren vermögen, nicht zuletzt aber die hier mitgeteilte Beobachtung des Ansteigens des Optochinspiegels im Reagensglas. Die letzterwähnte Erscheinung kann nur durch die Abgabe des Alkaloids durch die Erythrocyten an die Suspensionsflüssigkeit bedingt sein. Aus dem Umstande, daß sowohl die Chinaalkaloide als auch Altsalvarsan von Tierkohle adsorbiert werden, während die roten Blutkörperchen wohl Optochin oder Chinin, nicht aber Altsalvarsan zu binden vermögen, den Schluß zu ziehen, daß es sich bei der Bindung der Alkaloide um einen chemischen Vorgang handle (Schilling und Boecker), kann nicht als vollkommen stichhaltig gelten. In der Adsorptionslehre sind zahlreiche ähnliche Beispiele vorhanden.

Bekanntlich entwickelt Morgenroth auf Grundlage der Erscheinung der Aufnahme von Chinin oder Optochin durch die Erythrocyten, die er als eine durch chemische Affinitäten bedingte ansieht, seine Theorie der Wirkung dieser Alkaloide bei der Malaria. Ohne auf diese Theorie hier näher eingehen zu wollen, möchte ich nur bemerken, daß die von diesem Autor als Transgression bezeichnete, unter gewissen, nicht näher bekannten Umständen erfolgende Abgabe des Alkaloids durch die roten Blutkörperchen, nach den hier mitgeteilten Beobachtungen sich als Funktion der Adsorption und der Zeit erklären läßt.

Auf die tierexperimentellen Ergebnisse bezogen, geben die Reagensglasversuche eine teilweise Erklärung für die Erscheinung, daß der Optochinspiegel im Serum des untersuchten Tieres anfangs stark sinkt, um dann anzusteigen und wieder zu fallen, verursacht durch die Aufnahme des Alkaloids durch die roten Blut-

körperchen, die darauffolgende Abgabe an die Umgebung und schließlich durch die definitive Ausscheidung aus der Blutbahn.

Diese Speicherung der Chinaalkaloide erfolgt jedoch nicht allein in den Erythrocyten, sondern auch in den inneren Organen und Endothelien. Von den inneren Organen ist es besonders die Leber, die nach Grosser bis zu 55—77% des Chinins zu speichern oder zu zerlegen vermag. Dieser Autor trieb bei geeigneter Versuchsanordnung eine Chininmischung durch die vorher vollkommen blutfrei gemachte Leber einer Katze. Nach 2 Stunden fanden sich in der Spülflüssigkeit ca. 13% des Chinins, in der Leber gegen 23%, so daß 64% des verwendeten Alkaloids nicht wieder aufgefunden werden konnten.

Die speichernde Wirkung der Endothelien kommt in Versuchen von Plehn und Rona (zitiert bei Ziemann) zum Ausdruck. Diese Autoren ließen bei Versuchstieren nach Unterbindung und vollkommener Entblutung der Arteria und Vena femoralis eine Chinin-Blut-Ringermischung einströmen. Es zeigte sich, daß auch das periphere Gefäßsystem und zwar wahrscheinlich die Endothelauskleidung des Capillargebietes an der fast sofortigen Bindung des direkt in die Blutbahn eingeführten Chinins mitbeteiligt ist. Es ist naheliegend anzunehmen, daß es auch hier zu einer sekundären Abgabe des Alkaloids an die Umgebung kommt.

Daß die Speicherung das wichtigste bei dem merkwürdigen Verlauf der Optochinkurve ist, bewiesen Versuche mit Substanzen, die sich in physikalischer Beziehung anders verhalten als die Chinaalkaloide. Es sei hier auf die in der Literatur mitgeteilten Ergebnisse über das Verhalten der Immunkörper verwiesen. Ein von mir ausgeführter diesbezüglicher Reagensglasversuch veranschaulicht dies: Je 4,9 ccm defibriertes Kaninchenblut bzw. 0,85% NaCl werden mit je 0,1 ccm Hammelblutamboceptor gemischt. Das nach 5 Minuten abzentrifugierte Serum und die Verdünnung des Amboceptors in Kochsalzlösung werden auf ihre hämolytische Wirkung untersucht. Während die Verdünnung des Amboceptors in der Kochsalzlösung einen hämolytischen Titer 1 : 2000 anzeigt, löst das amboceptorhaltige Serum auch in einer Verdünnung 1 : 4000 Hammelerythrocyten auf. Es ist also nicht wie beim Optochin eine Abnahme, sondern ein Anstieg auf das Doppelte erfolgt. Diese Erscheinung läßt sich nur so erklären, daß hier die Adsorption des Amboceptors an die Kaninchenblutkörperchen ausgeblieben ist. Der Anstieg rührt daher, daß, wie bereits früher erwähnt, das tatsächliche Lösungsvolumen nicht 4,9 ccm, sondern weniger beträgt.

Zusammenfassend läßt sich folgendes sagen: Der Optochinpiegel im Blutserum eines intravenös gespritzten

Tieres zeigt nach anfänglichem steilem Abfall einen darauffolgenden deutlichen Anstieg und sinkt dann allmählich bis zum Nullpunkt. Eine Erklärung für diese Erscheinung geben Reagensglasversuche mit Optochin einerseits und mit Substanzen, die sich in physikalischer Beziehung anders verhalten, andererseits. Die Speicherung des Optochins durch die Erythrocyten und andere Zellen und die nachfolgende Abgabe des Alkaloids an die Umgebung besitzt dabei eine ausschlaggebende Bedeutung.

Die hier mitgeteilten Versuchsergebnisse betreffen zwar nur das Optochin, doch sprechen die Mitteilungen in der Literatur und eigene Beobachtungen dafür, daß die gleichen Verhältnisse auch beim Chinin vorliegen. Es wird Gegenstand weiterer Versuche sein, mit einem für das Chinin ausgearbeiteten stöchiometrischen oder biologischen Verfahren eine Nachprüfung vorzunehmen und analoge Untersuchungen beim Menschen auszuführen.

Literatur.

- Boecker, E., Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **24**, 148. 1915. — Giemsa, G., Arch. f. Schiffs- und Tropenhyg. 1908, Beiheft 5. — Giemsa, G., und H. Schaumann, ebenda 1907, Beiheft 3. — Grosser, P., Biochem. Zeitschr. **8**: 1908. — Halberkann, J., ebenda **95**. 1919 (daselbst größeres Literaturverzeichnis). — Hartmann, H., und L. Zila, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **83**. 1918. — Moore, H., Journ. of experim. med. **22**. 1915. — Morgenroth, J., Dtsch. med. Wochenschr. 1918, Nr. 35 u. 36. — Morgenroth, J., und Ginsberg, Berl. klin. Wochenschr. 1912, Nr. 46 u. 1913, Nr. 8. — Nocht, B., Verhandl. d. Dtsch. Kolonialkongresses 1905. Arch. f. Schiffs- und Tropenhyg. **12**, Beiheft 5. 1908. — Plehn, A., Arch. f. Schiffs- und Tropenhyg. **13**, Beiheft 6. 1909; ebenda **22**. 1918. — Schilling, Cl., und E. Boecker, Dtsch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 25. — Ziemann, H., Handb. der Tropenkrankheiten V. 1. Die Malaria 1917.
-

Zur Kenntnis der oligodynamischen Hämolyse.

Von

W. Hausmann und W. Kerl.

(Aus dem med.-chem. Institute der Universität und der Radiumstation
im allgemeinen Krankenhause in Wien.)

(Eingegangen am 18. September 1920.)

Die Beobachtungen über oligodynamische Giftwirkungen, die auf den grundlegenden Untersuchungen von Naegeli beruhen, haben neuerlich durch die Arbeiten von Spiro, Saxl, H. Pfeiffer, Baumgarten und Lergler, Dörr u. a. erhöhtes Interesse gewonnen. Es sei deshalb auf eine handliche Methode für oligodynamische Untersuchungen hingewiesen, die der eine von uns schon gelegentlich erwähnt hat¹⁾.

Bei Bestrahlung von Blutkörperchenagarplatten mittels metallischer Radiumträger konnte beobachtet werden, daß schon das Metall der Radiumträger an sich ohne Mitwirkung des Radiums bei direkter Berührung mit dem Blutagar Hämolyse hervorrufen kann. Daraufhin unternommene Versuche ergaben, daß beim Eintragen einiger Metalle in noch nicht erstarrte Erythrocytenagarplatten nach verschieden langer Zeit hämolytische Höfe um diese Substanzen entstanden. Unabhängig hiervon ist diese Beobachtung seither auch von R. Dörr gemacht worden²⁾.

Wir haben uns in der Regel folgender Versuchsanordnung bedient: 8,5 ccm 1 proz. Kochsalzlösung wurden in einem Kölbchen mit 3 Pipettentropfen einer Emulsion gewaschener Erythrocyten versetzt, die in ihrer Konzentration etwa der des defibrinierten Blutes entsprach. Diese Aufschwemmung wurde mit 8,5 ccm verflüssigten, entsprechend abgekühlten 2 proz. Kochsalzagars gemischt und in Petrischalen von etwa 9 cm Durchmesser gegossen. Vor dem Erstarren wurden nun die pulverisierten Metalle in kleinen Häufchen in den Agar eingetragen oder kleine Metallbleche in

¹⁾ W. Hausmann, Über Strahlenhämolyse „Strahlentherapie“ 9, 80. 1919, Anmerkung.

²⁾ Diese Zeitschrift 107, 217. 1920.

den Agar versenkt. Die Agarplatten wurden nach dem Beschicken mit dem Metall bei Zimmertemperatur stehengelassen. Steriles Arbeiten ist erforderlich. Die Beobachtung muß nötigenfalls über einige Tage ausgedehnt werden. Als Agarsuspension kam die von Hausmann bei Bestrahlungsversuchen benützte 2proz. Aufschwemmung in 1proz. Kochsalzlösung, nicht in Fleischwasser gekochter Agar zur Verwendung. Dieser Kochsalzagar ist nahezu farblos und ein schlechter Nährboden für verunreinigende Bakterien¹⁾.

Wir konnten feststellen, daß u. a. beim Eintragen von Silber, Kadmium, Kupfer, Magnesium, Nickel, Blei, Zinn und Zink nach mehr oder minder langer Zeit komplett hämolytische Höfe um die Metalle in den Blutagarplatten entstehen.

Besonders rasch traten diese Aufhellungen bei Silber, Kupfer und Magnesium auf. Von Interesse war es, daß um einen für diese Versuche verwendeten Glasstaub komplett hämolytische Höfe in den Platten entstanden. Offenbar hat es sich hier um Alkaliwirkung gehandelt. Auffallend war ferner die Hofbildung um ein für Röntgenzwecke bestimmtes Bariumsulfatpräparat, sowie in einem anderen Versuche die Bildung mehrerer konzentrischer Höfe um ein in die Blutplatte versenktes Bleistückchen. Nach einigen Tagen trat um das Bleistückchen selbst ein schmaler komplett hämolytischer Hof auf. Auf diesen folgte ein Hof nicht hämolytischer Erythrocyten, an den wieder eine ziemlich stark aufgehellte Zone grenzte.

In allen Versuchen wurden Erythrocyten vom Menschen verwendet.

Da uns das Problem der oligodynamischen Hämolyse derzeit nicht weiter beschäftigt, hielten wir es für gerechtfertigt, diesen methodischen Hinweis mitzuteilen.

¹⁾ Wien. klin. Wochenschr. 1916, Nr. 40.

Über biologische Beeinflussung der Haut durch carcinombegünstigende Agentien (wie Tabaksaft, Teer, Ruß).

Von

Ernst Freund und Gisa Kaminer.

(Aus der Station für Geschwulstkrankheiten an der Krankenanstalt Rudolfstiftung Wien.)

(Eingegangen am 18. September 1920.)

Seit langer Zeit ist das Interesse der Carcinomforschung durch den Einfluß in Anspruch genommen worden, den chronische Reizung durch Tabak, Ruß, Teer usw. auf das Entstehen von Hautgeschwüren ausübt.

Schon Pencivall Poll beschreibt 1775 in England bei Schornsteinfegern eine krebsige Affektion des Scrotums, die bis dahin als syphilitisch angesehen wurde. Später beschrieben ähnliche Affektionen W. Simons, H. Earle. — Cüsling beobachtete eine krebsige Affektion am Handrücken eines Gärtners, der Ruß mittels des Handrückens auf Pflanzen streute. Fütterer hat 47 ähnliche Affektionen aus der englischen und amerikanischen Literatur zusammengestellt. In Frankreich wurde der Rußkrebs selten beobachtet. Bayle und Cayol beschreiben in ihrer Zusammenstellung nichts von dergleichen Affektionen. Andere französische Forscher wie Stelle, Alibert, Jenine beschreiben ihn als Rußkrebsthracine. In Deutschland wurde der Rußkrebs von Mayer, Mickin, Köhler beschrieben. Später wurden als gleiche Ursachen des Krebses Teer und Paraffin angegeben, zuerst von englischen, dann später von den deutschen Forschern Volkmann, Heinrich, Tillmann und Schuchardt. Die Untersuchungen von Tillmann, Schuchardt, Liebe zeigten, daß es sich dabei um ein echtes Epithelcarcinom handle. Eine ähnliche Rolle wie Ruß und Teer beim Hodenkrebs spielt Tabak beim Lippenkrebs, und auch hier sind es offenbar Destillationsprodukte, die schädigen. Soemmering hat darauf hingewiesen, daß nicht der Rauch, sondern der Tabaksaft und die Tabakbeize die ursächlichen Momente dieser Erkrankung sein dürften. In Krain, wo kurze Kupferpfeifen zur Verwendung kommen und die Beize besonders stark auf die Lippenschleimhaut einwirkt, ist der Krebs sehr häufig, während bei Tabakrauchern und im Orient, wo Tabak in der Naturform geraucht wird, wie Melzer gezeigt hat, diese Affektion höchst selten vorkommt.

In einer ganzen Anzahl von Beobachtungen ist auch statistisch das gehäufte Vorkommen der Carcinomerkrankungen bei den entsprechenden Berufskrankheiten hervorgehoben worden. Es scheint uns unnötig, auf diese statistischen Angaben *) näher einzugehen und zwar aus folgendem Grunde:

So imponierend auch die Anzahl carcinomatöser Erkrankungen z. B. bei Paraffinarbeitern, Tabakrauchern, Röntgenbeschäftigten, Schornsteinfegern usw. ist, so darf eine kritische Beobachtung nicht achtlos daran vorübergehen, daß den positiven Fällen doch eine kolossale Majorität jener Individuen gegenübersteht die den gleichen Traumen ausgesetzt waren, ohne daß sie erkrankten (Raucher, Gravidität usw.).

Und selbst die Forscher, die dem Paraffin und Anilin z. B. eine schädigende Wirkung zuschreiben, stimmen darin überein, daß der Disposition ein großer Einfluß zugestanden werden muß, da manche Arbeiter sofort erkranken, andere wieder dauernd verschont bleiben.

Es würde allerdings wieder zu weitgehend sein, wenn man den Einfluß solcher Traumen als irrelevant hinstellen wollte. Etwas muß die Bevorzugung dieser Traumen doch zu bedeuten haben und es scheint uns die richtige Mitte in dieser Beziehung zu sein, wenn man annimmt, daß diese Traumen nach jener Richtung wirken, nach welcher der zum Carcinom disponierte Organismus eine Schwäche zeigt. Es wird sich daher die im Anfang gerichtete Frage dahin zuspitzen, einerseits die disponierende Substanz im Organismus zu charakterisieren, andererseits das Tertium comparationis jener Ähnlichkeiten festzustellen, welche solche Substanzen mit den in Frage stehenden Traumen gemeinsam haben. Existieren doch auch sonst eine Keihe von Momenten, die zur Annahme einer Disposition für Carcinomerkrankungen nötigen. Vor allem das Moment, daß ein Zurückbleiben von Carcinomresten bei Exstirpation so rasch zu Rezidiven führt, während andererseits die Übertragung von Carcinomen auf Operateure oder Wärterinnen gar nicht bekannt ist. Die Fälle, die als Beispiele von Übertragung ausgeführt werden, sind so spärlich (bei Ehepaaren in Carcinomhäusern usw.), daß sie nur als Ausnahmen angesehen werden können.

Ein weiteres Moment hierfür sind jene Fälle, wo Metastasen nicht nach jener Zeit sich entwickeln, wo Rezidiven zurückgelassener Keime zu erwarten wären, sondern jahrelang später, wo also, gleichviel ob man annimmt, daß doch Keime noch vorhanden waren oder Neuinfektion erfolgt ist, eine Mitwirkung des Organismus angenommen werden muß, sei es, daß derselbe die Entwicklung lange Zeit beeinträchtigt oder schließlich wieder gefördert hat.

Hierher gehören auch die Beobachtungen beim Impfcarcinom an Tieren, wo nicht nur die Tierspezifität von Ausschlag ist, sondern auch bei

*) Siehe bezüglich dieser Literatur: Wolff, Die Lehre von der Krebskrankheit.

verschiedenen Individuen einer Tierpezies eine verschiedene Empfänglichkeit gegenüber Carcinom zu beobachten ist.

Die vorerwähnte Fragestellung könnte für den ersten Moment als eine zwecklose Frageverschiebung erscheinen, da die Fragestellung disponierender Momente für Carcinom wohl nicht leichter zu sein scheint, als die der carcinomveranlassender. Steht doch zur Entscheidung einer solchen Frage nur das Tier-Impfexperiment zur Verfügung und hat doch eine jahrzehntelange Forschung dieser Richtung negative Erfolge zur Feststellung disponierender Momente gezeitigt. Dennoch haben alle diese Experimente eines gelehrt. Es kann dasselbe Krebsgewebe, daß bei einem Individuum zur Impfbildung führt, bei einem anderen in wenigen Tagen im Organismus verschwunden sein, sozusagen in den Säften gelöst worden sein.

Diese letzte Beobachtung, die man insbesondere bei Übertragung von Hundecarcinom auf Hunde in sehr markanter Weise studieren kann, hat uns vor Jahren schon einen Weg gewiesen, auf dem man carcinombegünstigende oder -hemmende Verhältnisse studieren kann. Wir sind dabei von dem Bestreben ausgegangen, vor allem nachzusehen, wie sich denn Serum carcinomatöser und carcinomfreier Individuen gegenüber Carcinomzellen verhält. Wenn überimpftes Carcinomgewebe im gesunden Gewebe aufgelöst wird, dann könnte sich ja dieser Vorgang vielleicht auch extra Corpus nachweisen lassen.

Wir haben uns daher durch Auspressen von Carcinomgewebe, Aufschwemmungen von Carcinomzellen bereitet und diese der Einwirkung sowohl von Normalserum wie Serum von Carcinomatösen bei 40° C unter antiseptischen Kautelen ausgesetzt¹⁾.

Die möglichst wenig zerfallenen oder verfetteten Teile vom Carcinom (Sektionsmaterial ist vorzuziehen) werden grob zerkleinert und nach und nach mit der zehnfachen Menge einer Lösung von 0,6 proz. Kochsalzlösung mit 1 proz. saurem phosphorsauren Natron durch ein grobmaschiges Tuch oder eine mehrfache Lage von Gaze unter leichtem Quetschen durchgepreßt. Die hierbei durch das Tuch tretende trübe Flüssigkeit enthält das ganze Zellmaterial. Man kann diese Zellen durch mehrstündiges Absetzen oder vorsichtiges Zentrifugieren und mehrfaches Waschen mit der gleichen Lösung gewinnen und bei ca. 0° C längere Zeit aufheben und für Zellversuche verwenden. Bei Zusatz von Fluornatriumlösungen bis zum Gehalt von 1% Fluornatrium ist darauf zu sehen, daß das Fluornatrium die saure Lösung nicht alkalisch mache.

Es hat sich dabei ein kardinaler Unterschied insofern ergeben, als Normalserum die Carcinomzellen größtenteils löst resp. zerstört, während Serum von Carcinomatösen die Carcinomzellen fast gar nicht löst.

Dieser Grundversuch hat nicht nur die Möglichkeit zu einer diagnostischen Verwertung geboten, sondern er ist ein einfacher Weg geworden, die verschiedensten Einflüsse in bezug auf Carcinom wenigstens dahin zu prüfen, ob sie die Carcinomzelle günstig oder ungünstig beeinflussen. Der wichtigste Einwand, den man gegen diesen Weg erheben könnte, nämlich der, daß das Verhalten der vielleicht überlebenden aber doch nicht lebenden Zellen keine Berechtigung zu Schlüssen über Carcinomkrankheit geben,

ist durch Versuche von Hirschfeld behoben worden. Hirschfeld⁹⁾ hat auf Grund unserer Versuche an Tieren Impfungen versucht, nachdem er einen Teil der Carcinomimpfmassen in Normalserum, den anderen in Carcinomserum belassen hatte und konnte eine bedeutende Schädigung der Imperfolge bei den in Normalserum getränkten Carcinomstückchen konstatieren. Es sind demnach die Resultate der Zellprüfung auch biologisch verwertbar.

Von diesem Standpunkt aus erschien es dann gerechtfertigt, die aufgestellte Frage auf diesem Wege zu prüfen resp. nachzusehen, ob die angefragten Schädigungen einen derartigen Einfluß auf die Carcinomzelle konstatieren lassen, daß sie als disponierendes Agens gelten können. Gerade in bezug auf die disponierenden Momente haben ja unsere früheren Untersuchungen eine Reihe aufklärender Tatsachen uns erkennen lassen. Vor allem hat es sich gezeigt, daß der Unterschied zwischen Normalserum und Serum Carcinomatöser nicht nur in dem Lösungsvermögen besteht, das das Normalserum besitzt, während es dem Carcinomserum abgeht, sondern daß das Carcinomserum nebst diesem Mangel durch den Besitz einer spezifischen Substanz ausgezeichnet ist, die die normale Lösungssubstanz zu neutralisieren, resp. in ihrer Wirkung zu vernichten imstande ist (Schutzvermögen für Carcinomzellen).

Denn während Normalserum auf die Hälfte mit NaCl-Lösung verdünnt, noch Lösungsvermögen für Carcinomzellen besitzt, erlischt dasselbe, wenn man Normalserum statt mit NaCl-Lösung mit Carcinomserum vermischt. Es hat sich auch gezeigt, daß das Carcinomserum die Fähigkeit hat, die Carcinomzellen gegenüber der Zerstörungsfähigkeit durch Normalserum zu schützen. Beläßt man Carcinomzellen im Carcinomserum, so bedürfen sie dann einer weit größeren Menge Serum als vorher, um gelöst zu werden. Andererseits kann durch ein Übermaß von Carcinomzellen gegenüber Normalserum diesem letzteren sein Zerstörungsvermögen gänzlich entzogen werden.

Es besteht also ein Kampf zwischen dem Lösungsvermögen des Normalserums und dem dieses vernichtenden resp. neutralisierenden Vermögen der Carcinomzellen, so daß der Endeffekt der Vermischung ganz von den zur Verwendung gelangenden Mengen abhängig ist. Die Verhältnisse dieser Experimente geben darin auch ein Bild der Verhältnisse, wie sie sich im Organismus abspielen müssen und die zur Erklärung jener Beobachtungen herangezogen werden können, wo Impfungen bei gleicher Tierart verschiedene Resultate geben, resp. die Entwicklung ungleich verläuft.

Es hat sich aber auch weiter nachweisen lassen, daß jedes Organ-ewebe eines Gesunden resp. nicht an Carcinom Erkrankten in seinen Zellen — abgesehen vom Serumgehalt — ein Zerstörungsvermögen für Carcinomzellen besitzt, denn NaCl-Extrakte resp. Ätherextrakte des Gewebes vermochten bei Vermischung mit Carcinomzellen dieselbe zu zerstören. Im Gegensatz hierzu zeigten die Auszüge von Organen, in denen Carcinome sich entwickelt hatten, nicht nur einen Mangel dieser Zerstörungsfähigkeit, sondern sogar das Vermögen, die Zerstörungsfähigkeit der nor-

malen Gewebe resp. des Normalserums gegenüber Carcinomzellen zu paralysieren.

Gerade der Nachweis dieses auffallenden Gegensatzes in der Beschaffenheit der Gewebe Gesunder gegenüber Carcinomatösen hat uns Veranlassung gegeben, jene Organstellen auf ihr Verhalten gegenüber Carcinomzellen zu untersuchen, die seit jeher als Prädilektionsstellen für Carcinome gelten, wie chron. Ulcus ventriculi, Ulcus-cruris-Stellen usw., um daraus zu ersehen, ob die gefundenen Veränderungen beim Organ des Carcinomatösen als Folgeerscheinung angesehen werden darf, oder etwas ist, was der Carcinomentwicklung vorhergeht.

Die Untersuchungen³⁾ haben ergeben, daß solche Prädilektionsstellen kein Zerstörungsvermögen für Carcinomzellen zeigen; es war damit einwandfrei nachgewiesen, daß wenigstens eine Veränderung — nämlich der Verlust der carcinomzellzerstörenden Fähigkeit als eine dispositionelle, d. h. der Carcinombildung vorangehende — sie begünstigende — zu betrachten ist. Ein weiterer Nachweis für die Auffassung dieser Änderung als dispositioneller ließ sich noch auf einem anderen Gebiete der Pathologie erbringen.

Bekanntlich hat sich insbesondere bei Personen, die mit Röntgenarbeiten längere Zeit beschäftigt waren, auffallend häufig und in relativ jungem Alter Carcinomentwicklung an den Händen gezeigt, so daß die Ansicht nicht von der Hand zu weisen ist, daß Röntgenbestrahlungsschädigungen eine lokale Disposition für Carcinom erzeugen.

Wir konnten nun in einer früheren Arbeit⁴⁾ nachweisen, daß durch allerdings toxische Röntgenbestrahlung das Zerstörungsvermögen normaler Hautstückchen gegenüber Carcinomzellen verloren geht, was um so auffallender war, als durch selbst intensive Radiumbestrahlung ein gleicher Effekt nicht erzielbar war. Ganz abgesehen von der pathognostischen Verwertbarkeit dieser Erkenntnisse hat die Übereinstimmung der durch die cytologische Reaktion nachweisbaren Ergebnisse mit den pathologischen Erscheinungen sicherlich erkennen lassen, daß die cytologische Prüfung für uns eine Methode ist, die zur Lösung von Fragen über disponierende Momente für Carcinom sehr geeignet ist. Wir haben daher diesen Weg auch betreten, um in der vorliegenden Frage über den Einfluß von Teer, Tabak, Paraffin usw. Aufklärung zu gewinnen. Wir geben im nachfolgenden mit Rücksicht auf die Gleichsinnigkeit der Versuche, die mit Tabaksaft, Teer und Ruß angestellt wurden, nur die Versuche mit Tabaksaft wieder.

Unsere Versuche gliederten sich in 3 Teile:

1. Versuche mit nicht lebendem Material
 - a) Einwirkung von Tabaksaft auf Serum,
 - b) Einwirkung von Tabaksaft auf Haut und Hautextrakte (mit Kochsalzlösung und mit Äther).
2. Versuche mit lebendem Material.

Untersuchung der Extrakte von Hautstückchen, die an der lebenden Ratte mit Tabaksaft-Ruß durch mehrere

Tage gereizt wurden, auf ihr Verhalten gegenüber Carcinomzellen.

3. Untersuchung auf wirksame Bestandteile des Teers, Tabakrauches usw.

Als Tabaksaft bezeichnen wir das Produkt, das sich beim Pfeifenrauchen am Boden der Tabakpfeife ansammelt.

Versuch 1: Wirkung des Tabaksaftes auf Carcinomzellzerstörung: Es wurden Carcinomzellen in mit NaCl-Lösung verdünntem Tabaksaft bei 40° C 24 Stunden belassen und nachgesehen, ob dies Zerstörung bewirkt. Aus Gründen der Kontrolle wurden auch Sarkomzellen auf Zerstörbarkeit durch Tabaksaft geprüft. Weiter wurde geprüft, ob Tabaksaft vielleicht die Zerstörungsfähigkeit des normalen Serums gegenüber Carcinomzellen beeinflusst.

Tabelle I.

Wirkung des Tabaksaftes auf Carcinomzellzerstörung.

Versuchsordnung	Zellgattung	Zählung der Mischung		Zerstörung
		sofort	nach 24 Std.	
5 Tr. Tabaksaft + 15 Tr. NaCl-Lösung (0,85%) + 2 Tr. FINa*) (10%) + 1 Tr. Zellenaufschüttlung	Carcinomzellen	79	75	zerstört nicht
5 Tr. Tabaksaft + 15 Tr. NaCl-Lösung + 2 Tr. FINa(10%) + 1 Tr. Zellenaufschüttlung	Sarkomzellen	79	73	zerstört nicht
Normalserum 20 Tr. + 2 Tr. FINa(10%) + 1 Tr. Zellenaufschüttlung	Carcinomzellen	80	5	zerstört
15 Tr. Normalserum + 5 Tr. Tabaksaft + 2 Tr. FINa (10%) + 1 Tr. Zellenaufschüttlung	Carcinomzellen	78	8	zerstört

*) Käufliches Präparat.

Tabaksaft zerstört weder Carcinomzellen noch Sarkomzellen; Tabaksaft hemmt das Zerstörungsvermögen des Normalserums gegenüber Carcinomzellen nicht.

Versuch 2: Prüfung von Extrakten einer Haut, die im Tabaksaft getränkt war. Ca. 6 g Rattenhaut wird in Tabaksaft 3 Tage bei 40° C belassen; dann wird der Tabaksaft mit physiologischer NaCl-Lösung gut gewaschen und aus je 3 g ein NaCl-Extrakt von 3 ccm sowie ein Ätherextrakt hergestellt; der letztere wird bei gewöhnlicher Temperatur abge-

dunstet und der Rückstand in 3 ccm phys. NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Als Kontrolle wird 6 g Rattenhaut in phys. NaCl-Lösung belassen und aus je 3 g, wie im Hauptversuch, ein NaCl- sowie ein Ätherextrakt hergestellt. Alle Extrakte werden in der in nachfolgender Tabelle verzeichneten Weise geprüft.

Tabelle II.

Prüfung der Extrakte von Haut, die im Tabaksaft getränkt war.

Versuchsordnung	Zellgattung	Zählung der Mischung		Zerstörung
		sofort	nach 24 Std.	
20 Tr. NaCl-Extrakt von der Rattenhaut die in Tabaksaft gelegen war + 1 Tr. Zellen + 2 Tr. 10% FNa-Lösung	Carcinomzellen	72	68	zerstört nicht
20 Tr. Ätherextrakt von der Rattenhaut, die in Tabaksaft gelegen war + 1 Tr. Zellen + 2 Tr. 10proz. FNa-Lösung	Carcinomzellen	76	75	zerstört nicht
20 Tr. NaCl-Extrakt von Rattenhaut mit Tabaksaft behandelt + 1 Tr. Zellen + 2 Tr. FNa-Lösung (10%)	Sarcomzellen	78	15	zerstört
Kontrolle.				
20 Tr. NaCl-Extrakt von Rattenhaut die in Kochsalz gelegen war + 1 Tr. Zellen + 2 Tr. FNa-Lösung (10%)	Sarkomzellen	80	18	zerstört
20 Tr. Ätherextrakt von Rattenhaut, die in Kochsalz gelegen war + 1 Tr. Zellen + 2 Tr. FNa-Lösung (10%)	Carcinomzellen	78	2	zerstört

Der Versuch ergibt, daß, während ein Stückchen Rattenhaut durch 3tägige Belassung in Kochsalzlösung ihr Zerstörungsvermögen gegenüber Carcinomzellen nicht ändert, ein gleiches Stückchen Haut in Tabaksaft belassen, sein Zerstörungsvermögen gegenüber Carcinomzellen einbüßt. Diese Einbuße ist eine spezifische, denn das Zerstörungsvermögen der Haut gegenüber Sarkomzellen ist erhalten geblieben.

Versuch 3: Nach dieser Feststellung, die in einer Reihe von Wiederholungen erhärtet wurde, war es eine naheliegende Aufgabe, nachzusehen, ob diese Schädigung des Zerstörungsvermögens auch eintritt, wenn der Tabaksaft direkt mit einem NaCl-Extrakt oder Ätherextrakt der Haut, die ja normalerweise zerstörend wirken, zusammengebracht wird.

Tabelle III.

Prüfung des Tabaksaftes auf Extrakte von normaler Rattenhaut.

Versuchsordnung	Zellgattung	Zählung der Mischung		Zerstörung
		sofort	nach 24 Std.	
15 Tr. Kochsalzextrakt von 3 g Haut + 5 Tr. Tabaksaft, 1 Tr. Carcinomzell-Aufschwemmung + 2 Tr. FlNa-Lösung (10%).	Carcinomzellen	76	8	zerstört
15 Tr. Ätherextrakt von 3 g Haut + 5 g Tabaksaft + 1 Tr. Carcinomzell-Aufschwemmung + 2 Tr. FlNa-Lösung (10%).	Carcinomzellen	72	4	zerstört

Der Versuch zeigt, daß der Verlust der normalen Zerstörungsfähigkeit gegenüber Carcinomzellen nicht lediglich als Bindung der zerstörenden Substanzen durch den Tabaksaft aufgefaßt werden kann, denn diese hätte auch im Extrakt stattfinden müssen; da der Kochsalzextrakt keine chemische Änderung der carcinolytischen Substanz bedeutet, läßt sich dieses Resultat nur dahin deuten, daß bei der Einwirkung des Tabaksaftes auf die Hautsubstanz komplizierte Einwirkungen vor sich gehen müssen. Um so wichtiger erschien es nun, Tabaksaft auf lebende Haut einwirken zu lassen und die betreffenden Hautstückchen nachher zu extirpieren und auf ihre carcinolytische Fähigkeit zu untersuchen.

Versuche mit lebendem Material.

Versuch 4: Einer Ratte wird nach Rasieren der Haut diese scarifiziert und durch 10 Tage Tabaksaft eingespritzt. Diese Haut wird nach 10 Tagen extirpiert, solange mit phys. NaCl-Lösung gewaschen, bis die Waschflüssigkeit sich nicht mehr färbt und aus 3 g dieser Haut ein NaCl-, aus 3 g ein Ätherextrakt, analog Versuch II, hergestellt und auf Carcinom- resp. Sarkomzellen geprüft. Als Kontrolle wird Haut mit NaCl-Lösung in obiger Weise behandelt.

Tabelle IV.

Prüfung von in vivo durch Tabaksaft geschädigter Haut auf Zerstörungsfähigkeit gegenüber Carcinom- und Sarkomzellen.

Versuchsordnung	Zellgattung	Zählung der Mischung		Zerstörung
		sofort	nach 24 Std.	
20 Tr. Kochsalzextrakt der in vivo mit Tabaksaft behandelten Rattenhaut + 1 Tr. Zellaufschwemmung + 2 Tr. 10proz. FlNa-Lösung.	Carcinomzellen	75	72	zerstört nicht
20 Tr. Kochsalzextrakt der in vivo mit Tabaksaft behandelten Rattenhaut + 1 Tr. Zellaufschwemmung + 2 Tr. 10proz. FlNa-Lösung.	Sarkomzellen	76	8	zerstört
20 Tr. Kochsalzextrakt der mit Tabaksaft in vivo behandelten Rattenhaut + 1 Tr. Zellaufschwemmung + 2 Tr. 10proz. FlNa-Lösung.	Carcinomzellen	80	80	zerstört nicht
Kontrolle.				
20 Tr. Kochsalzextrakt einer mit Kochsalzlösung behandelten Rattenhaut + 1 Tr. Zellaufschwemmung + 2 Tr. 10proz. FlNa-Lösung.	Carcinomzellen	77	8	zerstört
20 Tr. Ätherextrakt einer mit Kochsalzlösung behandelten Rattenhaut + 1 Tr. Zellaufschwemmung + 2 Tr. 10proz. FlNa-Lösung.	Carcinomzellen	80	0	zerstört
Prüfung der Tabaksafteinwirkung direkt auf die Extrakte der Haut.				
15 Tr. Kochsalzextrakt normaler Rattenhaut + 5 Tr. Tabaksaft + 2 Tr. 10proz. FlNa-Lösung.	Carcinomzellen	82	10	zerstört
15 Tr. Ätherextrakt normaler Rattenhaut + 5 Tr. Tabaksaft + 2 Tr. 10proz. FlNa-Lösung.	Carcinomzellen	78	2	zerstört

Es ergibt sich, daß auch Tabaksaft-Einwirkung während des Lebens die gereizte Haut ihres normalen Zerstörungsvermögens gegenüber Carcinomzellen beraubt und zwar nur speziell des Zerstörungsvermögens

gegenüber Carcinomzellen, während das Zerstörungsvermögen gegenüber Sarkomzellen erhalten bleibt.

Wiederum zeigt es sich, daß die Schädigung nicht eine ledigliche Bindung der betreffenden cytolytischen Substanz ist, sondern komplizierterer Art sein muß.

Für das nähere Verständnis dieser Schädigung schien es uns notwendig, zu studieren, welche Substanzen, welche Anteile der geprüften Materialien die eigentlich schädigenden seien. In bezug auf das chemische Verständnis der cytolytischen Reaktion haben unsere früheren Untersuchungen eine Reihe wichtiger Feststellungen erbracht. Es hat sich durch unsere früheren Untersuchungen⁴⁾ herausgestellt, daß das Zerstörungsvermögen des normalen Serums wie der normalen Organe als eine mit Äther extrahierbare N-freie gesättigte Fettsäureverbindung isolierbar ist, während die entgegengesetzt wirkende Substanz des Carcinomserums ein Nucleoglobulin ist, das sich chemisch vom normalen Nucleoglobulin durch seinen auffallenden Gehalt an kolloidalen Kohlenhydraten und eine N-freie ungesättigte Fettsäureverbindung unterscheidet⁵⁾.

Im Anschluß an frühere Konstitutionsuntersuchungen über diese isolierte Substanz haben sich auch im Rahmen der ihrer Konstitution nach bekannten Säuren der org. Chemie Repräsentanten auffinden lassen, die wenigstens ihrer Wirkung nach auf Carcinomzellen den aus den Geweben extrahierten Säureverbindungen gleichwertig waren. Es hat sich dabei gezeigt, daß Repräsentanten beider Wirkungen sich in der Reihe der Dicarbonsäuren finden⁶⁾, nur daß die normal wirkenden sich dadurch auszeichnen, daß sie eine ungerade Zahl von CH_2 -Gruppen besitzen, während die Säuren die ähnlich wie Carcinomserum wirken, sich dadurch auszeichnen, daß die beiden Carboxylgruppen an ein C-Atom verankert sind⁷⁾.

Gerade mit Rücksicht auf den Säurecharakter der Carcinomzellen zerstörenden Substanz schien es uns nun naheliegend, in den untersuchten Materialien nach basischen Substanzen zu fahnden. Als solche sind ja Pyridin und dessen Homologe bekannt.

Versuch 5: Prüfung von Pyridin und seinen Homologen auf carcino-lytische Fähigkeit. Von dem letzten werden ca. 0,1 g auf 20 Tropfen Flüssigkeit verdünnt zur Prüfung genommen. Siehe Tab. V—VIII.

Tabelle V.

Prüfung von Pyridinlösungen auf Zerstörungsfähigkeit gegenüber Carcinom- und Sarkomzellen.

Versuchsordnung	Zellgattung	Zählung der Mischung		Zerstörung
		sofort	nach 24 Std.	
20 Tr. Pyridinextrakt + 1 Tr. Carcinomzellen + 2 Tr. 10 proz. FNa-Lösung	Carcinomzellen	84	84	zerstört nicht
20 Tr. Pyridin + 1 Tr. Sarkomzellen + 2 Tr. 10 proz. FNa-Lösung	Sarkomzellen	72	71	zerstört nicht

Pyridin zerstört weder Carcinom- noch Sarkomzellen.

Tabelle VI.

Prüfung von Haut, die in vitro mit Pyridin behandelt worden war, auf ihre Zerstörungskraft gegenüber Carcinom- und Sarkomzellen.

Versuchsordnung	Zellgattung	Zählung der Mischung		Zerstörung
		sofort	nach 24 Std.	
20 Tr. NaCl-Extrakt von Rattenhaut, die in Pyridin gelegen war. 1 Tr. Zellen + 2 Tr. 1 proz. FNa-Lösung	Carcinomzellen	74	70	zerstört nicht
20 Tr. Ätherextrakt von Rattenhaut, die in Pyridin gelegen war + 1 Tr. Zellen + 2 Tr. FNa-Lösung	Carcinomzellen	78	74	zerstört nicht
20 Tr. NaCl-Extrakt von Rattenhaut, die in Pyridin gelegen war + 1 Tr. Zellen + 2 Tr. 10% FNa-Lösung	Sarkomzellen	72	12	zerstört

Durch Pyridinbehandlung in vitro wird Rattenhaut des Zerstörungsvermögens für Carcinomzellen beraubt, während das Zerstörungsvermögen für Sarkomzellen erhalten bleibt.

Tabelle VII.

Prüfung von in Pyridin geschädigter Haut auf Zerstörungsfähigkeit gegenüber Carcinom- resp. Sarkomzellen.

Versuchsanordnung	Zellgattung	Zählung der Mischung		Zerstörung
		sofort	nach 24 Std.	
20 Tr. NaCl-Extrakt von in vivo mit Pyridin behandelte Rattenhaut + 1 Tr. Carcinomzellen + 2 Tr. 10 proz. FINa-Lösung	Carcinomzellen	78	76	zerstört nicht
20 Tr. Ätherextrakt von in vivo mit Pyridin behandelte Rattenhaut + 1 Tr. Carcinomzellen + 2 Tr. 10 proz. FINa-Lösung	Carcinomzellen	76	76	zerstört nicht
20 Tr. NaCl-Extrakt von in vivo mit Pyridin behandelte Rattenhaut + 1 Tr. Sarkomzellen + 2 Tr. 10 proz. FINa-Lösung	Sarkomzellen	81	11	zerstört

Durch Behandlung der Rattenhaut beim lebenden Tier mit Pyridin kann der Haut das Zerstörungsvermögen für Carcinomzellen genommen werden, während das Zerstörungsvermögen für Sarkomzellen erhalten bleibt.

Tabelle VIII.

Einwirkung von Pyridin auf Hautextrakte bezüglich deren Zerstörungsfähigkeit gegenüber Carcinomzellen.

Versuchsanordnung	Zellgattung	Zählung der Mischung		Zerstörung
		sofort	nach 24 Std.	
5 Tr. NaCl-Extrakt von Rattenhaut + 2 Tr. 10 proz. FINa-Lösung + 5 Tr. $\frac{1}{10}$ proz. Pyridin-Lösung	Carcinomzellen	81	10	zerstört
5 Tr. von Rattenhaut-Äther-Extrakt + 2 Tr. 10% FINa-Lösung + 5 Tr. $\frac{1}{10}$ proz. Pyridin-Lösung	Carcinomzellen	78	6	zerstört

Das nicht zur Rattenhaut, sondern nur zu Rattenhautextrakten zugesetzte Pyridin kann die Zerstörungskraft des Serums gegenüber Carcinomzellen nicht beeinflussen.

Es ist in bezug auf die nachgewiesene Pyridinwirkung besonders interessant, daß analoge Versuche mit Picolin, Lutidin, Parvolin ganz im Gegensatz zu Pyridin das Zerstörungsvermögen der Haut gegenüber Carcinomzellen nicht beeinflußt haben. Es genügt also lediglich der Eintritt von Methylgruppen ins Pyridin, um die nachgewiesenen Einflüsse auf die Haut aufzuheben.

Fassen wir schließlich zusammen, so haben die Untersuchungen ergeben, daß Tabaksaft auf tierische Haut derart wirkt, daß deren normale Fähigkeit Carcinomzellen zu zerstören erlischt, während z. B. die Fähigkeit, Sarkomzellen zu zerstören, erhalten bleibt. Daraus allein geht schon hervor, daß es sich nicht etwa um eine allgemeine Zellschädigung, z. B. eine nekrotisierende Einwirkung handelt, die eben jede Lebensfunktion ertötet, sondern um eine jener spezifischen Läsionen im Sinne einer Begünstigung für die Carcinomzelle. Zu den wirksamen Bestandteilen des Tabaksaftes gehören basische Substanzen aus der Reihe der Pyridine. Allerdings ist nicht das Pyridin selbst der neutralisierende Faktor, denn der Ätherextrakt der normalen Haut, der ja die zerstörende Substanz enthält, wird durch Zusatz von Pyridin nicht inaktiviert, sondern bleibt unbeeinflußt (Tab. VIII); es muß sich also darum handeln, daß die Pyridinkörper sich selbst oder gewisse Zellbestandteile so verändern (bei Einwirkung auf die Haut), daß dann die Zerstörungsfähigkeit des Normalserums neutralisiert resp. zum Verschwinden gebracht wird.

Dem nachgewiesenen Einflusse des Pyridins gegenüber tauchte naturgemäß die Frage auf, warum denn z. B. der Tabaksaft nicht in einer noch größeren Prozentzahl der Raucher Lippenkrebs hervorruft. Oder warum ein Hund, dessen Haut mit Teer exzessiv behandelt wird — wie dies Casin getan hat — keinen Teerkrebs bekommt. Wir glauben, daß unsere Versuche darüber Aufschluß geben.

Es ist eben nur ein das Carcinom begünstigender Faktor geschaffen worden; die Entstehung des Carcinoms bedarf aber noch eines anderen Faktors, wie dies die zitierte Untersuchung der Prädilektionsstellen für Carcinom erwiesen haben.

Wie das Carcinomserum eine Substanz hat — das pathologische Nucleoglobulin —, das Carcinomzellen geradezu gegen die Zerstörung durch Normalserum schützt, so haben sich am primären Sitz des Carcinoms reichlich Substanzen gefunden, die die

Carcinomzellen gegen die Zerstörung schützen, Substanzen, die eben eine materielle Vorbedingung für die Existenz des Carcinoms sind. Die Prädilektionsstelle hat diese pathologischen Substanzen nicht, ihr mangeln nur die normalen Schutzsubstanzen. Oder um histologisch verständlicher zu sprechen, es mangeln der Prädilektionsstelle zwar die schützenden Grenzsubstanzen der normalen Zellen, aber es mangelt ihr noch das Material, das die feindlichen Zellen zur Wucherung bringt. Wir haben nun im vorliegenden Falle nachgesehen, ob in den Hautstückchen nach Tabaksaft-, Ruß- und Pyridineinwirkung sich solche Schutzwirkungen für die Carcinomzellen nachweisen lassen. Es hat sich herabgestellt, daß dies nicht der Fall ist (Tabelle IX).

Tabelle IX.

Versuch, ob Tabaksaft oder Pyridin der Rattenhaut carcinomzellschützende Eigenschaften verleihen können.

Versuchs-anordnung	Zell-gattung	Zählung der Mischung		Zerstörung
		sofort	nach 24 Std.	
12 Tr. Normalserum + 8 Tr. Carcinomserum + 2 Tr. FINa-Lösung + 1 Tr. Zellen	Carcinomzellen	78	74	zerstört nicht
12 Tr. Normalserum + 8 Tr. NaCl-Extrakt von einer mit Tabaksaft behandelten Rattenhaut + 2 Tr. 10proz. FINa-Lösung	Carcinomzellen	76	8	zerstört
12 Tr. Normalserum + 8 Tr. NaCl-Extrakt von einer mit Pyridin behandelten Rattenhaut + 2 Tr. FINa-Lösung	Carcinomzellen	80	9	zerstört

Weder Tabaksaft noch Pyridin können der Rattenhaut die Carcinomzellen schützende Kraft des Carcinomserums verleihen.

Und weil nun dieser zweite Faktor der Carcinombildung durch den Tabaksaft nicht hervorgerufen werden kann, so kann der Tabaksaft usw. nicht in allen Fällen Carcinom hervorrufen, sondern nur in jenen, wo eben aus anderen Ursachen der zweite Faktor vorhanden ist.

Der Sachverhalt der Erkrankungsbedingungen stellt sich somit derart dar, daß eine Reihe von Menschen eine dieser zwei Vorbedingungen besitzen, z. B. das Vorhandensein jener pathologischen Substanzen, die die materielle Grundlage der Carcinombildung darstellen; diese pathologischen Substanzen können aber nirgends zur Zellbildung verwendet werden, weil die normalen Grenzsubstanzen der gesunden Zelle dies verhindern; dort aber, wo diese Grenzsubstanzen geschwunden sind, können die pathologischen Nährsubstanzen zur Verwendung gelangen und zur Wucherung führen.

Leute mit diesem einen Faktor, die ohne diese Teer- oder Raucherschädigungen noch lange kein Carcinom bekommen hätten, bekommen dasselbe früher, weil sie zu ihrem schon vorhandenen Carcinomfaktor nun auch die lokale defekte Stelle erhalten. Andererseits können eine Menge Menschen durch den Rauch usw. eine lokale geschädigte Stelle haben; sie bekommen aber kein Carcinom, weil sie jenen anderen Faktor nicht haben, die Erzeugung einer pathologischen Substanz, die das Material zur Wucherung darstellt.

Und die Schädlichkeit des Tabaksaftes usw. beschränkt sich nach den vorliegenden Untersuchungen darauf, daß an der Reizungsstelle jene normalen Stoffe verbraucht werden, die imstande wären, Carcinomzellen resp. deren Material zu zerstören und daß sie somit eine Stelle schaffen, wo Carcinomentwicklung ungestört von den normalen Schutzkräften vor sich gehen kann.

Literatur.

- ¹⁾ Freund und Kaminer, *Biochem. Zeitschr.* **26**, 312. 1910; *Wien. klin. Wochenschr.* 1910, S. 1221; siehe auch: Neuberg, *Biochem. Zeitschr.* **26**, 34. 1910; Monakow, *Münch. med. Wochenschr.* 1911, Nr. 42; Kraus, Graff und Ranzi, *Wien. klin. Wochenschr.* 1911, Nr. 6; Erich Leschke, *Beiträge zur Klinik der Infektionskrankheiten und zur Immunitätsforschung* **1**, H. 2; Dr. W. Arzt und W. Kerl, *Wien. klin. Wochenschr. Jhrg.* **25** Nr. 46. 1912. — ²⁾ Hirschfeld, Hans, *Biochem. Zeitschr.* **26**, 344. 1910. — ³⁾ Freund und Kaminer, *Wien. klin. Wochenschr.* **25**, Nr. 43. 1912. — ⁴⁾ Freund und Kaminer, *Wien. klin. Wochenschr.* **26**, Nr. 6. 1913. — ⁵⁾ Freund und Kaminer, *Wien. klin. Wochenschr.* **23**, Nr. 34. 1910; *III. Intern. Krebskonfer. Brüssel 1913. Wien. klin. Wochenschr.* 1913, Nr. 51. — ⁶⁾ Freund und Kaminer, *Wien. klin. Wochenschr.* **27**, Nr. 14. 1914. — ⁷⁾ Freund und Kaminer, *Wien. klin. Wochenschr.* 1919, Nr. 46.
-

Über die Bildung von Acetaldehyd bei den Umsetzungen von Zucker durch Pilze.

Von
Clara Cohen.

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

(Eingegangen am 18. September 1920.)

Seit langem ist bekannt, daß eine Reihe von Sproßpilzen eine Zerlegung des Zuckers bewirken können, die in ihrem Wesen mit der alkoholischen Hefengärung übereinstimmt oder verwandt ist. Neben anderen Produkten erzeugen diese Pilze aus Zucker nämlich Weingeist und Kohlensäure angenähert im molekularen Verhältnis, das für die alkoholische Gärung kennzeichnend ist. Letztere führt nach den Arbeiten Neubergs und seiner Schule (1911—1920) über die Stufen der Brenztraubensäure und des Acetaldehyds. Mit Hilfe verschiedener Verfahren zur Fixierung von Zwischengliedern, z. B. mit der Sulfit-¹⁾ und der Dimedonmethode²⁾, konnten beträchtliche Mengen Acetaldehyd — bis nahezu 75% der theoretischen Möglichkeit — angehäuft werden.

Diese Wege zu künstlichen Eingriffen in die Gärungsvorgänge haben sich auch bei den Bakteriengärungen als gangbar erwiesen; hier war gleichfalls die Feststellung erfolgt, daß der Acetaldehyd eine Zwischenstufe jener Zuckerzersetzen bildet, die von verschiedenen Bacillen hervorgerufen werden³⁾.

Bei der allgemeineren Bedeutung, zu der somit die Acetaldehyd - Brenztraubensäuretheorie der Gärungen gelangt war, scheint es wichtig, ihre Gültigkeit weiter auch für jene Umsetzungen zu prüfen, die von den Sproßpilzen herbeigeführt

¹⁾ C. Neuberg und E. Färber, diese Zeitschr. **78**, 238. 1916. — C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. **89**, 365. 1918.

²⁾ C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. **106**, 281. 1920.

³⁾ Siehe auch die folgende Mitteilung, diese Zeitschr. **112**, 144. 1920.

werden und der alkoholischen Zuckerspaltung nahestehen. Aus diesem Grunde habe ich Neubergs Abfangverfahren, das sich der sekundären Sulfite bedient, auf die Vergärung von Traubenzucker durch folgende Pilze angewendet:

Aspergillus cellulosa,

Monilia candida,

Mucor racemosus,

Mucor rouxii sowie

Oidium lactis.

Der erstgenannte Mikroorganismus gehört zwar zu einer Gruppe, die nach F. Czapek¹⁾ nicht zu den eigentlichen Alkoholgärungspilzen zählt; er bietet aber deshalb ein Interesse, weil er der unter A. Scheunerts Leitung ausgeführten Untersuchung von Anna Hopffe²⁾ zufolge an der Aufspaltung der Cellulose beteiligt ist und man mit der Möglichkeit rechnen muß, daß der bekannte Abbau der Cellulose durch Kleinlebewesen zum Teil über den Acetaldehyd führt.

In der Tat läßt sich bei allen erwähnten Pilzen die Entstehung von Acetaldehyd nachweisen. Beim *Aspergillus cellulosa* bin ich bisher nur zu mäßigen Ausbeuten gelangt, zu sehr viel reicheren dagegen bei den anderen Erregern. Im einzelnen führe ich folgende Versuche an:

A. *Aspergillus cellulosa*.

Dieser Pilz³⁾ wächst bei 25° gut auf einer Nährlösung, welche in 100 ccm enthält: 1g KH_2PO_4 , 0,6 g MgSO_4 , 0,6g Witte-Pepton sowie 6 g Traubenzucker.

1. Fügt man zu einer solchen Mischung alkalisch reagierendes Dinatriumsulfit, und zwar 100 ccm einer 6proz. Lösung, so wird die Entwicklung des Erregers stark gehemmt. Gibt man von vornherein das Dinatriumsulfit hinzu, so dauert es etwa eine Woche, bis die Aussaat von *Aspergillus cellulosa* überhaupt angeht.

2. Weit geringer ist die Schädigung, die das unlösliche schwefligsaure Calcium verursacht. Wenn man zu obiger Kulturflüssigkeit, sobald der Pilz sich deutlich entwickelt hat,

¹⁾ F. Czapek, Bioch. der Pflanzen **1**, 317. 1913.

²⁾ A. Hopffe, Chem. Centralblatt **20**, I 92.

³⁾ Die Kultur verdankt das Institut der Güte des Herrn Professor A. Scheunert in Berlin.

4 g steril bereitetes und in 100 ccm keimfreiem Wasser aufgeschwemmtes Calciumsulfit (berechnet als wasserfreies CaSO_3) und zur Abstumpfung sich bildender Säuren 1 g sterilisiertes Calciumcarbonat setzt, so tritt keine erhebliche Beeinträchtigung des Wachstums ein. Nach einer Woche ist eine kräftige Pilzdecke vorhanden. 2 Tage nach Zusatz des sek. Calciumsulfits erhielt man eine schwache, nach 5 Tagen eine deutliche Reaktion auf Acetaldehyd.

Bei Ansatz von Versuchen mit Dinatriumsulfit war nach 16 Tagen ebenfalls Aldehyd, aber nur in Spuren, nachzuweisen.

Die qualitative Reaktion kann hier überall in sehr einfacher Weise so ausgeführt werden, daß unmittelbar 3—4 ccm der Kulturflüssigkeit mit einigen Tropfen der 4proz. Auflösung von Nitroprussidnatrium sowie der 3proz. von Piperidin gemischt werden. In den acetaldehydhaltigen Proben tritt dann eine mehr oder minder starke Blaufärbung auf.

B. *Monilia candida*.

Monilia candida ist auch gegen sekundäres schwefligsaures Natrium wenig empfindlich, verhält sich also in dieser Beziehung den eigentlichen Hefen analog. Trotz der geringen Aussaat bei Überimpfung¹⁾ mit einer Platinnadel in die Nährlösung war bereits nach 3 Tagen eine deutliche Acetaldehydreaktion vorhanden. Die Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung:

In 100 ccm waren 6 g Traubenzucker, 1 g KH_2PO_4 , 0,6 g MgSO_4 , 0,6 g Pepton (Witte); dazu kamen 100 ccm 6proz. Dinatriumsulfitlösung und 1 g Calciumcarbonat. Temperatur 25°.

Aus 185 ccm der Lösung wurde mit 60 ccm m-Bariumchloridlösung das unverbrauchte Sulfit ausgefällt und mit Nachwaschen ein Volumen von 310 ccm erhalten. Das Filtrat der Niederschläge, 288 ccm, entsprach 171,9 ccm der ursprünglichen Lösung. Unter Zusatz von 10 g Calciumcarbonat wurde dann der Aldehyd frei gemacht. Erhalten wurden 370 ccm Destillat. In diesen wurden durch jodometrische Titration 0,437 g Acetaldehyd gefunden; dies sind 8,47% des angewandten Zuckers. Im Destillationsrückstande befand sich noch ein Rest unvergorenen Kohlen-

¹⁾ Röhren mit diesem Pilz sowie mit den im folgenden erwähnten Erregern hat Herr Professor F. Ehrlich in Breslau dankenswerterweise dem hiesigen Laboratorium überlassen.

hydrates, das jedoch nicht mehr lediglich aus Glucose, sondern infolge der umlagernden Wirkung des alkalisch reagierenden Dinatriumsulfits auch aus anderen Hexosen bestand¹⁾.

Bei *Monilia* war die Aldehydbildung so reichlich, daß beim Erwärmen weniger Kubikzentimeter Gärgut mit Sodalösung, wie das Neuberg und Mitarbeiter beschrieben haben, sofort intensiver Geruch nach Acetaldehyd auftrat und dann typische Bildung von Aldehydharz erfolgte.

C. *Mucor racemosus*.

Mucor racemosus beginnt sich auf 3% Dinatriumsulfit enthaltenden Nährlösungen erst nach etwa 3 Wochen zu entwickeln. Daher bediente ich mich in diesem Falle des Calciumsulfitverfahrens. Die Zusammensetzung der Kulturflüssigkeit war die gleiche wie bei Versuch A 2. Bereits nach 6-stündiger Bebrütung bei 25° war deutliche Kohlensäureentwicklung und kräftige Aldehydreaktion wahrnehmbar; nach 20 Stunden fiel letztere recht stark aus. Nach zweiwöchentlichem Stehen wurde in bekannter Weise die Menge Aldehyd durch das Destillations-Titrationsverfahren ermittelt. Gefunden wurden, berechnet auf das ganze Quantum der Urlösung, 0,0984 g; an unverbrauchtem Zucker waren noch 3,29 g zugegen, so daß 3,6% Acetaldehyd vom wirklich umgesetzten Zucker isoliert worden sind.

D. *Mucor rouxii*.

Versuchsordnung genau wie bei *Mucor racemosus*.

Nach 24 Stunden starke Acetaldehydreaktion und beträchtliche Kohlendioxydentwicklung. Nach 2 Wochen wurden gefunden im ganzen 0,1206 g Acetaldehyd bei einem Gehalt von 2,22 g an unzersetztem Zucker. Unter Berücksichtigung dieser Menge beträgt die Ausbeute an Acetaldehyd 3,2%.

E. *Oidium lactis*.

Der Pilz verträgt die 3proz. Lösung von sek. schwefligsaurem Natrium glatt und gedeiht auf ihr befriedigend. Zusammensetzung der Nährflüssigkeit wie bei B. Nach 18 Tagen waren bei 25° 0,2488 g Aldehyd gebildet und noch 1,32 g Zucker vorhanden. Der Ertrag an Acetaldehyd machte also 5,3% aus.

Auch bei Calciumsulfit enthaltenden Nährgemischen wächst

¹⁾ Vergl. bei C. Neuberg, J. Hirsch und E. Reinfurth, diese Zeitschr. 105, 307. 1920.

Oidium lactis vortrefflich, doch ganz entsprechend den bei Hefen gemachten Erfahrungen¹⁾ ist der mit unlöslichem schwefligsaurem Kalk erzielbare Aldehydtrug erheblich geringer als der bei Anwendung löslichen und daher in stärkerem Umfange reagierenden Natriumsulfits. Er war dabei nur rund ein Sechstel so groß. —

Die Vergärung des Zuckers durch die genannten Pilze erfolgt, wie man weiß²⁾, viel langsamer und auch unvollständiger als durch Hefe. Zur höchsten Ausbeute an Alkohol, die z. B. bei *Mucoraceengärungen* überhaupt erzielt zu sein scheint, dürfte O. Emmerling³⁾ gelangt sein, der 22% Spiritus vom Gewichte des angewendeten Zuckers bei der Umsetzung mittels *Mucor racemosus* gewann; H. Pringsheim⁴⁾ gab Weingeisterträge von 12—19% an. In allen meinen Fällen, in denen die Versuchsdauer nur auf 14—18 Tage ausgedehnt gewesen ist, sind mehr oder minder beträchtliche Mengen Zucker unzerlegt geblieben. Bezogen auf die wirklich umgesetzten Quantitäten Kohlenhydrat sind die Aldehydausbeuten keineswegs gering. Sie sind bei *Monilia candida* unter Berücksichtigung der Sulfitkonzentration, die ja den Umfang der Aldehydfesselung bestimmt, fast ebenso groß wie bei der Hefengärung. Dieses Ergebnis ist um so bemerkenswerter, als man bei diesen Pilzen ja nicht wie bei den *Saccharomyceten* mit einer großen Aussaat die Versuche beginnt, sondern die Erreger in der Lösung heranzüchtet und selbst bei geeigneter Wahl der Versuchsbedingungen eine Schädigung des Mikroorganismus durch das Abfangmittel nicht ganz ausschließen kann. Bei einigen der genannten Pilze gelingt die Bindung des Acetaldehyds in solchen Massen, daß sich Erhebungen vornehmen lassen werden, ob die Fixation der Aldehydstufe zwangsläufig die Entstehung von Glycerin, also den Ablauf der zweiten Vergärungsform, nach sich zieht, wie das bei Anwendung der Methode auf die Hefengärung nach den Untersuchungen von Neuberg, Färber und Reinfurth (l. c.) der Fall ist. Diese Feststellung sowie die Ausführung vollständiger Bilanzen muß weiteren Versuchen vorbehalten bleiben, ebenso wie die Prüfung der Frage, ob man diese Pilze auch zur Vollziehung der dritten Vergärungsform veranlassen kann.

¹⁾ C. Neuberg und E. Reinfurth, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 52, 1677. 1918.

²⁾ C. Wehmer in Lafars Handb. 4, 455. 1907.

³⁾ O. Emmerling, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 30, 454. 1897.

⁴⁾ H. Pringsheim, diese Zeitschr. 8, 128. 1908.

Acetaldehyd als Zwischenstufe bei der Vergärung von Zucker durch *B. lactis aerogenes*.

Von

C. Neuberg, F. F. Nord und E. Wolff.

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

Vor einiger Zeit haben C. Neuberg und F. F. Nord darge-
tan, daß ebenso wie bei der alkoholischen Hefengärung
auch bei zahlreichen Arten der Zuckerspaltung durch
Bakterien der Acetaldehyd ein in beträchtlichen
Mengen faßbares Zwischenprodukt darstellt¹⁾. Die Ge-
nannten haben gezeigt, daß beim Abbau von Kohlenhydraten und
verwandten Substanzen, wie Glycerin und Mannit, durch *B. coli comm.*, durch verschiedene Varietäten von Erregern der
Ruhr sowie durch den zur Gruppe der Buttersäurebildner gehörigen
Fränkelschen Bacillus reichlich Acetaldehyd auftritt, wenn
man diesem durch Anwendung des Abfangverfahrens —
Bindung an sekundäre schweflige Säure Salze — Gelegenheit zur
Anhäufung schafft. Damit war bei den Bakteriengärungen eine
sichere Grundlage für die Entstehung von Acetaldehyd gegeben,
dessen Anteilnahme am Stoffwechsel des nach ihm benannten
Bacteriums übrigens Fitz 1876 als eine Möglichkeit nebenher
einmal angedeutet hat, freilich ohne jemals wirklich Acetaldehyd
aufgefunden zu haben. Neuberg und Nord hatten auch (l. c.)
bereits darauf hingewiesen, daß im Verdauungstraktus die Be-
dingungen zu einer Erzeugung von Acetaldehyd durch Mikroorga-
nismen vorhanden und daß eine gesteigerte Bildung bzw. ver-
langsamte Umsetzung oder vermehrte Resorption für den höher
entwickelten Organismus von Belang sein könnten.

¹⁾ C. Neuberg und F. F. Nord, diese Zeitschr. **96**, 133. 1919.

Zu den Bakterien, welche im Darmkanal vorkommen, insbesondere beim Säugling, zählt nun auch der den Milchsäurebacillen nächststehende *B. lactis aerogenes*. Seitdem 1887 A. v. Bókay¹⁾ auf die große Bedeutung der durch Kleinlebewesen erzeugten Säuren für die Muskeltätigkeit des Darmes aufmerksam gemacht hat, ist die physiologische und pathologische Rolle der Gärungsprodukte in den verschiedenen Abschnitten des Verdauungsapparates vielfach von diesem Gesichtspunkte sowie aus ernährungsphysiologischen Gründen in Betracht gezogen worden. Nach neueren Untersuchungen von Bessau und Bossert²⁾ kann bei akuten oder chronischen Störungen unter der Bakterienflora des Dünndarms der *B. lactis aerogenes* überwiegen und dem *Bacterium coli* an Gärungsintensität überlegen sein. Daher bietet dieser Erreger ein besonderes Interesse, und wir haben ihn deshalb auf sein Vermögen untersucht, Acetaldehyd hervorzubringen.

Die Stellung des *B. lactis aerogenes* im Bakteriensystem ist nicht scharf umrissen. Er teilt gewisse Eigenschaften mit dem *Colibacterium*, soll dieses jedoch durch die Fähigkeit übertreffen, aus Glucose in verstärktem Maße Milchsäure zu bilden, so daß er eine Zeitlang zu den *Lactobacillen* gerechnet worden ist. Er scheint außer durch seine Unbeweglichkeit am meisten durch die von O. Emmerling³⁾ festgestellte Reduktionskraft gegenüber Äpfelsäure charakterisiert, aus der dabei Bernsteinsäure in großen Mengen hervorgeht, ferner durch die weitere Beobachtung Emmerlings, daß er wohl aus Milchzucker, aber nicht aus Glucose Bernsteinsäure erzeugt und Lactose sowie Galaktose in ein schleimiges Galaktan überführt. Für das *B. coli comm.* ist ein derartiges Verhalten dem Anscheine nach nicht bekannt. Als unzweifelhafte, nicht gasförmige Produkte der Traubenzuckerzersetzung durch den genannten Erreger sind gefunden: Milchsäure, Essigsäure und Alkohol sowie 2, 3-Butylenglykol nebst Acetylmethylcarbinol⁴⁾.

Da Essigsäure sowie Alkohol nach den neueren Untersuchungen von C. Neuberg mit J. Hirsch, E. Rein-

1) A. v. Bókay, *Malys Jahresber.* 17, 270. 1887.

2) G. Bessau und O. Bossert, *Jahrb. f. Kinderheilk.* 89, 269. 1919.

3) O. Emmerling, *B.* 32, 1917, 1899 und 33, 2478. 1900.

4) A. Harden und G. S. Walpole, *Ch. C.* 06, I, 1560; G. S. Walpole, *Ch. C.* 11, I, 1309.

furth und W. Ursum¹⁾ auf eine Dismutation intermediär entstandenen Acetaldehyds zurückgeführt werden können, so mußte — in Erweiterung der bei den vorerwähnten Bakterienarten bereits erzielten Ergebnisse — es möglich sein, durch Verhinderung seiner Disproportionierung den Acetaldehyd als solchen zu fixieren, vielleicht auch die Entstehung der Butylderivate zurückzudrängen, falls deren Auftreten mit der intermediären Aldehydbildung in Zusammenhang steht²⁾. Beides, insbesondere die Fixierung von Acetaldehyd, gelingt in der Tat in nicht unerheblichem Umfange mit Hilfe der „Abfangmethode“. Eine vollkommene Aufhebung der normalen Gärung ist hier so wenig wie bei den Zuckerspaltungen durch Hefen aus den Gründen möglich, die wir ehemals dafür auseinandergesetzt haben.

Die Versuchsanordnung schloß sich an die früher gewählte an. Wir verfahren folgendermaßen:

Herstellung der Nährlösung: 70 g frische Brauereihefe wurden mit 1 l Wasser eine halbe Stunde lang in gelindem Sieden erhalten. Nach 24-stündigem Stehen wurde die Flüssigkeit durch ein Macherey-Filter gegossen, mit 1% Pepton und 10% Traubenzucker versetzt. Hierauf wurde die Lösung an drei aufeinanderfolgenden Tagen je eine halbe Stunde in strömendem Wasserdampf sterilisiert und nach Bedarf in keimfreie kleinere Kölbchen abgefüllt.

Als Erreger diente eine Reinkultur von *B. lactis aërogenes*, für deren Überlassung wir Herrn Professor Dr. Heymann vom hygienischen Institut der Universität Berlin auch an dieser Stelle danken möchten.

24 Stunden vor Beimpfung der Gäransätze wurde mit einer Platinöse der Erreger von 1proz. Traubenzucker-Agar zur Prüfung des Gärvermögens in ein Kölbchen mit der oben beschriebenen Nährlösung übertragen, die mit etwas keimfreiem Calciumcarbonat versetzt war. Das Gefäß wurde 24 Stunden bei 37° bebrütet. Die eingetretene Gasentwicklung zeigte die Gärfähigkeit an, während das Wachstum mikroskopisch kontrolliert wurde. Aus gut befundenen Lösungen wurde dann jeweils zur Beimpfung der eigentlichen Gärkolben 1 ccm steril entnommen.

¹⁾ C. Neuberg und J. Hirsch, diese Zeitschr. **100**, 304. 1919; C. Neuberg, J. Hirsch und E. Reinfurth, diese Zeitschr. **105**, 307. 1919; C. Neuberg und W. Ursum, diese Zeitschr. **110**, 193. 1920.

