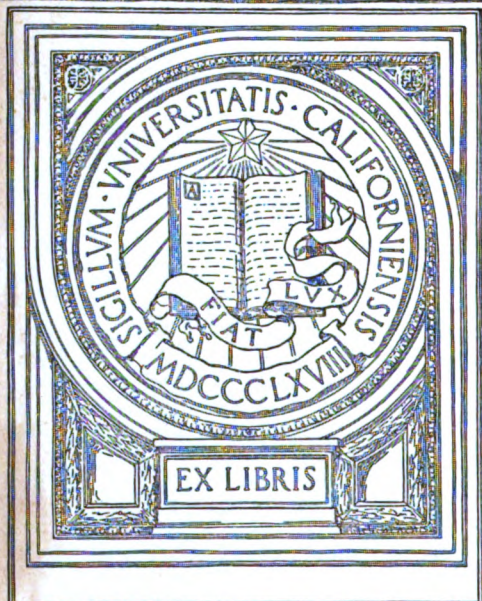
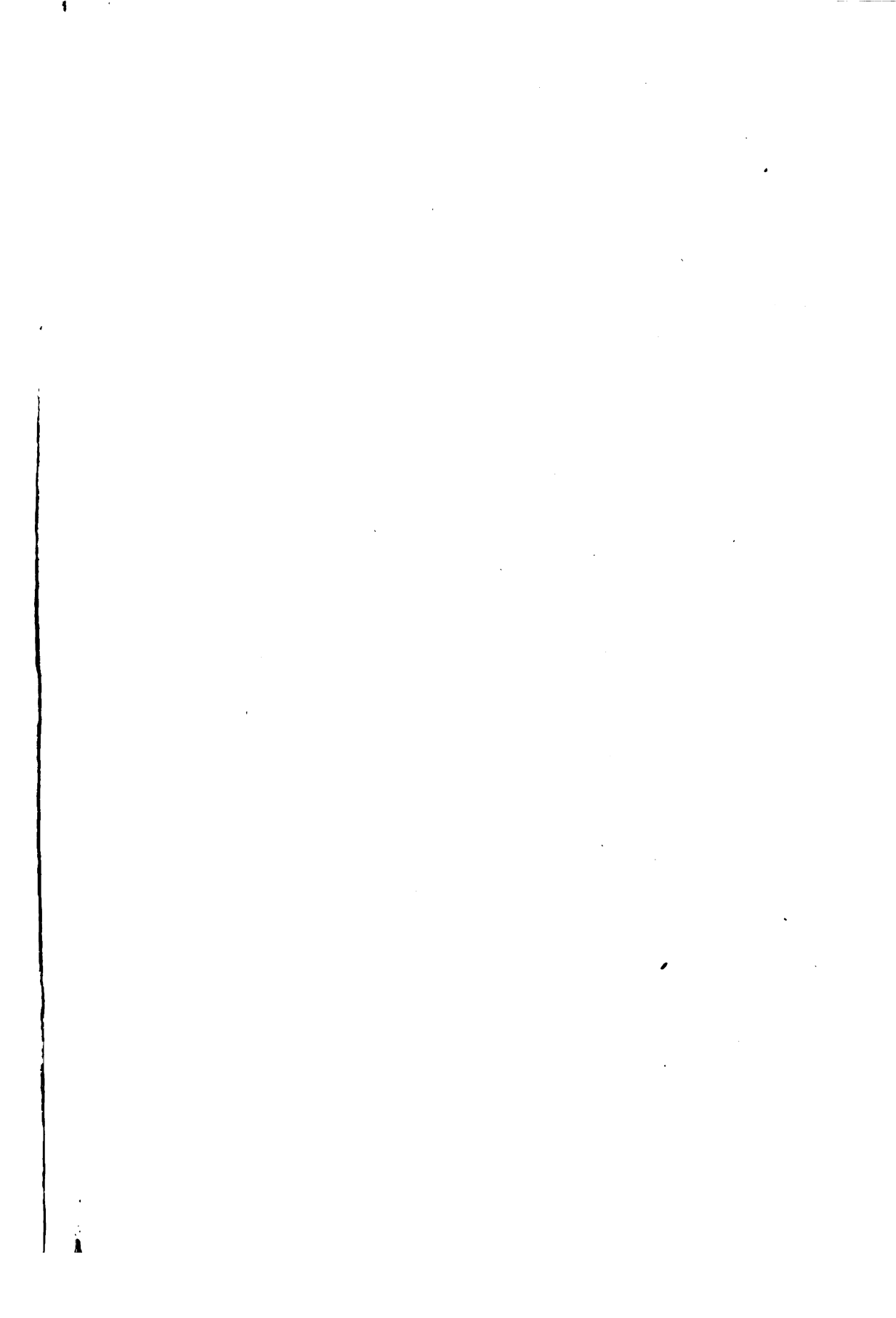
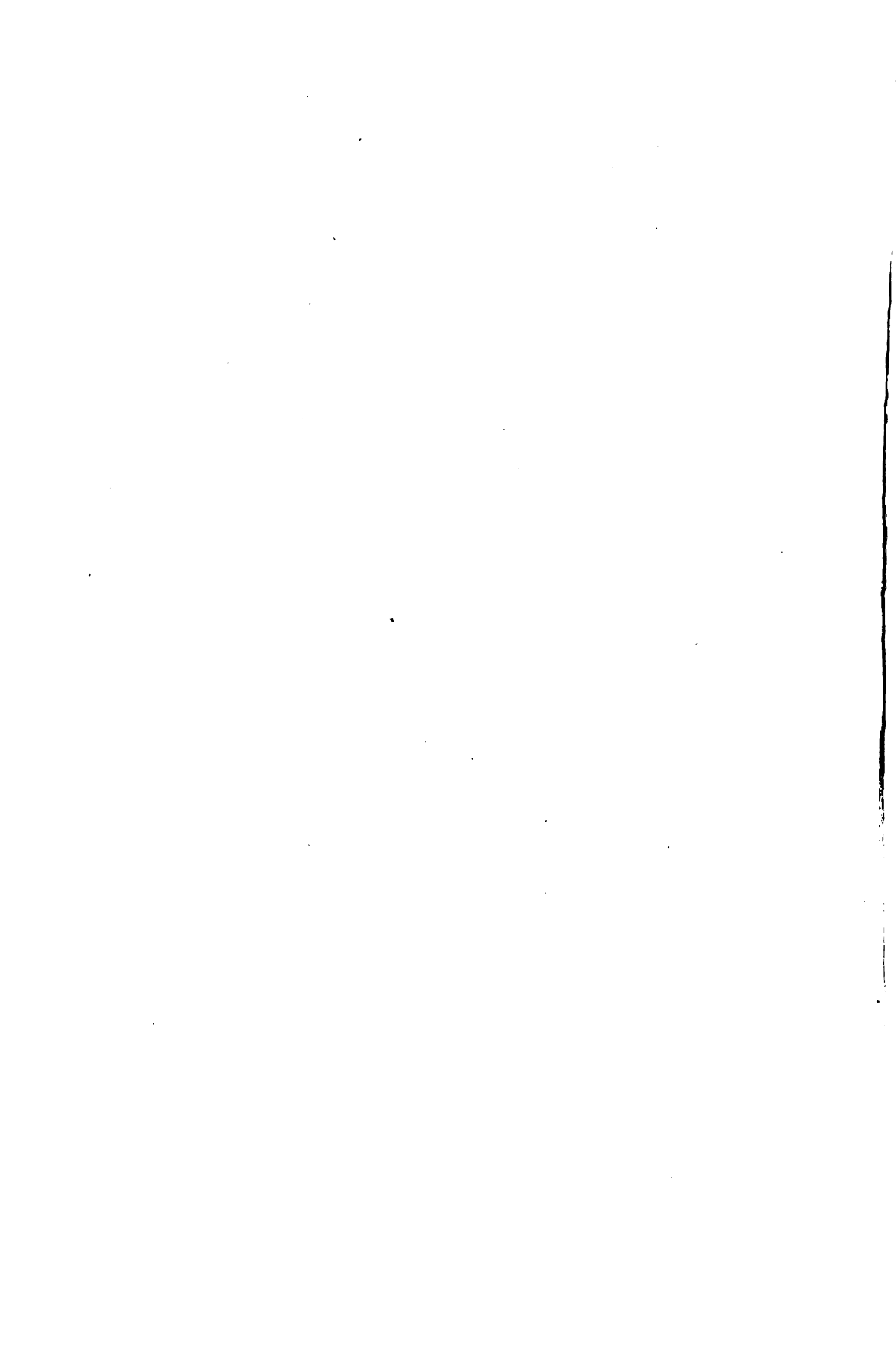


UNIVERSITY OF CALIFORNIA
MEDICAL CENTER LIBRARY
SAN FRANCISCO



EX LIBRIS





118-112

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, M. Bergmann-Berlin-Dahlem, G. Bertrand-Paris,
A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Botkanyi-Neapel, G. Bredig-
Karlsruhe i. B., F. Czapek-Leipzig, A. Durtg-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stock-
holm, J. Feigl-Hamburg, S. Flexner-New York, J. Forseman-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,
Y. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin-Dahlem, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-
Kiel, M. Jacoby-Berlin, A. Koch-Göttingen, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin,
P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, A. Loewy-Berlin,
A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-
Karlsbad, J. Meisenheimer-Greifswald, L. Michaelis-Berlin, H. Molisch-Wien, J. Morgen-
roth-Berlin, E. Münzer-Prag, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg,
J. K. Parnas-Lemberg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien,
J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salskkin-
St. Petersburg, T. Sasaki-Tokio, A. Scheunert-Berlin, A. Schloßmann-Düsseldorf,
S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Liestal, E. H. Starling-London, J. Steklase-Prag,
W. Straub-Freiburg i. B., A. Stützer-Königsberg i. Pr., K. Suto-Kanasawa, H. v. Tappeler-
München, K. Thomas-Leipzig, H. Thoms-Berlin, P. Trendelenburg-Berlin, O. Warburg-
Berlin, W. Wischewski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin

Hundertundachtzehnter Band

Manusdruck



Berlin

Verlag von Julius Springer

1921

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Bornstein, A. und Robert Vogel. Die Wirkung des Pilocarpins auf die Blutzusammensetzung	1
Nordefeldt, E. Die Bedeutung der Acidität für die Oxynitrilsynthese und die Nichttenz des Rosenthalerschen syn-Emulsins	15
Eisenhardt, W. und E. Schaefer. Schwankungen im Chlorid-Stoffwechsel unter dem Einfluß der menstruellen Vorgänge	34
Meyer-Bisch, Robert und E. Basch. Über das Schicksal parenteral verabreichten Schwefels und seinen Einfluß auf den Stoffwechsel	39
Freundberg, E. und P. György. Über Kalkbindung durch tierische Gewebe. III	50
Samson, G. Über Blutveränderung nach peroraler Kochsalzgabe .	55
Wilbrand, Eberhard. Schweißabsonderung und Blutzusammensetzung von Oettingen, KJ. Beiträge zur Frage der Senkungsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen im menschlichen Blute	67
Staub, H. Bahnung im intermediären Zuckerstoffwechsel	93
Herbst, Heinrich. Über den Einfluß des Wassergehaltes auf die Adsorptionsleistung einer aktiven Kohle	103
Murschhauser, Hans. Die quantitative Bestimmung von Dextrose und Lävulose in einer Lösung	120
Plagge, H. Vergleichende Untersuchung über die gärungshemmende Wirkung einiger Chlorderivate des Methans, Äthans und Äthylens	129
Michaëlis, L. und Y. Airila. Die elektrische Ladung des Hämoglobins	144
Jodlbauer, A. und F. Haffner. Über den Zusammenhang von Dunkelwirkung fluorescierender Stoffe und Photodynamie auf Zellen	150
Wester, D. H. Über den Mangangehalt von (holländischen) Samen	158
Friedberg, Eduard. Quantitative Messung der zeitlichen Coffeinausscheidung beim Menschen nach einer neuen biologischen Methode	164
Rona, Peter und Ernst Bloch. Beiträge zum Studium der Giftwirkung. Über die Wirkung des Chinins auf Invertase	185
Rona, Peter und Dora Reinicke. Beiträge zum Studium der Giftwirkung. Über die Wirkung des Chinins auf Serumlipase . . .	213
Rona, Peter und Emerich Bach. Beiträge zum Studium der Giftwirkung. Über die Wirkung des m- und p-Nitrophenols auf Invertase	232
Barendrecht, H. P. Das Enzym Phosphatase-Phosphatase	254
Erdstein, F. und L. Fürth. Zur Kenntnis der Wirkung blanker Metalle auf Toxine	256
Salkowski, E. Über die quantitative Bestimmung der Oxalsäure im Harn	259
Teschendorf, Werner. Über die Gefäßwirkung organischer Kationen und ihre Beeinflussung durch anorganische Ionen	267
Berichtigung zur Mitteilung von T. Sasaki. Diese Zeitschr. 114. 1921	286
Autorenverzeichnis	287



Die Wirkung des Pilocarpins auf die Blutzusammensetzung.

Von

A. Bornstein und Robert Vogel.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Hamburgischen Universität
[Krankenhaus St. Georg].)

(Eingegangen am 1. März 1921.)

Vor einiger Zeit wurden in unserem Laboratorium Versuche angestellt, welche die Wasserverschiebung im Körper nach Pilocarpineinwirkung feststellen sollten. Diese Versuche, welche an morphinisierten Hunden angestellt wurden, ergaben sehr ungleichmäßige Resultate, so daß Herr Dr. Reichenbächer, der diese Versuche begonnen hatte, deswegen von einer Fortsetzung derselben Abstand nahm. Etwas später bemerkten wir bei ganz andersartigen Versuchen, daß schon durch Morphinium allein beim Hunde beträchtliche Änderungen der Flüssigkeitsverteilung im Körper bewirkt werden¹⁾. Dieses veranlaßte uns, die inzwischen liegen gebliebenen Pilocarpinversuche wieder aufzunehmen. Es zeigte sich jetzt, daß am nichtmorphinisierten Hunde die Verhältnisse durchaus eindeutig waren. Über diese Verhältnisse soll in folgendem eingehend berichtet werden.

I. Wirkung des Pilocarpins auf die Blutkonzentration.

Bei einer Anzahl von Hunden wurde unter Kälte-Anästhesie die A. femoralis oder A. carotis freigelegt und aus ihr mittels einer Kanüle Blut entnommen. Das arterielle Blut wurde vor der Gerinnung zur Bestimmung des Hämoglobingehaltes und der Erythrocytenzahl benutzt. Nach der Gerinnung wurde das Serum abzentrifugiert und zur refraktometrischen Bestimmung des Eiweißgehaltes der Bestimmung des Kochsalzes und des Zuckers

¹⁾ Über die hierbei erhobenen Befunde wird baldigst berichtet werden.

im Blute benutzt. In vielen Fällen wurde gleichzeitig aus dem Ohr Capillarblut entnommen. Da sich herausstellte, daß die Veränderungen im arteriellen und Capillarblut ziemlich parallel gingen, wurde in einer späteren Versuchsreihe nur Blut aus dem Ohre entnommen. Das hatte den Vorteil, daß die Fesselung mit ihren Folgen auf die Blutzusammensetzung fortfiel. Die Versuche wurden alle an Hunden angestellt, die seit etwa 18 Stunden keine Nahrung erhalten hatten. Sie hatten nur Wasser erhalten. Während des Versuches erhielten sie keine Nahrung und kein Wasser.

a) Hämoglobingehalt.

Der Hämoglobingehalt des Blutes wurde mit dem Autenriethschen Colorimeter bestimmt, nachdem das Hämoglobin

Tabelle I.

Versuch	Hämoglobin in Prozenten								
	vorher	1/2 Std.	1 Std.						
26. X. 1920. Hund ♂, 21,87 kg. 25 mg Pilocarpin. Blut aus Ohr und A. carotis (gefesselt).	Aus dem Ohr								
	62,5	—	65,5						
	Aus A. carotis								
	61,25	—	60,5						
12. XI. 1920. Hund ♂, 9,96 kg. 15 mg Pilocarpin. Blut aus Ohr und A. femoralis (gefesselt).	Aus dem Ohr								
	60,5	87							
	Aus A. femoralis								
	71,75	88,25							
18. XI. 1920. Hund ♂, 19,84 kg. Blut aus Ohr und A. femoralis. 30 mg Pilocarpin (gefesselt).	Aus dem Ohr								
	88,25	105,5							
	Aus A. femoralis								
	89,75	108							
20. XI. 1920. Hund ♂, 20,16 kg. (später Milshund D). 40 mg Pilocarpin. (Blut aus A. femoralis) und Ohr (gefesselt).	Aus dem Ohr								
	95,5	111							
	Aus A. femoralis								
	95,5	108,75							
8. XII. 1920. Hund ♂, 6,54 kg. 20 mg Pilocarpin. Blut aus Ohr (ungefesselt).	1/2 Std.	1 Std.	1 1/2 Std.	2 1/2 Std.	3 1/2 Std.				
	61,5	77	78,5	85,5	84,25	80,5			
6. XII. 1920. Hund ♀, 12,57 kg. 30 mg Pilocarpin. Blut aus Ohr (ungefesselt).	18 Min.	26 Min.	1 Std.	2 Std.	3 Std.	4 Std.	5 Std.	6 Std.	
	71	88,25	95,5	101	95,5	90,5	88,25	79,75	77
18. I. 1921. Hund ♀, 19,80 kg. 30 mg Pilocarpin. Blut aus Ohr (ungefesselt).	1/2 Std.	1 Std.	1 1/2 Std.	2 1/2 Std.	3 1/2 Std.	4 1/2 Std.	5 1/2 Std.		
	62,5	88,25	88,25	87	87	85,5	82,5	74	
23. I. 1921. Hund ♀, 20 kg (später Milshund II). 30 mg Pilocarpin (ungefesselt).	1/2 Std.	1 Std.	2 Std.	3 Std.	4 Std.	5 Std.			
	82,5	112,5	112,5	101	101	95,5	77		

durch $\frac{2}{10}$ -Salzsäure in der bekannten Art in salzsaures Hämatin verwandelt worden war. Der Vergleichskeil des Colorimeters wurde mit einem Blute geeicht, dessen Hämoglobingehalt durch eine Eisenbestimmung nach Neumann festgestellt war. Die Resultate dieser Versuche zeigt Tabelle I.

Einige weitere Versuche mit gleichsinnigem Resultat sind in späteren Tabellen enthalten. Es ergibt sich aus diesen Versuchen, daß stets eine starke Vermehrung des Hämoglobingehaltes nach mittleren Dosen Pilocarpin (1–2 mg pro kg Hund) eingetreten ist. Die Eindickung fängt sehr bald nach Beginn der Salivation an. Sie ist nach einer halben Stunde stark ausgesprochen, sowohl am arteriellen, als auch am Capillarblut. Sie erreicht ihren Höhepunkt nach $\frac{1}{2}$ – $1\frac{1}{2}$ Stunden. Sie beträgt dann 10–40% des ursprünglichen relativen Hämoglobingehaltes des Blutes. Im Laufe von etwa 5–6 Stunden nach der Einspritzung sinkt der Hämoglobingehalt wieder, erreicht aber in den meisten Fällen die Norm nicht ganz. Die nächstliegende Erklärung für diesen Vorgang besteht in der Annahme einer Flüssigkeitsverschiebung aus dem Blute in die Gewebe, insbesondere in die Drüsen, die unter dem Einflusse des Pilocarpins stark sezernieren. In diesem Sinne sprechen auch die weiteren Beobachtungen. Definitiv geklärt kann diese Frage erst werden durch Blutmengenbestimmungen. Mit solchen sind wir zurzeit beschäftigt.

b) Erythrocyten.

Die Erythrocytenzahl im Kubikmillimeter wurde nach Hayem-Sahli im arteriellen Blute in einigen Fällen bestimmt. Wie aus Tabelle II hervorgeht, findet sich eine der Hämoglobinzunahme in der Größenordnung entsprechende Zunahme der Erythrocytenzahl im Kubikmillimeter.

Tabelle II.

Versuch	Erythrocyten	
	vorher	nachher
28. X. 1920. Hund ♂, 21,37 kg. 25 mg Pilocarpin. Blut aus A. carotis (gefesselt).	5 601 900	nach 1 Stunde 6 330 900
13. XI. 1920. Hund ♂, 9,96 kg. 15 mg Pilocarpin. Blut aus A. femoralis (gefesselt).	4 660 800	nach 20 Minuten 6 978 800
18. XI. 1920. Hund ♂, 19,64 kg. 30 mg Pilocarpin. Blut aus A. femoralis (gefesselt).	10 141 000	nach $\frac{1}{2}$ Stunde 15 749 000

c) Eiweißgehalt des Serums.

Zur weiteren Beurteilung der Änderung der Blutzusammensetzung war es wichtig zu wissen, wie sich der Eiweißgehalt des Serums verhält. Die Capillaren der meisten Körpergewebe sind ja bekanntlich für Eiweiß nicht durchlässig. War unsere Ansicht, daß es sich um einen Abfluß von Blutflüssigkeit in die Gewebe handelt, richtig, so schien es wahrscheinlich, daß der Eiweißgehalt des Serums entsprechend zunimmt. Es zeigte sich, daß dies tatsächlich der Fall war (siehe Tabelle III). Der Eiweißgehalt, der mit dem Refraktometer bestimmt war, war in allen Versuchen nach Pilocarpineinspritzung bedeutend höher als vorher. Die Zunahme entsprach in der Größenordnung einigermaßen der Zunahme des Hämoglobingehaltes des Blutes.

Tabelle III.

Versuch	Eiweißgehalt in Prozenten		
	vorher	I	II
28. X. 1920. Hund ♂, 21,37 kg. 25 mg Pilocarpin. Blut aus A. carotis (gefesselt).	6,55	nach 1 Std. 6,99	
13. XI. 1920. Hund ♂, 9,96 kg. 15 mg Pilocarp. Blut aus A. femoralis (gefesselt).	6,33	nach 20 Min. 7,44	
18. XI. 1920. Hund ♂, 19,64 kg. 30 mg Pilocarp. Blut aus A. femoralis (gefesselt).	6,77	nach 1/2 Std. 9,24	
20. XI. 1920. Hund ♂, 29,19 kg. 40 mg Pilocarp. Blut aus A. femoralis (gefesselt).	7,25	nach 1/2 Std. 9,24	
24. XI. 1920. Hund ♂, 29,5 kg, (ders. wie 20. XI.) Erst 40 mg Pilocarpin. Nach 1/2 Stunde, sofort nach Probe I: 6 mg Atropin (gefesselt).	7,41	1/2 Stunde nach Pil. 9,98	1/2 Stunde nach Atropin 7,63

d) Kochsalzgehalt.