²⁾ Vgl. C. Neuberg, Handbuch der Biochemie, **1**, 224. 1909; Monogr. Jena 1913. S. 40.

Ansätze 1 und 2:

A. Versuche mit Calciumsulfid als Abfangmittel.

Zu je 200 ccm der in der erwähnten Weise bereiteten Nährlösung wurden je 12 g Calciumcarbonat (an 3 aufeinanderfolgenden Tagen bei 180° trocken sterilisiert), sowie 40 bzw. 24 g sekundärer schwefligsaurer Kalk (66,4proz. feuchtes Salz) hinzugefügt. Hierauf wurde die Mischung abermals 20 Minuten im Dampfstrom sterilisiert und dann beimpft.

Ansätze 3 und 4:

B. Versuche mit Dinatriumsulfid als Abfangmittel.

172 bzw. 184 ccm steriler Nährlösung wurden mit je 12 g keimfreiem Calciumcarbonat nebst 28 ccm bzw. 16 ccm einer 2mal gesondert sterilisierten 25proz. Lösung von sekundärem schwefligsaurem Natrium versetzt und darauf gleichfalls beimpft.

Als Kontrolle dienten 100 ccm derselben Nährlösung, zu der vor der Infektion lediglich 6 g steriles Calciumcarbonat gegeben waren.

Nachdem die Gäransätze 24 Stunden lang bei 37° im Brutschranke sich selbst überlassen waren, wurde zunächst auf entstandenen Acetaldehyd qualitativ geprüft. Zu diesem Zwecke wurden dem Gärungsgemische etwa 3 ccm tunlichst ohne Bodenkörper steril entnommen, mit etwa 0,5 ccm einer 4proz. Nitroprussidnatriumlösung und hiernach mit ca. 1 ccm einer 3proz. Piperidinlösung versetzt. Bis auf die Kontrolle ergaben alle Proben die auf das Vorhandensein von Acetaldehyd zu beziehende Blaufärbung¹⁾. Nebenher wurde noch die Anwesenheit von Traubenzucker durch die Reaktion mit Ostscher Lösung festgestellt. Durch eine gleichzeitig vorgenommene mikroskopische Untersuchung eines Tropfens der Gärflüssigkeit konnten wir uns vom üppigen Wachstum der Erreger überzeugen.

¹⁾ Möglicherweise gibt das Acetylmethylcarbinol $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH}_2$ die Nitroprussidnatriumreaktion wie das isomere Acetaldol $\text{CH}_3 \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CHO}$ (vgl. C. Neuberg und E. Kerb, diese Zeitschr. 92, 108. 1918); da jedoch der Kontrollansatz, in dem Acetoin zu erwarten war, in der vorliegenden Verdünnung wenigstens, bei dieser Probe einen negativen Ausfall zeigte, so kann die Färbung auf Acetaldehyd bezogen werden. Daß tatsächlich $\text{CH}_3 \cdot \text{CHO}$ vorlag, wird weiter unten (s. S. 149) bewiesen.

Nach abermals 24stündigem Stehen erfolgte die erste quantitative Bestimmung des vorhandenen Acetaldehyds. Zu diesem Behufe wurden je 50 ccm Flüssigkeit von den Gäransätzen abgegossen. Bei den Ansätzen mit Calciumsulfit wurde durch Destillation mit 10 g gewöhnlichem festem kohlen-saurem Kalk der Acetaldehyd aus seiner Sulfit-Doppel-Verbindung frei gemacht und unter den vor Jahren von uns ausführlich beschriebenen Vorsichtsmaßregeln übergetrieben. Bei den Versuchen mit Natriumsulfit wurden außer den 10 g CaCO_3 noch 50 ccm bzw. 30 ccm m-Chlorbariumlösung hinzugegeben; dadurch wird die Umwandlung des nicht in Reaktion getretenen löslichen schwefligsauren Salzes in unlösliches BaSO_3 herbeigeführt und die der Zerlegung des Sulfit-Komplexes entgegengerichtete Wirkung der Sulfit-Ionen beseitigt. Das Abtreiben des Aldehyds wurde bis zum negativen Ausfall der qualitativen Acetaldehydreaktion in wenigen Tropfen des Destillates fortgesetzt. In aliquoten Teilen des Gesamtdestillates wurde nunmehr der Acetaldehyd nach der Methode von Ripper- v. Fürth durch 2 Kontrollanalysen ermittelt. Erhalten wurden (bezogen auf die Gesamtmenge der Kulturflüssigkeit):

bei Gäransatz 1 . .	0,106 g	Acetaldehyd,
bei Gäransatz 2 . .	0,081 g	„
bei Gäransatz 3 . .	0,510 g	„
bei Gäransatz 4 . .	0,336 g	„

Nach weiteren 48 Stunden wurde bei allen Ansätzen die 2. quantitative Bestimmung des Acetaldehyds vorgenommen. Es wurden — bei noch positiver Reaktion auf Traubenzucker — gefunden:

bei Gäransatz 1 . .	0,113 g	Acetaldehyd,
bei Gäransatz 2 . .	0,115 g	„
bei Gäransatz 3 . .	0,691 g	„
bei Gäransatz 4 . .	0,487 g	„

Die letzte quantitative Bestimmung des Aldehyds erfolgte bei allen Ansätzen nach weiteren 96 Stunden. Die ermittelten Werte waren hierbei die folgenden:

bei Gäransatz 1 . .	0,108 g	Acetaldehyd,
bei Gäransatz 2 . .	verloren	gegangen,
bei Gäransatz 3 . .	0,874 g	Acetaldehyd,
bei Gäransatz 4 . .	0,535 g	„

Nach dieser Zeit war in den Gäransätzen wie in der Kontrolle aller Traubenzucker nahezu verschwunden. In den Gegenproben

konnte während des ganzen Verlaufes der Versuche auch nicht die geringste Spur von Acetaldehyd nachgewiesen werden.

Der Ausfall der Versuche lehrte, daß wie bei allen gegen Alkali weniger empfindlichen Organismen das basisch reagierende, aber lösliche Na_2SO_3 dem unlöslichen neutralen CaSO_3 im Wirksamkeitsausmaße überlegen ist.

C. Isolierung des Acetaldehyds.

Um das Vorliegen von Acetaldehyd einwandfrei festzustellen, haben wir zwei größere Ansätze analog der Serie B vergoren, und zwar je 2 l Hefenwasser mit 10% Glucose und den erforderlichen Beigaben. Nach 8tägigem Stehen wurden die sulfithaltigen und -freien Gemische aufgearbeitet, wobei der Zucker noch nicht ganz restlos umgesetzt war.

Der Acetaldehyd wurde in der beschriebenen Weise in Freiheit gesetzt, durch zweimalige Destillation angereichert und mit einer alkoholisch-essigsäuren Lösung von p-Nitrophenylhydrazin niedergeschlagen. Das Hydrazon fiel sofort als dicker gelber Brei aus und wurde durch Umkrystallisieren in großer Menge analysenrein erhalten. F. 127,5–128°.

0,1507 g Substanz: 29,4 ccm N (14°, 772 mm)

$\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$ · Ber. N = 23,46; gef. N = 23,31%.

Die bei der Acetaldehydestillation hinterbliebene Flüssigkeit wurde von den Calcium- und Bariumsalzen abfiltriert und bei niedriger Temperatur weitgehend eingeeengt. Die restierende Salzmasse wurde mit absolutem Alkohol erschöpfend ausgezogen und der alkoholische Extrakt bei 40° verdampft, der Rückstand wieder mit Alkohol aufgenommen, filtriert, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet sowie fraktioniert. Dabei erzielten wir 0,9 g Acetoin und 1,7 g Butylenglykol.

Die Verarbeitung der sulfithfreien Kontrolle lieferte keine Spur Acetaldehyd, wohl aber 2,3-Butylenglykol und kleine Mengen β -Oxo- γ -oxybutan. Die Ausbeuten an beiden Butylabkömmlingen waren hier aber geringer als die englischen Autoren angaben, was mit der Variation des Bacteriums zusammenhängen dürfte; wir erhielten 1,4 g Acetylmethylcarbinol und 3,0 g Glykol. —

Wir haben uns nicht bemüht, günstigere Bedingungen der Aldehydabfangung durch Abänderungen in den experimentellen

Anordnungen ausfindig zu machen. Rund 5% des angewendeten Zuckers haben wir in Form von Acetaldehyd isolieren können.

Dieser Befund beweist, daß sicherlich auch beim Abbau des Zuckers durch den *B. lactis aerogenes* der Acetaldehyd eine Durchgangsstufe darstellt. Zugleich liefert dieses Ergebnis im Zusammenhange mit neuen Feststellungen an zahlreichen Pilzarten¹⁾, die — wie Aspergillen, *Monilia*, *Mucoraceen*, *Oidium* usw. — in Gegenwart sekundärer schwefligsaurer Salze reichlich Acetaldehyd aufspeichern, einen neuen Beitrag zu der Lehre, daß der Acetaldehyd bei mannigfachen Formen des Zuckerabbaus eine zentrale Stellung einnimmt und so im Haushalte der verschiedensten Organismen eine wichtige Rolle spielt.

¹⁾ Siehe die vorangehende Mitteilung.

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

M. Ascoli - Catania, L. Asher-Bern, G. Bertrand - Paris, A. Bickel - Berlin, F. Blumenthal - Berlin, A. Bonanni - Rom, F. Bottazzi - Neapel, G. Bredig - Karlsruhe i. B., A. Durlig - Wien, F. Ehrlich - Breslau, H. v. Euler - Stockholm, J. Feigl - Hamburg, S. Flexner - New York, J. Forssman - Lund, S. Fränkel - Wien, E. Freund - Wien, H. Freundlich - Berlin-Dahlem, E. Friedberger - Greifswald, E. Friedmann - Berlin, O. v. Fürth - Wien, G. Galeotti - Neapel, F. Haber - Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger - Groningen, P. Hári - Budapest, E. Hägglund - Åbo, A. Heffter - Berlin, V. Henri - Paris, V. Henriques - Kopenhagen, W. Heubner - Göttingen, R. Höber - Kiel, M. Jacoby - Berlin, A. Koch - Göttingen, F. Landolt - 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. Marchiewski - Krakau, P. Mayer - Karlsbad, J. Meisenheimer - Greifswald, L. Michaelis - Berlin, H. Molisch - Wien, J. Morgenroth - Berlin, E. Münzer - Prag, W. Nernst - Berlin, W. Ostwald - Leipzig, W. Palladin - St. Petersburg, W. Pauli - Wien, R. Pfeiffer - Breslau, E. P. Pick - Wien, J. Pohl - Breslau, Ch. Porcher - Lyon, P. Rona - Berlin, H. Sachs - Heidelberg, S. Salaskin - St. Petersburg, A. Scheunert - Berlin, N. Sieber - St. Petersburg, S. P. L. Sørensen - Kopenhagen, K. Spiro - Liestal, E. H. Starling - London, J. Stoklasa - Prag, W. Straub - Freiburg i. B., A. Stutzer - Königsberg i. Pr., K. Suto - Kanazawa, H. v. Tappeler - München, H. Thoms - Berlin, P. Trendelenburg - Rostock, O. Warburg - Berlin, W. Wiechowski - Prag, A. Wohl - Danzig, J. Wohlgemuth - Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg - Berlin

Hundertundzwölfter Band

Viertes bis sechstes Heft

Ausgegeben am 28. Dezember 1920



Berlin

Verlag von Julius Springer

1920

Die Biochemische Zeitschrift

erscheint in zwanglosen Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. Der Preis eines jeden Bandes beträgt M. 48.—. Die Biochemische Zeitschrift ist durch jede Buchhandlung sowie durch die unterzeichnete Verlagsbuchhandlung zu beziehen.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als 1½ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens 2 Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Redakteur, Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 13, zu richten.

Die Verfasser erhalten 60 Sonderabdrücke ihrer Abhandlungen kostenfrei, weitere gegen Berechnung. Für den 16 seitigen Druckbogen wird ein Honorar von M. 40.— gezahlt.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer

Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

112. Band.	Inhaltsverzeichnis.	4. 6. Heft.
		Seite
Hahn, Martin und Emil v. Skramlik.	Versuche mit Antigenen und Antikörpern an der überlebenden, künstlich durchströmten Leber. II. Mitteilung. Versuche mit Tetanustoxin	151
Löffler, Wilhelm.	Zur Kenntnis der Leberfunktion unter experimentell pathologischen Bedingungen	164
Olsen, O. und K. Goette.	Über Serumhämolyse und -lipolyse	188
Fränkel, Sigmund und Erik Schwarz.	Über wasserlösliche Vitamine und gärungsbeschleunigende Verbindungen. I. Mitteilung. Methodik der Bestimmung und Darstellung der gärungsbeschleunigenden Substanz aus Hefe und Reiskleie	203
Köhler, Erich.	Über Fermentbildung	236
Kochmann, Rudolf.	Über Schwefelwasserstoffbildung aus Sulfaten durch Faeces	255
Tröndle, A.	Neue Untersuchungen über die Aufnahme von Stoffen in die Zelle	259
Némec, Antonin.	Über Urikase im Samenorganismus. Vorläufige Mitteilung	286
Kochmann, M.	Quantitative Untersuchungen des Magnesium-, Kalk- und Bariumsulfat-Antagonismus	291
Atzler, Edgar und Fritz Richter.	Über die Wärmekapazität des arteriellen und venösen Blutes	310
Färber, E. und F. F. Nord.	Die phytochemische Reduktion des Acetols zu optisch-aktivem Propylenglykol. Nebst Bemerkungen und Versuchen zur Frage des Auftretens sowie der Verarbeitung von Racemkörpern bei Tier und Pflanze von C. Neuberg	313
Autorenverzeichnis		325

Versuche mit Antigenen und Antikörpern an der überlebenden, künstlich durchströmten Leber.

II. Mitteilung.

Versuche mit Tetanustoxin.

Von

Martin Hahn und Emil v. Skramlik.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 21. September 1920.)

Für die Pathogenese des Tetanus ist die Frage von besonderem Interesse, was mit dem in den Körper aufgenommenen Toxin zunächst geschieht. Selbst der Weg, den das Gift von seiner Eintrittsstelle bis zu seinem im Rückenmark gelegenen Angriffsort nimmt, ist noch nicht völlig sicher- und klargestellt.

Hier stehen einander zwei widerstrebende Theorien gegenüber; nach der einen, zuerst in den Arbeiten von Marie und Morax¹⁾ entwickelten, von Meyer und Ransom²⁾ später wieder aufgenommenen, wandert das Gift die peripheren Nerven entlang zum Rückenmark, während es nach der zweiten, von Zupnik³⁾ ⁴⁾ vertretenen, auf dem Blutweg dahin gelangt. Für alle Vorstellungen, die wir uns von dem Wege, den das Gift von dem Ort seines Eindringens zum Rückenmark nimmt, bilden können, ist sein Verhalten zu den Körpersäften und -zellen zweifellos von großer Bedeutung.

In einer Anzahl früherer Untersuchungen ging man vor allem darauf aus, die Anwesenheit des Giftes in der Blutbahn zu ermitteln. Nissen⁵⁾

¹⁾ V. Morax et A. Marie, Recherches sur l'absorption de la toxine tétanique. I. et II. Ann. de l'Inst. Pasteur 1902, S. 818; 1903, S. 335.

²⁾ H. Meyer und F. Ransom, Untersuchungen über den Tetanus. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 49, 369. 1903.

³⁾ L. Zupnik, Über experimentellen Tetanus descendens. Dtsch. med. Wochenschr. 1900, S. 837.

⁴⁾ L. Zupnik, Die Pathogenese des Tetanus. Dtsch. med. Wochenschr. 1905, S. 1999.

⁵⁾ F. Nissen, Über den Nachweis von Toxin im Blute eines an Wundtetanus erkrankten Menschen. Dtsch. med. Wochenschr. 1891, S. 775.

und Kitasato¹⁾ führten den Beweis, daß man durch Injektion des Blutes von tetanuskranken Menschen und Tieren bei Mäusen Tetanus erzeugen kann. Ferner wurde durch Knorr²⁾ und einige andere Forscher das Toxin im Blute nachgewiesen. Knorr hat dann weiter gefunden, daß es in kurzer Zeit aus dem Kreislauf verschwindet, eine Erscheinung, die er auf Bindung an die Organe zurückführte. Nahezu gleichzeitig veröffentlichte Dönitz³⁾ seine Versuchsergebnisse, durch die der Beweis geliefert wurde für die eminente Geschwindigkeit, mit der das Toxin aus dem Blut entfernt wird. Er machte auch interessante Angaben über die Mengen Antitoxin, die zur Erhaltung des Tieres injiziert werden mußten. Diese wachsen gewaltig mit der seit der Einführung des Giftes verflossenen Zeit. Systematische Untersuchungen über die zeitlichen Verhältnisse beim Verschwinden des Giftes aus der Blutbahn liegen hauptsächlich von Marie⁴⁾ vor, der 17 Stunden nach Injektion das Gift weder im Blut noch in den Organen nachzuweisen vermochte. Die Untersuchungen von Knorr, Dönitz und Marie sind an Kaninchen vorgenommen worden. Daß man in dieser Frage aus dem Verhalten einer Tierart nicht auf das einer anderen schließen dürfe, hat Blumenthal⁵⁾ gelehrt.

Injektion von Organextrakten tetanischer Tiere in die Blutbahn gesunder führte zu keinem einheitlichen Ergebnis. Unter 3 von 5 Fällen erzielten Courmont und Doyon⁶⁾ 7) auf diese Weise Erkrankung. Daß diese Versuche nicht beweiskräftig sind, hat Blumenthal gezeigt, der die gleichen Symptome mit nicht viel größeren Dosen von Organauszügen normaler oder mit anderen Giften vorbehandelter Tiere erzeugte. Das so hervorgerufene Krankheitsbild unterscheidet sich im übrigen sehr wesentlich von der gewöhnlichen Form des Tetanus. Injektion von Organauszügen tetanischer Tiere führt bei Versuchsmäusen zu typischem Tetanus, Einspritzung von gewöhnlichen Organauszügen führt zu einem Symptomenkomplex, in welchem klonische Krämpfe und Paraplegien vorherrschen, die also mit tetanischen Erscheinungen wenig gemein haben.

Zu bemerkenswerten Ergebnissen führten die Untersuchungen, bei denen das Verhalten des Tetanustoxins zu Emulsionen verschiedener

¹⁾ S. Kitasato, Experimentelle Untersuchungen über das Tetanusgift. Zeitschr. f. Hyg. 10, 267. 1891.

²⁾ Knorr, Habilitationsschrift Marburg 1895. Cit. n. Kraus-Levaditi, Handbuch der Immunitätsforschung.

³⁾ W. Dönitz, Über das Antitoxin des Tetanus. Dtsch. med. Wochenschr. 23, 428. 1897.

⁴⁾ A. Marie, Ann. de l'inst. Pasteur 1897, S. 591 sowie 1898, S. 91.

⁵⁾ F. Blumenthal, Über die Veränderungen des Tetanusgiftes im Tierkörper und seine Beziehungen zum Antitoxin. Dtsch. med. Wochenschr. 1898, S. 185.

⁶⁾ I. Courmont et M. Doyon, Mécanisme de production des contractures du tétanos. Arch. de physiol. 5, 64.

⁷⁾ I. Courmont et M. Doyon, Quelques points particuliers de la pathogénie des contractures du tétanos. Arch. de physiol. 5, 114. 1893.

Organe geprüft wurde. Hier sind vor allen die Arbeiten von Wassermann¹⁾ zu erwähnen, der gefunden hat, daß Gehirn, in schwächerem Grade auch Rückenmark, die Eigenschaft besitzen, Tetanusgift zu neutralisieren. Auch die Versuche von Asakawa²⁾ müssen angeführt werden, der am Huhn experimentierte, das bekanntlich gegen Tetanus immun ist. Durch Emulsionen von Hühnergehirn und -rückenmark wird das Gift festgehalten, von dem letzteren Organ freilich in geringerem Maße. Die Eigenschaft, das Toxin zu binden, fehlt dagegen nach Asakawa allen anderen untersuchten Organen (Blut, Leber, Niere, Milz und Muskulatur) völlig.

Es sind im wesentlichen also zwei Methoden, die man bisher angewandt hat, um über Schicksal, Wege und Angriffspunkte des in den Organismus aufgenommenen Giftes klar zu werden; einmal suchte man den Gehalt des Blutes an Toxin dauernd zu kontrollieren, andererseits die Giftigkeit des Toxins nach Zusatz von Organemulsionen zu prüfen. Beide Methoden sind nicht befriedigend. Verschwindet nämlich das Gift im Tierexperiment aus der Blutbahn, so weiß man noch nicht, ob es aus dem Körper entfernt oder in welchem Organ es verblieben ist; bei der zweiten Methode aber handelt es sich um Vorgänge, die nicht unbedingt mit denen im lebenden Gewebe zu identifizieren sind. Das Verhalten zu den Körperzellen kann man am reinlichsten und sichersten an einem überlebenden Organ verfolgen. Wir haben es uns daher zur Aufgabe gemacht, das Verhalten des Toxins in der überlebenden, künstlich durchströmten Leber zu verfolgen.

Eigene Untersuchungen.

Unsere Versuche wurden an der Meerschweinchenleber vorgenommen. Die Technik war dieselbe, die wir schon bei anderen Experimenten angewendet haben⁴⁾ und von dem einen von uns

¹⁾ A. Wassermann, Über eine neue Art von künstlicher Immunität. Berl. klin. Wochenschr. 1898, S. 4.

²⁾ A. Wassermann und T. Takaki, Über tetanusantitoxische Eigenschaften des normalen Zentralnervensystems. Berl. klin. Wochenschr. 1898, S. 5.

³⁾ N. Asakawa, Die Basis der natürlichen Immunität des Huhns gegen Tetanus. Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 24, 166. 1898.

⁴⁾ M. Hahn und E. v. Skramlik, Versuche mit Antigenen und Antikörpern an der überlebenden, künstlich durchströmten Leber. Biochem. Zeitschr. 98, 120. 1919.

ausführlich beschrieben wurde¹⁾. Das Tetanustrockengift war auf die übliche Weise dargestellt worden; 0,000 001 g reichten hin, um eine Maus von 20 g in 4 Tagen zu töten.

Wir haben uns indes nicht bloß darauf beschränkt, das Verhalten der künstlich durchströmten Leber zum Tetanusgift zu untersuchen, sondern haben auch den Erfolg einer Durchleitung von Tetanusantitoxin und Toxin-Antitoxin-Gemischen wechselnder Zusammensetzung studiert. Nach den Untersuchungen von Ehrlich und Madsen ist das Toxin kein einheitlicher Körper, sondern besteht zumindest aus zwei Komponenten, dem Lysin, das auf die roten Blutkörperchen wirkt und dem Spasmin, das zu den typischen Krämpfen Anlaß gibt. Schon die ersten Experimente hatten uns gelehrt, daß sich diese beiden Gifte im künstlichen Kreislauf durch die Leber verschieden verhalten. Es empfiehlt sich also eine gesonderte Behandlung.

1. Versuche mit Tetanolysin.

Zur Prüfung der Wirksamkeit des Lysins dienten Kaninchen- und Meerschweinchenblutkörperchen. Das geeignetste Objekt, die roten Blutkörperchen des Pferdes, stand uns zur Zeit nicht dauernd zur Verfügung. Wie aus der untenstehenden Tabelle I hervorgeht, unterscheiden sich die angeführten Blutkörperchenarten in ihrem Verhalten gegenüber dem Tetanolysin nur durch ihre Resistenz, die sich darin kundgibt, daß die Meerschweinchenblutkörperchen dem Gifte längere Zeit und auch in größerer Dosis widerstehen. Zur Erzielung der Hämolyse ist eine Komplettierung nicht erforderlich. Die Lösungsversuche wurden im Wasserbade stets bei einer Temperatur von 38° C angestellt, das Ergebnis nach 1^h abgelesen. Vorversuche hatten ergeben, daß sich in den nächsten 10—12^h an dem nach Ablauf 1^h gefundenen Resultat nichts Wesentliches mehr ändert.

Tabelle I²⁾.

Prüfung des Tetanusgiftes an Kaninchen- und Meerschweinchenblutkörperchen. Es bedeuten T.-G. das Tetanusgift, das stets in einer Verdünnung von 1 : 500 in Ringer-Lockelösung

¹⁾ E. v. Skramlik, Ein Apparat zur Durchströmung der Leber. Arch. f. d. ges. Physiol. 180, 1. 1920.

²⁾ Sämtliche Protokolle sind hier nur in abgekürzter Form wiedergegeben.

verwendet wurde. K.-Bl. und M.-Bl. Kaninchen- und Meerschweinchenblutkörperchen. Die Zahlen bedeuten ccm.

T.-G.	K.-Bl.	NaCl	Hämolyse	T.-G.	M.-Bl.	NaCl	Hämolyse
1,00	1,0	0,0	nach 3'	1,00	1,0	0,0	nach 20'
0,75	1,0	0,25	„ 3'	0,75	1,0	0,25	„ 25'
0,50	1,0	0,50	„ 6'	0,50	1,0	0,50	„ 50'
0,25	1,0	0,75	„ 13'	0,25	1,0	0,75	Spürchen n. 1 ^h
0,10	1,0	0,9	Küppchen n. 1 ^h	0,10	1,0	0,9	„ „ 1 ^h
0,075	1,0	0,925	0	0,075	1,0	0,925	0

Leitet man durch die Leber eines Meerschweinchens Tetanusgift in Ringerlösung in einer Verdünnung von 1 : 500, so zeigen kurze Zeit, etwa 2', später entnommene Proben, daß das Lysin zum größten Teil aus der kreisenden Flüssigkeit herausgenommen ist. 15' nach Beginn der Durchleitung enthält die durch die Leber hindurchgegangene Ringerlösung nachweislich keine Spur des Giftes. Von der Geschwindigkeit, mit der es an das Lebergewebe verankert wird, kann man sich durch folgende Überlegung eine Vorstellung machen. Bei dem in diesen Versuchsreihen angewendeten Stromvolumen von 1 ccm/sek. braucht die gesamte, zur Durchleitung bereitgestellte Flüssigkeit (100 ccm) genau 100", um einmal das Organ zu passieren. Wie oben angegeben, war nach 2' das Gift zum größten Teil der Durchströmungsflüssigkeit entnommen. Es genügt also tatsächlich der einmalige Kontakt von Gift und Lebergewebe zur Herbeiführung einer festen Bindung. Daß es sich dabei nicht bloß um eine Adsorption handelt, wird durch die Unmöglichkeit bewiesen, durch wiederholtes Ausspülen dem Organ das Gift wieder zu entreißen. In den Spülflüssigkeiten war keine Spur davon nachzuweisen. Die Abnahme des Giftes geht aus Tabelle II hervor.

Tabelle II.

Prüfung des Tetanusgiftes nach Durchgang durch die Leber (V. 2. vom 28. II. 1920). Die Bezeichnungen sind dieselben wie in Tabelle I. Verhalten vor dem Durchgang siehe Tabelle I.

Nach 5' Durchgang:				Nach 30' Durchgang:			
T.-G.	K.-Bl.	NaCl	Hämolyse	T.-G.	K.-Bl.	NaCl	Hämolyse
1,00	1,0	0,0	Spürchen	1,00	1,0	0,0	0
0,75	1,0	0,25	0	0,75	1,0	0,25	0
0,50	1,0	0,50	0	0,50	1,0	0,5	0
0,25	1,0	0,75	0	0,25	1,0	0,75	0
0,10	1,0	0,9	0	0,10	1,0	0,9	0

Die Feststellung, daß das Tetanolyisin mit solcher Schnelligkeit an das Lebergewebe gebunden und dann zäh festgehalten wird, legte den Gedanken nahe, zu untersuchen, wie sich das Gegengift beim Durchgang durch das Organ verhält. Leitet man durch die Leber Antitoxin in einer Verdünnung 1 : 50 — verwendet wurde das Präparat Höchst 4fach — so tritt wohl auch eine Verminderung ein, sie ist aber so geringfügig, daß man sie erst nach einstündigem Kreisen mit einiger Sicherheit nachzuweisen vermag, wie Tabelle III zeigt.

Tabelle III.

Verhalten des Antitoxins (Höchst 4fach), 1 : 50 mit Ringerlösung verdünnt, beim Durchgang durch die Leber (V. 5 vom 8. III. 1920). T.-G. bedeutet wieder Tetanusgift 1 : 500 in Ringerlösung, A. das durch die Leber gegangene Antitoxin, K.-Bl. Kaninchenblutkörperchen. Die Zahlen sind ccm.

Vor Durchgang:

T.-G.	A.	NaCl	K.-Bl.	Hämolyse
0,5	0,1	0,4	1,0	0
0,5	0,5 (1 : 500)	0,0	1,0	Spürchen
0,5	0,25 „	0,25	1,0	Spur
0,5	0,1 „	0,4	1,0	nach 18'

Nach 30' Durchgang:

T.-G.	A.	NaCl	K.-Bl.	Hämolyse
0,5	0,1	0,4	1,0	0
0,5	0,5 (1 : 500)	0,0	1,0	nach 1 ^h fast völlig
0,5	0,25 „	0,25	1,0	„ 8'
0,5	0,1 „	0,4	1,0	„ 3'

Nach 1^h Durchgang:

T.-G.	A.	NaCl	K.-Bl.	Hämolyse
0,5	0,1	0,4	1,0	nach 1 ^h fast völlig
0,5	0,5 (1 : 500)	0,0	1,0	„ 30' „ „
0,5	0,25 „	0,25	1,0	„ 6'
0,5	0,1 „	0,4	1,0	„ 6'

Die zahlenmäßige Feststellung, daß nach 30' Durchgang 0,1 ccm des im Verhältnis 1 : 50 mit Ringerlösung verdünnten Antitoxins noch 0,5 ccm des Tetanusgiftes (1 : 500) zu neutralisieren vermag, nach einer weiteren halben Stunde Kreislaufs aber nicht mehr, beweist nun natürlich nicht, daß eine Verminderung des Antitoxins auf etwa die Hälfte durch chemische

Bindung stattgefunden hat. Es könnte sich bei dieser im Vergleich zum Verhalten des Toxins so geringfügigen Abnahme vielmehr um Filtrations- oder Adsorptionswirkungen handeln.

Der Ausfall der beschriebenen Versuche, die Feststellung, daß das Tetanolyisin an das Lebergewebe verankert wird, während das Antitoxin mit diesem fast gar nicht reagiert, rückte die Frage in den Vordergrund, ob man den Leberzellen das von ihnen festgehaltene Gift durch sein Gegengift zu entreißen vermag. Bei diesen Experimenten mußte fortlaufend Toxin- wie Antitoxingehalt der kreisenden Flüssigkeit geprüft werden, denn man konnte immerzu damit rechnen, sowohl daß das Toxin durch sein Gegengift ausgeschwemmt, wie daß das Antitoxin durch das verankerte Gift festgehalten wird. Zahlreiche, über längere Zeit, bis zu drei Stunden, ausgedehnte Versuche, bei denen erst das Gift an die Zellen gebunden wurde (1^b), dann hinterher Antitoxinlösung (2^b) durchgeleitet wurde, haben nun gezeigt, daß man selbst durch einen großen Überschuß von Antitoxin dem Gewebe das Gift nicht zu entreißen vermag. Ebenso tritt keine Neutralisation im Organe ein; die Antitoxinlösung zeigt selbst nach stundenlangem Durchgange keine Verminderung ihres Gehalts. Das Ergebnis dieser Versuche zeigt, daß die Affinität des Giftes zu den Leberzellen eine viel größere ist, als zu seinem Gegengift.

Dieser Satz erfährt eine weitere Unterstützung durch Experimente, bei denen der Einfluß des Gewebes auf ein annähernd neutrales Gemisch von Toxin und Antitoxin festgestellt werden sollte. Unsere als neutral bezeichneten Gemische enthielten Antitoxin in geringem Überschuß. Leitet man eine solche Mischung durch die Leber, so kann man bereits nach 5' Durchgang eine Änderung der Zusammensetzung feststellen, und zwar auch dann, wenn die Bindung des Toxins an das Antitoxin vor Beginn der Durchleitung genügend lang ($\frac{1}{2}$ h bei 37° C) ermöglicht wurde. Das Antitoxin ist nunmehr in einem weit größeren Überschuß als ursprünglich vorhanden. Auch in diesem Falle wird also das Toxin an das Lebergewebe gebunden. Wir haben darin einen einfachen, aber nicht unwichtigen neuen Beweis dafür zu erblicken, daß Toxin und Antitoxin keine chemische Bindung eingehen, vielmehr nebeneinander bestehen, etwa wie Säure und Base in wässriger Lösung.

Tabelle IV.

Durchleitung eines annähernd neutralen Toxin-Antitoxin-gemisches durch die Leber. T.-G. bedeutet Tetanusgift 1 : 500 verdünnt. N.-M. die neutrale Mischung, die im Verhältnis 1 : 500 Tetanusgift und 1 : 150 Antitoxin (Höchst 4fach) in Ringerlösung gelöst enthält. K.-Bl. Kaninchenblutkörperchen. (V. 7 vom 12. III. 1920).

Nach 5' Durchgang durch die Leber:

N.-M.	T.-G.	NaCl	K.-Bl.	Hämolyse
0,5	0,0	0,5	1,0	0
0,5	0,1	0,4	1,0	nach 1 ^h Spur
0,5	0,2	0,3	1,0	„ 1 ^h fast vollständig
0,5	0,3	0,2	1,0	„ 6'
0,5	0,4	0,1	1,0	„ 3'
0,5	0,5	0,0	1,0	„ 2'

Nach 30' Durchgang durch die Leber:

N.-M.	T.-G.	NaCl	K.-Bl.	Hämolyse
0,5	0,0	0,5	1,0	0
0,5	0,1	0,4	1,0	Spürchen gelöst
0,5	0,2	0,3	1,0	Spur
0,5	0,3	0,2	1,0	„
0,5	0,4	0,1	1,0	„
0,5	0,5	0,0	1,0	Kuppe

Die gefundene größere Affinität der Körperzellen zum Gift hat indessen auch ihre Grenzen. Die Verhältnisse gestalten sich nämlich gleich anders, wenn man durch die Leber ein Toxin-Antitoxingemisch kreisen läßt, das einen großen Antitoxinüberschuß enthält, also z. B. in unserem Falle eine Mischung, die Toxin 1 : 500, Antitoxin 1 : 30 enthält. Bei dieser Versuchsanordnung werden vom Lebergewebe weder erhebliche Mengen von Toxin noch von Antitoxin festgehalten. Unsere Befunde (s. Tabelle V) stehen nur in einem scheinbaren Gegensatz zu den Ergebnissen von Dönitz¹⁾, der durch einen starken Antitoxinüberschuß einen Giftschutz zu erreichen vermochte und daraufhin auch behauptet hat, daß das Antitoxin den Geweben Toxin zu entreißen und so unschädlich zu machen vermag. Es ist vor allem hier zu beachten, daß die Giftmenge und die seit ihrer Einführung in den Organismus bis zur Neutralisation verfllossene Zeit in den Dönitzschen Versuchen von entscheidender Bedeu-

¹⁾ Siehe Fußnote 3 S. 152.

tung sind. Wir haben i. n. u. r die lytische Wirkung des Giftes hier geprüft und mußten deshalb mit Giftdosen arbeiten, die ungefähr das 1000fache der einfach tödlichen spastischen Dosis betragen, 2. aber wurde in unseren Versuchen das Antitoxin erst 1 Stunde nach Einführung der großen Giftmenge zur Durchströmung gebracht. Die Aussichten für eine Neutralisation des Giftes verschlechtern sich also hier durch die ungeheure Höhe der Giftdosis und durch Verzögerung der Einführung des Antitoxins.

Tabelle V.

Durchleitung eines Tetanustoxin- und -antitoxingemisches (M.) durch die Leber, das Antitoxin im Überschuß enthält. (V. 8 vom 15. III. 1920). M. enthält Toxin 1 : 500, Antitoxin 1 : 30 in Ringerlösung. Zur Austitrierung mußte M. noch 1 : 100 verdünnt werden.

Nach 5' Durchgang durch die Leber:

M.	T.-G.	NaCl	K.-Bl.	Hämolyse
0,5	0,5	0,0	1,0	0
0,4	0,5	0,1	1,0	Küppchen
0,3	0,5	0,2	1,0	Kuppe
0,2	0,5	0,3	1,0	Spur
0,1	0,5	0,4	1,0	nach 15'
0,0	0,5	0,5	1,0	„ 10'

Nach 30' Durchgang durch die Leber:

M.	T.-G.	NaCl	K.-Bl.	Hämolyse
0,5	0,5	0,0	1,0	Kuppe
0,4	0,5	0,1	1,0	Kuppe
0,3	0,5	0,2	1,0	Spur
0,2	0,5	0,3	1,0	fast vollständig nach 30'
0,1	0,5	0,4	1,0	nach 13'
0,0	0,5	0,5	1,0	„ 10'

Die beschriebenen Versuche haben gezeigt, daß das einmal an das Lebergewebe gebundene Toxin weder mechanisch, durch Ausspülung, noch durch das Antitoxin loszulösen ist. Es erhebt sich im Anschluß daran die Frage, ob es durch die Verankerung entgiftet ist oder noch irgendeine Wirkung, z. B. auf Blutkörperchen, zu äußern vermag. Zur Herbeiführung einer Entscheidung eignet sich am besten die Methode, die wir schon wiederholt bei früheren Versuchen mit Amboceptoren und Kobragift angewendet haben. Sie besteht darin, daß man nach längerer Ein-

wirkung der Giftlösung — in diesem Falle genügen etwa 15' zur vollständigen Bindung des Toxins — die entsprechende Blutkörperchenart durch die Leber kreisen läßt und das weitere Geschehen abwartet. Durchströmt man eine Leber, die das Toxin gebunden hält, mit einer 5 proz. Aufschwemmung von Kaninchen- oder Meerschweinchenblutkörperchen, so werden diese letzteren im Verlauf der nächsten 10' aus dem Kreislauf genommen. Gleich mit dem ersten Spritzenstoße, der die Blutkörperchen in die Leber treibt, bilden sich an deren Oberfläche rote Herde, die zuerst punktförmig sind, bei weiterem Kreisen der Aufschwemmung an Umfang aber ständig zunehmen. Man steht damit dem von uns früher beschriebenen Phänomen der Organbindung gegenüber¹⁾, das eine im Gewebe, und zwar in den Capillaren, vor sich gehende Agglutination²⁾ der Blutkörperchen darstellt. Die Schnelligkeit, mit der dieser Prozeß vor sich geht, wird am besten durch Zahlenbelege erwiesen. Bei Einführung der Aufschwemmung betrug in einem Versuch die Zahl der Blutkörperchen im cmm 321500, nach 5' Durchgang 155 500, nach weiteren 10' nur noch 7 500. Daß es sich um eine im Gewebe erfolgende Agglutination handelt, kann man auch durch retrograde Spülung einer solchen Leber feststellen, indem man Ringerlösung durch den proximalen Teil der Vena cava inferior einleitet, die dann zur Vena portae ausfließt und den verstopfenden Inhalt herausschwemmt. Untersucht man die ausgetretenen roten Gewebsetsen unter dem Mikroskop, so erweisen sie sich als agglutinierte, fest miteinander verbackene Blutkörperchen. Der eingetretenen Blutkörperchenagglutination folgt die Hämolysé in einem Zeitraum von längstens einer halben Stunde nach. Doch ist diese selten vollkommen; meist zeigt die kreisende Flüssigkeit nur eine rötliche Färbung, die indes als partielle Hämolysé wohl kenntlich ist. Als wichtiges Ergebnis geht aus dieser Versuchsreihe hervor, daß das Toxin durch seine Verankerung an das Lebergewebe noch durchaus nicht entgiftet ist, vielmehr seine Wirkungen auf Blutkörperchen noch zu äußern vermag. Unklar bleibt vorerst, wie diese zustände kommen können. Man

¹⁾ Siehe Fußnote 4 S. 153.

²⁾ Vgl. E. v. Skramlik und Th. Hünermann, Die überlebende, künstlich durchströmte Leber im histologischen Bild. Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. 11, 349. 1920.

wäre beinahe versucht, wie dem Kobragift auch dem Tetanustoxin Amboceptorennatur zuzuschreiben. Dem widerspricht vor allem, daß das Tetanustoxin zur Auflösung roter Blutkörperchen keines komplementierenden Körpers bedarf. Die Bindung des Lysins an das Lebergewebe bedeutet also jedenfalls noch keine Entgiftung für alle anderen Zellen. Es wäre denkbar, daß diese Verankerung durch eine Zellgattung wie die roten Blutkörperchen, welche scheinbar eine größere Affinität zum Lysin besitzen, wieder rückgängig gemacht wird. Daß der Hämolyse die Agglutination der roten Blutkörperchen vorangeht, ist ein neuer Beweis für die Richtigkeit der Bordetschen Ansicht, daß es sich dabei nur um verschiedene Stufen eines und desselben Vorganges handelt.

2. Versuche mit Tetanospasmin.

Alle bisher angeführten Befunde beziehen sich auf die Wirksamkeit des Tetanolytins; Gegenstand der weiteren Untersuchungen war das Verhalten der zweiten bekannten Komponente, des Tetanospasmins im künstlichen Kreislauf durch die Leber. Hierzu waren Tierversuche erforderlich, die an Mäusen vorgenommen wurden. Nach Ermittlung der einfach tödlichen Dosis (sie betrug, wie schon oben angegeben, 0,000001g für 20 g Maus) wurde den Tieren das entsprechend verdünnte Gift vor und nach Durchgang durch die Leber injiziert. Wie nach früheren Untersuchungen zu erwarten war, ergaben sich auch hier wieder erhebliche Unterschiede zwischen den Komponenten. Während das Tetanolytin beim Durchleiten durch die Leber in seiner Wirksamkeit mindestens um das Hundertfache geschwächt wird, ergaben die Tierversuche (s. Tabelle VI), daß die Menge des Tetanospasmins im künstlichen Kreislauf nicht einmal auf die Hälfte sinkt. Man kann also wohl sagen, daß eine erhebliche Bindung von Tetanospasmin durch das Lebergewebe nicht stattfindet.

Tabelle VI.

Tierversuch V. 11 vom 16. VI. 1920. Injektion von Tetanustoxin 1 : 500 entsprechend weiter verdünnt, und zwar auf $\frac{1}{500}$ und $\frac{1}{2000}$ vor und nach 1 stündigem Durchgang durch die Leber.
 Maus I: Gewicht 20 g, erhält 1 ccm $\frac{1}{500}$ Gift vor Durchgang. Stirbt nach 4 Tagen,
 .. II: Gewicht 20 g, erhält 1 ccm $\frac{1}{2000}$ Gift vor Durchgang. Stirbt nach 5 Tagen,

- Maus III: Gewicht 19 g, erhält 1 ccm $\frac{1}{800}$ Gift nach 1^h Durchgang. Stirbt nach 4 Tagen,
 „ IV: Gewicht 20 g, erhält 1 ccm $\frac{1}{2000}$ Gift nach 1^h Durchgang. Stirbt nach 5 Tagen als letzte.

Das gefundene Ergebnis, nämlich die erheblich geringere Bindung des Tetanospasmins durch Lebergewebe spricht aber nicht nur für die Verschiedenheit der beiden Gifte, sondern auch für eine elektive Bindungsfähigkeit der verschiedenen Körperorgane, wie sie in der starken Beeinflussung des Zentralnervensystems durch das Spasmin am deutlichsten zum Ausdruck kommt.

Kehren wir nun zu der ursprünglich aufgeworfenen Frage nach der Bahn zurück, die das Gift von seiner Eintrittsstelle zum Angriffspunkt im Rückenmark durchläuft, so lehren unsere Versuchsergebnisse, daß die beiden hierfür aufgestellten Theorien einander gar nicht ausschließen. Der ausschlaggebende Giftteil, das Tetanospasmin, kann seinen Weg sowohl über die peripheren Nerven als auch auf der Blutbahn nehmen. Soweit man aus den bisherigen Resultaten mit der durchströmten Leber schließen darf, wird es dabei durch die Zellen anderer Organe nicht aufgehalten. Nehmen auch noch andere Gewebe als nur Nerven, wie z. B. die Leber das Toxin in Beschlag, so bedeutet dies nur eine elektive Tätigkeit, die sich auf das Lysin allein beschränkt. Endgültigen Aufschluß über die hier vorliegenden sehr verwickelten Verhältnisse werden aber erst weitere Untersuchungen an anderen Organen, vor allem an der Milz, erbringen müssen. Jedenfalls ist durch die vorliegende Arbeit gezeigt worden, daß auch diejenigen Organe, welche nicht unmittelbar an der Erzeugung des Krankheitsbildes beteiligt sind, sich dem Gift gegenüber nicht nur passiv verhalten. Haben doch unsere Versuche ergeben, daß durch die Leber elektiv eine Giftkomponente zum großen Teil, die andere nur in sehr geringem Maße gebunden wird, ebenso, daß das Festhalten des Lysins noch keine Entgiftung bedeutet.

Zusammenfassung.

1. Das Tetanolysin besitzt eine große Affinität zum Lebergewebe. Im künstlichen Kreislauf wird es sofort von der Leber gebunden und kann nicht einmal durch nachträgliche Durch

strömung mit großen Mengen seines Gegengiftes dem Gewebe entrissen werden. Das Maß dieser Verwandtschaft des Toxins zu Körperzellen geht weiter daraus hervor, daß nur ein großer Überschuß von Antitoxin in Toxin-Antitoxingemischen den Eintritt der Bindung verhütet. Diese Tatsache ist darum von besonderem Interesse, weil hier auf einem neuen Wege die alte Erfahrung bestätigt wird, daß allein große Dosen von Antitoxin imstande sind, das Gift im Körper unschädlich zu machen.

2. Selbst in gebundenem Zustande kann das Lysin auf andere Körperzellen schädigend wirken. Rote Blutkörperchen werden beim Durchgang durch eine solche Leber agglutiniert und nach Verlauf einiger Zeit auch aufgelöst. Die Bindung bedeutet also keine Entgiftung.

3. Das Tetanospasmin wird geradeso wie das Antitoxin in keinem erheblichen Maße vom Lebergewebe festgehalten. Die elektive Bindungsfähigkeit dieses Organs beweist von neuem die Zusammensetzung des Tetanustoxins aus zwei verschiedenen Komponenten.

Zur Kenntnis der Leberfunktion unter experimentell pathologischen Bedingungen.

Von
Wilhelm Löffler.

(Aus dem Laboratorium der medizinischen Klinik Basel.)

(Eingegangen am 23. September 1920.)

Während die ausgedehnte Anwendung überlebender, künstlich durchströmter normaler Organe die Physiologie des intermediären Stoffwechsels mit zahlreichen grundlegenden Tatsachen bereichert hat, ist die Erforschung pathologisch veränderter, isolierter Organe zur Klärung des krankhaft gestörten Stoffwechsels in weit geringerem Maße herangezogen worden. Wenn auch die am Menschen beobachteten Stoffwechselstörungen sich häufig am Tier nicht in gleicher Weise erzeugen lassen, so erscheint es doch für die Erkenntnis des krankhaften intermediären Stoffwechsels von Bedeutung, den Verlauf bekannter biochemischer Reaktionen unter den veränderten Bedingungen des künstlich, in bestimmter, wenn möglich abgestufter, Weise geschädigten Organs zu verfolgen.

Untersuchungen an überlebenden, experimentell unter pathologische Bedingungen gebrachten Organen sind allerdings schon bald nach Ausbildung des Verfahrens der künstlichen Durchblutung von den Schulen Hofmeisters und Schmiedebergs durchgeführt worden. Die Versuche betrafen hauptsächlich das Oxydationsvermögen der überlebenden Lunge: Jaquet¹⁾ konnte zeigen, daß die oxydative Fähigkeit der Lungen gegenüber Salicylaldehyd und Benzylalkohol weder durch Gefrieren des Organs und nachheriges Wiederauftauen, noch durch Vergiftung mit Chinin oder Carbolsäure, noch durch Härten des Organs mit Alkohol aufgehoben wird. Auch nach Zusatz von Phosphor zur Durchströmungsflüssigkeit konnte Hauser²⁾ noch ausgiebige Oxydation von Salicylaldehyd nachweisen. Die Hippursäurebildung aus Glykokoll und Benzoe-

¹⁾ Jaquet, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **29**, 386.

²⁾ Hauser, ib. Bd. **36**, S. 165. 1895.

säure in der überlebenden Niere wurde dagegen durch Zusatz nativen Phosphors zum Durchströmungsblut erheblich gehemmt, während schon Bunge und Schmiedeberg gezeigt hatten, daß das bloße Aufbewahren einer Niere während 2 mal 24 Stunden im Eisschrank die Fähigkeit des Organs, die Hippursäuresynthese zu bewerkstelligen, nicht aufgehoben hatte. Bei der Hippursäurebildung handelt es sich um eine Anhydrierung, die *in vitro* erst bei hoher Temperatur unter Druck erfolgt, im Gegensatz zu der auch außerhalb des Tierkörpers viel leichter vor sich gehenden, rein oxydativen Umwandlung von Benzylalkohol und Salicylaldehyd. Für das Zustandekommen dieser Reaktionen ist in Anbetracht der zum Teil sehr schweren destruktiven Schädigung der Lungen eine eigentliche Zellfunktion nicht mehr anzunehmen, während offenbar die Hippursäurebildung Zelltätigkeit voraussetzt, die schon durch Schädigungen aufgehoben wird, welche die reinen Oxydationsreaktionen noch nicht beeinflussen.

Es läßt sich danach aus dem Verhalten des in geeigneter Weise geschädigten Organs ein Rückschluß auf die Natur der in Frage stehenden Reaktion ziehen; d. h. der Verlauf einer bekannten Reaktion am kranken Organ kann Aufschluß darüber geben, inwieweit es sich um einen Prozeß handelt, der nur dank der großen Oberfläche, die das Capillarsystem eines Organs bietet, bei der Durchströmung gewissermaßen katalytisch beschleunigt wird, oder ob eine spezifische Zellfunktion für das Zustandekommen der Reaktion notwendig ist, also eine biochemische Reaktion im eigentlichen Sinne vorliegt.

In eingehenden Untersuchungen hat Warburg¹⁾ das Verhalten isolierter Zellen (Seegeleier) unter normalen und experimentell pathologischen Verhältnissen studiert und dabei sein Hauptaugenmerk auf die Oxydationsreaktionen (Atmung) der isolierten Zellen gerichtet. Wichtige Reaktionen des intermediären Stoffwechsels lassen sich nun an isolierten Zellen häufig nicht mehr beobachten, und wir sind für die Verfolgung ihres Verlaufes auf das isolierte Organ in seiner Gesamtheit angewiesen, dabei muß unterschieden werden zwischen der eigentlichen Zellstruktur und dem Gefüge der Zellen, einer Struktur höherer Ordnung, bedingt durch gegenseitige Anordnung der Zellen, ihre Beziehungen zu den Capillaren, zu den Ausführungsgängen usw. Wir müssen uns in jedem Fall die Frage vorlegen: stellt eine gegebene Reaktion im überlebenden Organ, gleich wie die Oxydationsbeschleunigung in isolierten Zellen, eine Katalyse dar, und welcher Art ist diese Katalyse? Wenn wir Warburg in seinen Anschauungen über die Oxydationsprozesse in Zellen folgen, so sind dabei 2 Arten von Katalyse zu einem einheitlich funktionierenden Mechanismus verkettet, nämlich eine rein chemische Katalyse und eine mehr physicochemische. Die erstere würde bedingt durch oxydationsbeschleunigende Substanzen innerhalb der Zellen, die letztere wäre an eine besondere Anordnung der Substanzen in der Zelle, also an die Struktur der Zelle gebunden. Als Definition der Zellstruktur verstehen wir nach Warburg:

¹⁾ Warburg, Ergebnisse der Physiologie S. 253. 1914. Dasselbst auch Literatur.

„Die Forunen, an die die mechanische Zellarbeit gebunden ist.“ Wir nehmen an, daß der Ablauf geordneter biochemischer Reaktionen an die Zellstruktur gebunden sei. Durch Zerstörung der Struktur werden derartige Reaktionen in weitgehender Weise abgeschwächt oder aufgehoben, so z. B. besitzt der Hefepreßsaft nur noch wenige Prozente der Gärkraft lebender Hefen. Nach Zerstörung der Zellstruktur kommt ausschließlich die rein chemische Katalyse zur Wirkung.

Der Verlauf biochemischer Reaktionen unter pathologischen Bedingungen ist für die überlebende Leber erst in neuerer Zeit studiert worden, und zwar fast ausschließlich solcher Reaktionen, die den Kohlehydratstoffwechsel betreffen. Wertvolle Ergebnisse für die Auffassung pathologisch veränderter intermediärer Stoffwechselvorgänge sind dabei gewonnen worden. Es handelt sich um Leberschädigungen bei Phosphor- und bei Phloridzinvergiftung der Versuchstiere, und es wurde das Verhalten der isolierten Lebern dieser Tiere verglichen mit demjenigen der Lebern pankreatektomierter Hunde. Es ergaben sich folgende Feststellungen:

a) für die Leber phosphorvergifteter Tiere:

1. Keine Milchsäurebildung, 2. Hemmung des Fettabbaues in den höheren Stufen, 3. normale Verbrennung von Butter- und Isovaleriansäure und von Dioxyceton, 4. keine Verminderung des Sauerstoffbedarfes (Isaak).

b) Für die Leber phloridzinvergifteter Tiere:

1. Keine Milchsäurebildung (Isaak), 2. Glykogenbildung aufgehoben (Barrenscheen), 3. Zuckerbildung aus Milchsäure erhalten (Baltes und Silberstein), 4. Zuckerbildung aus Milchsäure, Glycerinsäure, Glykolaldehyd erhalten (Barrenscheen).

c) Leber pankreatektomierter Tiere:

1. Keine Milchsäurebildung (Isaak), 2. Glykogenbildung aufgehoben (Barrenscheen), 3. Glykogenbildung aus Fructose gelegentlich erhalten (Embden), 4. Umwandlung von Milchsäure in Glucose erfolgt leicht unter Ansteigen der Blutzuckerwerte, 5. gesteigerte Acetonkörperbildung.

Diese kurze Zusammenstellung zeigt, daß einzelne biochemische Reaktionen der Leber durch pathologische Veränderungen aufgehoben werden, während andere Vorgänge unbeeinflusst bleiben. Besonders hervorzuheben ist der Umstand, daß die Phosphorvergiftung des Tieres die oxydativen Leistungen der Leber nicht beeinträchtigt, daß aber Spaltungen, wie z. B. die Umwandlung von Glucose in Milchsäure, aufgehoben sind. In der maximal verfetteten Leber mit Phloridzin vergifteter Tiere ist neben dem Abbau der Glucose zu Milchsäure auch der Aufbau von Glykogen aus Glucose und aus Zuckerbildern in ähnlicher Weise gestört wie in der Leber pankreasdiabetischer Hunde; die Glucosebildung aus Milchsäure, Glycerinsäure, Glycerin und

Glykolaldehyd ist dagegen erhalten. Bei einer Leberschädigung bestimmter Art sind also gewisse Funktionen im Kohlehydratstoffwechsel aufgehoben, während andere ungestört weiter verlaufen.

Im Gegensatz zu dieser schon recht vielseitigen Bearbeitung des Kohlehydratstoffwechsels in der künstlich geschädigten Leber, wurde der Rolle dieses Organes im Eiweißstoffwechsel unter pathologischen Bedingungen viel weniger Aufmerksamkeit geschenkt. Von den hier in Betracht kommenden Funktionen verdient die Harnstoffbildung in erster Linie Beachtung, denn sie stellt eines der wichtigsten und bestbekanntesten Glieder dar in der lebenswichtigen Aufgabe der Leber, die Eiweißumsetzung im Organismus zu regeln.

Aus dem Jahre 1914 liegt eine Arbeit von Fiske und Karsner¹⁾ vor, in der gezeigt wird, daß die Fähigkeit der überlebenden Leber, Ammoniak umzuwandeln nach Vergiftung der Versuchstiere mit Phosphor, Chloroform, Äther, Hydrazinsulfat, Phloridzin und hämolytischem Immuneserum nicht beeinträchtigt wird, daß aber die Fähigkeit der Leber, Ammoniak zum Verschwinden zu bringen, durch reichliche Versorgung des Durchströmungsblutes mit Sauerstoff gesteigert werden kann.

In meinen Untersuchungen über die Harnstoffbildung in der überlebenden, künstlich durchbluteten Säugetierleber²⁾ konnte ich den auffallenden Befund erheben, daß die Leber selbst bei Gegenwart freier Säure in der Durchströmungsflüssigkeit die Harnstoffbildung aus Ammoniumsalzen nicht einstellt, eine Tatsache, die die weitgehende relative Unabhängigkeit des Prozesses von der H⁺-Ionenkonzentration beweist.

Einzig die Versuche von Rumpf³⁾, die unter Leitung des Verfassers im Laboratorium der hiesigen med. Klinik ausgeführt worden sind, sprechen dafür, daß unter gewissen pathologischen Verhältnissen, so bei anaphylaktischem Schock die Harnstoffbildung in der isolierten überlebenden Leber aufgehoben werden kann.

Auf Grund dieser Feststellungen schien zunächst die Frage angezeigt, ob bei der Harnstoffbildung in der Leber überhaupt eine spezifische Zelltätigkeit vorliegt, oder ob es sich im überlebenden Organ einfach um einen Vorgang handelt, der durch die sehr günstigen Oxydationsbedingungen im Capillarsystem der Leber erheblich beschleunigt wird. Dieser Gedanke drängt sich auf in Anbetracht der erheblichen Harnstoffbildung

¹⁾ Journ. of Biolog. Chem. 18, 381. 1914.

²⁾ Diese Zeitschr. 85, 230—94. 1918.

³⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforschung Orig. 27, 489. 1918.

bei sauer reagierender Durchströmungsflüssigkeit. Der Umstand, daß bis jetzt eine Harnstoffbildung aus Ammoniumsalzen und anderen Stickstoffverbindungen unter dem Einfluß von Leberbrei in vitro nicht beobachtet werden konnte, spricht zwar zugunsten der Auffassung, daß der Integrität der Zellen und des Zellverbandes bei der Harnstoffbildung eine Rolle zukommt; das Experimentum crucis, die Prüfung der Harnstoffbildung in der anatomisch erhaltenen, in ihrer Zelltätigkeit aber gestörten Leber ist jedoch noch nicht systematisch verfolgt worden. Chemische Reaktionen könnten an der großen Oxydationsfläche, die die Lebercapillaren bieten, in einer Weise ausgelöst oder beschleunigt werden, daß eine merkliche Harnstoffbildung nur auf die eigentümlichen Verhältnisse der Organstruktur zurückgeführt werden könnte.

Es ergibt sich danach die Fragestellung: Lassen sich pathologische Schädigungen irgendwelcher Art in der Leber herbeiführen, durch die die Fähigkeit des Organs, aus Ammoniumsalzen Harnstoff zu bilden, gehemmt oder aufgehoben wird? Es ist dies eine Frage, die auch in klinischer Hinsicht für die Bewertung der „Leberinsuffizienz“ von Bedeutung ist.

Die Leberfunktion wurde am künstlich durchströmten überlebenden Organ untersucht.

Als Methode der Leberschädigung kamen Vergiftungen, sei es des ganzen Tieres, sei es des isolierten Organs in Anwendung. Das zuletzt genannte Verfahren bietet den Vorteil, daß ein und dieselbe Leber zunächst unter physiologischen und anschließend daran unter pathologischen Bedingungen untersucht werden kann.

Für die Vergiftungen dienten folgende Substanzen:

A. Vergiftung des Versuchstieres mit Phosphor.

B. Vergiftung der isolierten überlebenden Leber 1. mit Alkohol, 2. mit Chloroform, 3. mit Nicotin, 4. mit Kaliumcyanid.

Die Wahl der Gifte ergab sich für Phosphor aus der Tatsache der schweren anatomischen Leberschädigung bei der Phosphorvergiftung. Alkohol und Chloroform kamen in erster Linie als Narkotica (lipoidlösliche Gifte) in Betracht, Nicotin für die Ausschaltung des vegetativen Nervensystems, endlich Kaliumcyanid als „Fermentgift“.

Folgende Resultate wurden erhalten:

1. Ein hemmender Einfluß der Phosphorvergiftung des Tieres auf die Harnstoffbildung in der überlebenden Leber konnte trotz starker Verfettung des Organs nicht festgestellt werden, wie auch auf Grund der Resultate Isaaks¹⁾ sowie Fiske und Karsners²⁾ zu erwarten gewesen war.

Die Ergebnisse am überlebenden Organ stimmen mit den Beobachtungen am Menschen bei Phosphorvergiftung gut überein, indem weder Badt, noch Münzer, noch Laub³⁾ bei derselben eine irgendwie erhebliche Herabsetzung der Harnstoffausscheidung beobachten konnten. Eine geringe Vermehrung der Ammoniakausscheidung erwies sich bedingt durch vermehrte Säurebildung im Organismus und ließ sich durch Zufuhr von Natriumbicarbonat stark zurückdrängen.

Die Leber eines an Phosphorvergiftung spontan zugrunde gegangenen Hundes bildet jedoch [im Gegensatz zu der längere Zeit (bis 7^h) auf Eis aufbewahrten normalen Leber] aus der Durchströmungsflüssigkeit zugesetztem Ammoniumcarbonat keinen Harnstoff mehr (Versuch 3).

Diese Feststellung ist von Interesse im Hinblick auf die Beobachtungen Jacobys⁴⁾, daß in der Leber phosphorvergifteter Tiere die postmortale Autolyse viel stärker ist als unter normalen Bedingungen; Verhältnisse, die Fischler⁵⁾ auch bei maximaler Phosphorvergiftung intra vitam bestätigen konnte, indem die Galle solcher Versuchstiere tryptisches Ferment enthielt. Fischler faßt diese Erscheinungen, die nur bei fast letaler Vergiftung erzielt werden können, auf als Versagen der Leberfunktion, bei der die im Organ angehäuften Fermente das Organ selbst zerstören.

2. Alkoholzusatz bis zu 5,5 Vol.-% der Durchströmungsflüssigkeit (Versuch 4—13) hebt das Harnstoffbildungsvermögen der Leber nicht auf. In einigen Versuchen tritt zwar unter der Alkoholwirkung eine geringere Harnstoffneu-

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie 100, 54.

2) Fiske und Karsner, Journ. of Physiol. Chem.

3) Zit. nach v. Noorden, Handb. d. Path. d. Stoffwechsels, 2. Aufl. II, S. 738.

4) Jacoby, Zeitschr. f. physiol. Chemie 30, 149. 1900.

5) Fischler, Physiologie und Pathologie der Leber. Springer 1916.

bildung ein als in den Vorperioden, doch ist dieser Rückgang nicht erheblich größer als der bei langdauernden Versuchen schon spontan erfolgende. Bei einem Alkoholgehalt der Durchströmungsflüssigkeit von 11% (Versuch 14) sistiert die Harnstoffbildung nach etwa einer halben Stunde.

Mit 11% Äthylalkohol kommen wir der Grenzzone sehr nahe, an der nach Spiro¹⁾ durch Äthylalkohol Eiweißfällung hervorgerufen wird. Ja wir haben dieselbe bei Berücksichtigung der Temperatur der Durchströmungsflüssigkeit von 38—40° wohl schon überschritten.

(Eine in den ersten Versuchen bei niedriger Alkoholkonzentration der Perfusionsflüssigkeit zunächst beobachtete Hemmung erwies sich als bedingt durch mangelhafte Arterialisierung des durchströmenden Blutes wegen Veränderung der physikalischen Beschaffenheit der Durchströmungsflüssigkeit durch den zugesetzten Alkohol.)

Die Resultate stehen in Einklang mit den klinischen Beobachtungen über die Alkoholwirkung auf die Leber. Es unterliegt keinem Zweifel, daß die chronische Alkoholintoxikation einen wesentlichen Faktor in der Genese der Lebercirrhose darstellt. Bei der Cirrhose ist nun die Harnstoffbildung in der Leber nicht gestört. Die leichte Verminderung der Harnstoffausscheidung zugunsten einer vermehrten Ammoniakausscheidung läßt sich nach Münzer²⁾ durch Zufuhr von Natrium bicarbonicum beheben. Es liegt also vermehrte Ammoniakausscheidung vor, bedingt ebenfalls durch abnorme Säurebildung und nicht durch verminderte Harnstoffsynthese; bestätigend haben die Versuche von Weintraud³⁾ sowie von Rumpf und Kleine⁴⁾ erwiesen, daß bei schwerster Cirrhose große Ammoniakmengen restlos in Harnstoff übergeführt werden.

Eine toxisch bedingte Beeinträchtigung der Harnstoffbildung am gesamten Tier läßt sich nur bei schwerster akuter experimenteller Vergiftung mit Äthylalkohol nachweisen. Auch durch Methylalkoholvergiftung wird die Harnstoffausscheidung herabgesetzt, doch liegen die Verhältnisse weniger eindeutig wegen der

¹⁾ Spiro, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 300.

²⁾ Münzer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 33, 164.

³⁾ Ibid. 32.

⁴⁾ Zeitschr. f. Biol. 34, 91.

Wirkung der gleichzeitig entstehenden, schwer verbrennlichen Ameisensäure.

Eine Beeinflussung der Leberfunktion durch Alkohol erschien daher für unsere Zwecke ein wenig geeignetes Mittel, indem a kut eintretende Schädigungen des Organs beabsichtigt waren. Der Nachweis der Resistenz des Harnstoffbildungsvermögens der isolierten Leber dem Alkohol gegenüber ist ebenso auffallend, wie der früher erhobene Befund der Fortdauer einer Harnstoffbildung bei sauer reagierender Durchströmungsflüssigkeit.

Diese führte zur Frage, ob überhaupt nur destruktive Einwirkung auf die Leber die Funktion der Harnstoffbildung aufzuheben imstande seien. Deshalb wurde schwerste Schädigung der Zellstruktur mittels Durchleiten konzentrierten Alkohols erzeugt.

Durch diesen Eingriff wurde nun die Harnstoffbildung sofort aufgehoben. Es schien damit auch für die überlebende Leber die alte Feststellung Liebleins¹⁾ zu gelten, daß die Leber abstirbt, bevor ihre harnstoffbildende Fähigkeit aufgehoben ist, daß also der Zelltod Vorbedingung für das Sistieren dieser Funktion darstellt.

3. Deshalb wurde versucht, durch Chloroform eine Narkose der Leberzellen und damit Schädigung ihrer Funktion herbeizuführen durch einen Eingriff, der ungleich weniger schwer ist als die Behandlung des Organs mit konzentriertem Alkohol. Durch mäßige Mengen von Chloroform wurde die Harnstoffbildung nur wenig gehemmt, durch größere Mengen dagegen sofort und dauernd aufgehoben. Die vollständige Unterdrückung der Harnstoffbildung unter starker Chloroformwirkung zeigt in gleicher Weise wie der Versuch mit konzentriertem Alkohol die Unentbehrlichkeit der Zellfunktion für die Harnstoffbildung.

Als zweiter Faktor von großer Bedeutung für die Harnstoffbildung ergab sich die Größe der Sauerstoffzufuhr (Versuche Nr. 12, 13). Sauerstoffmangel wirkt deutlich hemmend auf die Harnstoffbildung. Die Leberzellen selbst sind allerdings für Sauerstoffmangel nicht sehr empfindlich, wie schon aus der Beobachtung Salomons²⁾ hervorgeht, daß eine Leber auch nach

¹⁾ Lieblein, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 33, 318.

²⁾ Salomon, Virchows Archiv 97, 149.

Aufbewahrung während 7 Stunden auf Eis ihr Harnstoffbildungsvermögen behalten hat; einen ähnlichen Befund konnte ich selbst erheben¹⁾. Vorübergehender Sauerstoffmangel bedingt demnach, wenigstens wenn kürzere Versuchszeiten in Frage kommen, keine dauernde schwere Schädigung der Leberzellen, wohl aber bedeutet Sauerstoffmangel Abwesenheit einer für den Reaktionsverlauf der Harnstoffbildung unentbehrlichen Komponente.

4. Um einen etwaigen Einfluß des vegetativen Nervensystems festzustellen, wurde die Leber durch Zusatz von Nicotin zur Durchströmungsflüssigkeit zu beeinflussen gesucht. Eine erhebliche Abnahme der Harnstoffbildung trat dabei nicht ein.

5. Die wohl berechtigte Auffassung der Blausäurevergiftung als „innere Erstickung“ der Organe trotz Gegenwart überschüssigen Sauerstoffes (Gähtgens, Geppert) machen diese Vergiftung besonders geeignet zum Studium des Mechanismus der Harnstoffbildung. Durch die Blausäurevergiftung müßte es gelingen, ohne tiefgreifende Alteration des Gewebes eine Hemmung der Oxydation hervorzubringen. Dadurch würde vor allem die oxydative Komponente in der Harnstoffbildung zur Ausschaltung gebracht.

Während die Bedeutung des oxydativen Momentes für die Harnstoffbildung allgemein anerkannt ist und auch in diesen Versuchen wiederum die deutliche Beeinträchtigung der Harnstoffneubildung unter Sauerstoffmangel hervortritt, herrscht über die Art der Wirkung des oxydativen Faktors keine allgemeine Übereinstimmung. Betrachtet man die Harnstoffbildung mit Salkowski als Umlagerung von Ammoniumcyanat in Harnstoff, so muß die an der Reaktion beteiligte Cyansäure im Organismus auf oxydativem Wege entstanden sein und ebenso der Ammoniak, der durch oxydative NH_2 -Abspaltung aus Aminosäure oder Aminen zur Verfügung gestellt wird. Faßt man die Reaktion mit Hofmeister allgemeiner und wird der Harnstoff als Produkt einer Vereinigung oxydativ entstandener $-\text{CONH}_2$ -Gruppen und ebenfalls oxydativ entstandener $-\text{NH}_2$ -Gruppen betrachtet, so wird ebenfalls die Wichtigkeit des oxydativen Momentes hervorgehoben. Der Übergang von Ammonium-

¹⁾ Löffler, diese Zeitschr. 85, 250. 1918.

carbonat in Harnstoff durch Wasserabspaltung, wie ihn Schmie-
debergs Theorie verlangt, stellt nun zwar keine oxydative Reak-
tion dar, man könnte sich aber wohl vorstellen, daß die zur Reak-
tion notwendige Energie durch Oxydation irgendwelcher Ver-
bindungen in der Zelle geliefert würde. Daß diese Reaktion unter
bestimmten Bedingungen auch in vitro ohne nachweisbare Er-
wärmung stattfindet, jedoch der Energiezufuhr bedarf, haben
erst neuerdings Fichter¹⁾ und seine Mitarbeiter bei der Ver-
folgung der elektrolytischen Harnstoffbildung gezeigt.