Der Kochsalzgehalt des Bluteserums wurde in einigen Fällen nach der Bangs'schen Mikromethode bestimmt. Es zeigte sich in allen Versuchen eine geringe Herabsetzung des Kochsalzgehaltes, die jedoch die Fehlergrenzen der Methode nicht merklich überschritt. Während also nach Pilocarpin das Eiweiß in der Blutbahn zurückbleibt, verläßt das Kochsalz mit der Flüssigkeit die Capillaren und geht in das Gewebe über. Es ist dieses ein bemerkenswerter Unterschied gegenüber der Bluteindickung nach Morphinum. (Nach Morphinum verläßt nämlich auch ein Teil des Eiweißes das Gefäßsystem.) Die Wirkung des Pilocarpins auf den NaCl-Gehalt des Blutes läßt sich aus Tabelle IV erkennen.

Tabelle IV.

Versuch	Kochsalzgehalt in Prozenten	
	vorher	I
28. X. 1920. Hund ♂, 21,37 kg. 25 mg Pilocarpin. Blut A. carotis (gefesselt).	0,642	1 Std. nach Pil. 0,631
13. XI. 1920. Hund ♂, 9,96 kg. 15 mg Pilocarpin. Blut aus A. femoralis (gefesselt).	0,619	20 Min. nach Pil. 0,594
18. XI. 1920. Hund ♂, 19,64 kg. 30 mg Pilocarpin. Blut aus A. femoralis (gefesselt).	0,593	1/2 Std. nach Pil. 0,588
20. XI. 1920. Hund ♂, 29,18 kg. 40 mg Pilocarpin. Blut aus A. femoralis.	0,619	1/2 Std. nach Pil. 0,607

e) Körpergewicht.

In einigen Versuchen wurde der Einfluß des Pilocarpins auf die Perspiratio insensibilis festgestellt. Das Körpergewicht wurde vor und nach dem Versuche bestimmt und Urin, Kot und Speichel aufgefangen. Es zeigte sich eine starke Körpergewichtsabnahme von 5—8% des Körpergewichts. Die Perspiratio insensibilis betrug in einigen Kontrollversuchen am normalen Tier pro Stunde auf 1 kg berechnet 0,7—1 g. Sie ist in unseren Pilocarpinversuchen also stark erhöht. Diese Erhöhung beruht auf vermehrter Wasserabgabe, an der sich hauptsächlich Haut und Lungen beteiligen. Zu der starken Körpergewichtsabnahme in wenigen Stunden steht wohl das Verhalten des Hämoglobins in Beziehung. In mehreren, länger ausgedehnten Versuchen ist

Tabelle IVa.

Versuch	Gewichtsverschiebung				
	Gewicht vorher kg	Gewicht nach dem Versuch kg	Gewichts- verlust kg	Speichel + Urin, + Kot kg	Perspi- ratio insensi- bilis kg
3. XII. 1920. Hund ♂, 6,5 kg. 0,02 Pilocarpin (ungefesselt).	6,54	3/4 Std. nach Pil. 6,28	0,810	0,180	0,184
6. XII. 1920. Hund ♀, 12,27 kg. 30 mg Pilocarpin (ungefesselt).					
a) 2/3 Stunde nach der Injekt.	a) 12,27	11,87	0,900	0,689	0,241
b) 5/6 Stunde nach der Injekt.	b) 11,87	11,27	0,1	0,044	0,066
c) Gesamtverlust	—	—	1,00	0,733	0,297
28. XI. 1920. Hund ♀, 10,485 kg. 30 mg Pilocarpin, später 3 mg Atropin (danach kein Verlust mehr).	10,485	10,015	0,420 = 4% des K.-Gew.	Kot 110 g Speichel = 96 g Summe: 206 g Urin verloren	

Tabelle Va.
Milzloser Hund I. Splenectomiert am 17. XII. 1920.

Versuch	Hämoglobin in Prozenten			Leukozytenzahl			Blutzucker in Prozenten			
	vorher	1/2 Std.	1. Std.	2 Std.	vorher	1 Std.	2 Std.	vorher	1/2 Std.	
20. XI. 1920. Hund ♂, 29,18 kg. 40 mg Pilocarpin. Blut aus A. femoralis (gefesselt).	96,5	106,76	—	—	—	—	—	0,171	0,571	25 Min. nach Atropin 0,196
24. XI. 1920. Ders. Hund 29,5 kg. 40 mg Pilocarpin. Nach 1/2 Stunde: 6 mg Atropin.	a) 92,5 b) 96,5	121 116	101 99,5	—	—	—	—	0,147	0,290	—
a) Blut aus A. femoralis. b) Blut aus Ohr (gefesselt).										
17. XII. 1920. Ders. Hund 25,1 kg. Unmittelbar vor der Milzexstirpation. Blut aus Ohr (ungefesselt).	84,26	—	—	—	2,587	—	—	0,119	—	1/2 Std. nach Atropin 0,069
28. XII. 1920. Ders. 25,39 kg. 20 mg Pilocarpin. Nach 1/2 Stunden: 6 mg Atropinsulfat. Blut aus Ohr (ungefesselt).	66,75	81	—	1 Std. nach Atropin 71	—	—	—	0,064	0,091	1/2 Std. nach Atropin 0,069
12. I. 1921. Ders. Hund 25,8 kg. 40 mg Pilocarpin. Nach 1/2 Stunde: 6 mg Atropin. Blut aus Ohr (ungefesselt).	66,75	82,5	68	5 Std. nach Atropin 66,75	—	—	—	0,084	0,100	1/2 Std. nach Atropin 0,09
26. I. 1921. Ders. Hund. 23 mg Pilocarpin. Blut aus Ohr (ungefesselt).	66,75 8 Std. 77	79,5 4 Std. 77	77 5 Std. 79,5	2 Std. 77	12,000 3 Std. 39,637	1 Std. 4 Std. 24,660	1 Std. 5 Std. 27,800	0,089 8 Std. 0,074	0,130 4 Std. 0,070	1 Std. 0,113 5 Std. 0,076
10. I. 1921. Ders. Hund. 40 mg Pilocarpin } gleichzeitig 8 mg Atropin } Blut aus Ohr (ungefesselt).	vorher 66,75 66,5	1/2 Std. 62,5 66,5	1 Std. 66,5 66,5	2 Std. 59,5 69,5	vorher 16,537 19,162	1/2 Std. 19,162 22,312	2 Std. 27,562 27,562	vorher 0,119 0,119	1/2 Std. 0,129 0,129	2 Std. 0,155 0,155

nämlich der Hämoglobingehalt nicht bis zur Norm zurückgekehrt, sondern es ist eine leichte Eindickung des Blutes zurückgeblieben. Diese wird man zwanglos in Zusammenhang bringen mit dem starken Flüssigkeitsverlust des Körpers durch Drüsen, Lunge, Haut, Niere und Darm. Wir werden also die Bluteindickung auf zwei Faktoren zurückführen müssen:

1. auf eine Flüssigkeitsverschiebung aus den Gefäßen in das Gewebe, insbesondere wohl in die Drüsen. Nach Abklingen der Pilocarpinwirkung wandert diese Flüssigkeitsmenge in das Blut zurück. Der Vorgang ist also „reversibel“.

2. auf Wasserabgabe, an der neben anderen Geweben auch das Blut beteiligt ist. Dieser Faktor ist der kleinere. Der auf ihm beruhende Teil der Bluteindickung

Tabelle V b.
Milzloser Hund II. Splenectomiert am 1. II. 1921.

Versuch	Hämoglobin in Prozenten			Leukocytenzahl			Blutzucker in Prozenten				
	vorher	1/2 Std.	1 Std.	vorher	1/2 Std.	1 Std.	vorher	1/2 Std.	1 Std.	2 Std.	
20. I. 1921. Hund ♀, 20,4 kg. 15 mg Atropin } gleichzeitig. 46 mg Pilocarpin } Blut aus dem Ohr (ungefesselt).	91	88,25	104	1,387	19,081	14,962	11,812	0,113	0,084	0,110	0,129
28. I. 1921. Ders. Hund, 20 kg. 30 mg Pilocarpin hydrochlor. Blut aus dem Ohr (ungefesselt).	82,5 3 Std.	112,5 4 Std.	101 5 Std.	22,050 3 Std.	24,311 4 Std.	36,225 —	37,800 —	0,100 8 Std.	0,126 4 Std.	0,129 5 Std.	0,101 0,082
I. II 1921. Ders. Hund, unmittelbar vor der Milzexstirpation. Blut aus Ohr (ungefesselt).	74	—	—	11,550	—	—	—	0,110	0,085	0,082	
8. II. 1921. Ders. Hund, 18,8 kg (ohne Milz). 30 mg Pilocarpin. Blut aus dem Ohr (ungefesselt).	77 3 Std.	104 4 Std.	95,5 5 Std.	19,162 3 Std.	23,875 4 Std.	28,087 5 Std.	34,650 —	0,092 3 Std.	0,128 4 Std.	0,188 5 Std.	0,119 0,064
11. II. 1921. Ders. Hund, 18,9 kg. 18 mg Atropin } gleichzeitig. 40 mg Pilocarpin } Blut aus dem Ohr (ungefesselt).	79,75	79,75	78,75	19,687	18,912	19,960	20,757	0,099	0,119	0,157	0,123

geht nach Aufhören der Pilocarpinwirkung nicht ohne weiteres zurück, ist also „irreversibel“.

f) Milzexstirpation.

Wie bekannt, ruft Pilocarpin eine starke Leukocytose bei Mensch und Tier hervor. Wir haben diesen Befund in zahlreichen Versuchen bestätigen können. Über die Leukocytose nach Pilocarpin liegt eine Angabe von W. H. Harvey vor (*Journal of Physiology*, Band 35, S. 115).

Er behauptet, daß diese Leukocytose rein mechanischen Ursprungs sei, und zwar bedingt durch Kontraktion der glatten Muskelfasern der Milz. Nach Abbindung der Milzgefäße fand er ein Ausbleiben der Leukocytose. Diese Angabe erschien uns bemerkenswert, denn wenn die Leukocytose von der Milz ausging, so erschien es gut möglich, daß auch die Vermehrung der Erythrocyten nach Pilocarpin in irgendeinem Zusammenhange mit der Milz stehen müsse. Wir haben deshalb an zwei Hunden Milzexstirpation vorgenommen und den Einfluß des Pilocarpins auf die Blutzusammensetzung vor und nach der Operation untersucht. (Siehe Tabelle V.)

Zunächst konnten wir die Angaben Harveys an unseren Versuchen nicht bestätigen. Die splenectomierten Hunde reagierten auf Pilocarpin ebenso mit einer Leukocytose wie die normalen Hunde. Die Einzelheiten des relativen Blutbildes werden in einer anderen Arbeit aus diesem Institut beschrieben werden. Ebenso wenig wie die Leukocytose war die Vermehrung des Hämoglobingehaltes durch Pilocarpin durch die Milzexstirpation verändert. Auf die vorliegenden Verhältnisse scheint die Milz also keinen wesentlichen Einfluß auszuüben.

II. Blutzucker.

In der Literatur sind verschiedene Angaben über den Einfluß des Pilocarpins auf den Blutzuckergehalt vorhanden. Nach den letzten Untersuchungen von Mac Guyan (*Journ. of Pharmacology* 1916, S. 407, dort auch weitere Literaturangaben¹⁾), findet durch Pilocarpin keine Erhöhung des Blutzuckers statt. Wir stellten unsere Versuche mit der Bangschen Mikromethode an, und zwar teils am Capillarblut ungefesselter Tiere, teils am Serum, das aus arteriellem Blute gefesselter Hunde gewonnen war. Die Tiere erhielten 1—4 mg Pilocarpinum hydrochloricum pro kg.

¹⁾ Übersehen sind von Max Guyan die Versuche Watermann's (*Zeitschr. f. physiol. Chem.* Bd. 70, 72).

Tabelle VI.

Versuch	Blutzucker in Prozenten							
	vorher	1/2 Std.	1 Std.	2 Std.	3 Std.	4 Std.	5 Std.	6 Std.
28. X. 1920. Hund ♂, 21,57 kg. 0,025 g Pilocarpin hydrochlor. Blut aus A. carotis (gefesselt). Serumzucker!	0,188	—	0,212					
18. XI. 1920. Hund ♂, 9,96 kg. 0,015 g Pilocarpin hydrochlor. Blut aus A. femoralis (gefesselt). Serumzucker!	0,157	20 Min. 0,517						
18. XI. 1920. Hund ♂, 19,64 kg. 0,08 g Pilocarpin hydrochlor. Blut aus A. femoralis (gefesselt). Serumzucker!	0,180	0,280						
20. XI. 1920. Hund ♂, 29,18 kg, später Milshund I. 0,04 g Pilocarpin hydrochlor. Blut aus A. femoralis (gefesselt). Serumzucker!	0,171	0,672						
26. XI. 1920. Hund ♀, 10,55 kg. 0,02 g Pilocarpin hydrochlor. Blut aus Ohr, (ungefesselt). Zucker im Gesamtblut.	0,098	0,145						
8. XII. 1920. Hund ♂, 6,54 kg. 0,02 g Pilocarpin hydrochlor. Blut aus Ohr (ungefesselt). Zucker im Gesamtblut.	0,109	0,190	0,149	1 1/2 Std. 0,106	2 1/2 Std. 0,089	3 1/2 Std. 0,098		
6. XII. 1920. Hund ♂, 12,27 kg. 0,03 g Pilocarpin hydrochlor. Blut aus Ohr (ungefesselt). Zucker im Gesamtblut.	0,097	18 Min. 0,181	26 Min. 0,128	1 Std. 0,187	2 Std. 0,170	3 Std. 0,188	4 Std. 0,119	5 Std. 0,082
10. I. 1921. Hund ♀, 18,25 kg. 0,03 g Pilocarpin hydrochl. Blut aus Ohr (ungefesselt). Zucker im Gesamtblut.	0,067	40 Min. 0,188						
18. I. 1921. Hund ♀, 19,99 kg. 0,03 g Pilocarpin hydrochl. Blut aus Ohr (ungefesselt). Zucker im Gesamtblut.	0,080	1/2 Std. 0,089	1 Std. 0,107	1 1/2 Std. 0,114	3 1/2 Std. 0,098	4 1/2 Std. 0,089	5 1/2 Std. 0,098	
28. I. 1921. Hund ♀, 20 kg. 0,03 g Pilocarpin hydrochl. Blut aus Ohr (ungefesselt). Zucker im Gesamtblut (s. Tab. V b).	0,100	1/2 Std. 0,128	1 Std. 0,129	2 Std. 0,121	3 Std. 0,110	4 Std. 0,085	5 Std. 0,082	

Die Resultate der ersten Versuche finden sich in Tabelle VI. Weitere Versuche finden sich in den folgenden Tabellen.

In allen Versuchen ohne Ausnahme zeigt sich eine Erhöhung des Blutzuckers, die bereits nach einer viertel bis einer halben Stunde anfängt, etwa nach 1—1½ Stunden ihren Höhepunkt erreicht, um dann langsam wieder abzusinken. Der Zuckergehalt sinkt dann weiter allmählich auf Werte unter der Norm. Die Erhöhung des Blutzuckers ist meist mäßig, von 0,1 auf 0,15—0,2%. Wesentlich höher steigen die Werte des Serumzuckers bei den gefesselten Tieren an. Da das Blutserum im allgemeinen mehr Zucker enthält als die Blutkörperchen, und da das Pilocarpinblut infolge seiner Eindickung einen verhältnismäßig geringen Serumgehalt hat, war ein solches Resultat zu erwarten. Inwieweit eine Fesselungs-Glykämie dabei außerdem eine Rolle spielt, wollen wir nicht entscheiden. Zwei Versuche, in denen wir normale, hungernde Hunde 1 resp. 2 Stunden gefesselt hielten, ergaben keine Veränderungen des Blutzuckers, die die Fehlergrenzen deutlich überschritten. — Eine andere Versuchsreihe wurde an Kaninchen angestellt, die zwei Tage lang nur Wasser erhalten hatten. Im Capillarblut dieser Tiere, die 4—10 mg Pilocarpin pro kg erhalten hatten, zeigte sich ebenfalls eine starke Hyperglykämie, die bei kleinen Dosen ähnlich wie beim Hunde zurückging, bei großen Dosen aber auch nach 5 Stunden noch keine Tendenz zum Absinken zeigte (siehe Tabelle VII).

Unsere Versuche haben also andere Ergebnisse gezeitigt, als nach den Resultaten Mac Guigans zu erwarten war. Seine Versuche sind allerdings nicht streng mit den unsrigen vergleichbar. Seine Tiere hatten zum Teil kürzere oder längere Zeit vor dem Versuche gefressen. Die meisten seiner Versuche waren ferner so angestellt, daß nach unseren Beobachtungen eine etwa vorhandene Hyperglycämie schon wieder abgeklungen sein mußte. Wir sind daher der Ansicht, daß durch seine Versuche die Beweiskraft unserer Untersuchungen nicht beeinträchtigt wird.

Die Wirkung des Pilocarpins auf den Blutzucker ist zeitlich unabhängig von der Bluteindickung. Häufig ist der Blutzucker nach 1½—2 Stunden schon wieder zur Norm zurückgekehrt, während der Hämoglobingehalt erst nach weiteren Stunden fällt. Andererseits zeigen die Kaninchenversuche, daß bei dieser Tierart nach kleinen Pilocarpindosen eine beträchtliche Hyperglycämie

Tabelle VII.
Kaninchenversuche.

Versuch NB! Kaninchen A und B vom selben Wurf!	Hämoglobin in Prozenten			Lenkocythenzahl			Blutzucker in Prozenten					
	vorher	1/4 Std.	1 Std.	2 Std.	vorher	1/4 Std.	1 Std.	2 Std.	vorher	1/4 Std.	1 Std.	2 Std.
25. I. 1921. Kaninchen A, 1000 g. 4 mg Pilocarpin. Blut aus Ohr. Gesamtzucker.	55,5	58,25	54	54	7,350	9,450	10,500	8,925	0,104	0,158	0,248	0,104
	3 Std.	4 Std.	5 Std.	8 Std.	8 Std.	4 Std.	5 Std.	3 Std.	4 Std.	5 Std.	5 Std.	5 Std.
3. II. 1921. Kaninchen A, 1000 g. 4 mg Pilocarpin, 5 mg Atropin, gleichzeitig. Blut aus Ohr. Gesamtzucker.	52,5	51,25	48,25	—	20,474	13,387	12,075	—	0,100	0,079	0,091	—
	48,25	38,25	38,25	38,25	4,462	4,725	3,937	4,462	0,106	0,144	0,161	0,138
31. I. 1921. Kaninchen B, 1050 g. 4 mg Pilocarpin, 4 mg Atropin, gleichzeitig, wie oben.	46,75	42,5	46,75	46,75	3,412	5,250	13,912	3,937	0,098	0,131	0,119	0,102
	1 Std.	2 Std.	3 Std.	3 Std.	8,925	7,875	8,137	8,137	0,135	0,213	0,190	0,147
14. II. 1921. Kaninchen B, 1050 g. 4 mg Pilocarpin, wie oben.	55,3	54	51,25	46,75	9,187	8,925	7,875	8,137	0,135	0,213	0,190	0,147
	4 Std.	5 Std.	4 Std.	4 Std.	4 Std.	5 Std.	5 Std.	4 Std.	4 Std.	5 Std.	5 Std.	5 Std.
18. II. 1921. Kaninchen C, 2,43 kg. 24 mg Pilocarpin = 10 mg pro kg. Blut wie oben.	48,75	49,75	—	—	7,875	7,350	—	—	0,134	0,130	—	—
	61,75	66,75	66,75	66,75	20,737	22,575	28,087	22,837	0,129	0,195	0,253	0,306
8 Std.	4 Std.	5 Std.	3 Std.	3 Std.	4 Std.	5 Std.	5 Std.	3 Std.	4 Std.	5 Std.	5 Std.	5 Std.
66,75	66,75	66,75	—	41,212	28,350	33,610	—	—	0,302	0,308	0,323	—

ohne Bluteindickung und ohne merkliche Salivation zustandekommt. Ebenso fallen beim Hunde Hyperleukocytose und Hyperglycämie zeitlich nicht immer zusammen. Milzexstirpation hat auf die Pilocarpin-Hyperglycämie ebensowenig Einfluß wie auf Bluteindickung und Leukocytose (siehe Tabelle V).

III. Antagonismus: Pilocarpin-Atropin.

a) Wirkung des Atropins allein.

Die Beobachtung, daß Pilocarpin mit Regelmäßigkeit eine Erhöhung des Blutzuckers hervorruft, war für uns recht überraschend. Um das Wesen dieser Wirkung recht zu verstehen, schien es uns zunächst erforderlich festzustellen, ob Atropin diese Glycämie zu verhindern vermag. Nach Mac Guigan soll allerdings Atropin in großen Dosen den Zuckergehalt des Blutes erhöhen. Wir haben nur wenige Versuche mit Atropin allein angestellt. Es zeigte sich weder eine Veränderung des Blutzuckers, noch des Hämoglobingehaltes, anscheinend auch keine Veränderung der Leukocytenzahl im Kubikmillimeter. Unsere Atropindosen sind jedoch verhältnismäßig gering gewesen, und zwar 10mal geringer etwa als die Dosen, die Mac Guigan anwandte, und zwei- bis dreimal geringer, als diejenigen, welche wir in anderen Versuchen verwandten, wenn wir Atropin gleichzeitig oder nach Pilocarpin gaben. Es erscheint notwendig, diese Versuche noch mit größeren Dosen fortzusetzen.

b) Atropin und Pilocarpin gleichzeitig.

Wir stellten weiterhin einige Versuche an, in denen wir 1½ Stunde, nachdem wir Pilocarpin gegeben hatten, Atropin subcutan gaben. Vor der Atropininjektion stellten wir fest, daß das Pilocarpin seine gewohnte Wirkung auf das Blut ausgeübt hatte. Wir konnten feststellen, daß der durch Pilocarpin erhöhte Hämoglobingehalt sofort zur Norm zurückkehrte, während gleichzeitig der Speichelfluß aufhörte, ebenso kehrte die Zahl der Leukocyten zur Norm zurück. Dagegen konnten wir sichere Resultate in bezug auf die Wirkung auf den Blutzucker zunächst nicht erhalten. Bald schien es, als ob der erhöhte Blutzuckergehalt nach Atropin zur Norm zurückkehrte, bald schien eine solche Rückkehr weniger deutlich zu sein. Der Grund hierfür ist darin zu suchen, daß die Kurve der Hyperglycämie nach Pilocarpin nicht so regelmäßig

verläuft, wie die Kurve des Hämoglobins. Dies beruht wiederum offenbar auf dem wechselnden Ernährungszustande des Individuums und dem davon abhängigen Kohlenhydratvorrat des Körpers. Größere Aussicht schienen uns Versuche zu haben, in denen wir in passenden Dosen gleichzeitig Pilocarpin und Atropin gaben. Eine Reihe solcher Versuche ist in Tabelle VIII wiedergegeben. In allen Versuchen bei Hunden zeigt sich, daß die Wirkung des Pilocarpins auf den Blutzucker durch Atropin entweder ganz aufgehoben ist, oder erst später in Erscheinung tritt. Am wenigsten deutlich ist dieser Einfluß bei den beiden splenctomierten Hunden zu erkennen. In zwei Kaninchen-Versuchen war ebenfalls der verzögernde Einfluß des Atropins auf die Hyperglycämie nach Pilocarpin deutlich zu erkennen.

Zusammenfassung.

1. Bei Hunden bewirkt Pilocarpin eine beträchtliche Eindickung des Blutes, die sich in einer Vermehrung des relativen Hämoglobingehaltes, einem Anstieg der Zahl der roten Blutkörperchen und einer Vermehrung des Eiweißgehaltes des Blutserums äußert. Diese Veränderung beruht in erster Linie auf einer Wasserverschiebung innerhalb des Körpers, nur zum kleineren Teil auf einem Wasserverlust durch vermehrte Exkretion, Sekretion und vermehrte Perspiratio insensibilis.

2. Durch Pilocarpin wird bei Hunden und bei Kaninchen eine Hyperglycämie hervorgerufen.

3. Durch Milzexstirpation wird weder die Leukocytose, noch die Bluteindickung, noch die Hyperglycämie nach Pilocarpin beeinflusst.

4. Atropin wirkt antagonistisch auf sämtliche genannten Blutveränderungen:

Die Bedeutung der Acidität für die Oxynitrilsynthese und die Nichtexistenz des Rosenthalerschen syn-Emulsins.

Von
E. Nordefeldt.

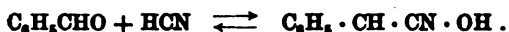
(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(Eingegangen am 1. März 1921.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Eine Amygdalinlösung wird, wie bekannt, von Emulsin in die Endprodukte Glucose, Benzaldehyd und Cyanwasserstoff gespalten, wobei als Zwischenprodukt Benzoxynitril auftritt. Bekanntlich kann das Oxynitril auch, in und ohne Gegenwart von Emulsin, aus Benzaldehyd und Cyanwasserstoff synthetisiert werden, nach der reversiblen Reaktion:



Über die angebliche und die wirkliche Rolle des Emulsins bei dieser Reaktion soll die vorliegende Arbeit berichten.

Kapitel I.

Historisches über katalytische Einwirkungen bei der Einstellung des Oxynitrilgleichgewichtes.

I. Wirkungen der Acidität.

Ultée¹⁾ fand, auf ältere Arbeiten gestützt, daß viele Oxynitrile in fast reiner Form aus Benzaldehyd und Cyanwasserstoff synthetisiert werden konnten, falls Spuren von Substanzen anwesend waren, welche in Lösung Hydroxylionen bildeten, z. B. KOH, KCN, Na₂CO₃. Wurden diese Substanzen nach beendeter Synthese durch einen Überschuß von Schwefelsäure wieder zerstört, verblieb das Oxynitril stabil, so daß es z. B. von Wasser nicht merklich zerlegt wurde. Falls der basische Katalysator

¹⁾ Rec. d. Trav. d. Pays-Bas 28, 1 und 248. 1909.

durch Säure nicht zerstört wurde, zerfiel das Oxynitril mit Wasser oder bei Erhitzen wieder in Aldehyd und Cyanwasserstoff. Wirth¹⁾ studierte das Gleichgewicht im System Benzaldehyd — Cyanwasserstoff — Oxynitril in wässriger Lösung. Er fand, daß schon kleine Mengen von Alkalien oder Säuren großen Einfluß auf die Gleichgewichtsreaktion in der Weise ausüben, daß Hydroxylionen die Geschwindigkeit, mit der das Gleichgewicht erreicht wird, von beiden Seiten vergrößern, Wasserstoffionen dagegen die beiden Reaktionen sehr stark verzögern. Übrigens fand er, daß die Dissoziation des Oxynitrils bei Verdünnung und bei Erwärmung zunimmt, um bei Konzentrierung und bei Abkühlung wieder zurückzugehen. Er stimmt mit La pworth²⁾ darin überein, daß man sich die Oxynitrilbildung so vorstellen muß, daß zuerst das CN-Ion sich verhältnismäßig langsam zum Aldehyd addiert, wonach das H-Ion, dank seiner Leichtbeweglichkeit, sich unmeßbar schnell mit dem neuen Komplex verbindet. Dadurch soll erklärt werden, warum Zusatz von Säure die Oxynitrilbildung verzögert, denn dadurch wird die Dissoziation des Cyanwasserstoffes zurückgedrängt und folglich die Menge der CN-Ionen vermindert.

II. Wirkungen des Emulsins.

1. Rosenthalers Arbeiten. syn-Emulsin und dia-Emulsin.

syn-Emulsin. Rosenthaler³⁾ studierte (1908—1913) den Effekt des Emulsins (aus Mandeln) auf die Oxynitrilbildung. Er entdeckte dabei, daß Emulsin unerwartete Wirkungen ausübte, teils asymmetrische, wodurch das entstandene Oxynitril optisch aktiv wurde (was bei gewöhnlicher Synthese nicht eintritt), teils symmetrische, so daß die Geschwindigkeit der totalen Synthese vermehrt und die Ausbeute von Oxynitril größer wurde. Er fand auch, daß der asymmetrische Effekt sein Optimum bei einer bestimmten Temperatur (25—30°) und nach einer bestimmten Zeit (2—3 Stunden) erlangte, und daß einstündiges Erhitzen auf 75—80° das Emulsin in asymmetrischer Hinsicht wirkungslos machte. Daraus zog er den Schluß, daß die Wirkung des Emulsins von enzymatischer Natur war. Das neue asymmetrisch synthetisierende Enzym wurde von ihm syn-Emulsin (*óv*-Emulsin, σ -Emulsin) genannt. Dieses konnte nach seinen Angaben in mehr oder weniger reiner Form dadurch isoliert werden, daß eine Emulsinlösung während längerer Zeit (1—2 Wochen) auf 40—45° erwärmt wurde, oder durch Behandeln von Emulsin zuerst mit Schwefelsäure und dann mit einer zur Säure äquivalenten Menge von Alkalihydroxyd, wodurch in beiden Fällen die übrigen enzymatischen Bestandteile beinahe vollständig zerstört wurden. Die enzymatische Wirkung des syn-Emulsins wurde vom Überschuß von Benzaldehyd, nicht aber von Cyanwasserstoff, geschwächt. Die Eigenschaft des syn-Emulsins,

¹⁾ Arch. d. Pharmazie 249, 382. 1911.

²⁾ Journ. Chem. Soc. 83, 995. 1903.

³⁾ Diese Zeitschr. 14, 238. 1908; 17, 257. 1909; 19, 186. 1909; 26, 1 und 7. 1909; 28, 408. 1910; 30, 486. 1913. — Arch. d. Pharmazie 246, 365. 1908; 248, 105 und 534. 1910; 249, 510. 1911; 251, 56 und 85. 1913.

zur Bildung von optisch aktiven Oxynitrilen zu führen, zeigte sich nicht nur beim Benzaldehyd, sondern es gelang Rosenthaler, von verschiedenen Aldehyden ausgehend, eine ganze Reihe von asymmetrischen Oxynitrilen darzustellen, von welchen die meisten rechtsdrehend waren. Demnach konnte man annehmen, daß Rosenthaler eine neue Methode zur asymmetrischen Synthese gefunden und die Existenz eines spezifisch synthetisierenden Enzymes bewiesen hatte. Das syn-Emulsin wurde später, nach dem Nomenklaturvorschlag Eulers¹⁾, Oxynitrilase oder, weil es rechtsdrehendes Benzoxynitril bildete, d-Oxynitrilase genannt.

Als Kriehle²⁾ fand, daß Präparate aus Blättern von wilder Kirsche (*Prunus serotina*) und aus Pfirsichblättern linksdrehendes Oxynitril gaben, wurde darin eine neue Oxynitrilase, l-Oxynitrilase, angenommen.

dia-Emulsin. Zum Unterschied vom syn-Emulsin wurde von Rosenthaler der enzymatische Bestandteil des Emulsins, welcher Amygdalin wie übrige β -Glucoside spaltet, dia-Emulsin (*dià*-Emulsin, δ -Emulsin) genannt.

Dieses Enzym soll nach Rosenthaler isoliert werden können, wenn eine Emulsinlösung mit einer gesättigten Lösung von Magnesiumsulfat oder mit Kupfersulfat gefällt wird, wobei es im Filtrat verbleibt. Er findet jedoch, daß die Methode mit Kupfersulfat bisweilen versagen kann. Durch Erwärmung während längerer Zeit auf 40–45° wurde das dia-Emulsin größtenteils zerstört, eine Lösung von syn-Emulsin ertrug aber eine kurze Erhitzung bis 70–80°. Weil das dia-Emulsin aus Amygdalin Benzaldehyd und Cyanwasserstoff abspaltete, sollte es auch das Zwischenprodukt Benzoxynitril zerlegen können. Die synthetisierende Wirkung des syn-Emulsins wurde folglich bei Anwesenheit von dia-Emulsin mehr oder wenig geschwächt, wodurch der sehr variierende Effekt verschiedener Emulsinpräparate des Handels erklärt wäre.

Als die englischen Forscher H. E. und E. F. Armstrong und Horton³⁾ das gewöhnliche Emulsin in mehrere spezifisch spaltende Enzyme einteilten — Amygdalase, Prunase und Benzocyanase —, identifizierte Rosenthaler sein dia-Emulsin als ein Gemisch der beiden erstgenannten. Die Benzocyanase, welche nach Armstrong und Horton das spezifisch oxynitrilspaltende Enzym wäre, wurde von Rosenthaler Oxynitrilase genannt.

2. Weitere Arbeiten über die asymmetrische Wirkung.

Die interessante Entdeckung Rosenthalers, daß bei Gegenwart von emulsinartigen Substanzen optisch aktive Oxynitrile gebildet werden, ist eine sichergestellte Tatsache, die von mehreren Forschern bestätigt worden ist. Das aus Benzaldehyd und Cyanwasserstoff mit gewöhnlichem Emulsin (aus Mandeln) erhaltene Oxynitril erweist sich immer rechtsdrehend.

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie 74, 13. 1911.

²⁾ Journ. Americ. Chem. Soc. 35, 1643. 1913.

³⁾ Proc. Roy. Soc. B. 80, 321. 1908; 85, 359. 1912.

Feist¹⁾ fand, daß linksdrehendes Benzoxynitril erhalten werden konnte, wenn eine Lösung von inaktivem Oxynitril mit Emulsin behandelt und dabei ein Luftstrom durch das Gemisch geleitet wurde. Mittels dieser Methode zur Wegführung der Spaltprodukte gelang es ihm, auch aus anderen Oxynitrilen die l-Form im Überschuß zu erhalten. Die Drehungsrichtung der durch Spaltung gewonnenen Oxynitrile war also der der durch Synthese dargestellten entgegengesetzt, und mit Hilfe von Emulsin konnten jetzt beide optischen Isomeren erhalten werden. Im Gegensatz zu Rosenthaler nimmt er an, daß das d-Oxynitril, welches bei Amygdalinspaltung mit Emulsin gefunden wird, schon als solches im Amygdalin vorhanden ist, um bei der Spaltung frei zu werden, und folglich in diesem Falle nicht synthetisiert wird, wie es bei dessen Bildung aus Benzaldehyd und Cyanwasserstoff der Fall ist.

Venth²⁾, ein Schüler Rosenthalers, findet, daß die asymmetrische Oxynitrilsynthese sich bei Verwendung einer ganzen Reihe von enzymartigen Präparaten vollzieht, die aus den verschiedensten Pflanzen gewonnen werden können, wobei in der Regel d-Oxynitril erhalten wird. In einem Falle aber (mit einem Präparat aus den Blättern von *Taractogenos Blumei*) erhielt er die l-Form, wodurch er die Existenz des Enzymes l-Oxynitrilase bestätigt findet.

Nachdem schon Fischer 1898 die Hypothese ausgesprochen hatte, daß die Spezifität der Enzyme optischen Antipoden gegenüber auf den asymmetrischen Bau ihrer als optisch aktive Katalysatoren wirksamen Moleküle zurückzuführen sei, gelang es Marckwald³⁾ und McKenzie⁴⁾, von symmetrischen Substanzen ausgehend, durch Verwendung asymmetrischer Hilfsstoffe und durch rechtzeitiges Unterbrechen der Synthesen optisch aktive Gemische zu erhalten. Durch Anwendung dieser Methode auf die Hydrolyse der inaktiven Mandelsäureester mittels des Enzymes Lipase konnte Dakin⁵⁾ rechtsdrehende Mandelsäure erhalten, während die noch zurückgebliebenen Ester sich linksdrehend erwiesen, und es gelang ihm auch eine Theorie für diese Befunde zu liefern.

Auf diese Arbeiten gestützt, haben dann Bredig, Fajans⁶⁾ und Fiske⁷⁾ mit großem Erfolg die asymmetrische Wirkung der Enzyme nachzubilden gesucht. Durch geeignete Wahl von asymmetrischen Substanzen bekannter Zusammensetzung als Katalysatoren konnten sie nämlich mehrere Reaktionen derart leiten, daß optisch aktive Produkte erhalten wurden, wobei nach Belieben die Wirkung eines l-Enzymes oder eines

¹⁾ Arch. d. Pharmazie 247, 226 und 542. 1909; 248, 101. 1910.

²⁾ E. Venth, Über emulsinartige Enzyme. Inaug.-Diss. Straßburg 1912.

³⁾ Berichte 37, 349 und 1368. 1904.

⁴⁾ Journ. Chem. Soc. 85, 1249. 1904; 87, 1373. 1905; 89, 365 und 688. 1906; 91, 1215. 1907.

⁵⁾ Journ. of physiol. 30, 253. 1904; 32, 199. 1905.

⁶⁾ B 41, 752. 1908. Zeitschr. f. physikal. Chemie 73, 25. 1910.

⁷⁾ Diese Zeitschr. 46, 7. 1912.

d-Enzymes nachgeahmt werden konnte. Wenn sie z. B. zu einer Mischung von Benzaldehyd und Cyanwasserstoff (in Chloroform oder Toluol gelöst) die linksdrehende Base Chinin fügten, wurde ein Überschuß von d-Oxynitril erhalten, während bei Verwendung des rechtsdrehenden Isomeren Chinidin l-Oxynitril in Überschuß gefunden wurde. Es gelang ihnen auch, eine experimentelle Stütze für die Annahme zu finden, daß der Grund der asymmetrischen Wirkung in einer intermediären Bindung zwischen dem Substrat (Oxynitril) und den genannten Basen liegt. Weil diese Substanzen nach beendeter Reaktion nicht verbraucht waren, sondern aus dem Gemisch wieder ausgelöst werden konnten, und weil ihre Wirkung viel größer war, als ihrer Menge stöchiometrisch entsprach, wurde ihr Effekt als ein katalytischer bewiesen. In diesen Versuchen findet Fajans starke Stützen für die Erklärung des Rosenthalerschen optischen Effektes als eine Wirkung eines asymmetrischen Katalysators in Emulsin, welcher nicht enzymatisch zu sein braucht und welcher die Dissoziation des l-Oxynitrils stärker beschleunigt als die des d-Oxynitrils, wodurch während des Verlaufes der Reaktion das letztere in Überschuß gefunden wird.

Die asymmetrische Oxynitrilsynthese von Fajans wurde von Bayliss¹⁾ experimentell bestätigt, welcher gleichfalls zeigte, daß auch bei Dissoziation des inaktiven Oxynitrils der verwendete Katalysator die Reaktionsgeschwindigkeit desselben Isomeren beschleunigt wie bei Synthese. —

Wir wissen aber noch nichts von der Zusammensetzung, der Stabilität und den übrigen Eigenschaften dieses asymmetrischen Katalysators. Vielleicht wird er aber wärmer stabil erscheinen, falls er von den koagulierbaren Eiweißstoffen des Emulsinpräparates befreit werden kann, und damit wäre seine einzige noch „enzymatische“ Eigenschaft aufgeklärt.

3. Weitere Arbeiten über die symmetrische Wirkung.

Die Behauptung Rosenthalers, daß in Emulsin zwei übrigens gleichartige Enzyme existieren, von welchen aber das eine synthetisierend, das andere spaltend auf dasselbe Substrat wirkt, erregte großes Aufsehen. Die Anhänger der synthetisierenden Enzyme glaubten hier eine gute Stütze für ihr sonst sehr schwaches Beweismaterial zu finden, während diejenigen, welche annahmen, daß die Enzyme nur als ideale Katalysatoren wirken, durch kontrollierende Untersuchungen die Resultate Rosenthalers zu widerlegen suchten.

Auld²⁾ ist mit Rosenthaler darin einverstanden, daß die synthetische Wirkung des Emulsins von einem speziellen Enzym veranlaßt ist. Er bestätigt, daß bei Spaltung des Amygdalins mit Emulsin Benzaldehyd einen stärker verzögernden Effekt zeigt als die übrigen Spaltprodukte (Glucose und Cyanwasserstoff), was er so erklärt, daß der Aldehyd, wie im allgemeinen die Atomgruppe — CHO, ein Gift für das Enzym sei. Bei

¹⁾ Journ. of physiol. 46, 236. 1913.

²⁾ Journ. Chem. Soc. Trans. 95, 927. 1909.

Gegenwart von Säuren oder Basen nimmt nach Auld die Geschwindigkeit der Hydrolyse stark ab, weil das Emulsin sich mit diesen zu Salzen vereinigt, und es könnte folglich selbst sowohl Base wie Säure sein, d. h. es besitze amphotere Eigenschaften.

Bayliss¹⁾ zeigte, daß bei Synthese, wie bei Hydrolyse, von Glycerin-glucosid sowohl mit syn-Emulsin als mit dia-Emulsin dasselbe Gleichgewicht, obschon mit verschiedener Geschwindigkeit, erhalten wurde. Er hält sie darum für ein und dasselbe Enzym, und er bezweifelt überhaupt die Existenz spezifisch synthetisierender Enzyme.

Krieble²⁾ verhinderte die partielle Oxydation des Benzaldehyds während des Verlaufs der Versuche dadurch, daß er den Luftsauerstoff durch Stickstoff verdrängte. Er fand dann bei Verwendung von Enzympräparaten aus verschiedenen Prunus-Arten keine Differenz im Gleichgewicht und stellte fest, daß ihre Wirkung durch vorhergehende Behandlung mit reinem Benzaldehyd oder mit Cyanwasserstoff nicht geschwächt wurde. Es gelang ihm nicht mit den Methoden von Rosenthaler das synthetisierende und das spaltende Enzym zu trennen.

Kapitel II.

Eigene Untersuchungen.

Auf Prof. v. Eulers Anregung habe ich eine Untersuchung über die Wirkungen des Emulsins begonnen, und dabei habe ich auch den Grund der Variation des kinetischen (symmetrischen) Effektes verschiedener Emulsinpräparate zu finden versucht, wodurch möglicherweise der Zusammenhang zwischen syn-Emulsin und dia-Emulsin aufgeklärt werden konnte.

Dabei habe ich näher studiert, in welchem Grade die Acidität (p_H) auf die Geschwindigkeit der Oxynitrilsynthese, mit und ohne Emulsin, einwirkt.

I. Material.

Nachdem ich einige Zeit versucht hatte, mit wässrigen Lösungen zu arbeiten, welche Methode wegen der Schwerlöslichkeit des Benzaldehyds im Wasser bei konzentrierten Lösungen nicht gut verwendbar war, habe ich hier Alkohol als Lösungsmittel verwendet, wodurch ich immer ein homogenes System beibehalten konnte. Der stets benutzte Alkohol war eine Mischung von Äthylalkohol und Wasser zum spez. Gew. 0,924 (bei 18°), 47 Gewichtsprozenten reinen Äthylalkohols entsprechend.

¹⁾ l. c.

²⁾ Journ. Americ. Chem. Soc. 37, 2205. 1915.

Zu den Synthesen wurde vom Benzaldehyd, dessen Gehalt an Benzoesäure mit Phenolphthalein zu 1% bestimmt wurde, eine solche Menge genommen, daß sie das angegebene Gewicht reinen Aldehyds enthielt.

Der Cyanwasserstoff wurde aus Cyankalium und verdünnter Schwefelsäure bereitet und, nach Durchstreichen einer mit Baumwolle gefüllte Waschflasche, in Alkohol gelöst. Die Lösung verblieb ungefärbt, und ihr Gehalt an HCN wurde nach Volhards¹⁾ Methode bestimmt und bisweilen kontrolliert.

Das Emulsin wurde aus bitteren Mandeln nach der Methode Hérisseys²⁾ dargestellt, so fein als möglich gepulvert und in dieser Form zum Reaktionsgemisch gefügt, in welchem es anscheinend ungelöst verblieb, obschon es dabei gute asymmetrische und kinetische Wirkung gab.