Die Versuche einer Lebervergiftung durch Kaliumcyanid
ergaben nun zum erstenmal den Nachweis einer starken aber
zugleich reversiblen Hemmung der Harnstoffbildung.

Während das aus der Leber ausfließende Blut unter normalen
Bedingungen als Zeichen einer starken Desoxydation intensiv
blau venös gefärbt ist, fließt es bei der Cyanwasserstoffvergiftung
ebenso hellrot arteriell aus der Leber aus, wie es eingeflossen ist.
Es handelt sich also um eine Oxydationshemmung in den Zellen
in dem Sinne, daß die Aufnahme des Sauerstoffs durch die Zellen
des Organs aufgehoben erscheint, trotzdem die Durchströmungs-
flüssigkeit reichlich mit Sauerstoff versehen ist.

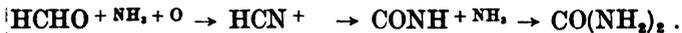
Der Umstand, daß hier eine Oxydationshemmung vorliegt,
unter deren Einfluß die Harnstoffbildung in der überlebenden
Leber sistiert, hebt wiederum das oxydative Moment bei der
Entstehung des Harnstoffes aus Ammoniumsalzen hervor.

Die Versuche ergaben aber auch Momente, die für die Theorie
der physiologischen Harnstoffbildung verwertbar sind. In den
erwähnten Versuchen über die Harnstoffbildung aus Ammoniak
unter physiologischen Verhältnissen hatte ich zeigen können,
daß der Neubildung an Harnstoff in vielen Fällen nahezu
eine der berechneten Menge entsprechende Ammoniak-
abnahme der Durchströmungsflüssigkeit gegenüberstand. Aus
dem Umstand, daß der ganze Stickstoffgehalt des neugebildeten
Harnstoffes durch die Ammoniakabnahme gedeckt wird, zog ich
den Schluß, daß der Harnstoff sich praktisch ausschließlich auf
Kosten des zugeführten Ammoniaks gebildet hatte, und daß mit
größter Wahrscheinlichkeit ein direkter Übergang von Ammoniak

¹⁾ Fichter, Steiger und Stanisch, Über die Bildung des Harnstoffes
aus Ammoniumcarbonat usw. Verhandl. d. naturforsch. Gesellsch. Basel
28, 566. 1916.

in Harnstoff stattfindende unter Anlagerung desselben an Kohlen- säure. Der zweite Teil dieses Schlusses ist nun nicht zwingend, während der erste, die Herkunft des gesamten Harnstoffstickstoffs aus Ammoniak betreffend, kaum eine andere Deutung zuläßt. Auch aus Ammoniumchlorid bei Gegenwart freier Salzsäure in der Durchströmungsflüssigkeit bildet die überlebende Leber Harnstoff und ebenso aus Ammoniumsalzen unverbrennlicher Säuren¹⁾. Der Kohlenstoffanteil muß in diesem Fall Verbindungen der Zellen oder des Blutes entnommen werden. Über die Natur dieses Anteiles ließ sich dagegen nichts aussagen.

Nun konnte neuerdings Fosse²⁾ bei der Harnstoffbildung *in vitro* aus verschiedenen Substanzen Cyansäure nachweisen, als Zwischenprodukt, das bisher oft gesucht, aber nie mit Sicherheit festgestellt worden war. Fosse nimmt nun auch für die Harnstoffbildung im Organismus als wahrscheinliche unmittelbare Vorstufe Cyansäure an, die sich aus Formaldehyd durch Anlagerung von Ammoniak, Abgabe von Wasser und Oxydation bilden würde.



Bei diesem Reaktionsverlauf entstammt ebenfalls der gesamte Stickstoff des neugebildeten Harnstoffs dem Ammoniak. Der Kohlenstoffanteil wird aber nicht von der Kohlensäure, sondern vom Formaldehyd hergeleitet.

Dieser Reaktionsverlauf postuliert als intermediäres Produkt Cyanwasserstoffsäure. Trotzdem wir heute keineswegs mehr daran Anstoß nehmen, auch stark giftige Zwischenprodukte bei chemischen Reaktionen im tierischen und pflanzlichen Organismus anzunehmen, erscheint im Hinblick auf die mitgeteilten Versuche, nach denen Cyanwasserstoffsäure die Funktion der Harnstoffbildung in hohem Maße zu hemmen imstande ist, die Blausäure kaum als ein geeignetes Zwischenglied bei der vitalen Harnstoffbildung, besonders wenn die sehr erhebliche Harnstoffproduktion des Organismus in Betracht gezogen wird³⁾.

¹⁾ Löffler, diese Zeitschr. 85, 230.

²⁾ Fosse, Bulletin de la Soc. de Chimie biologique 2, 4. 1920.

³⁾ Bewerten wir die letale Dosis Blausäure zu 0,004 mg pro kg Lebergewicht, so bedeutet für einen 70 kg schweren Menschen ca. 0,3 g die letale Dosis. Unter der Voraussetzung, daß die Hälfte des Harnstoffstickstoffs die Blausäurestufe durchläuft, würde bei einer Produktion von 25 g

Die Hemmung der Harnstoffbildung durch Blausäure erlaubt aber vielleicht noch einen weiteren Einblick in den Mechanismus der Harnstoffbildung. Wenn für die Umwandlung von Ammoniak in Harnstoff oxydative Momente maßgebend sind, sei es, wie schon erwähnt, durch oxydative Bildung von Cyansäure usw., so kommt das oxydative Moment nicht in Frage bei der einfachen Umlagerung von cyansaurem Ammonium in Harnstoff. Es läßt sich also vielleicht der Reaktionsverlauf der Harnstoffbildung mit Hilfe der Cyanwasserstoffvergiftung in 2 Abschnitte zerlegen, und es müßte sich derjenige Anteil der Reaktion, bei dem das oxydative Moment keine ausschlaggebende Rolle mehr spielt, von dem oxydativ verlaufenden trennen lassen. Versuche über diese Frage sind im Gange.

6. Endlich bot die Cyanvergiftung des isolierten Organs noch die Möglichkeit, den Mechanismus des Entgiftungsvorgangs zu studieren. Seit der bekannten Entdeckung Langs¹⁾, daß im Organismus Blausäure durch Überführung in Rhodanwasserstoffsäure entgiftet wird, ist diese Reaktion Gegenstand zahlreicher bestätigender Untersuchungen am Gesamtorganismus gewesen. Auch die von Lang gefundene Tatsache, daß durch Injektion von Verbindungen, die leicht Schwefel abspalten, sich die Blausäurevergiftung erfolgreich bekämpfen läßt, wurde am überlebenden Organ geprüft.

Tatsächlich konnte die Cyanwasserstoffvergiftung durch Zusatz von Natriumthiosulfat zur Durchströmungsflüssigkeit verhindert werden. Die Leber setzte die Harnstoffbildung fort trotz Zufuhr der doppelten, als vollständig hemmend ermittelten Dose Kaliumcyanid. Die Entgiftung erfolgt auch in der überlebenden Leber durch Bildung von Rhodanverbindungen (Versuche 24 u. 25).

Durch die Entgiftung der Cyanwasserstoffsäure mit Hilfe von Thiosulfat in der Leber ist eine Reaktion nachgewiesen, die der Bildung von Cyansäure aus Cyanwasserstoffsäure völlig analog

Harnstoff pro die intermediär ca. 11 g Blausäure entstehen, also 37 mal die letale Menge in 24 Stunden. Wenn auch derartigen Berechnungen für die hier vorliegende Frage wenig Beweiskraft innewohnt, so erscheinen doch diese alle recht hoch bei der großen Empfindlichkeit der Leber für Blausäure.

¹⁾ Lang, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 34. 1894. 36. 1895.

verläuft. Nur findet offenbar die Vereinigung der Blausäure mit dem Schwefel bedeutend leichter statt als diejenige mit dem Sauerstoff, denn wenn letztere Reaktion mit dem in großem Überschuß stets in der Durchströmungsflüssigkeit vorhandenen Sauerstoff sehr leicht erfolgen würde, so müßte die Entgiftung der Cyanwasserstoffsäure durch Überführung in Cyansäure und Umwandlung derselben in Harnstoff den für den Organismus am ehesten gangbaren Weg darstellen.

Zusammenfassend ergibt sich:

1. In der isolierten überlebenden Leber mit Phosphor vergifteter und beim Bestehen schwerer Vergiftungserscheinungen getöteter Hunde besteht keine Beeinträchtigung der Harnstoffbildung bei Durchströmung des Organs unter Zusatz von Ammoniumsalzen. In der Leber von Hunden, die an Phosphorvergiftung spontan gestorben sind, findet unter gleichen Bedingungen keine Harnstoffbildung mehr statt.

2. Zusatz von Alkohol bis 5,5% der Durchströmungsflüssigkeit beeinträchtigt in der nächsten halben Stunde die Harnstoffbildung in der Leber nicht. Selbst bei einem Gehalt der Durchströmungsflüssigkeit an 11% Alkohol findet in der ersten halben Stunde noch erhebliche Harnstoffbildung statt. Unter tiefergreifender Alteration der Durchströmungsflüssigkeit und der Leber sistiert die Harnstoffbildung erst in der nächsten Periode. Durch schwere Schädigung der Leber mit konzentriertem Alkohol (Härtung) wird ihr Vermögen, Harnstoff zu bilden, vollständig aufgehoben.

3. Einleiten von Chloroform in geringer Menge in das Durchströmungsblut beeinträchtigt die Harnstoffbildung nicht; durch stärkeres Einleiten von Chloroform wird sie aufgehoben.

4. Ein Gehalt der Durchströmungsflüssigkeit an Nicotin bis zu 0,01% hebt die Harnstoffbildung der überlebenden Leber nicht auf.

5. Kaliumcyanid in einer Konzentration von 0,002% (im System Leber + Durchströmungsflüssigkeit) hebt die Harnstoffbildung völlig auf. Durch Spülen des Organs kann das Harnstoffbildungsvermögen wiederhergestellt werden.

Die Blausäurewirkung wird durch Natriumthiosulfat erheblich abgeschwächt.

Die Entgiftung erfolgt durch Bildung von Rhodanverbindungen.

6. Die Harnstoffbildung in der überlebenden Leber ist an die Unversehrtheit der Zellstruktur gebunden; oxydative Prozesse spielen dabei eine integrierende Rolle.

Experimenteller Teil.

Zur Methodik: Die Methodik war dieselbe wie bei meinen Untersuchungen über die physiologische Harnstoffbildung aus Ammoniumsalzen¹⁾. Als Harnstoffquelle wurden benützt Ammoniumcarbonat und -lactat, in den Versuchen mit Phosphorvergiftung auch Benzylamin. Als Versuchstiere dienten ausschließlich Hunde. Sie hungerten 1–3 Tage vor dem Versuch, wurden entblutet, mit Ringerlösung ausgespült und die Leber mit dem eigenen, mit Ringerlösung verdünnten Blut durchströmt. Nur bei Vergiftung des ganzen Tieres wurde Rinderblut verwendet. Der Harnstoffgehalt der Durchströmungsflüssigkeit wurde stets von vornherein auf physiologisches Niveau gebracht, durch Zusatz von 0,2 g Harnstoff pro 800 bis 1000 ccm Ringerlösung. Zunächst wurde die Harnstoffbildung nach Zusatz des Ammoniumsalzes in einer Vorperiode von 30 Min. pro 100 ccm Flüssigkeit bestimmt; darauf wurde das Organ der toxischen Schädigung unterworfen und weiter in halbstündigen Perioden die Harnstoffneubildung mittels Urease gemessen, indem Sorge getragen wurde dafür, daß die Harnstoffquelle stets im Überschuß in der Durchströmungsflüssigkeit zur Verfügung stand. In einzelnen Versuchen wurde durch Ausspülen des Organs das schädigende Agens entfernt, und das Organ zu einer weiteren Durchströmung wiederum unter physiologischen Bedingungen verwendet, um festzustellen, ob vorübergehende oder dauernde Schädigung vorlag.

Die Methode der Doppeldurchströmung ein und desselben Organs unter physiologischen und anschließend unter pathologischen und unter Umständen wiederum unter physiologischen Bedingungen erlaubt am ehesten quantitative Vergleiche. Durch Verwendung derselben Leber werden die physiologischen, individuellen Variationen, Unregelmäßigkeiten in der Blutfüllung des Organs usw. ausgeschaltet, Momente, die zur Zeit noch nicht vollständig zu beherrschen sind, wenn die Leistungsfähigkeit verschiedener Lebern miteinander verglichen wird.

Wegen Raumangels muß ich mich darauf beschränken, die Mehrzahl der Versuche in tabellarischer Anordnung wiederzugeben. Einzig bei den Vergiftungsversuchen mit Phosphor und mit Kaliumcyanid sind Protokolle in gekürzter Form mitgeteilt.

I. Vergiftung der Versuchstiere mit Phosphor.

Versuch 1: Hund, 8,8 kg. Injektion von 1proz. Phosphoröl, 8,7 ccm im Verlauf von 4 Tagen, bis wiederholt Erbrechen erfolgt und extreme Muskelschwäche eintritt.

Leber: 226 g, sehr stark fettinfiltriert. Durchströmung mit 1100 Ringer und 500 ccm Rinderblut und 0,2 g Harnstoff; Ammoniumcarbonat als Harnstoffquelle.

¹⁾ Löffler, diese Zeitschr. 85, 230. 1918.

I. Periode	15 mg	U-Neubildung ⁺	pro 100 ccm	Durchströmungsflüssigk.
II. „	13 „	„	„ 100 „	„
III. „	12 „	„	„ 100 „	„

Leber gewaschen und zu einer weiteren Durchströmung unter Zusatz von 2 g Phenyläthylaminchlorhydrat verwendet (1000 Ringer, 500 ccm Rinderblut).

IV. „	2 mg	U-Neubildung ⁺	pro 100 ccm	Durchströmungsflüssigk.
V. „	2 „	„	„ 100 „	„
VI. „	4 „	„	„ 100 „	„

Versuch 2: Hund, 9,4 kg. Im Verlauf von 4 Tagen Injektion von 9 ccm 1 proz. Phosphoröls, das Tier im Zustand hochgradiger Muskelschwäche entblutet. Leber 212 g stark fettinfiltriert, Durchströmung mit 1000 ccm

Ringerlösung, 600 ccm Rinderblut + 0,2 g U⁺; Phenyläthylaminchlorhydrat im ersten, Ammoniumcarbonat im zweiten Versuch als Harnstoffquelle.

I. Periode	3 mg	Harnstoffneubildung	pro 100 ccm	Durchströmungsfl.
II. „	7 „	„	„ 100 „	„
III. „	2 „	„	„ 100 „	„

2 Durchströmungen unter Verwendungen von Ammoniumcarbonat als Harnstoffquelle.

IV. Periode	8 mg	Harnstoffneubildung	pro 100 ccm	Durchströmungsfl.
V. „	3 „	„	„ 100 „	„
VI. „	4 „	„	„ 100 „	„
VII. „	8 „	„	„ 100 „	„

Die Harnstoffneubildung erfolgt in der schwer fettinfiltrierten Leber mit Phosphor vergifteter Hunde sowohl aus Ammoniumcarbonat wie auch aus Phenyläthylamin. Die Ausschläge sind für Phenyläthylamin als Harnstoffquelle etwas gering.

In diesem Zusammenhang ist ein weiterer Versuch mit Phosphorvergiftung von Interesse. Um möglichst weitgehende Schädigung der Leber zu erzielen, wurde in Versuch 3 der Hund maximal vergiftet. Das Tier ging in der Nacht zugrunde, nachdem es 10^h abends die letzte Injektion von Phosphoröl erhalten hatte. Es wurde morgens 7^h totenstarr im Käfig gefunden. Zur Kontrolle (Hund von 9,4 kg — Vergiftung mit total 0,05 g Phosphor) wurde um 9^h die Leber zu einer Durchströmung mit dem durch Ausspülen des Tieres gewonnenen Blut verwendet. Als Durchströmung diente Ammoniumcarbonat als Harnstoffquelle.

Es ergaben sich folgende Zahlen:

Versuch 3:

Harnstoffgehalt

der Flüssigkeit	zu Beginn	33 mg pro 100 ccm
„	nach einer halben Stunde	35 „ „ 100 „
„	nach einer Stunde	33 „ „ 100 „
„	nach einer weiteren Stunde	33 „ „ 100 „

Die Leber des spontan an Phosphorvergiftung zugrunde gegangenen Tieres hat also bei der Durchströmung ca. 6–8 Stunden nach dem Tode keinen Harnstoff mehr geliefert.

II. Vergiftung der isolierten Leber durch Zusatz von Äthylalkohol zur Durchströmungsflüssigkeit.

Als Harnstoffquellen dienten Ammoniumcarbonat und -lactat.

H = Hundegewicht in kg; L = Lebergewicht in g; A. lact. = Ammoniumlactat; A. carb. = Ammoniumcarbonat; P = Periode von $\frac{1}{2}$ Stunde Dauer; Alk = Alkoholgehalt der Durchströmungsflüssigkeit in der betreffenden Periode in Vol.-%; $\overset{+}{U}$ = Harnstoffneubildung pro 100 ccm der Durchströmungsflüssigkeit in mg; Spülung = die Durchströmungsflüssigkeit wird gewechselt, das Organ mit 4 l Ringerlösung durchgespült und mit frischer Durchströmungsflüssigkeit zu einer weiteren Durchströmung angesetzt; 0-Sauerstoff = Zufuhr von Sauerstoff in den Arterialisator unterbrochen; Viel Sauerstoff = maximale Zuleitung von Sauerstoff in den Arterialisator.

In mehreren Versuchen (7, 8) tritt zwar in den späteren Perioden eine erhebliche Abnahme der Harnstoffneubildung ein, doch ist diese inkonstant und geht durchaus nicht parallel dem Alkoholgehalt der Durchströmungsflüssigkeit. Die Abnahme ist häufig nicht größer als die spontane Abnahme der Harnstoffneubildung in länger dauernden Versuchen (4, 5, 6). In anderen dagegen tritt nicht nur keine Abnahme, sondern eine mehr oder weniger ausgesprochene Zunahme der Harnstoffneubildung unter der Alkoholwirkung ein (Versuch 6, 11, 13). Es stellte sich heraus, daß besonders bei Verwendung von Ammoniumlactat als Harnstoffquelle nach Zusatz des Alkohols zur Durchströmungsflüssigkeit offenbar durch Änderung der physikalisch-chemischen Beschaffenheit derselben starkes Schäumen eintritt, dadurch wird die Arterialisierung sehr erschwert. In diesem Umstand ist der Hauptgrund für die geringe Harnstoffneubildung bei geringer Alkoholkonzentration zu sehen. Dies geht deutlich aus den Versuchen 12 und 13 hervor, in denen sich der Sauerstoffmangel als ungleich stärker hemmend erweist, als der Alkoholgehalt der Durchströmungsflüssigkeit.

Erst bei einem Alkoholgehalt der Durchströmungsflüssigkeit von ca. 10%, bei dem partielle Hämolyse und Bildung von Capillarthromben stattfindet, sistiert die Harnstoffbildung nach einiger Zeit.

Zusatz von Alkohol zur Durchströmungsflüssigkeit erscheint danach als ein wenig geeignetes Mittel, um sofortige schwere Schädigung des Harnstoffbildungsvermögens hervorzurufen.

Es wurde aber noch versucht, durch eine schwere Schädigung, Zerstörung der Zellstruktur mittels konzentrierten Alkohols unter Vermeidung von Thrombenbildung zu entscheiden, ob die Zelltätigkeit der Leber für die Harnstoffbildung überhaupt von Bedeutung sei. Die Behandlung mit konzentriertem Alkohol bedeutet aber nicht funktionelle Schädigung, sondern eine destruktive, durch Koagulation der Zelleiweiß-

körper, Entzug von Lipoiden und anderen Bestandteilen, jedoch unter Erhaltung der anatomischen Struktur des Organs. Trotz Erhaltung des Zellverbandes ist dieser Eingriff wohl schwerer als die mechanische Zerkümmerung des Organs.

Versuch	P	Alk.	† Ü	Versuch	P	Alk.	† Ü
4				10			
Kontrolle	I	0	13	H 8,3	I	0	35
H 12,9	II	0	10	L 157	II	3%	32
L 416	III	0	9	A. carb.	Spülung		
A. lact.	IV	0	5		III	0	35
	V	0	9		IV	0	30
	VI	0	2				
5				11			
H 11,5	I	0	25	H 8,6	I	0	25
L 233	II	0	14	L 219	II	5,5	34
A. lact.	III	0	11	A. carb.	Spülung		
	IV	0	4		III	0	33
	V	0,6	9		IV	0	14
	VI	id.	9				
6				12			
H 5,3	I	0	10	H 25	I	4,5	25
L 131	II	0	6	L 461	II	id. 0 Sauerstoff	15
A. carb.	III	0	5	A. carb.	III	id. viel Sauerstoff	13
	IV	1,3	7		Spülung		
	V	id.	9		IV		20
	VI	id.	8				
7				13			
H 20,5	I	0	20	H 19,7	I	0	17
L 527	II	0,3	4	L 341	II	4; wenig Sauerstoff	8
A. lact.	III	0,8	0,3	A. lact.	Spülung		
	IV	id.	±0		III	0	10
	Auswaschen				IV	5,5; viel Sauerstoff	14
	V	0	2		V	5,5; wenig Sauerstoff	9
	VI	0	2				
8				14			
H 15,2	I	0	8	H 13,0	I	11%	15*)
L 298	II	0,6	6	L 220	II	id.	±0
A. lact.	III	2,0	2	A. carb.			
	IV	4,0	2				
9							
H 13,7	I	0	29				
L 302	II	1,0	28				
A. carb.	III	2,0	9				
	IV	id.	3				

*) Bald nach Beginn der Durchströmung wird das Blut lackfarben, fließt aber noch stark desoxydiert aus der Leber ab; in der II. Periode Bildung ausgedehnter Capillarthromben, so daß gegen Schluß der Periode das Blut nur mehr sehr schlecht abfließt.

Versuch 15: H 13,6 kg. L 200 g. Durchströmung 900 Blut + 1000 ccm Ringelösung + 0,2 Harnstoff. Zusatz von 536 mg NH₃ in Form von Ammoniumcarbonat.

I. Periode 4 Min. 2,1 mg; in 30 Min. 15,8 mg pro 100ccm Durchströmungsfli.
 II. „ 30 „ 14,4 „
 III. „ 30 „ 13,9 „

Nach der III. Periode wurde die Durchströmung unterbrochen. Die Leber mit Ringerlösung von Blut möglichst leer gespült und unter Zusatz von ganz allmählich steigenden Alkoholmengen 45 Minuten durchströmt, zuletzt wurde 3 mal je 200 ccm 95 proz. Alkohol durchgeleitet. Der Alkohol wurde darauf durch Spülen mit 1500 ccm Ringerlösung entfernt und das Organ zu einer neuen Durchströmung angesetzt. Zusatz von 536 mg NH₃ in Form von Ammoniumcarbonat, 1000 Blut + 1000 Ringerlösung.

- IV. Periode 0,45 mg pro 100 ccm Durchströmungsflüssigkeit
- V. " 1,5 " " 100 " "
- VI. " 1,2 " " 100 " "

Durch diesen Eingriff in die Zellstruktur bei Erhaltung des Zellverbandes assistiert also die Harnstoffbildung. Der Versuch zeigt, daß bei der Harnstoffbildung aus Ammoniumcarbonat in der isolierten Leber die Zellstruktur maßgebend ist.

Durchströmung unter Einleiten von Chloroform in die Durchströmungsflüssigkeit.

Über die Leistung der Leber unter direkter Chloroformwirkung, also in der Narkose, liegen meines Wissens keine Versuche vor. Fiske und Karsner haben Lebern mit Chloroform vergifteter Tiere durchströmt und ihr Vermögen, der Durchströmungsflüssigkeit zugesetztes Ammoniak zu zerstören, unbeeinflusst gefunden. Es handelt sich in jenen Versuchen aber nicht um Narkose, sondern um eine Leberschädigung im Sinne hochgradiger Verfettung. Über das Verhalten der Leber unter akuter Chloroformwirkung liegt nur eine beiläufige Bemerkung Barrenscheens¹⁾ vor. Bei der Tötung des Versuchstieres zum Zweck der Untersuchung des Glykogenstoffwechsels der isolierten Leber war die Beobachtung gemacht worden, daß bei starker Narkose des Tieres gelegentlich das Blut auffallend hell durch die Leber abströmt.

Die Narkose der Leber wurde in der Weise ausgeführt, daß ein Teil des Sauerstoffs vor dem Eintreten in den Arterialisator ein Gefäß mit Chloroform passierte.

Versuch	P	Chloroform	+ U	Versuch	P	Chloroform	+ U
16				17			
H 24,9	I	0	40	H 15	I	0	24
L 306				L 235	II	viel	1
A. carb.	II	mäß. Zufuhr	25	A. lact.	III	0	±0
	III	0	19		Spülung		
	IV	0	7		IV		±0
	V	0	7				

Stärkere Zufuhr von Chloroform in den Arterialisator hat also in diesem Versuch die Harnstoffbildung sofort und vollständig aufgehoben. Auch eine Ausspülung des Organs konnte die Fähigkeit der Harnstoffbildung nicht wiederherstellen.

¹⁾ Barrenscheen, diese Zeitschr. 58, 277.

Außer der schweren Schädigung durch konzentrierten Alkohol ist die akute Chloroformvergiftung bis jetzt die einzige Schädigung, die die Harnstoffbildung sofort und vollständig aber auch in irreparabler Weise aufhebt. Die Vergiftung mit Chloroform, die nach den beiden Versuchen sehr wohl auch so gestaltet werden könnte, daß nur eine Narkose der Leberzellen auftritt, ist die ungleich weniger tiefgreifende Schädigung der Leber als die Durchströmung mit konzentriertem Alkohol. Es braucht also zur Aufhebung der harnstoffbildenden Tätigkeit der Leber keiner eigentlich destruktiven Einwirkung auf die Zellen.

Vergiftung mit Nicotin.

Versuch	P	Nicotin	$\frac{+}{U}$	Versuch	P	Nicotin	$\frac{+}{U}$
18				19			
II 3,3	I	0	8	II 20,1	I	0	23
L 113	II	0,001%	5	L 454	II	0,002	23
A. lact.	III	0,01	4	A. lact.	III	0,007	13
					IV	0,014	10

Die Abnahme der Harnstoffneubildung ist nicht größer als die in Kontrollversuchen beobachtete spontane Abnahme. Die Unwirksamkeit des Nicotins in den angewandten Mengen zeigt, daß das vegetative Nervensystem bei der Harnstoffbildung in der Leber nicht beteiligt ist.

Vergiftung mit Kallumcyanid.

Die letale Dosis Blausäure wird zu 0,003—0,005 g pro kg Tier abgegeben, entsprechend 0,0065—0,012 g KCN = 0,00065—0,0012% des Tiergewichtes. Ausgehend von der Tatsache, daß die gegen Sauerstoffmangel weit weniger empfindlichen Kaltblüter der Blausäurevergiftung gegenüber auch viel resistenter sind als die Warmblüter, weil bei diesen der Stilllegung des Nervensystems beim Zustandekommen des Todes eine wichtige Rolle zukommt, wurde in den Versuchen am isolierten überlebenden Organ, an dem ein Nerveneinfluß nicht mehr besteht, die Vergiftung zunächst mit relativ hohen Blausäuredosen durchgeführt. So wurde in Versuch 1 0,15 g KCN zugesetzt bei einem Volumen von 1500 ccm Durchströmungsflüssigkeit und einem Nettolebergewicht von 230 g. KCN-Gehalt des Systems Leber + Durchströmungsflüssigkeit = 0,0086%.

Versuch 20: Hund 11,9 kg, 3 Tage gehungert. Leber 230 g, Durchströmung mit 1000 ccm Ringerlösung + 650 ccm Blut + 0,2 g $\frac{+}{U}$ + 30 ccm Ammoniumcarbonatlösung (0,45 g NH_3).

Versuch A: Abstrom 300 ccm in der Minute, stark venös gefärbt. I. Periode: + 10 mg Harnstoff pro 100 ccm Durchströmungsflüssigkeit. Auf Zusatz von 15 ccm 1proz. Kaliumcyanidlösung + 2 ccm $\frac{1}{10}$ n-HCl wird das abströmende Blut fast momentan hellrot, während es zuvor stark venös gefärbt war.

II. Periode (0,0086% KCN): 4 mg $\overset{+}{H}$ pro 100 ccm Flüssigkeit. Zusatz von 15 ccm Ammoniumcarbonatlösung entsprechend 225 mg NH_3 .

III. Periode: 0 mg $\overset{+}{U}$.

IV. Periode: 0 mg $\overset{+}{U}$.

Versuch B: Leber mit 4 l Ringerlösung gespült, bis die abströmende, mit etwas Blut versetzte Flüssigkeit leicht venös gefärbt erscheint und keine Spuren eines Geruches nach Cyanwasserstoffsäure mehr erkennbar sind.

Durchströmung mit 1000 ccm Ringerlösung + 650 ccm Blut + 0,2 g $\overset{+}{U}$, Zusatz von 30 ccm Ammoniumchlorid entsprechend 450 mg NH_3 .

V. Periode: -1 mg $\overset{+}{U}$.

VI. Periode: ± 0 mg $\overset{+}{U}$.

Zusatz von 0,15 g KCN zur Durchströmungsflüssigkeit entsprechend einem Gehalt des Systems Leber + Durchströmungsflüssigkeit von 0,0086% hat also die Harnstoffbildung vollständig und endgültig aufgehoben, indem nach Spülung des Organs und nach mehrmaliger Durchströmung keine Harnstoffbildung mehr erfolgt.

In Versuch 21 wurde die KCN-Menge zu 0,05 g = 0,0025% gewählt.

Versuch 21: Hund 15,1 kg, 3 Tage gehungert. Leber 317 g. Durchströmung mit 1000 Blut + 1000 Ringerlösung + 0,2 $\overset{+}{U}$, Abstrom 400 ccm; Durchströmung sehr gut. Zusatz von Ammoniumcarbonat entsprechend 800 mg NH_3 .

Versuch A: I. Periode total +513 mg $\overset{+}{U}$ 27 mg pro 100 ccm.

II. „ +465 „ „ 25 „ „ 100 „

Zusatz von 5 proz. Kaliumcyanidlösung. Das Blut wird in der Leber nicht mehr desoxydiert, sondern fließt hellrot, arteriell aus der Leber ab, gleichgefärbt wie das zufließende Blut.

III. Periode (+ KCN 0,0025%) - 1,0 mg pro 100 ccm.

IV. „ id. + 0,3 „ „ 100 „

Durchströmung unterbrochen, die Leber mit 3,5 l Ringerlösung durchgespült; die Spülflüssigkeit wird bald bläulich rot, deutlich venös. Die Leber wird sofort zu einer neuen Durchströmung angesetzt 800 Ringer + 800 Blut. Zusatz von 25 ccm von Ammoniumcarbonatlösung enthaltend 670 mg NH_3 .

Versuch B: V. Periode + 17 mg $\overset{+}{U}$ pro 100 ccm Flüssigkeit.

VI. „ + 9 „ „ „ 100 „ „

Durch Zusatz von Kaliumcyanid 0,0025% ist demnach die Harnstoffbildung in der Leber aufgehoben worden, indem die Harnstoffbildung von 27 bzw. 25 mg pro 100 ccm in der I. und II. Periode vor dem Zusatz des Cyanids auf -1 resp. +0,3 mg abgesunken ist. Nach Spülung des Organs mit Ringerlösung und nachheriger Durchblutung unter Ammonium-

carbonatzusatz tritt aber in den Perioden V und VI wieder starke Harnstoffbildung ein.

Zur Verifikation dieses Versuches wurde eine zweite analoge Durchströmung ausgeführt.

Versuch 22: Hund 26,0 kg, 2 Tage gehungert. Leber 582 g. Durchströmung mit 1000 ccm Ringerlösung und 900 ccm Blut + 0,2 g Harnstoff. Abstrom 265 ccm pro m. Durchblutung gut. Zusatz von Ammoniumlactat entsprechend 720 mg NH_3 .

I. Periode: 21 mg $\overset{+}{\text{U}}$ pro 100 ccm Flüssigkeit, total 394.

II. „ (KCN 0,002%) 1 mg $\overset{+}{\text{U}}$ pro 100 ccm Flüssigkeit.

Schon 2 Minuten nach Zusatz der Cyanidlösung wird das anfangs noch stark venös gefärbte aus der Leber ausfließende Blut hellrot, so daß die Farbe von zu- und abströmendem Blut nicht mehr unterschieden werden kann.

Die Leber wird nach Durchspülung mit 1500 ccm Ringerlösung zu einer weiteren Durchströmung angesetzt, mit 800 Ringerlösung + 900 ccm Blut + 0,20 g $\overset{+}{\text{U}}$.

III. Periode total 17,4 mg $\overset{+}{\text{U}}$ pro 100 ccm Flüssigkeit + 365 mg.

Dieser Versuch zeigt die Hemmung der Harnstoffbildung durch Kaliumcyanid sehr deutlich, ebenso die Reversibilität dieser Wirkung. Trotz eines großen Angebotes an Ammoniumsalz bildet die Leber in der Periode II nur 1 mg Harnstoff pro 100 ccm Durchströmungsflüssigkeit, während in der I. Periode 21 mg pro 100, total 394 gebildet worden waren. Nach Entfernung des Ammoniumcyanids setzt aber die Harnstoffbildung in der III. Periode wieder stark ein und erreicht mit 17 mg pro 100 ccm total 365 mg (2100 ccm Durchströmungsflüssigkeit) nahezu die Intensität wie in Periode I unter durchaus gleichartigen Versuchsbedingungen. Es sollte in Versuch 23 die eben hemmende Dose ermittelt werden.

Versuch 23: Hund 15,4 kg, 3 Tage gehungert, Leber 428 g. Durchströmung mit 1200 Ringerlösung + 700 ccm Blut + 0,2 g Harnstoff. Abstrom 330 ccm in der Minute. Ammoniumlactatlösung entsprechend 360 mg NH_3 .

I. Periode (Kontrolle) 10 mg $\overset{+}{\text{U}}$ pro 100 ccm Flüssigkeit.

II. „ 0,0025% KCN — 1 mg $\overset{+}{\text{U}}$ pro 100 ccm Flüssigkeit.

Spülung der Leber mit 4000 Ringerlösung, am Schlusse fließt das zugesetzte Blut wieder deutlich venös aus. Durchströmung mit 800 ccm Blut + 1200 ccm Ringerlösung, Ammoniumlactatlösung entsprechend 360 mg NH_3 . Abstrom 375 ccm in der Minute.

Versuch B:

III. Periode (Kontrolle) +0,3 mg $\overset{+}{\text{U}}$ pro 100 ccm Flüssigkeit.

IV. „ „ —0,6 „ „ „ 100 „ „

V. „ KCN 0,004% —0,3 „ „ „ 100 „ „

In diesem Versuch hat schon die Menge von 0,05 g KCN = 0,0025% die Harnstoffbildung vollständig und irreversibel gehemmt. Der zweite Versuch mit Zusatz von 10 ccm Cyanidlösung ist deshalb ohne Bedeutung für die vorgelegte Frage. Die vollständig und irreversibel hemmende Konzentration von KCN kann also schon bei 0,0025% liegen. Von technischem Interesse sind die geringen Schwankungen im Gesamtharnstoff der Durchströmungsflüssigkeit unter den gegebenen Versuchsbedingungen.

Beeinflussung der KCN-Wirkung durch Thiosulfat.

Unter Berücksichtigung der bei Durchströmungsversuchen stets bestehenden individuellen Differenzen kann nach den Versuchen (21–23) unter Zusatz von Kaliumcyanid die die Harnstoffbildung vollständig hemmende Giftdosis mit 0,0025% bewertet werden. Diese Hemmung war in 2 Versuchen durch Ausspülen des Organs rückgängig zu machen; in Versuch 23 ist durch dieselbe Giftdosis schon irreversibler Verlust der harnstoffbildenden Fähigkeit der Leber bewirkt worden, trotzdem das in diesem Versuch zur Verwendung gelangte Organ in einer Größe zwischen den in Versuch 21 und 22 verwendeten Lebern stand.

Da sich 0,0025% KCN als die vollständig, aber in der Regel reversibel hemmende Dose erwiesen hatte, sollte festgestellt werden, ob ihre Wirkung durch Thiosulfat abgeschwächt oder aufgehoben werden kann.

Versuch 24: Hund 15,2 kg, 2 Tage gehungert. Leber 300 g. Durchströmung mit 600 Ringerlösung + 1000 Blut. Abstrom 250 ccm in der Minute. Zusatz von 10 ccm 10proz. Lösung von Natriumthiosulfat (1 g). Zusatz von Ammoniumlactatlösung enthaltend 215 mg NH₃.

Versuch A: I. Periode $28,8 \text{ mg } \overset{+}{\text{U}}$ pro 100 ccm Flüssigkeit, total 432 mg. Zusatz von 0,05 g KCN (= 0,0028%) + 25 ccm Ammoniumlactatlösung entsprechend 360 mg NH₃. Das abströmende Blut wird heller, ist aber noch deutlich venös gefärbt.

II. Periode $14 \text{ mg } \overset{+}{\text{U}}$ pro 100 ccm Flüssigkeit, total + 225 mg. Zusatz von 12,5 ccm Ammoniumlactatlösung + 0,10 g KCN = 0,0062%. Das aus der Leber abströmende Blut wird hell, nach 2 Min. kein Unterschied mehr erkennbar zwischen abströmendem und zuströmendem Blut.

III. Periode + $1,2 \text{ mg } \overset{+}{\text{U}}$ pro 100 ccm Flüssigkeit. Im Verlauf der III. Periode allmählicher Zusatz von 15 ccm 10proz. Natriumthiosulfatlösung; ganz am Schluß der Periode erscheint das aus der Leber abfließende Blut wieder dunkler gefärbt als das zufließende.

IV. Periode + $9 \text{ mg. } \overset{+}{125 \text{ mg } \text{U}}$ pro 100 ccm Flüssigkeit.

In der I. Periode bildet die Leber trotz Gegenwart des Thiosulfates reichlich Harnstoff. Die Substanz hat also keinen schädigenden Einfluß auf die Harnstoffbildung. Im Gegensatz zu den vorangehenden Versuchen bedingt nun aber der Zusatz von 0,05 g Kaliumcyanid = 0,0028% keine erhebliche Hemmung der Harnstoffbildung; diese ist mit 225 mg pro $\frac{1}{2}^h$ im Gegenteil noch recht beträchtlich. Dieser Wert erreicht nahezu den Wert

für Harnstoffbildung in denjenigen Perioden der Versuche 21 und 22, die unmittelbar nach Auswaschung der Leber im Anschluß an die Cyankalivergiftung beobachtet worden sind.

Nach Zusatz von weiteren 0,1 g KCN, also bei einem Gesamtgehalt der Durchströmungsflüssigkeit an 0,15 g KCN = 0,009% sistiert die Harnstoffbildung in der III. Periode vollständig. Im Verlauf dieser Periode wurden weitere 1,5 g Natriumthiosulfat zugesetzt. In der IV. Periode erreicht darauf die Harnstoffbildung wieder den erheblichen Wert von 145 mg pro $\frac{1}{3}$ h. Es ist also auch hier die Giftwirkung des Kaliumcyanids durch Thiosulfat erheblich herabgesetzt worden.

Versuch 25: Hund 25 kg, 2 Tage gehungert, Leber 661 g. Durchströmung mit 1400 ccm Blut, 300 Ringerlösung, 400 ccm Wasser, enthaltend 4 g Natriumthiosulfat + 0,2 g U.

I. Periode (Kontrolle)	Neubildung	30 mg U	pro 100 ccm Flüssigk.
II. „	0,05 g = 0,0025% KCN	27 „ „ „	100 „ „
III. „	0,05 g = 0,005 % „	8 „ „ „	100 „ „

Leber gewaschen und nochmals durchströmt ohne Zusatz von Thiosulfat:

IV. Periode (Kontrolle)	27 mg U	pro 100 ccm Flüssigkeit.
V. „	0,0025% KCN	19 „ „ „ 100 „ „
VI. „	0,005% „	5 „ „ „ 100 „ „

Im ersten Versuch findet wiederum trotz eines Gehaltes der Durchströmungsflüssigkeit von 0,0025% KCN eine erhebliche Harnstoffneubildung statt. Ein weiterer Zusatz von 0,0025% KCN hebt die Harnstoffbildung nicht auf. Doch ist dieselbe bei der III. Periode erheblich geringer als in der nachfolgenden IV., bei der die Leber ausgiebig gespült worden war. Auffallend ist der Befund, daß in der V. Periode trotz eines Gehaltes der Durchströmungsflüssigkeit von 0,0025% ohne Gegenwart von Thiosulfat die Harnstoffbildung nicht aufgehoben ist, und daß auch ein weiterer Zusatz von 0,0025% KCN noch keine völlige Hemmung ergibt.

Die einzelnen Proben der Durchströmungsflüssigkeit wurden auf ihren Gehalt an Rhodansalz untersucht. Es kamen zur Bearbeitung 10 Proben und zwar: 1. entnommen zu Beginn des Versuchs, 2. Ende der I. Periode, 2a. sofort nach Zusatz von KCN, 3. Ende der II. Periode, 4. Ende der III. Periode, 5. anfangs des zweiten Versuches, 6. Ende der IV. Periode, 6a. kurz nach Zusatz von KCN, 7. Ende der V. und 8. Ende der VI. Periode. Je 20–100 ccm der Durchströmungsflüssigkeit wurden durch Eingießen in das 4fache Volumen 95proz. Alkohols enteivweiß. Bei starker Wirkung des Ventilators auf dem Wasserbad bei niedriger Temperatur stark eingengt; mit Wasser aufgenommen, vom abgeschiedenen Niederschlag abzentrifugiert, das Zentrifugat auf $\frac{1}{10}$ des ursprünglich verwendeten Volumens Durchströmungsflüssigkeit gebracht. Mit dieser Flüssigkeit wurde die Rhodanreaktion mit Ferrichlorid ausgeführt. Es ergab sich:

- | | |
|---------------|---------------|
| 1. negativ, | 5. negativ, |
| 2. „ | 6. „ |
| 2a. ± orange, | 6a. ± orange, |
| 3. + rot, | 7. + rot, |
| 4. +++ rot, | 8. + rot. |

Die rotgefärbten Lösungen wurden mit Salzsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt, die ätherischen Extrakte färbten sich beim Einengen schön rot und hinterließen beim Verdünsten einen roten Rückstand.

Die Entgiftung des Kaliumcyanids war also in diesem Versuch durch Umwandlung der Cyanwasserstoffsäure in Sulfocyanwasserstoffsäure erfolgt, in gleicher Weise wie die Entgiftung im Gesamtorganismus vor sich geht.

Zur Kontrolle wurde Blut mit Natriumthiosulfat versetzt und unter Zusatz von 0,0025, 0,005% Kaliumcyanad je zur Hälfte sofort in der angegebenen Weise verarbeitet und zur Hälfte 4 Stunden im Brutschrank bei 38° gehalten. In keiner dieser Proben konnte die Rhodanreaktion auch nur andeutungsweise erhalten werden. Die Entgiftung des Kaliumcyanids erfolgt also *in vitro* in der in Frage kommenden Zeit bei Gegenwart von Blut nicht in qualitativ nachweisbarem Maße, während sie bei der Durchströmung der Leber in aller Deutlichkeit erfolgt.

Über Serumhämolyse und -lipolyse.

Von

O. Olsen und K. Goette.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Freiburg i. B.)

(Eingegangen am 23. September 1920.)

Die Hämolyse durch fettlösende Mittel wie Alkohol, Äther und Chloroform¹⁾, die vielfachen Beziehungen, die bei der Saponin- und Kobragifhämolyse²⁾ sowie bei anderen tierischen und pflanzlichen Hämolytinen zwischen Hämolytisin und Lipoiden wie Cholesterin und Lecithin nachweisbar waren, lenkten die Aufmerksamkeit auf ähnliche Zusammenhänge auch bei der Serumhämolyse. So sprach Landsteiner³⁾ die Vermutung aus, daß es besondere Lipoidweißverbindungen sind, die den in Wasser löslichen Inhalt der roten Blutkörperchen, namentlich das Hämoglobin am Austritt in die umgebenden wässerigen Lösungen hindern, während die Auflösung der Erythrocyten, der Austritt von Hämoglobin erfolgt, sobald der durch die Lipoide gebotene Schutz in irgendwelcher Weise zerstört wird. Die Anschauung, die auch bei der Serumhämolyse Wechselwirkungen zwischen Lipoiden der Erythrocyten und lipoidlösenden Eigenschaften des Serums annimmt, hat manches Einnehmende, wenn auch für sie endgültige Beweise bisher nicht erbracht wurden⁴⁾.

¹⁾ Grijns, Arch. f. d. ges. Physiol. **63**, 86. 1903. — Hedin, ebenda **68**, 222. 1897; **70**, 525. 1898. — Fühner und Neubauer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **56**, 333. 1907.

²⁾ Ransom, Dtsch. med. Wochenschr. 1901, S. 194. — Kyes, Berl. klin. Wochenschr. 1902, S. 886. — Kyes und Sachs, ebenda 1903, S. 21. — Pascucci, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **6**, 552. 1905. — Bang, Chemie und Biochemie der Lipide.

³⁾ Landsteiner im Handbuch der Biochemie von Oppenheimer Bd. II (1) und im Kollé-Wassermann Bd. II (2) Kolloide und Lipide in der Immunitätslehre.

⁴⁾ Über die verschiedenen Theorien über das Zustandekommen der Hämolyse, auf die hier nicht näher eingegangen werden kann, vgl. Sachs, Kapitel Hämolyse in Kollé-Wassermanns Handbuch. — Landsteiner l. c.

Es war nun möglich, daß die blutkörperchenlösende Wirkung gewisser Hämolsine auf deren Gehalt an fettsplattendenden Fermenten beruhen könnte. Neuberg¹⁾ und seine Mitarbeiter waren es, die zuerst die Vermutung aussprachen, daß ursächliche Zusammenhänge zwischen hämolytischen und lipolytischen Wirkungen beständen. Neuberg und Rosenberg beobachteten, daß eine Reihe tierischer und pflanzlicher Hämolsine und Agglutinine (Crotalus-, Mokassin-, Kobra-, vielleicht auch das Morgenroth-Carpische Bienengift, endlich Crotin und Ricin) neben ihren hämolytischen und agglutinierenden Eigenschaften auch ein deutliches enzymatisches Spaltungsvermögen gegenüber Fetten und Lipoiden, z. B. Oliven-, Ricinusöl, Lecithin, wie sie durch Titration der Fettsäuren feststellten, besitzen. Erweitert wurden diese Befunde von Neuberg und Reicher, die auch für bactericide und antitoxische Sera, sowie für Magen- und Pankreasfermente einen Parallelismus zwischen Hämolyse und Lipolyse konstatierten. Das gleiche beobachteten sie in einer weiteren Arbeit auch bei einigen cytolytischen und hämolytischen Immunsersis: bakterielle Hämolsine, das Vibrio- und Staphylolysin besaßen neben der hämolytischen auch lipolytische Wirkung; deutliche Lipolyse konnte namentlich auch mit dem inaktivierten Serum eines mit Ziegenblut vorbehandelten Kaninchens im Verein mit Meerschweinchenserum erzielt werden, während die Fettsplaltung ausblieb, wenn als Kontrolle Meerschweinchenserum allein verwendet wurde. Wenn Neuberg auch die Möglichkeit eines zufälligen Nebeneinandervorkommens von Lipasen und Hämolsinen durchaus nicht in Abrede stellt, so hält er es doch für nicht unwahrscheinlich, daß Enzyme der Fett- und Lipoidsubstanzen bei den Immunitätserscheinungen eine Rolle spielen. Auch Bergel²⁾ stellt, gestützt auf Untersuchungen, auf die einzugehen zu weit führen würde, Hypothesen über Beziehungen zwischen Hämolyse und Lipolyse auf.

¹⁾ Neuberg und Rosenberg, Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 2. — Neuberg und Reicher, diese Zeitschr. 41, Nr. 35. 1907. — Dieselben, Münch. med. Wochenschr. 1907, Nr. 35. — Neuberg, diese Zeitschr. 11. 1908.

²⁾ Bergel, Dtsch. med. Wochenschr. 1908, Nr. 9. — Dtsch. Arch. f. klin. Med. 106, 147. 1912. — Münch. med. Wochenschr. 1912, Nr. 12. — Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 14, 255. 1912. — Ebenda 27, 441. 1918.

Landsteiner¹⁾ steht aus verschiedenen Gründen der Neubergschen Hypothese skeptisch gegenüber. Auch Sachs²⁾ hält sie nicht für hinreichend begründet und hält Schlußfolgerungen aus den Neubergschen Versuchen, namentlich denjenigen, die sich auf die hämolytischen Immunsera beziehen, wegen des Fehlens erforderlicher Kontrollversuche nicht für berechtigt. Er betont, daß bei den Schlangengiften und ähnlich wirkenden Toxinen³⁾ die Lipolyse gar nicht auf direktem Wege den hämolytischen Vorgang bewirkt. Hier und ebenso auch bei den von Friedemann⁴⁾, Wohlgemuth⁵⁾ und Noguchi⁶⁾ mitgeteilten Versuchen über Entstehung hämolytischer Wirkungen durch die Kombination von Lipasen z. B. aus Pankreas mit Lipoiden könnte vielmehr die hämolytische Funktion nur als indirekte Folge eines lipolytischen Prozesses gelten. Sachs hält es nicht für angängig, den Wirkungsmechanismus derartiger Formen der Hämolyse, bei denen die Lipolyse der Hämolyse vorangeht und indirekt erst das hämolytisch wirkende Agens (vielleicht Fettsäuren) erzeugt, mit der Funktion der Serumhämolyse beherrschenden Amboceptor-Komplementwirkung in Parallele zu setzen. Er hält es für zweifelhaft und bisher unbewiesen, daß überhaupt Blutkörperchen durch Lipasen in der Weise angegriffen werden können, daß durch lipolytische Wirkung direkt Hämolyse erfolgt.

Zur Anbahnung einer Klärung der Meinungen, die so von verschiedenen Seiten für und wider die — immerhin recht bestechende — Auffassung über das Bestehen von Zusammenhängen zwischen Hämolyse und Lipolyse vorgebracht wurden, schien es uns wert, durch vergleichende Untersuchungen festzustellen, wie weit überhaupt ein Parallelismus zwischen lipolytischen und hämolytischen Funktionen des Serums nachweisbar wäre.

¹⁾ Landsteiner l. c.

²⁾ Sachs, Kolle-Wassermann II (2), S. 810.

³⁾ Bedenken gegen die Lipasetheorie bei der Kobragifthämolyse s. Bang l. c.

⁴⁾ Friedemann, Dtsch. med. Wochenschr. 1907, S. 585.

⁵⁾ Wohlgemuth, diese Zeitschr. 4, 271. 1907. — Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 8 u. 28.

⁶⁾ Noguchi, diese Zeitschr. 6, 185. 1907.

Eigene Versuche.

Die fettspaltenden Eigenschaften der von uns untersuchten hämolytischen bzw. komplettierenden Sera wurden festgestellt nach der von Rona und Michaelis¹⁾ angegebenen einfachen und exakten Tropfmethode mit dem bei der Untersuchung auf die Blutlipase am häufigsten angewendeten Tributyrin²⁾ als Substrat, seiner chemischen Konstitution nach einem echten Fett. Daneben wurde die hämolytische Wirkung oder der hämolytische Komplementgehalt gegenüber Hammelblut geprüft, und zwar berücksichtigten wir dabei einstweilen nur die Immnhämolytine. Diese Beschränkung der Untersuchung auf die hydrolytische Spaltung des Tributyrins, die zwar als echte Lipasewirkung anzusehen ist, einerseits und auf die Hammelbluthämolyse andererseits bedeutet natürlich eine gewisse Einseitigkeit, da die Möglichkeit, daß es verschiedene, teils gegen niedere teils gegen höher molekulare Ester gerichtete Lipasen gibt, nicht ausgeschlossen werden kann und so beispielsweise die Anwesenheit tributyrinspaltender Eigenschaften in einem Serum kein Beweis für das gleichzeitige Vorhandensein von Lipasen gegen komplizierter gebaute Ester zu sein braucht, die möglicherweise gerade bei der Hämolyse eine Rolle spielen könnten. So ließ auch die Prüfung der Fettspaltung und der Hämolyse unter verschiedenen Bedingungen, der einen z. B. bei Zimmertemperatur, der anderen bei 37° C, ferner die Verschiedenheit der Mechanismen bei der einfacheren Tributyrinspaltung und den weit komplizierteren Vorgängen der Hämolyse von vornherein keine allzu weitgehende Übereinstimmung der zu vergleichenden Funktionen, namentlich in zeitlicher und quantitativer Beziehung, erwarten.

Bei der Untersuchung auf die sogenannte Blutlipase hielten wir uns eng an die von Rona³⁾ gegebene Vorschrift. Wir verwendeten zum Nachweis der Spaltung des Tributyrins durch das Serum den von Rona und Michaelis für diesen Zweck angegebenen Tropfenzähler⁴⁾, eine einfache capillar zulaufende Röhre mit einer kugelförmigen Ausbauchung in der Mitte. Die stark oberflächenaktiven Glycerinester, so das Tributyrin, haben bekanntlich die Eigenschaft, die Oberflächenspannung des Wassers, in dem sie gelöst

1) Rona und Michaelis, diese Zeitschr. **31**, 343. — Rona im Handbuch der Biochem. Arbeitsmethoden Bd. VIII, S. 301.

2) Tributyrin Kahlbaum.

3) l. c.

4) Vereinigte Fabriken für Laboratorien, Berlin.

sind, stark zu erniedrigen, während ihre Spaltprodukte, das Glycerin und die Na-Salze der Fettsäuren ohne Einfluß auf die Oberflächenspannung des Wassers sind. Man zählt nun innerhalb von gewissen Abständen die Tropfen, die beim Ausfließen eines bestimmten an dem Tropfenzähler durch Marken bezeichneten Volumens der Flüssigkeit gebildet werden. Die gesättigte wässrige Tributyrinlösung zeigt dabei eine — im Verhältnis zu der des Wassers — große Tropfenzahl infolge der Verminderung der Oberflächenspannung. Gleichzeitig mit der Spaltung des Tributyrins und dem allmählichen Rückgang der Erniedrigung der Oberflächenspannung wird auch die Tropfenzahl geringer. Man erhält also aus der Tropfenzahl ein Maß für die Spaltung des Tributyrins, aus dem nach Untersuchungen von Rona und Ebsen¹⁾ auch Schlüsse auf die Menge des spaltenden Fermentes ohne weiteres gezogen werden können. Es ist nämlich die Geschwindigkeit, mit der die Spaltung vor sich geht, direkt proportional der Fermentmenge. Bei der Erörterung unserer Versuchsergebnisse begnügen wir uns zum Vergleich der Lipasemengen mit der Berücksichtigung der Zeiten, innerhalb deren ein Abbau des Tributyrins bis zu einer Tropfenzahl von 120 erfolgt. Der von uns verwendete Tropfenzähler besaß für Wasser eine Tropfenzahl von 94—98, für reine gesättigte wässrige Tributyrinlösung eine solche von 145—155. Die Zählung und ebenso auch die Einwirkung des Serums auf das Tributyrin ging bei Zimmertemperatur vor sich, die bei sämtlichen Versuchen zwischen 22 und 24° lag. Die nach der Vorschrift von Rona hergestellte, nicht mehr als 2 Tage alte Tributyrinlösung wurde jeweils versetzt mit einem Phosphatregulatorgemisch, bestehend aus einem Teil primären und 9 Teilen sekundärem Phosphat²⁾ (jedes $\frac{1}{3}$ molar), so daß die Lösung in bezug auf Phosphat $\frac{1}{30}$ molar wurde (Optimum der Blutlipase ca. $p_H = 8 - 8,5$), alsdann wurde diese Lösung mit dem zu prüfenden Serum gemischt und die Tropfenzählung innerhalb bestimmter Zeitabstände vorgenommen. Es wurden stets die nötigen Kontrollen mit inaktiviertem Serum angesetzt, wir beschränken uns aber bei der Wiedergabe der Versuchsprotokolle der Einfachheit halber auf die Angabe der Tropfenzahlen des Hauptversuchs ohne Kontrollen und verzichten auch auf die Wiedergabe des den jeweiligen Tropfenzahlen entsprechenden prozentischen Tributyringehalts, da unsere mit nur einer Pipette gewonnenen Tropfenzahlen für unsere Zwecke genügend vergleichbare Werte liefern.

I. Beziehungen zwischen hämolytischem Amboceptor und Blutlipase.

Bei der komplexen Natur der Serumhämolytine mußte die Erörterung der Frage, ob Beziehungen zwischen hämolytischen und lipolytischen Eigenschaften des Blutserums bestünden, besonders für hämolytischen Amboceptor und hämolytisches Kom-

¹⁾ Rona und Ebsen, diese Zeitschr. **39**, 32.

²⁾ Hergestellt aus 1 molarer Phosphorsäure (Kahlbaum) und n-NaOH, siehe Michaelis im Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden Bd. 3, S. 1337.

plement erfolgen. Nach dem mit hämolytischem Serum ange-
stellten Versuche Neubergs, der eine — allerdings nur wenig
— stärkere Spaltung von Olivenöl, Ricinusöl und Lecithin bei
dem Zusammenwirken von hämolytischem Amboceptor und Kom-
plement als durch komplementhaltiges Serum allein beobachtet
hatte, konnten Zusammenhänge zwischen hämolytischem Ambo-
ceptor und Blutlipase vermutet werden. Weitgehende Schlüsse
nach dieser Richtung, die auch Neuberg selbst vermeidet, ließ
diesen Versuch aber nicht zu, weil, wie schon Sachs betont,
wichtige Kontrollen über das lipolytische Vermögen des Immun-
serums allein und des entsprechenden Normalserums mit dem
komplettierenden Serum fehlen.

Wir prüften das Serum eines mit Hammelblutkörperchen
vorbehandelten Kaninchens, das einen Titer von 1 : 320 aufwies,
zunächst frisch, dann nach halbstündiger Erwärmung auf 56°
(Tab. I).

Tabelle I.

	Tributyrin Phosphat- gemisch ccm	Serum	Tropfenzahl nach Minuten					
			0	5	10	15	20	25
Hammelblut-Kanin- chen (36) Titer 1:320	10,0	0,04 aktiv	155	151	143	136	128	123
„	10,0	0,04 inaktiv $\frac{1}{2}$ Std. 56° C	156					154

Die in dem frischen Serum deutlich nachweisbaren
tributyrinspaltenden Eigenschaften gingen durch
halbstündiges Erhitzen auf 56° C verloren. Es fragte
sich nun, ob die lipolytische Funktion durch den Zusatz frischen
komplementhaltigen Meerschweinchenserums wieder herstellbar
sei und ob überhaupt das erhitzte amboceptorhaltige Serum
einen fördernden Einfluß auf die lipolytischen Fähigkeiten des
frischen Meerschweinchenserums besaß. Frisches Meerschwein-
chenserum mit reichlichem Gehalt an hämolytischem Komplement

Tabelle II.

	Tributyrin Phosphat- gemisch ccm	Serum	Tropfenzahl nach Minuten							
			0	5	10	15	20	25	30	50
Meerschweinchen 35	10,0	0,02 aktiv	151	150	148	143	138	132	126	109
Meerschweinchen 35 + Kaninchen 36	10,0	0,02 aktiv + 0,04 inaktiv	156	154	149	142	138	133	126	110

wurde zunächst allein und dann mit dem gleichen inaktivierten Kaninchenserum versetzt auf Fettspaltung untersucht (Tab. II).

Die Geschwindigkeit der Tributyrinspaltung war demnach dieselbe, gleichgültig ob frisches Meerschweinchenserum allein oder zusammen mit inaktiviertem, hämolytischem Kaninchenserum geprüft wurde. Hätte sich eine fördernde Einwirkung des inaktivierten, aber amboceptorenhaltigen Serums auf die Lipolyse des Meerschweinchenserums geltend gemacht, so hätte sich die Verstärkung der lipolytischen Fähigkeit in einem ganz entsprechend rascheren Abbau des Tributyrins bemerkbar machen müssen. Diese von Rona und Ebsen¹⁾ festgelegte Tatsache, daß nämlich die Geschwindigkeit der Spaltung proportional der Fermentmenge vor sich geht, konnten wir in einer Reihe von Versuchen bestätigen. Eine Summation trat auch ein beim Mischen verschiedener frischer Tiersera, z. B. von frischem Kaninchen- und Meerschweinchenserum, so auch gerade beim Mischen des bei dem eben angegebenen Versuch angewendeten aber aktiven Immunserums und des gleichen Meerschweinchenserums, so daß irgendwelche hemmende Einflüsse hier auszuschließen sind.

Auch in einer Anzahl anderer Versuche hatten inaktivierte hämolytische Immunsera mit hohem hämolytischen Titer (1 : 2400, 1 : 1200 usw.) keinerlei Einfluß auf die Tributyrinspaltung frischer Sera.

Ebensowenig ließen sich in dem Lipasegehalt verschiedener frischer Sera, die von unbehandelten und mit Hammelblutkörperchen vorbehandelten Kaninchen stammten und erhebliche Differenzen bezüglich ihres Gehalts an hämolytischen Amboceptoren aufwiesen (1 : 160, 1 : 320, 1 : 1200 usw.), Unterschiede nachweisen, die mit dem Amboceptorgehalt in Beziehung zu bringen wären. Die bei diesen Sera in ihrem Fettspaltungsvermögen beobachteten Unterschiede waren vielmehr äußerst geringe und gingen keineswegs parallel dem Verhalten des hämolytischen Titers. Wir kommen auf diese Verhältnisse später noch zurück. Nach diesen Versuchen konnten irgendwelche Zusammenhänge zwischen dem Gehalt der untersuchten Immunsera an hämolytischen Amboceptoren und ihrem Gehalt an Blutlipase als ausgeschlossen gelten.

¹⁾ l. c.

II. Beziehungen zwischen hämolytischen Gesamtkomplement und Blutlipase.

In den oben angeführten Versuchen zeigten nur solche Sera lipolytische Eigenschaften, die frisch und unerhitzt waren und gleichzeitig hämolytisches Komplement enthielten, während durch Erwärmen auf 56° gleichzeitig mit dem Komplementschwund auch ein Lipaseschwund erfolgte. Wenn die Lipase irgendeine Rolle bei dem Zustandekommen der Hämolyse spielte, so konnte sie diese nur im Bereiche der Komplementwirkung ausüben.

Es fiel uns auf, daß Meerschweinchenserum, das von allen Tierarten am meisten Komplement enthielt, auch am reichlichsten Lipase besaß, daß Hammelserum beispielsweise in unseren Versuchen weder hämolytisches Komplement noch Lipase aufwies. Wir verglichen daher den Komplement- und den Lipasegehalt von Sera verschiedener Tierarten genauer.

Der Gehalt an hämolytischem Komplement wurde in der üblichen Weise mit 10–20fach sensibilisierten Hammelblutkörperchen geprüft. Die gefundenen Werte beziehen sich in allen Fällen auf die Lyse von 0,5 ccm 5proz. Hammelbluts bei einem Gesamtvolumen von 2,5 ccm Flüssigkeit (0 = keine, Spch = Spürchen, Sp = Spur, w = wenig, m = mäßige, fk = fast komplette, k = komplette Hämolyse). Ablesung nach 1^h Brutschrank und am nächsten Tage.

Tabelle III.

Tierart	1. Komplementtitration					2. Lipase											
	Hämolyse bei Serumverdünnung					Tributyrin-Phosphat	Serumaktiv	Tropfenzahl nach Minuten									
	0,1	0,05	0,04	0,02	0,01			0	10	20	30	40	60	120	150		
Kaninchen . . .	k	m	w	0	0	10,0	0,02	156	148	140	130	120					
Meerschweinchen		k	k	fk	Spch	10,0	0,02	155	136	121							
Hammel		0	0	0	0	10,0	0,08	155	155	158							
Ratte		k	fk	m	g	10,0	0,08	155	151	150	145	143	134	116	153	158	
Hund		Spch	g	0	0	10,0	0,08	154	152	154	147		1	129	119		

Eine gewisse Übereinstimmung in dem Gehalt an Lipase und Komplement ist bei einzelnen der untersuchten Sera nicht zu leugnen. So läßt sich im Hammelserum weder Komplement noch Lipase nachweisen, im Kaninchen- serum fand sich etwas weniger als die Hälfte Komplement und etwa halb soviel Lipase wie im Meerschweinchenserum, im Hundeserum waren nur sehr geringe Mengen Komplement und ebenfalls nur Spuren Lipase vorhanden. Im Rattenserum dagegen

ließ sich eine derartige Übereinstimmung wenigstens in quantitativer Beziehung nicht nachweisen, es fand sich hier ein Komplementgehalt, der etwa $\frac{4}{5}$ des Komplementgehalts des Meerschweinchenserums, aber eine Lipasemenge, die im Verhältnis zum Meerschweinchenserum nur etwa $\frac{1}{16}$ betrug. Nun ist zweifellos ein Vergleich der in Frage kommenden Verhältnisse nicht möglich ohne genaue Kenntnis der bei den verschiedenen Tierarten und namentlich bei der Kombination von Sera verschiedener Tierarten vorkommenden und vermutlich auch unabhängig vom Komplementgehalt auftretenden auxilytischen und auch der hämolysehemmenden Funktionen¹⁾. Auch die Beschränkung unserer Untersuchungen auf die Tributyrinspaltung ist hier zu berücksichtigen. Wir verzichteten daher einstweilen auf eine weitere Untersuchung der Verhältnisse bei den Seris verschiedener Tierarten und begnügten uns mit den eben dargelegten Feststellungen, die sich in mehreren Versuchen bestätigen ließen.

Von Interesse war ferner die Frage, ob die bei Tieren derselben Species gelegentlich zu beobachtenden geringen Verschiedenheiten des Komplementgehalts auch im Lipasegehalt der Sera zum Ausdruck kämen. Die gleichzeitige Untersuchung verschiedener Meerschweinchensera auf Komplement und Lipase hatte folgende Ergebnisse.

Tabelle IV.

1. Gesamtkomplementtitration							2. Lipase										
Tierart	Hämolyse bei Serumverdünnung						Tributyrinphosphat	Serum	Tropfenzahl nach Minuten								
	0,05	0,04	0,02	0,01	0,005	0			5	10	15	20	25	30	40		
Meerschweinchen	59	k	k	k	k	g	10,0	0,02	149	134	121	114					
"	60	k	k	k	g	0	10,0	0,02	148	140	134	132	128	122			
"	65	k	k	k	m	0	10,0	0,02	154	146	138	130	124	117			
"	66	k	k	k	Sp	0	10,0	0,02	145	139	133	126	119				
"	53	k	k	k	0	0	10,0	0,02	155	149	144	138	131	127	119		
"	47	k	k	k	k	m	10,0	0,02	157	146	133	120	113	110			

Hier war also eine weitgehende Analogie zwischen Komplement- und Lipasegehalt zu konstatieren. Annähernd gleichen Komplementgehalt (0,02) finden wir bei Meerschweinchen 60, 65 und 66, entsprechend ist auch der Lipasegehalt ein annähernd gleicher, die Tropfenzahl 120 wird fast zur

¹⁾ Vgl. u. a. Leschly, Die Komplemente verschiedener Tiere. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **25**, 107. 1916.

selben Zeit nach 20—25 Min. erreicht. Fast doppelt so groß ist der Komplementgehalt bei Meerschweinchen 59 und 47 (0,01), der Abbau des Tributyrins vollzieht sich ebenfalls fast doppelt so rasch wie bei den drei erstgenannten Tieren (Tropfenzahl 120 in 10 bzw. 15 Min.). Tier 53 weist die Hälfte des Komplementgehalts der Tiere 60, 65 und 66 auf (0,04); die Tropfenzahl 120 wird nach etwa 40 Min. erreicht, also nach der doppelten Zeit, was auch nur der Hälfte der Lipasemenge entsprechen würde.

Ein ähnlicher Parallelismus zwischen Lipase- und Komplementgehalt ließ sich auch in mehreren Versuchen, auf deren Wiedergabe verzichtet sei, bei Kaninchen, sowohl normalen als auch mit Hammelblut immunisierten, deren Serum reichliche Amboceptoren Mengen aufwies, nachweisen, denselben Tieren, bei denen, wie oben erwähnt, ein Parallelismus zwischen Amboceptor- und Lipasegehalt nicht zum Ausdruck gekommen war (s. S. 194).

Während in den bisherigen Versuchen eine Übereinstimmung in dem Verhalten des hämolytischen Gesamtkomplements und der Blutlipase nicht zu verkennen war, traten bei weiteren Untersuchungen, die das Verhalten der beiden Serumfunktionen unter den Bedingungen feststellen sollten, die bekannterweise zu einer Zerstörung der Gesamtkomplementwirkung, zur Inaktivierung, führen, gewisse Unterschiede auf. Diese Unterschiede aber deuteten darauf hin, daß wiederum Zusammenhänge zwischen Blutlipase und einer der Komponenten des Komplements vorhanden wären, über dessen komplexen Bau wir seit den Untersuchungen Ferratas unterrichtet sind.

Nach den Feststellungen Ferratas¹⁾ wird bei der Dialyse die Komplementwirkung in zwei Komponenten zerlegt. Die eine Komponente ist in der Globulinfraktion, die andere in der Albuminfraktion enthalten. Erst durch das Zusammenwirken der beiden Teile, die allein unwirksam sind, erfolgt eine Hämolyse sensibilisierten Blutes. Sachs und Altman²⁾ verwendeten zur Trennung der beiden Komponenten mit Salzsäure angesäuertes Wasser, Liefmann³⁾ die Durchleitung von Kohlensäure durch das mit Aq. dest. verdünnte Serum. Alle 3 Methoden erzielen eine Fällung des Euglobulin, an das ein Teil des Komplements gebunden erscheint, während der andere Teil in der überstehenden Flüssigkeit verbleibt. Der

¹⁾ Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 13.

²⁾ Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 10 u. 14.

³⁾ Münch. med. Wochenschr. 1909, Nr. 41.

Niederschlag enthält das sogenannte „Mittelstück“, die überstehende Flüssigkeit das „Endstück“¹⁾ (Brand).

Es zeigte sich beispielsweise, daß bei der Inaktivierung von Meerschweinchenserum durch Stehenlassen bei Zimmertemperatur trotz des Schwindens der Gesamtkomplementwirkung noch Lipase nachweisbar war. Die weitere Untersuchung ergab, daß hier die Mittelstückfunktion unwirksam geworden war, während gleichzeitig mit dem Endstück auch die Lipase noch erhalten war.

Es erhob sich daher die Frage, ob Beziehungen der Lipase zu Mittelstück und Endstück auch unter anderen Bedingungen nachweisbar wären.

III. Beziehungen zwischen Mittelstück, Endstück und Blutlipase.

Wir zerlegten das Komplement nach der vielfach erprobten Methode von Liefmann mittels Fällung durch Kohlensäure.

Je 1 ccm frisches Meerschweinchenserum wurde mit destilliertem Wasser (1 : 5) verdünnt und reine Kohlensäure im langsamen Strom bis zur maximalen Trübung durchgeleitet. Dann wurde zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgossen, mit 10proz. NaCl-Lösung auf einen NaCl-Gehalt von 0,85% gebracht und das Sediment mit der dem ursprünglichen Serumvolumen entsprechenden Menge ($\frac{1}{1}$) Kochsalzlösung (0,85%) kurz vor der Verwendung gelöst.

In zahlreichen Versuchen fanden wir im mittelstückhaltigen Sediment nie, im endstückhaltigen Abguß immer Lipase. Entsprechend der Schwächung des Endstücks bei der Kohlensäuredurchleitung²⁾ war auch — anscheinend abhängig von der Menge der durchgeleiteten CO_2 — die Menge der im Abguß enthaltenen Lipase geringer als im unbehandelten Serum. Irgendein fördernder oder hemmender Einfluß des frisch verwendeten Sediments auf die Lipase konnte nicht festgestellt werden (vgl. Tab. V, Vers. 55, 5).

Die im folgenden angegebenen Endstücktitrationen wurden mit 5% Hammelblutkörperchen vorgenommen, die mit der 10–20fachen lösenden Amboceptorosis sensibilisiert waren und außerdem auf 0,5 ccm Blut 0,1 ccm des $\frac{1}{1}$ verdünnten Mittelstücks gewonnen durch Kohlensäurefällung enthielten (persensibilisierte Blutkörperchen).

¹⁾ Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 34.

²⁾ Leschly, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 23, 44. 1918.

Die Titration auf Mittelstück erfolgte mit ebenfalls 10–20fach sensibilisierten Blutkörperchen, die auf 0,5 ccm Blut 0,5 des wie ursprünglich $\frac{1}{5}$ verdünnten Endstückes enthielten.

Tabelle V.

Versuch 55. 0,5 ccm 5 proz. persensibilisiertes Hammelblut [10f. Amboceptor und auf 0,5 ccm Hammelblut 0,1 ccm des 1:1 verdünnten (auf das ursprüngliche Serumvolumen aufgefüllten) Sediments]. Abguß in der ursprünglichen Konzentration 1:5, Gesamtvolumen 2,5 ccm. Kontrollen mit Abguß bzw. Sediment allein + 10f. sensibilisierte Hammelblutkörperchen keine Hämolyse.

	1. Endstücktitration				2. Lipase (Tributyrinphosphatgemische je 10 ccm)						
	Serum od. Abgußverdünnungen				Menge	Tropfengehalt nach Minuten					
	0,5	0,4	0,2	0,1		0	5	10	15	20	120
1. Meerschweinchenserum unbehandelt $\frac{1}{10}$ verdünnt	k	k	k	Sp	0,2	148	141	138	126	119	
2. Dasselbe mit CO ₂ behandelt, unzentrifugiert, $\frac{1}{10}$ verdünnt . .	k	k	k	Sp	0,2	149	141	131	122	115	
3. Abguß (isot.) $\frac{1}{10}$ verdünnt . .	k	k	k	Sp	0,2	149	141	132	123	115	
4. Sediment $\frac{1}{10}$ verdünnt					0,2	161	148	147		148	148
5. Meerschweinchenserum unbehandelt $\frac{1}{10}$ verdünnt + Sediment $\frac{1}{10}$ verdünnt					0,2+0,2	145	187	182	123	117	

Die nach der Kohlensäurebehandlung des Serums geprüften Dosen (Serum 1:5 verdünnt) waren doppelt so groß wie die mit dem unbehandelten Meerschweinchenserum verwendeten Mengen (Serum 1:10 verdünnt). Aber trotz der doppelten Dosis ergab die Endstücktitration und die Tropfenzählung mit dem mit Kohlensäure behandelten Serum nur annähernd dieselben Werte wie bei der Untersuchung des doppelt so stark verdünnten unbehandelten Meerschweinchenserums. Es konnte also nach der Kohlensäuredurchleitung sowohl in der unzentrifugierten trüben Flüssigkeit (2) als auch im Abguß nach dem Zentrifugieren (3) nur halb so viel Endstück vorhanden sein. Ganz entsprechend war auch nur die Hälfte der im unbehandelten Meerschweinchenserum (1) nachweisbaren Lipase festzustellen.

Der Vergleich der „Endstück“funktion und der lipolytischen Eigenschaften von Sera verschiedener Tierarten hatte Ergebnisse, die fast zahlenmäßig sich wie die in Tab. III niedergelegten verhielten. Wenn auch hier wieder-

um in quantitativer Beziehung gewisse Differenzen, die durch die Kompliziertheit der Vorgänge bei Mischung von Sera verschiedener Tierarten erklärt werden könnten (s. S. 196), zu beobachten waren, so berechtigen diese Versuche doch zum mindesten zu dem Schluß: dort, wo Endstück nachweisbar war, waren auch lipolytische Eigenschaften vorhanden, so z. B. im Hunde-, Kaninchen-, Ratten- und Meerschweinchen-serum, während dort, wo wir Endstück vermißten (Hammel), auch der Nachweis von Lipase mißglückte. Der Eintritt von Hämolyse ohne die Anwesenheit der lipolytischen Funktion des Serums wurde nie beobachtet. Mit der Mittelstückfraktion waren auch hier irgendwelche Zusammenhänge nicht nachweisbar.

Weitere Zusammenhänge zwischen Endstück und Lipase fanden sich bei der Thermoaktivierung. Wir erhitzen frisches Meerschweinchen-serum im Wasserbade bei 52–53° und entnahmen in Abständen von 10 Minuten Proben, die wir auf Endstück und Lipase untersuchten.

Tabelle VI.

Versuch 66. Endstücktitration mit persensibilisierten Hammelblutkörperchen (s. Tab. V).

1. Endstücktitration						2. Lipase (Tributyryn-Phosphat je 10 ccm, Serum je 0,02)							
Serum bei 52–53°	Serumverdünnungen					Tropfenzahl nach Minuten							
	0,1	0,05	0,04	0,02	0,01	0	10	20	30	40	60	100	120
1. Vorher . . .	k	k	k	k	Sp	145	133	119					
2. 10 Minuten	k	k	k	m	0	144	139	136	128	121			
3. 20 Minuten	k	m	w	g	0	150	148	146	145	142	138	121	
4. 30 Minuten	g	g	0	0	0	151						138	
5. 40 Minuten	0	0	0	0	0	142							142
6. 50 Minuten	0	0	0	0	0	146							144

Während in diesem Versuch, dessen Ergebnisse in einem anderen, unter denselben Bedingungen angestellten Versuch bestätigt wurden, „Mittelstück“ noch nach zweistündigem Aufenthalt des Serums bei 52–53° fast unverändert nachweisbar blieb, also ein Parallelismus zwischen Mittelstück und Lipase fehlte, war Endstück nach 10 Min. auf die Hälfte, nach 20 Min. auf $\frac{1}{5}$ des ursprünglichen Wertes geschwunden, nach 30 Min. waren nur noch Spuren vorhanden, gleichzeitig wurde bei der Einwirkung

des Serums auf die Tributyrinlösung die Tropfenzahl 120 vor der Behandlung in 20 Min., nach 10 bzw. 20 Min. Inaktivierung in 40 bzw. 100 Min. erreicht, ganz entsprechend also der Hälfte bzw. einem Fünftel der ursprünglichen Lipasemenge; später waren überhaupt nur noch minimale Spuren nachweisbar.

Nicht nur bei der Inaktivierung durch Hitze, sondern auch unter verschiedenen anderen Bedingungen, so bei der Inaktivierung durch Stehenlassen bei Zimmertemperatur, bei der Absorption durch Kaolin, bei der ersten Phase der Wassermannreaktion, bei der spezifischen Komplementbindung sahen wir ein weitgehend übereinstimmendes Verhalten der „Endstück“- und der lipolytischen Funktion des Meerschweinchen-serums. Wir möchten uns vorbehalten, über diese Ergebnisse, deren quantitative Verhältnisse namentlich ein eingehendes Studium erfordern, erst später zu berichten. Irgendwelche hemmende oder fördernde Einflüsse der Mittelstückfunktion oder überhaupt irgendwelche Beziehungen von dieser zu der lipolytischen Wirkung fanden sich nicht, auch mit der sogenannten „dritten Komponente“, deren Existenz von Sachs und seinen Mitarbeitern angenommen wird, scheinen Zusammenhänge nicht zu bestehen.

Wenn auch unsere Untersuchungen allzu weitgehende Schlußfolgerungen über eine etwaige Identität der „Endstück“- und der lipolytischen Funktion des Serums nicht erlauben, so spricht doch das unter den verschiedensten Bedingungen übereinstimmende Verhalten zum mindesten sehr für einen weitgehenden Parallelismus dieser Serumwirkungen. Vermutlich wird die Ausdehnung unserer Untersuchungen, die sich zur Gewinnung eines orientierenden Überblicks bisher auf die Spaltung des Tributyrins, also eines echten Fetts, beschränkten, auf das Spaltungsvermögen gegenüber komplizierter gebauten Fetten und fettähnlichen Substanzen übereinstimmende Ergebnisse haben (s. S. 191). Alles in allem erscheint von den Komponenten, die bei den Vorgängen der Serumhämolyse beteiligt sind, gerade das Endstück noch am ehesten mit Enzymen oder Funktionen, die wir bisher als katalytische bezeichnen, vergleichbar¹⁾. Was die Beziehungen

¹⁾ Vgl. Liefmann, Jahresber. üb. d. Ergebnisse d. Immunitätsforsch. (W. Weichardt, Bd. VIII. 1912).

des Endstücks zu den amboceptorbeladenen Blutkörperchen betrifft, so wird mit Brand¹⁾ wohl fast allgemein angenommen, daß das Endstück erst dann in Aktion tritt, wenn die Mittelstückeinwirkung auf die roten Blutkörperchen erfolgt ist, genau wie die Wirkung des Gesamtkomplements erst nach der Amboceptorbindung eintritt. Eine Einwirkung des Endstücks auf die roten Blutkörperchen scheint also erst durch Vermittlung des Mittelstücks und Amboceptors zu erfolgen. Nehmen wir nun an, die Endstückfunktion sei eine lipolytische, so ließe sich mit der erwähnten Auffassung sehr wohl die Hypothese in Einklang bringen, daß Lipotide der roten Blutkörperchen — vorher in unangreifbarem Zustand vorhanden — durch Vermittlung von Amboceptor und Mittelstück der lipolytischen Wirkung des Endstücks anheimfallen und daß so die Hämolyse erfolge.

¹⁾ Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 34.

Über wasserlösliche Vitamine und gärungsbeschleunigende Verbindungen.

I. Mitteilung.

Methodik der Bestimmung und Darstellung der gärungsbeschleunigenden Substanz aus Hefe und Reiskleie.

Von

Sigmund Fränkel und Erik Schwarz.

(Aus dem Laboratorium der Ludwig Spiegler-Stiftung in Wien.)

(Eingegangen am 18. Juli 1920.)

Mit 12 Abbildungen im Text.

Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat es sich durch zahlreiche Beobachtungen und Untersuchungen verschiedener Forscher aller Weltteile herausgestellt, daß eine kalorisch völlig zureichende Nahrung, welche Eiweißkörper in ausreichender Menge besitzt, und ebenso alle notwendigen Aschenbestandteile, trotzdem für den schadlosen Ablauf des Stoffwechsels und die Erhaltung des Organismus nicht ausreicht und ebensowenig den normalen Wachstumsbedarf heranwachsender Tiere unterhalten kann. Denn für diese Leistungen sind außer den Calorienträgern, Eiweiß, Fetten und Kohlenhydraten und anorganischen Salzen, welche die Ionen der Salzsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure und Kieselsäure, ferner des Natriums, Kaliums, Calciums, Magnesiums und Eisens, ferner kleinste Mengen Jod enthalten, noch kleine Mengen gewisser Verbindungen organischer Natur notwendig, über deren Natur noch großes Dunkel herrscht. Im Laufe der Untersuchungen aber stellte es sich heraus, daß zwei, vielleicht auch drei solcher Gruppen von Verbindungen zu unterscheiden sind, für welche die Forscher eine Reihe von Namen gefunden haben, ohne damit der Art und dem Wesen der Verbindungen nähergekommen zu sein. Solche Namen sind: Akzessorische Nährstoffe, Vitamine.

wachstumsfördernde Substanzen, Eutonine usw. Man sieht aber bald, daß die Stoffe dieser Art in ihren Wirkungen und anscheinend auch in ihrer chemischen Zusammensetzung, wie aus den verschiedenen Angaben zu schließen ist, verschieden sind. So finden sich die einen in wässerigen Extrakten, während die anderen glatt fettlöslich sind und auch in die fettlösenden Reagenzien übergehen, während andere wieder z. B. in Äther oder Petroläther völlig unlöslich sind.

Insbesondere die Erscheinungen der Beriberi-Krankheit, die sich experimentell leicht erzeugen ließen, wurden mit großem Eifer studiert, da sie sowohl dem Tierexperiment als auch den Massenbeobachtungen bei Menschen zugänglich waren. Die Beriberierkrankung in Japan hat die Form einer Polyneuritis und tritt besonders bei den armen Volksklassen auf, deren hauptsächliche Nahrung der Reis ist. Seitdem auch in Japan der polierte Reis sich völlig eingeführt hatte, und damit die Beriberierkrankung zunahm, war es wahrscheinlich geworden, daß zwischen den beiden Erscheinungen, Nahrung mit poliertem Reis und der Beriberierkrankung ein genetischer Zusammenhang besteht.

Die Erscheinung der Beriberi war nun leicht ins Tierexperiment übertragbar, ebenso die Heilungsversuche, da es schon im Jahre 1897 Eijkman¹⁾ gelungen war, bei Hühnern (später wurden Tauben verwendet) durch einseitiges Füttern mit gekochtem, poliertem Reis, charakteristische Symptome der Hühnerpolyneuritis zu erzeugen. Damit war das experimentelle Studium der Beriberierkrankheit einerseits, andererseits das experimentelle Studium der Heilmittel der Beriberi ermöglicht. Eijkman selbst konnte alsbald zeigen, daß Tiere, die nach dem Füttern mit poliertem Reis die charakteristischen Krankheitserscheinungen aufwiesen, beim Verfüttern von unpoliertem Reis wieder gesunden. Wenn man neben dem polierten Reis den erkrankten Tieren Reiskleie zur Nahrung zugibt, so gesunden sie ebenfalls. Es war also klar, daß die Reiskleie der Träger einer Substanz ist, bei deren Verfütterung es bei den gesunden Tieren nicht zu den Erscheinungen der Polyneuritis kommt und die in der Lage ist, polyneuritisch erkrankte Tiere, deren Polyneuritis auf die einseitige Ernährung mit poliertem Reis zurückzuführen war, wieder zu heilen. Es stellte sich durch seine Untersuchung heraus, daß diese Substanz in der Fruchthülle (dem Perikarp), die man beim Reis das Silberhäutchen nennt, enthalten war. Ebenso wie die ganze Kleie oder das Silberhäutchen wirkten auch Extrakte aus dem Silberhäutchen selbst.

Im letzten Jahrzehnt hat die Untersuchung auf breiter Basis gezeigt, daß es durchaus nicht die Reiskleie allein ist, die Substanzen dieser Art enthält, sondern daß man in verschiedenen pflanzlichen und tierischen Geweben, so in der Hefe, dem Eidotter usw. Substanzen gleicher Wirksamkeit finden könne. Aber es wurde auch gezeigt, daß das Fehlen dieser Substanzen in der Nahrung bei verschiedenen Tieren sehr verschieden-

¹⁾ Eijkman, Virchows Archiv, 148, 523; 149, 187. 1897.

artig sich äußert. Während bei Hühnern und Tauben bei einseitiger Verfütterung von poliertem Reis die Erscheinungen der Beriberi zu beobachten sind, leiden bei gleicher Fütterungsart Meerschweinchen an Skorbut, bei Mäusen tritt Abmagerung und Krämpfe ein. Bei vielen Tieren sieht man das Auftreten von Wachstumshemmungen^{1) 2) 3) 4) 5)}.

Im Laufe der Untersuchungen zeigte es sich, daß insbesondere die Milch und das Butterfett Substanzen dieser Art enthalten. Man sah aber auch, daß man durch Extraktion von Nahrungsmitteln durch Wasser, Alkohol und Äther oder durch Erhitzen auf 120°, was ihren Nährwert nicht im geringsten tangierte, sie doch insuffizient machen konnte, und zwar in der Weise, daß bei ausschließlicher Verwendung solcher Nahrungsmittel Krankheitserscheinungen auftraten, die alsbald verschwanden, wenn man nur wenig Reiskleie oder Hefe oder Dotter oder Milch der Nahrung zusetzte, daß in gleicher Weise eine Reihe von frischen Gemüsen, deren Nährwert als solcher nur gering zu veranschlagen ist, in kleinen Mengen der insuffizienten Nahrung zugesetzt, diese suffizient machte.

Die Wachstumshemmung durch insuffiziente Nahrung insbesondere durch Verfütterung chemisch reiner Substanzen, läßt sich z. B. durch Zusatz von geringen Mengen Milch und Ätherauszügen aus alkoholischem Hefeextrakt beheben. Wachstumshemmungen durch eine solche reine, jedoch fettlose Nahrung werden auch alsbald ausgeglichen, wenn man Butterfett oder ätherische Extrakte aus lipoidreichen Substanzen (z. B. Fischhoden, Schweinenieren) verabreicht. Aber nicht alle Futterarten haben die gleiche Wirkung. Dem Olivenöl und dem Baumwollsamensöl⁶⁾, ebenso dem Schweinefett kommen diese Wirkungen nicht zu. Die Vermutung, daß der Unterschied im Lipoidgehalt solcher Fette liege, war aber unzutreffend, da reine Lipide diese Wirkung auch nicht zeigten.

Es muß bei Durchsicht des Schrifttums über experimentelle Untersuchungen dieser Art klar werden, daß wir zwei große Gruppen zu unterscheiden haben, und zwar solche Verbindungen, die in Wasser unlöslich, aber sowohl in Fett als auch in organischen Solvenzien, insbesondere in Äther löslich sind und Verbindungen, die im Wasser und Alkohol löslich sind, und die sich mit organischen Solvenzien wie Äther, Petroläther und ähnliche aus der wässrigen Lösung nicht ausschütteln lassen.

Da man nun durch den Tierversuch die Möglichkeit hatte, zu erfahren in welcher Fraktion eines irgendwie bereiteten Extrakts die wirksame Verbindung enthalten sei, so war dadurch auch die Möglichkeit gegeben,

1) F. Hofmeister, Ergebnisse d. Physiologie. **16**, S. 1 u. 510. 1918.

2) Axel Holst und Fröhlich, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **72**, 51, 1012; **75**, 334. 1913.

3) F. G. Hopkins, Journ. of Physiol. **4**, 425. 1912.

4) Th. Osborn und Lafayette Mendel, Journ. of Biolog. chem. **22**, 241. 1915; **26**, 1. 1916; Ch. C. 1917. I. 592.

5) C. V. Mc. Collum und M. Davis, Journ. of Biolog. chem. **19**, 245. 1914; Ch. C. 1915. **2**. 905.

6) W. Stepp, Zeitschrift für Biologie **66**, 339 u. 365. 1916.

die chemische Untersuchung nach den wirksamen Substanzen aufzunehmen. Und es hat an Versuchen dieser Art trotz der Kostspieligkeit dieser Experimente nicht gemangelt.

Die experimentelle Forschung schlug den Weg ein, in den Extrakten, von deren Wirksamkeit man sich überzeugt hatte, durch Fällung mit verschiedenen Reagenzien, Niederschläge zu erhalten und aus diesen Substanzen zu isolieren, deren Wirksamkeit oder Nichtwirksamkeit in der Weise konstatiert wurde, daß man künstlich beriberikranke Tiere durch Einspritzen oder Verfüttern dieser Substanzen zu heilen versuchte.

Insbesondere die Japaner Suzuki, Shimamura und Otake¹⁾ haben aus Reiskleie solche Verbindungen darzustellen versucht, unter der chemischen Voraussetzung, daß es sich um Basen handelt. Einen ähnlichen Weg hat Kasimir Funk²⁾ eingeschlagen. Aber bei den Versuchsreihen ist es durchaus zweifelhaft geblieben, ob die Forscher zu einheitlichen Verbindungen gelangt sind, die die gesamte Wirkung des Extraktes beinhalten, oder ob nicht die schon in sehr kleinen Mengen wirksamen Verbindungen ihren Präparaten, deren Einheitlichkeit eben nicht erwiesen ist, adhären. So fehlt vor allem der Gegenversuch, ob die Lösungen, aus denen die Substanzen niedergeschlagen waren (die Mutterlaugen), wirksam waren oder nicht.

Es sei hier vorerst die Arbeitsweise von Suzuki¹⁾ und Funk²⁾ wiedergegeben:

Die japanischen Forscher extrahierten Reiskleie mit 90% Alkohol in der Wärme, engten die Extrakte ein und schüttelten sie behufs Entfernung von Fett mit Äther aus. Der Extrakt wurde in bekannter Weise mit Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure gefällt, wobei man einen Überschuß von Phosphorwolframsäure vermeiden muß, da die wirksame Substanz, wie aus anderen Arbeiten hervorgeht, im Überschuß der Phosphorwolframsäure löslich ist. Man zerlegt den Niederschlag in bekannter Weise mit Ätzbaryt und engt die wässrige Lösung im Vakuum ein. Diese Lösung wird nun mit wässriger Tanninlösung gefällt und aus dem Tanninniederschlag mit verdünnter Schwefelsäure die Substanz herausgelöst. Mit Ätzbaryt entfernt man Schwefelsäure und Tannin. Aus dieser Lösung kann man, wenn sie sehr konzentriert ist, ein Pikrat erhalten, doch war die Ausbeute sehr schlecht. Die Forscher nannten diese Substanz „Oryzanin“. Dieses Oryzanin gab bei der Hydrolyse Nicotinsäure, Cholin und Traubenzucker.

Funk hat in ähnlicher Weise wie die Japaner gearbeitet, indem er mit Phosphorwolframsäure fällte und in der üblichen Weise zerlegte. Er neutralisierte dann die Lösung mit Salzsäure, zog sie mit Alkohol aus und fällte mit Sublimat. Aber dieses machte bei ihm keine Trennung, da Niederschlag und Filtrat wirksam waren. Schließlich fällte er mit Silber und Baryt und erhielt eine Substanz, die er für chemisch rein hielt und der

¹⁾ Suzuki, Shimamura und Otake, Journ. of trop. med. a. Hyg. 15, 352. 1912. Diese Zeitschr. 43, 89. 1912.

²⁾ C. Funk, Ergebnisse der Physiol. 13, 126. 1913

er den Namen „Vitamin“ gab. Später aber stellte es sich heraus, daß diese Substanz kein reiner Körper sei, sondern sich noch weiter fraktionieren läßt.

Auch Edie und seine Mitarbeiter¹⁾, denen es gelungen ist, wirksamere Präparate herzustellen, als die von Funk, gehen von Hefe aus, die sie mit Methylalkohol ausziehen, verarbeiten den gewonnenen Extrakt mit Gips, um ihn wieder mit Methylalkohol zu extrahieren, fällen den Extrakt mit wässriger Lösung mit Bleiacetat, verwerfen den Niederschlag, zerlegen die Lösung mit Schwefelwasserstoff, extrahieren mit absolutem Alkohol und fällen wie Funk mit Silbernitrat und Ätzbaryt. Sie erhalten dann das Nitrat einer Verbindung, die sie „Torulin“ nennen, die zehnmal so wirksam ist als Funks „Vitamin“.

Ebenso befaßte sich Abderhalden²⁾ mit der Isolierung der wirksamen Substanzen, denen er den Namen „Eutonine“ gab. Er ging dabei von nicht vollkommen getrockneter Hefe aus, hydrolysierte sie mit verdünnter Schwefelsäure, neutralisierte mit Kalkmilch und knetete den erhaltenen Syrup mit Gips zu einer festen Masse, die er mit hochprozentigem Alkohol auszog. Der alkoholische Syrup wurde mit 25% Schwefelsäure versetzt und mit Aceton vollständig ausgefällt. Der Niederschlag wurde mit absolutem Alkohol ausgezogen und die Prozedur noch zweimal vorgenommen. Der dritte Acetonniederschlag wurde mit Sublimatlösung gefällt und der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das durch Extraktion mit Alkohol gewonnene salzsaure Salz zeigte sich sehr wirksam. Zur weiteren Reinigung wurde der Syrup noch 2 mal mit Sublimat gefällt. Die schließlich erhaltene Substanz gab mit Platinchlorid eine Fällung und zeigte eine zehnmal größere Wirksamkeit als die Substanz Funks. Die Analyse ergab aber keine auf eine Formel stimmenden Werte.

Man sieht, daß die großen Schwierigkeiten bei diesen Untersuchungen sowohl in der chemischen Aufarbeitung, da die Substanz in sehr geringen Mengen vorliegt, als insbesondere in der jeweiligen Konstatierung liegen, in welchem Anteil die Substanz enthalten ist und ob sie ein Fällungsmittel oder ein Lösungsmittel nur teilweise oder gänzlich aufgenommen hat. So kommt es, daß trotz der Verwendung sehr großer Mengen dieser im Frieden so billigen und leicht zugänglichen Ausgangsmaterialien, wie Reiskleie, Hefe, Eidotter usw. alle diese Forscher nur zu so geringen Mengen wirksamer Substanz gekommen sind, daß weder verlässliche Analysen noch verlässliche Untersuchungen über die Hydrolyse dieser Substanz im Schrifttum vorliegen.

Die experimentelle Schwierigkeit ist um so größer, als man zu jeder Zeit im richtigen Stadium erkrankte Tiere für die Heil-

¹⁾ E. S. Edie und Mitarbeiter, *Ann. of trop. med. a. parasit.* **6**, 234. 1912.

²⁾ E. Abderhalden und H. Schaumann, *Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol.* **172**, 88 u. 156. 1918.

versuche bereit halten muß. Es wurden im hiesigen Institut schon im Jahre 1914 und 1915 Versuche gemacht, die im Jahre 1916 zum Patentschutz¹⁾ angemeldet wurden, welche von der Idee ausgingen, zu sehen, was Stoffe dieser Art bzw. Extrakte, die solche Stoffe enthalten, auf einzellige Organismen für Wirkung ausüben. Als wir Extrakte aus Reiskleie und aus Hefe in kleinster Menge zu gärender Hefe zusetzten, beobachteten wir, daß die Hefegärung in sehr großem Maße beschleunigt wird. Nun ist aber die Beschleunigung der Hefegärung durch verschiedene Mittel gewiß keine unbekannte Tatsache. Es war bekannt, und dies insbesondere aus den älteren Arbeiten von Wildiers²⁾, welche an den bekannten Streit zwischen Liebig und Pasteur anknüpfen, daß, wenn man kleinste Mengen von Hefe einer Nährlösung zusetzt, keine Gärung auftritt. Gibt man etwas mehr dazu, so tritt diese Gärung ein. Es bedarf also nach Wildiers neben den Nährstoffen, entgegen den Angaben Pasteurs, zum Eintritt der Hefegärung ganz geringer Mengen von Gärflüssigkeit, die in der Hefe selbst enthalten ist, die aber nicht unterschritten werden darf. Es handelt sich nicht um ein Mehr an lebenden Hefezellen in diesem Fall, da man ja bekanntlich aus einer Hefezelle ungemein viele herauszüchten kann, sondern vielmehr um einen Teil der Hefezellen, der auch, wenn die Hefe abgetötet ist, die Wirkung des gesamten Zusatzes beeinflußt. Es gehört also zum Hefewachstum und zur Hefegärung außer den lebenden Zellen noch eine Substanz, welche in der Zellflüssigkeit vorkommt und diesen wirksamen Stoff nennt Wildiers „Bios“. Wenn es wahrscheinlich erscheint, daß das Bios von Wildiers nichts anderes ist als das, was wir gegenwärtig als „Koferment“ bezeichnen, den kochbeständigen Anteil der Zymase resp. des Hefepreßsaftes, wenn wir annehmen, daß die fermentative Funktion erst ausgelöst werden kann, wenn Koferment zugleich vorhanden ist, so sehen wir, daß solche aktivierende Einflüsse schon dem Hefesaft selbst zukommen.

Aber auch eine Reihe von Salzen übt solche Einflüsse auf die Hefegärung aus, wie Euler und Cassel³⁾, Rosenblatt⁴⁾,

¹⁾ S. Fränkel und Josef Fischl, D. R. P. 307 545 24. Mai 1916.

²⁾ Wildiers, *La Cellule* 18, 313—329.

³⁾ H. v. Euler und H. Cassel, *Zeitschr. f. physiol. Chemie* 86, 123. 1913.

⁴⁾ Mr. et Mme. Rosenblatt, *Ann. de l'inst. Pasteur* Juli 1914, S. 714.

Zaleski¹⁾, Oppenheimer²⁾ und Neuberg³⁾ gezeigt haben. Es wurde erwiesen, daß Salze aliphatischer organischer Säuren, der Ameisensäure, der Weinsäure, der Milchsäure, der Oxalsäure, der Citronensäure und Brenztraubensäure ein solches Aktivierungsvermögen besitzen.

Ebenso stark wie die Brenztraubensäure wirken nach Neuberg viele Ketonsäuren und Ketodicarbonsäuren, z. B. Ketobuttersäure, Ketocaprinsäure, Oxybrenztraubensäure, Oxalessigsäure, Ketoglutarsäure, Phenylglyoxalsäure, Phenylbrenztraubensäure und Oxyphenylbrenztraubensäure. Sämtliche hier genannten Ketonsäuren lassen sich als Derivate der bei der Eiweißspaltung resultierenden Aminosäuren auffassen, die durch Desaminierung derselben entstanden sind.

Es war also nach Neuberg die Vermutung naheliegend, daß das Koferment mit diesen Ketonsäuren in irgendeiner Beziehung steht. Die Existenz des Kofermentes ist an die Gär-tätigkeit der Hefe gebunden. Das Koferment, das sich aus Hefe durch einfaches Auslaugen bei Zimmertemperatur gewinnen läßt, geht aber bei längerer Berührung mit Hefesaft, insbesondere wenn dieser keine Gärarbeit leistet, also kein Zucker anwesend ist, zugrunde. Aber selbst der Zucker schützt das Koferment nicht dauernd vor der Vernichtung, denn die zellfreie Gärung hört unter Umständen auf, ehe noch aller Zucker umgesetzt, d. i. vergoren ist. Durch Zusatz von neuem Koenzym kann sie wieder in Tätigkeit gesetzt werden. Aber selbst ein Gemisch von Salzen der Ketonsäuren und Phosphaten, also ein künstlicher Aktivator, reicht nicht voll an die Wirkung des nativen Saftes heran.

In seinen neuesten Arbeiten über die Beziehungen der Aldehyde zur alkoholischen Gärung stellt Neuberg⁴⁾ als Ergebnis vieler Untersuchungen fest, daß die Stimulierung der alkoholischen Gärung auch eine allgemeine Eigenschaft der Aldehyde resp. Aldehydgruppen sei.

¹⁾ V. Zaleski, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **31**, 349 u. 354. 1915.

²⁾ M. Oppenheimer, Zeitschr. f. physiol. Chemie **93**, 235. 1914/15.

³⁾ C. Neuberg, diese Zeitschr. **36**, 60, 1911; **51**, 133, 1913; **71**, 26, 75, 83. 1915.

⁴⁾ C. Neuberg, diese Zeitschr. **88**, 145. 1918; C. Neuberg u. M. Ehrlich, diese Zeitschrift **101**, 239. 1920.

Beobachtet man die Gärungskurven, welche durch Acceleratoren dieser Klasse wie Salze der Ketonsäuren usw. bei der Zuckergärung durch die Hefe gefunden werden, mit den Kurven, welche die alkoholischen Extrakte aus Reiskleie, Hefe usw. nach unseren später zu beschreibenden Versuchen bewirken, so sieht man einen sehr auffallenden Unterschied. In den Neuberg'schen Versuchen steigt die Kurve, die die Kohlensäureentwicklung der gärenden Hefe bzw. des Preßsaftes anzeigt, bei Zusatz von Koferment, Ketonsäuren oder Aldehyden anfangs im Vergleich zum blinden Versuch sehr stark. Bald aber nähert sie sich wieder der normalen, so daß man deutlich die Abnahme der accelerierenden Wirkung wahrnehmen kann, während die mit Alkohol aus Reiskleie oder

Unser Gärversuch mit alkoholischem Hefeextrakt.

Versuchsordnung I, Versuch A und B.

Tabelle I.			Tabelle II.			Tabelle III.	
In	Gesamtkohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch		In der	Kohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch		Pro	Beschleunigung in ccm CO ₂ bei Versuch B
	A	B		A	B		
15'	0	0	1.	0	0	1.)	0
30'	0,8	1,8	2.)	0,8	1,8	2.)	+1,0
45'	2,2	3,8	3.)	1,4	2,0	3.)	+0,6
1 ^h	4,4	6,6	4.)	2,2	2,8	4.)	+0,6
1 ^h 15'	7,8	12,2	5.)	3,4	5,6	5.)	+2,2
1 ^h 30'	10,8	19,0	6.)	3,0	6,8	6.)	+3,8
1 ^h 45'	14,6	25,6	7.)	3,6	6,6	7.)	+3,0
2 ^h	18,6	30,8	8.)	4,0	5,2	8.)	+1,2
2 ^h 15'	24,2	38,4	9.)	5,6	7,6	9.)	+2,0

Gärversuch Neubergs mit Alkalipyruvat.

Tabelle I.			Tabelle II.			Tabelle III.	
In	Gesamtkohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch		In der	Kohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch		Pro	Beschleunigung in ccm CO ₂ bei Versuch B
	A	B		A	B		
15'	0	3,9	1.)	0	3,9	1.)	3,9
30'	1,4	7,6	2.)	1,4	3,7	2.)	2,3
45'	3,2	8,6	3.)	1,8	2,0	3.)	0,2
1 ^h	5,8	11,6	4.)	2,6	2,0	4.)	-0,6
1 ^h 30'	8,4	13,6	5.)	2,6	2,0	5.)	-0,6
3 ^h 30'	17,8	19,2	6.)	2,6	2,0	6.)	-0,6

Zum besseren Vergleiche mit unseren Kurven berechneten wir auch Tabelle II und III aus den Angaben Neubergs zu Tabelle I.

Hefe erhaltenen Extrakte, welche die akzessorischen Nährstoffe oder Vitamine enthalten, durchaus während des ganzen Ablaufes des Gärversuches eine Mehrentwicklung von Kohlensäure gegenüber dem Kontrollversuch zeigen. Der Vergleich solcher Kurven, wie wir sie gewonnen haben, mit denen von Neuberg zeigt vielmehr nach der Richtung hin, daß das Koferment als Initiator, aber nicht als dauernder Accelerator anzusehen ist, während die Substanzen, von denen wir sprechen werden, als dauernde Acceleratoren anzusehen sind.

Es zeigt sich aber nicht nur in bezug auf die differente Wirkung, einerseits die initiiierende, anderseits die konstante Beschleunigung, ein Unterschied zwischen dem Koenzym und unserer Substanzgruppe, sondern auch darin, daß Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure das Koenzym nicht fällt, hingegen der Accelerator der Hauptsache nach gefällt wird, wenn man nicht zu viel Phosphorwolframsäure oder Phosphormolybdänsäure verwendet hat.

Ganz unabhängig von uns haben Abderhalden und Schaumann¹⁾, wenn auch etwas später, anscheinend ohne Kenntnis der bis nun von uns ausschließlich in der Patentliteratur niedergelegten Beobachtung, die gleiche Erfahrung gemacht, daß die sog. Vitamine, die Zuckergärung durch Hefe beschleunigen.

Wir haben indessen diese Beobachtungen, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden wird, nach der Richtung hin ausgearbeitet und ausgebaut, daß wir statt der schwierigen und kostspieligen, jetzt überhaupt infolge Tiermangels undurchführbaren Tierversuche, die Hefegärung verwendeten. Wir konnten so in jedem Moment sämtliche Fraktionen, Fällungen und Filtrate quantitativ in wenigen Stunden auf ihre Wirksamkeit prüfen, und zwar gingen wir in der Weise vor, daß wir einen gemessenen Teil den Versuchen entnahmen und prüften, wie sich dieser in bezug auf die Beschleunigung der Kohlensäureproduktion gärender Hefe gegenüber einer gewöhnlichen Hefegärung verhält. Auf diese Weise kann man nicht nur erfahren, ob man die wirksame Substanz in der Hand hat, sondern kann aus der Größenordnung der Beschleunigung zugleich sehen, wieviel von der wirksamen Substanz man im Niederschlag, Filtrat bzw. in jeder Fraktion hat.

¹⁾ E. Abderhalden und H. Schaumann, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **172**, 88 u. 156. 1918.

Nachdem wir diese Erfahrung gemacht, war es nun möglich, schrittweise die Untersuchung bei Anwendung verschiedener Fällungs- und Lösungsmittel durchzuführen und der Reindarstellung der Verbindung näherzukommen.

Arbeitsmethode zur Isolierung und Reinigung der wirksamen Substanz.

Versuchsordnung zur Ermittlung der Gärbeschleunigung.

In einem Dumasschen Azotometer, welcher zuerst mit Quecksilber vollgefüllt wurde, wurden 5 ccm einer 10 proz. Hefeaufschlemmung, wobei jedesmal frische Spiritus-Preßhefe angewendet wurde, und 10 ccm einer 10 proz. Rohrzuckerlösung eingesogen. Zum Hauptversuch wurde eine gemessene Menge des Extraktes oder der Lösung, zum Gegenversuch stets eine gleiche Menge Wasser zugelassen, so daß in den Parallelversuchen das Gesamtvolumen gleich war.

Sodann wurden die so beschickten Eudiometer auf Minusdruck gestellt, indem man die mit der Meßröhre in Verbindung stehenden, Quecksilber enthaltenden Kugeln in allen Versuchen senkte.

Bei der Beobachtung und Ablesung wurde durch Heben der Kugel und Einstellen der Quecksilberoberflächen in Röhre und Kugel auf das gleiche Niveau stets der gleiche Druck eingehalten. Die Versuche wurden im Thermostaten bei 28° C durchgeführt.

Bei allen unseren Versuchen setzten wir beim Hauptversuch eine bestimmte Menge des zu prüfenden Extraktes bei, der eine bestimmte Menge Trockensubstanz enthielt. Wir beobachteten die jeweils sich entwickelnde Kohlensäure in jeder Viertelstunde in allen Parallelversuchen und verbanden die Punkte zu einer Kurve, die einen kontinuierlichen Aufstieg zeigt. Um die Beschleunigung, d. i. die Mehrentwicklung an Kohlensäure in dem Hauptversuch gegenüber dem Gegenversuch deutlich zu sehen, stellten wir gleichzeitig mit der Tabelle, welche die Gesamtkohlensäureentwicklung anzeigt, eine solche auf, welche die Kohlensäureentwicklung jedes der Versuche in den einzelnen Viertelstunden ersehen läßt und berechneten daraus in einer dritten Tabelle das Plus der Kohlensäureentwicklung im Hauptversuch gegenüber dem blinden Gärungsversuch. Weist die Gesamtentwicklung der Kohlensäure eine kontinuierliche Zunahme

auf, so sieht man, daß die Beschleunigung nicht gleichmäßig oder gleichförmig vor sich geht. Die in ein und derselben Versuchsanordnung zusammengehörigen Kurven sind mit denselben großen Anfangsbuchstaben des Alphabets bezeichnet. Aus den meisten Kurven, welche die Tabelle III, d. i. die Beschleunigung veranschaulichen soll, ersieht man, daß während der ersten sieben Viertelstunden Maxima und Minima der Beschleunigung, also Schwankungen auftreten, nach dieser Zeit aber, soweit unsere Beobachtung reicht, eine größere Regelmäßigkeit zu verzeichnen ist. Wodurch die Unregelmäßigkeiten bedingt sind, wäre noch zu untersuchen. Wir berechnen daher die Vergleichszahlen der Beschleunigung erst nach Ablauf von sieben Viertelstunden, indem wir das arithmetische Mittel aus den Beschleunigungen, berechnet aus der letzten Ablesung, mit Rücksicht auf die vorliegenden Unregelmäßigkeiten, nahmen.

Wir bezeichnen also als Beschleunigung in jedem Hauptversuche die Mehrproduktion an Kohlensäure gegenüber dem Parallelversuch innerhalb einer Viertelstunde nach 2 Stunden.

Zum Vergleich der quantitativen Wirkung nahmen wir jeweils die Wirkung eines Milligramms der Trockensubstanz der vorhandenen Substanz an.

Darstellung und Untersuchung des alkoholischen Extraktes.

Die ersten Versuchsreihen wurden mit Reiskleie gemacht. Als aber Reiskleie inzwischen zu den seltensten Dingen geworden war, waren wir gezwungen, uns lediglich auf Hefe zu beschränken, welche trotz der Bewirtschaftung uns eine Zeitlang in genügender Menge zur Verfügung stand. Da die Bierhefen in den letzten Jahren sehr schlecht waren, haben wir es vorgezogen, trotz der hohen Kosten lediglich Spiritus-Preßhefe für unsere Versuche heranzuziehen. Diese Preßhefe trockneten wir, da der Wassergehalt etwa 85% beträgt, vorerst in unserem großen Vakuumtrockenschrank bei etwa 30° C, in dünner Schicht ausgebreitet, jedoch nicht zu stark, da sonst eine solche Verhornung eintritt, daß der Alkohol nur schwer angreifen kann.

Die zerkleinerte Hefe wurde mit etwa 80 proz. Alkohol übergossen und auf dem Wasserbade etwa $\frac{1}{2}$ Stunde unter Rückflußkühlung erhitzt. Die alkoholische Lösung wurde dekantiert und die Hefe mit frischem Alkohol von gleicher Konzentration be-

Versuchsanordnung I, Versuch D.

Dieser erstreckt sich auf die Untersuchung, in welchem Teile, dem ätherischen Auszug des Hefeextraktes oder dem mit Äther ausgezogenen Anteil, die wirksame Substanz enthalten sei. Der Versuch zeigte, daß der ätherische Auszug keine weitere Beschleunigung des Gärprozesses hervorrufe, weshalb er weiterhin nicht mehr berücksichtigt wurde.

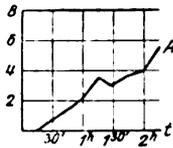
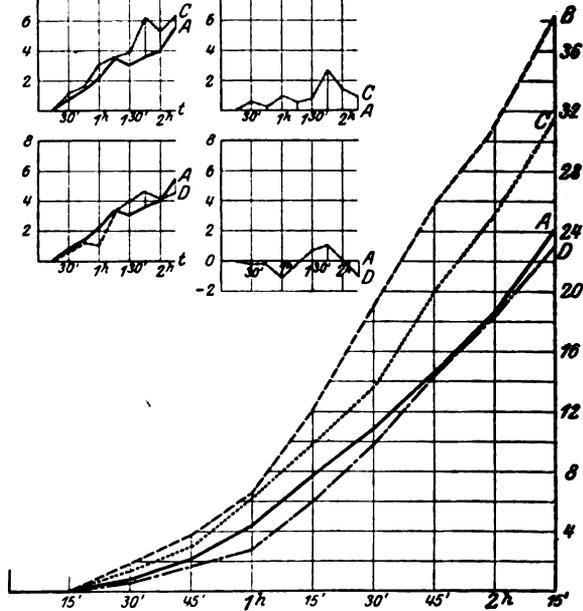
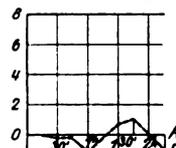
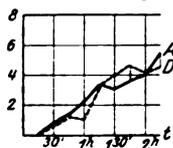
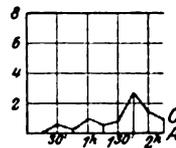
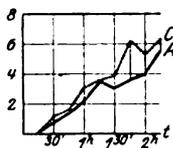
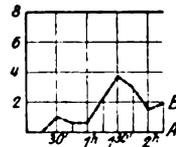
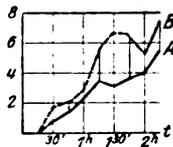
Kohlensäureentwicklung
in ccmBeschleunigung
in ccm CO₂

Abb. 1.

schießt und dieser Vorgang des öfteren wiederholt, während der alkoholische Extrakt ununterbrochen im Vakuum konzentriert wurde, so daß man immer genügende Mengen abdestillierten Alkohols für die weiteren Extraktionen hatte. Schließlich wurden

die Auszüge in immer kleineren Fraktionierkolben zu einem kleinen Volumen konzentriert.

Der gleiche Vorgang ohne Vakuumtrocknung wurde bei der Reiskleie eingeschlagen. Die ganze Arbeitsweise ist bei der Verwendung der Reiskleie eine einfachere und angenehmere.

Der nun vorhandene, trübe, alkoholfreie, wässrige Extrakt wird nach dem Abfiltrieren des abgeschiedenen Fettes mehrfach mit Äther ausgeschüttelt, bis alles Fett in Lösung gegangen ist.

Die von uns verwendete Preßhefe gab bei ihrer Prüfung nach dem Trocknen 15% Trockensubstanz, so daß der gesamte Trockenrückstand von feuchter Preßhefe pro Kilogramm 150 g betrug. Der Extrakt, nachdem er entfettet ist, enthält nach unserer Berechnung 8,67% der festen Bestandteile der verwendeten Hefe.

Versuchsordnung I.

Tabelle I.

In	Kohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch			
	A	B	C	D
15'	0	0	0	0
30'	0,8	1,8	1,4	0,6
45'	2,2	3,8	3,0	1,8
1 ^h	4,4	6,6	6,2	2,8
1 ^h 15'	7,8	12,2	9,8	6,0
1 ^h 30'	10,8	19,0	13,6	9,8
1 ^h 45'	14,6	25,6	20,0	14,4
2 ^h	18,6	30,8	25,2	18,4
2 ^h 15'	24,2	38,4	31,6	23,0

Tabelle II.

In der	Kohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch			
	A	B	C	D
1.)	0	0	0	0
2.)	0,8	1,8	1,4	0,6
3.)	1,4	2,0	1,6	1,2
4.)	2,2	2,8	3,2	1,0
5.)	3,4	5,6	3,6	3,2
6.)	3,0	6,8	3,8	3,8
7.)	3,6	6,6	6,4	4,6
8.)	4,0	5,2	5,2	4,0
9.)	5,6	7,6	6,4	4,6

Tabelle III.

Pro	Beschleunigung in ccm CO ₂ bei Versuch		
	B	C	D
1.)	0	0	0
2.)	+1,0	+0,6	-0,2
3.)	+0,6	+0,2	-0,2
4.)	+0,6	+1,0	-1,2
5.)	+2,2	+0,4	-0,2
6.)	+3,8	+0,8	+0,8
7.)	+3,0	+2,8	+1,0
8.)	+1,2	+1,2	0
9.)	+2,0	+0,8	-1,0

Versuch A: Vergleichsversuch, d. h. 10 ccm einer 10 proz. Rohrzuckerlösung + 5 ccm einer 10 proz. Hefeaufschlammungs-Gärflüssigkeit.

Versuch B: Gärflüssigkeit + 1 ccm des Alkoholextraktes.

Versuch C: Gärflüssigkeit + 1/2 ccm des Alkoholextraktes.

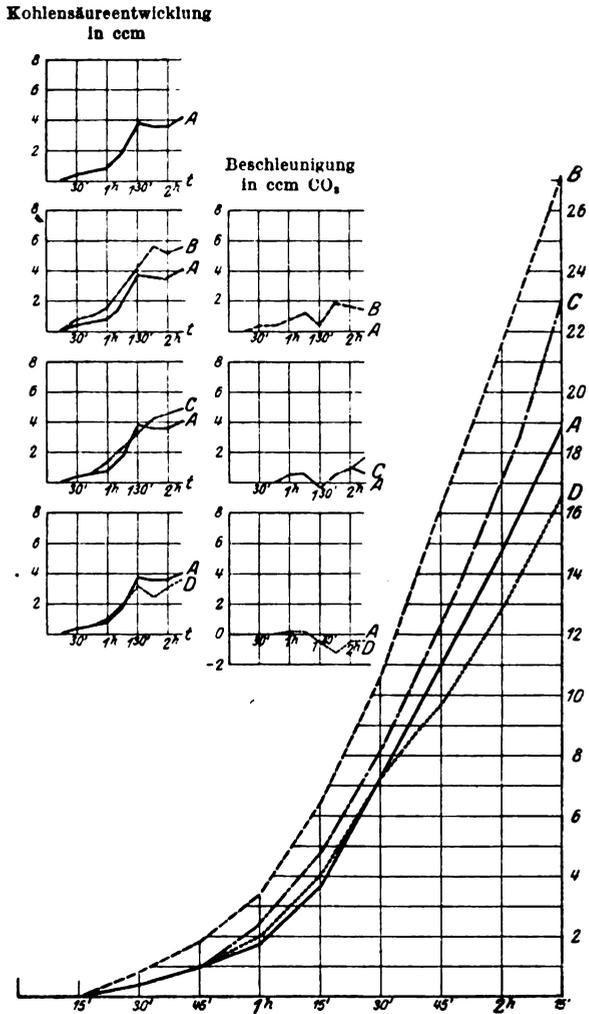
Versuch D: Gärflüssigkeit + Ätherextrakt aus dem alkoholischen Hefenauszug.

In der gleichen Versuchsordnung (Versuch B) ergab der aus 1/2 kg Hefe gewonnene, auf 100 ccm aufgefüllte Extrakt, noch 8,67% der Trockenhefe enthaltend, eine stärkere Beschleunigung. 1 ccm des Extraktes, der 0,065 g Trockensubstanz enthielt, löste nach zwei Stunden in einer Viertelstunde eine Beschleunigung von 1,6 ccm aus. Die beschleunigende Wirkung von 0,001 g der Trockensubstanz des Extraktes in einer Viertelstunde nach 2 Stunden berechnet sich demnach auf 0,0247 ccm.

Bei der Trocknung eines Kubikzentimeters bei 110° erhielten wir 0,065 g Trockensubstanz, die bei der Veraschung 0,0041 g Asche zurückließen, so daß an organischer Substanz etwa 0,06 g im Kubikzentimeter enthalten waren.

Versuchsanordnung I, Versuch C, Versuchsanordnung II, Versuch B, C, D,
 Versuchsanordnung V, Versuch D.

Wir versuchten hier, diejenige Menge festzustellen, welche sich bei einem solchen Beschleunigungsversuch noch eben wirksam erweist und sind in der Weise vorgegangen, daß wir durch weiterschreitende Halbierung eines



Kubikzentimeters das Mindestmaß der Substanz eruiert haben, welche noch in der Lage ist, bei Zusatz zu der oben beschriebenen Mischung von Zucker und Hefe, eine meßbare Beschleunigung auszulösen. Bei diesen Untersuchungen stellte es sich heraus, daß sowohl bei der Verwendung

Versuchsordnung II.

Tabelle I.

In	Kohlensäure-entwicklung in ccm bei Versuch			
	A	B	C	D
15'	0	0	0	0
30'	0,4	0,8	0,4	0,4
45'	1,0	1,8	1,0	1,0
1 ^h	1,8	3,4	2,4	2,0
1 ^h 15'	3,6	6,4	4,8	4,0
1 ^h 30'	7,4	10,6	8,2	7,2
1 ^h 45'	11,0	16,2	12,4	9,6
2 ^h	14,6	21,4	17,0	12,8
2 ^h 15'	18,8	27,0	22,0	16,6

Tabelle II.

In der	Kohlensäure-entwicklung in ccm bei Versuch			
	A	B	C	D
1.)	0	0	0	0
2.)	0,4	0,8	0,4	0,4
3.)	0,6	1,0	0,6	0,6
4.)	0,8	1,6	1,4	1,0
5.)	1,8	3,0	2,4	2,0
6.)	3,8	4,2	3,4	3,2
7.)	3,6	5,6	4,2	2,4
8.)	3,6	5,2	4,6	3,2
9.)	4,2	5,6	5,0	3,8

Tabelle III.

Pro	Beschleunigung in ccm CO ₂ bei Versuch		
	B	C	D
1.)	0	0	0
2.)	+0,4	0	0
3.)	+0,4	0	0
4.)	+0,8	+0,6	+0,2
5.)	+1,2	+0,6	+0,2
6.)	+0,4	-0,4	-0,6
7.)	+2,0	+0,6	-1,2
8.)	+1,6	+1,0	-0,4
9.)	+1,4	+0,8	-0,4

Versuch A: Vergleichsversuch.

Versuch B: Gärlüssigkeit + $\frac{1}{4}$ ccm Alkoholextrakt aus Hefe.

Versuch C: Gärlüssigkeit + $\frac{1}{8}$ ccm Alkoholextrakt aus Hefe.

Versuch D: Gärlüssigkeit + $\frac{1}{16}$ ccm Alkoholextrakt aus Hefe.

eines Viertels als auch noch eines Achtels der ursprünglichen Menge, d. i. eines Kubikzentimeters des Extraktes eine meßbare Beschleunigung zu beobachten war. $\frac{1}{16}$ ccm des Extraktes zeigte einmal eine schwache Verzögerung, ein anderes Mal eine schwache Beschleunigung, so daß dieser Wert noch als der Grenzwert anzusehen ist.

0,003 g der Trockensubstanz dieses Extraktes rufen aber keine meßbare Beschleunigung mehr hervor, während der Zusatz von 0,007 g noch recht gut beschleunigt, was einer Menge von etwa $\frac{1}{10}$ ccm des Extraktes, 0,08 g Trockenhefe oder etwa 0,5 g feuchter Preßhefe entspricht.

Versuchsordnung III.

Tabelle I.

In	Gesamt-Kohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch			
	A	B	C	D
15'	0	0	0	0
30'	0,8	0,4	0,8	0
45'	3,8	2,2	3,8	0,2
1 ^h	7,0	5,6	7,0	0,6
1 ^h 15'	11,2	12,0	11,2	2,8
1 ^h 30'	16,2	20,2	16,2	7,2
1 ^h 45'	20,4	24,8	20,4	11,2
2 ^h	24,6	31,2	24,0	15,8
2 ^h 15'	30,2	39,4	29,2	22,2

Tabelle II.

In der	Kohlensäure-entwicklung in ccm bei Versuch			
	A	B	C	D
1.)	0	0	0	0
2.)	0,8	0,4	0,8	0
3.)	3,0	1,8	3,0	0,2
4.)	3,2	3,4	3,2	0,4
5.)	4,2	6,4	4,2	2,2
6.)	5,0	8,2	5,0	4,4
7.)	4,2	4,6	4,2	4,0
8.)	4,2	6,4	4,0	4,6
9.)	5,6	7,8	5,2	6,4

Tabelle III.

Pro	Beschleunigung in ccm CO ₂ bei Versuch		
	B	C	D
1.)	0	0	0
2.)	-0,4	0	-0,8
3.)	-1,2	0	-2,8
4.)	+0,2	0	-2,8
5.)	+2,2	0	-2,0
6.)	+3,2	0	-0,6
7.)	+0,4	0	-0,2
8.)	+2,2	-0,2	+0,4
9.)	+2,2	-0,4	+0,8

Versuch A: Vergleichsversuch.

Versuch B: Gärlüssigkeit + 1ccm alkoh. Hefeextrakt bei 110° getrocknet.

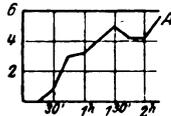
Versuch C: Gärlüssigkeit + Asche von 1 ccm Hefeextrakt; neutralisiert.

Versuch D: Gärlüssigkeit + Asche von 1 ccm Hefeextrakt; nicht neutralisiert.

Versuchsordnung III, Versuch D.

Es war nun wichtig, vorerst zu konstatieren, ob die anorganischen Anteile des Extraktes an der Wirksamkeit beteiligt sind. Durch Veraschung eines Kubikzentimeters wurde eine Asche gewonnen, die dem

Kohlensäureentwicklung
in ccm



Beschleunigung
in ccm CO₂

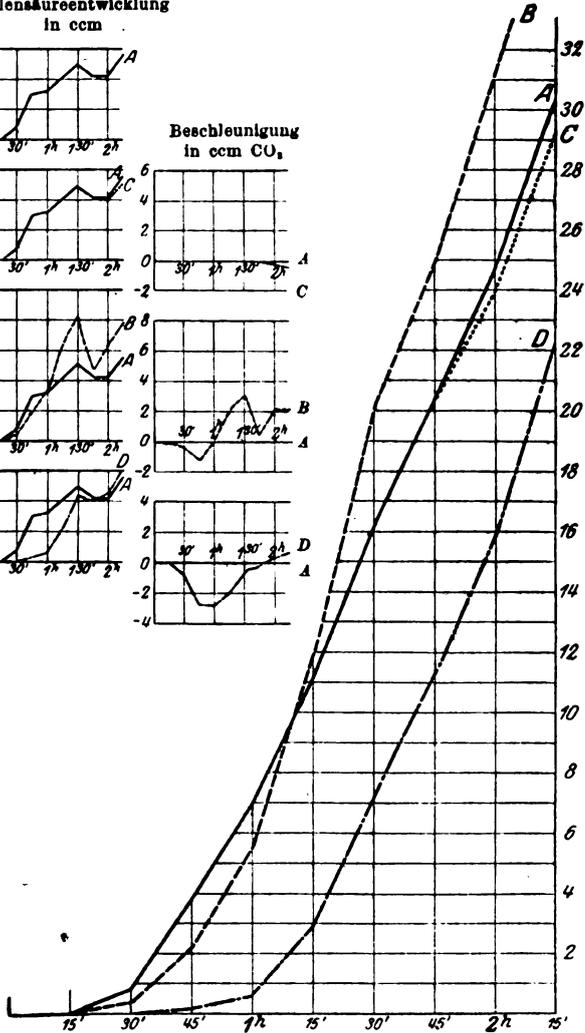
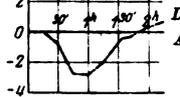
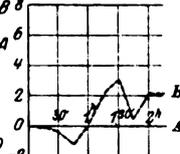
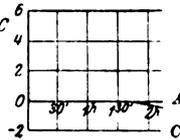
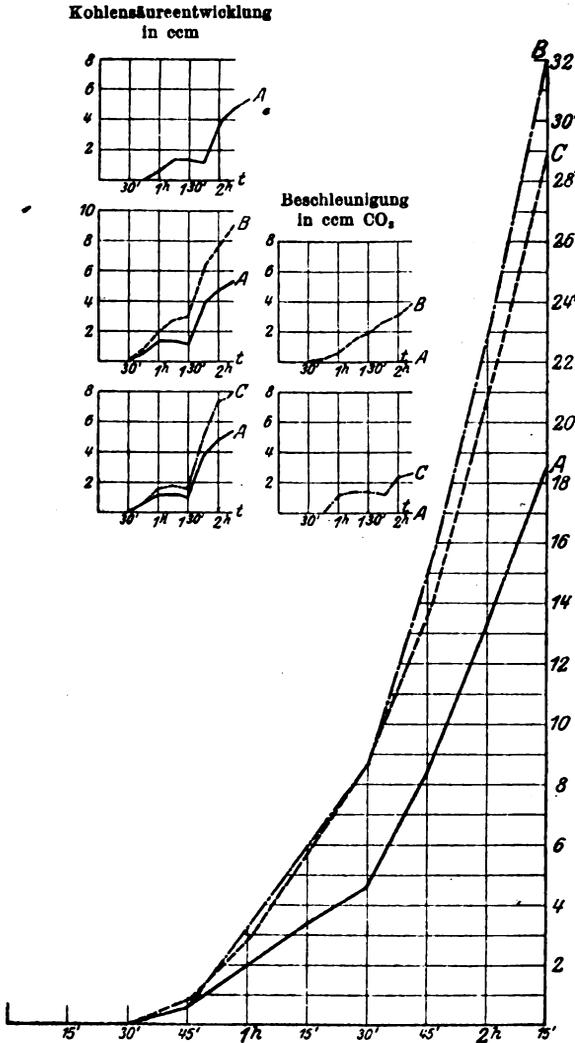


Abb. 8.

Gärversuch zugesetzt, hemmend auf die normale Zuckergärung einwirkte. Wir vermuteten, daß diese Hemmung durch die Alkaleszenz der Asche bedingt sei. Zur Bestätigung dieser Vermutung führten wir die Neutralisation der Asche durch, und zwar auf folgende Weise: Wir veraschten je 1 ccm des

Extrakt, bestimmten bei dem einen Kubikzentimeter die Menge der erforderlichen Neutralisationssäure unter Zusatz von Methylorange als Indicator und setzten bei der Ausführung des Versuches eine gleiche Menge Säure der Asche des anderen Kubikzentimeters zu.



Es zeigte sich, daß der Zusatz von neutralen anorganischen Salzen, die die Asche des Hefeextraktes ausmachen, zu solchen Extrakten weder fördernd noch hemmend auf den normalen

Gärungsverlauf einwirkte (Versuchsordnung III, Versuch C). Es war also klar, daß die Beschleunigung der Gärung durch die organische Komponente hervorgerufen war.

Versuchsordnung III, Versuch B.

A. erstreckt sich auf die Untersuchung, ob die Trocknung bei 110° einen Einfluß auf die gärbeschleunigende Wirkung habe.

Diese Trocknung schädigt die Wirkung des Extraktes nicht.

Versuchsordnung IV.

Tabelle I.				Tabelle II.				Tabelle III.		
In	Gesamt-Kohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch			In der	Kohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch			Pro	Beschleunigung in ccm CO ₂ bei Versuch	
	A	B	C		A	B	C		B	C
15'	0	0	0	1.)	0	0	0	1.)	0	0
30'	0	0	0	2.)	0	0	0	2.)	0	0
45'	0,6	0,8	0,6	3.)	0,6	0,8	0,6	3.)	+0,2	0
1 ^h	2,0	2,8	3,2	4.)	1,4	2,0	2,6	4.)	+0,6	+1,2
1 ^h 15'	3,4	5,6	6,0	5.)	1,4	2,8	2,8	5.)	+1,4	+1,4
1 ^h 30'	4,6	8,6	8,6	6.)	1,2	3,0	2,6	6.)	+1,8	+1,4
1 ^h 45'	8,4	15,0	13,6	7.)	3,8	6,4	5,0	7.)	+2,6	+1,2
2 ^h	13,2	22,8	20,8	8.)	4,8	7,8	7,2	8.)	+3,0	+2,4
2 ^h 15'	18,6	32,0	28,8	9.)	5,4	9,2	8,0	9.)	+3,8	+2,6

Versuch A: Vergleichsversuch.

Versuch B: Gärflüssigkeit + 1¹/₂ ccm alkoholischer Hefeextrakt.

Versuch C: Gärflüssigkeit + 1¹/₂ ccm alkoholischer Hefeextrakt 2 Std. gekocht.

Versuchsordnung IV, Versuch C und B.

In diesem wurde untersucht, ob die wirksame Substanz durch längeres Kochen eine Schädigung erfahre. Wir setzten daher in Parallelversuchen gleiche Mengen von ungekochten und 2 Stunden gekochten Extrakten zu, wobei wir die Beobachtung machten, daß die lange gekochte Lösung ein wenig an Wirksamkeit eingebüßt hatte. Wir vermieden daher bei allen Destillationen, die wir vorzunehmen hatten, Temperaturen, die über 50° C lagen.

I. Reinigung mit basischem Bleiacetat.

Vorerst wurde die Reinigung mit neutralem Bleiacetat versucht und als sich zeigte, daß diese Reinigung keinen Verlust an wirksamer Substanz zur Folge hatte, wurde weiter versucht, die Lösung mit basisch-essigsäurem Blei zu reinigen. Es wurde also die Lösung mit basisch-essigsäurem Blei gefällt, so lange als eine Fällung entstand. Man läßt dann den dicken gelblichen Niederschlag gut absetzen und filtriert und wäscht ihn mit Wasser, dem ein wenig basisches Bleiacetat zugesetzt ist, gründlich aus. Sowohl das Filtrat, als auch die Fällung wurden nun mit Schwefelwasserstoff zerlegt und vom ausgeschiedenen Schwefelblei abfiltriert.

Der Schwefelwasserstoff wurde durch Kohlensäure ausgeblasen, die zerlegte Bleifällung neutralisiert und beide Teile im Vakuum eingengt und schließlich auf die Hälfte des Volumens der ursprünglichen Lösung gebracht.

Kohlensäureentwicklung
in ccm

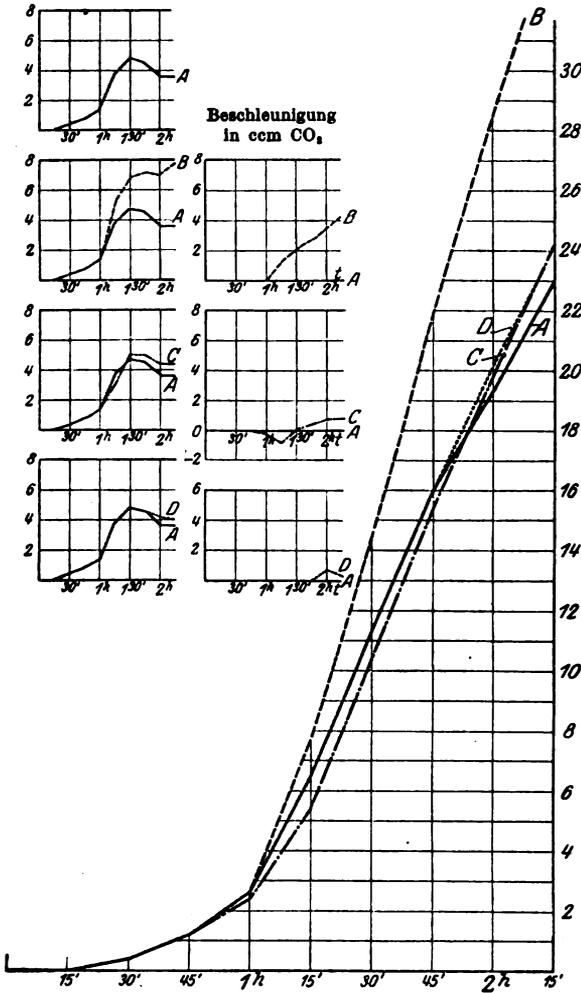


Abb. 5.

Versuchsanordnung V, Versuch D und C

zeigt, daß die mit basischem Bleiacetat gefällten und vom Blei befreiten Verbindungen absolut unwirksam waren, während das Filtrat die gesamte wirksame Substanz enthielt, da 1 ccm der bleigereinigten Lösung eine Beschleunigung hervorrief, die einer Mehrentwicklung von Kohlensäure

gegenüber dem Normalversuch von 3,2 ccm nach 2 Stunden in einer Viertelstunde entsprach, also genau doppelt soviel, wie 1 ccm des ursprünglichen Extraktes. Da diese Flüssigkeit auf die Hälfte des früheren Volumens konzentriert war, so ist es ersichtlich, daß die Fällung mit basisch-essigsäurem Blei ohne Verluste an wirksamer Substanz durchgeführt werden konnte.

Versuchsordnung V.

Tabelle I.					Tabelle II.					Tabelle III.			
In	Gesamtkohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch				In der	Kohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch				Pro	Beschleunigung in ccm CO ₂ bei Versuch		
	A	B	C	D		A	B	C	D		A	B	C
15'	0	0	0	0	1.)	0	0	0	0	1.)	0	0	0
30'	0,4	0,4	0,4	0,4	2.)	0,4	0,4	0,4	0,4	2.)	0	0	0
45'	1,2	1,2	1,2	1,2	3.)	0,8	0,8	0,8	0,8	3.)	0	0	0
1 ^h	2,6	2,6	2,4	2,6	4.)	1,4	1,4	1,2	1,4	4.)	0	-0,2	0
1 ^h 15'	6,4	7,6	5,4	6,4	5.)	3,8	5,0	3,0	3,8	5.)	+1,2	-0,8	0
1 ^h 30'	11,2	14,4	10,4	11,2	6.)	4,8	6,8	5,0	4,8	6.)	+2,0	+0,2	0
1 ^h 45'	15,8	21,6	15,4	15,8	7.)	4,6	7,2	5,0	4,6	7.)	+2,6	+0,4	0
2 ^h	19,4	28,6	19,8	20,2	8.)	3,6	7,0	4,4	4,4	8.)	+3,4	+0,8	+0,8
2 ^h 15'	23,0	36,4	24,2	24,2	9.)	3,6	7,8	4,4	4,0	9.)	+4,2	+0,8	+0,4

Versuch A: Vergleichsversuch.

Versuch B: Gärlüssigkeit + 1 ccm des zersetzten Pb-Filtrates.

Versuch C: Gärlüssigkeit + aliquoter Teil des zersetzten Pb-Niederschlags.

Versuch D: Gärlüssigkeit + $\frac{1}{16}$ ccm des alkoholischen Hefeextraktes.

II. Fraktionierung mit Alkohol.

Verschiedenartige Versuche wurden unternommen, um die im Vakuum eingengte Lösung weiter zu reinigen. Es stellte sich heraus, daß jeder Versuch mit organischen Solvenzien eine Fraktionierung in einen wirk-

Versuchsordnung VI.

Tabelle I.				Tabelle II.			Tabelle III.			
In	Gesamtkohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch			In der	Kohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch			Pro	Beschleunigung in ccm CO ₂ bei Versuch	
	A	B	C		A	B	C		B	C
15'	0	0	0	1.)	0	0	0	1.)	0	0
30'	0	0,6	0,4	2.)	0	0,6	0,4	2.)	+0,6	+0,4
45'	1,2	3,0	2,4	3.)	1,2	2,4	2,0	3.)	+1,2	+0,8
1 ^h	2,4	4,4	3,8	4.)	1,2	1,4	1,4	4.)	+0,2	+0,2
1 ^h 15'	5,0	9,0	8,0	5.)	2,6	4,6	4,2	5.)	+2,0	+1,6
1 ^h 30'	9,0	15,4	12,8	6.)	4,0	6,4	4,8	6.)	+2,4	+0,8
1 ^h 45'	11,0	19,0	17,0	7.)	2,0	3,6	4,2	7.)	+1,6	+2,2
2 ^h	14,4	24,2	22,0	8.)	3,4	5,2	5,0	8.)	+1,8	+1,6
2 ^h 15'	16,8	29,0	26,2	9.)	2,4	4,8	4,2	9.)	+2,4	+1,8

Versuch A: Vergleichsversuch.