Mein Präparat wirkte außerdem kräftig spaltend auf Amygdalin; die Analyse nach Bertrand³⁾, zeigte nur Spuren von löslichen Kohlenhydraten an; bei Mikroanalyse nach Kjeldahl⁴⁾ wurde als Mittel 12,5% Stickstoff gefunden, und die Asche betrug ca. 10%.

II. Versuchsanordnung.

Die Synthesen. In einem Fläschchen mit Stopfen wurde ein abgemessenes Volumen Cyanwasserstofflösung, eventuell auch die kleine Menge p_H -variierender Substanz, eingefüllt. Nach Umschwenken wurde dann die dem Cyanwasserstoff äquimolekulare Menge Benzaldehyd zugefügt und das Gemisch kräftig geschüttelt, wonach das Titrieren auf freiem HCN beginnen konnte. Dabei wurde mit Pipette ein bestimmtes Volumen des Reaktionsgemisches in überschüssiger Silbernitratlösung (0,1 N), welche mit etwas Salpetersäure versetzt war, gegossen und weiter nach Volhards Methode verfahren.

Die Bestimmung von p_H wurde gewöhnlich gegen das Ende jeden Versuches gemacht.

¹⁾ Annalen d. Chemie u. Pharmazie 190, 47. 1878

²⁾ Recherches sur l'Emulsine. Thèse Paris 1899, S. 44.

³⁾ Bull. de la Soc. chim. 35, 1285. 1906.

⁴⁾ I. Bang, Methoden zur Mikrobestimmung einiger Blutbestandteile. Wiesbaden 1916.

Alle Versuche wurden bei Zimmertemperatur (17–18° C) ausgeführt.

Die Aciditätsbestimmungen. Bei den Reaktionsgemischen konnte, der Anwesenheit des Cyanwasserstoffs zufolge, die sonst verwendete elektrometrische Methode¹⁾ (wie auch beim Kupfersulfat) nicht gebraucht werden, weshalb dort die kolorimetrische Methode Sorensens²⁾ gewählt wurde. Als Vergleichsmaterial wurden Acetatgemische in Alkohol (eventuell mit Spuren von Schwefelsäure versetzt) verwendet, in welchen p_H elektrometrisch bestimmt wurde.

Durch Zusatz von Acetatpuffer oder Spuren von Schwefelsäure bzw. Natriumhydroxyd zu den Reaktionsgemischen wurde darin p_H innerhalb des Intervalls 2,9–8,0 variiert.

Die p_H -Werte einzelner Lösungen sind im Versuch 17 zusammengestellt.

III. Versuche.

Versuch 1.

Der Zusammenhang zwischen Acidität und Reaktionsgeschwindigkeit der Synthese (Vers. 1–8).

Reaktionsgemisch: 5 ccm (= 5,141 g) C_6H_5CHO + 36,71 ccm HCN (1,32 N) + 0,06 ccm verdünnte Schwefelsäure.

Titriertes Volumen: 2 ccm. Der Geschwindigkeitskoeffizient k ist aus der Formel einer bimolekulären Reaktion $k = \frac{1}{at} \cdot \frac{x}{a-x}$ berechnet.

Zeit in Stunden	AgNO ₃ ccm verbraucht	HCN Proa. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
2,5	22,7	2,2	0,09
4,75	22,6	2,5	0,05
24	20,8	10,3	0,03
72	17,5	24,8	0,04
198	12,2	47,7	0,04
240	10,5	54,7	0,09

Mittel: $k \cdot 10^3 = 0,06$, $p_H = 2,9$.

¹⁾ L. Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin 1914.

²⁾ Diese Zeitschr. 21, 131. 1909; wie auch in der oben genannten Monographie von Michaelis.

Versuch 2.

Wie im Versuch 1, aber 0,03 ccm verd. Schwefelsäure.

Zeit in Stunden	AgNO ₃ ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	k · 10 ³ berechnet
1,5	18,0	22,5	1,9
4	14,1	39,3	1,4
6,5	11,8	49,2	1,3
8	10,6	54,5	1,5
21	6,0	74,0	1,3
29	4,9	78,9	1,4
100	1,7	92,7	1,3

Mittel: $k \cdot 10^3 = 1,4$, $p_H = 3,3$.

Versuch 3.

Wie im Versuch 1, aber 2 ccm Natriumacetatpuffer (0,2 N, $p_H = 3,4$) anstatt verd. Schwefelsäure.

Zeit in Stunden	AgNO ₃ ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	k · 10 ³ berechnet
1,1	17,1	22,9	2,7
2	14,5	34,6	2,3
3	12,7	42,7	2,2
5	10,3	53,5	2,1
6	9,3	58,0	2,3
7	8,45	61,9	2,4
21	4,6	79,3	1,6
47	2,4	89,2	1,7
70	1,85	91,7	1,6
120	1,6	94,3	

Mittel: $k \cdot 10^3 = 2,2$, $p_H = 3,4$.

Versuch 4.

Wie im Versuch 1, aber ohne Zusatz.

Zeit in Stunden	AgNO ₃ ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	k · 10 ³ berechnet
0,5	18,7	19,5	4,8
2,5	11,5	50,5	3,9
4,75	8,6	63,0	3,0
24	3,2	86,2	2,6
72	1,5	93,5	

Mittel: $k \cdot 10^3 = 3,6$, $p_H = 3,5$.

Versuch 5.

Wie im Versuch 1, aber 2 ccm Acetatpuffer (0,2 N, $p_H = 4,1$)
anstatt verd. Schwefelsäure.

Zeit in Stunden	AgNO ₃ ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
1	9,0	59,4	14
2	6,0	73,0	12
3	4,5	79,7	12
5	3,2	85,6	10
6	2,75	87,6	11
7	2,5	88,7	11
21	1,55	93,0	
47	1,3	94,1	
70	1,25	94,4	
120	1,2	94,6	

Mittel: $k \cdot 10^3 = 12$, $p_H = 4,1$.

Versuch 6.

Wie im Versuch 1, aber 0,03 ccm Natriumhydroxydlösung
anstatt verd. Schwefelsäure.

Zeit in Stunden	AgNO ₃ ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
0,15	13,3	42,7	50
0,4	7,4	68,1	56
0,75	4,5	80,6	56
0,92	3,8	83,6	56
1,6	2,7	88,4	37
2	2,3	90,1	37
4,75	1,7	92,7	
24	1,3	94,2	
72	1,2	94,8	

Mittel: $k \cdot 10^3 = 50$, $p_H = 5,3$.

Versuch 7.

Wie im Versuch 1, aber 0,06 ccm Natriumhydroxydlösung
anstatt verd. Schwefelsäure.

Zeit in Stunden	AgNO ₃ ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
0,2	3,15	86,7	326
0,32	2,3	90,1	273
0,5	1,7	92,7	268
0,92	1,5	93,5	
1,5	1,4	94,0	
2	1,4	94,0	
24	1,3	94,4	
72	1,3	94,4	

Mittel: $k \cdot 10^3 = 290$, $p_H = 6,1$.

Versuch 8.

Wie im Versuch 1, aber 0,1 ccm Natriumhydroxydlösung anstatt verd. Schwefelsäure.

Zeit in Stunden	AgNO ₃ ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
0,03	1,6	93,2	4110
0,07	1,6	93,2	2055
0,10	1,5	93,6	1470
0,17	1,5	93,6	
0,5	1,45	93,8	
1,0	1,4	94,0	
1,5	1,3	94,5	
2,0	1,3	94,5	

Mittel: $k \cdot 10^3 = \text{ca. } 2000$, $p_H = 8,0$.

Versuch 9.

Die Wirkung des Emulsins bei der Synthese. (Vers. 9—13).

Wie im Versuch 1, aber 0,2 g Emulsin anstatt verd. Schwefelsäure.

Eine nach Verlauf von 22 Stunden filtrierte Probe vom Reaktionsgemisch gab eine Drehung von $+1,0^\circ$, nach Verlauf von 100 Stunden gab eine neue Probe die Drehung von $+0,6^\circ$ (1 dm-Rohr).

Zeit in Stunden	AgNO ₃ ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	$k \cdot 10^3$ berechnet
0,15	16,5	29,0	16
0,75	9,2	60,4	22
1,5	6,0	74,2	18
3	3,5	84,7	18
4	2,7	88,4	21
7	1,8	92,3	15
22	1,2	94,8	
30	1,15	95,0	
100	1,15	95,0	

Mittel: $k \cdot 10^3 = 18$, $p_H = 4,4$.

Versuch 10.

Wie im Versuch 1, aber 0,1 g Emulsin und 0,14 ccm verd. Schwefelsäure.

Drehung nach 2 Stunden $+0,1^\circ$, nach 50 Stunden noch unverändert.

Zeit in Stunden	AgNO ₃ ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	k · 10 ³ berechnet
18	21,5	10,2	0,06
23	21,5	10,2	0,05
43	20,6	13,9	0,04
67	17,5	26,9	0,05
91	16,4	31,5	0,05
117	15,3	36,1	0,05

Mittel: $k \cdot 10^3 = 0,05$, $p_H = 2,9$.

Versuch 11.

Wie im Versuch 1, aber 0,1 g Emulsin und 0,1 ccm. verd. Schwefelsäure.

Drehung + 0,1° (nach 20 Stunden).

Zeit in Stunden	AgNO ₃ ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	k · 10 ³ berechnet
4	22,3	7,0	0,18
19	19,4	19,0	0,12
24	18,9	21,1	0,15
41	17,3	27,8	0,07
67	14,9	37,8	0,09
90	13,0	45,8	0,10
115	11,55	51,8	0,09
138	10,8	54,9	0,09
162	9,6	59,9	0,11

Mittel: $k \cdot 10^3 = 0,11$, $p_H = 3,0$.

Versuch 12.

Wie im Versuch 1, aber 0,1 g Emulsin und 0,06 ccm verd. Schwefelsäure.

Drehung + 0,15° (nach 20 Stunden).

Zeit in Stunden	AgNO ₃ ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	k · 10 ³ berechnet
3	20,9	12,9	0,3
17	16,4	31,6	0,2
19	15,9	33,7	0,2
24	14,3	40,4	0,3
41	11,45	52,3	0,2
67	8,35	65,2	0,3
90	6,7	72,1	0,3
115	5,5	77,1	0,3
138	4,6	80,8	0,4
162	4,1	82,9	0,3

Mittel: $k \cdot 10^3 = 0,3$, $p_H = 3,1$.

Versuch 13.

Wie im Versuch 1, aber 0,1 g Emulsin und 0,03 ccm verd. Schwefelsäure.

Drehung + 0,2° (nach 20 Stunden).

Zeit in Stunden	AgNO ₃ ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden	k · 10 ³ berechnet
2	16,5	31,2	2,3
3	14,9	37,9	2,2
17	5,4	77,5	2,0
19	4,8	80,0	2,1
22	4,6	80,8	2,2
41	2,35	90,2	2,2
67	1,55	93,5	2,2
90	1,2	95,0	2,1
115	1,15	95,2	
138	1,15	95,2	

Mittel: $k \cdot 10^3 = 2,2$, $p_H = 3,4$.

Versuch 14.

Dasselbe Gleichgewicht wird bei Dissoziation und bei Assoziation erhalten.

Dissoziation.

Reaktionsgemisch: 20 ccm (= 20,67 g) C₆H₅CHO + 141,8 ccm HCN (1,37 N) + 0,1 ccm Natriumhydroxydlösung.

Nach 24 Stunden durch Titrierung (2 ccm; 1,2 ccm AgNO₃) 95,1% gebundenes HCN gefunden.

Vom Gemisch wurden 20 ccm mit Alkohol zum Volumen 200 ccm versetzt.

Tit. Volumen: 10 ccm.

Zeit in Stunden	AgNO ₃ ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden
3	1,5	87,8
21	1,55	87,4
29	1,55	87,4
46	1,55	87,4

Das Gleichgewicht bei Dissoziation wurde folglich bei 87,4% gebundenes HCN erreicht.

Assoziation.

Reaktionsgemisch: $\frac{20 \cdot 20,67}{161,9}$ g C₆H₅CHO + $\frac{20 \cdot 141,8}{161,9}$ ccm

HCN (1,37 N) + Alkohol zum Volumen 200 ccm.

Tit. Volumen: 10 ccm.

Zeit in Stunden	AgNO ₃ ccm verbraucht	HCN Proz. gebunden
3,5	2,5	79,2
29	1,5	87,5
46	1,5	87,5

Es wurde folglich auch bei Assoziation dasselbe Gleichgewicht wie bei Dissoziation erhalten.

Versuch 15.

Der Zusammenhang zwischen Acidität und Dissoziationsgeschwindigkeit.

Von dem Reaktionsgemisch im Versuch 14, mit 95,1% gebundenem HCN, wurden zwei Proben von je 10 ccm in Alkohol zu 100 ccm gelöst.

Die Lösungen wurden mit einem Tropfen von Natriumhydroxyd (I), bzw. Schwefelsäure (II), versetzt. Titr. Volumen: 10 ccm.

Lösung I.

Zeit in Stunden	AgNO ₃ ccm verbr.	HCN Proz. geb.
0,02	1,55	87,4
6	1,55	87,4
22	1,55	87,4

$$p_H = 7,5 .$$

Lösung II.

Zeit in Stunden	AgNO ₃ ccm verbr.	HCN Proz. geb.
0,02	0,5	95,1
6	0,5	95,1
22	0,9	92,7

$$p_H = 2,9 .$$

In einer beinahe neutralen Lösung ($p_H = 7,5$) wird folglich bei Dissoziation das Gleichgewicht unmeßbar schnell, in einer sauren Lösung ($p_H = 2,9$) dagegen sehr langsam erreicht.

Versuch 16.

Bestimmung der Kontraktion.

5 ccm C₆H₅CHO und 36,7 ccm HCN (1,32 N) wurden in einem in Kubikzentimetern gradiertem Rohre vermischt und 0,1 ccm Natriumhydroxydlösung zugefügt, um die Synthese zu beschleunigen. Nach Verlauf von 20 Stunden wurde das Volumen abgelesen, wobei gefunden wurde, daß eine Kontraktion von 1,0 ccm stattgefunden hatte, 2,4% vom anfänglichen Volumen entsprechend. Das Volumen verblieb dann unverändert.

Diese Kontraktion vermehrt die Prozentziffern des gebundenen Cyanwasserstoffs nur mit höchstens einer Einheit in der ersten Dezimalstelle, weshalb sie hier nicht berücksichtigt worden ist.

Versuch 17.

p_H -Bestimmungen.

Substanz	Lösungs- mittel	p_H	Bestimmungs- methode
Alkohol	Alkohol	7,9	Elektrometrisch
Benzaldehyd (2 ccm B. + 20 ccm Alk.)	Alkohol	4,7	Elektrometrisch
Cyanwasserstoff (1,32 N)	Alkohol	6,0	Kolorimetrisch
Emulsin	Alkohol	7,0	Elektrometrisch
Magnesiumsulfat (gesättigte Lösung)	Wasser	7,0	Elektrometrisch
Kupfersulfat (verd. Lösung)	Wasser	ca. 6	Kolorimetrisch

Nachdem die Acidität der Benzaldehydlösung zu $p_H = 4,7$ bestimmt war, wurde diese langsam (während einer Stunde) durch einmalige Entleerung einer Bürette in ein untergestelltes Fläschchen getropft, wonach gefunden wurde, daß p_H sich zu 3,0 vermindert hatte.

Sodann wurde ca. 0,1 g Emulsin zugefügt und das Gemisch geschüttelt. Nach einer Viertelstunde wurde p_H zu 4,9 bestimmt, auf welchem Werte es dann fortwährend verblieb.

IV. Resultate.

Aus dem aus den Versuchen 1–13 gezeichneten Diagramm (Abb. 1) wird sogleich ersichtlich, daß (bei unveränderter Temperatur und Konzentration) die Geschwindigkeit der Synthese von der Acidität der Lösung bestimmt wird. Beim Ansteigen von

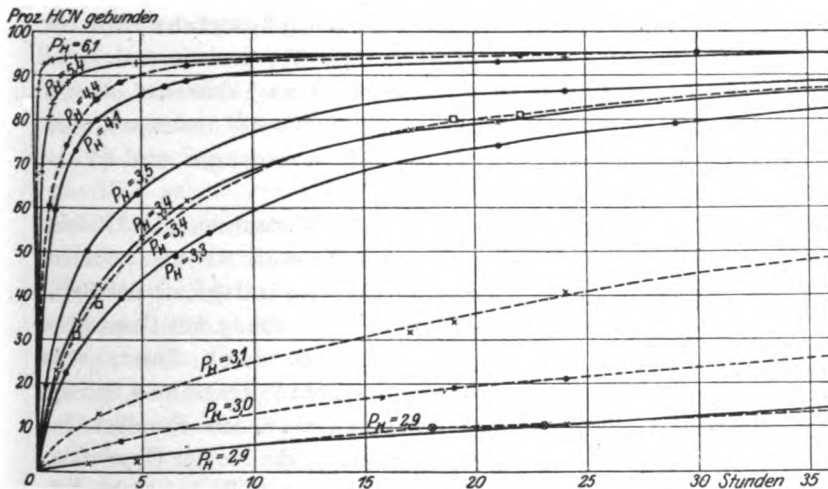


Abb. 1. Die Geschwindigkeit der Oxynitrilsynthese bei verschiedenen Aciditäten. Die Kurven der Versuche bei Gegenwart von Emulsin sind gestrichelt.

p_H von ca. 3 bis ca. 6 vermindert sich die Reaktionszeit von etwa zwei Monaten bis zu einer Stunde, d. h. die Geschwindigkeit wird dadurch außerordentlich vergrößert, um bei Neutralität der Lösung unmeßbar groß zu werden.

Der genannte Zusammenhang zwischen Acidität und Geschwindigkeit geht auch aus folgender Zusammenstellung hervor:

p_H	2,9	3,0	3,1	3,3	3,4	3,5	4,1	4,4	5,3	6,1	8,0
$k \cdot 10^3$	0,6	0,11	0,3	1,4	2,2	3,6	12	18	50	290	2000

Mit diesen Zahlen ist die Kurve in Abb. 2 gezeichnet.

Auch bei der Dissoziation findet man einen derartigen Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit und Acidität (Versuch 15).

In einer genügend sauren Lösung ($p_H = \text{ca. } 3$) verläuft sowohl die Bildung wie die Spaltung des Oxynitrils äußerst langsam.

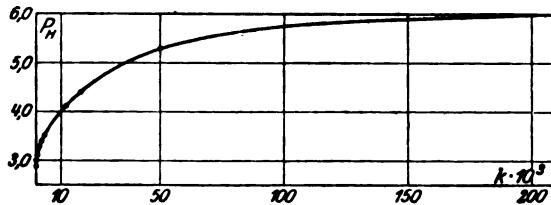


Abb. 2. Der Zusammenhang zwischen Acidität und Reaktionsgeschwindigkeit bei der Oxynitrilsynthese.

Das früher oder später erreichte Gleichgewicht wird bei allen Synthesen praktisch dasselbe, falls Temperatur und Konzentration unverändert sind. Es verbleibt auch dasselbe, ob von dem Oxynitril, das sich beim Verdünnen teilweise dissoziiert, oder von Benzaldehyd und Cyanwasserstoff, ausgegangen wird (Versuch 14).

Der Zusatz von Emulsin hat keine Veränderung im Gleichgewicht zur Folge. Dagegen wird von Emulsin, wie von anderen Substanzen, die p_H vermehren, die Geschwindigkeit der Synthese entsprechend vergrößert. In einer Mischung mit Geschwindigkeitskonstante $k \cdot 10^3 = 3,6$ wird z. B. durch Zusatz von 0,2 g Emulsin diese auf dem Werte 18 erhöht (Versuche 4 und 9). Der Grund ist, daß das Emulsinpräparat, wie andere Eiweißstoffe, die Säure (Benzoesäure) zu binden vermag, die bei der Oxydation des Aldehyds gebildet wird; diese Bildung geschieht bei reichlicher Luftzufuhr sehr schnell (Versuch 17).

Außerdem wirkt Emulsin dahin, daß die Produkte optisch aktiv (asymmetrisch) gefunden werden (Versuche 9—13).

V. Besprechung der Theorie von Rosenthaler und anderen.

Wenn die von mir gefundenen Resultate mit den Befunden und Annahmen von Rosenthaler verglichen werden, scheint es mir, als wären seine Ansichten und Erklärungen über die „enzymatische“ Wirkung des Emulsins im Falle des Oxynitrilgleichgewichts nicht haltbar. Es können jetzt einfachere Erläuterungen gegeben werden, wobei die genannten Wirkungen des Emulsins nicht als enzymatische aufgefaßt zu werden brauchen.

1. Die Zunahme der Geschwindigkeit der Synthese wird jetzt ungedrungen darauf zurückgeführt, das das Emulsinpräparat mehr oder weniger von der freien Benzoesäure des Reaktionsgemisches bindet, wodurch p_H , und damit die Reaktionsgeschwindigkeit, vergrößert wird.

2. Die Zunahme der Menge des Oxynitrils bei Anwesenheit von Emulsin hat ihren Grund darin, daß das Gleichgewicht in diesem Falle, wo ja die Benzoesäure vom Emulsin gebunden wird, früher erreicht wird als in einem Gemisch, wo die anwesende Säure die Reaktion verzögert.

Weder die erstere Zunahme noch die letztere braucht also als ein enzymatischer Effekt angesehen zu werden.

3. Das „syn-Emulsin“, welches erhalten wird, wenn Emulsin zuerst mit Säuren und dann mit Alkali bis zur Neutralisation behandelt wird, beschleunigt die Synthese schlechthin, weil dann der Neutralitätspunkt ($p_H = \text{ca. } 7$) erreicht ist und folglich der Säuregrad so unmerklich, daß die Synthese außerordentlich schnell verläuft. Die Wirkung dieses Präparates ist mithin keine enzymatische.

4. Rosenthalers „dia-Emulsin“, welches er dadurch erhalten hat, daß Emulsin mit Lösungen von Kupfersulfat oder Magnesiumsulfat behandelt wird, und welches das Oxynitril schnell zerlegt, verliert auch ihre enzymatische Mystik. Denn durch die geringe Acidität ($p_H = 6-7$) in diesen Lösungen — von welchen, sehr bezeichnend, Rosenthaler das fragile Enzym niemals trennen konnte — wird das zugeführte Oxynitril (z. B. aus gespaltenem Amygdalin) schnell dissoziiert und ein neues Gleichgewicht erhalten, wobei natürlicherweise etwas Cyanwasserstoff

entbunden wird. Daß das Kupfersulfat nicht immer geeignet war, wird daraus erklärt, daß es etwas mehr sauer ist als das Magnesiumsulfat (Versuch 17).