Versuch B: Gärlüssigkeit + gleiche Mengen des alkohollös. Teiles des Sirups.

Versuch C: Gärlüssigkeit + gleiche Mengen des alkoholunlös. Teiles des Sirups.

samen und einen unwirksamen Anteil durchzuführen, scheiterte, da sowohl in der Fällung als auch in der Lösung die wirksame Substanz in dem Gärversuch zu finden war.

So konnte z. B. durch Zusatz von starkem Alkohol zu der im Vakuum noch weiter eingeeengten Lösung ein Sirup ausgefällt werden, dessen Wirksamkeit und die der alkoholischen Lösung in der

Versuchsanordnung VI, Versuch B und C,

untersucht wurde. Es zeigte sich, daß beide Anteile nach Entfernung des Alkohols und Auffüllung auf das gleiche Volumen mit Wasser die Hefegärung fast gleich stark beschleunigten.

Kohlensäureentwicklung
in ccm

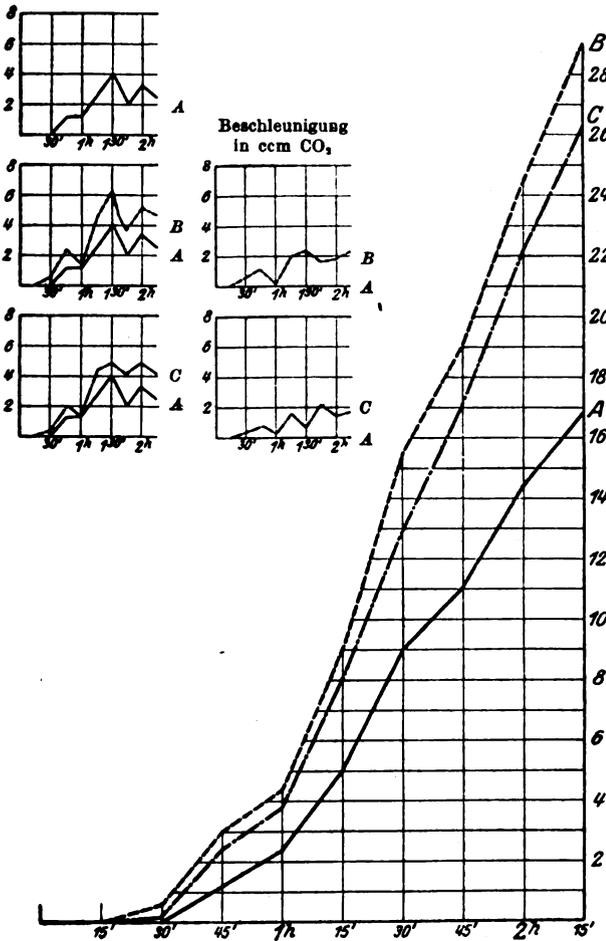


Abb. 6.

III. Fällung mit Sublimatlösung.

In der Annahme, daß es sich um eine Base handelt, wurde die Fällung mit Quecksilberchlorid vorgenommen, da andere Schwermetallsalze in Vorversuchen sich als nicht geeignet erwiesen hatten. Es wurde also die Lösung nach der Bleifällung mit einer konzentrierten, alkoholischen Sublimatlösung, solange noch ein Niederschlag sich zeigte, gefällt. Man ließ dann stehen, um dem Quecksilbersalz die Möglichkeit einer vollständigen Abscheidung zu geben, und filtrierte dann von den weißen ausgeschiedenen Quecksilberverbindungen ab. Die recht reichliche Abscheidung der Quecksilberverbindungen wurde mit Wasser aufgeschlämmt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. In gleicher Weise wurde das Filtrat vom Quecksilber befreit.

Aus der nun salzsauren Lösung wurde der Schwefelwasserstoff wieder mit Kohlensäure ausgeblasen und hierauf die Flüssigkeit zum Abstumpfen der freien Salzsäure mit Bleiglätte versetzt, so daß sich keine Blaufärbung von Kongopapier mehr zeigte. Aus beiden Lösungen wurde der Überschuß an Bleiglätte und Bleichlorid abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingengt. Beim Einengen schied sich wieder Chlorblei ab. Die abfiltrierte, stark konzentrierte Lösung wurde neuerdings mit Schwefelwasserstoff zerlegt, um das noch etwa vorhandene Blei zu entfernen. Das Filtrat vom Bleisulfid wurde wieder mit Kohlensäure vom Schwefelwasserstoff befreit und dann nach ziemlich starkem Einengen mit frisch bereitetem Silbercarbonat versetzt, wodurch die freie Salzsäure gänzlich entfernt wurde. Das Filtrat hiervon gab mit Ammonsulfid keine schwarze Fällung, war also frei von allen zugesetzten Schwermetallen.

Versuchsordnung VII.

Tabelle I.					Tabelle II.					Tabelle III.			
In	Gesamtkohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch				In der	Kohlensäureentwicklung in ccm bei Versuchen				Pro	Beschleunigung in ccm CO ₂ bei Versuch		
	A	B	C	D		A	B	C	D		B	C	D
15'	0	0,2	0	0	1.)	0	0,2	0	0	1.)	+0,2	0	0
30'	0,6	1,4	0,2	0,2	2.)	0,6	1,2	0,2	0,2	2.)	+0,6	-0,4	-0,4
45'	2,2	4,4	0,4	0,4	3.)	1,6	3,0	0,2	0,2	3.)	+1,4	-1,4	-1,4
1 ^h	5,2	9,6	1,4	1,2	4.)	3,0	5,2	1,0	0,8	4.)	+2,2	-2,0	-2,2
1 ^h 15'	11,0	17,6	4,0	3,4	5.)	5,8	8,0	2,6	2,2	5.)	+2,2	-3,2	-3,6
1 ^h 30'	15,2	22,8	6,4	5,8	6.)	4,2	5,2	2,4	2,4	6.)	+1,0	-1,8	-1,8
1 ^h 45'	19,4	29,0	9,0	8,2	7.)	4,2	6,2	2,6	2,4	7.)	+2,0	-1,6	-1,8
2 ^h	23,4	33,4	11,6	10,8	8.)	4,0	4,4	2,6	2,6	8.)	+0,4	-1,4	-1,4
2 ^h 15'	31,4	42,0	17,0	15,2	9.)	8,0	8,6	5,4	4,4	9.)	+0,6	-2,6	-3,6

Versuch A: Vergleichsversuch.

Versuch B: Gärflüssigkeit + zersetzter Niederschlag nach HgCl₂-Fällung. (Nach Entfernung von Hg und ClH.)

Versuch C: Gärflüssigkeit + 8, Auszug des Niederschlages mit heißem Wasser. (Nach Entfernung von Hg und ClH.)

Versuch D: Gärflüssigkeit + Filtrat vom Niederschlag nach HgCl₂-Fällung. (Nach Entfernung von Hg und ClH.)

Versuchsordnung VII, Versuch B C und D,

zeigt, daß die Quecksilberfällung die gesamte Menge des Beschleunigers enthält, während das Filtrat hiervon auf die Gärung geradezu hemmend wirkt. Eine gleiche Hemmung ruft auch eine, durch versuchtes Umlösen des Sublimatniederschlages mit warmem Wasser entstandene Lösung hervor.

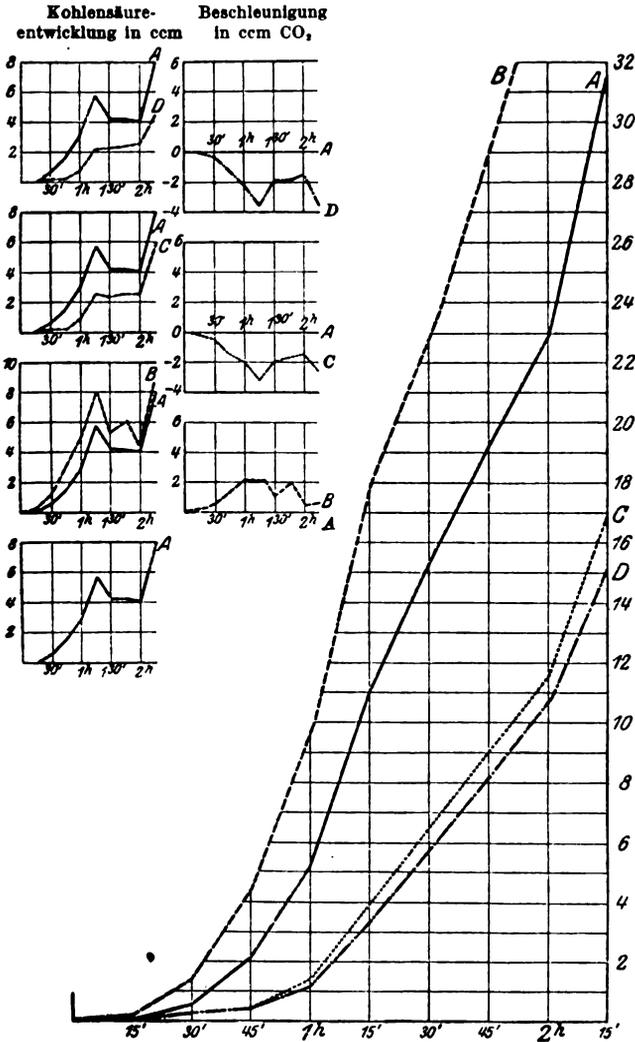
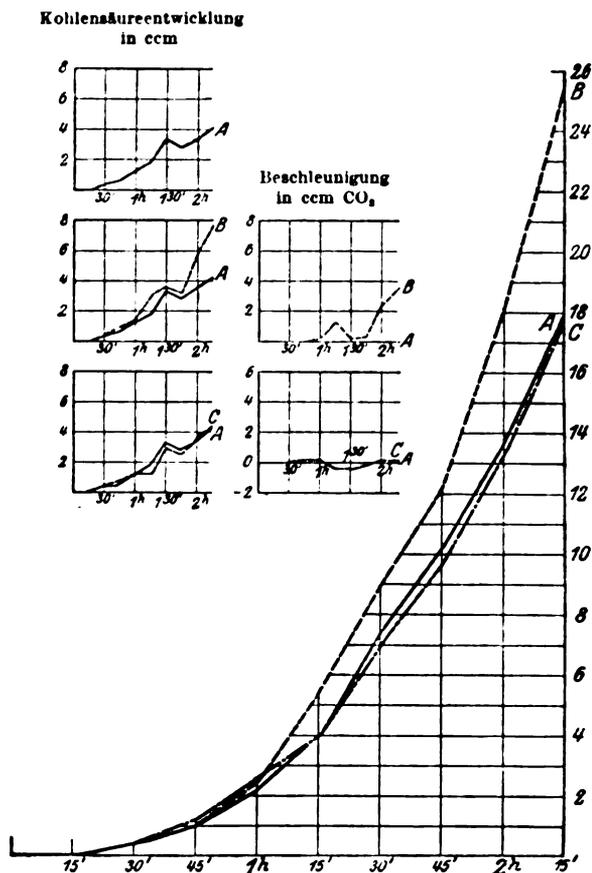


Abb. 7.

Die beiden zuletzt genannten Lösungen wurden daher nicht weiter untersucht, während die Lösung, gewonnen aus der Quecksilberfällung, die Grundlage für die weiteren Versuche bildete.



Untersuchung von Krystallen aus der Sublimatfällung.

Die wirksame Lösung wurde im Vakuum zu einem Sirup eingedunstet und im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure etwa 14 Tage sich selbst überlassen. Es schieden sich Krystalle in kugeligen Aggregaten ab, die man mit wenig kaltem Wasser vom Sirup trennen konnte. In

Versuchsordnung VIII, Versuch C, Versuchsordnung IX, Versuch D, wurde die Wirkung der Krystalle und die Wirkung des Extractes (Versuchsordnung VIII, Versuch B, Versuchsordnung IX, Versuch C) untersucht. Hierbei ergab es sich, daß die Krystalle unwirksam, resp. sehr schwach wirksam waren, was vielleicht durch das Anhaften geringster Mengen von wirksamer Substanz zu erklären ist. Der Sirup zeigte starke Beschleunigung.

Versuchsordnung VIII.

Tabelle I.

Tabelle II.

Tabelle III.

In	Gesamtkohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch				In der	Kohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch				Pro	Beschleunigung in ccm CO ₂ bei Versuch	
	A	B	C	D		A	B	C	D		B	C
15'	0	0	0		1.)	0	0	0		1.)	0	0
30'	0,4	0,4	0,4		2.)	0,4	0,4	0,4		2.)	0	0
45'	1,0	1,0	1,2		3.)	0,6	0,6	0,8		3.)	0	+0,2
1 ^h	2,2	2,4	2,6		4.)	1,2	1,4	1,4		4.)	+0,2	+0,2
1 ^h 15'	4,0	5,4	4,0		5.)	1,8	3,0	1,4		5.)	+1,2	-0,4
1 ^h 30'	7,4	9,0	7,0		6.)	3,4	3,6	3,0		6.)	+0,2	-0,4
1 ^h 45'	10,2	12,2	9,6		7.)	2,8	3,2	2,6		7.)	+0,4	-0,2
2 ^h	13,6	18,0	13,2		8.)	3,4	5,8	3,6		8.)	+2,4	+0,2
2 ^h 15'	17,8	25,6	17,6		9.)	4,2	7,6	4,4		9.)	+3,4	+0,2

Versuch A: Vergleichsversuch.

Versuch B: Gärflüssigkeit + aliquoter Teil des Sirups nach Krystallisation.

Versuch C: Gärflüssigkeit + aliquoter Teil der Krystallisation.

Kohlensäureentwicklung in ccm

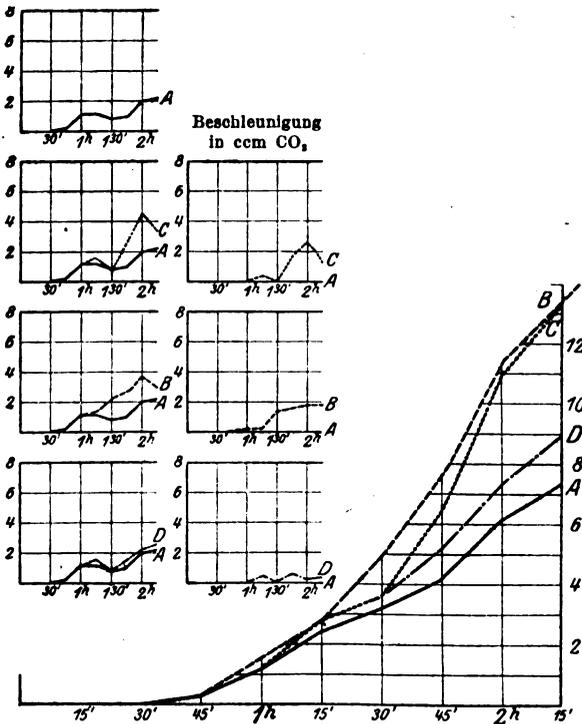


Abb. 9.

Versuchsordnung IX.

Tabelle I.					Tabelle II.					Tabelle III.			
In	Gesamtkohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch				In der	Kohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch				Pro	Beschleunigung in ccm CO ₂ bei Versuch		
	A	B	C	D		A	B	C	D		B	C	D
15'	0	0	0	0	1.)	0	0	0	0	1.)	0	0	0
30'	0	0	0	0	2.)	0	0	0	0	2.)	0	0	0
45'	0,2	0,2	0,2	0,2	3.)	0,2	0,2	0,2	0,2	3.)	0	0	0
1 ^h	1,2	1,2	1,2	1,2	4.)	1,0	1,2	1,0	1,0	4.)	+0,2	0	0
1 ^h 15'	2,4	1,4	2,8	2,8	5.)	1,2	1,4	1,6	1,6	5.)	+0,2	+0,4	+0,4
1 ^h 30'	3,2	2,8	3,6	3,6	6.)	0,8	2,2	0,8	0,8	6.)	+1,4	0	0
1 ^h 45'	4,2	5,0	6,4	5,2	7.)	1,0	2,6	2,8	2,8	7.)	+1,6	+1,8	+0,6
2 ^h	6,2	11,4	11,0	7,4	8.)	2,0	3,8	4,6	4,6	8.)	+1,8	+2,6	+0,2
2 ^h 15'	8,4	14,4	14,4	10,0	9.)	2,2	3,0	3,4	3,4	9.)	+1,8	+1,2	+0,9

Versuch A: Blinder Versuch.

Versuch B: Gärflüssigkeit + aliquoter Teil des Sirups nach Sublimat fällung (Krystalle abfiltriert).

Versuch D: Gärflüssigkeit + aliquoter Teil der Krystallisation.

In Versuchsordnung IX, Versuch B

wurde geprüft, ob nicht etwa die Mischung des Sirups mit den Krystallen eine erhöhte Wirkung auf die Gärung ausübe. Der Versuch ergab aber keineswegs eine besondere Erhöhung der Gärtätigkeit.

IV. Reinigung mit Pikrolonsäure.

Der wirksame Sirup wurde nun mit etwas Wasser verdünnt und, da es sich im Vorversuch gezeigt hatte, daß Pikrolonsäure einen Niederschlag hervorriefe, Pikrolonsäure in verdünnter alkoholischer Lösung

Versuchsordnung X.

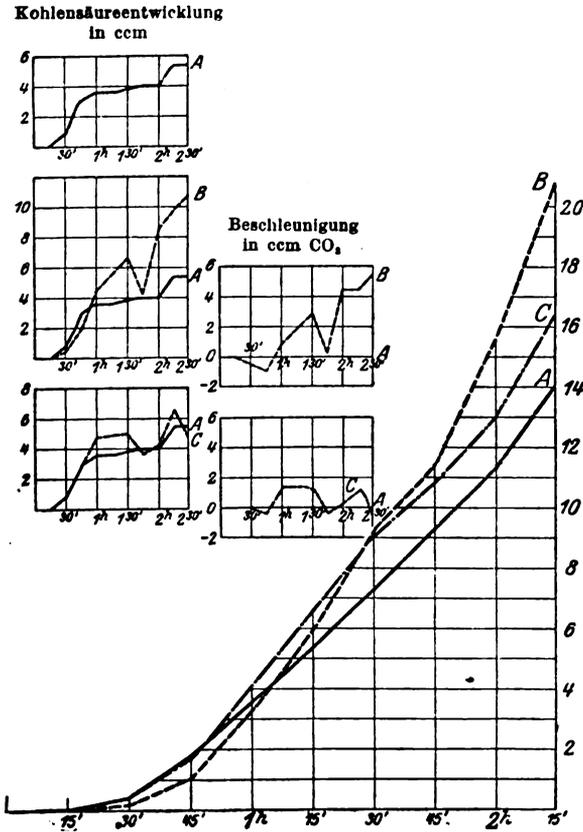
Tabelle I.					Tabelle II.					Tabelle III.		
In	Gesamtkohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch				In der	Kohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch				Pro	Beschleunigung in ccm CO ₂ bei Versuch	
	A	B	C	D		A	B	C	D		B	C
15'	0	0	0		1.)	0	0	0		1.)	0	0
30'	0,8	0,4	0,8		2.)	0,8	0,4	0,8		2.)	-0,4	0
45'	3,6	2,2	3,4		3.)	2,8	1,8	2,6		3.)	-1,0	-0,2
1 ^h	7,2	6,6	8,2		4.)	3,6	4,4	4,8		4.)	+0,8	+1,2
1 ^h 15'	10,8	12,0	13,2		5.)	3,6	5,4	5,0		5.)	+1,8	+1,4
1 ^h 30'	14,6	18,6	18,2		6.)	3,8	6,6	5,0		6.)	+2,8	+1,2
1 ^h 45'	18,6	22,8	21,8		7.)	4,0	4,2	3,6		7.)	+0,2	-0,4
2 ^h	22,6	31,2	26,0		8.)	4,0	8,4	4,2		8.)	+4,4	+0,2
2 ^h 15'	28,0	41,0	32,6		9.)	5,4	0,8	6,6		9.)	+4,4	+1,2
2 ^h 30'	33,4	51,0	37,2		10.)	5,4	19,8	4,6		10.)	+5,4	-0,8

Versuch A: Vergleichsversuch.

Versuch B: Gärflüssigkeit + Extrakt nach Pikrolonsäurefällung (0,0407 Trockenextrakt).

Versuch C: Gärflüssigkeit + 5 mg Pikrolonat.

zugesezt, solange eine Fällung entstand. Das ausgeschiedene Pikrolonat wurde abfiltriert und seine Wirksamkeit (Versuchsordnung X, Versuch C) untersucht, wobei sich wieder eine minimale Beschleunigung, wohl wieder durch anhaftende wirksame Substanzen hervorgerufen, bemerkbar machte. Die Prikrolonsäure fällt also die wirksame Substanz nicht.



**Quantitative Untersuchung des Sirups nach den drei ersten
Reinigungen.**

Die überschüssige Pikrolonsäure wurde aus dem Filtrate erschöpfend mit Essigäther entfernt und 1 ccm der zum Sirup verdickten Lösung zur Trockne gebracht. Im ganzen hatten wir 17,4 ccm von diesem Sirup. Da es sich ergab, daß 1 ccm hiervon 0,285 g Trockensubstanz enthielt, so waren im ganzen Sirup etwa 5 g feste Substanz. Da wir von 2 kg Preßhefe bei diesem Versuche ausgegangen waren, welche 300 g Trockenhefe enthielt, so waren in diesem Extrakte jetzt etwa 1,67% der Trockenhefe noch vorhanden. Durch Fällen mit basischem Bleiacetat, Sublimat

und Pikrolonsäure wurden also etwa 80% (genauer 80,74%) unwirksamer Teile aus dem alkoholischen, mit Äther entfetteten Hefeextrakt entfernt, da dieser noch 8,67% der Trockenhefe enthalten hatte. Der Sirup nach der Reinigung mit basischem Bleiacetat, Sublimat und Pikrolonsäure ent-

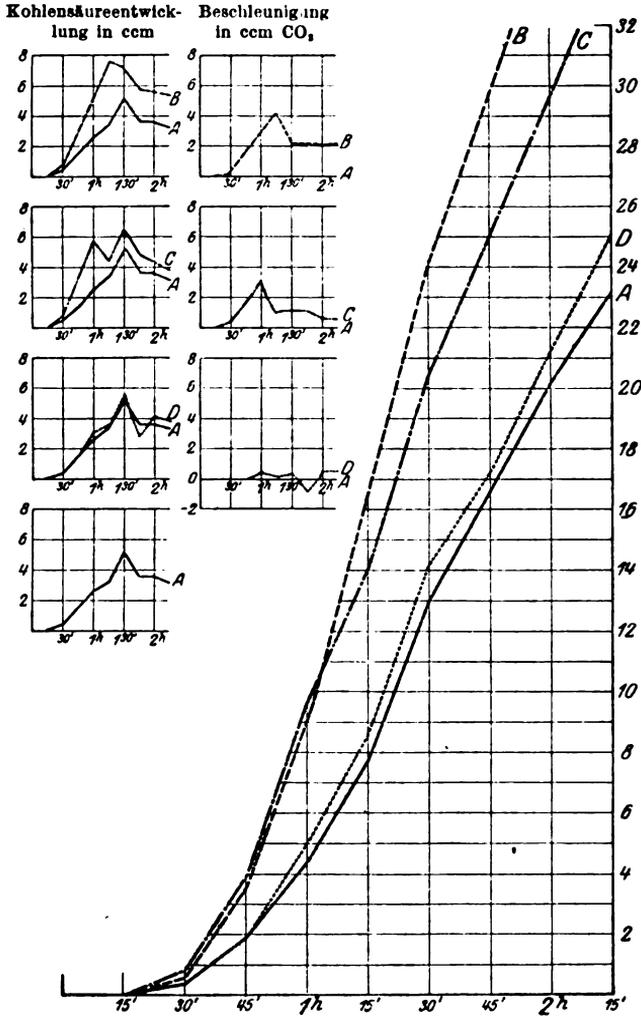


Abb. 11.

hält demnach etwa ein Fünftel der Trockensubstanz des primären Sirups. Daher müßte, wenn an der Wirksamkeit nichts verlorengegangen ist, der letzte Sirup fünfmal so stark sein, was auch durch die quantitative Untersuchung der Gärbeschleunigung angenähert bestätigt wird, woraus ersichtlich wird, daß sehr wenig von der wirksamen Substanz bei der Reinigung

verlorengegangen war. Zum Vergleiche nahmen wir jedesmal die beschleunigende Wirkung von 0,001 g Trockensubstanz des betreffenden Extraktes an.

In der

Versuchsordnung X, Versuch C,

wird, wie schon erwähnt, die Wirksamkeit des Pikrolonates und außerdem die Wirkung des Extraktes (Versuch B) untersucht. Für diesen Versuch verwendeten wir drei Tropfen des Sirups, die etwa 0,0407 g Trockensubstanz enthalten. Diese Menge gab eine Gärbeschleunigung von 4,4 cm nach 2 Stunden pro Viertelstunde. Berechnen wir, wie früher, die Beschleunigung, die 0,001 g der Trockensubstanz des Sirups ausüben würde, so erhalten wir den Wert von 0,108 cm. Im Vergleiche zum primären Extrakt ist sie etwas weniger als 5 mal ($4\frac{1}{2}$ mal) so groß.

Versuchsordnung XI.

Tabelle I.

Tabelle II.

Tabelle III.

In	Gesamtkohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch				In der	Kohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch				Pro	Beschleunigung in ccm CO ₂ bei Versuch		
	A	B	C	D		A	B	C	D		B	C	D
15'	0	0	0	0	1.)	0	0	0	0	1.)	0	0	0
30'	0,4	0,6	0,8	0,4	2.)	0,4	0,6	0,8	0,4	2.)	+0,2	+0,4	0
45'	1,8	3,6	3,8	1,8	3.)	1,4	3,0	3,0	1,4	3.)	+1,6	+1,6	0
1 ^h	4,4	9,0	9,6	5,0	4.)	2,6	5,4	5,8	3,2	4.)	+2,8	+3,2	+0,6
1 ^h 15'	7,8	16,6	14,0	8,6	5.)	3,4	7,6	4,4	3,6	5.)	+4,2	+1,0	+0,2
1 ^h 30'	13,8	24,0	20,4	14,2	6.)	5,2	7,4	6,4	5,6	6.)	+2,2	+1,2	+0,4
1 ^h 45'	16,6	29,8	25,2	17,0	7.)	3,6	5,8	4,8	2,8	7.)	+2,2	+1,2	-0,8
2 ^h	20,2	35,4	29,6	21,2	8.)	3,6	5,6	4,4	4,2	8.)	+2,0	+0,8	+0,6
2 ^h 15'	23,4	40,8	33,4	25,0	9.)	3,2	5,4	3,8	3,8	9.)	+2,2	+0,6	+0,6

Versuch: Vergleichsversuch.

Versuch B: Gärflüssigkeit + 5 mg des Sulfates der PWS-fällbaren Base.

Versuch C: Gärflüssigkeit + 5 mg des Sirups nach CH₃-OH-Fällung

Versuch D: Gärflüssigkeit + aliquoter Teil des Filtrats nach Phosphorwolframsäurefällung.

V. Reinigung mit Phosphorwolframsäure.

Der Sirup wurde weiter zuerst mit 10proz. Schwefelsäure versetzt, bis er gerade auf Kongopapier sauer reagierte, wobei sich Gips abschied. Das Filtrat hiervon wurde zur Abscheidung der Base so lange mit Phosphorwolframsäure gefällt, als sich noch ein Niederschlag zeigte, wobei ein Überschuß vermieden wurde.

Versuchsordnung XI, Versuch D.

zeigte, daß das mit Ätzbaryt zur Entfernung der Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure behandelte Filtrat fast wirkungslos war.

Der gelbliche dicke Niederschlag (Phosphorwolframat) wurde gut abgesaugt und so lange mit mehrmals umkristallisiertem Ätzbaryt und

warmem Wasser verrieben, bis er keine Reaktion auf Kongopapier mehr zeigte. Der Brei wurde abgesaugt, wobei die unlöslichen Bariumsalze zurückblieben, während die Base und der überschüssige Ätzbaryt in das Filtrat gingen. Durch Einleiten von Kohlensäure und dann Einengen im Vakuum wurde Bariumcarbonat abgeschieden, das abfiltriert wurde.

VI. Reinigung mit 50 proz. H_2SO_4 und quantitative Untersuchung des neuen Sirups.

Das Filtrat wurde hierauf mit 50 proz. Schwefelsäure und Alkohol, solange ein Niederschlag fiel, versetzt. Der Niederschlag und ein dicker Sirup, der sich in kleinen Mengen dabei abschied, wurde abfiltriert. Das Filtrat, die Base als Sulfat enthaltend, wurde zwecks Entfernung der freien Schwefelsäure mit Bariumcarbonat bis zur kongopapierneutralen Reaktion versetzt. Der Niederschlag von Bariumsulfat und etwas überschüssigem Bariumcarbonat wurde abfiltriert das Filtrat im Vakuum eingeeengt und dann im Vakuumexsiccator stehengelassen. Wir erhielten wieder einen sehr dicken Sirup in der Menge von 1,20 g, die nach unserer Berechnung 0,984 g Trockensubstanz enthielten. Beziehen wir die Gesamtmenge der Trockensubstanz auf das Ausgangsmaterial von 300 g Trockenhefe, so sind von je 100 g idealer Trockenhefe in unserem Sirup nur noch 0,328 g der Trockenhefe, also etwas mehr als 3 pro Mille vorhanden.

Durch Reinigen mit Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure erhielten wir aus dem Sirup nach der Blei- und Sublimatfällung, der noch 1,67% der Trockenhefe beinhaltet hatte, einen Sirup, der nur noch 0,328% derselben enthielt. Es waren durch die Reinigung demnach wieder etwa 80% (genauer 80,40%) unwirksamer Substanz entfernt worden. Die Menge der Trockensubstanz des Sirups betrug jetzt wieder etwa ein Fünftel von der des früheren. Seine Wirksamkeit sollte also wieder etwa 5 mal stärker sein, als die des früher untersuchten Sirups.

Tatsächlich bestätigte auch diesmal die quantitative Untersuchung der Gärbeschleunigung angenähert diese Berechnung.

Versuchsanordnung XI, Versuch B

untersucht die Wirkung von 0,005 g des Sirups nach der Phosphorwolframsäure- und Schwefelsäurefällung, 0,0041 g Trockensubstanz enthaltend.

Es trat hierbei eine Gärbeschleunigung von 2,2 ccm nach zwei Stunden pro Viertelstunde auf. Auf 0,001 g der Trockensubstanz des Sirups bezogen, ergibt sich eine Beschleunigung von 0,537 ccm. Das Verhältnis zum Trockenrückstand des ersten Extrakts ist also wie 22 : 1, zum Extrakt nach der ersten Reinigung wie 5 : 1. Der letzte Extrakt ist also 22 mal stärker als der aus der Hefe bloß durch Alkoholextraktion erhaltene Extrakt, alles auf Trockensubstanz berechnet. Da 0,007 g Trockensubstanz des primären Extraktes noch eine Beschleunigung gut anzeigten, so würde also jetzt auch der 22. Teil, also etwa 0,0003 g Trockensubstanz des jetzigen Extraktes, eine noch merkbare Beschleunigung ergeben.

Gleichzeitig wurde auch der nach dem Versetzen mit 50% Schwefelsäure und Alkohol entstandene Sirup geprüft. Zu diesem Zwecke war er

von dem gleichzeitig ausgeschiedenen Niederschlag (anorganisch) durch wenig Wasser getrennt worden. Bei Behandlung der Lösung mit Methylalkohol schied sich neuerdings ein Niederschlag ab, der anorganisch war. Das im Vakuum eingeengte Filtrat wurde nach Entfernung des Methylalkohols im Vakuumexsiccator belassen. Beim Gärversuch (Versuchs-anordnung XI, Versuch C) der mit 0,005g des dicken Sirups, 0,004 g Trockensubstanz enthaltend, angestellt wurde, trat eine Beschleunigung von 0,9 ccm pro Viertelstunde nach 2 Stunden auf. 0,001 g Trockensubstanz rufen also eine Beschleunigung von 0,225 ccm hervor, die also doppelt so groß ist, wie die des früheren Extrakts. Es ist möglich, daß der Sirup, der nicht in großen Mengen bei der Schwefelsäurefällung entstanden war, Teile des wirksamen Stoffes mitriß, die hier in geringerer Konzentration wirkten.

VII. Reinigung mit Amylalkohol.

Durch Zusatz von Natriumbicarbonat zum sulfathaltigen Sirup wurde die Base frei gemacht und es wurde versucht, diese mit organischen Solvenzien auszuschütteln. Mit Äther, Benzol, Chloroform gelang es nicht. Mit Amylalkohol konnte durch wiederholtes Ausschütteln eine kleine Menge aus der mit Bicarbonat versetzten Flüssigkeit heraus geholt werden. Im Vakuum wurde der Amylalkohol abgedampft und die Wirksamkeit des Rückstandes, wie die der vom überschüssigen Bicarbonat abfiltrierten Lösung geprüft. Die Menge des aus dem Amylalkoholauszug erhaltenen Sirups betrug 0,09 g, entsprechend 0,0756 g Trockensubstanz.

Versuchs-anordnung XII, Versuch B

ergab bei der Verwendung von 0,0018 g des Sirups, d. i. 0,0015g Trockensubstanz, eine Beschleunigung von 0,8 ccm pro Viertelstunde nach 2 Stunden 0,001 g dieser Trockensubstanz würden also eine Beschleunigung von etwa

Versuchs-anordnung XII.

Tabelle I.

Tabelle II.

Tabelle III.

In	Gesamtkohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch			In der Viertelstunde	Kohlensäureentwicklung in ccm bei Versuch			Pro	Beschleunigung in ccm CO ₂ bei Versuch	
	A	B	C		A	B	C		B	C
15'	0	0	0	1.	0	0	0	1.	0	0
30'	0,2	0,2	0,2	2.	0,2	0,2	0,2	2.	0	0
45'	1,2	1,6	1,2	3.	1,0	1,4	1,0	3.	+0,2	0
1 ^h	3,2	5,0	3,6	4.	2,0	3,4	2,4	4.	+1,4	+0,4
1 ^h 15'	6,6	9,6	7,6	5.	3,4	4,6	4,0	5.	+1,2	+0,6
1 ^h 30'	10,8	14,4	13,0	6.	4,2	4,8	5,4	6.	+0,6	+1,2
1 ^h 45'	15,6	19,8	19,0	7.	4,8	5,4	6,0	7.	+0,8	+1,2
2 ^h	18,6	23,8	23,2	8.	3,0	4,0	4,2	8.	+1,0	+1,2
2 ^h 15'	22,8	29,0	27,6	9.)	4,2	5,2	4,4	9.)	+1,0	+0,2

Versuch A: Vergleichsversuch.

Versuch B: Gärfähigkeit + 1,8 mg des mit Amylalkohol extrahierten

Sirups

Versuch C: Gärfähigkeit + 1,8 mg des Amylalkoholauszuges.

0,53 ccm bewirken, woraus ersichtlich ist, daß der Amylalkohol keine besondere Trennung und Reinigung hervorrief. Bei dem Parallelversuch (Versuch C), der noch Natriumcarbonat gelöst enthielt, zeigte sich unter Anwendung gleicher Mengen gleichfalls eine Beschleunigung von 0,58 ccm für 0,001 g seiner Trockensubstanz.

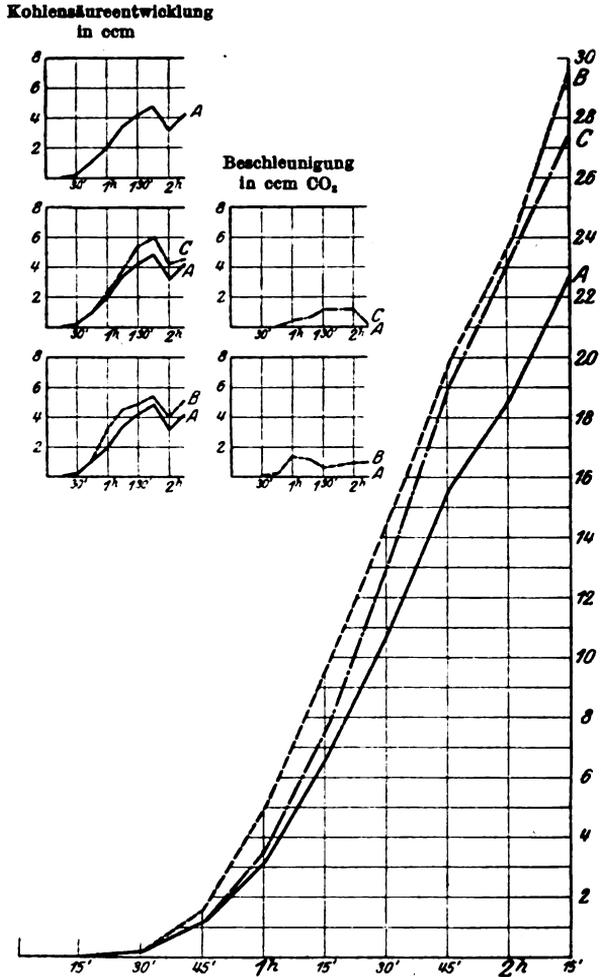


Abb. 12.

Zusammenfassung unserer Arbeitsmethode.

Nicht vollkommen getrocknete Hefe wurde mit 80proz. Alkohol ausgezogen, die gelösten Fette mit Äther entfernt und zuerst mit basischem Bleiacetat gefällt. Das als wirksam erkannte

Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff entbleit und dann mit konzentrierter Sublimatlösung gefällt. Der Niederschlag wurde dann mit Schwefelwasserstoff zerlegt mit Blei und Silber von der freien Salzsäure befreit, im Vakuum eingeengt und stehen gelassen, wobei sich unwirksame Krystalle abschieden. Der wirksame Sirup wurde mit Pikrolonsäure gefällt, das unwirksame Pikronolat abfiltriert und das Filtrat nach Entfernung der überschüssigen Pikrolonsäure mit Phosphorwolframsäure unter Vermeidung eines Überschusses gefällt. Der Niederschlag, der wirksam war, wurde mit Ätzbaryt zerlegt und mit 50 proz. Schwefelsäure versetzt. Das im Vakuum eingeengte Filtrat enthält die gesuchte Base als Sulfat und ist 22 mal wirksamer als der primäre alkoholische Extrakt. Der letzte Sirup wurde mit Natriumbicarbonat alkalisch gemacht und es wurde versucht, mit Amylalkohol die nun freie Base auszusütteln, was aber infolge der geringen Menge nicht vollkommen gelang. Die Aufeinanderfolge der Reinigung mit Blei, Quecksilber, Phosphorwolframsäure hat gegenüber der primären Fällung mit Phosphorwolframsäure wesentliche Vorteile.

Ergebnis der vorliegenden Arbeit.

Es wurde vorerst ein Verfahren ausgearbeitet, mittels welchen es möglich ist, in sehr einfacher Weise ohne kostspielige und langwierige Tierversuche die Anwesenheit von sogenannten akzessorischen Nährstoffen, hier Gärungsbeschleunigern, festzustellen und deren Menge vergleichend auszuwerten.

An der Hand dieses Verfahrens war es weiter möglich, diese Stoffe bei allen chemischen Operationen in Lösung und Niederschlag zu verfolgen und so ein chemisches Verfahren zu deren Darstellung auszuarbeiten, bei dem 99,8% der unwirksamen Verbindungen abgeschieden werden.

In den folgenden Mitteilungen wird die Anwendbarkeit dieser Verfahren weiter untersucht.

Über Fermentbildung.

Von
Erich Köhler.

(Aus dem botanischen Laboratorium der Hochschule Weihenstephan.)

(Eingegangen am 2. Oktober 1920.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Daß das physiologische Verhalten einer bestimmten Hefevarietät den verschiedenen Zuckerarten gegenüber ein sehr unterschiedliches ist, ist eine bekannte Tatsache. Die beiden Prozesse des Wachstums und der Gärung sind zum mindesten quantitativ von der Art der gebotenen Zuckerquelle weitgehend abhängig. Was die Gärung anbelangt, so wissen wir ja, daß gewisse Zucker, beispielsweise von Bierhefe gar nicht, andere mäßig, wieder andere sehr leicht vergoren werden. Wodurch ist diese „spezifische Zuckerwirkung“ bedingt? Es wäre ein gewisser Fortschritt, wenn es gelingen würde, auf diese Frage eine befriedigende Antwort zu bekommen. Ist es etwa eine Frage der Permeabilität? Ist die Vorstellung berechtigt, daß die verschiedenen Zucker die Permeabilität der Plasmamembran in verschiedenem Sinne beeinflussen, oder daß von vornherein für die verschiedenen Zucker ein verschiedener Grad der Permeabilität bestehe? — Soweit mir die Literatur zugänglich ist, habe ich keinen ernsthaften Versuch zur Lösung dieser Frage angetroffen. Eine Ausnahme macht allein eine Abhandlung von Boas, Leberle und Langkammerer¹⁾, in welcher besonders nachdrücklich auf das Problem hingewiesen und auch eine Erklärung in dem eben angedeuteten Sinne versucht wird, wie das folgende Zitat zeigt:

„Die vermutete spezifische Zuckerwirkung scheint also auf zweierlei Weise sich geltend zu machen. Die einzelnen Zuckerarten dürften näm-

¹⁾ Diese Zeitschr. **105**, 199. 1920.

lich in verschiedenem Maß auf die Plasmamembran teils verhärtend, teils auflockernd wirken; teils dürften dann entsprechend Teilprozesse des Stoffwechsels und des Stoffaustausches qualitativ verschieden vor sich gehen.“

Die Autoren machten a. a. O. die interessante Feststellung daß bei Darbietung eines Gemisches von gleichen Teilen Maltose und Saccharose in der Nährlösung der Vergärungsgrad nach beendetem Wachstum denselben Wert erreicht wie bei Darbietung von Maltose allein (bei Weihenstephaner Unterhefe); letzterer war bedeutend höher als bei Darbietung von Saccharose allein. Man hätte ja von vornherein erwarten können, daß der Vergärungsgrad des Gemisches einen Mittelwert darstellen würde zwischen dem Vergärungsgrad der Saccharose und der Maltose. Ein anderer interessanter Fall betrifft die Vergärung von Saccharose und Maltose durch Weinhefe. Die Maltose für sich wurde vergoren, die Saccharose für sich wurde wohl invertiert aber nicht vergoren. Mischte man aber die beiden Zucker zu gleichen Teilen, so wurde auch die Saccharose im Gemisch vergoren. Nach Ansicht der Autoren „wird die schädliche Wirkung der Saccharose durch Maltose aufgehoben oder jedenfalls sehr stark vermindert“.

Ich habe schon in anderem Zusammenhang¹⁾ die Vermutung ausgesprochen, daß das unerwartete Ergebnis der Versuche wohl zurückgeführt werden müsse auf das im Vergleich zur Maltose mangelhafte Vermögen der Saccharose, die Ferment- (Zymase-) Produktion anzuregen. Damit ist das Problem der spezifischen Zuckerwirkung mit dem Vorgang der Fermentbildung in Zusammenhang gebracht.

Eigene Untersuchungen.

Bei Vergärung von Maltose durch Unterhefe Weihenstephan²⁾ konnte ich feststellen (l. c.), daß in Abhängigkeit vom „physiologischen Zustand“ der Hefe — es ist noch nicht offenbar, welche Faktoren einen hierfür günstigen Zustand bedingen — gelegentlich ein vorläufiges Maximum der Gärung entsteht, das von einem Minimum gefolgt ist. Erst dann folgt das Hauptmaximum. Wenn meine damals gemachte Annahme richtig wäre, daß eine Anreicherung von gärfertiger Zymase, „ein Ferment Spiegel“, die

¹⁾ Diese Zeitschr. III, 17. 1920.

²⁾ Auch bei den folgenden Versuchen wurde diese Hefe ausschließlich verwendet.

äußerst lebhaft Angärung mit der Erscheinung des vorläufigen Maximums bedinge, so müßte sich ein solches auch bei der Vergärung von anderen Zuckern zeigen. Dies ist aber lange nicht in dem erwarteten Umfange der Fall. Zwar hatte ich schon früher¹⁾ ein vorläufiges Maximum angetroffen bei der Vergärung von Dextrose. Bei den späteren Versuchen konnte ich es ungleich viel häufiger bei Maltose feststellen. Darüber werden die folgenden Versuche orientieren.

Versuch 1: Frisch gewaschene Unterhefe aus dem Betrieb wurde — nach Angleichung der Temperatur an diejenige des Versuchsaumes — einer 18stündigen Vorgärung in einer 2,9 proz. Maltoselösung unterzogen. Nach Abgießen der überstehenden Flüssigkeit von der abgesetzten Hefe

Tabelle I.
Dextrose, Maltose, Saccharose (je 5%)
Angesetzt: 8^h 43'

Zahl der Blasen in $\frac{1}{2}$ Minute gezählt					
D		M		S	
Zeit	Zahl	Zeit	Zahl	Zeit	Zahl
9 ^h	3	8 ^h 54'	40	9 ^h 2'	4
9 ^h 04'	4	8 ^h 55'	44	9 ^h 6'	7
9 ^h 08'	5	8 ^h 57'	47	9 ^h 9'	10
9 ^h 12'	7	8 ^h 59'	42	9 ^h 14'	14
9 ^h 16'	8	9 ^h 1'	27	9 ^h 18'	18
9 ^h 20'	10	9 ^h 3'	27	9 ^h 22'	19
9 ^h 25'	14	9 ^h 5'	31	9 ^h 24'	21
9 ^h 30'	18	9 ^h 7'	32	9 ^h 27'	25
9 ^h 34'	18	9 ^h 10'	38	9 ^h 29'	25
9 ^h 38'	21	9 ^h 13'	42	9 ^h 31'	25
9 ^h 42'	21	9 ^h 15'	44	9 ^h 33'	28
9 ^h 45'	23	9 ^h 17'	47	9 ^h 35'	29
9 ^h 55'	26	9 ^h 19'	48	9 ^h 37'	29
10 ^h 5'	28	9 ^h 21'	50	9 ^h 39'	28
10 ^h 20'	32	9 ^h 23'	49	9 ^h 41'	30
10 ^h 35'	30	9 ^h 26'	53	9 ^h 43'	31
10 ^h 50'	31	9 ^h 32'	55	9 ^h 47'	31
11 ^h 15'	31	9 ^h 36'	56	9 ^h 57'	34
11 ^h 45'	25	9 ^h 40'	54	10 ^h 07'	37
2 ^h	10	9 ^h 46'	58	10 ^h 22'	40
		9 ^h 56'	58	10 ^h 37'	39
		10 ^h 6'	59	10 ^h 52'	37
		10 ^h 21'	58	11 ^h 17'	38
		10 ^h 36'	54	11 ^h 47'	32
		10 ^h 51'	48	2 ^h 02'	13
		11 ^h 16'	35		
		11 ^h 46'	23		
		2 ^h 1'	2		

¹⁾ Diese Zeitschr. 106, 235. 1920. Abb. 2. S. 239.

wurde letztere in destilliertem Wasser suspendiert. Je 50 ccm der Aufschlemmung wurden mit einer 5proz. Lösung von Dextrose, Maltose und

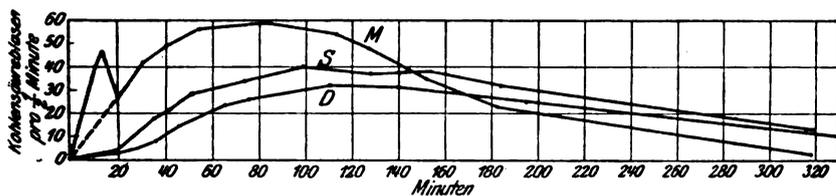


Abb. 1.

Saccharose versetzt und die Gärung mit Hilfe der Gasblasenzählmethode verfolgt. Wie aus Tabelle I und Abb. 1 hervorgeht, trat ein vorläufiges Maximum nur bei der Maltose in Erscheinung, bei den anderen Zuckern zeigte sich keine Andeutung davon.

Versuch 2: Zur Erzielung eines stärkeren vorläufigen Maximums wurde Hefe nach 24stündiger Vorgärung in 5proz. Saccharoselösung mit 4proz. Lösungen von Maltose, Saccharose und Dextrose versetzt. Wie die Kurve (Abb. 2) zeigt, erscheint bei Maltose ein ganz gewaltiges vorläufiges Maximum, dessen Höhe späterhin bei weitem nicht mehr erreicht wird. Ob aber bei den anderen Zuckern nicht doch ein vorläufiges Maximum

Tabelle II.

Saccharose, Maltose, Dextrose (je 5%).

Zahl der Blasen in 1/2 Minute gezählt					
Anges.: 3 ^h 33'		3 ^h 36'		3 ^h 40'	
S		M		D	
Zeit	Zahl	Zeit	Zahl	Zeit	Zahl
3 ^h 43'	13	3 ^h 44'	45	3 ^h 45'	2
3 ^h 47'	18	3 ^h 46'	67(!)	3 ^h 51'	9
3 ^h 50'	24	3 ^h 48'	66	3 ^h 54'	18
3 ^h 53'	29	3 ^h 49'	64	3 ^h 58'	29
3 ^h 56'	33	3 ^h 52'	45	4 ^h 1'	37
3 ^h 59'	34	3 ^h 55'	37	4 ^h 4'	43
4 ^h 2'	38	3 ^h 57'	33(!)	4 ^h 7'	48
4 ^h 5'	38	4 ^h	38	4 ^h 9'	47
4 ^h 8'	40	4 ^h 3'	43	4 ^h 12'	48
4 ^h 13'	38	4 ^h 6'	47	4 ^h 15'	48
4 ^h 16'	42	4 ^h 10'	49	4 ^h 18'	46
4 ^h 19'	40	4 ^h 14'	48	4 ^h 20'	44
4 ^h 22'	41	4 ^h 17'	49	4 ^h 23'	40
4 ^h 25'	37	4 ^h 21'	48	4 ^h 26'	37
4 ^h 28'	38	4 ^h 24'	46	4 ^h 29'	34
4 ^h 31'	36	4 ^h 27'	43	4 ^h 32'	36
4 ^h 33'	36	4 ^h 30'	41	4 ^h 35'	31
4 ^h 40'	33	4 ^h 34'	37	4 ^h 42'	28
4 ^h 50'	30	4 ^h 41'	33	4 ^h 52'	25
5 ^h 8'	25	4 ^h 51'	26	5 ^h 11'	20
		5 ^h 09'	15		

in Erscheinung getreten wäre, wenn infolge Zuckermangels nicht das frühzeitige Absinken erfolgt wäre, läßt sich nicht sagen (Tabelle II, Abb. 2).

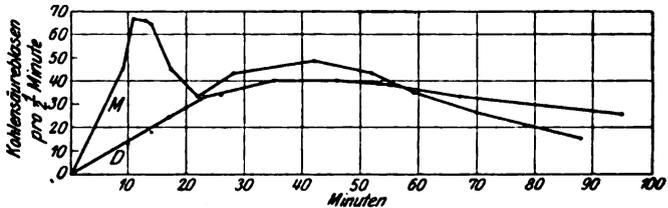


Abb. 2.

Versuch 3: Um also einem zu frühen Absinken zu begegnen, wurden die Zucker in 10 proz. Lösung (Saccharose) vorbehandelt. Da aus Versuch 1 und 2 hervorgeht, daß Dextrose und Saccharose sich ähnlich verhalten, wurden erstere weggelassen. In drei 100 ccm fassenden Erlenmeyerkolben wurde je eine Hefeaufschlemmung von 20 ccm mit 60 ccm 10 proz. Saccharoselösung einer Vorgärung unterzogen. Nach 24 Stunden wurde die klare, schwach gärende überstehende Flüssigkeit vorsichtig abgesehen und zwecks Waschung durch destilliertes Wasser ersetzt, so daß die Hefe am Boden sitzen blieb. Nach Abgießen des Waschwassers wurde die Hefe in verschiedenen Zuckerlösungen suspendiert, in Pasteurkolben eingefüllt und die Gärung verfolgt.

- Gäransatz 1 80 ccm Maltose (Merck),
 2 80 ccm Saccharose (Würfelzucker),
 3 40 ccm Maltose + 40 ccm Würfelzucker.

Man sieht aus Abb. 3, daß ein ausgesprochenes vorläufiges Maximum hier nicht zustande gekommen ist. Die Maltosekurve erreicht nach 70 Minuten ein Maximum (33 Blasen), sinkt nach weiteren 35 Minuten unerheblich ab (31 Blasen), um weiterhin um denselben Wert (32 Blasen) zu schwanken. Diese Höhe wurde von der Saccharosekurve erst nach ungefähr 270 Minuten erreicht. Schließlich wird die immer noch horizontale Maltosekurve von der weiter ansteigenden Saccharosekurve geschnitten. Die Gemischkurve deckt sich zwar von Anfang an nicht ganz mit der Maltosekurve, ist ihr aber stark genähert und hält sich weit entfernt von der Saccharosekurve. Nach 140 Minuten entwickelt das Gemisch gleich starke Gärungsintensität wie die Maltose allein, überschneidet die Maltosekurve, um weiterhin dauernd darüber zu bleiben. Späterhin zwischen 12^h 5' und 1^h 50' sind an CO₂ gebildet von Maltose 0,61 g; von Saccharose 0,63 g und vom Gemisch 0,66 g. Um 3^h 35' bei Maltose 1,21 g; bei Saccharose 1,17 g; beim Gemisch 1,34 g. Wir treffen hier also zum erstenmal auf die Erscheinung, die uns noch öfter begegnen wird, daß die Gärungsintensität in Zuckergemischen zuzeiten eine höhere ist als in den ungemischten Zuckerlösungen.

Tabelle III.
Maltose, Saccharose (je 5%).

Zahl der Blasen in 1/2 Minute gezählt					
Anges.: 8 ^h 47'		8 ^h 41'		8 ^h 44'	
M		S		$\frac{M}{2} + \frac{S}{2}$	
Zeit	Zahl	Zeit	Zahl	Zeit	Zahl
9 ^h	1		1		2
9 ^h 05'	3		2		3
9 ^h 10'	6		3		6
9 ^h 15'	9		3		11
9 ^h 20'	14		4		14
9 ^h 25'	18		5		17
9 ^h 30'	22		5		19
9 ^h 35'	26		5		20
9 ^h 40'	28		8		22
9 ^h 45'	29		9		25
9 ^h 50'	32		9		25
9 ^h 55'	33		11		27
10 ^h	32		12		27
10 ^h 05'	33		13		29
10 ^h 15'	33		15		29
10 ^h 25'	33		16		31
10 ^h 35'	31		17		29
10 ^h 45'	31		19		31
10 ^h 55'	31		19		32
11 ^h 05'	32		23		34
11 ^h 15'	32		24		33
11 ^h 25'	33		24		34
11 ^h 35'	33		26		34
11 ^h 45'	31		26		34
11 ^h 55'	32		29		34

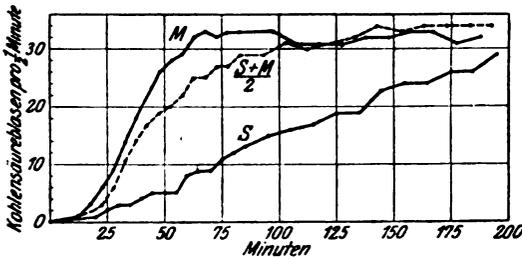


Abb. 8.

Versuch 3a:

- Gäransätze 1 Je 20 ccm Hefeaufschlemmung zu 50 ccm Dextrose (10%),
- 2 25 ccm Dextrose + 25 ccm Maltose (je 10%).
- 3 50 ccm Maltose (10%).

Die Hefe war frisch gewaschen aus der Brauerei.

Wie sich aus Tabelle IIIa und Abb. 3a ersehen läßt, kommt es bei diesem Versuch zu einem schwachen vorläufigen Maximum bei der Maltose-

gärung nach 11 Minuten (16 Blasen), das vorläufige Minimum erscheint nach 44 Minuten (14 Blasen), während das Hauptmaximum (26 Blasen) nach ungefähr 90 Minuten erreicht ist. Die Dextrosekurve hält sich weit unterhalb der Maltosekurve. Die Kurve des Gemischs überschreitet schon nach 34 Minuten die Maltosekurve, um weiterhin noch anzusteigen und bis zum Abbruch des Versuchs über der letzteren zu bleiben. Also auch hier wird das Gemisch beträchtlich rascher vergoren als die reinen Zuckerlösungen.

Tabelle IIIa.
Dextrose, Maltose (je 5%).

Zahl der Blasen in $\frac{1}{2}$ Minute gezählt					
Anges.: 8 ^h 33'		8 ^h 34'		8 ^h 35'	
D		$\frac{D}{2} + \frac{M}{2}$		M	
Zeit	Zahl	Zeit	Zahl	Zeit	Zahl
8 ^h 51'	3	8 ^h 52'	7	8 ^h 53'	14
8 ^h 54'	4		11		16
8 ^h 57'	5		12		16
9 ^h	7		13		—
9 ^h 03'	7		15		17
9 ^h 06'	9		15		16
9 ^h 09'	9		18		16
9 ^h 12'	11		19		15
9 ^h 15'	11		20		16
9 ^h 18'	11		20		15
9 ^h 21'	11		21		15
9 ^h 27'	13		22		14
9 ^h 40'	14		25		22
9 ^h 50'	17		25		24
10 ^h	20		28		25
10 ^h 10'	21		30		26
10 ^h 21'	23		31		26
10 ^h 30'	24		28		25

Entwickelte CO₂ in Hundertstel Gramm:

zwischen 10^h 46' und 3^h 17' $D = 73, \frac{M + D}{2} = 72, M = 75$

„ 3^h 17' nachm. und 11^h vorm. $D = 65, \frac{M + D}{2} = 50, M = 63$

Insgesamt: $\frac{138}{2} \quad \frac{122}{2} \quad \frac{138}{2}$

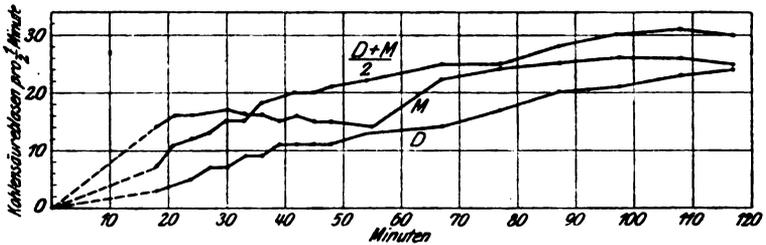


Abb. 8a.

Es dürfte zu einem leichteren Verständnis der ziemlich verwickelten und nicht einfach darzustellenden Verhältnisse beitragen, wenn ich gleich jetzt die Lösung der aufgetretenen Fragen vorwegnehme, so wie sie sich mir im Laufe der Arbeit ergeben hat.

Daß es sich in den Gemischen um ein Gegenspiel von Hemmungen und Förderungen handeln könnte, ist von vornherein plausibel. Die Förderung der Gärung im Gemisch läßt sich erklären durch die Annahme, daß die beiden beteiligten Zucker auf die verschiedenen Faktoren der Gärung im ungleichen Sinne einwirken. Die Schwierigkeit liegt nur darin, die in Betracht kommenden Faktoren ausfindig zu machen. Als solche kommen eine ganze Reihe in Frage, u. a. die schon erwähnte Permeabilität, dann die von Michaelis¹⁾ und Mitarbeitern studierten Hemmungen, die zustande kommen infolge chemischer Affinität des Ferments zum Substrat oder durch Verkleinerung der Geschwindigkeitskonstante der fermentativen Spaltung.

Nun liegen aber von Buchner²⁾ einige Versuche mit Preßsäften vor, aus denen sich entnehmen läßt, daß die Vergärung der häufigsten Zucker (Saccharose, Maltose, Dextrose, Fructose) mit annähernd derselben Geschwindigkeit erfolgt. Höchstens daß sich vielleicht eine jedenfalls unbeträchtliche raschere Vergärung von Saccharose und Maltose herauslesen ließe. Dies läßt darauf schließen, daß wir es bei der spezifischen Zuckerwirkung überwiegend mit einer Lebenserscheinung, vielleicht einer Reizwirkung zu tun haben.

Man kann sich vorstellen, daß zur Bildung der gärfertigen Zymase mehrere Bedingungen erfüllt sein müssen. Erstens müssen im Protoplasma die nötigen Baustoffe vorhanden sein (Ernährungszustand), zweitens muß auf das Plasma ein Reiz ausgeübt werden, durch welchen die Bildung der unwirksamen Vorstufe der Zymase ausgelöst wird, und drittens muß ein Reiz ausgeübt werden, der die Aktivierung dieser Vorstufe, d. h. ihre Umwandlung in gärfertige Zymase veranlaßt. (Ob dabei auch katalytische Prozesse eine Rolle spielen, ist noch ungewiß.) Es wird durch die Versuche dargetan, daß die Auslösung der beiden genannten Reizwirkungen

¹⁾ Vgl. z. B. diese Zeitschr. 60, 62 u. 79. 1914.

²⁾ Die Zymasegärung 1903, S. 104.

unabhängig voneinander erfolgt, daß es Zucker gibt, die den einen Auslösungsvorgang rascher, günstiger bewirken als den anderen, und daß sich andere Zucker umgekehrt verhalten.

Die Maltose hat die Eigenschaft, die Aktivierung der schon hervorgebrachten Zymasevorstufe außerordentlich rasch zu veranlassen, wogegen sie in deren Hervorbringung hinter den Zuckern Saccharose, Fructose, Dextrose beträchtlich zurücksteht. Die letzteren Zucker dagegen haben die Eigenschaft, die Hervorbringung selbst zwar zu beschleunigen, sind aber weniger geeignet, die Aktivierung selbst zu veranlassen. Wenn daher auch eine bedeutende Anreicherung der Vorstufe in der Hefe stattgefunden hat, so werden diese Zucker anfangs viel langsamer vergoren werden. Bei Gegenwart von Maltose dagegen wird überall da eine Beschleunigung eintreten, wo sich eine solche Anreicherung eingestellt hat.

Daraus erklärt sich das häufige Auftreten eines vorläufigen Maximums bei der Maltosegärung. Auch bei den anderen Zuckern kann es zu einem vorläufigen Maximum kommen; aber nur dann, wenn eine Anreicherung gärfertiger, aktivierter Zymase in der Hefe stattgefunden hat. In dem Falle sind wir also berechtigt von der Bezeichnung „Fermentspiegel“ Gebrauch zu machen. Nicht aber dann, wenn das vorläufige Maximum bei der Maltosegärung auftritt als Folge einer Anreicherung von nicht aktivierter Zymase. Hier wäre eher die Bezeichnung „Profermentspiegel“ am Platz.

Wie man sich den Vorgang der Aktivierung vorzustellen hat, ist eine andere Frage und soll in einer späteren Arbeit untersucht werden. Vorläufig nur folgendes: Die Aktivierung könnte darin bestehen, daß die vorher getrennten Fermentkomponenten (z. B. Zymase und Koferment) zusammentreten. Mit dieser Vorstellung könnten auch andere Erscheinungen in Einklang gebracht werden. Wenn man Hefe tötet, die wohl die Fermentvorstufen enthält, nicht aber aktiviertes Ferment, und aus dieser getöteten Hefe einen Auszug herstellt, so werden die im Organismus getrennt gewesenen Komponenten ungehindert zusammentreten können, wodurch dann die Aktivierung zustande kommt. Die Gärkraft eines Hefeauszugs wäre also nicht bloß abhängig von der Menge der in der lebenden Hefe vorrätigen, sondern

auch von der Menge der infolge der Tötung aktivierten Zymase.

Bei der Vergärung des Gemischs Maltose und Saccharose zu gleichen Teilen ist das Vorhandensein oder Fehlen eines Profermentspiegels von ausschlaggebender Bedeutung. Wenn kein solcher vorhanden ist, so liegt auf der Hand, daß der aktivierende Einfluß der Maltose von Anfang an nach Maßgabe der hervorgebrachten Profermente in Erscheinung treten kann. Auf deren Hervorbringung wirkt aber die Saccharose fördernd, und da das gebildete Proferment alsbald aktiviert und vergoren wird, resultiert daraus eine Steigerung der Gärungsgeschwindigkeit im Gemisch. Ein Gemisch wird demnach von Anfang an rascher vergoren werden als Maltose allein. — Ist hingegen ein Spiegel vorhanden, so kommt anfangs die fördernde Wirkung der Saccharose nicht zum Ausdruck. Ihre Gegenwart wirkt verzögernd und die Vergärung des Gemisches erfolgt zwar rascher als diejenige der Saccharose, aber nicht so rasch wie die der Maltose. Erst wenn der Spiegel unter dem Einfluß der Maltose aufgebraucht ist, kommt die fördernde Wirkung der Saccharose zum Vorschein. Schließlich tritt der Moment ein, wo die Maltosekurve von der Gemischkurve überschritten wird — sofern nicht andere Hemmungen eingreifen, wie Alkoholanreicherung, Abnahme des Zuckers, Abnahme der Maltosewirkung infolge fortgeschrittener Maltose-spaltung. — Man könnte sich auch anders ausdrücken und sagen: die Maltose wirkt relativ hemmend auf die Bildung der Zymasevorstufe, die anderen Zucker dagegen hemmend auf die Aktivierung der Vorstufe. Im Gemisch wird dann eine Milderung der beiden gegensätzlichen Hemmungen eintreten. Man könnte zur Kennzeichnung dieses Verhältnisses von einer „antagonistischen Zuckerwirkung“ sprechen.

Wir haben bisher — aus Gründen der klareren Darstellung — mit der Annahme gerechnet, als ob sich eine Anreicherung von Prozymase (so sei der Kürze wegen die nicht aktivierte Zymase genannt) bei der Maltosegärung stets durch ein vorläufiges Maximum anzeige. Dies braucht aber nicht immer zuzutreffen. Es kann nämlich nicht allein die plötzliche Abnahme der Gärgeschwindigkeit anzeigen, daß die Vergärung des Profermentspiegels zu Ende gekommen ist, sondern schon das plötzliche Verharren der Gärgeschwindigkeit auf gleicher Höhe. Dieses Verharren wird

sich auf der Kurve als scharfer Knick abzeichnen. Die Maltosekurve auf Abb. 2 zeigt einen solchen Fall sehr schön. Noch ein anderer Faktor kann die Bildung eines vorläufigen Maximums verhindern und so die Anwesenheit eines Profermentspiegels verschleiern. Je höher die Konzentration des der Vergärung unterworfenen Zuckers ist, desto höher hinauf rückt das dem vorläufigen Maximum folgende Minimum, um schließlich bei sehr hohen Konzentrationen ganz zu verschwinden¹⁾. Die Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte ist notwendig bei Beurteilung der Frage, ob ein Fermentspiegel vorhanden ist oder nicht.

Nach diesen Gesichtspunkten sollen nun die Versuche 1—3a kurz diskutiert werden, soweit noch nicht geschehen.

Zu Abb. 1. Man sieht, daß, auch abgesehen von dem vorläufigen Maximum bei Maltose, die anfängliche Beschleunigung der Gärgeschwindigkeit diejenige der anderen Zucker übertrifft. Die Beschleunigung bei Maltose kann nach dem vorhergehenden zurückgeführt werden auf die Bildung neuer Prozymase, und man braucht nicht anzunehmen, daß auch die Aktivierungsgeschwindigkeit eine Beschleunigung erfahre. — Bei Saccharose und Dextrose muß die Frage einstweilen dahingestellt bleiben, ob die Beschleunigung allein zurückzuführen ist auf eine Beschleunigung der Profermentbildung oder ob auch eine gewisse Beschleunigung der Aktivierung dabei in Betracht kommt, oder beides. — Daß die von Dextrose und Saccharose erreichten Maxima weit unterhalb des Maltosemaximums gelegen sind, würde nicht darauf beruhen, daß diese Zucker zur Auslösung der Profermentbildung weniger geeignet wären, als vielmehr darauf, daß sie die sich anreichernden Profermentmengen nicht so rasch aktivieren können wie die Maltose. Man sieht ferner, daß die Dextrosekurve beträchtlich hinter der Saccharosekurve zurückbleibt. Es ist aber fraglich, ob dieser Unterschied, dem wir des weiteren immer wieder begegnen werden, auf denselben Faktoren beruht, die man in Anbetracht der zwischen Maltose einerseits und den anderen Zuckern andererseits bestehenden Unterschiede als wirksam annehmen muß. Es scheint, daß dabei noch andere Faktoren in Rechnung zu ziehen sind.

Zu Abb. 2. Die Vorbehandlung in Saccharose scheint für die Hervorbringung des Profermentspiegels günstiger zu sein als die Vorbehandlung in Maltose. Das würde ja mit unseren anderen Vorstellungen sehr gut übereinstimmen, was keiner weiteren Ausführung bedarf.

Zu Abb. 3. Das vorläufige Maximum kommt bei Maltose hier gerade noch zum Ausdruck. Wir wissen ja, daß die hohe Zuckerkonzentration (hier 10%) dem Auftreten des vorläufigen Maximums ungünstig ist. Dies ist, wie an anderer Stelle ausgeführt wurde, auf eine anfängliche Hemmung des Gärprozesses zurückzuführen. Eine solche Hemmung durch höhere

¹⁾ Vgl. diese Zeitschr. 108, 240. 1920.

Zuckerkonzentrationen treffen wir ja auch bei der Preßsaftgärung (Buchner, Zymasegärung 1903, S. 150ff.). Man muß sich vorstellen, daß infolge der langsameren Gärung der Profermentverbrauch langsamer vor sich geht, daß aber der Ersatz keine Hemmung erleidet. — Typisch für die Saccharosekurve ist der langsame, gleichmäßige Anstieg. In der anfänglichen Aufbauchung der Gemischkurve deutet sich noch schwach der Maltoseinfluß auf die Vergärung der Profermentanreicherung an.

Zu Abb. 3a. Auf dieser Kurve (Konzentration nur 7%) kommen die Verhältnisse sehr klar zum Ausdruck. Wäre die verwendete Hefe ohne einen Vorrat an Prozymase gewesen, so hätte die Gemischkurve von Anfang an die anderen übertroffen. Die Maltosekurve zeigt wieder deutlich das vorläufige Maximum mit dem darauffolgenden Minimum.

Versuch 4: Um zu sehen, ob die Vorgärung in verschiedenen Zuckern eine verschiedenartige Nachwirkung bedingt, wurde die zu Versuch 1 benutzte Hefe weiterverwendet. 24 Stunden nach Ansetzen des Versuchs 1 wurden bei den drei Versuchsgefäßen die überstehenden Flüssigkeiten ab-

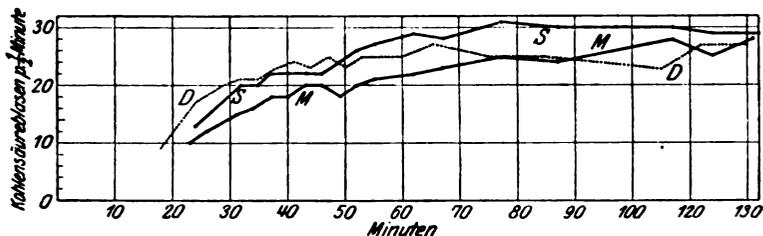


Abb. 4.

gegossen und zu jeder Hefe 80 ccm 5proz. Saccharoselösung zugegeben. Aus der Abb. 4 ist ersichtlich, daß kein fördernder Einfluß durch die Vorbehandlung mit Maltose nachgewiesen werden kann. Die Gärung der mit Maltose vorbehandelten Hefe ist sogar erheblich schwächer als diejenige der anderen Hefen. In der zum Versuch verwendeten Hefe war offenbar keine Anreicherung von Zymase oder Prozymase vorhanden. Die Vergärung der Zucker erfolgte hier nur in Abhängigkeit von der Menge der neugebildeten Zymase. Daß die Kurven nicht übereinstimmen, ist auf die im Vergleich zur Maltose fördernde Nachwirkung der Saccharose und Dextrose auf die Fermentproduktion zurückzuführen. Wie auch aus Versuch 1 und 5 hervorgeht, übertrifft darin die Saccharose die Dextrose, wenn auch unerheblich.

Versuch 5: Um die Richtigkeit der Annahme, daß die Maltose weniger günstig auf die Hervorbringung der Prozymase wirke als Dextrose und Saccharose, zu prüfen, wurden folgende Versuche angestellt. Um eine Anreicherung des Enzyms hervorzurufen, wurden gleiche Mengen Hefe mit verschiedenen Zuckerlösungen (von geringer Konzentration) kurze Zeit vorbehandelt und hierauf mit einer 8proz. Maltoselösung versetzt.

Vorgärung in folgenden Ansätzen:

1. 20 ccm Hefeaufschwemmung und 10 ccm Maltoselösung (0,4 g)
2. 20 „ „ „ 10 „ Dextrose (0,4 g),
3. 20 „ „ „ 10 „ Saccharose (0,4 g).

Nach 20 Minuten wurde zu den Ansätzen je 50 ccm 8 proz. Maltoselösung zugegeben.

Man ersieht aus Abb. 5, daß tatsächlich in der mit Saccharose oder Dextrose vorbehandelten Hefe eine stärkere Anreicherung von Prozymase eingetreten sein muß, als in der mit Maltose vorbehandelten Hefe. Entsprechend der rascheren Aktivierung durch die reine Maltose zeigt die Gärung bei letzterer Hefe anfangs eine größere Geschwindigkeit. Dieser Vorsprung wird aber bei den anderen Hefen rasch eingeholt, und schon nach 43 Minuten überschreitet die Dextrosekurve die Maltosekurve, um längere Zeit erheblich darüber zu bleiben.

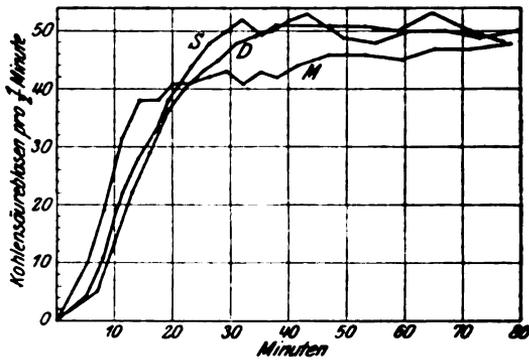


Abb. 5.

Nach ungefähr 100 Minuten hört die Nachwirkung der Vorgärung bei allen drei Ansätzen auf: die Kurven nähern sich allmählich. — Es ist überflüssig zu betonen, daß bei Verwendung eines anderen Zuckers an Stelle von Maltose der Vorgang, wenn überhaupt, so doch jedenfalls lange nicht so deutlich zutage tritt.

Versuch 6: Bei diesem und den folgenden Versuchen wurde die Gärungsgeschwindigkeit durch Bestimmung des Gewichtsverlustes festgestellt. In die Untersuchung wurden mehrere Mischungsverhältnisse einbezogen.

Zu je 20 ccm breiiger Aufschwemmung frisch gewaschener Hefe aus der Brauerei wurden folgende Zuckerlösungen (10 proz.) zugesetzt:

1. 50 ccm Maltoselösung,
2. 25 „ „ + 25 ccm Saccharoselösung,
3. 15 „ „ + 35 „ „
4. 5 „ „ + 45 „ „
5. 50 „ Saccharoselösung allein.

Tabelle VI gibt die gefundenen Werte wieder; vgl. Diagramm I (VIII. Wägung).

Tabelle VI.
Gewichtsverlust in Hundertstel Gramm.

Gärsubstrat	50 ccm Malt. —	25 ccm Malt. 25 ccm Sacch.	15 ccm Malt. 35 ccm Sacch.	5 ccm Malt. 45 ccm Sacch.	50 ccm Sacch. —
Laufende Nummer	1	2	3	4	5
Ansetzen des Versuchs	1 ^h	1 ^h 1'	1 ^h 3'	1 ^h 05'	1 ^h 07'
Nach 30 Min. I. Wägung	5	3	3	2	1
Nach 30 Min. II. Wägung					
Differenz	7	14	12	11	7
Insgesamt	12	17	15	13	8
Nach 30 Min. III. Wägung					
Differenz	15	17	14	11	10
Insgesamt	27	34	29	24	18
Nach 30 Min. IV. Wägung					
Differenz	16	14	14	11	10
Insgesamt	43	18	43	35	28
Nach 30 Min. V. Wägung					
Differenz	16	17	17	16	15
Insgesamt	59	65	60	51	43
Nach 30 Min. VI. Wägung					
Differenz	15	17	13	9	10
Insgesamt	74	82	73	60	53
Nach 30 Min. VII. Wägung					
Differenz	12	15	13	13	11
Insgesamt	86	97	86	73	64
Nach 30 Min. VIII. Wägung					
Differenz	13	13	10	10	11
Insgesamt	99	110	96	88	75
Nach 15 Std. IX. Wägung					
Differenz	99	95	91	99	102
Insgesamt	198	205	187	182	177
Nach 7 Std. X. Wägung					
Differenz	16	12	20	21	25
Insgesamt	214	217	207	203	202
Nach 20 Std. XI. Wägung					
Differenz	17	18	30	33	35
Insgesamt	231	235	237	236	237

Abb. 6. Man sieht, daß von Anfang an die Maltose für sich bedeutend rascher vergoren wird als die Saccharose. Nach und nach wird dieser Vorsprung bei der Saccharose eingeholt, bis nach 3 Stunden die Gärungsgeschwindigkeit bei beiden Lösungen ungefähr denselben Wert erreicht. In dem Gemisch von gleichen Teilen Saccharose und Maltose übertrifft die Gärungsgeschwindigkeit schon von der

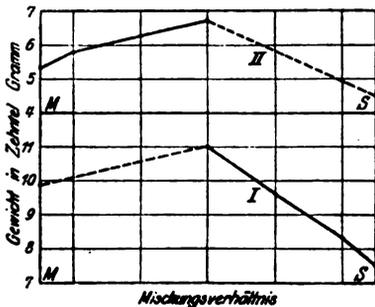


Abb. 6.

zweiten halben Stunde an diejenige der ungemischten Zucker. Dieses Verhältnis bleibt bis zur 4. Stunde annähernd erhalten. Bei dem Mischungsverhältnis $\frac{15 \text{ Teile Maltose}}{35 \text{ Teile Saccharose}}$ kommt der Gärungsablauf demjenigen nahe, wie er sich bei reiner Maltose darstellt. Über die sonstigen Verhältnisse gibt ein Blick auf das Diagramm I Aufschluß.

Versuch 6a: Mit der Wiederholung des Versuches 6 am darauffolgenden Tag wurde die Gärung der zwischen den Nummern 1 und 2 gelegenen Mischungsverhältnisse untersucht.

1. 25 ccm Maltose + 25 ccm Saccharose,
2. 35 „ „ + 15 „ „
3. 45 „ „ + 5 „ „
4. 50 „ „ allein,
5. 50 „ Saccharose allein.

Der vorhergehende Versuch wird vollkommen bestätigt (vgl. Diagramm II, Abb. 6). Die beiden Diagramme sind nahezu kongruent. Auffallend ist die Symmetrie, die das Dreieck zeigt, wenn man die Grundlinie zieht.

In der zu Versuch 6 verwendeten Hefe ist ein verhältnismäßig schwacher Profermentspiegel vorhanden, der bereits nach der ersten Stunde aufgebraucht ist; denn von da an macht sich im Gemisch der fördernde Einfluß der Saccharose geltend. Die zu Versuch 6a verwendete Hefe scheint dagegen frei gewesen zu sein von Anreicherungen von Prozymase; denn im Gemisch macht sich schon von Anfang an ein Vorsprung bemerkbar. Der weitere Ablauf ist bei beiden Versuchen derselbe.

Tabelle VIa.

Gewichtsverlust in Hundertstel Gramm.

Gärsubstrat	50 ccm Malt. —	45 ccm Malt. 5 ccm Sacch.	35 ccm Malt. 15 ccm Sacch.	25 ccm Malt. 25 ccm Sacch.	50 ccm Sacch. —
Laufende Nummer	1	2	3	4	5
Ansetzen des Versuchs	2 ^h 56'	2 ^h 54'	2 ^h 52'	2 ^h 50'	2 ^h 58'
Nach 45 Min. I. Wägung					
Differenz	8	9	11	11	8
Nach 45 Min. II. Wägung					
Differenz	25	28	25	26	20
Insgesamt	33	37	36	37	28
Nach 45 Min. III. Wägung					
Differenz	20	21	27	30	17
Insgesamt	53	58	63	67	45
Nach 45 Min. IV. Wägung					
Differenz	22	18	22	21	23
Insgesamt	75	76	85	88	68

Versuch 7: Frische, längere Zeit (5 Tage) gewaschene Hefe aus der Brauerei wurde breiig mit Wasser angerührt und davon je 20 ccm in folgenden (10 proz.) Lösungen suspendiert:

- | | |
|-----------------------------------|--------------------------|
| 1. 50 ccm Dextrose allein | } vgl. hierzu
Abb. 7a |
| 2. 35 „ „ + 15 ccm Maltose | |
| 3. 25 „ „ + 25 „ „ | |
| 4. 15 „ „ + 35 „ „ | |
| 5. 50 „ Maltose allein | } vgl. hierzu
Abb. 7b |
| 6. 15 „ Fructose + 35 ccm Maltose | |
| 7. 25 „ „ + 25 „ „ | |
| 8. 35 „ „ + 15 „ „ | |
| 9. 50 „ „ allein. | |

Im übrigen dieselbe Methode wie beim Versuch 5 (vgl. Tabelle VII),

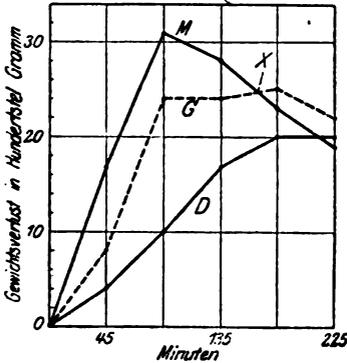


Abb. 7a.

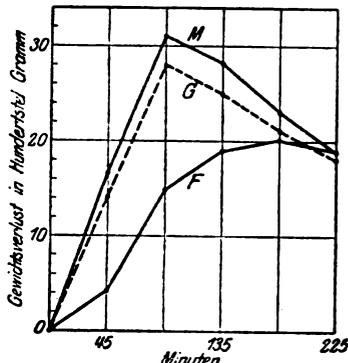


Abb. 7b.

Diese Hefe muß eine sehr beträchtliche Anreicherung von Prozymase in den Versuch mitgebracht haben. Dies geht daraus hervor, daß die Maltosekurve von der Gemischkurve erst nach ungefähr 3 Stunden überschritten wird (× auf Abb. 7a). Nach 19 Stunden ist in sämtlichen Kulturen annähernd derselbe Vergärungsgrad erreicht. Es ist also ein (vorübergehender) Ausgleich eingetreten. Den Stand der Vergärung nach $3\frac{1}{2}$ Stunden bringt Diagramm I zum Ausdruck, den Stand $15\frac{1}{4}$ Stunden nach diesem Zeitpunkt Diagramm II (Abb. 8). Die Diagramme I und II sind einander spiegelbildlich fast gleich.

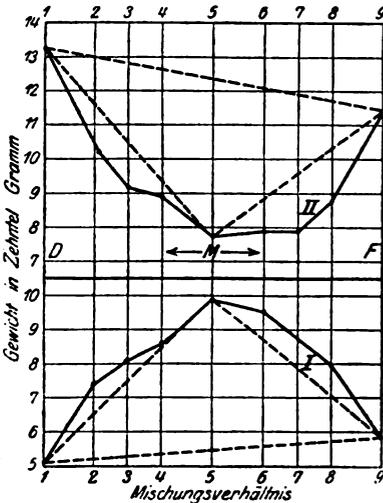


Abb. 8.

Tabelle VII.
Gewichtsverlust in Hundertstel Gramm.

Gärsubstrat	50 ccm Dextr.		25 ccm Dextr.		15 ccm Dextr.		15 ccm Fruct.		25 ccm Fruct.		35 ccm Fruct.		50 ccm Fruct.	
	—	1 ^h 30'	15 ccm Malt.	25 ccm Malt.	15 ccm Malt.	35 ccm Malt.	15 ccm Malt.	35 ccm Malt.	25 ccm Malt.	25 ccm Malt.	15 ccm Malt.	15 ccm Malt.	15 ccm Malt.	50 ccm Malt.
Laufende Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ansetzen des Versuchs	1 ^h 30'	1 ^h 32'	1 ^h 34'	1 ^h 36'	1 ^h 38'	1 ^h 40'	1 ^h 42'	1 ^h 44'	1 ^h 46'					
Nach 45 Min. I. Wägung	4	8	8	10	17	16	14	11	4					
Differenz														
Nach 45 Min. II. Wägung	10	21	24	27	31	31	28	26	15					
Differenz														
Insgesamt	14	29	32	37	48	47	42	37	19					
Nach 45 Min. III. Wägung	17	24	24	27	28	27	25	23	19					
Differenz														
Insgesamt	31	53	56	64	76	74	67	60	38					
Nach 45 Min. IV. Wägung	20	21	25	22	23	21	21	19	20					
Differenz														
Insgesamt	51	74	81	86	99	95	88	79	58					
Nach 45 Min. V. Wägung	20	16	22	21	19	17	18	16	19					
Differenz														
Insgesamt	71	90	103	107	118	112	106	95	77					
Nach 15 Std. VI. Wägung	188	102	91	89	77	79	79	88	114					
Differenz														
Insgesamt	204	192	194	196	195	191	185	188	191					
Nach 24 Std. VII. Wägung	30	32	28	22	25	26	37	39	33					
Differenz														
Insgesamt	234	224	222	218	220	217	222	222	224					

Eine vergleichende Untersuchung der Zucker Dextrose, Saccharose, Fructose unter sich ist in Angriff genommen.

Zusammenfassung und Schluß.

Man darf wohl den Nachweis für erbracht gelten lassen, daß bei der Bildung der „Zymase“ die Beteiligung von Reizvorgängen eine wesentliche Rolle spielt. Das ist der Fall einmal bei dem Vorgang der Hervorbringung der Zymasevorstufe (Prozeß 1), und zum anderen bei der Aktivierung dieser Vorstufe, ihrer Umwandlung in gärfertige Zymase (Prozeß 2). Beide Vorgänge werden unabhängig voneinander ausgelöst durch Reize, die ausgehen von im Substrat vorhandenen Stoffen. Hierfür geeignete Stoffe sind verschiedene Zuckerarten. Das Auftreten des „vorläufigen Maximums“ bei der Gärung, sowie die Erscheinung der gesteigerten Gärung in Zuckergemischen können mit dieser Vorstellung sehr gut in Einklang gebracht werden. Die Ausnahmestellung der Maltose den anderen verwendeten Zuckern gegenüber (Saccharose, Dextrose, Fructose) ist erstens begründet darin, daß sie den Prozeß 2 außerordentlich rasch, fast momentan, auslöst, während die anderen Zucker im Vergleich zur Maltose auf diesen Prozeß hemmend wirken, zweitens darin, daß die Maltose auf die Auslösung des Prozesses 1 im Vergleich zu den anderen Zuckern hemmend wirkt. Ich wählte zur Kennzeichnung dieses Verhältnisses den Ausdruck „antagonistische Zuckerwirkung“.

Es ist nun auch möglich, mit dem Begriff „physiologischer Zustand“ klarere Vorstellungen zu verbinden. Wir bekommen die Gesichtspunkte geliefert, nach denen wir die Hefe auf ihren physiologischen Zustand prüfen können. Dabei ist zu berücksichtigen: 1. Der allgemeine Ernährungszustand. 2. Eine etwaige Anreicherung der Zymasevorstufe. 3. Eine etwaige Anreicherung fertiger Zymase.

Weitere Konsequenzen haben die Ergebnisse offenbar für die Frage nach der Lokalisierung des Gärvorganges. Es ist ja bekannt, daß die Plasmamembran pflanzlicher und tierischer Zellen für Zucker außerordentlich schwach permeabel ist¹⁾. Wenn man nun sieht, daß die Aktivierung der Zymase so stürmisch erfolgt wie bei Maltose, so kann das kaum auf ein im Vergleich

1) Overton, Arch. f. d. ges. Physiol. 92, 115. 1902.

mit anderen Zuckern rascheres Eindringen der Maltose ins Zellinnere zurückgeführt werden. Es ist im Gegenteil naheliegend, anzunehmen, daß die Permeabilität hierbei überhaupt nicht in Frage kommt, sondern daß die vom Plasma hervorgebrachte Zymasevorstufe sich in den äußersten Regionen der lebenden Substanz anreichert, wo sie durch direkte Berührung mit dem Substrat (die Zellwand bildet dabei kein Hindernis) aktiviert wird. (Vgl. hierüber meine letzte Abhandlung, wo diese Frage noch von anderen Gesichtspunkten aus diskutiert wird.)¹⁾

¹⁾ Diese Zeitschr. **III**, 17. 1920.

Über Schwefelwasserstoffbildung aus Sulfaten durch Faeces.

Von
Rudolf Kochmann.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 2. Oktober 1920.)

Die Wirkungsweise der salinischen Abführmittel findet in der alten Wasserhaltungstheorie von Buchheim auch heute noch eine ausreichende Erklärung. Ein Anhang zu ihr wäre aber noch in der Art denkbar, daß aus Sulfaten im Dickdarm durch irgendwelche Einflüsse Schwefelwasserstoff entsteht. Dieses ist als Peristaltikerreger ja bekannt und a priori scheint es gar nicht ausgeschlossen, daß dem immer im Dickdarm sich bildenden SH_2 sogar die Rolle eines natürlichen Peristaltikhormons zukommen könnte. Die obstipierende Wirkung des medikamentösen Eisens spricht ja auch dafür.

Direkt unterstützt wird die Annahme durch die Beobachtungen Rösés¹⁾, der nach Trinken von Gipswasser (gesättigte Lösung) starke Durchfälle erzielte und ausdrücklich den SH_2 -Geruch der Flatus und Faeces konstatierte. Da in Rösés Versuchen das getrunkene Lösungswasser des Gipses in genügendem Umfang wieder im Harn erschien, kann für diesen Fall die Wasserhaltungstheorie nicht herangezogen werden.

Chemisch ist die Reduktion von Sulfat zu SH_2 wohl denkbar, bleibt doch für die Bildung des Hydrosulfidions in Mineralwässern keine andere Deutung als die Reduktion des Gipsulfats. Die moderne Großindustrie beschäftigt sich ja auch emsig damit, uns elementaren Schwefel aus Gips zu fabrizieren.

¹⁾ C. Röse, Einwirkung der Kalksalze auf Ausscheidung und Zusammensetzung des Harns. Veröff. d. Zentralstelle f. Balneol. 1, H. 9.

Ich habe deshalb auf Veranlassung von Prof. Straub zunächst einmal untersucht, ob und in welchem Umfange in vitro aus Faeces sich Schwefelwasserstoff bilden kann.

Versuchsordnung.

Es wurden jeweils 30 g frischen Kaninchenkotes bzw. 10 g Katzenkot in der Reibschale mit 250 ccm Wasser zum dünnen Brei verrieben, dem die zu prüfende Substanz beigemischt war. Dieser Brei wurde im spritzflaschenähnlichen Rundkolben in ein Wasserbad von konstanter Körpertemperatur eingesenkt. Durch das Reaktionsgemisch perlte dauernd Wasserstoff oder Kohlensäure, die die sich bildenden Gase in eine doppelte Vorlage von mit Essigsäure angesäuerter Bleiacetatlösung herübertrieb. Das erhaltene Schwefelblei wurde in bekannter Weise in Sulfat überführt und als solches gewogen. Die Versuche blieben jeweils mehrere Tage in Gang.

Ergebnisse.

A. Kaninchenkot.

1. Blinder Versuch. Kaninchenkot mit reinem Wasser liefert in 24 Stunden nur eine schwache bräunliche Trübung der Vorlage, die kolloid bleibt und nicht zur Wägung gebracht werden kann. Die Schwefelwasserstoffbildung aus Faeces allein kann also als Quantität vernachlässigt werden.

2. 30 g Kaninchenkot, 300 ccm 1 proz. Lösung von Natriumsulfat ($\text{Na}_2\text{SO}_4 + 10 \text{ aq}$). Nach mehrstündiger Inkubation beginnt eine zunehmende Ausscheidung von Bleisulfid. Es wurden gefunden

	mg SH_2	mg $\text{Na}_2\text{SO}_4 + 10 \text{ aq}$	% des gegebenen Sulfats
innerhalb 24 Std.	3,83	= 36,2	= 1,25
48 „	45,86	433,3	15,26
54 „	70,36	664,8	23,43
72 „	92,84	877,2	30,92

Die Reaktion war nach 72 Stunden keineswegs beendet, sohien viel mehr mit linearer Geschwindigkeit weiterzuverlaufen.

3. 30 g Kaninchenkot mit 250 ccm Wasser und 3,0 g Gips. Der Gips wurde aus den auf $\text{CaSO}_4 + 2 \text{ aq}$ berechneten Mengen Chlorcalcium durch Natriumsulfat gefällt und nach Waschen des Niederschlags ungetrocknet dem Reaktionsgemisch zugegeben.

Es wurden gefunden

	mg SH_2	mg $\text{CaSO}_4 + 2 \text{ aq}$	% des gegebenen Sulfats
innerhalb 20 Std.	1,348	= 6,81	0,22
25 „	6,18	31,2	1,03
54 „	9,29	47,46	1,56
66 „	11,91	60,18	1,97

Also auch Gips wird von Kaninchenkot reduziert. Die viel geringere Reaktionsgeschwindigkeit ist wohl auf die geringe Konzentration der Gipslösung zurückzuführen. Dementsprechend gab auch der analoge Versuch mit frisch gefälltem Bariumsulfat keinerlei Ausfällung von Schwefelblei innerhalb von 48 Stunden. Es kam nur jene kolloide bräunliche Ausscheidung des blinden Versuchs; mit anderen Worten die Sulfatreduktion ist nur in wässriger Lösung des Sulfats möglich.

4. 30 g Kaninchenkot mit 250 ccm Wasser und 1,0 g Sulfur sublimatum:

	mg SH ₂	mg Schwefel	% der gegebenen Menge
innerhalb 7 Std.	3,15	2,96	0,30
24 „	12,93	13,31	1,33

Es findet also auch aus elementarem Schwefel eine Bildung von Schwefelwasserstoff statt, allerdings in sehr geringem Umfang. Da Schwefel ebensowenig wasserlöslich ist wie Bariumsulfat, aber eine immerhin gegenüber Bariumsulfat beträchtliche SH₂-Bildung veranlaßt, muß die Reaktion Schwefel-Faeces unter ganz anderen Umständen erfolgen wie die Sulfatreduktion. Die von Heffter¹⁾ gegebene Erklärung der SH₂-Bildung durch einen Eiweißkörper der Darmschleimhaut dürfte hier kaum in Frage kommen, es bleibt also wenig mehr übrig als die Schwefelwasserstoffbildung aus elementarem Schwefel in meinem Falle mit Bakterientätigkeit zu erklären. Darüber sollen weitere Untersuchungen von anderer Seite angestellt werden.

5. 30 g Kaninchenkot mit 230 ccm Wasser und 1% Natriumthiosulfat. Dieses wurde herangezogen, weil es bei seinem gemischten Sulfit-Sulfidcharakter hohe Wasserlöslichkeit zeigt.

	mg SH ₂	mg Schwefel	% der angew. Menge
innerhalb 24 Std.	12,81	93,3	4,06
30 „	20,62	150,2	6,42

Die Reduzierbarkeit des Thiosulfats steht also beträchtlich hinter dem leichtlöslichen Sulfat zurück.

B. Versuche mit Katzenkot.

Sie wurden analog den bisher beschriebenen Versuchen angestellt. Es wurden gebildet aus

1. 1proz. Natriumsulfatlösung in 48 Stunden 0,69 mg SH₂ = 6,38 mg Na₂SO₄ + 10 aq oder 0,21% der gegebenen Menge.

2. 1,0 g Sulfur sublimatum in 7 Stunden 0,78 mg SH₂ = 0,74 mg Schwefel oder 0,074% der gegebenen Menge.

3. 1proz. Thiosulfatlösung, nach 24 Stunden keinerlei Entwicklung von SH₂.

4. Blinder Versuch = spurweise Bildung von SH₂.

¹⁾ A. Heffter, Beiträge zur Pharmakologie des Schwefels. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 51, 175. 1904.

Das Reduktionsvermögen des Katzenkotes ist also gegenüber dem des Kaninchenkotes ein verschwindend geringes. Bemerkenswert ist, daß Thiosulfat gar nicht reduziert wird.

Ob angesichts des Ausfalls der Katzenkotversuche der Sulfatreduktion in praxi eine Beteiligung an der Abführwirkung der Sulfate zukommt, erscheint zweifelhaft. Zur Klärung bedarf es weiterer Versuche, die im Gange sind.

Zusammenfassung.

Kaninchenkot ist imstande, in vitro bei Körpertemperatur in Wasser gelöstes Sulfat ausgiebig zu Schwefelwasserstoff zu reduzieren. Thiosulfat und elementarer Schwefel sind hingegen unter gleichen Umständen eine nur sehr wenig ergiebige Schwefelwasserstoffquelle. Die gleiche Fähigkeit ist beim Katzenkot (Fleischfresser) nur in sehr abgeschwächtem Umfange vorhanden.

Neue Untersuchungen über die Aufnahme von Stoffen in die Zelle.

Von
A. Tröndle.

(Eingegangen am 9. Oktober 1920.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Inhaltsverzeichnis.

Einleitung. S. 259.

Kap. I. Der Einfluß von Narkoticis auf die Salzaufnahme. S. 260.

Kap. II. Der Einfluß von Säuren auf die Salzaufnahme. S. 266.

Kap. III. Die Permeabilität des Plasmas für einige Alkaloide. S. 272.

1. Die Aufnahme von freien Alkaloidbasen. S. 272.

2. Die Aufnahme der Alkaloidsalze. S. 276.

3. Vergleich zwischen freien Alkaloiden und Alkaloidsalzen. S. 277.

Zusammenfassung. S. 283.

Literatur. S. 285.

Die Protokolle zu den folgenden Untersuchungen fanden sich im Nachlasse des verstorbenen Privatdoz. Dr. A. Tröndle. Auf Grund eines kurz skizzierten Gedankenganges habe ich es übernommen, den Text niederzuschreiben. Die Versuche waren zum Abschluß gelangt und sollten gerade veröffentlicht werden.

Peter Stark.

Einleitung.

Bereits veröffentlichte Untersuchungen⁷⁾ ergaben, daß bei der Aufnahme von Salzen in die Zelle die Geschwindigkeit des Eintritts unabhängig vom Konzentrationsgefälle ist. Die experimentellen Tatsachen wurden zu folgender Hypothese verarbeitet: Die Salze reizen das Protoplasma. Die Reaktion besteht darin, daß das Protoplasma die Salze zufolge aktiver Tätigkeit in die Vakuole hineinschafft. Wenn eine bestimmte Menge Salz aufgenommen ist, so macht sich eine Ermüdung geltend, die dem Weberschen Gesetz folgt.

Die neuen Versuche*) bezweckten eine weitere experimentelle Prüfung dieser Hypothese. Wenn tatsächlich die Salzaufnahme auf eine aktive Beteiligung des Plasmas zurückzuführen ist, so war zu erwarten, daß die Narkose ein Eindringen dieser Stoffe verhindert. Es war also die Wirkung von Narkoticis auf die Salzaufnahme näher zu analysieren. Weiterhin war es von Interesse, festzustellen, in welcher Weise die Vorbehandlung der Zellen mit verdünnten Säuren auf die Aufnahmegeschwindigkeit wirkt; durch eine solche Behandlung tritt eine mehr oder minder weitgehende Schädigung der Protoplasten ein, und es war infolgedessen die Vermutung berechtigt, daß nunmehr die Salzaufnahme nicht mehr mit konstanter Geschwindigkeit, sondern proportional der Außenkonzentration erfolgt, wie es das Ficksche Diffusionsgesetz rein physikalisch vorschreibt. Schließlich bot unsere Deutung eine Möglichkeit, den schon von Overton aufgedeckten Unterschied bei der Aufnahme von freien Alkaloidbasen und Alkaloidsalzen in die lebende Zelle zu erklären. Alle diese Erwartungen haben sich im Verlaufe der Untersuchungen durchaus bestätigt und somit hat die aufgestellte Hypothese von verschiedener Seite aus neue Stützen erhalten.

Kapitel I.

Der Einfluß von Narkoticis auf die Salzaufnahme.

Um den Einfluß des Narkotisierens auf die Salzaufnahme festzustellen, wurden Gewebeschnitte zuerst eine bestimmte Zeit in das Narkoticum gelegt und dann in abgestufte Salzlösungen gebracht. Nach 3 Minuten wurde die plasmolytische Grenzkonzentration ermittelt und zwei weitere Ablesungen folgten nach 16' und 29' nach. Gleichzeitig angesetzte Parallelserien wurden in derselben Weise behandelt, nur mit dem Unterschied, daß die Schnitte statt in das Narkoticum zunächst eine entsprechende Zeit in Wasser und dann in die Salzlösungen verbracht wurden. Die plasmolytischen Grenzkonzentrationen wurden nach denselben 3 Zeitintervallen bestimmt. In den Kontrollversuchen ergab sich entsprechend früheren Erfahrungen eine starke Verschiebung des plasmolytischen Grenzwerts mit der Dauer des Aufenthalts in

*) Eine vorläufige Mitteilung über einen Teil der Ergebnisse wurde in den Verhandl. d. schweiz. Naturf. Ges. (8) gegeben.

der Lösung. Es fand ein ständiges Ansteigen der Beträge statt, das uns ein sicheres Maß für die inzwischen erfolgte Salzaufnahme liefert. In den Narkoseexperimenten dagegen macht sich eine deutliche Hemmung der Stoffaufnahme bemerkbar, die von einer bestimmten Konzentration und Einwirkungsdauer des Narkotics an zu einem vollständigen Stillstand führen kann, sich also in einem nur geringen Ansteigen oder Gleichbleiben der plasmolytischen Grenzkonzentration äußert.

Das wurde zunächst an Schnitten durch das Palisadengewebe von *Buxus sempervirens* festgestellt. Die Schnitte für Kontroll- und Hauptserien wurden stets symmetrischen Stellen der beiden Blattlaminahälften entnommen. Zur Bestimmung der plasmolytischen Grenzkonzentration dienten NaCl-Lösungen, die von 0,025 zu 0,025 Mol abgestuft waren. In den ersten Versuchen wurde als Plasmolyticum Chloralhydrat verwendet, und zwar in einer Konzentration von $\frac{1}{2}\%$. Die Resultate sind in Tabelle I zusammen-

Tabelle I.

Buxus sempervirens. Aufnahme von NaCl.

Hauptversuch: 20' in $\frac{1}{2}$ proz. Chloralhydrat			Kontrollversuch: 20' in Wasser		
plasmolytische Grenzkonzentration nach			plasmolyt. Grenzkonzentr. nach		
3'	16'	29'	3'	16'	29'
0,737	0,737	0,787 Mol	0,737	0,787	0,837 Mol
0,737	0,787	0,862 „	0,737	0,787	0,862 „
0,762	0,812	0,862 „	0,762	0,812	0,862 „
Mittel: 0,745	0,778	0,837 Mol	0,745	0,795	0,853 Mol
Aufnahme:	0,033	0,059 „	0,050	0,058	„

Tabelle II.

Buxus sempervirens. Aufnahme von NaCl. 14—16° C.

Hauptversuch: 20' in 1proz. Chloralhydrat			Kontrollversuch: 20' in Wasser		
plasmolytische Grenzkonzentration nach			plasmolyt. Grenzkonzentr. nach		
3'	16'	29'	3'	16'	29'
0,987	0,987	0,987 Mol	0,987	1,012	1,037 Mol
0,962	0,962	0,962 „	0,962	1,000	1,037 „
0,962	0,962	0,962 „	0,962	1,012	1,062 „
0,962	0,962	0,962 „	0,962	1,012	1,062 „
0,962	0,962	0,962 „	0,962	1,000	1,037 „
0,962	0,962	0,962 „	0,962	0,987	1,012 „
0,962	0,962	0,962 „	0,962	1,037	1,087 „
Mittel: 0,965	0,965	0,965 Mol	0,965	1,008	1,047 Mol
Aufnahme:	0,00	0,00 „	0,043	0,039	„

gestellt; die Temperatur betrug in diesen Experimenten 13–14°. Es zeigt sich, daß in den beiden Reihen von der 3. bis zur 16. Minute die Aufnahme verschieden groß ist, ohne Narkose beträgt sie 0,033 Mol, mit Narkose bloß 0,050 Mol; dagegen sind für die Zeit von der 16. bis zur 29. Minute die beiden Werte identisch (0,059 bzw. 0,058 Mol). Danach scheint es, daß durch den 20 Minuten währenden Aufenthalt im Chloralhydrat die Salzaufnahme vorübergehend gehemmt wird, daß aber schon nach einer Viertelstunde der Einfluß der Narkose zurückgeht. Um hierüber Sicherheit zu erlangen, ging ich zu einer höheren Konzentration von Chloralhydrat über. Die Versuche erfolgten in derselben Weise, nur daß an Stelle des $\frac{1}{2}$ proz. 1 proz. Chloralhydrat trat (Tabelle II).

Wie man sieht, ist nunmehr ein sehr deutlicher Unterschied zwischen Haupt- und Kontrollserie vorhanden. In der Hauptserie steht die Aufnahme vollständig still, die plasmolytischen Grenzkonzentrationen sind nach den drei Intervallen absolut gleich, in der Kontrollserie dagegen findet in der ersten Viertelstunde eine Aufnahme von 0,043, in der zweiten von 0,039 Mol statt. Wir können also konstatieren, daß durch die Narkose eine durchgreifende Hemmung der Aufnahme von NaCl hervorgerufen wird.

Es war zu erwarten, daß die Hemmung der Stoffaufnahme nicht bloß von der Konzentration, sondern auch von der Einwirkungs-dauer des Narkoticums abhängt. Diese Vermutung hat sich tatsächlich bestätigt. Setzt man den Aufenthalt in 1 proz. Chlorhydrat von 20 auf 15 Minuten herab, dann ist das Bild noch völlig unverändert; es dringt kein Salz ein; dagegen macht sich bei bloß 10 Minuten währendem Aufenthalt schon ein erhebliches Ansteigen der plasmolytischen Grenzkonzentrationen bemerkbar, das indes keineswegs mit dem Anwachsen der Grenzwerte im Kontroll-experiment Schritt hält. Vielmehr verhielten sich in einem dahingehenden Versuch die Aufnahmewerte wie ca. 1 : 3.

Den Versuchen mit Chloralhydrat schließen sich diejenigen mit Äther im Erfolg vollständig an. Die Lösung, die zur Narkotisierung verwendet wurde, enthielt 3 Vol-% Äther. Im Hauptexperiment lagen die Schnitte 20' in Äther, im Kontrollexperiment dieselbe Zeit in Wasser; dann wurden sie wie bisher in abgestufte Lösungen von Kochsalz gebracht (Tabelle III). Ein Vergleich zwischen Haupt- und Kontrollversuch ergibt, genau wie bei Tabelle II, daß nach der Vorbehandlung mit dem Narkoticum die plasmolytischen Grenzkonzentrationen gleichbleiben, während nach einem vorangehenden

Aufenthalt im Wasser eine konstante Aufnahme von Salz stattfindet, die in der ersten Viertelstunde 0,043 Mol. in der zweiten 0,044 Mol beträgt.

Tabelle III.

Buxus sempervirens. Aufnahme von NaCl. Temp 12—17°.

Hauptversuch: 20' in 3 Vol.-% Äther			Kontrollversuch: 20' in Wasser		
plasmolytische Grenzkonzentration nach			plasmolyt. Grenzkonzentr. nach		
3'	16'	29'	3'	16'	29'
0,937	0,937	0,937 Mol	0,937	0,987	1,037 Mol
0,937	0,937	0,937 "	0,937	0,987	1,037 "
0,937	0,937	0,987 "	0,937	0,987	1,037 "
0,887	0,887	0,887 "	0,875	0,912	0,950 "
0,887	0,887	0,887 "	0,887	0,912	0,937 "
0,912	0,912	0,912 "	0,887	0,937	0,987 "
Mittel: 0,916	0,916	0,916 Mol	0,910	0,953	0,997 Mol
Aufnahme:	0,00	0,00	0,043	0,044	"

Die Versuche wurden dann weiterhin auf *Acer platanoides* ausgedehnt. Schnitte von Blättern wurden zum Teil in 1 proz. Chloralhydrat, zum Teil in Wasser gebracht und in beiden Flüssigkeiten je 15' liegengelassen. Dann erfolgte die Übertragung in

Tabelle IV.

Acer platanoides. Aufnahme von KCl. Temp. 20—22°.

Hauptversuch: 15' in 1 proz. Chloralhydrat			Kontrollversuch: 15' in Wasser		
plasmolytische Grenzkonzentration nach			plasmolyt. Grenzkonzentr. nach		
3'	16'	29'	3'	16'	29'
0,737	0,737	0,737 Mol	0,762	0,862	0,887 Mol
0,687	0,687	0,687 "	0,787	0,862	0,912 "
0,662	0,662	0,662 "	0,712	0,812	0,862 "
0,662	0,662	0,662 "	0,737	0,837	0,937 "
0,637	0,637	0,637 "	0,637	0,700	0,712 "
Mittel: 0,677	0,677	0,677 Mol	0,727	0,814	0,862 Mol
Aufnahme:	0,00	0,00	0,087	0,048	"

abgestufte Lösungen von KCl und Bestimmung der plasmolytischen Grenzkonzentration nach den üblichen Intervallen (Tabelle IV). Es zeigte sich auch hier, daß durch die Einwirkung von Chloralhydrat die Salzaufnahme völlig unterbunden

wird, daß dagegen im Kontrollexperiment eine fortschreitende Zunahme der plasmolytischen Grenzkonzentrationen statthat, die allerdings nach der zweiten Viertelstunde hinter dem in der ersten Viertelstunde erreichten Betrag wesentlich zurücksteht. Doch sind das spezielle Verhältnisse, die unsere Hauptfrage, nicht berühren.

Nach all dem, was man bisher über die Narkose weiß, war zu vermuten, daß die Wirkung der Narkose nach einiger Zeit abklingt. Auch für diese Tatsache sollten noch empirische Daten gewonnen werden. Zu dem Zwecke wurden Schnitte von *Acer platanoides* in einer ersten Versuchsreihe wie in Tabelle IV behandelt, d. h. sofort nach der Einwirkung des Narkoticums in die abgestuften Salzlösungen verbracht, in einer zweiten Versuchsreihe aber wurde zwischen dem Aufenthalt im Chloralhydrat und dem Übertragen in KCl-Lösungen ein 5—6stündiges Verweilen in Wasser eingeschaltet (Tabelle V). Das hatte zur Folge, daß nunmehr die Salzaufnahme im Vergleich zu dem Kontrollversuch in Tabelle IV fast wieder normal erscheint.

Tabelle V.

Acer platanoides. Aufnahme von KCl. Temp. 20—22°.

Hauptversuch: 15' in 1 proz. Chloralhydrat sofort in die KCl-Lösungen			Kontrollversuch: 15' in 1 proz. Chloralhydrat zunächst 5—6 ^h in Wasser			
plasmolytische Grenzkonzentration nach			plasmolyt. Grenzkonzentr. nach			
3'	16'	29'	3'	16'	29'	
0,712	0,712	0,712 Mol	0,712	0,787	0,812 Mol	
0,662	0,662	0,662 „	0,637	0,712	0,762 „	
0,662	0,662	0,662 „	0,687	0,737	0,750 „	
0,612	0,612	0,612 „	0,637	0,737	0,787 „	
0,637	0,637	0,637 „	0,687	0,712	0,762 „	
Mittel: 0,657	0,657	0,657 Mol	0,672	0,737	0,774 Mol	
Aufnahme:	0,00	0,00	„	0,065	0,037	„

Aus der soeben gewonnenen Tatsache ist zugleich zu ersehen, daß durch die Einwirkung des Narkoticums keine eingreifende Schädigung der lebenden Zellen erfolgt ist; sonst könnte keine Rückkehr zu normalen Verhältnissen eintreten. Nach derselben Richtung weisen übrigens auch Versuche über Deplasmolyse und Plasmolyse, die mit Schnitten des Hauptversuchs Tabelle II angestellt wurden. Als plasmolytische Grenzkonzentration bei

einem Aufenthalt von 20 Minuten in 1 proz. Chloralhydrat hatte sich dort nach 29 Minuten Aufenthalt in NaCl 0,965 Mol ergeben. Nun wurden Schnitte aus höherer Konzentration (1,00—1,05 Mol), Schnitte also, die plasmolysiert waren, in niedere Konzentrationen von NaCl (0,9—0,95 Mol) gebracht. Es trat dann ein sehr rascher Rückgang der Plasmolyse ein; wurden die Schnitte nun wieder in die ursprüngliche Lösung übertragen, dann setzte die Plasmolyse von neuem ein. Dies besagt, daß der Protoplast noch durchaus normal auf die Einwirkung von hypotonischen und hypertonischen Lösungen mit Expansion bzw. Kontraktion des Plasmaschlauches zu reagieren vermag, also offenbar nicht geschädigt ist.

Unsere bisherigen Versuche erstreckten sich alle auf Blätter. Dafür, daß sich auch Wurzeln gleich verhalten, liegen einige orientierende Daten vor. So wurden Schnitte von Wurzeln von *Lupinus albus* 20' in 1 proz. Chloralhydrat gelegt und dann in abgestufte Lösungen von NaNO₃ gebracht. In der Vergleichsreihe unterblieb diese Vorbehandlung, die Schnitte kamen sofort in die Lösungen. Dann wurde in beiden Fällen die plasmolytische Grenzkonzentration nach 2', 5' und 8' bestimmt (Tabelle VI).

Tabelle VI.

Lupinus albus. Aufnahme von NaNO₃.

Hauptversuch: 20' in 1 proz. Chloralhydrat			Kontrollversuch: sof. in abgestufte NaNO ₃ -Lösngn.		
plasmolytische Grenzkonzentration nach			plasmolyt. Grenzkonzentr. nach		
2'	5'	8'	2'	5'	8'
0,25	0,25	0,25 Mol	0,35	0,65	0,95 Mol
0,25	0,25	0,25 "	0,32	0,85	1,45 "
0,25	0,25	0,25 "	0,37	0,95	1,50 "
0,25	0,25	0,25 "	0,37	0,75	1,25 "
0,25	0,25	0,25 "	0,37	0,75	1,00 "
0,25	0,25	0,25 "	0,27	0,45	0,75 "
Mittel: 0,25	0,25	0,25 Mol	0,34	0,73	1,15 Mol
Aufnahme:	0,00	0,00 "	0,39	0,42	"

Der Unterschied zwischen Haupt- und Kontrollversuch ist deutlich zu ersehen: dort absolutes Gleichbleiben der Grenzkonzentrationen, hier deutlicher Anstieg von 0,34 über 0,73 bis 1,15 Mol, also insgesamt Aufnahme von 0,81 Mol. Allerdings ist hierbei zu bemerken, daß der völligen Analogie halber die Schnitte

beim Kontrollversuch zuvor hätten 20' in Wasser liegen müssen. Auch ein solcher Versuch wurde angestellt, und er ergab ebenfalls Hemmung der Salzaufnahme. Wie an anderer Stelle ausgeführt werden soll⁹⁾, beruht in diesem Falle die Hemmung auf Wundreiz, der in derselben Weise wie die Narkotica die Stoffaufnahme unterbindet und der erst eine bestimmte Zeit nach dem traumatischen Eingriff zum Ausdruck gelangt. Man könnte also die Beweiskraft des Hauptversuchs in Abrede stellen und das Gleichbleiben der plasmolytischen Grenzkonzentrationen auf die Wundwirkung zurückführen. Dem ist aber entgegenzuhalten, daß der Wundreiz mit größter Wahrscheinlichkeit durch die Narkose ebenso unterdrückt wird wie andere Reize, wie Versuche von Günther¹⁾ und Stark⁵⁾ ergeben haben. Wir haben es also im Hauptversuch offenbar mit einer reinen Narkoticumwirkung zu tun. Ganz ähnliche Ergebnisse erhielt ich auch mit *Allium Cepa*, doch sind die Wurzeln eben wegen der gleichzeitig wirkenden Wundreizung für unsere Fragestellung nicht so geeignet wie Blätter.

Zusammenfassend können wir feststellen, daß durch die Narkose die Salzaufnahme fortschreitend bis zu völliger Sistierung gehemmt wird. Diese Tatsache dient uns als neues Indicium dafür, daß sich die Salzaufnahme nicht rein nach Diffusionsgesetzen abspielt, sondern daß die lebendige Mitarbeit der Zellen für den Erfolg maßgebend ist. Wenn durch die Einwirkung der Narkotica die aktive Beteiligung des lebenden Plasmas ausgeschaltet ist, dann findet in unseren Versuchen keine Stoffaufnahme mehr statt.

Kapitel II.

Der Einfluß von Säuren auf die Salzaufnahme.

Es ist bekannt [de Vries¹⁰⁾, Pfeffer³⁾], daß durch Behandlung mit sehr verdünnten Säuren die Permeabilität der Plasmahaut stark erhöht werden kann. Die Plasmahaut gelangt dabei in einen Zustand, in dem sie nicht mehr völlig lebensstüchtig ist, und es werden die normalen Lebensfunktionen aufgehoben. Es ergab sich für uns die Frage, in welcher Weise dieser Zustand auf die Art und Weise der Salzaufnahme einwirkt. Es war zu erwarten, daß durch die schädigende Einwirkung der Säuren

die lebendige Beteiligung der Zellen an der Salzaufnahme ausgeschaltet wird, und daß infolgedessen das Eindringen der Stoffe rein physikalisch erfolgt. Ist dies wirklich der Fall, dann muß nunmehr die Aufnahmegeschwindigkeit dem Fickschen Diffusionsgesetz folgen, d. h. die Zeit, in der die gleiche Menge diffundiert, muß der Konzentrationsdifferenz oder — da die Konzentration des betreffenden Stoffes in der Zelle selbst in unserem Falle als verschwindend klein angenommen werden kann — der Außenkonzentration umgekehrt proportional sein. Unsere Versuche haben tatsächlich zu einer Bestätigung dieser Annahme geführt.

Untersucht wurde die Wirkung von Oxalsäure und Salzsäure. Die Ergebnisse mit Oxalsäure wird in Tabelle VII niedergelegt. Schnitte von Blättern von *Buxus sempervirens* wurden 5 Minuten in 0,01 normale Oxalsäure gelegt und dann in abgestufte Lösungen von NaCl gebracht (linke Seite der Tabelle). Dann wurden die plasmolytischen Grenzkonzentrationen nach 5, 20, 30 und 40 Minuten Aufenthalt in den NaCl-Lösungen bestimmt. Es wurden 40 Einzelversuche angestellt, die hier nur summarisch

Tabelle VII.

Buxus sempervirens. Aufnahme von NaCl. Temp. 13—20°.

Grenzkonzentration in Mol	a) 5' in 0,01 norm. Oxalsäure				b) 5' in Leitungswasser			
	Aufenthalt in den NaCl-Lösungen				Aufenthalt in den NaCl-Lösungen			
	5'	20'	30'	40'	5'	20'	30'	40'
0,787	1				1			
0,812	1	1			1			
0,837	5	1			3	4	2	
0,862	3	6	2		4		2	2
0,887	5	1	3		4	5	3	1
0,912	9	4	3	4	7	4	3	6
0,937	3	6	3	1	7	4	3	1
0,962	9	7	5	3	5	7	4	2
0,987	2	8	4	4	4	5	8	5
1,012	2	3	6	3	4	6	6	9
1,037		2	6	4		3	4	6
1,062		1	4	4		1	4	3
1,087			4	7			1	3
1,112				4				1
1,137				6				1
Mittel:	0,9117	0,9442	0,9892	1,0468	0,9220	0,9517	0,9723	0,9970
Aufgenommen:	0,0325 0,0450 0,0576				0,0297 0,0206 0,0247			
dass. pro Min.	0,00216 0,00450 0,00576				0,00198 0,00206 0,00247			

wiedergegeben werden, und zwar bedeuten die Ziffern in den vertikalen Spalten die Zahl der Fälle, die bei dem aus dem Kopf der Spalte zu ersehenden Aufenthalt in den Lösungen für jede Klasse der plasmolytischen Grenzkonzentrationen gefunden worden sind. Aus diesen Einzeldaten ist der darunter befindliche Mittelwert in Mol berechnet. Neben dieser Hauptserie wurde eine Kontrollserie durchgeführt, bei der an Stelle des zuvorigen Aufenthalts in Oxalsäurelösung ein ebenso langes Verweilen in Leitungswasser trat (rechte Seite der Tabelle). Auch hier fußt die Übersicht auf 40 Einzelversuchen. Auf Grund der gefundenen mittleren Grenzkonzentrationen ist in beiden Serien die Stoffaufnahme pro Minute für jedes der drei Zeitintervalle berechnet (unterste horizontale Reihe). Es ergibt sich, daß im Kontrollversuch die Salzaufnahme mit annähernd konstanter Geschwindigkeit erfolgt; es findet nur ein leichtes Ansteigen von 0,00198 Mol pro Minute auf 0,00247 Mol pro Minute statt. Dagegen zeigte sich bei den mit Oxalsäure vorbehandelten Schnitten ein viel rascheres Ansteigen der plasmolytischen Grenzkonzentrationen und damit auch eine raschere Aufnahme. So ist die Aufnahmegeschwindigkeit, die im ersten Intervall von 5—10' 0,00216 Mol pro Minute beträgt, im dritten Intervall auf 0,00576 Mol pro Minute, also ca. den $2\frac{1}{2}$ fachen Betrag angewachsen.

Da sich nun infolge des Anstieges der plasmolytischen Grenzkonzentration mit der Dauer des Aufenthalts in der Salzlösung die für die Aufnahmegeschwindigkeit berechneten Werte in ansteigender Linie auf immer höhere Ausgangskonzentrationen gründen, so kann man unsere Ergebnisse auch derart formulieren, daß bei vorhergehendem Aufenthalt der Schnitte in Oxalsäure die Aufnahmegeschwindigkeit der Außenkonzentration proportional geht, während ohne solche Vorbehandlung eine mit nahezu konstanter Geschwindigkeit erfolgendes Eindringen des Salzes stattfindet. Das ist aber genau das Resultat, das auf Grund unserer Überlegung erwartet wurde.

Um eine anschauliche Vorstellung von den gefundenen Verhältnissen zu geben, sind die empirischen Werte in Abb. 1 graphisch dargestellt. Auf der Abszisse ist die Zeit, auf der Ordinate sind die plasmolytischen Grenzkonzentrationen von 0,03 zu 0,03 Mol ansteigend von 0,9 Mol NaCl wiedergegeben. Das Ansteigen der Kurven ist ein Maß für die Aufnahmegeschwindigkeit. Kurve A

entspricht dem Verhalten der Schnitte, die mit Oxalsäure vorbehandelt sind, Kurve *B* dem Verhalten der Schnitte, die entsprechende Zeit in Wasser verweilt haben. Während Kurve *B* gleichmäßig ansteigt, also konstante Aufnahmegeschwindigkeit anzeigt, wird die Kurve *A* immer steiler, je mehr sie in dem Bereich höherer plasmolytischer Grenzkonzentrationen gelangt, d. h., die Salzaufnahme erfährt mit zunehmender Außenkonzentration eine Beschleunigung.

Die mit Oxalsäure gewonnenen Erfahrungen wurden durch entsprechende Experimente mit Salzsäure in schönster Weise

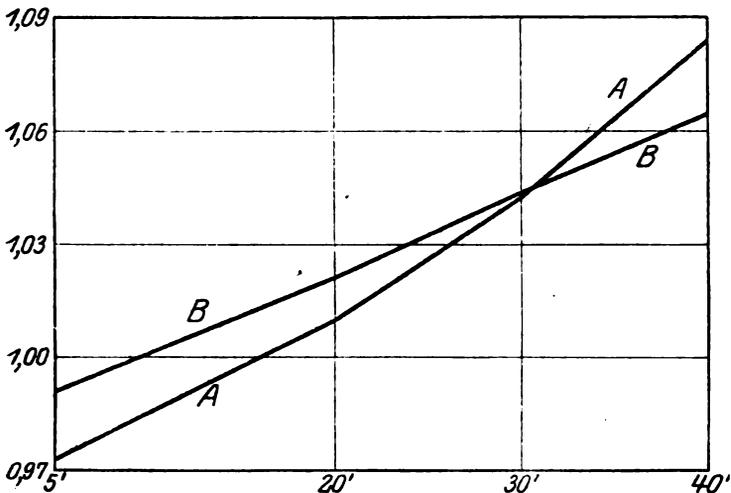


Abb. 1. Aufnahme von NaCl durch die Palisadenzellen von *Buxus sempervirens*. Abszissen: Dauer des Aufenthaltes in den Lösungen, Ordinaten: plasmolytische Grenzkonzentration in Mol. Kurve *A* mit, Kurve *B* ohne Vorbehandlung mit Oxalsäure.

bestätigt. Wiederum dienten als Versuchsobjekt die Blätter von *Buxus sempervirens*, und die Bestimmung der plasmolytischen Grenzkonzentrationen wurde wie bisher an den Palisadenzellen vorgenommen. In der Hauptreihe wurden die Schnitte zuvor 5' in 0,005 normaler Salzsäure verbracht, in der Kontrollreihe verweilten sie dieselbe Zeit in Leitungswasser. Beide Reihen stützen sich auf je 20 Einzelversuche, die hier aber nicht wie in Tabelle VII statistisch zusammengefaßt sind, sondern in extenso mit allen Einzeldaten wiedergegeben werden. Die linke Seite der Tabelle VIII gibt das Verhalten der Hauptreihe, die rechte das der Parallelreihe wieder. In beiden Fällen wurden die Schnitte nach der Vorbehandlung mit Salzsäure bzw. Wasser in abgestufte

Salzlösungen gebracht (NaCl) und sodann in üblicher Weise nach einem Aufenthalt von 5, 20, 30 und 40 Minuten die plasmolytische Grenzkonzentration bestimmt. Auf Grund der berechneten Mittelwerte wurde daraus zunächst die Gesamtaufnahme in den einzelnen Intervallen und sodann die Aufnahmegeschwindigkeit

Tabelle VIII.

Buxus sempervirens. Aufnahme von NaCl. Temp. 14—18°.

Hauptversuch: 5' in 0,005 norm. Salzsäure				Kontrollversuch: 5' in Leitungswasser			
plasmolytische Grenzkonzentration nach				plasmolyt. Grenzkonzentr. nach			
5'	20'	30'	40'	5'	20'	30'	40'
0,962	0,987	1,012	1,062 Mol	1,012	1,037	1,062	1,062 Mol
0,962	0,987	1,012	1,037 "	1,012	1,012	1,012	1,037 "
0,937	0,987	1,037	1,112 "	0,987	1,037	1,037	1,062 "
0,987	1,012	1,037	1,137 "	1,000	1,037	1,062	1,125 "
0,987	1,012	1,062	1,125 "	1,012	1,012	1,030	1,087 "
0,937	0,987	1,012	1,062 "	0,962	0,987	1,012	1,012 "
0,987	1,012	1,062	1,087 "	1,037	1,087	1,087	1,112 "
1,012	1,062	1,087	1,137 "	1,037	1,062	1,062	1,112 "
1,037	1,062	1,062	1,087 "	1,025	1,062	1,062	1,087 "
0,987	1,037	1,062	1,112 "	1,037	1,062	1,037	1,162 "
0,962	0,987	1,037	1,087 "	1,012	1,037	1,062	1,062 "
0,962	0,962	1,012	1,037 "	0,962	0,987	1,037	1,062 "
0,887	0,912	0,962	0,987 "	0,912	0,937	0,987	0,987 "
0,887	0,937	0,962	1,012 "	0,837	0,937	0,987	0,987 "
0,937	0,987	1,037	1,037 "	0,937	0,987	0,987	0,987 "
0,937	0,962	0,987	1,037 "	0,912	0,962	1,012	1,012 "
0,987	1,062	1,037	1,087 "	0,962	0,962	1,012	1,012 "
1,012	1,062	1,112	1,112 "	0,987	1,012	1,037	1,062 "
1,062	1,137	1,187	1,212 "	1,037	1,112	1,112	1,162 "
1,037	1,037	1,087	1,137 "	1,087	1,087	1,112	1,112 "
Mittel: 0,9732	1,0095	1,0432	1,0851 Mol	0,9908	1,0207	1,0439	1,0651 Mol
aufgenommen: 0,0363	0,0337	0,0419	"	0,0299	0,0232	0,0212	"
dasselb.pr.Min.: 0,00242	0,00337	0,00419	"	0,00199	0,00232	0,00212	"

pro Minute festgestellt (letzte Zeile der Tabelle VIII). Das Resultat ist genau wie bei der Oxalsäure: nach Aufenthalt in Leitungswasser nahezu gleichmäßige Salzaufnahme; von 5' zu 20' beträgt sie 0,00199, von 20'—30' 0,00232 und von 30'—40' 0,00212 Mol pro Minute. In den parallelgehenden Versuchen mit Oxalsäure dagegen erhebt sich der betreffende Wert in denselben Intervallen von 0,00242 über 0,00337 auf 0,00419 Mol pro Minute, also fast auf den doppelten Betrag: mit der Höhe der Außenkonzentration nimmt auch hier die Aufnahmegeschwindigkeit zu.

Die Übereinstimmung der mit Oxalsäure und Salzsäure angestellten Versuche geht auch aus einem Vergleich von Abb. 1 mit Abb. 2, die sich auf Salzsäure bezieht, hervor. Kurve *A* in Abb. 2 veranschaulicht den Verlauf der Aufnahme bei vorheriger Einwirkung von Säure, Kurve *B* die Aufnahme ohne solche Vorbehandlung. Kurve *B* steigt geradlinig an, bekundet also gleiche Aufnahmegeschwindigkeit; Kurve *A* wird mit zunehmender

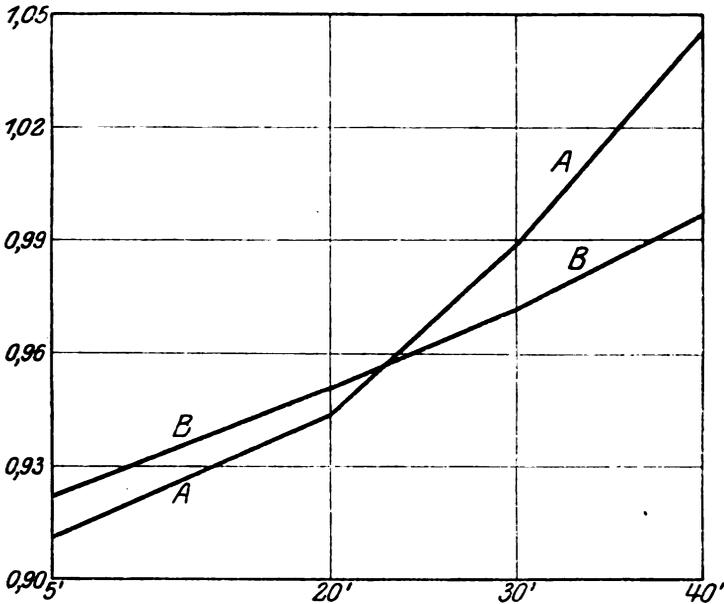


Abb. 2. Aufnahme von KCl durch die Palisadenzellen von *Buxus sempervirens*. Abszissen: Dauer des Aufenthalts in den Lösungen, Ordinaten: plasmolytische Grenzkonzentration in Mol. Kurve *A* mit, Kurve *B* ohne Vorbehandlung mit Salzsäure.

Außenkonzentration dagegen immer steiler, worin sich eben die Aufnahmebeschleunigung kundgibt.

Unsere Versuche zeigen also, daß dann, wenn das Protoplasma durch Vorbehandlung mit Säuren in den Zustand der Inaktivität versetzt ist, die Salzaufnahme nicht mehr mit konstanter Geschwindigkeit erfolgt, sondern daß unter diesen Umständen das Ficksche Diffusionsgesetz, welches besagt, daß die Aufnahmegeschwindigkeit der Außenkonzentration direkt proportional ist, rein zum Ausdruck gelangt.

Kapitel III.

Die Permeabilität des Plasmas für einige Alkaloide.

Die bisherigen Ausführungen bezogen sich auf Stoffe, die durch aktive Tätigkeit des Plasmas aufgenommen wurden; dies ist aber keineswegs in allen Fällen zutreffend; es gibt vielmehr zweifellos auch Substanzen, die sicherlich einfach hineindiffundieren. Bis jetzt war das nur für einige basische Anilinfarben durch Szűcs⁶⁾ nachgewiesen. Im folgenden kann nun der Nachweis erbracht werden, daß dasselbe auch für die Alkaloide gilt. Als Versuchsobjekt dienten zwei Spirogyraarten, von denen die eine mit ziemlicher Sicherheit dem Typus majuscula zugeordnet werden konnte, während bei der andern schmalen einbändrigen Art eine Identifizierung nicht gelang. Sie sei im folgenden als Spirogyra X bezeichnet.

Zunächst wurde mit freien Basen gearbeitet, daran schlossen sich Versuche über die Aufnahme der Alkaloidsalze an. Ein Vergleich zwischen der Permeabilität für Salze und jener für freie Basen ergab auffällige Unterschiede, die eine besondere Analyse erforderten. Damit ist die Gliederung des Stoffes gegeben.

1. Die Aufnahme von freien Alkaloidbasen.

Als Indikator für die Aufnahmegeschwindigkeit diene die Zeit, die verstreicht, bis im Innern der Zelle die Fällung erscheint. Das eindringende Alkaloid bildet mit dem Gerbstoff in der Vakuole einen Niederschlag. Es mußte also bei den verschiedenen Konzentrationen der Alkaloide die Zeit bestimmt werden, mit welcher der Niederschlag eben beginnt, sichtbar zu werden (= Fällungszeit). Diese Fällungszeit wurde mit abgestuften Konzentrationen für Chinin, Coffein und Piperidin ermittelt. Hierfür nur einige Belege aus den Versuchslisten. Es sei dabei betont, daß die folgenden Daten stets Mittelwerte aus einer größeren Zahl von Parallelserien darstellen.

Versuch 1: Piperidin. Spirogyra majuscula.

Konzentration	0,0585	0,029	0,0146	0,0073	0,00365	0,00182	0,00091	Mol
Fällungszeit . . .	4,0''	6,9''	16,0''	31,2''	67,0''	116,1''	259,1''	„
Konz.-Fällungsz.	0,2340	0,2015	0,2336	0,2285	0,2446	0,2113	0,2363	„

Wie aus Versuch 1 deutlich zu ersehen ist, nimmt die Fällungszeit mit wirkender Konzentration ständig zu. Dies Ergebnis entspricht der Fickschen Diffusionsformel

$$m = K \cdot q \cdot dt \cdot \frac{dc}{dt}$$

Hierin bedeutet k die Diffusionskonstante, q den Querschnitt, dt die Zeit, dc das Konzentrationsgefälle, ds den Diffusionsweg und m die diffundierte Menge. In unseren Versuchen ist nur die Menge, die aus verschiedenen Konzentrationen des Alkaloids hindiffundieren muß, damit die Ausfällung eben sichtbar wird, gleich groß. Der Diffusionsweg (Zellwand + wandständiges Plasma) ist konstant. Das Konzentrationsgefälle, d. h. die Differenz der Konzentrationen am äußeren und inneren Ende des Diffusionswegs ist gleich der Außenkonzentration. Denn, vorausgesetzt, daß das Volumen der Lösung groß ist, wird die Außenkonzentration im Laufe des Versuchs praktisch nicht geändert und die Innenkonzentration bleibt Null, da das eingedrungene Alkaloid sofort ausgefällt wird.

Unter diesen Bedingungen geht in der obigen Formel dc über in c (= Außenkonzentration) und auf der rechten Seite der Formel bleiben nur noch zwei Größen variabel, die Zeit (dt) und die Konzentration (c); steigt die Konzentration, so wird der Formel bloß Genüge getan, wenn die Zeit sinkt, und zwar umgekehrt proportional der Konzentration. Dieser Forderung entsprechen die Versuchsergebnisse. Um das zahlenmäßig darzutun, ist in Versuch 1 in der untersten Zeile das Produkt aus Konzentration · Fällungszeit berechnet. Wie man sieht, schwanken die erhaltenen Werte tatsächlich um einen sehr engen konstanten Wert. Dasselbe Verhalten zeigte sich aber auch in allen andern angestellten Versuchen.

Versuch 2: Coffein. *Spirogyra majuscula*.

Konzentration	. . 0,025	0,0125	0,00625	0,00312	0,00156	0,00078	Mol
Fällungszeit	... 9,1''	17,6''	29,0''	28,5''	109,2''	242,3''	„
Konz. · Fällungsz.	0,2275	0,2200	0,1813	0,1825	0,1704	0,1890	„

Versuch 3: ebenso; Zahl der Fälle (= n) 13. Temp. 12—14°.

Konzentration	. . . 0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,003125	0,001563	0,000789	0,0005	Mol
Fällungszeit	... 10''	15,2''	24,7''	38,8''	65,0''	152,5''	324,2''	507,6''	„
Konz. · Fällungsz.	0,5000	0,8788	0,3082	0,2384	0,2025	0,2362	0,2594	0,2588	„

Versuch 4: ebenso; Zahl der Fälle (= n) 10. Temp. 16—17,5°.

Konzentration	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,00312	0,00156	0,00078	Mol
Fällungszeit	... 13,3''	24,6''	47,0''	86,2''	179,6''	363,5''	715,5''	„
Konz. · Fällungsz.	0,6650	0,6150	0,5875	0,5375	0,5603	0,5671	0,6203	„

Versuch 5: ebenso; $n = 10$. Temp. 20°.

Konzentration 0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,00312	0,00156	0,000781	Mol
Fällungszeit 5,6''	10,3''	17,3''	27,4''	60,8''	118,2''	257,8''	„
Konz. · Fällungsz.	0,2800	0,2575	0,2188	0,1718	0,1884	0,1769	0,2010	„

In allen 4 Reihen ist wieder die Zunahme der Fällungszeit mit der Abnahme der Konzentration klar erkennbar. Auch die annähernde Konstanz der Produkte springt deutlich in die Augen. Nur die drei ersten Werte von Versuch III fallen etwas aus der Reihe heraus. An sich wäre vielleicht zu erwarten gewesen, daß die absoluten Werte der Produkte in Versuch 2 bis 5 gleich ausgefallen wären. Diese Bedingung ist für Versuch 2, 3 und 5 annähernd erfüllt, dagegen ist der in Versuch 4 gefundene Betrag ca. 3 mal höher. Das erklärt sich daraus, daß die Experimente zu verschiedener Zeit angestellt sind und bei dem starken Schwanken im physiologischen

Verhalten, das sich gerade bei *Spirogyra* oft mit besonderer Deutlichkeit offenbart, ist die Differenz keineswegs verwunderlich.

Versuch 6: Chinin. *Spirogyra majuscula*. $n = 9$. Temp. 15–16°.

Konzentration ..	0,0025	0,00125	0,000625	0,000312	0,000156	0,000078	Mol
Fällungszeit	31,5"	56,2"	133,9"	269,2"	592,7"	1212,4"	„
Konz. · Fällungsz.	0,7875	0,7025	0,8369	0,8397	0,9246	0,9457	„

Der Versuch mit Chinin ergibt nichts prinzipiell Neues: auch hier umgekehrte Proportionalität zwischen Konzentration und Zeit des Eindringens.

Alle bisherigen Angaben bezeichnen sich auf *Spirogyra majuscula* zur Ergänzung sei hier noch ein Experiment mit *Spirogyra X* angeführt.

Versuch 7: Chinin. *Spirogyra X*.

Konzentration ..	0,00156	0,00078	0,00039	0,000195	0,000097	0,000048	Mol
Fällungszeit	8,5"	18,0"	38,7"	89,4"	177,5"	350,4"	„
Konz. · Fällungsz.	0,01326	0,01404	0,01509	0,01743	0,01722	0,01682	„

Auch dieser Versuch fügt sich in schönster Weise in den bisherigen Rahmen, besonders hinsichtlich der Konstanz des Produktes aus Konzentration und Fällungszeit.

Es erhebt sich nun die Frage, ob die Diffusion der Alkaloide durch das Plasma hindurch ein normaler oder pathologischer Vorgang ist. Bereits Overton und nach ihm andere haben die geringe Giftigkeit der meisten Alkaloide für Pflanzenzellen hervorgehoben. Eigene Versuche führten zu einem analogen Ergebnis. Coffein z. B. ist sehr wenig giftig. In der stärksten, von mir überhaupt verwendeten Lösung von 0,05 Mol tritt der Niederschlag in wenigen (4,5) Sekunden auf. Wird der Aufenthalt in der Lösung um einige Sekunden verlängert, so wird der Niederschlag so intensiv, daß der ganze Protoplast bei schwächster Vergrößerung fast schwarz erscheint und man die grünen Chlorophyllbänder kaum noch durchschimmern sieht. Solche Zellen plasmolysieren in 0,25 Mol $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ völlig normal. Durch Auswaschen mit Wasser läßt sich die Plasmolyse rückgängig machen, um bei neuem Durchsaugen von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ wieder normal zu erscheinen.