Die Annahme Aulds¹⁾, daß die auffallend stark verzögernde Wirkung des Aldehyds bei der Spaltung des Substrates eine Giftwirkung der Atomgruppe —CHO sei, wird jetzt ganz einfach auf die durch Oxydation des Aldehyds vergrößerte Acidität zurückgeführt.

5. Im Zusammenhang mit dem dia-Emulsin wurde erwähnt, daß Armstrong und Horton²⁾ in Emulsin u. a. auch ein Oxynitril spaltendes Enzym, Benzocyanase, von Rosenthaler Oxynitrilase genannt, angenommen hatten. Ihr Grund hierfür war, daß Schwefelsäure, nach Walker und Krieble³⁾, aus Amygdalin, Benzoxynitril lostrennt, ohne daß diese Substanz dann weiter zerlegt wird, und daß, nach Ultée⁴⁾ das Oxynitril viel beständiger ist als vorher angenommen war. Weil also das (in saurer Lösung) sehr stabile Oxynitril in Gegenwart von Emulsin zerlegt wird, soll, nach Armstrong und Horton, darin ein Oxynitril spaltendes Enzym stecken. Ultée hat aber gezeigt, daß die Stabilität des Oxynitrils nur bei Überschuß von Säure vorhanden ist, welches mit dem Befunde von Walker und Krieble übereinstimmt, während in neutraler Lösung, nach Wirth⁵⁾ und nach meinem Versuche 15, Spaltung schnell von selbst eintritt. Man braucht also nicht die Annahme eines speziellen Enzymes, um zu erklären, warum Benzoxynitril in Lösung gespalten wird.

6. Der einzige spezifische Effekt, den Emulsin auf eine Mischung von Benzaldehyd und Cyanwasserstoff ausübt, ist die Asymmetrie des entstandenen Oxynitrils. Prinzipiell würde dieses Verhalten zur Annahme eines Enzymes nicht nötigen, wie Fajans⁶⁾ ausführlich dargelegt hat. Es ergibt sich jetzt die Aufgabe, quantitativ zu erforschen, in welcher Weise sich eine solche nichtenzymatische, asymmetrische Wirkung über die symmetrische Synthese superponiert.

¹⁾ l. c.

²⁾ l. c.

³⁾ Journ. Chem. Soc. Trans. **95**, 1437. 1909.

⁴⁾ l. c.

⁵⁾ l. c.

⁶⁾ l. c.

Zusammenfassung.

I. Sämtliche symmetrisch-kinetischen Wirkungen, welche bei der Oxynitrilbildung einem synthetischen Enzyme zugeschrieben worden sind, lassen sich einfach, ohne Einführung besonderer Hypothesen, als Aciditätswirkungen erklären.

Für diese Wirkungen wird die Annahme eines synthetischen Enzymes „syn-Emulsin“ oder „Oxynitrilase“ folglich überflüssig und hinfällig, und die betr. „Enzyme“ können aus der Reihe der enzymatischen Katalysatoren gestrichen werden.

II. Gegen die Existenz einer Oxynitrilase (Benzocyanase) dürften meine Versuche 14 und 15 sprechen. Der Beweis von Armstrong und Horton kann nicht als entscheidend angesehen werden.

In welchem Grad die Oxynitrilsynthese, bzw. die Oxynitrilspaltung, wenn sie unter Einwirkung eines Emulsinpräparates verläuft, auf einen asymmetrischen, nicht enzymatischen Katalysator im Sinne Fajans' zurückgeführt werden kann, und ob man ohne Annahme eines Oxynitril spaltenden (asymmetrischen) Enzyms auskommt, hoffe ich in meiner nächsten Mitteilung erläutern zu können.

Nachtrag.

Nach Erledigung der 1. Korrektur ist im Januarheft 1921 des Journal Americ. Chem. Society eine Untersuchung von Krieble und Wieland: "The properties of oxynitrilase" zu meiner Kenntnis gekommen. Die genannten Autoren sind zwar auf Grund einiger Versuche ebenfalls zur Ansicht gelangt, daß die Acidität für die Oxynitrilsynthese eine wesentliche Rolle spielt, haben aber trotzdem die Wirkung des Rosenthalerschen Enzympräparates nicht auf die Acidität zurückführen können.

Schwankungen im Chlorid-Stoffwechsel unter dem Einfluß der menstruellen Vorgänge.

Von

W. Eisenhardt und R. Schaefer.

(Aus der Medizinischen Universitätsklinik Königsberg Pr.)

(Eingegangen am 4. März 1921.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Bei seinen Untersuchungen über intermediäre Veränderung im Chloridstoffwechsel¹⁾ kommt Veil zu den Ergebnissen, daß unter normalen Verhältnissen und gleichbleibender Ernährung der prozentuale Chloridgehalt des Blutserums wesentlichen Schwankungen nicht ausgesetzt sei, die individuellen Schwankungen bewegen sich zwischen 0,643 und 0,602%. Die Schwankungsbreite betrage also 0,041%. Mit höherem Eiweißwert sinke meistens der Chloridwert. Diese ziemlich konstanten Verhältnisse nimmt er als Ausgangspunkt bei seinen weiteren Untersuchungen über Störungen des intermediären Chloridstoffwechsels.

Unsere eigenen Untersuchungen, die in dieser Richtung, jedoch ursprünglich zu anderen Zwecken an Frauen angestellt wurden, führten zu merkwürdigen Befunden, die bei näherer Nachprüfung sich in gewisser Regelmäßigkeit wiederholten.

Wir gingen in ähnlicher Weise wie Veil vor, indem wir den Chloridgehalt des Gesamtblutes und des Blutserums gleichzeitig mit dem refraktometrischen Wert des Serums feststellten. Die Chloridbestimmungen wurden nach der Bangschen Mikromethode gemacht. Dabei wurden ausschließlich doppelte, meistens jedoch dreifache Bestimmungen verwertet, die unter einander vorzügliche Übereinstimmung ergaben. Die Untersuchungen wurden an ruhenden, nüchternen Frauen früh morgens ausgeführt. Es wurde

¹⁾ Diese Zeitschr. 91, 267. 1918.

Wert darauf gelegt, nur die Ergebnisse bei solchen Patientinnen zu verwerten, deren Leiden nach den Veilschen Untersuchungen keine Verschiebungen im Chloridstoffwechsel erwarten ließen. Die Bestimmungen wurden möglichst über zwei bis drei Wochen ausgedehnt.

Die von uns erhobenen Chloridwerte im Serum lagen höher als die Veilschen. Im allgemeinen bewegten sich die niedrigsten um 0,610%. Was dagegen die höchsten Werte betrifft, so ergaben sich um die Zeit der Menses auffällige Ausschläge nach oben, die begleitet waren von ausgesprochenen Veränderungen des Serum-eiweißgehaltes. Während bis kurz vor Einsetzen der Menses und bald nach Aufhören derselben die Chlorid- sowohl wie die Serum-eiweißkurve keine großen Schwankungen aufwiesen, setzte um die Zeit der Menses ein bemerkenswerter Anstieg ein. Dieser Anstieg wurde entweder einige, meistens ein bis zwei Tage vor Beginn der Menses oder in den ersten beiden Menstruationstagen beobachtet. Begleitet war er

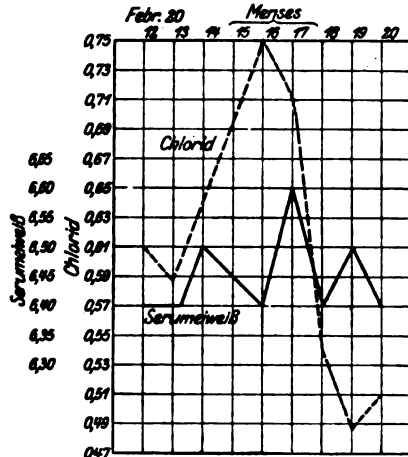


Abb. 1 (Typus I) Patientin H.

in den meisten Fällen von einem Absinken des Eiweißgehaltes des Serums. In diesen Fällen handelte es sich also um eine absolute und relative Hyperchlorämie. Dabei trat fast immer gegen Ende der Menses eine Umkehr im Verhalten ein: die Plethora sank ab, nicht selten mit geringem Ausschlag unter die Norm. Danach trat Rückkehr zu den ursprünglichen Verhältnissen ein. Dieses Verhalten, das wir als Typus I bezeichnen möchten, wurde am häufigsten beobachtet. Aus nebenstehender Kurve I sind die eben geschilderten Verhältnisse ersichtlich. Es handelt sich hierbei um einen Ausschnitt aus einer von uns gemachten Beobachtung, die aus einer Reihe von 15 Fällen als besonders charakteristisch herausgegriffen wurde. Viel seltener wurde ein anderer Verlauf beobachtet, den wir als Typus II be-

zeichnen wollen. Hierbei tritt gleichzeitig mit Einsetzen der Hyperchlorämie ein Anstieg des Serum-Eiweißgehaltes ein, die Hyperchlorämie ist also nur eine relative. Kurve II zeigt das Bild einer solchen Bluteindickung. Zeitlich fiel der Anstieg auch hier entweder vor Mensesbeginn oder in die ersten beiden Tage der Menstruation. Die Geschwindigkeit, mit der der Chloridanstieg erfolgte, war in den einzelnen Fällen sehr verschieden; während der Chloridgehalt in einigen Fällen schnell in 1–2 Tagen zunahm, war in anderen, wie z. B. Kurve II zeigt, der Anstieg ein allmählicher, während mehrerer Tage.

Von Interesse dürfte es sein, daß wir für jeden der oben geschilderten Typen über je eine Beobachtung an Patientinnen verfügen,

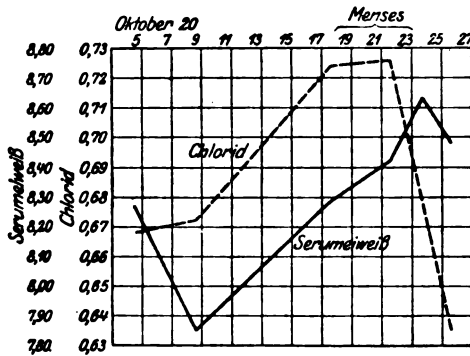


Abb. 2 (Typus II) Patientin K.

bei denen während der Zeit der erwarteten Menses die beschriebenen Schwankungen eintraten, obgleich die genitalen Blutungen ausblieben. Die Untersuchte, bei der der Ablauf der Kurve sich nach Typus II gestaltete, hatte zu Beginn des Menses-termins sehr heftiges

Nasenbluten; genau 4 Wochen später war die Periode normal, leider aber konnte das Verhalten des Chloridstoffwechsels während dieser Zeit nicht wieder beobachtet werden.

Ganz erhebliche Schwankungen zeigten sich bei einem Falle von Epilepsie. Ein Krampfanfall, der genau eine Woche vor Beginn der Menses auftrat, war verbunden mit starkem Absinken des Chloridwertes von 0,665 auf 0,620%, dem ein Abfall des refraktometrisch festgestellten Serum-Eiweißwertes parallel ging. Der zweite Anfall traf mit dem Einsetzen der Menses zusammen. Hierbei ergab sich eine Kurve vom oben geschilderten Typus I. Die Kranke befand sich während des fast vierwöchigen Aufenthaltes in der Klinik unter kochsalzärmer Diät. Wie weit dieser allein-stehende Befund sich zu diagnostischen Zwecken verwerten läßt, müssen weitere Untersuchungen an umfangreichem Material ergeben.

Daß zur Zeit des Prämenstruums und der ersten Tage der einsetzenden Menstruation Veränderungen im Stoffwechsel vorkommen, war bereits durch eine Reihe von Arbeiten festgestellt. So berichtet Kahler (Wiener klin. Wochenschr. 1914, Nr. 15) über einen Anstieg des Blutzuckers kurz vor oder mit Eintritt der Periode, der von einer Rückkehr zur ursprünglichen Höhe mit aufgehörenden Menses gefolgt war. Bell und Hick (Brit. med. Journal 1909) berichten über einen Calciumanstieg im Blut kurz vor Einsetzen der menstruellen Blutung. Marcus (Berliner klin. Wochenschr. 1907, Nr. 16 und 17) konnte am 1. und 2. Menstruationstage ein Sinken des Serumeiweißwertes auf refraktometrischem Wege feststellen, ein Befund, der dem unrigen bei Typus I entspricht.

Mit diesen früheren Befunden stehen unsere Ergebnisse in gutem Einklang. Man gewinnt den Eindruck, daß es sich hierbei um parallel verlaufende Vorgänge handelt, die aus gleicher Ursache bedingt sind. Naheliegend ist es, zuerst diese Vorgänge als eine Folge des stattgefundenen Blutverlustes zu erklären.

Betrachten wir den Einfluß des Aderlasses oder einer stärkeren Blutung auf die Blutzusammensetzung, so sehen wir eine reaktive Hydrämie, verbunden mit Hyperchlorämie und Hyperglykämie (Veil, *Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk.* 15. 1917). Auch wir fanden die Hyperchlorämie und in den meisten Fällen eine Hydrämie. Das Bild würde durch die Kahlerschen und Marcusschen Befunde im Sinne einer Blutverlustfolge vervollständigt. Daß alle diese Erscheinungen mehrfach schon vor Ausbruch der eigentlichen Genitalblutung, während des Prämenstruums, den Höhepunkt erreicht haben, würde nicht unbedingt gegen die Deutung einer Blutverlustfolge sprechen, wenn man die prämenstruellen Vorgänge am Uterus berücksichtigt. Eine andere Frage ist es jedoch, ob der eintretende Blutverlust tatsächlich ein so großer ist, daß er die Konzentration des Capillarblutes der Hand wesentlich beeinflussen könnte. Nach den verschiedenen Untersuchungen zu der Frage des Blutverlustes (*Literatur s. bei Schickele, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk.*) scheint die Menge des Blutverlustes bei der Menstruation nur in den seltensten Fällen etwa 150 ccm zu betragen, ein Quantum, bei dem nach Veils Untersuchungen sich eben noch die Hydrämie und Hyperchlorämie bemerkbar machen. Unsere oft recht hohen Chloridwerte können also wohl nicht eine alleinige Folge des Blutverlustes sein. Andererseits haben wir ja auch in Typus II Fälle vor uns, die eine Hydrämie vollkommen vermischen lassen, bei denen sogar eine vorübergehende Eindickung des Blutes festzustellen war.

Hierdurch werden wir zu der Annahme gedrängt, daß, wenn überhaupt Ausgleichsvorgänge infolge des Blutverlustes eine Rolle spielen, daneben doch innersekretorische Beeinflussung des intermediären Stoffwechsels angenommen werden muß.

Diese Annahme wird durch die verschiedenen Beobachtungen anderer Untersucher über die wechselnden Vorgänge im weiblichen Körper, die auf innersekretorische Einflüsse hinweisen, gestützt. So berichtet z. B. *ver Eke* (zitiert nach *Schickele*) über erhöhte Harnstoff-Phosphat- und Chloridausscheidung zu Beginn der prämenstruellen Zeit. *Plantengu* und *Filippo*¹⁾ untersuchten die Frauenmilch zur Zeit des Einsetzens der Menstruation und fanden einen vermehrten Chloridgehalt und höheren Milchzuckerwert während dieser Zeit.

Das Nächstliegende wäre natürlich, eine direkte Ovarialwirkung anzunehmen, doch könnte man im Hinblick auf die Veränderungen im Chloridstoffwechsel auch an Thyreoideawirkung denken. Aber durch die *Veilschen* Untersuchungen ist nachgewiesen, daß Schilddrüsensekret keine Hyperchlorämie hervorruft. Bei drei Fällen wurden mit den Blutuntersuchungen gleichzeitig die renalen Chloridausscheidungen bestimmt. Eindeutige Ergebnisse, die auf eine vermehrte Ausscheidung kurz vor oder während der Menses schließen lassen, wurden nicht ermittelt, so daß wir nach dieser Richtung hin keinen Anhaltspunkt für Thyreoideawirkung finden konnten.

Weitere Untersuchungen müßten ergeben, wie weit Extrakte des Ovariums oder anderer Organe mit innerer Sekretion die von uns beobachteten und oben geschilderten Vorgänge auszulösen vermögen.

Zusammenfassung.

1. Ein bis zwei Tage vor Eintritt oder in den ersten beiden Tagen der Menses wurde in der Mehrzahl der Fälle absolute und relative, in einigen wenigen Fällen jedoch nur eine relative Hyperchlorämie beobachtet.

2. Mit Aufhören der Menses tritt Rückkehr des Chloridgehaltes zur Norm ein.

3. Diese Schwankungen wurden auch bei zwei Fällen von vorübergehender Amenorrhoe zur Zeit des Menses termines festgestellt.

4. Möglicherweise handelt es sich bei den beobachteten Vorgängen neben dem einfachen Ausgleich nach erfolgtem Blutverlust um innersekretorisch bedingte Verschiebungen im Stoffwechsel.

¹⁾ Zeitschr. f. Kinderheilk. 14, 106. 1916.

Über das Schicksal parenteral verabreichten Schwefels und seinen Einfluss auf den Stoffwechsel.

Von

Robert Meyer-Bisch und E. Basch.

(Aus der Medizinischen Universitätsklinik Göttingen.)

(Eingegangen am 7. März 1921.)

Eine günstige Beeinflussung gewisser chronischer Gelenkleiden durch parenterale Schwefeltherapie, die wir an unserer Klinik beobachteten und über die der Eine von uns an anderer Stelle berichtet, gaben uns Veranlassung, uns über die Ausscheidungsbedingungen des in dieser Weise einverleibten Schwefels durch den Harn zu unterrichten, besonders da defartige Untersuchungen nur über den peroral verabreichten Schwefel vorliegen.

Seitdem Krause im Jahre 1853 in Dorpat seine Dissertation „De transitu sulfuris in urinam“ veröffentlichte, ist die Frage nach dem Schicksal des dem Organismus zugeführten Schwefels Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Ihre Klärung konnte allerdings erst von dem Augenblick an mit einer gewissen Aussicht auf Erfolg in Angriff genommen werden, in dem die zur Zeit von Krause noch sehr primitiven Kenntnisse über die chemische Bedingungsform des Schwefels im Harn sich durch die Erkenntnis der physiologischen Bedeutung des von Salkowski Neutralschwefel genannten Komplexes verschiedenartigster Verbindungen vertieften. Die Versuche über den Verbleib des zugeführten Schwefels wurden in überwiegender Weise so angestellt, daß eine gewisse Menge Schwefel verabreicht und im Anschluß daran der Gehalt des Harnes an anorganischer, an Ätherschwefelsäure und an Neutralschwefel untersucht wurde. Da der Schwefel stets per os gegeben wurde, so stand natürlicherweise neben der Ausscheidungsform des Schwefels die Art seiner Aufnahme durch den Darm im Vordergrund des Interesses. Lange Jahre war die Auffassung der Dorpater Schule, daß Schwefel als Sulfit die Darmwand passiere, die allein herrschende; von den bekannteren Untersuchern wurde sie zuerst von Regensburger bekämpft. Der von Roesing und Nasse, besonders aber von Heffter und Haussmann geführte, in neuester Zeit von Sabatani bestätigte Nachweis, daß Schwefel in Berührung mit Eiweiß und zwar, wie Heffter nachwies, durch den Einfluß eines eiweißhaltigen Be-

standteiles der Darmwand, zu Schwefelwasserstoff wird und als solcher zur Resorption gelangt, zeigte jedoch das Irrtümliche der bisherigen Auffassung.

Das weitere Schicksal dieses Schwefelwasserstoffes von seiner Aufnahme ins Blut bis zu seinem Übergang in den Urin ist noch in völliges Dunkel gehüllt; ein Umstand, der bei der Stellung des Schwefels im Aufbau des Eiweißmoleküls und bei der Schwierigkeit der Trennung von endogenem und exogenem Schwefelstoffwechsel ohne weiteres begreiflich erscheint.

Sehr viel mehr wissen wir über die verschiedenen Verbindungen, in denen von außen zugeführter Schwefel — es ist hier immer nur von peroraler Zufuhr die Rede — im Harn erscheint. Regensburger, Salkowski, Presch, Maillard, Etzinger, in neuerer Zeit Kojo, Kenji, Konohegg, Nevinny, Izar haben diese Frage durch zahlreiche Analysen zu klären versucht. Von dem zugeführten Schwefel wurden in der Regel zwischen 10 und 46% resorbiert und durch den Harn ausgeschieden. Wenn sich auch absolut konstante Verschiebungen bei den einzelnen Autoren nicht feststellen lassen, — besonders über die Frage der Stärke der Neutralschwefelvermehrung und über die Beziehungen des Neutralschwefels zum Sulfatschwefel besteht keine Übereinstimmung — so geht doch aus den meisten Untersuchungen soviel hervor, daß die Ausscheidungssteigerung in erster Linie als Sulfatschwefel, in zweiter als Neutral- und in dritter als Ätherschwefel erfolgt. Gleichzeitige Untersuchungen über den allgemeinen Stoffwechsel nach Schwefelaufnahmen sind selten. Nur Regensburger, Konohegg und Nevinny beobachteten den Stickstoffumsatz und fanden ihn unverändert. Daß bisher im Gegensatz zu der Häufigkeit enteraler Schwefelstoffwechseluntersuchungen jegliche systematische Untersuchung über das Schicksal parenteral verabreichten Schwefels fehlt, mag wohl daran gelegen haben, daß bis vor kurzer Zeit eine klinische Indikation zu dieser Applikationsweise so gut wie gar nicht existierte.

Angeregt durch den oben erwähnten therapeutischen Eingriff und in Anbetracht der bisherigen Unklarheit dieser Frage haben wir versucht, über die Ausscheidungsform des in dieser Weise zugeführten Schwefels und über seinen Einfluß auf den Stickstoff-, Kochsalz- und Wasserstoffwechsel Aufschluß zu erhalten. Die in Betracht kommenden Patienten wurden vor der Injektion — es wurden 10 ccm einer 1proz. Lösung von Sulf. depur. und ol. oliv. intramuskulär injiziert — in Stickstoff- und Kochsalz-Gleichgewicht gebracht; im 24stündigen Urin wurde Gesamtstickstoff nach Kjeldahl, Chlor nach Mohr bestimmt. Gleichzeitig wurde der Gehalt an Gesamtschwefel nach Folin, Gesamtschwefelsäure (anorganische Schwefelsäure plus Ätherschwefelsäure) und an Ätherschwefelsäure nach Salkowski bestimmt. Außerdem wurde

der Urin auf das Vorhandensein von reduzierenden Substanzen mit Fehlingscher Lösung und auf die Gegenwart von Urobilin untersucht. Zum Nachweis von gepaarter Glukuronsäure wurde die Naphthoresorcinprobe nach Tollens, die neuerdings auf ihre diagnostische Verwertbarkeit von Sabbatini und Lorenzani nachgeprüft und in ihrer diagnostischen Verwertbarkeit bestätigt worden ist, verwandt. Der Ätherextrakt wurde regelmäßig spektroskopisch untersucht. Bei Auftreten der Reduktion wurde polarisiert. Die Reduktion wurde vor und nach Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure untersucht. Die Polarisation des hydrolysierten Urins war wegen der starken Dunkelfärbung nicht möglich, eine Beobachtung, die schon von P. Mayer und Neuberger gemacht wurde. Ein Teil der Patienten wurde regelmäßig gewogen.

Über die klinischen Allgemeinerscheinungen nach Schwefelinjektion wird an anderer Stelle berichtet werden¹⁾. Es soll hier nur darauf hingewiesen werden, daß im allgemeinen nach 12 bis 24 Stunden Fieber auftritt und 1 bis 2 Tage anhält.

Vollständige Schwefel- und Stickstoffanalysen wurden bei drei Patienten, die sich in Stickstoff- und Kochsalzgleichgewicht befanden, in der oben angegebenen Weise ausgeführt. Bei fünf weiteren Kranken wurde lediglich der Einfluß auf die Stickstoff- und Kochsalzbilanz und auf das Körpergewicht beobachtet. Die Untersuchung auf Glykuronsäure und auf Urobilin geschah in 14 Fällen. Ausnahmslos tritt nun zeitlich mit dem Fieber ungefähr zusammenfallend im Urin eine linksdrehende, nicht gärende, Fehlingsche Lösung schon ohne Spaltung reduzierende Substanz auf. In den meisten Fällen nimmt die Stärke der Reduktion nach Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure zu. Entsprechend der Stärke der Reduktion wird der Ätherextrakt bei der Tollenschen Probe violett bis dunkelblau, das spektroskopische Bild ergibt einen Streifen in der D-Linie. Es ist danach der Schluß berechtigt, daß es sich um gepaarte Glukuronsäure handelt.

Gleichzeitig mit dieser Mehrausscheidung von Glukuronsäure steigt der Gehalt des Urins an Urobilin. Die Zeitpunkte ihrer maximalen Ausscheidung fallen jedoch nicht völlig zusammen. Die Urobilinurie erreicht ihren Höhepunkt bald vor, bald nach dem der Glykuronsäure. Stets hält sie aber 2—3 Tage länger an als diese. Mit dem Fieber haben beide den zeitlichen Beginn

¹⁾ Meyer-Bisch, Münch. med. Wochenschr. 1921.

gemeinsam. Die Dauer der Ausscheidung der Glykuronsäure schwankt zwischen 2 und 5 Tagen. Die höchste beobachtete Drehung im Polarimeter war $0,8^\circ$. Die Dauer der Urobilinurie hält dementsprechend länger an. Sie erreicht im allgemeinen sehr beträchtliche Grade.

Die Veränderung der Diurese ist in sämtlichen beobachteten Fällen gesetzmäßig und zwar nimmt sie vom ersten Tag nach der Injektion an in deutlicher Weise ab. Die Verminderung kann sehr beträchtlich sein; in einem Fall betrug die Diurese am Injektionstag 1800 ccm, am übernächsten Tag nur 150 ccm. In einzelnen Fällen, aber nicht regelmäßig, geht dieser ungewöhnlich starken Abnahme eine kurzdauernde, stets auf den Injektionstag beschränkte, geringe Diuresesteigerung voraus. Gleichzeitig mit der Urinmenge sinkt die Kochsalzausscheidung. Die Abnahme der 24stündigen Menge ist stets sehr erheblich, in einem Fall beträgt sie 1,4 g 2 Tage nach der Injektion, gegen 14 g in der Vorperiode. Es geht ihr stets voraus eine oft nur Stunden dauernde und deshalb leicht zu übersehende Ausfuhrsteigerung. Die tiefsten Punkte der Diurese und der Kochsalzausscheidung fallen zeitlich zusammen. In den Fällen, in denen am Injektionstag eine Diuresesteigerung nachweisbar ist, pflegt auch die der Verminderung der Kochsalzausscheidung vorhergehende Vermehrung deutlicher und anhaltender zu sein. Die geschilderten Veränderungen dauern 4 bis 7 Tage an. Das Maximum der Kochsalz- und Wasserretention fällt mit der Temperatursteigerung zeitlich nicht zusammen.

12–24 Stunden nach der Injektion entwickelt sich ein erheblicher Gewichtssturz, Abnahmen von 1500–2000 g sind die Regel. Er wird nicht, wie das bei plötzlichen Wasserverlusten der Fall ist, in wenigen Tagen wieder ersetzt, sondern nur langsam, erst nach mehreren Wochen wieder eingeholt.

Die Stickstoffbilanz zeigt ebenfalls charakteristische Veränderungen, und zwar beginnt mit dem ersten Injektionstag eine an den folgenden Tagen fortlaufend zunehmende Steigerung des Stickstoffumsatzes. Der Höhepunkt wird meist nach 3 oder 4 Tagen erreicht und zwar fällt er in der Regel mit dem größten Tiefstand von Diurese und Kochsalzausscheidung zusammen. Die Zunahme beträgt in der Regel 100–120%. Im ganzen hält die Mehrausscheidung 2–5 Tage an; die negative Bilanz kann für die ganze Versuchsperiode bis zu 19 g betragen.

Ungefähr 7 Tage nach der Injektion sind in bezug auf Diurese, Kochsalz- und Stickstoffausscheidung die Verhältnisse der Vorperiode wieder erreicht, nur der Gewichtsverlust gleicht sich erst in Wochen wieder aus.

Vergegenwärtigt man sich die beschriebenen Veränderungen, so ergibt sich, daß die Ausscheidung von Kochsalz und Urin gleichsinnig, die des Stickstoffs entgegengesetzt verläuft.

Wie schon erwähnt, wurde bei drei Patienten die Ausscheidung des Harnschwefels in ausführlicher Weise untersucht. Es war hiervon nicht nur Aufschluß über das Schicksal des zugeführten Schwefels zu erwarten, sondern wir konnten auch hoffen, über Herkunft und Bedeutung des vermehrten Harn-N wertvolle Fingerzeige zu erhalten.

Bevor wir auf diese Fragen weiter eingehen, wollen wir die einzelnen Tabellen gesondert kurz besprechen.

Fall 1. B. Die Schwefelausscheidung in der Vorperiode beträgt als SO_2 berechnet 1,28 g bei einer Stickstoffausscheidung von 5,31 g. Durch die Schwefelinjektion steigt sie bis zum 3. Tage auf 2,17 g. Gleichzeitig zeigt die Stickstoffausfuhr ihren höchsten Wert von 10,7 g. Von da ab gehen beide sehr rasch zur Norm zurück. An der Zunahme der Schwefelausscheidung sind an den einzelnen Tagen die verschiedenen Schwefelverbindungen in wechselnder Weise beteiligt. Nur am Injektionstage selbst zeigen anorganischer, Äther- und Neutralschwefel eine gleichsinnige geringe Zunahme. Am nächsten Tage wird die Gesamtzunahme allein von dem Neutralschwefel bestritten. Sein prozentualer Anteil an der Gesamtschwefelausscheidung steigt an diesem Tage von 16 auf ca. 60%. Gleichzeitig nimmt der anorganische Schwefel gegen den Vortag fast um die Hälfte ab, der Ätherschwefel sinkt sogar auf den siebenten Teil. Vom dritten Tage ab

Tabelle I.

Fall 1. B.

	Diurese	Gesamt-N	Gesamt-S	Gesamt- SO_2	Sulfat- SO_2	Äther- SO_2	Neutral-S als SO_2	Prozent-Verhältnis zu Sulfat-S
4. IX.	970	5,31	0,516	1,29	0,92	0,075	0,293	18
5. IX.	980	5,31	0,510	1,274	1,135	0,076	0,067	5,26
6. IX.	1410	6,01	0,596	1,489	1,461	0,085	0,237	15,9
I. Injekt.								
7. IX.	700	7,224	0,78	1,950	0,780	0,014	1,155	59,2
8. IX.	800	10,712	0,867	2,168	1,728	0,176	0,256	11,8
9. IX.	600	6,84	0,612	1,530	1,44	0,114	0,029	1,9
10. IX.	1100	4,136	0,446	1,115	1,087	0,128	0	0
11. IX.	1220	5,54	0,739	1,824	1,632	0,212	0	0
12. IX.	1000	6,85	0,776	1,955	1,873	0,069	0,014	0,71

ändert sich das Bild vollkommen. Der Neutralschwefel zeigt jetzt eine fortschreitende wesentliche Abnahme, am 5. und 6. Tage kommt überhaupt kein Neutralschwefel zur Ausscheidung. In derselben Zeit zeigen Sulfat- und Ätherschwefel eine an einzelnen Tagen ganz beträchtliche Zunahme. Am 7. Tage ist die Menge des ausgeschiedenen Ätherschwefels wieder auf den Vorversuchswert zurückgegangen, der Sulfatschwefel zeigt jedoch noch eine deutliche Erhöhung. Der Neutralschwefel ist bei Abschluß des Versuches noch abnorm niedrig.

Fall 2. L. Gesamtschwefelausscheidung in der Vorperiode 1,8 g SO₂ bei einem Stickstoffumsatz von 6,8 g. Am Injektionstag leichte Zunahme der Schwefelausscheidung ohne Steigerung des Stickstoffumsatzes. Am 2. Tage Abnahme von Sulfat- und Ätherschwefel. Der Neutralschwefel nimmt gegen den Vortag leicht zu. Vom 3. Tage ab gleichzeitig Abnahme des Neutralschwefels und Zunahme von Sulfat- und Ätherschwefel. Am 7. Tage sind die Verhältnisse der Vorperiode im allgemeinen wieder erreicht. Am 8., 9. und 10. Tage tritt nochmals eine durch Zunahme des Neutral- zum Teil auch des Ätherschwefels bedingte Mehrausscheidung von Schwefel, ein.

Tabelle II.

Fall 2. L.

	Dtutese	Gesamt-N	Gesamt-S	Gesamt-SO ₂	Sulfat-SO ₂	Neutral-SO ₂	Neutral-SO ₂ in Prozent zu Sulfat-SO ₂	Äther-SO ₂	Gewicht	Reduktion	Mobilien
3. XI.	750	6,858	0,69	1,718	1,461	0,257	15	0,103	—	0	0
4. XI.	800	6,896	0,755	1,888	1,492	0,396	21	0,118	43,0	0	0
5. XI.	1050	5,852	0,813	2,032	1,801	0,231	11	0,104	43,0	+	0
Injekt.											
6. XI.	400	5,414	0,544	1,361	1,088	0,273	20	0,073	42,0	±+	+
7. XI.	490	8,937	0,674	1,684	1,476	0,208	12,4	0,151	42,1	++	++
8. XI.	690	11,956	0,997	2,495	2,343	0,152	6,1	0,152	41,9	++	++
9. XI.	610	7,611	0,684	1,711	1,603	0,108	6,3	0,110	41,5	++	++
10. XI.	900	6,596	0,677	1,692	1,482	0,210	12,4	0,108	41,9	(+)	(+)
11. XI.	1500	6,908	0,687	1,718	1,395	0,323	18,8	0,113	42,3	0	0
12. XI.	1550	5,484	0,714	1,786	1,329	0,457	25,6	0,117	42,0		
13. XI.	2020	6,977	0,976	2,439	1,663	0,776	31,4	0,207	42,2		
14. XI.	1750	5,602	0,864	2,161	1,489	0,672	31	0,219	42,2		
15. XI.	1430	4,778	0,604	1,511	1,305	0,206	13,7	0,123	42,2		

Gesamt-N der Vorperiode:

31. X. 6,564 g.

1. XI. 6,781 g

2. XI. 6,491 g

Nahrung:

8,81 N

1940 Cal.

} ca! (tabellarisch berechnet).

Fall 3. Sch. Durchschnittliche Schwefelausscheidung in der Vorperiode 1,75 g SO₂ bei 5,8 g N. Unter dem Einfluß der Schwefelinjektion erfolgt schon am 1. Tage eine Steigerung auf 2,47 g SO₂, bedingt durch eine gleichzeitige Zunahme von Sulfat-, Neutral- und Ätherschwefel. In den folgenden Tagen nimmt der Neutralschwefel beträchtlich ab und ver

schwindet an einem Tage vollkommen. Gleichzeitig ist die Menge des Sulfat-schwefels deutlich vermehrt, jedoch wird der hohe Wert des Injektions-tages nicht mehr erreicht. Die Vermehrung des Ätherschwefels ist hier stärker, als bei den beiden anderen Fällen. Am 7. Tage nach der Injektion sind die Verhältnisse der Vorperiode wieder erreicht.

Tabelle III.

Fall 3. Sch.

	Dturose	Gesamt-N	Gesamt-S	Gesamt-SO ₂	Sulfat-SO ₂	Neutral-SO ₂	Proz. Neutral zu Gesamt-SO ₂	Äther-SO ₂	NaCl
1. XII.	1450	5,944	0,676	1,690	1,351	0,180	10,6	0,159	—
2. XII.	1050	5,850	0,622	1,556	1,426	0,130	8,3	0,159	4,725
3. XII.	1140	7,762	0,989	2,471	2,170	0,301	12	0,196	9,804
Injekt.									
4. XII.	900	9,205	0,682	1,704	1,476	0,228	13,4	0,247	4,05
5. XII.	700	11,634	0,722	1,806	1,806	0	0	0,202	—
6. XII.	700	11,086	0,715	1,786	1,750	0,036	2,0	0,178	1,05
7. XII.	770	9,340	0,894	2,234	1,948	0,286	12,8	0,161	0,924
8. XII.	450	5,749	0,570	1,426	1,413	0,013	0,9	0,112	—
9. XII.	750	7,287	0,543	1,358	1,150	0,208	15,4	0,136	4,50
10. XII.	1200	6,268	0,728	1,819	1,408	0,411	22,6	0,185	9,96
11. XII.	1050	6,840	0,602	1,506	1,260	0,246	17	0,153	8,61

Gesamt-N der Vorperiode:

28. XII. 6,29 g

29. XII. 7,042 g

30. XII. 5,947 g

Nachperiode:

12. XII. 6,844 N NaCl

13. XII. 4,75 —

14. XII. 6,059 —

16. XII. 5,975 7,64

17. XII. 4,953 8,40

Nahrung: 8,81 N } tabellarisch
1940 Cal. }
NaCl konstant.

Überblickt man die Verhältnisse der Schwefelausscheidung bei den 3 genannten Fällen, so ergibt sich eine weitgehende Übereinstimmung. In allen 3 Fällen ist am ersten Injektionstage die Ausscheidung des Gesamtschwefels merklich erhöht und zwar sind an dieser Vermehrung am 1. Tage in zweien von den 3 Fällen sämtliche Schwefelfractionen in annähernd gleicher Weise beteiligt. Am 2. Tage zeigt der Sulfatschwefel durchweg eine Abnahme, der Neutralschwefel eine Zunahme. Vom 3. Tage ab nehmen Sulfat- und Ätherschwefel in gleichmäßiger Weise zu, der Neutralschwefel nimmt gleichmäßig erheblich ab.

Es ist hauptsächlich diese Verschiebung in der prozentualen und absoluten Neutralschwefelausscheidung, die den besprochenen Tabellen das Gepräge gibt. In Verbindung mit der Zunahme der Gesamt-Schwefel- und Gesamt-Stickstoffausscheidung ist sie ge-

eignet, uns die Deutung der im Harn beobachteten Veränderungen zu erleichtern.

In der Erörterung von Stoffwechselfragen hat der Neutralschwefel von jeher, d. h. seit seiner Entdeckung durch Salkowski, eine wichtige Rolle gespielt. Trotzdem sind unsere Kenntnisse über ihn bekanntlich noch nicht vollständig. Es ist merkwürdig, daß viel eher Übereinstimmung besteht über den prozentualen Anteil des Neutralschwefels am Gesamtschwefel als über seine absolute Menge. Benedikt, Folin finden einen konstanten Wert von 0,18—0,20 g in 24 Stunden — unabhängig von der Nahrung —, Hess dagegen kaum den 20. Teil davon. Die anderen Autoren begnügen sich mit der Feststellung, daß der Sulfatschwefel 1,5—3 g betrage und daß der Neutralschwefel im Verhältnis dazu zwischen 5 und 25% schwanke (Salkowski, Rudenko, Lépine, Stadthagen, Mester, Folin) ohne sich auf eine bestimmte Zahl festzulegen. Wenn wir auch den bekannten und allgemein anerkannten Untersuchungen von Benedikt, Folin, Weiß u. a. unsere Kenntnis über den exogenen und endogenen Eiweißstoffwechsel und über die Beziehungen des Neutralschwefels zu letzterem verdanken, so bleiben doch eine ganze Reihe von Fragen ungeklärt. Benedikt stellt den Satz auf, daß der Neutralschwefel eine nur in geringen Grenzen variable Größe darstelle, deren Schwankungen nur prozentualer Natur und durch die Schwankung der dem exogenem Stoffwechsel entsprechenden Sulfatschwefelsäure bedingt seien. Nach ihm bleibt die Gültigkeit dieser Regel im allgemeinen auch dann bestehen, wenn Körpereiß durch vermehrte Muskelarbeit oder ähnliche Bedingungen in verstärkter Menge zum Abbau gelangt. Er berichtet aber selbst über eine auffallende Ausnahme: ein an einer fieberhaften Injektionskrankheit leidender Kranker schied zwei Tage vor der Krisis eine absolut und relativ außergewöhnlich hohe Menge von Neutralschwefel aus. In der Rekonvalenssenz sank dann der nicht oxydierte Schwefel auf abnorm niedrige Werte, die zum Teil unter 1% des Gesamtschwefels lagen. Benedikt deutet diese Erscheinung als „regenerativen Vorgang“.

Im Gegensatz hierzu finden andere Autoren, Weiß, Jérôme, Rudenko, einen regelmäßigen engen Zusammenhang zwischen der Ausscheidung von Neutralschwefel und von Gesamt-N. Die von Benedikt selbst festgestellte Abhängigkeit der Neutralschwefelausschei-

dung von exogener Fettzufuhr bietet einen deutlichen Fingerzeig dafür, daß schon unter physiologischen Verhältnissen der Neutralschwefel eine auch absolut nicht unveränderliche Größe darstellt.

Übereinstimmender sind die Ansichten über die Veränderungen des Neutralschwefels, wenn die Wirkung der Protoplasmagifte die N. Ausscheidung steigern. Untersucht in dieser Richtung sind Kaliumacetat, Chlorhydrat, Amylenhydrat, Chloroform. Wie die Untersuchungen von Salkowski, Rudenko, Benedikt, Kast und Mester, Jérôme, Ken Tanikuti, Peiser, Harnack ergeben, steigt unter dem Einfluß der genannten Mittel der Neutralschwefel prozentual und absolut. Die Zunahme erstreckt sich jedoch nicht auf die ganze Periode der vermehrten Stickstoffausscheidung, da vorher oder nachher auch der Sulfatschwefel einen Teil der vermehrten Gesamtschwefelausscheidung bestreitet. Unentschieden ist hier nur die Frage, welche von den beiden Schwefelfractionen zuerst im Harn erscheint. Während aus Rudenkos Versuchen hervorgeht, daß zuerst der vermehrte Sulfatschwefel ausgeschieden wird, beobachten Kast und Mester unter Chloroform schon nach einer Stunde eine Zunahme des Neutralschwefels. Auch Jawein findet, daß der Neutralschwefel sehr rasch zur Ausscheidung gelangen kann. Unsere eigenen Versuche sprechen ebenfalls für diese Annahme.

Die Chloroformwirkung wurde von Kast und Mester auch nach anderen Richtungen untersucht. Sie fanden neben einer Steigerung der Kochsalzausfuhr und einer Gewichtsabnahme das Auftreten einer reduzierenden, von ihnen nicht näher identifizierten Substanz im Urin sowie eine Urobilinurie.

Nach den angeführten, von den verschiedensten Untersuchern gemachten Beobachtungen steht, trotz einzelner Widersprüche, soviel fest, daß die Ausscheidung des Neutralschwefels überall dort verändert ist, wo sich tiefgreifende Veränderungen im endogenen Eiweißstoffwechsel abspielen. Dasselbe finden wir bei unseren Fällen. Die Verschiebungen im Neutralschwefel, besonders die starke Abnahme vom dritten Tag ab, entsprechen dem, was u. a. Benedikt in einem Einzelfall nach dem kritischen Fieberabfall beobachtet und als regenerativen Vorgang gedeutet hat. Bei der Übereinstimmung aller drei Versuchsperioden in dieser Beziehung erscheint die Annahme berechtigt, daß es sich um einen gesetzmäßigen Vorgang handelt.

Das Auftreten von Glukuronsäure und von Urobilin kann auch nach Chloroform vorkommen, wenn man annimmt, daß der von Kast und Mester beobachtete reduzierende Körper Glukuronsäure gewesen sei. Nach den Untersuchungen von Sabbatini und Lorenzani dürfte man in der Glukuronurie den Ausdruck einer Leberschädigung sehen. Daß eine solche nach Chloroform tatsächlich auftritt, ist bekannt; als Folge der Schwefelinjektion ist sie noch nicht erwiesen. Die Möglichkeit ist aber nicht von der Hand zu weisen.