Die Versuche über die Giftigkeit sind weitgehend variiert worden und erstreckten sich auch auf Chinin und Piperidin. Diese beiden sind etwas giftiger als Coffein, doch läßt sich auch für sie zeigen, daß während ihrer Aufnahme noch keine Schädigung des Plasmas eintritt. Das sei nur an einem Beispiel dargetan, das sich auf *Spirogyra X* bezieht.

Versuch 8: Plasmolytisches Verhalten nach Aufenthalt in Chinin.

In Chinin	Dauer	dann in $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	dann in H_2O	dann in $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	dann in H_2O
0,000097	300'	Plasmolyse	Deplasmol.	Plasmolyse	—
0,000195	150'	„	„	„	—
0,00039	45"	„	„	„	—
0,00078	32"	„	„	„	—
0,00156	25"	„	„	„	Deplasmol.

Es zeigt sich, daß in keinem Fall eine Schädigung zu verzeichnen war. Dabei betrug der Aufenthalt in dem Chinin immer mehr, als der Fällungszeit bei der betreffenden Konzentration (s. Versuch 7) entspricht.

Es war schließlich noch von Interesse, festzustellen, in welcher Weise Narkotica die Aufnahme von Alkaloiden beeinflussen. Zu dem Zwecke wurden Versuche mit Spirogyra majuscula angestellt, und zwar diente als Narkoticum Chloralhydrat. In einem ersten Versuch wurde mit 1% Chloralhydrat gearbeitet und hierauf wurden die Spirogyrafäden in 0,05 Mol Coffein verbracht. Die Einwirkungsdauer des Narkoticums wurde von 5–120 Minuten schrittweise abgestuft.

Versuch 9: Wirkung des Chloralhydrats auf die Aufnahme von Coffein. $n = 3$ Temp. 15–16°

in Chloralhydrat	0'	5'	10'	20'	40'	60'	120'
Fällungszeit	10,7	9,2	10,8	12,2	11,7	8,8	7,7'

Die Fällungszeiten zeigen hier infolge der geringen Versuchsziffer eine stärkere Schwankung, indes gruppieren sich die gefundenen Werte sehr deutlich um einen festen mittleren Betrag, und im Durchschnitt genommen herrscht eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Kontrollversuch ohne Narkosewirkung. Dieselbe Erscheinung zeigte sich bei weiterer Variation der Versuche. Diesmal wurden die Fäden nach der Narkotisierung in 0,025 Mol Coffein eingetaucht, und es wurde nicht nur die Einwirkungsdauer, sondern auch die Konzentration des Chloralhydrats stufenweise verändert. Eine Zusammenstellung der Einzeldaten gibt Versuch 10. Die Zahlen stellen wieder Mittelwerte aus 3–13 Einzelbestimmungen dar.

Versuch 10: Wie Versuch 9, aber 0,025 Coffein. Temp. 15–16°.

in Chloralhydrat	0,5%	0,25%	0,1%	0,02%
0' (Kontr.)	17,5''	—	17,2''	16,8''
1' „	16,5''	17,7''	—	16,3''
2' „	18,1''	18,2''	19,0''	18,5''
3' „	17,2''	15,7''	—	19,8''
5' „	16,4''	16,2''	18,7''	18,5''
10' „	15,5''	—	—	17,2''
20' „	—	—	—	16,8''

Es fällt hier deutlich auf, daß sich die Fällungszeiten unter den wandelnden Versuchsbedingungen durch eine außerordentliche Konstanz auszeichnen. Es war daher nur noch der Nachweis zu erbringen, ob es sich hierbei wirklich um den Ausdruck der Narkose handelt oder ob nicht die Zellen durch den Aufenthalt in Chloralhydrat ernstlich geschädigt waren. Deshalb wurden Versuche über die Plasmolysierbarkeit zuvor mit Chloralhydrat behandelter Fäden angestellt. Die Ergebnisse sind im Versuch 11 niedergelegt. Als Plasmolyticum diente 0,5 Mol KCl.

Versuch 11: Einfluß des Chloralhydrats auf die Plasmolysierbarkeit. Temp. 16°.

In Chloralhydrat	5 Minuten	10 Minuten	20 Minuten	40 Minuten	60 Minuten
1%	mittl. Pl.	gute Pl.	—	—	—
0,5%	gute Pl.	mittl. Pl.	—	—	—
0,25%	gute Pl.	gute Pl.	mittl. Pl.	—	—
0,1%	gute Pl.	gute Pl.	gute Pl.	—	—
0,02%	gute Pl.	gute Pl.	gute Pl.	mittl. Pl.	schlechte Pl.

Ein Überblick ergibt, daß in allen Fällen noch Plasmolyse zu erzielen war, wenngleich bei längerer Einwirkungsdauer besonders bei höheren Konzentrationen ein deutlicher Rückgang des Erfolges zu verzeichnen war. Bemerkenswert ist aber, daß selbst bei 1 proz. Chloralhydrat nach 10 Minuten noch in den meisten Zellen sehr schöne Plasmolyse erfolgt. Wir können also schließen, daß in unseren Versuchen fast durchweg von einer dauernden Schädigung der Zellen nicht die Rede sein kann. Wenn also trotzdem keine Verschiebung der Fällungszeiten eingetreten ist, so berechtigt uns dies zu der Annahme, daß die Stoffaufnahme durch die Narkose in keiner Weise verändert wird. Dieses Ergebnis steht in deutlichem Gegensatz zu den im Kap. I gewonnenen Erfahrungen, die sich auf die Aufnahme von anorganischen Salzen beziehen. Dort erfolgt das Eindringen unabhängig von dem Fickschen Diffusionsgesetz durch aktive Tätigkeit der Zellen und durch Narkotica wird die Permeabilität völlig unterdrückt; hier dagegen ist die Salzaufnahme ein reiner Diffusionsprozeß, die Aufnahmegeschwindigkeit ist durch das Ficksche Diffusionsgesetz bestimmt und die Narkotisierung, die die aktive Beteiligung der Zellen ausschaltet, hat keinen Einfluß auf den Ablauf der Vorgänge.

2. Die Aufnahme der Alkaloidsalze.

Im Anschluß an die Versuche über die Aufnahme von freien Alkaloidbasen wurden solche über das Eindringen von Alkaloidsalzen angestellt. Es ergab sich, daß das Reaktionsbild im großen und ganzen dasselbe ist; auch hier nimmt die Fällungszeit mit absteigender Konzentration ständig zu. Es genügt daher, zwei Einzelbeispiele hier besonders anzuführen. In beiden Fällen diente *Spirogyra majuscula* als Versuchsobjekt; als Fällungsmittel wurden Chininsulfat und Chininhydrochlorid verwendet.

Versuch 12: Chininsulfat. *Spirogyra majuscula*. $n = 10$. Temp. 16° .

Konzentration . . .	0,00163	0,000815	0,000407	0,000203	0,000101	Mol
Fällungszeit	40,5"	84,0"	183,5"	397,8"	845,5"	"
Konz. · Fällungszeit	0,06602	0,06846	0,07468	0,08075	0,08509	

Versuch 13: Chininhydrochlorid. $n = 10$. Temp. $16,5^\circ$.

Konzentration . . .	0,0504	0,0252	0,0126	0,0063	0,00315	0,00157	0,00078	0,00039	Mol
Fällungszeit	9,6"	18,2"	84,8"	70,5"	133,5"	194,8"	414,2"	776,5"	"
Konz. · Fällungszeit	0,4838	0,4586	0,4885	0,4441	0,4225	0,8051	0,8231	0,3028	"

Beide Male haben wir wieder die gesetzmäßig ansteigenden Reihen der Fällungszeiten vor uns, und daß auch hier das Ficksche Gesetz annähernd verwirklicht ist, das zeigen die Produkte jeweils in der untersten Zeile.

Ergänzend sei hier hinzugefügt, daß sich anscheinend auch die Salze des Ammoniaks derselben Regel fügen. Es wurde eine Versuchsreihe mit Ammoniumcarbonat ausgeführt, das ja ebenfalls Gerbstoffe fällt und dessen Aufnahmegeschwindigkeit daher mit den nämlichen Methoden bestimmt werden kann. Die Ergebnisse, die bei *Spirogyra majuscula* mit $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ erzielt wurden, sind in Versuch 14 zusammengefaßt.

Versuch 14: Ammoniumcarbonat, *Spirogyra majuscula*. $n = 5 - 9$. Temp. 17° .

Konzentration . .	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,003125	0,00156	Mol
Fällungszeit	15,2"	32,8"	69,8"	22,1"	717"	1098"	1838"	"
Konz. · Fällungsz.	1,520	1,640	1,725	2,763	4,481	3,431	2,869	"

Ein Blick zeigt, daß die Fällungszeiten der Konzentration wenigstens annähernd umgekehrt proportional sind. Wurde nun die Schnitte solange, als die Fällungszeit entspricht, in die betreffende Konzentration von $(\text{NCl}_4)_2\text{CO}_3$ gelegt und hernach in 0,5 Mol KCl gebracht, dann zeigte sich in den Zellen deutliche Plasmolyse. Hieraus ist klar zu ersehen, daß die Objekte zur Zeit, da der Niederschlag erschien, noch nicht geschädigt sein konnten, daß also die Aufnahme normalerweise so erfolgt, wie es der Versuch 14 andeutet.

3. Vergleich zwischen freien Alkaloiden und Alkaloidsalzen.

Die soeben geschilderten Versuche zeigen, daß die Alkaloidsalze eine ähnliche Kurve der Fällungszeiten und damit eine entsprechende Beziehung zwischen Aufnahmegeschwindigkeit und Konzentration ergeben, wie die zugehörigen freien Basen. Läßt sich nun daraus schließen, daß die Salze der Alkaloide durch das Plasma in genau derselben Weise diffundieren wie die freien Basen, und besteht damit ein Gegensatz zu der wiederholt gemachten Feststellung, wonach die Aufnahme der Salze eine aktive Tätigkeit der Zellen voraussetzt?

Zur Beantwortung dieser Frage gehen wir von der Overtonschen Angabe aus*), daß die Salze der Alkaloide die Gerbsäure in den Spirogyren langsamer fallen als die entsprechenden freien Basen. Das hat sich in meinen Versuchen völlig bestätigt, wie aus den Daten des Versuchs 15 ohne weiteres zu ersehen ist. Um hier genau vergleichbare Werte zu erhalten, wurden die Parallelversuche mit Chinin, Chininsulfat und Chininhydrochlorid genau zu derselben Zeit und genau mit demselben Material angestellt*).

Versuch 15: Spirogyra X. $n = 18$. Temp. 19°.

Konzentration	0,00156	0,00078	0,00039 Mol
Chinin, Fällungszeit.....	8,5''	18''	38,7'' „
Konzentration · Fällungszeit....	0,01326	0,01404	0,01509 „
Chininsulfat, Fällungszeit	14,8''	26,5''	42,3'' „
Konzentration · Fällungszeit...·	0,02309	0,02067	0,01650 „
Chininhydrochlorid, Fällungszeit	24,3''	47,8''	91,7'' „
Konzentration · Fällungszeit...·	0,03791	0,03728	0,03576 „

Es ergibt sich, daß bei der freien Base die Fällungszeiten allenthalben am kürzesten sind. Schon beim Chininsulfat macht sich ein unverkennbarer Anstieg bemerkbar und beim Chininhydrochlorid haben sich die Werte fast verdreifacht. Dementsprechend sind auch die Produkte aus Konzentration und Fällungszeit, die immer in der zweiten Zeile beigefügt sind und die sich innerhalb derselben Reihe dem Fickschen Gesetze entsprechend annähernd auf derselben Höhe erhalten, vom Chinin ausgehend über das Sulfat bis zum Chlorid im gleichen Sinne angewachsen. Wir sehen also, daß tatsächlich die Aufnahme der Alkaloidsalze hinter derjenigen der freien Basen mehr oder minder stark zurückbleibt. Ehe wir uns auf die Erklärung dieser Erscheinung näher einlassen, müssen wir uns noch ganz kurz der Giftwirkung der Alkaloidsalze zuwenden. Es gilt hier genau dasselbe, was über die freien Alkaloide gesagt wurde. Die Giftigkeit der verwendeten Salze ist so gering, daß sie sich in der für die Herbeiführung des Niederschlags erforderlichen Zeit noch nicht bemerkbar macht. In einer speziell nach dieser Richtung hinzielenden Versuchsserie mit Chininsulfat (Spirogyra X) wurden zunächst die Fällungszeiten für 0,00157—0,000097 Mol bestimmt und dann die Fäden

*) Die Versuche 7, 12 und 13 lassen keinen solchen Vergleich zu, da sie zu verschiedenen Zeiten angestellt sind.

in 0,25 Mol $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ verbraucht. In allen Fällen ergab sich schöne Plasmolyse. In einer weiteren Serie, in der die Fällungszeiten für Chininhydrochlorid von 0,0126—0,00039 Mol festgestellt wurden, konnte der Nachweis erbracht werden, daß auch bei einem Aufenthalt in der Salzlösung, der doppelt so lange währt, als die Fällungszeit, eine Schädigung des Protoplasmas nicht eintritt. Eine Kontrolle mit $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ergab in allen Fällen gute Plasmolyse, die mit Wasser wieder rückgängig gemacht und bei wiederholter Einwirkung von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ von neuem hervorgerufen werden konnte. Die Salzaufnahme ist also bis zur Fällungszeit sicher unter normaler Tätigkeit der lebenden Zellen erfolgt.

Wir stehen nun vor der Aufgabe, klarzustellen, wie die langsamere Aufnahme der Salze zu deuten ist. Overton erklärte diese Erscheinung so: Es ist bekannt, daß in den Lösungen der Alkaloidsalze freie Base hydrolytisch abgespalten wird. Nimmt man an, daß nur die freie Base eindringt, das Salz aber nicht, so muß auch in den Lösungen der Salze eine Fällung eintreten, aber langsamer als in den entsprechenden Lösungen der freien Basen. Gibt man eine Spur freier Säure in die Lösung des Alkaloidsalzes, so kann man die Hydrolyse so weit zurückdrängen, daß keine freie Base mehr vorhanden ist. In solchen Fällen trat keine Ausfällung mehr ein, und Overton erblickte darin den Beweis für seine Auffassung, daß nur die freie Base eindringt, das Salz aber nicht. Ruhland (4) bestätigte das auf plasmolytischem Wege.

Meine eigenen Versuche brachten eine Bestätigung der experimentellen Befunde von Overton. Einige Versuchsdaten, die sich alle auf *Spirogyra majuscula* beziehen, seien hier angeführt.

Versuch 16:

a) in Chinin 0,00157	b) in Chininhydrochlorid 0,00157	c) in Chininhydr. 0,00315	} $\frac{e}{e_{\text{norm}}}$
		+ 0,01 norm. HCl	
nach 15' starker Niederschlag	nach 15' schwacher Niederschlag	nach 15' kein Niederschlag	

Die Objekte von c), die keine Schrumpfung und keine Kontraktion der Chromatophoren zeigten, wurden 15' in Wasser und dann in 0,00157 Mol Chinin gelegt; in einem Versuch erfolgte ein Niederschlag nach 338'', in einem zweiten nach 180''; bei einem dritten Kontrollexperiment in 0,0504 Mol trat die Fällung nach 146'' ein, der Vergleich von a), b), und c) ergibt, daß die Angaben von Overton tatsächlich zu Recht bestehen, und daß durch die Beigabe von Salzsäure die Aufnahme der Alkaloidsalze noch weiter

zurückgedrängt wird. Dies äußert sich auch in den folgenden Versuchen, bei denen immer geringere Konzentrationen von Salzsäure angewendet wurden.

Versuch 17: Spirogyra majuscula. in 0,00315 Mol Hydrochlorid }
Temp. 16,5° + 0,01 norm. HCl } je 6 ccm

nach 10' kein Niederschlag, auch keine Schrumpfung und keine Kontraktion der Chromatophoren; dann in Wasser ab gespült und in 0,00157 Mol Chinin; mittlere Fällungszeit in 6 Einzelversuchen 94,5'' (Kontrolle ohne Vorbehandlung mit Chininhydrochlorid + Salzsäure 39,0'').

Versuch 18: Sp. majuscula in 0,00315 Mol Chininhydrochlorid }
Temp. 16,5° + 0,005 norm. HCl. } je 6 ccm

nach 15' kein Niederschlag, vielfach Kontraktion der Chromatophoren; dann ab gespült und in 0,001 Mol Chinin, mittlere Fällungszeit in 6 Einzelversuchen 69,7 (Kontrolle ohne Vorbehandlung 53,8'', also gute Übereinstimmung).

Versuch 19: Sp. majuscula in 0,00315 Mol Chininhydrochlorid }
Temp. 16° + 0,0025 norm. HCl } je 6 ccm

nach 30' kein Niederschlag, vielfach Kontraktion der Chromatophoren; dann ab gespült und in 0,00157 Mol Chinin; mittlere Fällungszeit in 2 Einzelversuchen 120'' (Kontrolle ohne Vorbehandlung 91,2'').

Versuch 20: Sp. majuscula in 0,00315 Mol Chininhydrochlorid }
Temp. 17° + 0,00125 norm. HCl } je 6 ccm

nach 15' kein Niederschlag, vielfach Kontraktion der Chromatophoren; dann ab gespült und in 0,00157 Mol Chinin. Fällungszeit 72''.

Zu diesen Versuchen ist noch zu bemerken, daß sich bei 0,0025 norm. HCl nach 90', bei 0,00125 norm. HCl nach 160' die Hälfte der Zellen nach dem mikroskopischen Aussehen als geschädigt erweist. Dies sind aber Zeitwerte, die weit über der angewendeten Einwirkungsdauer liegen. Wir können also annehmen, daß das Absterben der Zellen nicht für die beobachteten Erscheinungen verantwortlich gemacht werden kann.

Ehe wir uns aber der Overtonschen Interpretierung anschließen konnten, mußte entschieden werden, ob nicht an sich schon die Säure die Ausfällung des Tartrates hemmt. Die Overtonsche Deutung wäre richtig, wenn freie Base, Salz und etwas Säure im Reagensglas Gerbsäure gleich rasch fällten. Versuche in vitro ergaben nun, daß dies von 10 proz. Gerbsäure hinab bis zu 1 proz. tatsächlich der Fall ist. Der Niederschlag trat praktisch zu derselben Zeit ein. Base und Chlorid verhielten sich auch bis zu 0,0125 proz. Gerbsäure annähernd gleich, ein Zusatz von HCl zum Salz aber hinderte bereits bei 0,25 proz. Gerbsäure den Niederschlag völlig.

Die Versuche wurden derartig angestellt, daß 1 Tropfen Gerbsäure (Kahlbaum, frische Lösung) und 1 Tropfen Alkaloid (Chinin, Chininhydrochlorid und Chininhydrochlorid + HCl) nebeneinander auf den Objektträger gebracht und dann zum Zusammenfließen veranlaßt wurden. Zwei derartige Versuchsreihen seien hier angeführt. Bei der einen war die Salzsäure 0,0025, bei der andern 0,00125 normal (durch Vermischen mit dem Hydrochlorid sank natürlich die Konzentration auf die Hälfte).

Versuch 20a: Fällung von Gerbsäure durch Alkaloide in vitro.
Temp. 19°.

Konzentration der Gerbsäure	a)	b)	c)
	1 Tropfen Gerbsäure und 1 Tropfen Chinin 0,00157	1 Tropfen Gerbsäure und 1 Tropfen Chininhydrochlorid 0,00157	1 Tropfen Gerbsäure und 1 Tropfen (Chininhydrochlor. 0,00315 + 0,0025 norm. HCl) gleiche Teile.
10%	Niedersch. sofort	Niedersch. sofort	Niedersch. sofort
1%	„ n. 3,1''	„ n. 3,6''	„ n. 4,2''
0,5%	„ n. 3,6''	„ n. 4,8''	nach 8 bis über 60''

Schon in diesem Versuch tritt die hemmende Wirkung der Säure im chemischen Versuch bei niederer Konzentration von Gerbsäure klar zutage. Noch deutlicher wird dies in der folgenden Versuchsreihe.

Versuch 21: Fällung von Gerbsäure durch Alkaloide in vitro.
Temp. 18,5°.

Konzentration der Gerbsäure	a)	b)	c)
	1 Tropfen Gerbsäure und 1 Tropfen Chinin 0,00157	1 Tropfen Gerbsäure und 1 Tropfen Chininhydrochlorid 0,00157	1 Tropfen Gerbsäure und 1 Tropfen Chininhydrochlor. 0,00315 + 0,00125 HCl, gleiche Teile
10%	Niedersch. sofort	Niedersch. sofort	Niedersch. sofort
1%	„ nach 4,4''	„ nach 4,1''	„ nach 4,7''
0,5%	„ „ 5,1''	„ „ 6,5''	„ „ 7 bis über 120'
0,25%	„ „ 3,6''	„ „ 6''	} nach 120'' kein Niederschlag.
0,125%	„ „ 4,2''	„ „ 7,6''	
0,0125%	„ „ 16,1''	„ „ 18,1''	

Wie man sieht, sind hier die Fällungszeiten für Chinin und Chininhydrochlorid praktisch gleich, für Hydrochlorid und Salzsäure macht sich aber von 0,5% Gerbsäure an abwärts eine immer stärkere Hemmung der Fällungen geltend, die dazu führt, daß in den angewendeten Beobachtungszeiten überhaupt kein Niederschlag beobachtet wurde. Dieses Ergebnis zeigt uns, daß die Overtonsche Deutung nicht so ohne weiteres zu Recht besteht. Sie wäre nur bewiesen, wenn die Gerbsäure in den Vakuolen von Spiro-

gyra mindestens 1% betragen würde. Hierüber wissen wir aber nichts. Da aber außerdem nicht zu entscheiden ist, ob der in der Spirogyra vorhandene Gerbstoff identisch ist mit dem geprüften, und da bei der Fällung in der Spirogyrazelle neben Gerbstoff auch noch andere Substanzen (wahrscheinlich Eiweißkörper) im Spiele sind*), so war auf dem angegebenen Wege keine sichere Entscheidung möglich. Eine solche war indes in anderer Weise herbeizuführen.

Ausgehend von der Idee, daß das tote Plasma für Base und Salz gleich permeabel sei, wurde probiert, das Protoplasma vor oder während des Aufenthalts in der Salzlösung abzutöten. Zum Ziele führte schließlich eine Sättigung der Lösungen mit Chloroform. In diesem Falle war die Fällungszeit für äquimolekulare Mengen von Salz und Base gleich groß, oder es trat wenigstens eine starke Annäherung der Vergleichsweite ein, wie Versuch 22—24 zeigen.

Versuch 22: Aufnahme bei Abtötung mit Chloroform.

Konzentration0,00157 Mol	0,00078 Mol
Chinin	14,8'' ,,	35,5'' ,,
Chininhydrochlorid .	29,6'' ,,	55,0'' ,,

Hier ist der Kontrast zwischen Chinin und Chininhydrochlorid schon lange nicht mehr so groß wie in Versuch 15 ohne Chloroform. Dort betrug die Fällungszeit für dasselbe Salz das Dreifache, hier das Zweifache oder noch weniger. In einem gleichartigen weiteren Versuche (23) ist der Unterschied völlig verschwunden.

Versuch 23: Aufnahme bei Abtötung mit Chloroform. (Wie in Versuch 22 sind die Alkaloidlösungen mit Chloroform gesättigt.)

Konzentration0,00157 Mol	0,00078 Mol
Chinin	14,4'' ,,	31,4'' ,,
Chininhydrochlorid .	16,7'' ,,	30,2'' ,,

Schließlich sei noch ein Versuch erwähnt, bei dem drei Vergleichslösungen von Chinin 0,00157 Mol, Chininhydrochlorid 0,00157 Mol und Chininhydrochlorid + 0,00125 norm. HCl (gleiche Teile!) mit Chloroform gesättigt waren (Versuch 24).

Versuch 24: Aufnahme bei Abtötung mit Chloroform. Temp. 18°.

Chinin	Fällungszeit	111,3'' (Mittel aus 3 Einzelwert.)	*
Chininhydrochlorid	„	117,5''	„
Chininhydrochlorid + HCl	„	113,5''	„

Die Übereinstimmung ist hier so gut, als sie nur irgendwie sein kann. Zum Vergleich wurde noch ein Kontrollversuch ohne Zufügung von Chloroform angestellt, der ergab, daß nunmehr die Fällungszeit beim Hydrochlorid dreimal so lang ist, während bei Zugabe von Salzsäure zum Hydrochlorid ein Niederschlag überhaupt ausbleibt.

*) Versuche mit Hühnereiweiß in vitro gaben mit Alkaloiden und Alkaloidsalzen ebenfalls Niederschläge, allerdings von etwas anderem Charakter.

Darüber, daß in unseren Versuchen die Zellen tatsächlich getötet waren, kann kein Zweifel bestehen. Durch das Chloroform wird das Protoplasma sehr rasch zum Absterben gebracht. Bereits nach 5" Aufenthalt in Chininhydrochlorid 0,00157 Mol gesättigt mit Chloroform, ist das Plasma getötet, leicht geschrumpft und nicht mehr plasmolysierbar, während 30' Aufenthalt in Chininhydrochlorid derselben Konzentration ohne Chloroform kaum eine Schädigung erkennen läßt, was sich in der durchaus normalen Plasmolyse äußert.

Bringt man die Fäden vor dem Eintragen in die Alkaloidlösungen in Chloroform und stuft diesen Aufenthalt schrittweise ab, dann kann man beobachten, daß mit abnehmender Einwirkungsdauer auch der Kontrast zwischen Chinin, Chininhydrochlorid und Chininhydrochlorid + HCl immer deutlicher hervortritt, und zwar genau in dem Maße, das der schädigenden Wirkung des Chloroforms entspricht, die mit sinkender Expositionszeit mehr und mehr verklingt.

Sättigt man die Lösungen statt mit Chloroform mit Äther, so wird die Fällungszeit für das Salz ebenfalls verkürzt, aber sie bleibt etwas länger als bei der Base. Dem entspricht, daß mit Äther gesättigte Lösungen langsamer töten als mit Chloroform gesättigte.

Damit ist nun unsere Frage im Sinne Overtons entschieden. Nur die freien Basen der Alkaloide diffundieren durch das Protoplasma von Spirogyra, die Moleküle des Salzes dagegen nicht. Da diese Hemmung mit dem Tod der Zellen erlischt, so muß sie auf einer aktiven Beteiligung des lebenden Plasmas beruhen.

Zusammenfassung.

Die Untersuchungen, über die im vorstehenden berichtet worden ist, bewegten sich alle auf einer Linie: sie sollten die aktive Beteiligung der lebendigen Zellen an der Stoffaufnahme schärfer herausarbeiten. Diese Aufgabe ist von verschiedener Seite aus in Angriff genommen worden. In einer ersten Gruppe von Versuchen wurde die aktive Betätigung der Zellen dadurch ausgeschaltet, daß das Gewebe vor dem Verbringen in die Salzlösungen durch Äther oder Chloralhydrat in den Zustand der Narkose versetzt wurde. Die Experimente erstreckten sich auf die Palisadenzellen von *Buxus sempervirens* und *Acer platanoides* und betrafen die Aufnahme von KCl und NaCl. Es ergab sich, daß durch die Narkose die Salzaufnahme vollständig unterdrückt wird. Wendet man schwächere Konzentrationen an oder setzt man die Einwirkungsdauer des Narkoticums herab, dann findet bloß eine Verlangsamung des Eindringens statt, das zu normalen Verhältnissen hinüberleitet. Die Narkosewirkung nimmt nach einiger Zeit wieder ab, so daß nach einem bestimmten

Intervall die typischen Permeabilitätsverhältnisse hergestellt werden *).

Die Wirkung verdünnter Säuren auf die Salzaufnahme liegt in der umgekehrten Richtung; durch ihren Einfluß wird die Durchlässigkeit erhöht und es werden Verhältnisse geschaffen, die eine rein physikalische Aufnahme der Salze bedingen, und zwar schon bei Säurekonzentrationen, die keine dauernde Schädigung des Protoplasten nach sich ziehen. Das äußert sich darin, daß die Aufnahmegeschwindigkeit von NaCl, die bei den Palisadenzellen von *Buxus sempervirens* unter normalen Umständen konstant ist, bei vorheriger Einwirkung von Oxalsäure oder Salzsäure dem Fickschen Diffusionsgesetz folgt, d. h. der Außenkonzentration proportional geht.

Eine solche nach rein physikalischen Gesetzen erfolgende Stoffaufnahme zeigte sich nun schon unter normalen Verhältnissen bei den freien Alkaloidbasen. Das ist wieder einer von den vielen Hinweisen darauf, daß das physiologische Geschehen nicht auf eine einzige Schablone zurückgeführt werden darf. Die Versuche mit Alkaloiden erstreckten sich auf zwei Spirogyraarten, und als Maß für die Aufnahmegeschwindigkeit diente die Fällungszeit des in der Vakuole vorhandenen Gerbstoffs. Experimente mit Chinin, Coffein und Piperidin ergaben, daß das Produkt aus Fällungszeit und Außenkonzentration weitgehend konstant ist, wie das nach dem Fickschen Gesetz zu erwarten war. Hier ist also ein prinzipieller Unterschied zu dem Verhalten der oben erwähnten anorganischen Salze vorhanden. Es war deshalb von Wichtigkeit, festzustellen, wie sich die Salze der Alkaloidbasen verhielten. Schon Overton hatte festgestellt, daß die Salze viel langsamer fallen, und er führte dies darauf zurück, daß bloß die in der Salzlösung vorhandene hydrolytisch abgespaltene freie Base eindringt. Diese Auffassung Overtons konnte bestätigt werden. Setzt man dem gelösten Salz eine Spur Säure, welche die Hydrolyse zurückdrängt, zu, dann findet keine Fällung, also auch keine Aufnahme statt. Wenn man nun in einer Vergleichsreihe freie Alkaloidbase, Alkaloidsalz und Alkaloidsalz + verdünnte Säure in äquimolaren Mengen anwendet, aber alle drei Lösungen mit

*) Auch Lepeschkin (Ber. d. d. bot. Ges. 29. 1911) fand eine Herabsetzung der Permeabilität für Salze und Anilinfarben durch Äther und Chloroform.

Chloroform sättigt, dann erfolgt der Niederschlag zu derselben Zeit, und das ist eine Folge davon, daß durch das Chloroform die Zellen äußerst rasch abgetötet werden. Hier wirkt also das lebende Plasma dahin, daß die Salzaufnahme, die nach dem Absterben ebenso rasch stattfindet als die der freien Base, unterbleibt. Damit ist aber auch bei den Versuchen über die Alkaloide der Anschluß an unsere Hypothese gewonnen.

Literatur.

¹⁾ Günther: Über den Traumatotropismus der Wurzel. Diss. Berl. 1913. — ²⁾ Overton: Vierteljahrsschr. d. naturf. Ges. Zürich. **10**. 1896 (Jubelbd.). — ³⁾ Pfeffer: Pflanzenphysiologie. 2. Aufl. Leipz. 1897—1904. — ⁴⁾ Ruhland: Jahrb. f. wissensch. Botanik. **54**. 1914. — ⁵⁾ Stark: Beiträge zur Kenntnis des Traumatotropismus. Jahrb. f. wissensch. Botanik. **57**. 1917. — ⁶⁾ Szűcs: Jahrb. f. wissensch. Botanik. **52**. 1913. — ⁷⁾ Tröndle: Arch. des sc. phys. et nat. Genève. **45**. 1918. — ⁸⁾ Tröndle: Verhandl. d. schweiz. naturf. Ges. Lugano. 1919. — ⁹⁾ Tröndle: Beih. z. bot. Centralbl. **38**. 1 Abt. (im Druck). — ¹⁰⁾ de Vries: Jahrb. f. wissensch. Botanik. **16**. 1885.

Über Urikase im Samenorganismus.

Vorläufige Mitteilung.

Von

Antonín Němec.

(Aus der Biochemischen Abteilung der Staatl. Versuchsanstalt für Pflanzenproduktion in Prag.)

(Eingegangen am 11. Oktober 1920.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Obwohl über enzymatische Harnsäurespaltung im tierischen Organismus schon viele Untersuchungen unternommen wurden, sind bisher ähnliche Enzymreaktionen im Pflanzenkörper fast vollständig unbekannt.

Kossowicz¹⁾ zeigte, daß die von ihm festgestellten Zersetzungen der Harnsäure und Hippursäure durch zahlreiche Pilze Prozesse enzymatischer Natur sind. Daß uricolytische Enzyme auch im Organismus höherer Pflanzen auftreten, kann man aus der Arbeit von G. Berti²⁾ schließen. In dieser Studie wurde die Wirkung einiger dem Pflanzenreich angehörenden Enzyme auf die Harnsäure untersucht, und zwar des Emulsins, des Papains, der Takadiastase und der Malzdiastase. Die Harnsäure wurde in Natriumphosphat aufgelöst, der Titer der Lösung mittelst der Folin-Schafferschen³⁾ Methode bestimmt; durch geeignete Versuche wurde festgestellt, daß das zur Fällung des Ammoniumurates verwendete Ammoniumsulfat die Enzyme nicht oder nur spurenweise mit sich riß. Eine Reihe von Kölbchen, welche Harnsäure, Enzym und Toluol enthielten, wurde in den Brutschrank gebracht und in gewissen Zeitabständen der Gehalt an Harnsäure bestimmt. Es ergab sich, daß die verwendeten Enzyme ein ausgesprochen harnsäurespaltendes Vermögen besitzen. Unter dem Einflusse der enzymatischen Wirkung wird der Gehalt der Lösung an Harnsäure bedeutend herabgesetzt, kommt jedoch nicht gänzlich zum Schwinden. Hierbei wurde aber in interessanter Weise beobachtet, daß durch die Wirkung des gleichen, die Harnsäure zerstörenden Enzyms nach 10–12 Tagen dieselbe

¹⁾ Kossowicz: Zeitschr. f. Gährungsphysiol. 1, 121 u. 317. 1912.

²⁾ Berti: Biochemica e Terap. Sperim. 2, 266. 1911.

³⁾ Folin und Schaffer: Zeitschr. physiol. Chemie 32, 553. 1900.

neuerdings gebildet wird. In dieser Richtung fanden in ähnlicher Weise Ascoli¹⁾ und Izar²⁾, sowie Preti³⁾, daß die durch die Leber bei Luftzufuhr zerstörte Harnsäure durch Stehenlassen mit dem Rinderleberbrei bei Luftabschluß und Kohlensäuredurchleitung im Brutschrank wieder gebildet wird, daß hier also gewissermaßen ein reversibler Prozeß vorliege.

Die meisten Forscher, welche die enzymatische Spaltung der Harnsäure studierten, haben sich bei ihren Untersuchungen damit begnügt, das Verschwinden der Harnsäure zu konstatieren. Es ist aber in neuerer Zeit fraglich geworden, ob die einfache Feststellung, daß Harnsäure verschwindet, genügt, um das oxydierende Ferment sicherzustellen. Für die Harnsäurespaltung durch Urikase existieren nach Battelli und Stern⁴⁾ zwei Arten des Abbaus: 1. ein hydrolytischer, 2. der typische oxydative Abbau zu Allantoin durch Urikase, bei welchem Sauerstoff gebunden und Kohlendioxyd gebildet wird. Ob und in welcher Weise Allantoin weiter zerstört wird, darüber ist das letzte Wort noch nicht gefallen. Almagia⁵⁾ nimmt eine weitere Umwandlung des Allantoins zu Glyoxalsäure an, Cipollina⁶⁾ noch eine weitere Oxydation zu Oxalsäure. Schittenhelm⁷⁾ weist auf die Möglichkeit einer Oxydation zu Harnstoff hin, welche wahrscheinlich in ähnlicher Weise wie die durch Wasserstoffperoxyd und Eisenchlorid von Ohta⁸⁾ in Neubergs Institut durchgeführte Spaltung der Harnsäure in Harnstoff, Oxalsäure und Ammoniak verlaufen möchte.

Bei Gelegenheit einer Untersuchung über die desamidisierenden Enzyme der Samenorganismen habe ich einige Versuche über die Harnsäurespaltung durch Enzyme der Samenkörper durchgeführt, die ich im folgenden wiedergebe. Es hat sich gezeigt, daß das Sojabohnenmehl in ausgesprochener Weise ein enzymatisches Harnsäurespaltungsvermögen zeigt, besonders bei Anwesenheit von Luftsauerstoff. Die Spaltung der Harnsäure durch Sojabohnenmehl verläuft bis zur Ammoniakbildung; welche Übergangsformen während des Harnstoffabbaus gebildet werden, habe ich bisher noch nicht untersucht, jedoch halte ich unterdessen mit Rücksicht auf den beträchtlichen Ureasegehalt der

¹⁾ Ascoli und Izar: Zeitschr. physiol. Chemie **38**, 529. 1908; **62**, 347. 1909.

²⁾ Izar: Zeitschr. f. physiol. Chemie **64**, 63. 1910; **65**, 78. 1910. *Biochimica e Terap. Sperim.* **3**, 117. 1912.

³⁾ Preti: Zeitschr. f. physiol. Chemie **62**, 354. 1909.

⁴⁾ Oppenheimer: Die Fermente und ihre Wirkungen **2**, 821. 1913

⁵⁾ Almagia: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **7**, 459. 1906.

⁶⁾ Cipollina: Berl. klin. Wochenschr. 1901, S. 544.

⁷⁾ Oppenheimer: Handbuch der Biochemie **4**. Schittenhelm: *Der Nucleinstoffwechsel* 1911.

⁸⁾ Ohta: diese Zeitschr. **34**, 439. 1913.

Sojasamen für wahrscheinlich, daß die oxydative Spaltung im Sinne der oben angeführten Schittenhelmschen Anschauung stattfindet.

Versuche über den Urikasegehalt der Sojabohne.

Zu den Versuchen wurden einheimische, auf unseren Versuchsfeldern akklimatisierte Sojabohnensamen ausgewählt und in feingemahlener Form verwendet. Die Urikasewirkung wurde an Kaliumurat (E. Merck) studiert, und zwar wurde 5 g Sojabohnenmehl im Erlenmeyerschen Kolben je mit 100 ccm 0,3 proz. Kaliumuratlösung (welche durch Auflösung des Urats in kochendem Wasser hergestellt wurde) versetzt und unter Zugabe von 5 ccm Toluol im Brutschrank bei 35° C belassen.

Es wurden insgesamt vier Versuchsreihen angestellt:

1. 5 g Sojabohnenmehl + 100 ccm 0,3 proz. Kaliumuratlösung + 5 ccm Toluol. Der Versuchskolben wurde mit Kautschukpfropfen geschlossen und im Brutschrank bei 35° C angesetzt (Versuch ohne Luftdurchführung).

2. 5 g Sojabohnenmehl + 100 ccm 0,3 proz. Kaliumuratlösung + 5 ccm Toluol. Der Kolben wurde mit zweimal gebohrtem Kautschukpfropfen geschlossen, und zwecks Zuführung und Abführung der Luft mit passenden Röhrchen versehen. Die durch den Kolben durchzuleitende Luft strich zuerst einen Filtrierturm mit Watte, dann eine Drechslersche Waschflasche mit 0,5 proz. Sublimatlösung, weiter eine kleine Waschflasche mit Toluol, bevor sie durch ein bis auf den Boden reichendes Glasröhrchen in das Reaktionskölbchen im Brutschranke gelangte; durch das zweite Glasröhrchen, welches knapp unter dem Kautschukpfropfen endete, wurde die Luft weiter in ein wieder mit zwei Bohrungen in dem Pfropfen versehenes Erlenmeyerkölbchen (außerhalb des Brutschrankes) mit titrierter Schwefelsäure geführt und endlich in eine der beiden Saugflaschen des Wasserasspirators, in welchen zugleich die Menge der durchgeflossenen Luft gemessen wurde. Im Durchschnitte wurden pro 24 Stunden 25 l Luft durchgeführt. Temperatur im Brutschrank: 35° C.

3. Kontrollversuch: 5 g Sojabohnenmehl + 100 ccm destilliertes Wasser + 5 ccm Toluol (unter Luftabschluß adl.). Temperatur im Brutschrank: 35° C.

4. Kontrollversuch: 5 g Sojabohnenmehl + 100 ccm destil-

liertes Wasser + 5 ccm Toluol (unter Luftdurchführung ad 2), durchschnittlich 25 l pro Tag). Temperatur im Thermostat: 35° C.

In diesen Versuchen wurde die Urikasewirkung nicht durch das Verschwinden der Harnsäure, ebensowenig durch das entstandene Kohlendioxyd verfolgt, sondern es wurde der abgespaltene Ammoniak bestimmt unter Benutzung einer ähnlichen Destillationsmethode, welche bei den Versuchen über die Urease der Getreidesamen verwendet wurde¹⁾. Von Zeit zu Zeit wurde der Versuch abgebrochen und die Menge des gebildeten Ammoniaks unter Luftdurchsaugung während der Destillation in die titrierte Schwefelsäurelösung (1 ccm — 0,000611 g Ammoniak) bestimmt.

Die Versuchsergebnisse mit Sojabohne sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Versuche mit Sojabohne.

5 g Sojabohnenmehl; 0,3% Kaliumuratlösung; 5% Toluol.

Versuchstemperatur 35° C.

Dauer der Versuche in Stunden	Versuche											
	unter Luftabschluß						unter Luftdurchführung					
	Kontroll- versuch		Kaliumurat				Kontroll- versuch		Kaliumurat			
	ccm H ₂ SO ₄	mg NH ₃	ccm H ₂ SO ₄	mg NH ₃	mg NH ₃ , abge- spalten aus Urat	% der Spal- tung	ccm H ₂ SO ₄	mg NH ₃	ccm H ₂ SO ₄	mg NH ₃	mg NH ₃ , abge- spalten aus Urat	% der Spal- tung
24	6,6	4,03	12,2	7,45	3,42	3,4	8,7	5,31	23,4	14,30	8,99	9,1
72	9,7	5,93	17,2	10,51	4,58	4,6	—	—	30,6	18,69	—	—
120	—	—	21,5	13,13	—	—	11,8	7,21	31,8	19,43	12,22	12,8
144	9,5	5,80	22,5	13,74	7,94	8,0	11,3	6,90	34,2	20,89	13,99	14,1

Bei vollständiger Spaltung liefert Kaliumurat C₅H₃KN₄O₃ (0,3 g Substanz) theoretisch 99,03 mg Ammoniak.

Aus diesen Resultaten, welche auch graphisch dargestellt sind, ist ersichtlich, daß Sojabohnen ein merkliches Harnsäurespaltungsvermögen besitzen. Es wurde beobachtet, daß der Zersetzungsvorgang viel energischer vor sich geht, wenn die Reaktionsflüssigkeit mit Luftsauerstoff gesättigt wird als unter Luftabschluß.

¹⁾ A. Němec, diese Zeitschr. 91, 126. 1918.

Da die oxydative Spaltung der Harnsäure durch Sojabohnenmehl bis zur Ammoniakbildung verläuft, muß angenommen wer-

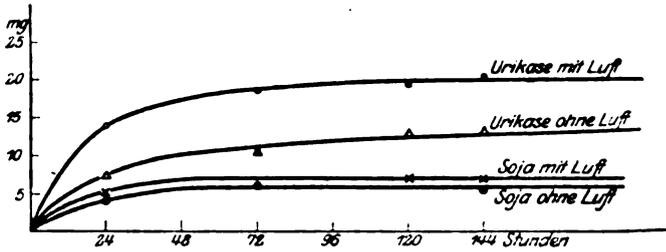
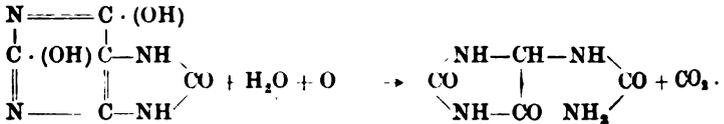
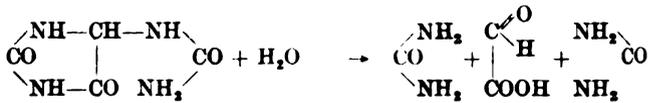


Abb. 1.

den, daß an diesen Spaltungen mehrere Enzyme teilnehmen, mindestens die Urikase (Harnsäure wird in Allantoin oxydativ gespalten):



Die hypothetische Allantoinase (Allantoin wird in Harnstoff und Glyoxalsäure hydrolysiert):



und endlich die Urease (Harnstoffzersetzung in Ammoniak und Kohlendioxyd):



Das beträchtliche Harnstoffspaltungsvermögen der Sojasamen steht mit dieser Anschauung im besten Einklang.

Quantitative Untersuchungen des Magnesium-Kalk-, und Barium-Sulfat-Antagonismus.

Von

M. Kochmann.

[Nach Versuchen von C. Lucanus und R. Multhaupt¹⁾.]

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Halle a. S.)

(Eingegangen am 11. Oktober 1920.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Bei der Feststellung des Einflusses pharmakologisch wirksamer Körper werden vielfach die Mengenverhältnisse außer acht gelassen. Und doch spielt die Dosierungsfrage kaum eine geringere Rolle als die chemische Beschaffenheit der untersuchten Substanz selbst. Bei Agenzien, die im tierischen Organismus antagonistische Wirkungen entfalten, ist es von Interesse festzustellen, inwieweit ein solcher Antagonismus in quantitativer Hinsicht besteht, welche Gaben des „Giftes“ mithin noch entgiftet werden können, ob der Entgiftung enge oder weite Grenzen gezogen sind. Unter Umständen können die gewonnenen Ergebnisse zur Aufklärung der dabei ins Spiel kommenden Vorgänge beitragen und auch vom praktischen Gesichtspunkt einen gewissen Wert besitzen. Merkwürdigerweise sind derartige quantitative Untersuchungen weder für den Antagonismus Magnesiumion — Calciumion noch Bariumion — Sulfation bisher, wenigstens nicht in ausreichendem Maße, ausgeführt worden.

Bei den folgenden Untersuchungen am Frosch (*R. fusca*) wurde in der Weise vorgegangen, daß zunächst die tödliche Gabe der beiden Antagonisten festgestellt und dann der gegenseitige Antagonismus quantitativ verfolgt wurde. Es schien auch geboten, das „Gegengift“ vor und nach der Vergiftung darzureichen, um so die prophylaktische und kurative Wirkung zu entwickeln

¹⁾ Inaug.-Diss. Halle 1920; dort auch die Literaturangaben.

A. Antagonismus Magnesium — Calcium.
1. Feststellung der Dosis efficace et letalis des Magnesiums.

Tabelle I.

Versuch Nummer	Gewicht des Frosches in g	Gabe pro Kg Gewicht		Beginn der Wirkung in Min.	Dauer der Wirkung		Ausgang der Vergiftung	Bemerkungen		
		in g	in Millimol		a) bis Lagewechsel auf Reiz wieder möglich	b) bis Lagewechsel spontan wieder möglich				
33	22	1,0	4,07	10	dauernd mögl.	2 Min.	Erholung	Keine völlige Lähmung, ständig Spontanbewegungen, Muskulatur nicht erschläft, auf Reiz stets Lagewechsel.		
34	15	1,0	4,07	11	" "	38 "				
6	12	2,0	8,13	6	1 Std. 39 Min.	2 Std. 34 Min.			† nach 1 Std. 5 Min. Erholung	
4	14	2,0	8,13	10	" "	1 " 52 "				
5	15	3,0	12,20	7	" "	3 Std. 22 Min.			" "	
7	14	3,0	12,20	4	1 Std. 5 Min.	2 " 30 "				
36	10	3,0	12,20	6	4 " 49 "	über 6 Std.			" "	Am nächsten Tag völlig normal.
40	12	3,0	12,20	6	" "	" "				
1	12	4,0	16,27	7	" "	" "	† in 32 Min. † in 1 Std. 17 Min.	Sehr tiefe Narkose. Auf ihrer Höhe über 5 Std. ohne jede Reflexerregbarkeit. Herzstillstand in Diastole.		
8	14	4,0	16,27	6	" "	" "				
29	28	4,0	16,27	5	" "	" "	Erholung	Herzmuskel auch auf Reiz keine Kontraktionen mehr.		
15	10	5,0	20,33	6	" "	" "				
35	19	5,0	20,33	6	18 Std. 48 Min.	24 Std.	Erholung	Hat sich erst am übernächsten Tag völlig erholt. Herzstillstand in Diastole.		
41	14	5,0	20,33	5	" "	" "				
2	13	6,0	24,40	6	" "	" "	† nach 48 Min. † nach 1 Std. 21 Min.	" " Systole.		
16	16	6,0	24,40	4	" "	" "				
20	12	6,0	24,40	3	" "	" "	† nach 1 " 24 " Erholung	" " Diastole.		
21	14	6,0	24,40	5	28 Std. 25 Min.	" "				
3	16	8,0	32,54	5	" "	" "	† in 42 Min.	Hat sich am übernächsten Tag völlig erholt. Herzstillstand in Diastole.		

Im einzelnen verlief ein Versuch folgendermaßen:

Versuch 6: Frosch ♂ 12 g.

11^h 30' 2,0 g MgSO₄ + 7 H₂O pro kg in d. Brustlymphsack = 0,096 ccm
25 proz. Lösung.

11^h 36' erträgt das Tier Rückenlage.

11^h 48' auf Kneifen der Schwimmhäute nur schwache Zuckung. Die Hinterbeine werden nicht an den Rumpf angezogen; ihre Muskulatur ist völlig erschlafft. Herzschlag sichtbar.

12^h 15' die reflektorischen Zuckungen auf Kneifen sind sehr schwach.

12^h 30' Reflexbewegungen beginnen deutlicher zu werden.

12^h 40' sehr lebhafte Reflexbewegungen.

1^h 15' auf starkes Kneifen erfolgt Lagewechsel.

2^h 10' Rückenlage wird nicht mehr ertragen. Erholung.

Es zeigt sich also, daß Gaben unter 1,0 g MgSO₄ + 7 H₂O nur ganz geringe toxische Erscheinungen hervorrufen; von dieser Gabe an werden Rückenlage, Lähmung, Erschlaffung der Muskulatur bei schlagendem Herzen beobachtet. Je größer die Dosis ist, desto schneller tritt die Vergiftung ein, um so schwerer ist sie, und um so langsamer erfolgt die Erholung. Bei 3,0, 4,0 und 5,0 g Magnesiumsulfat bleibt die Erholung manchmal aus, d. h. manche Tiere sterben bereits bei dieser Gabe. Mit 6,0 g ist die sicher tödliche Dosis erreicht.

2. Feststellung der wirksamen und tödlichen Gabe vom Calciumchlorid.

Tabelle II.

Versuch Nr.	Gew. des Frosches in g	Gabe pro kg Gewicht		Beginn der Wirkung	Dauer der Wirkung (d. h. wie lange wurde Rückenlage ertragen?)	Ausgang der Vergiftung	Bemerkungen
		in g	in Millimol				
a) CaCl ₂ + 6 H ₂ O in 2proz. Lösung.							
9	18	0,5	2,18	—	—	—	} Keinerlei Vergiftungserscheinungen.
10	14	1,0	4,57	—	—	—	
11	15	1,5	6,86	—	—	—	
12	17	2,0	9,14	—	—	—	
13	11	8,0	18,70	8 Min.	2 Std. 20 Min.	Erholung	
14	11	4,0	18,28	9 Min.	—	†	Wirkung länger als 3 Std. beobachtet, am nächsten Morgen † aufgefunden.
b) CaCl ₂ + 6 H ₂ O in 4proz. Lösung.							
37	12	2,0	9,14	2 Std. 58 Min.	30 Min.	Erholung	} Hat sich bis zum nächsten Tag erholt, vermag aber nur auf Reiz die Lage zu wechseln.
38	12	8,0	18,70	2 Std. 5 Min.	länger a. 8 Std.	"	
39	18	4,0	18,28	2 Std. 18 Min.	3 Std. 40 Min.	"	
c) CaCl ₂ + 6 H ₂ O in 10proz. Lösung.							
78	36	2,0	9,14	40 Min.	1 Std. 15 Min.	Erholung	} Herzstillstand in Systole.
74	28	8,0	18,70	4 Min.	über 3 Tage	"	
60	20	4,0	18,28	8 Min.	—	+ n. 1 Std. 37 Min.	
61	14	5,0	27,40	3 Min.	—	+ n. 1 Std. 35 Min.	

Bei diesen Versuchen mußte die wirksame Substanz in verschiedenen Konzentrationen dargereicht werden. Die für den Frosch isotonische Lösung von Calciumchlorid enthält 1,5% CaCl_2 . Bei diesem niedrigen Kalkgehalt hätten den Tieren so große Wassermengen zugemutet werden müssen, daß dadurch eine Schädigung des Organismus möglich gewesen wäre. Aus diesem Grunde wurden 2,4 und 10proz. Lösungen verwendet. Es ist kaum ein Zweifel, daß die Konzentration einen gewissen Einfluß auf die Giftwirkung ausübt. Während 2,0 g Calciumchlorid in 2proz. Lösung fast jeden Einfluß vermissen ließ, erwiesen sich die gleichen Gaben in 4proz. und 10proz. Lösung schon wirksam, um ein Vergiftungsbild mit schweren Lähmungserscheinungen hervorzurufen. Auch in der Schnelligkeit der Resorption zeigten sich bei den verschiedenen Konzentrationen Unterschiede, die aber hier nicht in Betracht kommen.

Die beobachteten Erscheinungen bestanden in einer allmählich eintretenden Lähmung. Nach Verabreichung der tödlichen Gabe von 4,0 g ($\text{CaCl}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$) wurde das Herz in systolischem Stillstand gefunden.

8. Antagonistische Versuche Magnesium — Calcium.

Zuerst wurde untersucht, inwieweit es durch vorherige Einspritzung von Calciumchlorid gelingt, die Tiere gegen die Giftwirkung des Magnesiums zu schützen:

Protokollbeispiel.

Versuch 30: Frosch ♂ 14 g.

1^h 45' 2,0 g $\text{CaCl}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$ pro kg in dem Brustlymphsack = 0,7 ccm der 4proz. Lösung.

2^h 15' sichtbare Erscheinungen einer Kalkwirkung bisher nicht zu verzeichnen. Erhält jetzt 2,0 g $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$ pro kg in dem Rückenlymphsack = 0,112 ccm der 25proz. Lösung.

2^h 17' Lagewechsel nur auf Reiz.

2^h 19' „ wieder spontan. Das Tier kriecht und springt.

2^h 25' „ nur auf Reiz. Muskulatur nicht erschlafft.

3^h 30' „ nur auf leichten Reiz.

5^h 45' „ noch nicht spontan; auf Reiz sofort.

9^h 30' „ vormittags des nächsten Tages: Es ist völlige Er-

holung eingetreten.

Versuch 72: Frosch ♂ 21 g.

4^h 08' 6,0 g $\text{CaCl}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$ pro kg in dem Brustlymphsack = 1,26 ccm der 10proz. Lösung.

Tabelle III.

Versuch Nummer	Gewicht des Frosches in g		CaCl ₂ +6H ₂ O, 4% pro kg Gewicht		MgSO ₄ +7H ₂ O 25% pro kg Gew.		Zeit zwischen Injektionen in Min.	Zeit bis zum Eintritt der Mg-Wirkung		Dauer der Wirkung		Ausgang des Versuches
	in g	in Millimol	in g	in Millimol	in g	in Millimol		a) Lagewechsel nur noch auf Reiz	b) Lagewechsel überhaupt unmöglich	a) Lagewechsel auf Reiz wieder mögl.	b) Spont. Lagewechsel möglich	
30	14	2,0	9,14	2,0	8,13	30	2 Min.	10 Min.	1 Std. 5 M.	—	Erholung	
25	19	2,0	9,14	4,0	16,27	61	unmittelbar	20 "	länger als 1 1/2 Std.	—	Erholung am nächsten Tage völlig.	
26	14	2,0	9,14	4,0	16,27	66	"	14 "	10 Min.	35 Min.	Erholung	
27	11	2,0	9,14	4,0	16,27	34	fast "	7 "	länger als 2 Std.	—	"	
28	14	2,0	9,14	4,0	16,27	38	12 Min.	24 "	"	2 "	"	
18	12	2,0	9,14	6,0	24,40	60	unmittelbar	unmittelbar	—	—	† nach 1 Std. 20 Min. Herzstillstand in Diastole.	
19	14	2,0 (2%)	9,14	6,0	24,40	60	unmittelbar	10 Min.	länger als 24 Std.	—	† am 3. Tag nach der Injekt. Herzstillstand in Diastole.	
71	24	4,0 (10%)	18,28	4,0	16,27	7	8 Min.	15 "	"	12 "	Sehr langsame Erholung.	
72	21	6,0 (10%)	27,40	6,0	24,40	4	unmittelbar	1 "	—	—	† nach 1 Std. 3 Min. Herzstillstand in Diastole.	

4^h 12' bisher keine Kalkwirkung. Es wird jetzt injiziert: 6,0 g MgSO₄ + 7 H₂O pro kg in den Rückenlymphsack = 0,804 ccm der 25 proz. Lösung.

4^h 13' erträgt Rückenlage; auch auf Reiz kein Lagewechsel.

4^h 25' reagiert auf Reize noch lebhaft. Hinterpfoten werden an den Rumpf angezogen gehalten.

4^h 40' Bewegungen auf Reize sind schwächer geworden.

4^h 55' auf Kneifen nur ganz schwache Zuckung

5^h 05' reaktionslos. Tod. Herz steht in Diastole still, kontrahiert sich auf Reiz noch einige Male.

Prophylaktische Darreichung von Calciumchlorid bewirkte also eine gewisse Abschwächung der Giftwirkung kleiner und mittlerer Gaben von Magnesiumsulfat. Es kam bei 2,0 g MgSO₄ + 7 H₂O pro kg Gewicht nicht, wie gewöhnlich, zu Ausbildung eines vollständigen Lähmungszustandes. Zwar ging die Fähigkeit zu spontanem Lagewechsel für etwa 1 Std. verloren, doch war das Tier fähig, sich auf leichten Reiz umzulegen; ebenso wurde die Erschlaffung der Muskulatur vermißt. In einem anderen Fall (Versuch 26, s. Tabelle III) gelang es, die Wirkung von 4,0 g Magnesiumsulfat auf 35 Min. zu beschränken, während sie ohne Kalk etwa 6 Std. und darüber hätte dauern müssen. Indessen wurde dieser auffallende Erfolg in keinem anderen Versuch mehr erzielt. Eine Entgiftung der tödlichen Magnesiumgabe wurde niemals erreicht. Nach 6,0 g Magnesiumsulfat trat der Tod stets ein, als wäre gar kein Calciumchlorid gegeben worden.

In weiteren Versuchen wurde die kurative Wirkung des Calciumions bei schon bestehender Magnesiumsulfatvergiftung untersucht. Durch Injektionen einer 25 proz MgSO₄ + 7 H₂O-Lösung in den Brustlymphsack wurden die Frösche in den bekannten Lähmungszustand versetzt. Nach verschieden langer Zeit erhielten sie dann entweder in den Rücken- oder in den Schenkellymphsack Calciumchlorid eingespritzt, das meist in 4 proz., bei manchen Versuchen in 10 proz. Lösung gebraucht wurde. Dabei wurden die verschiedensten Mengenverhältnisse der beiden Substanzen in ihrer Wechselwirkung untersucht.

Protokollbeispiele.

Versuch 31: Frosch ♂ 15 g.

1^h 40' 2,0 g MgSO₄ + 7 H₂O pro kg in den Brustlymphsack = 0,12 ccm der 25 proz. Lösung.

Tabelle IV.

Versuch Nr.	Gewicht des Frosches in g	MgSO ₄ + 7 H ₂ O pro kg Gewicht (25%)		CaCl ₂ + 6 H ₂ O pro kg Gewicht		Zeit zwischen beiden Injek- tionen	Zeit bis Eintritt der antagonistischen Wirkung	Ausgang des Versuches
		in g	in Milli- mol	in g	in Milli- mol			
31	15	2,0	8,13	2,0	9,14	21 Min.	a) 2 b) 2 Min.	Erholung " " " "
32	12	2,0	8,13	2,0	9,14	1 Std. 3 Min.	—	
46	31	2,0	8,13	2,0	9,14	1 " 5 "	1 Std. 49 Min.	
48	37	2,0	8,13	2,0	9,14	51 Min.	1	Bei Rückenlage stets lebhaftere Bewe- gung, aber kein Lagewechsel
47	33	2,0	8,13	3,0	13,70	1 Std. 31 Min.	2	
23	24	4,0	16,27	2,0	9,14	11 Min.	14	Bei Rückenlage stets lebhaftere Bewe- gung, aber kein Lagewechsel
24	11	4,0	16,27	2,0	9,14	12 "	13	
66	21	4,0	16,27	4,0	18,28	14 "	9	Bei Rückenlage stets lebhaftere Bewe- gung, aber kein Lagewechsel
67	17	4,0	16,27	4,0	18,28	23 "	5	
68	19	4,0	16,27	6,0	27,40	35 "	—	hat länger als 5/4 Std. nach der Kalkgabe gelebt.
17	17	6,0	24,40	2,35 (2%)	10,73	30 "	—	
22	15	6,0	24,40	2,0	9,14	12 "	15	der Kalkgabe gelebt.
69	13	6,0	24,40	4,0	18,28	1 Std. 5 Min.	—	
49	18	6,0	24,40	6,0	27,40	13 Min.	2	5 Std. 20 Min. nach der Kalkgabe.
56	17	6,0	24,40	6,0	27,40	35 "	5	

1^h 45' erträgt Rückenlage. Auf Kneifen lebhaft Bewegungen, aber kein Lagewechsel.

1^h 48' reagiert auf Reiz viel schwächer. Muskulatur erschlafft.

2^h 01' Auf Kneifen nur schwache Zuckung. Erhält jetzt:

0,05 g $\text{CaCl}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$ in 4proz. Lösung pro kg in den Rückenlymphsack = 0,75 ccm.

2^h 03' macht Spontanbewegungen. Auf Reiz Lagewechsel.

2^h 05' Spontaner Lagewechsel. Kriecht und wird munter.

2^h 08' ist völlig normal. Klettert an der Wand des Glases hoch.

Versuch 32: Frosch ♂ 12 g.

1^h 42' 2,0 g $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$ in 25proz. Lösung pro kg in dem Brustlymphsack = 0,086 ccm.

1^h 48' Nur auf Reiz Lagewechsel.

1^h 55' Auch Reiz bewirkt keinen Lagewechsel mehr.

2^h 05' Auf Kneifen deutliche Bewegungen.

2^h 25' Nur ganz schwache Zuckung auf Kneifen. Muskulatur erschlafft.

2^h 45' Hochgradige Lähmung. Erhält jetzt: 2,0 g $\text{CaCl}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$ in 4proz. Lösung pro kg in dem Rückenlymphsack = 0,6 ccm.

2^h 47' Spontanbewegungen.

2^h 48' Spontaner Lagewechsel. Hinterbeine werden an den Rumpf angezogen, kriecht und springt.

3^h 05' Das Tier ist ganz munter, nur etwas leicht ermüdbar. So gelingt Lagewechsel nur 2–3 mal hintereinander, um dann auszubleiben. Auf leichten Reiz ist er jedoch stets sofort zu erzielen.

Diese prompte Entgiftung der Magnesiumwirkung durch das Calciumion wurde in einigen Versuchen auch für den peripheren Angriffspunkt des Magnesiums besonders nachgewiesen. Dabei wurde so vorgegangen, daß zunächst Frösche durch Injektionen von 2,0 g $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$ pro kg in einen Lymphsack vergiftet wurden. Sobald die Lähmung sich entwickelt hatte, wurde der eine der beiden N. ischiadici freigelegt, durchtrennt und auf seine Erregbarkeit durch den faradischen Strom geprüft. Dann erhielt das Tier in einen anderen Lymphsack 2,0 g $\text{CaCl}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$ pro kg und kurz darauf wurde der zweite N. ischiadicus präpariert und faradisch gereizt. Der verschiedene Rollenabstand der primären und sekundären Spule des du Bois-Reymondschen Schlittenapparats, bei dem tetanische Zuckungen auftraten, war bei dieser Versuchsanordnung der Maßstab für die eingetretene Entgiftung. Eine Übersicht der Ergebnisse gibt nachstehende Zusammenstellung:

Tabelle V.

Versuch Nr.	Gewicht des Frosches in g	Erhält pro kg Gewicht				Faradische Erregbarkeit bis zum Tetanus				Bemerkungen
		MgSO ₄ + 7 H ₂ O (25 Proz.)		CaCl ₂ + 6 H ₂ O (4 Proz.)		I. Während der Mg.-Lähmung		II. Nach d. Entgiftung durch Ca		
		in g	in Milli-mol	in g	in Milli-mol	a) indirekt	b) direkt	a) indirekt	b) direkt	
						R. A. in cm	R. A. in cm	R. A. in cm	R. A. in cm	
42	81	2,0	8,18	2,0	9,14	19	13	85	14	Während der Lähmung sind unvollkommene Zuckungen zu erzielen.
43	26	2,0	8,18	2,0	9,14	20	9	85	10	
44	23	2,0	8,18	2,0	9,14	24	7	88,7	9,8	
45	25	2,0	8,18	2,0	9,14	20,5	8,5	30,5	10	

Die entgiftende Kalkwirkung war also auch am Kaltblüter in der Dosierung von 2,0 g Calciumchlorid gegen 2,0 g Magnesiumsulfat pro kg Tier eine außerordentlich sichere, obschon das Calciumchlorid nicht, wie es beim Warmblüter möglich ist, unmittelbar ins Blut, sondern in einen Lymphsack gegeben wurde, also erst noch resorbiert werden mußte. Die Zeit, die bis zur Kalkdarreichung verstrich, war ohne größeren Einfluß auf diesen Antagonismus, denn die Wirkung ließ sich ebenso rasch und vollständig auf der Höhe der Magnesiumlähmung erzielen, wie gleich zu Beginn der Vergiftung. Binnen weniger Minuten war, sowohl eine halbe Stunde wie eine Stunde nach der Magnesiumsulfatinjektion, das Calciumchlorid als Gegengift wirksam. Steigerung der Kalkgabe auf 3,0 g pro kg hatte 1 ½ Stunde nach der Magnesiumdarreichung keinen so sicheren Erfolg. Zwar trat auch in diesem Falle schon 2 Minuten später unverkennbar eine Besserung ein, doch kehrte die Fähigkeit zu spontanem Lagewechsel trotz stundenlanger Beobachtung nicht zurück.

Sehr auffallend waren die Erscheinungen, wenn versucht wurde, mittlere Dosen Magnesiumsulfats (4,0 g pro kg), die an sich nicht tödlich waren, zu entgiften. Wie hierbei auch die Kalkmenge gewählt wurde, immer kam es nur zu einer vorübergehenden Besserung; diese hielt etwa 15—20 Minuten an. Dann nahmen die Lähmungserscheinungen wieder an Tiefe zu, und schließlich starb das Tier. An Stelle einer antagonistischen Wirkung des Calciumions zeigte sich also quoad vitam eine synergistische.

Entsprechend dieser Tatsache war es auch unmöglich, die tödliche Magnesiumsulfatdosis zu entgiften. Eine beginnende Besserung wurde auch in diesem Versuche stets erreicht und der Eintritt des tödlichen Ausgangs hinausgezögert, wenn große Mengen Calciumchlorid gegeben wurden. Während 6,0 g Magnesiumsulfat allein in etwa $1\frac{1}{2}$ Stunden tödlich wirkten, trat in Verbindung mit 6,0 g Calciumchlorid das Ende in einem Falle erst nach 5 Stunden ein. Kombination kleiner Kalkgaben (2,0 g pro kg) mit der tödlichen Magnesiumdosis schienen dagegen den Tod zu beschleunigen.

Zur Demonstration des Antagonismus der Calciumionen gegenüber den Magnesiumionen ist also auch der Kaltblüter durch-

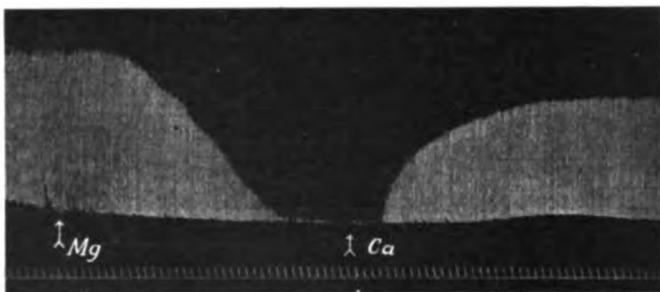


Abb. 1. Aufhebung der Magnesiumlähmung in der Peripherie durch Kalk bei rhythmischer Reizung des *M. gastrocnemius* vom *N. ischiadicus* aus (*R. fusca*).

aus geeignet. Ein Vorlesungsversuch wäre etwa so einzurichten, daß man zu Beginn der Vorlesung einem Frosch pro kg seines Gewichtes $2,0\text{ g MgSO}_4 + 7\text{ H}_2\text{O}$ in 25proz. Lösung in den Brustlymphsack injiziert. Wenn sich dann in etwa 20–30 Minuten ein tiefer Lähmungszustand ausgebildet hat, spritzt man pro kg Gewicht $2,0\text{ g CaCl}_2 + 6\text{ H}_2\text{O}$ in 4proz. Lösung in den Rückenlymphsack. Binnen 2–3 Minuten wird dann der Entgiftungsvorgang vor sich gehen, und vor den Augen der Hörer wird die völlige Wiederherstellung des Versuchstieres eintreten.

Die Tatsache, daß auch die peripheren Wirkungen der Magnesiumionen durch Kalkzufuhr so rasch rückgängig gemacht werden, erlaubt die graphische Darstellung dieses Vorganges. Vorstehende Kurve ist das Ergebnis folgenden Versuches:

Ein Frosch von etwa 30 g wird mit 50–100 mg Urethan narkotisiert. Unter Schonung der Aorta und A. iliaca wird ein *N. ischiadicus* freigelegt, mit

einem Faden angeschlungen und möglichst hoch oben durchtrennt. Sodann wird die Sehne des *M. gastrocnemius* des entsprechenden Unterschenkels präpariert, von ihrer Insertion abgetrennt und mit einem kurzen Fädchen, das an dem anderen Ende eine Schlinge trägt, versehen. Der so vorbereitete und auf ein Brettchen aufgespannte Frosch wird dann mit einem Tigerstedtschen Muskelschreiber in Verbindung gebracht, der mit 10facher Vergrößerung schreibt. Der Schreibhebel ist mit 6,0 g belastet. Der *N. ischiadicus* wird über 2 Elektroden gelegt, die ihm alle fünf Sekunden einen Schließungsschlag der sekundären Spule eines du Bois-Reymondschen Schlittenapparates bei einem Rollenabstand von 24 cm zuführen. Diese rhythmische Unterbrechung des Primärstromes und die gleichzeitige Abblendung des Öffnungsinduktionsschlages geschieht mit einem Apparat der nach dem Prinzip von Ludwig - Hüfler konstruiert ist. Bei der Kurve werden nun zunächst einige Zuckungen des unvergifteten Muskels aufgeschrieben, dann werden in einen Lymphsack pro kg Gewicht 2,0 g $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$ in 25 proz. Lösung injiziert. Das allmähliche Absinken der Kurve zeigt bald die Abnahme der indirekten Erregbarkeit an. Nachdem diese auf Null gesunken ist, erhält das Tier wieder in einen Lymphsack 2,0 g $\text{CaCl}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$. Die Wirkung macht sich bald bemerkbar, und mit der Erholung des Nerven steigt auch die Kurve wieder an.