Für die auffallenden und regelmäßigen Veränderungen im Wasser- und Kochsalzstoffwechsel fehlt uns vorläufig jede Deutungsmöglichkeit. Sie wird erschwert durch den Umstand, daß die Kochsalz-Retention noch zunimmt, wenn das Fieber längst abgeklungen ist. Das Gleiche gilt für den Wasserhaushalt. Untersuchungen über den intermediären Stoffwechsel, die noch nicht abgeschlossen sind, werden uns vielleicht Aufschluß darüber bringen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß unter der Wirkung parenteral verabreichten Schwefels ein vermehrter Abbau von Körpereiß eintritt, der sich in einer Zunahme der N.- und Schwefelausscheidung im Urin äußert. Die einzelnen Schwefelverbindungen zeigen dabei ganz bestimmte prozentuale Verschiebungen. Direkt nach der Injektion ist die Kochsalzausscheidung vorübergehend vermehrt, vom 2. Tage ab nehmen Kochsalzmenge und Urin für mehrere Tage erheblich ab. In dieser Zeit treten Glykuronurie und Urobilinurie auf.

Die Mehrausscheidung von Schwefel ist sehr viel größer, als die Menge des injizierten Schwefels.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß zwischen der Wirkung peroral und parenteral verabreichten Schwefels auf die Zusammensetzung des Urins weitgehende und prinzipielle Unterschiede bestehen. Die Verschiedenheit der therapeutischen Wirksamkeit erscheint danach nicht weiter verwunderlich. Erklärt ist damit jedoch die klinische Wirkung einer Schwefelinjektion noch keineswegs; Aufschluß können wir nur erhalten von einer Beobachtung der intermediären Vorgänge und von einer vergleichenden Beobachtung anderer in ihrer klinischen Wirkung verwandter Behandlungsmethoden. Versuche hierüber sind im Gange.

Abgeschlossen am 26. Februar 1921.

Literatur.

- 1) Benedikt, *Zeitschr. f. klin. Med.* **36**. 1899. — 2) Folin, *Amer. Journ. of Physiol.* **13**, zit. nach Maly, 1905. — 3) Harnack, *Zeitschr. f. Biol.* **37**. — 4) Heffter, *Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol.* **51**. — 5) Heffter und Hausmann, *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.* **5**. — 6) Hess, L., *Berl. klin. Wochenschr.* **1906**, 1452. — 7) Izar, *Pathologica* **5**, 162. — 8) Jawein, *Zeitschr. f. klin. Med.* **22**. — 9) Jérôme, *Arch. f. d. ges. Physiol.* **60**. — 10) Hass, *Berl. klin. Wochenschr.* **1888**. — 11) Hass und Mester, *Zeitschr. f. klin. Med.* **18**. — 12) Kanschegg, *Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol.* **62**. — 13) Kojo, Kenji, *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **76**. — 14) Lépine et Flavard, *Compt. rend.* **91**. — 15) Lorenzani, zit. nach *Presse méd.* **1920**, Nr. 74. — 16) Mayer, P., *Berl. klin. Wochenschr.* **1899**, Nr. 27 und 28. — 17) Mayer, P. und C. Neuberg, *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **29**. — 18) Nevinny, *Berl. klin. Wochenschr.* **1906**. — 19) Presch, *Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol.* **119**. — 20) Rudenko, *Virchows Archiv* **125**. — 21) Sabatini, zit. nach *Kongreß-Centralblatt XIII*, S. 553. — 22) Schmidt, *Zeitschr. f. klin. Med.* **34**. — 23) Taniguti, *Virchows Archiv* **120**. — 24) Sabbatani, *diese Zeitschr.* **59**. — 25) Tauber, *Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol.* **36**. 1895. — 26) Weiss, *diese Zeitschr.* **7**. — 27) Wohlgemuth, *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **40** und **43**.

Über Kalkbindung durch tierische Gewebe. III.

Von

E. Freudenberg und P. György.

(Aus der Kinderklinik in Heidelberg.)

(Eingegangen am 7. März 1921.)

Für die Frage, welche Bedeutung der von uns¹⁾ untersuchte Vorgang der Kalkbindung für den normalen Verkalkungsprozeß im Skelett besitzt, war es von großer Wichtigkeit, zu untersuchen, wie sich Knorpel, der Ca aufgenommen hat, gegen Phosphatlösungen verhält. Wir haben dieser Frage folgende Versuche gewidmet:

1. Je 14 g Kalbstrockenknorpel werden eingelegt in 100 ccm einer CaCl_2 -Lösung von 0,720 Normalität, einer MgCl_2 -Lösung von 2,60 Normalität und einer NaCl -Lösung von 0,258 Normalität. Nach 5 Tagen werden die Proben den Lösungen entnommen, mit destilliertem Wasser energisch abgespült und getrocknet. Ein Teil gelangt zur Analyse auf Ca, Mg und P_2O_5 , der Rest wird in $\frac{m}{3}$ -Phosphatgemische von p_H 7,4 und 6,5 gelegt. Nach 3 Tagen werden die Knorpelmassen den Lösungen abermals entnommen, wieder ausgiebig gewaschen und getrocknet. Die Ca-Proben sind auffällig verändert gegen die sonstige Beschaffenheit des Knorpels. Sie sind weiß, undurchsichtig, spröde, sehr hart geworden und erinnern in ihrer Beschaffenheit an Knochen. Die Proben mit Mg sind andeutungsweise, die mit Na gar nicht in diesem Sinne verändert.

Die Untersuchung vor dem Einlegen in Phosphatlösung ergab für 1 g Trockensubstanz folgende Zahlen, die sich auf 1 ccm $\frac{n}{10}$ -Säure bzw. Lauge für Ca und H_3PO_4 beziehen. Zur Bestimmung letzterer haben wir uns der Methode von Neumann bedient.

	Ca-Knorpel	Mg-Knorpel	Na-Knorpel
Ca	4,93	Ca 1,35	Ca 1,34
H_3PO_4	1,58	Mg 5,33	H_3PO_4 1,39
		H_3PO_4 1,30	
Nach Behandlung mit Phosphatgemisch:			
p_H 7,4	Ca-Knorpel	Mg-Knorpel	Na-Knorpel
Ca	5,20	Ca 1,35	Ca 1,34
H_3PO_4	5,21	Mg 4,74	H_3PO_4 1,36
		H_3PO_4 4,75	

¹⁾ Diese Zeitschr. 110. 1920; 115. 1921.

Der Versuch zeigt, daß in den Knorpelproben, die Ca bzw. Mg gebunden hatten, eine Zunahme von Phosphorsäure erfolgt ist, welche in den Na-Proben ausbleibt. Ein analog angesetzter Versuch mit Phosphatgemisch p_H 6,5 ergibt:

Ca-Knorpel	Mg-Knorpel	Na-Knorpel
Ca 5,00	Ca 1,35	Ca 1,29
H ₃ PO ₄ 6,98	Mg 4,85	H ₃ PO ₄ 1,45
	H ₃ PO ₄ 5,78	

Angesichts dieser Befunde erhebt sich die Frage, wie die beobachtete Bindung von Phosphorsäure zu deuten ist. Es kommen folgende Möglichkeiten in Frage:

1. Es liegt eine bloße mechanische Imprägnation mit dem Kalkphosphatniederschlag vor, indem die beiden Lösungen, die nacheinander in das Kolloid eindiffundieren, miteinander in Reaktion treten.

2. Bei der Reaktion des — gemäß unseren früheren Annahmen — an das Kolloid gebundenen Ca mit Phosphorsäure wird diese Verbindung zerlegt und es kommt zur Einlagerung eines Kalkphosphatniederschlages.

3. Das entstehende Kalkphosphat bildet mit dem Kolloid, an welches Ca gebunden war, eine komplexe Verbindung.

Diese letztere Annahme würde, falls die Ca-Kolloidverbindung ionisiert wäre, mit den Anschauungen J. Loeb's¹⁾ in einem gewissen Widerspruch stehen, nach denen der Ampholyt bei gegebener Reaktion nur Anionen oder Kationen, nicht aber beide binden kann. Wir behalten die Entscheidung zwischen den beiden letzten Möglichkeiten einer besonderen Untersuchung vor, die erste dagegen können wir durch einfache, jederzeit reproduzierbare Versuche ausschließen.

Liegt eine bloße Imprägnation vor, die dadurch zustande kommt, daß sich das Kolloid zuerst mit der Ca-, dann mit der Phosphatlösung imbibierte, so muß die Reihenfolge gleichgültig sein, in welcher man die Lösungen einwirken läßt. Wir werden Bindung von Phosphorsäure auch dann finden, wenn wir zuerst das Phosphatgemisch und nach der Waschung des Knorpels die Ca-Lösung einwirken lassen. Ebenso wird die Behandlung mit Ca bei saurer Reaktion mit nachfolgender Phosphateinwirkung beim Vorliegen bloßer mechanischer Imprägnation erfolgreich sein

¹⁾ Journ. of Gen. Physiol. 1918, Nr. 1 und 2; 1919, Nr. 3, 4, 5.

müssen. Finden wir bei diesen Versuchsanordnungen keine Zunahme von Phosphorsäure, so erledigt sich die Annahme mechanischer Imprägnation als Folgezustand von Diffusionsvorgängen.

2. Trockener Kalbsknorpel wird wie in Versuch 1 in eine CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl -Lösung gelegt, deren p_{H} aber 3,0 beträgt.

Der weitere Versuch wie in 1. p_{H} des Phosphatgemisches 7,4

	Ca-Knorpel	Mg-Knorpel	Na-Knorpel
ccm $\frac{2}{10}\text{-H}_3\text{PO}_4$ pro 1 g trockner Substanz	1,70	1,59	1,73

3. Versuch 1. wird wiederholt unter Umkehrung der Reihenfolge der Ca- und Phosphatbehandlung.

	Ca-Knorpel	Mg-Knorpel	Na-Knorpel
ccm $\frac{2}{10}\text{-H}_3\text{PO}_4$ pro 1 g Trocken-substanz	0,90	0,75	0,61

Der Ausfall der Versuche entspricht unserer früheren Beobachtungen, nach denen das Kolloid bei saurer Reaktion kein Ca zu binden vermag und den Angaben von J. Loeb über die Bindung von Ionen an amphotere Kolloide.

Der Nachweis, daß es sich bei diesen Versuchen nicht um eine mechanische Imprägnation mit Kalkphosphat handelt, wurde auch durch histologische Untersuchungen am hiesigen pathologischen Institut durch Herrn Prof. Gross geführt. Mikrotomschnitte von frischem, ungehärtetem Knorpel zeigten bei einer unserem Verfahren nachgebildeten Behandlung mit Ca- und Phosphatlösung mittels des Kalknachweises durch Hämatoxylin eine ganz eigenartige Kalkeinlagerung. Der Kalk war nicht kristallinisch, auch nicht in Schollen oder Körnern eingelagert, sondern stellte sich als eine staubförmige, offenbar auf starker Dispersität beruhende Trübung der Grundsubstanz dar, welche die Zellen frei ließ, sich aber an den Knorpelkapseln besonders ausgeprägt und dicht zeigte. Prof. Gross wird die histologische Prüfung dieser Befunde fortsetzen.

Es war von Interesse festzustellen, wie weit sich diese Versuche auch mit Knochengrundsubstanz ausführen lassen.

4. Zu diesem Zwecke wurde sorgfältig von Fett befreiter Rinderknochen mit verdünnter Salzsäure in der Kälte bis zur völligen Lösung der Erden behandelt. Durch wochenlanges Waschen mit destilliertem Wasser gelang es, die Säure völlig zu entfernen. Hierauf wurden 5 g der getrockneten Substanz in 50 ccm CaCl_2 (etwa 1%) für 3 Tage eingelegt, dann gewaschen und endlich in eine Phosphatlösung (p_{H} 6,9) eingelegt.

Nach 2 Tagen wurde die Lösung abgesehen und die Masse gründlich mit destilliertem Wasser gespült.

Vor der Phosphatbehandlung:

ccm $\frac{1}{10}$ -Säure bzw. Lauge pro 1 g Trockensubstanz Ca 0,66 H_2PO_4 0,40

Nach der Phosphatbehandlung:

Ca 9,45 H_2PO_4 6,03

Der Vorgang mit $CaCl_2$ -Lösung 5% wiederholt, sonst alles unverändert.

Ca 28,5 H_2PO_4 10,44

Statt mit $CaCl_2$ mit NaCl behandelt

Ca 0,96 H_2PO_4 0,41

Dieser Versuch zeigt, daß sich das Ossein wie der Knorpel verhält und weiter, daß die aufgenommene Menge Phosphorsäure von der aufgenommenen Ca-Menge abhängig ist. Diese Abhängigkeit geht auch aus den folgenden Versuchen hervor, bei denen die Konzentration der Ca-Lösungen variiert, sonst die oben beschriebenen Bedingungen eingehalten wurden. Die Phosphatlösung war $\frac{1}{2}$ molar und hatte einen p_H von 7,9—6 2.

5.	p_H 6,2	$CaCl_2$ 5%	$CaCl_2$ $\frac{1}{2}$ %
ccm $\frac{1}{10}$ -S.	pro 1 g	Ca 11,34	4,85
		H_2PO_4 7,70	3,30
6.	p_H 6,5	$CaCl_2$ 5%	$CaCl_2$ 1%
ccm $\frac{1}{10}$ -S.	pro 1 g	Ca 7,92	5,20
		H_2PO_4 8,45	4,59
7.	p_H 7,94	$CaCl_2$ 5%	$CaCl_2$ $\frac{1}{2}$ %
ccm $\frac{1}{10}$ -S.	pro 1 g	Ca 11,15	4,81
		H_2PO_4 8,06	3,68

Zu einer genauen Festlegung des Verhältnisses von Kalk und Phosphorsäure reichen unsere Zahlen nicht aus, die dadurch eine Unsicherheit enthalten, daß der Knorpel Phosphorsäure auch in organischer Bindung enthält. Die Menge derselben wird entsprechend dem Zellreichtum abhängig sein von der Entfernung von der Wachstumszone. Da wir von einem zwar möglichst zerkleinerten, aber doch nicht pulverförmigen Material ausgingen, konnte eine gewisse Ungleichmäßigkeit im H_2PO_4 -Gehalt desselben wohl nicht vermieden werden.

Endlich haben wir die Bindung der Phosphorsäure als Funktion der Acidität der verwendeten Phosphatgemische geprüft. Wir machten hierbei die Erfahrung, daß wir auch bei recht saurer Reaktion (p_H 3,0) eine deutliche Phosphatbindung feststellen konnten. Wir führen dies, wie in unserer ersten Mitteilung, auf

die Unbeständigkeit saurer Reaktionsstufen des Puffers in Gegenwart größerer Eiweißmengen zurück.

8.	Ca-Knorpel	Mg-Knorpel	Na-Knorpel		
Phosphatgemisch p_H 3,0; H_2PO_4 pro 1 g Trockensubstanz in ccm $n/_{10}$ -S.	10,69	2,58	1,86		
Phosphatgemisch p_H 3,0; H_2PO_4 pro 1 g Trockensubstanz in ccm $n/_{10}$ -S.	4,78	1,78	1,95		
9. p_H der Phosphatgemische	7,10	6,60	5,90	3,50	
H_2PO_4 pro 1 g Tr.-	Ca-Knorpel.	9,34	6,80	3,33	3,13
S. in ccm $n/_{10}$ -S.		Mg-Knorpel	5,96	5,32	4,82

Es zeigt sich hier wie im Versuch 1, daß Mg ebenso wie Ca eine Bindung von Phosphorsäure zu bewirken vermag. Bei der guten Löslichkeit der Magnesiumphosphate ist dieser Befund höchst auffällig, er lehrt wieder, daß nicht eine Imprägnation der Grundsubstanz vorliegt, sondern daß Beziehungen zwischen ihr und den Erdphosphaten bestehen. Man könnte diesen Befund als abnorme Unlöslichkeit der abnormen Löslichkeit durch Kolloide entgegenstellen¹⁾. Auf die Bedeutung der hier mitgeteilten Beobachtungen für die Lehre von der Ossifikation werden wir im Zusammenhang mit weiteren Untersuchungen zurückkommen.

Zusammenfassung.

Die Verbindungen der Erdalkalien mit den Knorpelkolloiden vermögen Phosphorsäure zu binden. Hierbei handelt es sich nicht um eine rein mechanische Imprägnation des Kolloids mit den Erdphosphaten, sondern es bestehen chemische Beziehungen zwischen diesen und den Kolloiden des Knorpels.

¹⁾ Vgl. Pauli und Samec, diese Zeitschr. 17. 1919.

Über Blutveränderung nach peroraler Kochsalzgabe.

Von

G. Samson.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg. Krankenhaus St. Georg.)

(Eingegangen am 9. März 1921.)

Über die Wirkung peroraler Kochsalzgaben auf die Menge und Zusammensetzung des Blutes beim Menschen liegen bisher nur unvollständige Angaben vor. Auch die schönen Versuche von Veil erscheinen uns deswegen nicht ganz erschöpfend, weil bei diesen Versuchen fortlaufende Untersuchungen des Hämoglobingehaltes fast nie gemacht worden sind, und seine Schlüsse auf die Veränderung der Blutmenge, wie wir weiter unten zeigen werden, nicht ohne weiteres erlaubt erscheinen.

Wir machten unsere Versuche durchweg an Gesunden, d. h. Rekonvaleszenten nach leichter Diphtherie, oder Bazillenträgern. Nach 2—3tägiger salzarmer Nahrung erhielten die Patienten 0,3 g NaCl pro kg Körpergewicht in wenig Wasser, und durften während der nächsten 4 Stunden kein Wasser zu sich nehmen. Vorher, sowie 2 und 4 Stunden nach der Kochsalzgabe wurde im Capillarblut (Ohrläppchen) Hämoglobin bestimmt (Methode Autenrieth), außerdem vorher und nach 4 Stunden im venösen Blut auf Hämoglobin, Körperchenvolumen, NaCl und Eiweiß untersucht.

Wir machten die Hauptbestimmungen alle im venösen Blut, da das Capillarblut, wie schon Zuntz und Cohnstein zeigten, weniger geeignet ist für derartige Untersuchungen. Die Gefahr, daß Lymphe aus den Geweben mit einwandert, der ungleiche Capillartonus, und die eventuellen Differenzen, die durch die Art der Entnahme entstehen, machen die Befunde manchmal ungenau. Außerdem stößt eine venöse Blutentnahme ja auch nur in den allerwenigsten Fällen auf irgendwelche Schwierigkeit, ist im

Gegenteil in der Mehrzahl der Fälle schneller und leichter auszuführen. — Die anfänglichen Rest-N-Bestimmungen wurden bald wieder aufgegeben, da sich in keinem Falle im Verlauf eines Versuches eine wesentliche Änderung zeigte. — Wo wir konnten, wiederholten wir den Versuch nach einigen Tagen noch einmal mit unbeschränkter Trinkerlaubnis für den Patienten.

Die Hämoglobinbestimmungen wurden alle doppelt abgelesen, Eiweiß wurde refraktometrisch, Kochsalz mit der Bangsohen Mikromethode bestimmt, das Körperchenvolumen durch Zentrifugieren auf einer elektrischen Zentrifuge im kalibrierten Zentrifugenglas (bis zur Konstanz) geschätzt. Die Kochsalzausscheidung im Urin konnte aus äußeren Gründen leider nur in einigen Fällen verwertet werden. Die Resultate der Versuche sind in folgender Tabelle verzeichnet.

Die Berechnung der in der Tabelle verzeichneten absoluten Werte von Kochsalz und Eiweiß nahmen wir in folgender Weise vor:

$$\text{Bl. M. 1} = \text{Blutmenge}_1 = \frac{\text{Körpergewicht} \cdot 6}{100};$$

$$\text{S. M. 1} = \text{Serummenge}_1 = \frac{\text{Blutmenge}_1 \cdot (100 - \text{Körp.-Vol.})}{100};$$

$$\text{Eiweiß}_1 = \frac{\text{S. M. 1} \cdot \text{Eiweiß \%}}{100};$$

$$\text{Kochsalz}_1 = \frac{\text{S. M. 1} \cdot \text{Kochsalz \%}}{100};$$

$$\text{Bl. M. 2} = \text{Blutmenge}_2 \text{ (nach d. Versuch)}$$

$$= \frac{\text{Hämoglobin venös vor dem Versuch}}{\text{Hämoglobin venös nach dem Versuch}} \cdot 100 = x\% \text{ von d. Bl. M. 1.}$$

z. B. bei Versuch 2 (Patient Stahl):

$$\text{Bl. M. 1} = \frac{65 \cdot 6}{100} = 3,9 \text{ kg};$$

$$\text{S. M. 1} = \frac{3,9 \cdot (100 - 50)}{100} = 1,95 \text{ kg};$$

$$\text{Eiweiß}_1 = \frac{1,95 \cdot 8,92}{100} = 0,174 \text{ kg};$$

$$\text{Kochsalz}_1 = \frac{1,95 \cdot 0,569}{100} = 0,011 \text{ kg};$$

$$\text{Bl. M. 2} = \frac{64}{58,25} \cdot 100 = 110\% \cdot 3,9 = 4,29 \text{ kg};$$

$$\text{S. M. 2} = \frac{4,29 \cdot (100 - 49)}{100} = 2,19 \text{ kg};$$

$$\text{Eiweiß}_2 = \frac{2,19 \cdot 8,28}{100} = 0,181 \text{ kg};$$

$$\text{Kochsalz}_2 = \frac{2,19 \cdot 0,611}{100} = 0,0134 \text{ kg}.$$

Name	Alter Jahre	Ge- wicht kg	NaCl - Gabe		Hämocritin (Autorenrieth)		Blutmenge (aus Hämo-gl.)		Im veröden Blut		Zunahme in absol. Wert.		Bemerkungen
			Wann? Uhr	Wieviel? g	Wann? Uhr	Vonds. %	Capill. %	Vonds. %	Capill. %	Ehw. g	Körp.-Vol. %	NaCl g	
I. Thomessen	7		8 ¹ / ₂	10	67 62,5 57	62,5			8,49	50	0,567		Rest N = 26,0 gedurstet
II. Strahl	32	65,0	10	20	67 64 54	64	58,25	125	8,28	37	0,609	7,0	gedurstet
III. Lange 1	13	44,2	8 ¹ / ₂	13	64 54	65,5		110	8,28	49	0,611	26,0	1500, getrun- ken
IV. Lange 2	13	44,2	8 ¹ / ₂	13	62,5 56,5	52,5		120	7,74	39	0,556	18,0	gedurstet
V. Samson 1	27	55,0	9 ¹ / ₂	20	66,5 62,5	54	65	110	7,95	39	0,599	42,0	1200, getrun- ken
VI. Samson 2	27	55,0	9 ¹ / ₂	20	67 60	66,5		105	7,74	40	0,589	35,0	
VII. Störek	24	71,0	8	20	60 64	62,5		111	8,49	46	0,597	39,0	400, getrun- ken
VIII. Lutbuer	9	33,0	9	10	58,25 53,25	52,5	64	120	7,74	44	0,560	39,0	gedurstet
IX. Heine 1	40	59,5	9	20	55 56	57	59,75	106	6,99		0,605		gedurstet
X. Heine 2	40	59,5	9	20	57 64	58,25		100	7,74		0,588		2000, getrun- ken
					57		Unbrauchbar		7,63		0,573		
									7,41		0,556		

Wir sind uns dabei vollkommen bewußt, daß diese Berechnung reichliche Fehlerquellen hat. Einmal ist die Schätzung der Blutmenge zu 6%, wie wir sie annahmen, vielleicht zu gering. Dann ist das Körperchen-Volumen, wie wir es bestimmt haben, ein Maximalwert und bis zu einem gewissen Grade ungenau. — Wir haben deshalb alle Werte vielfach durchgerechnet mit Berücksichtigung unserer Fehlerquellen; d. h. wir haben die Berechnung außer mit den gefundenen Werten und mit 6% Blutmenge auch mit 8% Blutmenge berechnet, ferner mit den allgemein gültigen Durchschnittswerten von 40 und 50% für das Körperchenvolumen. Die Zahlen, die dabei für Eiweiß und NaCl herauskommen, sind natürlich verschieden; aber wie man den Anfangswert auch setzt, der Sinn der Tabelle bleibt immer der gleiche: Es findet sich stets Blutverdünnung, Zunahme der Gesamtmenge von Kochsalz und Eiweiß im Serum, während die Prozente der Eiweißwerte regelmäßig, wie auch bei Veil, abgenommen haben. Das Hämoglobin im venösen Blut ist meistens um ein paar Prozent weniger oder mehr als das im Capillarblut, nimmt auch in der Mehrzahl der Fälle etwas stärker ab. Das Herabsinken des Hämoglobins, überhaupt die Blutverdünnung ist in den einzelnen Fällen sehr verschieden intensiv; es scheint von individuellen Komponenten der einzelnen Patienten abhängig zu sein. Wie zu erwarten war, haben die Patienten beim Trinkversuch stets stärker verdünnt als beim Durstversuch, besonders deutlich in Versuch 3 und 11.

Um ausschließen zu können, daß wir beim Abschnüren des Armes bei der Entnahme im venösen Blut durch die starke Stauung falsche Werte bekommen, haben wir einige Versuche mit starker, schwacher und gar keiner Stauung angestellt und fanden, daß die leichte Stauung, wie wir sie für gewöhnlich anwenden, ohne Einfluß ist, daß bei stärkerer Stauung aber die Werte von Hämoglobin, Kochsalz und Eiweiß sich erheblich verändern können.

Das Kochsalz nimmt einheitlich zu, nur ist auch hier der Grad der Zunahme sehr verschieden; es schwankt — in den absoluten Werten — zwischen 6,2% und 33% der eingegebenen Menge. Das Berechnen der absoluten Werte hat sich nun als besonders interessant erwiesen. Während es beim Betrachten der Prozentwerte so scheint, als ob Serum-Kochsalz und Serum-

Eiweiß sich stets im entgegengesetzten Sinne verändern, fanden wir, wie schon erwähnt, daß die absoluten Werte auch beim Eiweiß regelmäßig in die Höhe gehen, und zwar um ganz beträchtliche Mengen. Während also eine Blutverdünnung stattfindet, steigt der Eiweißgehalt des Serums. Es scheint sich hieraus zu ergeben, daß man nicht, wie man gewöhnt war, aus dem Eiweißgehalt des Blutserums den Grad der Verdünnung des Blutes berechnen kann. Oder, anders ausgedrückt: Bei der NaCl-Hydrämie gehen Hämoglobingehalt des Blutes und Eiweißgehalt des Blutserums beim Menschen nicht einander parallel. — Das Blut muß also, während es durch die Capillarwände Wasser aus dem Gewebe anzieht, auch Eiweiß mit hineinziehen. Die Eiweißzunahme steht in sehr wechselndem Verhältnis zur Kochsalzzunahme und schwankt an der gleichen Versuchsperson erheblich. Man gewinnt den Eindruck, als ob bei größerer Kochsalzzunahme im Serum meist auch größere Eiweißmengen ins Serum aus den Geweben einwanderten.

Daß außer im Blute sehr viel Kochsalz in den Geweben retiniert wird, geht aus der Tatsache hervor, daß im Urin nach 4 Stunden nie mehr — meistens viel weniger — als 50% der eingegebenen Kochsalzmenge ausgeschieden sind.

Wesentlich ist es jedenfalls, die Schlüsse auf die Zusammensetzung des Serums erst aus den absoluten, nicht aus den prozentualen Werten zu ziehen, bei derartigen Versuchen also immer wenigstens Hämoglobin, möglichst auch Körpervolumen mitzubestimmen, um diese Berechnung zu ermöglichen. Schon, wenn man versucht, die Blutmenge nach dem Versuch aus dem Eiweiß des Serums statt aus dem Hämoglobinwert zu berechnen, kommt man stets auf einen viel niedrigeren Wert. Man sieht sofort, daß da irgend etwas nicht stimmt, und die Differenz der wirklichen Blutmenge und der aus dem Eiweiß gefundenen läßt sich nur dann erklären, wenn man eine Einwanderung von Eiweiß aus den Geweben in die Capillaren annimmt. Schon diese kleine Überlegung zeigt, wie ungeeignet das Eiweiß für die Schätzung der Blutverdünnung ist. — Dasselbe geht auch aus den Versuchen von Wilbrandt aus dem hiesigen Institut hervor, bei denen sich nach Schwitzkuren nach dem Hämoglobin beurteilt eine starke Eindickung des Blutes findet, während der Eiweißgehalt konstant bleibt.

Zusammenfassung.

Große perorale Kochsalzgaben erhöhen beim normalen Menschen den prozentualen und absoluten Kochsalzgehalt des Bluts; doch bleibt nur ein kleiner Teil des Kochsalzes im Serum, der größte Teil geht in die Gewebe. Die Blutmenge steigt dabei regelmäßig durch Übertreten von Gewebsflüssigkeit ins Blut auch dann an, wenn kein Wasser zugeführt wird. — Neben Wasser treten regelmäßig auch beträchtliche Mengen von Eiweiß aus dem Gewebe ins Blut.

Schweißabsonderung und Blutzusammensetzung.

Von

Eberhard Wilbrand.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg.
Krankenhaus St. Georg.)

(Eingegangen am 9. März 1921.)

Die älteren Veröffentlichungen über Blutveränderungen bei Schwitzprozeduren enthalten meist Befunde physikalischer Untersuchungsmethoden und beziehen sich vorzüglich auf mäßiges Schwitzen von verschiedener Dauer. Chemische Blutuntersuchungen finden sich erst in neuerer Zeit.

Gross und Kestner²⁾, O. Kestner, W. Gross, F. Laquer, E. Schlagintweit, H. Weber²⁾, A. Eckert¹⁾ und E. Cohn⁴⁾ berichten über Blutveränderung beim Schwitzen, sowohl bei Muskelarbeit wie bei Körperruhe, im Hochgebirge wie in der Ebene. Sie geben übereinstimmend ein Sinken des Hämoglobingehalts bei gleichzeitigem Anstieg des Eiweißgehaltes und gleichbleibendem Kochsalzgehalt des Blutes an. Es interessierte mich nun zu sehen, ob bei langdauerndem Ruheschwitzen in hohen Temperaturen die chemische Blutzusammensetzung sich ändern würde. Bei den Versuchen, die sämtlich an mir selbst angestellt wurden, richteten wir unser Augenmerk außer auf Hämoglobin, Eiweiß und Kochsalz auch auf den Fettgehalt und den Rest-N des Blutes. Um nebst den chemischen Veränderungen des Blutes auch die Menge des durch den Schweiß verlorenen NaCl bestimmen zu können, wurde die Versuchsanordnung folgendermaßen getroffen.

Versuchsanordnung.

Nach gründlicher Entsalzung der Körperoberfläche durch Abwaschen und Abspülen mit Aqua dest. wurde, sobald die Haut wieder trocken war, Körpergewicht und Körpertemperatur be-

stimmt sowie 10 ccm Blut auf die übliche Weise, jedoch unter möglichst geringer Stauung, der Cubitalvene entnommen. Das Blut wurde sofort defibriniert und weiterverarbeitet. Sodann begab ich mich, eingehüllt in ein trockenes, salzfrei gemachtes Laken, in ein elektrisches Ganzschwitzbad, welches so eingerichtet war, daß man bequem auf einem Stuhle sitzend schwitzen konnte, während nur der Kopf sich außerhalb des Bades befand. Um allen Schweiß auffangen zu können, hielt ich meine Füße in einen mit Aqua dest. salzfrei gemachten Metallbottich. Während des Versuchs wurde wiederholt Bade- und Zimmertemperatur notiert, vor und nach demselben Pulszahl und Körpertemperatur bestimmt.

Nach Beendigung des Versuchs wurde der Körper wiederum mit Aqua dest. abgewaschen und im übrigen wie bei Versuchsbeginn verfahren.

Alle Versuche stellte ich morgens bei nüchternem Magen an. Zur Hämoglobinbestimmung diente der Autenrieth-Königsbergersche Apparat, dessen Ergebnisse auf Sahli umgerechnet wurden; zur Eiweißbestimmung wurde das Pulfrichsche Eintauchrefraktometer benutzt, Kochsalz im Schweiß wurde nach Volhard, NaCl im Blutserum und Rest-N durch die Mikromethode von Bang, Fett im Serum nach dem Vorgang von Bloor bestimmt. Das Körperchenvolumen wurde durch Zentrifugieren (elektrische Zentrifuge, Zentrifugieren bis zur Konstanz) in mit Teilung versehenen Zentrifugenröhrchen bestimmt.

Versuch 1: Versuchsdatum 28. III. 1919.

Versuchsdauer: von 7^h 30' bis 8^h 13'.

Schwitzbad- und Zimmertemperatur nicht notiert.

Pulszahl: um 7^h 30' 60 Schläge p. M.; um 8^h 13' 116 Schläge p. M.

Körpertemperatur (Achselhöhle): um 7^h 39' 36,2°; um 8^h 13' 36,2°.

1. Blutentnahme um 7^h 00', 2. Blutentnahme um 8^h 30'.

Tabelle I.
Untersuchungsergebnis des Blutes.

	Blut			Serum				Körpergewicht kg	Per- spiration kg	NaCl- Gehalt des Schweißes
	Hämo- globin %	Blutmenge	Körper- s- chenvol. %	Eiweiß %	NaCl %	Rest-N mg	Fett %			
Vor dem Versuch	65,5	100	54	7,95	0,557	21	0,159	78,81	0,52	1,72 g
Nach d. Versuch	64	98	58	8,38	0,554	28	1,68	78,29	—	= 0,17%

Versuch 2: Versuchsdatum 14. IV. 1919.

Versuchsdauer: von 7^h 50' bis 8^h 25'.

Schwitzbadtemperatur: um 8^h 05' 45° C

„ 8^h 15' 57° C

„ 8^h 25' 60° C

Zimmertemperatur: „ 8^h 25' 24° C

Pulszahl: um 7^h 45' 56 Schläge p. M.; um 8^h 25' 116 Schläge p. M.

Körpertemperatur: um 8^h 00' 36,3°; um 8^h 25' 36,3°.

Tabelle II.

Untersuchungsergebnis des Blutes.

	Blut			Serum			Körpergewicht kg	Per- spiration kg	NaCl- Gehalt des Schweißes	
	Hämo- globin %	Blutmenge	Körper- chenvol. %	Eiweiß %	NaCl %	Rest-N mg				Fett %
Vor dem Versuch	65,5	100	45	7,85	0,589	24,4	1,66	78,77	0,60	1,7 g
Nach d. Versuch	69,5	94	46	7,74	0,579	31	1,505	78,17	—	= 0,17%

Versuch 3: Versuchsdatum 2. V. 1919.

Versuchsdauer: von 7^h 35' bis 8^h 25'.

Schwitzbadtemperatur: um 7^h 45 48° C

„ 8^h 00' 58° C

„ 8^h 10' 60° C

„ 8^h 25' 63° C

Zimmertemperatur: „ 7^h 15' 27° C

Pulszahl um 7^h 45' 60 Schläge; um 8^h 25' 120 Schläge p. M.

Körpertemperatur (Achselhöhle): um 7^h 45' 36,3°; um 8^h 25' 37,2°.

1. Blutentnahme um 7^h 10'; 2. Blutentnahme um 8^h 35'.

Tabelle III.

Untersuchungsergebnis des Blutes.

	Blut			Serum			Körpergewicht kg	Per- spiration kg	NaCl- Gehalt des Schweißes	
	Hämo- globin %	Blutmenge	Körper- chenvol. %	Eiweiß %	NaCl %	Rest-N mg				Fett %
Vor dem Versuch	67	100	45	7,74	0,579	33,8	1,56	79,2	1,05	3,22 g
Nach d. Versuch	80,5	83	50	8,38	0,572	39,8	1,60	78,15	—	= 0,32%

Versuch 4: Versuchsdatum 1. IV. 1919.

Versuchsdauer: von 7^h 40' bis 8^h 27'.

Schwitzbadtemperatur: um 7^h 40' 56° C

„ 8^h 22' 64° C

Zimmertemperatur: „ 7^h 40' 17° C

Pulszahl um 7^h 40' 60 Schläge p. M.; um 8^h 20' 136 Schläge p. M.
Körpertemperatur (Achselhöhle): um 7^h 40' 36,3°; um 8^h 42' 36,8°.

1. Blutentnahme um 7^h 10'; 2. Blutentnahme um 9^h 05' (wegen schweren Kollapses wurde die 2. Blutentnahme erst 38 Minuten nach Versuchsbeendigung gemacht).

Tabelle IV.
Untersuchungsergebnis des Blutes.

	Blut			Serum				Körpergewicht kg	Perspiration kg	NaCl-Gehalt des Schweißes
	Hämoglobin %	Blutmenge	Körperchenvol. %	Eiweiß %	NaCl %	Rest-N mg	Fett %			
Vor dem Versuch	59,5	100	51	7,95	0,564	25,6	1,65	78,73	1,24	3,86 g
Nach d. Versuch	79,5	75	61	8,38	0,576	27,5	1,68	77,49	—	= 0,31%

Tabelle V.
Tabellarische Zusammenstellung der Blutbefunde mit ausgerechneten Werten.

Vers.-Nr.	Blutmenge		Serummenge		Eiw.-Menge des Serums		Aus dem Serum verschwunden	NaCl in der Blutbahn		Aus d. Blutbahn verschwunden	NaCl-Gehalt des Schweißes	NaCl aus d. Geweb. verschwunden	H ₂ O verschw. aus dem	
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher		vorher	nachher				Serum g	Gewebe g
	1	4728	4822	2175	2025	172,9	169,8	3,3	12,1	11,2	0,9	1,72	0,82	185,0
2	4772	4489	2597	2397	208,8	185,5	18,3	15,29	13,71	1,58	1,7	0,86	180,0	420,0
3	4752	3944	2818,6	1972	202,25	165,25	37,0	14,1	11,3	3,8	3,22	0,58	577,8	472,2
4	4723	3541	2314	1381	183,9	115,7	68,2	14,05	7,95	6,1	3,86	1,24	399,7	461,3

Die Berechnung der Versuchsergebnisse erfolgte in der gleichen Art wie in der vorstehenden Arbeit von G. Samson.

Versuchsergebnisse.

Der Versuch 1, bei welchem die geringste Schweißmenge abge sondert wurde, zeigt uns — entsprechend den Befunden vorgenannter Forscher — eher ein Sinken des Hämoglobingehaltes bei ansteigendem Eiweißgehalte des Blutes. Ein ganz anderes Ergebnis haben die Versuche 2—4. Hier fällt vor allem auf, daß die Blutmenge entsprechend der Perspiration regelmäßig abnimmt. Sowohl Eiweiß- wie Hämoglobingehalt steigen, während der NaCl-Gehalt im wesentlichen unverändert bleibt. Die notwendige Folgerung aus diesem Befund ist die, daß Wasser und Kochsalz aus dem Blute verschwinden, kurz, es ergibt sich eine der Perspiration parallelgehende, gleichmäßige Eindickung des Blutes. Fettgehalt und Rest-N zeigen keine nennenswerten Schwankungen.

Meine Versuchsergebnisse stehen im wesentlichen im Widerspruch mit den Befunden obgenannter Autoren und sind um so auffälliger, als in den Arbeiten jener z. T. viel größere Schweißverluste vorhanden sind, als ich sie bei meinen Versuchen hatte.

Vereinzelte sind in den genannten Veröffentlichungen indessen doch Befunde angegeben, die den meinen entsprechen, und zwar bei Weber²⁾ nach kochsalzfreier Ernährung und bei Eekert¹⁾ nach protrahierten heißen Bädern. Leider hat letzterer im Protokoll nicht vermerkt, in welchem Körperzustand er die in Frage kommenden Schwitzversuche unternommen hat. Um nach einer Ursache für die Verschiedenheit der Befunde zu suchen, müssen wir zunächst in Betracht ziehen, daß die Untersuchungen sämtlicher Forscher in die Vorkriegszeit fallen und dementsprechend ein guter Ernährungszustand bei denselben bestand; meine Versuche wurden dagegen im Frühjahr 1919 angestellt, zu einer Zeit, wo die Ernährungsverhältnisse sehr im argen lagen (Fettration pro Woche 30 g, Fleisch gab es überhaupt nicht). Außerdem ließ ich mir in der fraglichen Zeit aus Gründen, die mit dieser Arbeit nichts zu tun haben, öfters, manchmal mehrmals am Tag, regelmäßig jedoch vor und nach den Schwitzversuchen den Magen aushebern. Ziehen wir diesen Umstand in Betracht, so besteht zwischen dem vorbezeichneten Versuch Webers²⁾ und den meinen ein gewisser Parallelismus; es handelt sich wohl bei beiden um Schwitzversuche bei herabgesetztem Kochsalzgehalt des Körpers.

Beim Vergleich der ausgerechneten Wasserverluste des Gewebes fällt ihre große Gleichmäßigkeit auf. Sie liegen alle um die Zahl 400. Unter 400 keine Bluteindickung, über 400 Bluteindickung. Hieraus könnte man den Schluß ziehen, daß infolge der Kochsalzarmut des Körpers dessen Wasserreservoir, die Muskeln, einen recht geringen Wasservorrat beherbergten, so daß sehr bald die Bluteindickung einsetzen mußte. Da seitens der Körpertemperatur ein nennenswertes Steigen nicht zu beobachten war, so muß ich den bei Versuch 4 eingetretenen schweren Kollaps, welcher mit Atemnot und fliegendem Puls einherging, als Folge der Bluteindickung ansehen.

Zusammenfassung.

In unseren Versuchen, bei einem der Kriegszeit entsprechenden Körperzustand, nimmt

1. die Blutmenge bei stärkerem Schwitzen — erkennbar an der starken Perspiration — regelmäßig ab — Eindickung des Blutes. Bei Verschwinden von 25% Blutflüssigkeit aus den Gefäßen trat Kollaps ein.

2. Die aus dem Blute verschwundene Wassermenge ist um so größer, je größer die Perspiration ist. Aus den Geweben verschwindet ungefähr gleichmäßig viel Wasser bei allen Versuchen; wir haben uns also die Wasser-verschiebung so vorzustellen: Zunächst gibt das Gewebe sein H_2O her, sind die Wasserreservoirs erschöpft, so muß das Blut sein H_2O hergeben.

3. Aus dem Serum verschwinden außer H_2O noch andere Bestandteile, von denen Eiweiß und $NaCl$ untersucht sind. Der Verlust von beiden Stoffen aus dem Serum geht der Stärke der Perspiration parallel.

4. Man hat den Eindruck, daß das Gewebe seinen $NaCl$ -Gehalt zäh festhält und im wesentlichen zunächst nur $NaCl$ aus dem Serum verschwunden ist.

5. Fettgehalt des Blutes und Rest-N zeigen keine beträchtlichen Schwankungen.

Literatur.

¹⁾ A. Eckert, Die Wirkungen erschöpfender Muskelarbeit auf den menschlichen Körper. *Zeitschr. f. Biol.* 71. 1920. — ²⁾ O. Kestner, W. Gross, F. Laquer, E. Schlagintweit, H. Weber, Blutuntersuchungen im Hochgebirge. *Zeitschr. f. Biol.* 70, Heft 3, 4, 5. 1919. — ³⁾ W. Gross, und O. Kestner, Über die Einwirkungen der Muskelarbeit und des Schwitzens auf Blut und Gewebe. *Zeitschr. f. Biol.* 70. 1919. — ⁴⁾ E. Cohn, Über die Veränderung des Hämoglobins sowie des Eiweißgehaltes im Blutserum bei Muskelarbeit und Schwitzen. *Zeitschr. f. Biol.* 70. 1919.

Beiträge zur Frage der Senkungsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen im menschlichen Blute.

Von
Kj. von Oettingen.

(Aus der wissenschaftlichen Abteilung des Institutes für experimentelle Krebsforschung in Heidelberg und aus der Universitätsfrauenklinik in Heidelberg.)

(Eingegangen am 10. März 1921.)

Die schon den alten Physiologen¹⁾ bekannte Erscheinung der Blutkörperchensenkung und ihrer Beschleunigung bei entzündlichen Krankheitsprozessen und in der Gravidität ist in den letzten Jahren der Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen. Das Interesse an dem einfachen, aber in seiner Wesensart noch keineswegs hinreichend geklärten