Amnur leicht urethanisierten Frosch sind vereinzelte Spontanzuckungen kaum auszuschalten, so daß die Gleichmäßigkeit der Kurve dadurch beeinträchtigt werden kann. Noch viel mehr ist das der Fall, wenn der Versuch an einem nicht betäubten Tier vorgenommen wird. Es gelingt dann nicht, eine schöne Darstellung der Magnesiumwirkung zu erhalten. Wohl aber läßt sich an dem bereits magnesiumvergifteten Tier die Wiederherstellung der indirekten Muskeleerregbarkeit durch Calciumchlorid zeigen.

Die Ergebnisse lassen sich kurz wie folgt zusammenfassen:

1. Der Antagonismus zwischen dem Calcium- und Magnesiumion ist bei Injektion in die Lymphsäcke beider Mittel am Kaltblüter leicht nachweisbar.

2. Durch prophylaktische Kalkdarreichung läßt sich durch 2,0 g $\text{CaCl}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$ pro kg eine Abschwächung der wirksamen Magnesiumgabe, und ein Hinauszögern des Todes bei der tödlichen Magnesiumdosis erzielen.

3. Kurativ tritt sowohl zu Beginn wie auch auf der Höhe der Magnesiumwirkung binnen einiger Minuten vollständige „Entgiftung“ niedriger Magnesiumsulfatdosen durch geringe Calciumchloridgaben ein.

4. Mittlere Magnesiumsulfatgaben können durch Kalkzufuhr nur in geringem Maße antagonistisch beeinflußt werden. Im Gegenteil zeigt sich hier quoad vitam eine synergistische Wirkung, so daß nicht tödliche Magnesiummengen schon durch die eben

wirksame Calciumchloridgabe nach einer kurzen vorübergehenden Besserung tödlich werden.

5. Eine Entgiftung der tödlichen Magnesiumsulfatdosis ist in keinem Fall möglich. Es kommt nur zu einer vorübergehenden Besserung und zu einer Verzögerung der Wirkung.

6. Auch die Entgiftung der Magnesiumwirkung in der Peripherie erfolgt sehr prompt durch Zufuhr von Calciumchlorid.

7. Zur Demonstration dieses Antagonismus eignet sich am besten die Dosierung von 2,0 g $MgSO_4 + 7 H_2O$ in 25 proz. Lösung und 2,0 g $CaCl_2 + 6 H_2O$ in 4 proz. Lösung pro kg Gewicht des Versuchstieres.

8. Auch die graphische Darstellung der peripheren Giftwirkung des Magnesiumions und der Gegenwirkung des Calciumions eignet sich zur Demonstration.

B. Antagonismus Bariumchlorid — Natriumsulfat.

In gleicher Weise wie das antagonistische Verhalten von Magnesium und Calcium wird die Wechselwirkung Bariumchlorid und Natriumsulfat quantitativ an *R. fusca* untersucht.

1. Feststellung der toxischen und tödlichen Gaben von Bariumchlorid.

Es wurden 2 proz. und 4 proz. Lösungen des Salzes ($BaCl_2 + 2 H_2O$) in den Brustlymphsack injiziert. 1,9 proz. Lösungen sind blutisotonisch; aber auch die 4 proz. Lösung wurde anstandslos vertragen.

Die Barytsalze machen beim Frosch ein typisches Vergiftungsbild, wie es auch schon von R. Boehm geschildert worden ist. Anfangs treten nach einer schnell vorübergehenden Unruhe, die vielleicht der Einspritzung als solcher zur Last zu legen ist, Muskelzuckungen auf, denen sehr schnell eigenartige Krampferscheinungen folgen. Die Vorderglieder sind in tonischem Krampfe seitwärts ausgestreckt. Die Oberschenkel sind abduziert und bilden mit der Längsachse des Körpers fast einen Winkel von 90° . Bei gewissen Gaben des Bariumchlorids kommt es zu kurz dauernden Streckkrämpfen, die reflektorisch ausgelöst werden, manchmal auch scheinbar spontan auftreten. Zeitweise geben die vergifteten Tiere eigenartige Schreie von sich, oder die Luft wird mit einem eigenartigen Geräusch ausgestoßen.

Tabelle VI.

Versuch Nr.	Geschlecht des Frosches	in Gewicht des Frosches in g	Dosis der verabfolgten BaCl ₂ + 2 H ₂ O			Bemerkungen	Tod eingetreten nach
			pro kg in g	Menge der Lösung in ccm	in Milli- mol pro kg		
1	♀	22	2,0	2,2 (2%)	8,2	Nach 22 Min. typische Beinstellung. Nach 41 Min. vollkommenes Ertragen der Rückenlage, gleichzeitig Streckkrämpfe.	2 Std. 7 Min.
2	♀	29	2,0	1,45 (4%)	8,2	Nach 6 Min. Streckkrämpfe. Nach 9 Min. vollkommenes Ertragen der Rückenlage. Nach 20 Min. typische Vergiftungsstellung.	2 Std. 40 Min.
3	♂	25	1,6	2,0 (2%)	6,56	Nach 18 Min. Ertragen der Rückenlage. Nach 3 Std. 15 Min. vollständige Lähmung.	6 Std. 7 Min.
4	♀	24	1,5	0,9 (4%)	6,1	Nach 17 Min. typische Stellung. Nach 19 Min. Ertragen der Rückenlage.	18 Std. 21 Min.
5	♂	20	1,0	1,0 (2%)	4,1	Nach 32 Min. typische Stellung. Nach 44 Min. Ertragen der Rückenlage. Nach 6 Std. 44 Min. vollkommen reaktionslos.	8 Std. 29 Min.
6	♀	31	1,0	1,6 (4%)	4,1	Nach 18 Min. typische Stellung und Ertragen der Rückenlage. Nach 39 Min. Streckkrämpfe, die 45 Min. anhalten.	14 Std. 25 Min.
7	♂	34	1,0	1,7 (2%)	4,1	Nach 44 Min. Ertragen der Rückenlage. Nach 49 Min. typische Stellung. Nach 1 Std. 17 Min. Streckkrämpfe.	11 Std. 24 Min.
8	♀	18	0,75	0,68 (2%)	3,07	Nach 20 Min. Muskelsuckungen. Nach 1 Std. 48 Min. Ertragen der Rückenlage. Nach 24 Std. völlig reaktionslos. Nach 40 Std. etwas erholt.	4 Tagen 2 Std.
9	♀	25	0,75	0,94 (4%)	3,07	Nach 26 Min. Ertragen der Rückenlage. Vom 3. Tage an deutliches Schreien.	am 10. Tag
10	♂	35	0,5	0,88 (2%)	2,05	Nach 8 Min. Muskelsuckungen. Nach 40 Min. Ertragen der Rückenlage. Nach 60 Min. spontane Umdrehung aus der Rückenlage. Nach 1 Std. 30 Min. Schreien. Nach 23 Std. springt wieder leidlich gut.	29 Std. 15 Min.
11	♀	23	0,5	0,58 (2%)	2,05	Nach 26 Min. typische Stellung. Schreit vom 2. Tage an. Am 1. Tag wird Rückenlage unvollkommen ertragen. Am 11. Tag völlige Erholung.	—
12	♂	23	0,25	0,29 (2%)	1,02	Am 1. Tag nach 20 Min. Schreien und Muskelsucken. Zu weiteren Vergiftungserscheinungen, außer einer gewissen Erhöhung der Reflexerregbarkeit kam es nicht.	—
13	♀	17	0,25	0,21 (4%)	1,02	Am 1. Tag Übererregbarkeit, Schreie, Mattigkeit. Am 2. Tag ein Schrei, Muskelsuckungen (gering). Vom 6. Tag an außer geringer Übererregbarkeit keine besonderen Erscheinungen.	—

Den Krampfständen sind schon anfangs gewisse Lähmungserscheinungen zugesellt, die allmählich immer mehr das Vergiftungsbild beherrschen. Der Tod erfolgt durch Lähmung und diastolischen Herzstillstand. Die Lähmung ist zentral bedingt, da Muskel und Nerv auch nach dem Herzstillstand regelrechte Erregbarkeit fast immer bewahrt haben. Die sichere Dosis letalis ist 1,0 g Barium chloratum pro kg Frosch, doch tritt bei dieser der Tod erst nach Verlauf von etwa 12—24 Stunden ein. 2,0 g BaCl_2 pro kg Frosch töten dagegen nach 2 Stunden.

2. Feststellung der Wirkung des Natriumsulfats.

Auch Natriumsulfat mußte in stark hypertotonischer, 10 proz. Lösung gegeben werden, um eine Überschwemmung des Froschorganismus mit Wasser zu vermeiden. Auch hier waren Gewebeschädigungen durch die hypertotonische Salzlösung nicht zu beobachten, obwohl doch eine $4\frac{1}{2}$ mal stärkere als die isotonische Lösung zur Verwendung kam; denn die isotonische Natriumsulfatlösung hat einen Gehalt von 2,2 proz. Na_2SO_4 . Die Injektionen wurden intraperitoneal gemacht, damit es bei den Entgiftungsversuchen von vornherein ausgeschlossen war, daß die Lösungen von Bariumchlorid und Natriumsulfat schon am Ort der Injektion eine gegenseitige Umsetzung erführen, die eine Resorption des Giftes überhaupt hindern würde. Eine sichtbare Wirkung des Natriumsulfats auf das Verhalten der Frösche war nicht festzustellen.

3. Wechselwirkung von Natriumsulfat und Bariumchlorid.

a) Prophylaktische Einspritzung des Natriumsulfats.

Es ergibt sich also, daß die prophylaktische Einspritzung von Natriumsulfat mindestens die Wirkung der doppelten tödlichen Dosis des BaCl_2 aufheben kann, und zwar so, daß die Frösche überhaupt kaum irgendwelche erheblicheren Vergiftungserscheinungen aufweisen, mit Ausnahme einer gewissen Erhöhung der Reflexerregbarkeit und vorübergehenden Anfängen von Lähmungserscheinungen in einzelnen Fällen. Jedoch ist nur dann der Entgiftungsversuch von Erfolg begleitet, wenn Natriumsulfat in ausreichender Menge verabfolgt wird. Die der doppelten tödlichen Gabe von Bariumchlorid äquivalente Menge Natriumsulfat entgiftet vollkommen, dagegen ist die Hälfte unwirksam; das Tier stirbt, wenn auch erst nach längerer Zeit.

Tabelle VII.

Versuch Nr.	Geschlecht des Frosches		Gewicht des Frosches in g		Menge des 10proz. Na ₂ SO ₄ + 10 H ₂ O			Menge des BaCl ₂ + 2 H ₂ O pro kg Gewicht		Zeit, nach der BaCl ₂ injiziert wurde in Min.	Bemerkungen	Tod
	in ccm	pro kg in g	in Milli-mol pro kg	in g	in g	in Milli-mol pro kg						
						in g	in Milli-mol pro kg					
17	1		3,0	9,30	1,0	4,1	30	18 Min. nach Giftnjektion Muskelzuckungen. Am 1. Tag Mattigkeit, Übererregbarkeit, geringe Abduktionshaltung der Beine. Vom 2. Tag an keine besonderen Erscheinungen. Nach 45 Min. Muskelzuckungen, Mattigkeit, Übererregbarkeit, geringe Abduktionshaltung der Beine. Vom 3. Tag an völlig normales Verhalten. Am 1. und 2. Tag Muskelzuckungen, sonst keine besonderen Erscheinungen. Bis zum 4. Tag einschließlich mäßige Übererregbarkeit, sonst keine besonderen Erscheinungen. Am 2. Tag Übererregbarkeit und Muskelzuckungen im geringen Grade. Vom 3. Tag an keine krankhaften Erscheinungen mehr. Nach 45 Min. nach der Giftnjektion Muskelzuckungen. Nach 5 Std. 40 Min. Schreie. 5 Tage noch geringe Abduktionshaltung der Beine, sonst vom 4. Tage an außer geringer Übererregbarkeit nichts Bemerkenswertes.	bis z. Morgen des 3. Tages eingetreten			
18	1	♂	3,3	10,24	1,0	4,1	30	Nach 44 Min. Muskelzuckungen und typische Bein- stellung. Am 3. Tag nur noch Übererregbarkeit. 14 Min. nach der Giftnjektion Ertragen der Rücken- lage. Nach 20 Min. typische Bein- stellung und Muskelzuckungen.				
19	1	♂	5,5	17,00	1,5	6,1	30					
20	1	♀	4,0	12,40	1,5	6,1	30					
21	1	♂	5,5	17,00	2,0	8,2	30					
22	1	♀	3,2	10,00	2,0	8,2	30					
23	0,28	♂	1,33	4,10	1,0	4,1	30					
24	0,19	♀	0,68	2,10	1,0	4,1	30					

b) Kurative Wirkung des Natriumsulfats.

Tabelle VIII.

Versuch Nr.	Geschlecht des Frosches	Gewicht in g des Frosches	Dosis des $\text{BaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$		Zeit nach der 1 ccm Na_2SO_4 injiziert wurde in Min.	Bemerkungen
			pro kg Gewicht in g	in Millimol		
25	♂	15	1,0	4,1	10	9 Min. nach der Gifteinjektion: beginnt typische Haltung anzunehmen. Nach 14 Min. Muskelsuckungen. Nach 26 Min. vorübergehendes Ertragen der Rückenlage. 38 Min. nach der Entgiftung leidlich erholt. Vom 2. Tage an außer zunächst noch geringer Übererregbarkeit keine Erscheinungen.
26	♀	22	1,0	4,1	10	9 Min. nach Gifteinjektion Ertragen der Rückenlage. 56 Min. nach Entgiftung, erträgt Rückenlage nicht mehr. 5 Std. 22 Min. ziemlich vollständige Erholung. bleibt ohne nennenswerte Erscheinungen außer Schwäche in den Armen 5 Tage.
27	♂	16	1,0	4,1	10	9 Min. nach Gifteinjektion kurze Zeit Ertragen der Rückenlage. 34 Min. nach Gifteinjektion, trotz inzwischen erfolgter Entgiftung, Rückenlage. 54 Min. nach Entgiftung wird Rückenlage nicht mehr ertragen. Von da an bis einschließlich 2. Tag erhöhte Reflexerregbarkeit. Sonst keine Erscheinungen.
28	♂	12	1,0	4,1	30	12 Min. nach Gifteinjektion wird jede Lage ertragen, reagiert nach 20 Min. nur noch mit Zehenbewegung. 25 Min. nach Entgiftung wieder bessere Reaktion. 4 Std. 42 Min. nach Entgiftung vorübergehendes Umdrehen aus Rückenlage. Am 2. Tag gutes und schnelles Umdrehen aus Rückenlage.
29	♀	29	1,0	4,1	30	6 Min. nach Gifteinjektion Ertragen der Rückenlage. 12 Min. nach Gifteinjektion typische Vergiftungstellung 8 Std. 45 Min. nach der Entgiftung, dreht sich aus Rückenlage um. Am 6. Tage ist er noch am Leben.
30	♀	21	1,0	4,1	60	30 Min. nach Gifteinjektion Ertragen der Rückenlage. 52 Min. nach Gifteinjektion Streckkrämpfe. Entgiftung hat keine Wirkung gezeigt.
31	♀	30	1,0	4,1	60	15 Min. nach Gifteinjektion Ertragen der Rückenlage. 35 Min. nach Gifteinjektion, reagiert nur noch wenig.
32	♀	22	2,0	8,2	10	12 Min. nach Gifteinjektion (2 Min. nach Entgiftung) Muskelzuckungen und Übererregbarkeit am 1. Tag, sonst keine krankhaften Erscheinungen.
33	♀	31	2,0	8,2	30	17 Min. nach Gifteinjektion Ertragen der Rückenlage. 19 Min. nach Gifteinjektion typische Beinstellung. Am Nachmittag des 1. Tages etwas erholt und erholt sich weiter, so daß am 4. Tage Umdrehen aus Rückenlage. Am 6. Tage lebt er noch.
34	♂	27	2,0	8,2	60	Nach 27 Min. typische Beinstellung. Nach 48 Min. Streckkrämpfe.

Es ergibt sich also, daß die sichere tödliche Dosis von 1,0 g Bariumchlorid pro kg Körpergewicht des Frosches, aber auch das Doppelte der tödlichen Gabe (2,0 g) durch nachher verabreichtes Natriumsulfat entgiftet werden kann. Mit einiger Sicherheit gelingt die Entgiftung, wenn die kurative Behandlung mit Natriumsulfat nach 10 Minuten einsetzt. Findet die Natriumsulfatinjektion

½ Stunde nach Verabreichung des Bariumchlorids statt, so können die Frösche auch am Leben bleiben, jedoch gehen typische Vergiftungserscheinungen erst nach mehreren Tagen zurück, wobei aber die Frösche eine gewisse Mattigkeit für längere Zeit zurückbehalten. Findet die Einspritzung des therapeutischen Agens 60 Minuten nach der Giftzufuhr statt, so scheint die Überlebenszeit vielleicht etwas verlängert zu werden, eine Rettung des Tieres ist aber nicht mehr möglich.

Der chemische Mechanismus der Entgiftung ist zweifellos der gleiche wie bei der Umsetzung beider Agenzien *in vitro*, die sich nach der Formel: $\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{BaCl}_2 = \text{BaSO}_4 + 2 \text{NaCl}$ vollzieht. Dieser Vorgang spielt sich zunächst nicht an der Stelle der Injektion des Giftes und Gegengiftes ab, denn das Natriumsulfat wurde intraperitoneal, das Bariumchlorid in den Brustlymphsack des Frosches eingespritzt.

Zur Erklärung für die Tatsache, daß die Entgiftung des Bariumions durch die nachträgliche (kurative) Darreichung des Sulfats zeitlich beschränkt ist, muß man annehmen, daß das Bariumchlorid, das einmal in den Körperzellen fixiert oder in ihnen wirksam gewesen ist, von dem Natriumsulfat nicht mehr rechtzeitig erreicht wird. Mit anderen Worten: Entweder läßt sich die Bindung Bariumion-Körperzelle durch Natriumsulfat nicht im Sinne der Reversibilität beeinflussen oder das Barium hat Schädigungen gesetzt, die auch nach Fortfall des Bariums die Zelle irreversibel verändert haben. Der experimentellen Untersuchung ist diese Frage am Warmblüter zugänglich. Es ergibt sich weiterhin, daß sich die Umsetzung aus Bariumsulfat in den Flüssigkeiten des Körpers, also im wesentlichen im Lymph- und Blutstrom vollzieht und nicht in den Zellen des Organismus.

Der Antagonismus zwischen dem Bariumion und Sulfation ist deshalb nicht ohne Interesse, weil er ein vollständiges Analogon zu der spezifischen Entgiftung des Diphtherietoxins und Antitoxins bildet. Hier wie dort kann nur das noch nicht in die Zellen eingedrungene oder noch nicht zur Wirkung gelangte Gift von dem antitoxischen Agens erfaßt werden. In beiden Fällen ist also die prophylaktische Darreichung des „Gegengiftes“ mit Sicherheit von Erfolg begleitet. Ist das toxische Agens im tierischen Organismus resorbiert, dann hat die „Entgiftung“ um so geringere Aussichten, je später das „Gegengift“ einverleibt wird.

Durch das Beispiel des Antagonismus Bariumchlorid — Natriumsulfat läßt sich der Wirkungsmechanismus Diphtherietoxin-Antitoxin gut verständlich machen. Daß man ihn am leicht zu beschaffenden Frosch im Verlauf einer Stunde demonstrieren kann, ist ein Vorteil, der den Versuch für die Vorlesung besonders geeignet erscheinen läßt.

Zusammenfassung.

1. Bariumchlorid bewirkt beim Frosch ein eigentümliches, schon von R. Boehm beschriebenes Vergiftungsbild, das durch tonische Krämpfe, Muskelzuckungen und Flimmern charakterisiert ist. Dem Krampfzustand folgt eine zentral bedingte Lähmung. Die tödliche Dosis pro kg Frosch beträgt 1 g.

2. Natriumsulfat in Gaben bis zu 10 g in 10 proz. Lösung ruft keine sichtbaren Veränderungen im Verhalten des Frosches hervor.

3. Die prophylaktische Darreichung des Natriumsulfats kann auch die mehrfache tödliche Gabe des Bariumchlorids vollkommen entgiften.

4. Die kurative Darreichung des Natriumsulfats ist nur dann wirksam, wenn sie 10 bis spätestens 30 Minuten nach der Injektion des Bariumchlorids stattgefunden hat.

5. Die Entgiftung vollzieht sich zweifellos dadurch, daß das Bariumchlorid in das wasserunlösliche und ungiftige Bariumsulfat umgesetzt wird.

6. Es müssen zur Entgiftung des Bariumchlorids mindestens äquimolekulare Mengen Natriumsulfat verabreicht werden.

7. Die Entgiftung des Bariumions findet, wie aus den Versuchen geschlossen werden kann, nur so weit statt, als das Gift noch nicht in den Zellen verankert ist.

8. Die Umsetzung des Bariumchlorids und Natriumsulfats zu Bariumsulfat und Kochsalz findet dadurch statt, daß Gift und Gegengift in dem Blut- und Lymphstrom miteinander in Berührung kommen.

9. Dem Antagonismus Bariumchlorid — Natriumsulfat liegt eine der Wechselwirkung Diphtherietoxin — Antitoxin vergleichbarer Vorgang zugrunde, womit über die Art der gegenseitigen Beeinflussung von Toxin — Antitoxin (chemisch, kolloid-chemisch usw.) nichts gesagt werden soll.

Die Wechselwirkung zwischen Magnesium und Kalk einerseits und dem Barium- und Sulfation andererseits stellen zwei Gattungen des Antagonismus dar, die sehr auffällige, auch vom praktischen Gesichtspunkt aus wichtige Unterschiede aufweisen. Während sich die Tiere, die mit tödlichen Gaben von Magnesium vergiftet worden sind, durch keinerlei Gaben von Kalk am Leben erhalten lassen, ist dies bei der Bariumvergiftung durch Natriumsulfat zu erreichen. In letzterem Falle ist aber nur das noch nicht zur Wirksamkeit gelangte, aber bereits resorbierte Gift unschädlich zu machen. Die einmal eingetretenen toxischen Erscheinungen dagegen können nicht mehr rückgängig gemacht werden. Im Gegensatz dazu werden bei dem Antagonismus Magnesium — Kalk gerade nur die toxischen Wirkungen der Lähmung fast augenblicklich aufgehoben. Der Mechanismus dieses Vorgangs läßt sich trotz aller darauf verwandten Mühe der verschiedensten Forscher bisher nicht restlos erklären. Um chemische Reaktionen scheint es sich nicht zu handeln, wohl aber um solche physikalisch-chemischer oder kolloid-chemischer Art. Der Antagonismus Bariumion — Sulfation beruht wohl mit Sicherheit auf einer chemischen Umsetzung, die sich auch durch den Reagensglasversuch ohne weiteres verständlich machen läßt.

Über die Wärmekapazität des arteriellen und venösen Blutes.

Von
Edgar Atzler und Fritz Richter.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Greifswald.)

(Eingegangen am 11. Oktober 1920.)

Von verschiedenen Autoren ist behauptet worden, es bestehe ein Unterschied in der spez. Wärme des arteriellen und venösen Blutes. So findet Kopp¹⁾ für arterielles Blut eine spez. Wärme 1,02, für venöses Blut 0,892; Bordier²⁾ gibt für ersteres 0,901 bis 0,906, für letzteres 0,893 an. Hillersohn und Stein - Bernstein³⁾ konnten diese Unterschiede aber nicht bestätigen. In einer vorangehenden Arbeit „über die spez. Wärme des Blutes und des Serums unter besonderer Berücksichtigung der Methodik“⁴⁾ haben wir eine Untersuchung dieser Unstimmigkeiten angekündigt, und wir sind heute in der Lage, unsere Versuchsergebnisse vorzulegen.

Nach Bordier⁵⁾ soll die geringere Wärmekapazität des venösen Blutes einmal in den durch die Gewebeatmung freiwerdenden Abfallprodukten, dann aber hauptsächlich in dem reduzierten Hämoglobin ihre Erklärung finden. Was die erste Vermutung anlangt, so befolgt in der Tat eine Mischung von Wasser und Salz nicht das Ostwaldsche Additivitätsgesetz; derartige Mischungen haben vielmehr eine niedrigere spez. Wärme, als der Summe der Komponenten des Gemisches entspricht. Nach Nernst⁶⁾ „kann man bei nicht allzu konzentrierten Lösungen

¹⁾ Zitiert nach Landois, Lehrb. d. Physiol. 401, 1880.

²⁾ Compt. rend. 130 (I), 799, 800. 1900.

³⁾ Arch. Anat. u. Physiol. 1896. S. 249.

⁴⁾ Diese Ztschr. 100, 193. 1919.

⁵⁾ l. c. S. 799.

⁶⁾ Nernst, Theor. Chem. 1909, S. 105.

die Wärmekapazität nahe gleich derjenigen der Menge des in ihnen enthaltenen Wassers setzen“. Wenn also durch diese Stoffwechselprodukte der genannte Unterschied in der Wärmekapazität tatsächlich bedingt wäre, dann müßte man, wie eine einfache Überlegung lehrt, diese Stoffe in einer Konzentration annehmen, wie sie bei den Kreislaufvorgängen kaum vorkommen werden. Auch der zweite Teil der Bordierschen Theorie, der einen — hypothetischen — Unterschied in der Wärmekapazität des Hämoglobins und des Oxyhämoglobins für die Differenz der spez. Wärmen der beiden Blutarten verantwortlich macht, besitzt wenig Wahrscheinlichkeit.

Dann läuft aber das Problem auf die Frage hinaus, ob absorbierte Gase eine Änderung der spez. Wärme bedingen. In der uns zugänglichen Literatur konnten wir hierüber keine Angaben finden. Es ist aber wohl anzunehmen, daß die durch diesen Faktor hervorgerufene Änderung der spez. Wärme der kalorimetrischen Messung entgeht, wenn man die spez. Wärmen der in Betracht kommenden Gase berücksichtigt. Wenn nun aber trotzdem für arterielles und venöses Blut so beträchtliche Differenzen angegeben werden, so möchte man^e eher vermuten, daß Schwankungen im Wassergehalt vorgelegen haben, die durch die Blutentnahme bedingt waren; ist es doch sehr schwer, bei derartigen Eingriffen Stauungen zu vermeiden.

Dazu kommt noch, worauf Hillersohn und Stein-Bernstein¹⁾ aufmerksam machen, daß sich bei dem langen Erwärmen des Blutes (Eiskalorimeter!) auf Körpertemperatur das arterielle Blut in venöses umwandelt; aus diesem Grunde schüttelten die genannten Autoren die eine Blutportion mit Luft, während sie durch die andere Kohlensäure bis zur Sättigung durchleiteten. Damit haben sie aber eine neue Fehlerquelle hineingebracht; durch das Durchleiten von Kohlensäure wird dem Blut Wasser entzogen und die Autoren geben nicht an, daß sie diese Eindickung des Blutes korrigiert haben.

Der Vollständigkeit halber sei noch eine Möglichkeit diskutiert, die bei oberflächlicher Betrachtung für den in Frage stehenden Unterschied verantwortlich gemacht werden könnte. Bekanntlich verschwindet aus längere Zeit aufbewahrtm Blut der Sauerstoff, während eine entsprechende Menge Kohlensäure gebildet wird. Nimmt man nun an, daß dieser „Stoff-

¹⁾ l. c.

wechsel des überlebenden Blutes“ in dem arteriellen Blut mit größerer Geschwindigkeit verläuft als in dem venösen Blut, so würde bei dem arteriellen Blut auch eine größere Wärmetönung in der Zeiteinheit zu erwarten sein. Dann würde aber die kalorimetrische Untersuchung eine — scheinbar — geringere spez. Wärme für das arterielle Blut ergeben als für das venöse. Also ganz abgesehen von den Größenverhältnissen, würden die in Frage stehenden Differenzen der Wärmekapazitäten auch durch diese Hypothese keine befriedigende Erklärung finden können.

Wir gingen bei unseren Untersuchungen in der Weise vor, daß wir durch frisches Rinderblut teils Wasserstoff, teils Sauerstoff mehrere Stunden lang hindurchperlen ließen. So wurde der Stauungsfehler vermieden. Zu Beginn und am Ende dieser Prozedur wurden die Dichten der Blutproben im Pyknometer möglichst genau bestimmt; der eingetretene Wasserverlust wurde dann auf Grund einer einfachen Berechnung ersetzt; durch eine erneute Bestimmung der Dichte überzeugten wir uns überdies noch davon, daß die Dichten der drei Blutproben bis auf 0,05% übereinstimmten. Dann wurde die spez. Wärme gemessen. Wir benutzten die gleiche Apparatur, die wir schon in der vorerwähnten Arbeit ausführlich beschrieben haben. Auch hinsichtlich der rechnerischen Verwertung der Beobachtungszahlen befolgten wir die gleichen Regeln. Als Wasserwert für Wasserfüllung benutzten wir die dort gefundene Zahl $W_w = 563,9$.

	Wasserwert	Zahl der Messungen (= n)	Unsicherheit $\left(U \cong \sqrt{\frac{\sum A^2}{n(n-1)}} \right)$	Spez. Wärme
O ₂ -Blut	520,5	12	0,235	0,9165
Wasserstoffblut .	521,0	11	1,03	0,9175
Frisches Blut . .	521,0	10	0,229	0,9175

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß hinsichtlich der spez. Wärme kein Unterschied zwischen arteriellem und venösem Blut anzunehmen ist.

Die phytochemische Reduktion des Acetols zu optisch-aktivem Propylenglykol.

Von

E. Färber und F. F. Nord.

Nebst Bemerkungen und Versuchen zur Frage des Auftretens sowie der Verarbeitung von Racemkörpern bei Tier und Pflanze.

Von

C. Neuberg.

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

I.

Beim Zusammenbringen der gewöhnlichen Aldehyde¹⁾ und Ketone²⁾ mit gärenden Zuckerlösungen entstehen allgemein die entsprechenden primären bzw. sekundären Alkohole. Eine solche Reaktion ist zuerst am Furfurol beobachtet³⁾; das Verhalten der beiden Oxyaldehyde Glykolaldehyd⁴⁾ sowie Acetaldo⁵⁾ lehrt weiter, daß Oxycarbonylverbindungen, die nicht zu den „gärbaren“ Zuckerarten zählen, in gleicher Weise phytochemisch reduzierbar sind. Für ein einfaches Oxyketon liegt bisher keine diesbezügliche Erfahrung vor. Am Beispiele des niedrigsten Vertreters dieser Gruppe, des Acetols ($\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2\text{OH}$), zeigen wir im folgenden, daß auch hier die phytochemische Reduktion zu dem entsprechenden zweiwertigen Alkohol leicht gelingt. Das Acetol bietet in dieser Hinsicht als Angehöriger der 3-Kohlenstoffreihe und wegen seiner Beziehungen zum Methylglyoxal, zur Milchsäure und Brenztraubensäure sowie zum Zucker selbst ein besonderes Interesse dar.

¹⁾ C. Neuberg und Mitarbeiter, diese Zeitschr. 1912–1918.

²⁾ C. Neuberg und F. F. Nord, 52, 2237 und 2248. 1919.

³⁾ C. J. Lintner und H. v. Liebig, H. 72, 449. 1911.

⁴⁾ C. Neuberg und E. Schwenk, diese Zeitschr. 71, 114. 1915.

⁵⁾ C. Neuberg und E. Kerb, diese Zeitschr. 92, 96. 1918.

Acetol wird in Berührung mit arbeitender Hefe in beträchtlichem Umfange in Propylenglykol, $\text{CH}_3 \cdot \dot{\text{C}}\text{HOH} \cdot \text{CH}_2\text{OH}$, verwandelt. Dieser Übergang ist mit den beiden für das Acetol in Betracht gezogenen Formulierungen ($\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2\text{OH}$ bzw. $\text{CH}_3 \cdot \text{COH} \cdot \text{CH}_2$) vereinbar. Das so von uns gewonnene



Propylenglykol war stets stark linksdrehend; die phytochemische Reduktion verläuft demnach **asymmetrisch**, wie bisher in allen Fällen festgestellt worden ist, die dazu die Möglichkeit bieten¹⁾. Diese Reduktion des Acetols geht sowohl mit obergäriger als mit untergäriger Hefe vor sich, allerdings mit ersterer glatter, wenigstens bei der von uns geprüften Rasse. Das gewonnene α , β -Dioxypropan zeigte in drei Fällen eine nahezu übereinstimmende spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{18} = -15,66^\circ$ in wasserfreiem Zustande und von $[\alpha]_D^{16} = -20,48^\circ$ in wässriger Lösung, während in einem vierten Ansatz eine noch etwas höhere, in einem fünften eine niedrigere Aktivität festgestellt wurde. Ob die erzielte Drehung die maximale ist, bleibt unentschieden; jedenfalls dürfte man von diesem biochemisch leicht erhältlichen hochdrehenden Produkte nach bekannten chemischen Methoden unschwer zur reinen 1-Form gelangen können, falls sie noch nicht vorliegt. Hervorgehoben sei, daß der erreichte Wert nicht unwesentlich größer ist, als für die bisher bei anderen Reaktionen beobachteten spiegelbildisomeren Formen dieser Substanz.

Die von Le Bel²⁾ beschriebene bakterielle Spaltung des racemischen Propylenglykols hatte eine lävogyre Verbindung vom Drehungsvermögen $-1^\circ 15'$ bis $-4^\circ 35'$ (im 2,2 dem-Rohr) geliefert. Nach Ad. Grün³⁾ ist jedoch diese Zerlegung nicht reproduzierbar; er gibt an, daß das von Le Bel verwendete sogenannte *Bacterium termo* nicht einheitlich gewesen sei, sondern aus einer Mischkultur bestanden habe. Die von A. Péré⁴⁾ mit *Thyothrix tenuis* und die von A. Kling⁵⁾ mit dem Sorbosebacterium sowie mit *Mycoderma aceti* aus racemischem Propylenglykol nach wochenlanger Einwirkung der Erreger erhaltenen Substanzen waren mehr

¹⁾ C. Neuberg und W. H. Peterson, diese Zeitschr. **67**, 32. 1914; C. Neuberg und M. Ringer, diese Zeitschr. **90**, 388. 1918; C. Neuberg und A. Lewite, diese Zeitschr. **91**, 257. 1918; C. Neuberg und E. Kerb, diese Zeitschr. **92**, 96 und 111. 1918; C. Neuberg und F. F. Nord, l. c.

²⁾ Le Bel, C. r. **92**, 532. 1881.

³⁾ Ad. Grün, B. **52**, 260. 1919.

⁴⁾ A. Péré, Ch. C. **97**, II. 517.

⁵⁾ A. Kling, Ch. C. **1900**, I, 280 und **1901**, II, 576.

oder weniger rechtsdrehend. Auf rein chemischem Wege — durch Spaltung des β -Chlor-n-propylamins und weiterhin über das aktive β -Chlor- α -propanol und das dazu gehörige Propylenoxyd — kamen E. Abderhalden und E. Eichwald¹⁾ zu aktivem Propylenglykol; sie gaben für die l-Form das Drehungsvermögen $[\alpha]_D^{18} = -8,97^\circ$ und für die d-Form $[\alpha]_D^{18} = +13,71^\circ$ an, und zwar beide Male für die wässrigen Lösungen. Die Gewinnung des aktiven Propylenglykols auf diese Weise scheint nicht ganz leicht zu sein, nämlich abgesehen von dem mühevollen Wege infolge bisher unerklärter Unregelmäßigkeiten, die beispielsweise vom d-Propylenoxyd bald zu einem rechtsdrehenden, bald zu einem linksdrehenden Dioxipropan führten. Schließlich hat Ad. Grün (l. c.) die Gewinnung von aktivem Propylenglykol erstrebt; er ist unter Verwendung des von Meth für die Zerlegung des racemischen Butylalkohols angegebenen Verfahrens bis zum Dischwefelsäureester des Propylenglykols gelangt, dessen Bariumsalz dextrogyr befunden wurde.

Die auf biochemischem Wege vollzogene reduktiv-synthetische Bildung optisch aktiver Körper aus strukturell inaktivem Material ist prinzipiell verschieden von der biologischen Methode Pasteurs, bei der die eine Komponente der Racemverbindung durch ein Lebewesen fortgeschafft wird. Im vorliegenden Falle liefert zugleich die asymmetrische Hydrierung des Acetols ein weit stärker drehendes Propandiol als die Spaltung von fertigem d,l-Propylenglykol mittels Mikroorganismen, und zwar in nicht mehr Tagen, als sonst Wochen erforderlich waren.

Die phytochemische Reduktion des Acetols verlief mit der nach den Angaben von J. U. Nef²⁾ erhältlichen Ausgangssubstanz ohne Schwierigkeiten. Die Hydrierung ging in den Ansätzen mit gärender Oberhefe in 3—5 Tagen vor sich, wobei die Konzentration an Acetylcarbinol 1—1,6% nicht überstieg.

Die biochemische Behandlung des Propanolons erfolgte zunächst in 3 Ansätzen, bestehend aus 1000, 1200 bzw. 1400 ccm lauwarmem Leitungswasser mit 100, 120 bzw. 140 g Zucker und ebensoviel obergäriger Hefe (Rasse M des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin) sowie mit 8 g, 10 g bzw. 16 g des Oxyketons, welches frisch bereitet und vor der jeweiligen Verwendung nochmals im Vakuum destilliert worden war. Die Vergärung vollzog sich bei Zimmertemperatur flott; doch sind am zweiten oder dritten Tage, da Fehlingsche Lösung in der Kälte noch schwach reduziert wurde, je 100 g Hefe hinzugefügt worden.

¹⁾ E. Abderhalden und E. Eichwald, B. 51, 1312. 1918.

²⁾ J. U. Nef, A. 335, 260. 1904.

Nachdem die Gärung beendet war, haben wir zur Isolierung des Reduktionsproduktes das filtrierte Gärgut bei etwa 35° auf Sirupdicke konzentriert, erschöpfend mit absolutem Alkohol ausgezogen, den Alkoholextrakt wiederum verdampft und das Residuum von neuem in absolutem Alkohol aufgenommen, durch Zusatz eines Drittel Volumens Äther von Verunreinigungen befreit, filtriert und eingeengt. Den letzten Rückstand haben wir in absolutem Alkohol gelöst und diese Flüssigkeit über frisch geglühtem Natriumsulfat getrocknet. Die Rektifikation lieferte im ersten Falle 3, im zweiten 5 und im dritten 6,5 g l-Propylen-glykol, dessen Analysenfraktion bei gewöhnlichem Druck zwischen 186—188° sott.

Für die unverdünnte Substanz fanden wir folgende optischen Konstanten bei der Prüfung im 1 dcm-Rohr:

Bei I: $\alpha = -16,31^\circ$,

„ II: $\alpha = -16,27^\circ$,

„ III: $\alpha = -16,30^\circ$.

Daraus berechnet sich:

$$[\alpha]_D^{18} = -15,66^\circ$$

$$(l = 1, c = 100, d = 1,04).$$

Für die wässrige Lösung ergab sich:

$$[\alpha]_D^{16} = -20,48^\circ$$

($\alpha = -1,06^\circ$, $l = 1$, 0,5191 g Subst. mit Wasser zu 10,0070 g gelöst, $d = 1,0032$).

0,1578 g Subst.:	0,2708 g CO ₂ ,	0,1456 g H ₂ O.
C ₂ H ₅ O ₂ :	Ber. C = 47,35%,	H = 10,52%;
(76)	gef. C = 46,80%,	H = 10,25%.

In einem vierten Falle wurden zu 400 g Zucker in 4000 ccm Wasser 400 g Oberhefe M gegeben und nach Beginn der Gärung 40 g Acetol zugesetzt. Die Maische ist zunächst so lange bei 12° belassen, bis die Kohlensäureentwicklung schwach geworden war, und die Vergärung ist dann bei 32° in 48 Stunden zum Abschluß gebracht. Das dem Acetol eigene Reduktionsvermögen gegen Fehlingsche Lösung in der Kälte verschwand dann ohne erneute Zucker- und Hefezugabe. — Ein Vergleich des erzielten Ergebnisses mit dem vorher erwähnten zeigte somit einen gewissen Vorteil dieser Art von verlangsamter Gärführung.

Die Aufarbeitung nach dem beschriebenen Verfahren lieferte 24 g zwischen 102—105° (25 mm) siedende wasserklare Hauptfraktion. Bei ihrer Rektifikation unter Atmosphärendruck ging

fast die gesamte Menge zwischen 186–187° (unkorrigiert) über. Die Drehung war noch etwas höher als in den oben wiedergegebenen Versuchen:

$$[\alpha]_D^{20} = -16,11^\circ$$

$$(\alpha = -16,76^\circ, l = 1, d = 1,04).$$

0,1589 g Subst.:	0,2762 g CO ₂ ,	0,1492 g H ₂ O.
C ₃ H ₈ O ₂ :	Ber. C = 47,35%,	H = 10,52%;
(76)	gef. C = 47,40%,	H = 10,43%.

Die optische Reinheit unseres Propylenglykols hätte sich durch Überführung in die entsprechende Milchsäure beurteilen lassen. Wir versuchten die Oxydation mit Hilfe des Verfahrens, das V. v. Richter sowie E. Fischer und H. Leuchs¹⁾ zur Umwandlung von Epichlorhydrin in Chlormilchsäure angewendet haben; wir beobachteten unter anderem nach der Behandlung mit Salpetersäure auch Milchsäure, nachweisbar mit der Probe von Fletcher und Hopkins. Von einer näheren Untersuchung haben wir jedoch Abstand genommen, da das schließlich erhaltene Zinksalz kein Drehungsvermögen aufwies. Möglicherweise führt die Reaktion zunächst zu Acetol, das nach Angabe von Nef (l. c.) durch weitere Oxydation über Methylglyoxal gleichfalls Milchsäure, und zwar selbstverständlich inaktive, liefert.

Beim fünften Versuche entstand ein Propylenglykol von schwächerer Aktivität. Hier waren 25 g Acetol in einem Gäransatz mit 250 g Zucker und 250 g Hefe in 2,5 l Wasser behandelt. Als nach 3 Tagen kein Reduktionsvermögen mehr vorhanden war, erfolgte die Aufarbeitung wie in den früheren Fällen; isoliert wurden 14 g α, β -Dioxypropan.

Der abgelesene Drehungswinkel betrug beim 1 dm-Rohr = $-8,15^\circ$; daraus ergab sich $[\alpha]_D^{20} = -7,84^\circ$.

Auch mit einer untergärigen Hefe (von der Schultheiß-Brauerei zu Berlin) gelang die Reduktion des Acetols, allerdings wie bereits erwähnt weniger glatt, indem mehrfache Erneuerung der Hefe nötig war.

II.

Es sind gerade 20 Jahre vergangen, daß der erste Fall von Vorkommen einer racemischen Verbindung im Tierkörper be-

¹⁾ V. v. Richter, Journ. f. prakt. Chemie **20**, 193. 1879; E. Fischer und H. Leuchs, B. **35**, 3794. 1902.

kannt geworden ist¹⁾); es handelt sich um die d,l-Arabinose bei der Pentosurie. Das Zustandekommen dieser Stoffwechselanomalie ist bis jetzt nicht voll aufgeklärt. Für die Fälle von echter Pentosurie mit Ausscheidung von racemischer Arabinose hat am meisten Anklang folgende, 1902 von Neuberg ausgesprochene Theorie²⁾ gefunden.

E. Salkowski und C. Neuberg³⁾ war es gelungen, die d-Glucuronsäure durch biochemische Kohlensäureabspaltung in l-Xylose umzuwandeln und so von der d-Reihe der Kohlenhydrate auf einem physiologischen Wege zur l-Reihe zu gelangen. Daran anknüpfend wurde in den „Ergebnissen der Physiologie“⁴⁾ 1904 nachstehendes ausgeführt:

„Stellt man retrospektiv eine analoge Betrachtung über die Abstammung der Harnpentose an, d. h. denkt man sich die Kohlenstoffkette dieser Pentose über die Alkoholgruppe hinaus um eine Kohlenstoffgruppe verlängert, so gelangt man zu dem überraschenden Ergebnis, daß die Harnpentose in Beziehung zu den Zuckern der Dulcitreihe, z. B. mit d-Galaktose, tritt . . . Im Lichte dieser Betrachtung erscheint es vielleicht mehr als ein Werk des Zufalls, daß der einzige optisch inaktive Zucker, der bisher in der Natur außer der i-Arabinose (Harnpentose) aufgefunden ist, gerade die i-Galaktose ist. Aus zwei seltenen Produkten allerdings pflanzlichen Ursprungs, im Chagualgummi und im Norischleim, haben F. Winterstein (1898) sowie Tollens und Oshima (1901) durch Hydrolyse die optisch inaktive Galaktose erhalten. Um für den menschlichen Organismus die Möglichkeit einer solchen Abstammung der Harnpentose aus der Galaktose zuzugeben, bedarf es lediglich der Annahme von präexistierenden Galaktosegruppen sowie der Vorgänge abwechselnder Oxydation und Reduktion.“

In der Folgezeit ist dann eine ganze Reihe von Angaben⁵⁾ gemacht, laut denen tatsächlich eine gesteigerte Ausscheidung von d, l-Arabinose

¹⁾ C. Neuberg, B. **33**, 2243. 1900.

²⁾ C. Neuberg, Verhandl. der Berlin. physiol. Ges. **1902**, 68.

³⁾ E. Salkowski und C. Neuberg, H. **36**, 261. 1902.

⁴⁾ C. Neuberg in Asher - Spiros Ergebn. d. Physiol. **3**. I. 428. 1904.

⁵⁾ Vgl. hierzu Kj. O. af Klercker, Luzzatto, Schüler, Tintemann u. a. sowie D. Romani, dessen wertvolle Monogr. (Pentosuria, Siena **1913**) auch die ausführl. Literaturangaben enthält. Romani schreibt (l. c. S. 501): „In altra parte del mio lavoro sono riportate in succinto le varie teorie patogenetiche: di esse, in base alle mie esperienze ed a quelle compiute dagli altri ricercatori, mi sembra che la meno suscettibile di critica e la più soddisfacente sia la teoria di Neuberg che fa derivare il pentosio dei pentosurici dal galattosio.“ — Von neuen Gesichtspunkten hat in jüngerer Zeit A. Alexander (Verhandl. d. dtsh. Congr. f. inn. Med. **1914**, 552 und Arch. f. Verdauungskrankheiten **24**, 286. 1918) die Abstammung der Harnpentose von der Galaktose beleuchtet.

nach Darreichung von d-Galaktose und ihren Polysacchariden statthat. Damit könnte die Pentosurie zurückgeführt werden auf alternierende Reduktion und Oxydation bzw. auf die umgekehrte Reihenfolge in der physiologischen Verarbeitung der d-Galaktose, die durchaus im Bereiche des Denkbaren liegt.

Im Hinblick auf diese Erfahrungen und gestützt auf ältere Beobachtungen von Neuberg und Mitarbeitern bezüglich des asymmetrischen Verlaufs der phytochemischen Reduktionen haben deshalb im Jahre 1918 C. Neuberg und E. Kerb¹⁾ Stellung genommen zu einem Ausspruch von K. Hess und A. Eichel²⁾ in der Asymmetriefrage. Nach diesem Ausspruch wird nämlich auf Grund des beachtenswerten Umstandes, daß sie unter den Alkaloiden des Granatapfelbaums vorwiegend optisch inaktive Basen fanden, den Vegetabilien eine eigene Kraft zur Racemisierung zuerkannt; in der Fähigkeit des Tierkörpers, im asymmetrischen Sinne auf- und abzubauen, dürfte „eines der bedeutsamen physiologischen Unterschiedsmerkmale zwischen Tier- und Pflanzenorganismus“ bestehen. Wider eine solche scharfe Trennung sprachen die von Neuberg und Kerb als entgegenstehend angeführten abweichenden Beobachtungen beim Tierkörper, und ihre¹⁾ Darlegungen in bezug auf die pflanzlichen Organismen lauteten folgendermaßen: „„Andererseits lehren gerade die zahlreichen asymmetrischen Spaltungen, welche Racemgebilde der Zucker- und Eiweißreihe durch pflanzliche Enzyme erfahren, daß die Vegetabilien im allgemeinen eine Tätigkeit entfalten, die gerade auf das Gegenteil einer Racemisierung, auf optische Aktivierung, gerichtet ist. Diesen Abbauvorgängen reiht sich nun auch die synthetische Leistung der asymmetrischen phytochemischen Reduktion an““³⁾).

Diese Ausführungen von Neuberg und Kerb sind offenbar den Herren Pringsheim⁴⁾ und Hess⁵⁾ entgangen, zwischen denen jüngst ein Meinungs-austausch über die Frage nach einer

¹⁾ C. Neuberg und E. Kerb, diese Zeitschr. 92, 99. 1918.

²⁾ K. Hess und A. Eichel, B. 50, 1391. 1917; später erweitert B. 53, 119. 1920.

³⁾ Die im voranstehenden Teil I beschriebene Bildung von aktivem Propylenglykol aus strukturell inaktivem Acetol ist ein neues Beispiel phytochemischer Wirkung in ausgesprochen asymmetrischer Richtung.

⁴⁾ H. Pringsheim, B. 53, 1372. 1920.

⁵⁾ K. Hess, B. 53, 1375. 1920.

besonderen Fähigkeit des Pflanzenkörpers zu symmetrischen Leistungen stattgefunden hat. Wenn man die zuletzt von Hess (l. c. S. 1377) gewählte Formulierung: „Ich möchte mich also zunächst in meiner diesbezüglichen früher gegebenen Schlußfolgerung beschränken und hervorheben, daß die stereochemische Spezifität der Enzyme im höher entwickelten Organismus zuzunehmen scheint“, auch voll wird gelten lassen und man andererseits bestimmten Ausführungen von Pringsheim zustimmen darf, so kann man dem Problem wohl noch eine andere Seite abgewinnen. Diese ist: Es scheint kein wesentlicher Unterschied zwischen Tier- und Pflanzenkörper hinsichtlich dieses Teiles der Asymmetriefrage zu bestehen.

Sollte nämlich Pringsheim die Pentosuriefälle als die einzige Ausnahme von der Regel asymmetrischen Geschehens im animalischen Stoffwechsel betrachten, so würde das nicht zutreffen. Symmetrische Vorgänge sind weit zahlreicher. Obgleich nach den Ermittlungen von J. Pohl und M. Rawicz¹⁾ der Befund²⁾ von d,l-ac- α -Tetrahydronaphthylharnstoff im Hundeharn nach Verabfolgung von Tetrahydronaphthalin durch einen sekundären Zusammentritt von ac- α -Tetrahydronaphthol mit Harnstoff extra corpus seine Erklärung findet, so bleibt doch die physiologische Bildung des racemischen 4fach-hydrierten Naphthols bestehen. Ferner sind racemische Arbeitsweisen auch sonst für den Tierkörper bekannt. Dabei darf man natürlich mit Hess daran festhalten, daß die Gegenwart je eines Antipoden in Organismen ungleicher Art dem Prinzip der Enzymspezifität nicht widerspricht; die Betrachtung muß sich auf gleiche Arten beschränken. Hier findet man z. B. angegeben, daß sowohl d- als l-Cerebronsäure³⁾ wie d, l-Cerebrin⁴⁾ in den Gehirnlipoiden vorkommen, ferner daß d- und l-Glycerinphosphorsäure⁵⁾ auftreten. Das symmetrische Verhalten von d- und l-Weinsäure ergibt sich aus den Feststellungen von Neuberg und Saneyoshi⁶⁾;

¹⁾ J. Pohl und M. Rawicz, H. 104, 95. 1919.

²⁾ G. Schröter und K. Thomas, H. 101, 262. 1918.

³⁾ P. A. Levene und W. A. Jacobs, Chem. Centralbl. 12, II. 1671; s. a. Ch. C. 13, I, 2045.

⁴⁾ P. A. Levene, Chem. Centralbl. 13, II. 1495.

⁵⁾ S. Fränkel und L. Dimitz, diese Zeitschr. 21, 337. 1909; vgl. dazu P. A. Levene und J. P. Rolf, Journ. of Biolog. Chem. 40, 1. 1919.

⁶⁾ C. Neuberg und S. Saneyoshi, diese Zeitschr. 36, 32. 1911.

von den mehrfachen Beobachtungen über gleiches pharmakologisches Verhalten von Antipoden sei nur auf die Erfahrungen von Cloetta und Waser¹⁾ bei α - β -Tetrahydronaphthylamin und dessen Derivaten sowie auf die Ergebnisse von Joachimoglu²⁾ mit den stereoisomeren Campherformen verwiesen. Zwar haben Versuche³⁾ mit d,l-Arabinose, d,l-Arabonsäure und d,l-Mannose gezeigt, daß diese racemischen Gebilde im Organismus des Kaninchens eine gewisse Zerlegung erfahren können, aber der größte Teil der inaktiven Verbindungen ging durch den Tierkörper unverändert hindurch, näherte sich also dem Verhalten der Traubensäure⁴⁾.

Zwei höhere homologe Dicarbonsäuren der Zuckerreihe haben nun im Tierkörper dasselbe Schicksal wie die d,l-Weinsäure. Es sind dies die d,l-Zuckersäure sowie die d,l-Mannozuckersäure. Beide Substanzen passieren den Leib des Kaninchens, ohne Spaltung in die optischen Komponenten zu erfahren.

Diese Experimente mit den beiden genannten inaktiven Kohlenhydratsäuren sind vor längerer Zeit ausgeführt, aber nicht veröffentlicht worden, weil sie Gegenstand einer ausgedehnteren diesbezüglichen Untersuchung sein sollten. Da die Zeitverhältnisse deren Wiederaufnahme in Frage stellen, so sei hier kurz über die betreffenden Resultate berichtet:

Versuche.

Es ist für d-Zuckersäure bekannt, daß sie im Organismus des Menschen und der Tiere nur unvollständig verbrennt⁵⁾. Mit Mannozuckersäure scheinen bisher keine Tierversuche angestellt zu sein.

A. Verhalten von d,l-Zuckersäure.

a) Nach subcutaner Verabfolgung von 10 g d,l-Zuckersäure als Natriumsalz in 50 ccm Wasser an einem Kaninchen von 1920 g wurden innerhalb 26 Stunden 95 ccm Harn gesammelt. Derselbe zeigte direkt oder nach dem

¹⁾ M. Cloetta und E. Waser, Chem. Centralbl. **13**, II, 2150.

²⁾ G. Joachimoglu, Chem. Centralbl. **16**, II, 408.

³⁾ C. Neuberg und J. Wohlgemuth, H. **35**, 41. 1902 und C. Neuberg und P. Mayer, H. **37**, 530. 1903.

⁴⁾ C. Neuberg und S. Saneyoshi, l. c.

⁵⁾ P. Mayer, Chem. Centralbl. **63**, I, 474; O. Baumgarten, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. **2**, 53. 1905; J. Baer und L. Blum, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **65**, 1. 1911; E. Schott, ebendas. **65**, 35. 1911; C. Paderi, Chem. Centralbl. **16**, II, 585.

Erwärmen mit Säure keine optische Aktivität. Er enthielt weder Eiweiß noch Zucker und war ohne Einwirkung auf Fehlingsche Mischung. Sein bedeutendes Lösungsvermögen für Kupferhydroxyd wies auf einen Gehalt an einer Polyhydroxyverbindung hin. Der Harn wurde bei 35° auf 20 ccm eingeeengt und mit einer Lösung von 5 g Phenylhydrazin in 8,5 ccm 50 proz. Essigsäure 2 Stunden im siedenden Wasserbade behandelt. Dabei wurden 4,0 g einer zunächst mit gelblichbraunen Schollen durchsetzten Substanz erhalten. Sie erwies sich, nach den Angaben von Maquenne umkrystallisiert, nach Schmelzpunkt- und Stickstoffbestimmung als Doppelhydrazid der Zuckersäure. F. 210–211°. $C_{18}H_{22}O_6N_4$: Ber. N = 14,36; gef. N = 14,70%.

Eine Lösung von 0,5 g derselben mit 10,0 ccm 10 proz. alkoholischer Alkalilauge war vollkommen optisch inaktiv. Unter gleichen Verhältnissen zeigte das Di-phenylhydrazid der d-Zuckersäure (5 Minuten nach kalt bewirkter Lösung) eine Rechtsdrehung = +1,0% Glucose im 2 dcm-Rohr.

b) Subcutane Verabfolgung einer Lösung, die durch genaue Neutralisation von 10 g saurem d, l-zuckersaurem Kalium mit Natronlauge erhalten und auf ein Volumen von 50 ccm gebracht war. Menge des Harns nach 30 Stunden 80 ccm, Eigenschaften wie bei a). Die gesamte Urinportion wurde bei etwa 35° auf 10 ccm konzentriert, mit 3 g festem Kaliumacetat versetzt und mit Eisessig angesäuert. Nach wiederholtem kräftigem Reiben und beim Stehen im Eisschrank schieden sich 1,7 g saures zuckersaures Kalium aus. Durch Umkrystallisieren aus heißem Wasser unter Zusatz von etwas Knochenkohle rein weiße Krystalle. $C_6H_7O_6K$: Ber. K = 15,73; gef. K = 15,93%.

Nach dem Erwärmen einer 5 proz. Lösung¹⁾ mit rauch. HCl trat keine Drehung auf, ebensowenig bei Zugabe von Uranylнитrat + NaOH (s. unten). Das saure Kaliumsalz der aktiven Zuckersäure zeigt bei obiger Behandlung (0,5 g Salz, 10 ccm H_2O , 7 Tropfen konz. HCl) nach E. Fischer (l. c.) eine Drehung = 3° im 2 dcm-Rohr. Bequemer ist die Benutzung der drehungssteigernden und -umkehrenden Wirkung von Uranylverbindungen, die bei manchen Oxyssäuren Holleman²⁾ und H. Grossmann³⁾ beobachtet hatten.

Eine zum Nachweise kleiner Mengen von aktiver Zuckersäure geeignete recht hohe Aktivität erzielt man, wenn man zu nur 0,0625 g d-zuckersaurem Kalium in 7,0 ccm H_2O 1,3 ccm 20 proz. Uranylнитratlösung sowie zur Neutralisation 0,7 ccm 2n-NaOH setzt und auf 10,0 ccm auffüllt. Es besteht dann für das 2 dcm-Rohr Linksdrehung = -2,2% Glucose; die verwendete sehr kleine Quantität d-zuckersauren Salzes polarisiert für sich praktisch = 0.

Im ursprünglichen Harn rief die Zufügung von Uranylacetat + Lauge gleichfalls kein Drehungsvermögen hervor. Da bei Anwesenheit von aktiver Zuckersäure auch im Urin die Rotationsänderung eintritt, so ergibt sich, daß lediglich die d, l-Verbindung ohne Beimischung einer der aktiven Komponenten ausgeschieden war.

¹⁾ E. Fischer, B. 23, 2623. 1890.

²⁾ A. F. Holleman, R. 17, 326. 1898.

³⁾ H. Grossmann, Z. Ver. Rübenzuckerind. 55, 1058. 1905.

B. Verhalten von d, l-Mannozuckersäure.

10 g reines Doppellacton der d, l-Mannozuckersäure wurden vorsichtig mit Natronlauge neutralisiert. Die Lösung (= 50 ccm) wurde einem Kaninchen von 1620 g unter die Haut gespritzt. Der Harn, der innerhalb 24 Stunden entleert war, verhielt sich wie bei A., nur reduzierte er mäßig Fehlingsche Flüssigkeit; diese Eigenschaft kommt bekanntlich der Mannozuckersäure selbst zu. Aus dem im Vakuum konzentrierten Urin wurden 2,65 g eines Doppelhydrazids erhalten; durch seinen Schmelzpunkt (222 bis 225°) erwies es sich als Derivat der racemischen Mannozuckersäure; denn die entsprechende Verbindung der aktiven Formen schmilzt bereits bei 212°. $C_{18}H_{22}O_6N_4$: Ber. N = 14,36; gef. N = 14,48%.

Auch die kalt bereitete Lösung¹⁾ von 0,3 g Doppelhydrazid mit 10,0 ccm 10proz. alkoholischer Kalilauge war optisch inaktiv, während die d-Komponente unter diesen Verhältnissen (nach insgesamt 20 Minuten) eine Rechtsdrehung = +2,8% Glucose im 2 cm-Rohr zeigt²⁾.

Der native Harn war inaktiv, blieb es auch nach Zugabe von Säure. Demgegenüber ist Urin, der z. B. d-mannozuckersaures Natrium enthält, schwach dextrogyr und nimmt bei Zusatz von überschüssiger Salzsäure nach einigem Stehen, schneller beim Erwärmen, eine auf Lactonisierung beruhende starke Drehung an; Zusatz von Uranylacetat + Lauge erhöhte auch hier die Drehung unter gleichzeitiger Umkehrung. Daraus darf man schließen, daß die stereoisomeren Formen der Mannozuckersäure vom Kaninchen gleichmäßig verarbeitet werden.

Demnach sind die Fälle symmetrischer Betätigung des Tierkörpers gar nicht so selten. Daß man bei Pflanzen scheinbar öfter Racematen begegnet, hängt vielleicht mit der sehr viel gründlicheren Untersuchung zusammen, die bisher die vegetabilischen Erzeugnisse gefunden haben. Hinzu kommt, daß bei einigen empfindlichen Pflanzenbasen eine künstliche, zu Täuschungen Anlaß gebende Inaktivierung vorliegen kann, wie das Tanret³⁾ jüngst für das Granatapfelalkaloid Pelletierin angegeben hat. Da es nach obigem nicht unwahrscheinlich ist, daß die Zahl animalischer Vorgänge mit symmetrischem Verlauf sich bei einschlägigen Versuchen erhöht, so wird man im ganzen zu der Auffassung gelangen, daß ein durchgreifender Unterschied in dieser Richtung zwischen beiden Naturreichen nicht obwalten dürfte.

¹⁾ Dieselbe erfolgt beim Schütteln in der Kälte in etwa 15 Min.

²⁾ Aktive Zuckersäure und Mannozuckersäure können also durch die von uns festgestellte sehr verschiedene Drehung ihrer Doppelhydrazide unterschieden werden; die Verbindung der Mannosereihe dreht viel stärker (vgl. S. 322).

³⁾ G. Tanret, Chem. Centralbl. 20, III, 193.

Nachtrag zu der Mitteilung

von M. Weiss, diese Zeitschr. 112, 61. 1920.

Das Uromelanin enthält organisch gebundenen Schwefel. Beim Erhitzen einer Probe im Röhrrchen wird ein Bleipapier geschwärzt. Die Substanz enthält keine gepaarte Schwefelsäure, da das Kochen einer mit Barytwasser und HCl versetzten Probe keine Trübung ergibt. Sulfate sind nicht nachweisbar.

Die Mikroanalyse auf S ergab:

- | | |
|--------------|--------------------------------------|
| 1. 10,887 mg | 1,405 mg Asche = 12,91%; |
| | 2,55 mg BaSO ₄ = 3,22% S. |
| 2. 8,700 mg | 1,323 mg Asche = 15,21%; |
| | 1,91 mg BaSO ₄ = 3,01%. |

Auf aschefreie Substanz berechnet, ergab sich für

S 1. 3,69%, 2. 3,56%.

Die Differenz im Aschegehalt erklärt sich daraus, daß die Substanz beim Erhitzen unter Glühen und Funkenprühen verbrennt, wobei Teilchen auch aus dem Schiffchen geschleudert werden.

Autorenverzeichnis.

- Acél, D. Über die oligodynamische Wirkung der Metalle. S. 23.
- Atzler, Edgar und Fritz Richter. Über die Wärmekapazität des arteriellen u. venösen Blutes. S. 310.
- Cohen, Clara. Über die Bildung von Acetaldehyd bei den Umsetzungen von Zucker durch Pilze. S. 139.
- Färber, E. und F. F. Nord. Die phytochemische Reduktion des Acetols zu optisch-aktivem Propylenglykol. Nebst Bemerkungen und Versuchen zur Frage des Auftretens sowie der Verarbeitung von Racemkörpern bei Tier und Pflanze von C. Neuberger. S. 313.
- Feigl, Joh. Über das Vorkommen von Phosphaten im menschlichen Blutserum. XII. Die P-Verteilung, nach den derzeitigen Methoden zur Trennung und Isolierung. Neue Ergebnisse. S. 27. — Bemerkung zur Frage der „Restreduktion“ des Blutes. S. 51.
- Fränkel, Sigmund und Erik Schwarz. Über wasserlösliche Vitamine und gärungsbeschleunigende Verbindungen. I. Methodik der Bestimmung und Darstellung der gärungsbeschleunigenden Substanz aus Hefe und Reiskleie. S. 203.
- Freund, Ernst u. Gisa Kaminer. Über biologische Beeinflussung der Haut durch carcinombegünstigende Agentien (wie Tabaksaft, Teer, Ruß). S. 124.
- Goette, K. s. Olsen.
- Hahn, Martin u. v. Skramlik, Emil. Versuche mit Antigenen und Antikörpern an der überlebenden, künstlich durchströmten Leber. II. Versuche mit Tetanustoxin. S. 151.
- Hausmann, W. und W. Kerl. Zur Kenntnis der oligodynamischen Hämolyse. S. 122.
- Herzfeld, E. und R. Klinger. Berichtigung und Ergänzung zu unserer Arbeit: „Zur Chemie der Polysaccharide“. S. 55.
- Hüsgen, Hans. Über eine lipotrope Quecksilberverbindung. S. 1.
- Kaminer, Gisa s. Freund.
- Kerl, W. s. Hausmann.
- Klinger, R. s. Herzfeld.
- Kochmann, Rudolf. Über Schwefelwasserstoffbildung aus Sulfaten durch Faeces. S. 255.
- Kochmann, M. Quantitative Untersuchungen des Magnesium-, Kalk- und Bariumsulfat-Antagonismus. S. 291.
- Köhler, Erich. Über Fermentbildung. S. 236.
- Löffler, Wilhelm. Zur Kenntnis der Leberfunktion unter experimentell pathologischen Bedingungen. S. 164.
- Némec, Antonin. Über Urikase im Samenorganismus. S. 286.
- Neuberger, C., F. F. Nord und E. Wolff. Acetaldehyd als Zwischenstufe bei der Vergärung von Zucker durch *B. lactis aerogenes*. S. 144.
- Neuberger, C. s. Färber und Nord.
- Nord, F. F. s. Neuberger und Färber.
- Olsen, O. und K. Goette. Über Serumhämolyse u. -lipolyse. S. 188.
- Richter, Fritz s. Atzler.
- Rosenmann, M. Über Fibrinolyse. S. 98.
- Schnabel, Alfred. Die Verteilung der China-Alkaloide im Blute. S. 112.
- Schwarz, Erik s. Fränkel.
- v. Skramlik, Emil s. Hahn.
- Tröndle, A. Neue Untersuchungen über die Aufnahme von Stoffen in die Zelle. S. 259.
- Weiss, M. Die Farbstoffanalyse des Harnes. II. Das Urochromogen. S. 61.
- Wolff, E. s. Neuberger.

Verlag von J. F. Bergmann in München

Soeben erschienen:

Chemie der Enzyme

Von

Professor Hans Euler

in Stockholm

Zweite, nach schwedischen Vorlesungen
vollständig umgearbeitete Auflage

I. Teil:

Allgemeine Chemie der Enzyme

Mit 32 Textabbildungen und einer Tafel

1920 — Preis M. 56.—; gebunden M. 64.—

Methoden zur Mikrobestimmung einiger Blutbestandteile

Von

Professor Dr. med. Ivar Bang

in Lund

Zweite Auflage

Mit 4 Abbildungen

1920 — Preis M. 6.—

Praktischer Leitfaden der qualitativen und quantitativen Harnanalyse

Von

Professor Dr. Sigmund Fränkel

in Wien

Dritte, umgearbeitete Auflage

Mit 6 Tafeln

1919 — Gebunden Preis M. 5.60

Hierzu Teuerungszuschläge



FILTRIR PAPIER

CARL SCHLEICHER & SCHÜLL
RFP
Engl. Schutzmarke

In unerreichter Vollkommenheit und Vielseitigkeit liefern wir auf Grund 30jähriger Erfahrung unsere
Filtrirpapier = Sonderheiten
für die Zwecke der Technik und analytischen Chemie. Beim Einkauf achte man auf unsere in allen Kulturstaaen eingetragenen Etiketten und Schutzmarken.
Carl Schleicher & Schüll, Düren (Rheinland)

Verlag von Julius Springer in Berlin W 9

Die
Gifte in der Weltgeschichte

Toxikologische, allgemeinverständliche Untersuchungen
der historischen Quellen

von

Professor Dr. L. Lewin

Preis M. 56.—; gebunden M. 68.— (und Sortimentszuschlag)

Aus einem an Erfahrungen, Forschen und Lehren reichen Leben heraus ist dieses Werk entstanden, und für andere, und auch für andere Zweige menschlichen Wissens ist es als Bereicherung gedacht.

Inhaltsübersicht:

Die Entwicklung, Verbreitung und Verwendung der Giftenkenntnisse in alter Zeit. — Die Vergiftungen in ihrer Erscheinung als Krankheiten. — Die Behandlung der Vergiftungen in früheren Zeiten. — Die Beziehung von Gesetzen zu Gift. — Vergiftungen durch Ärzte oder Laien mittels Arzneien. — Giftbringung auf absonderlichen Wegen. — Selbstmorde durch Gift. — Alter und Bedeutung der Arsenverbindungen als Gifte. — Hervorragende, geschichtliche Menschen als Verüber oder Erdulder von Vergiftungen. — Frauen als Giftennerinnen und Vergiftennerinnen. — Geistliche als Vergiftenner oder Opfer von Vergiftungen. — Gifte als Kriegsmittel.

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig

STACKS

141713

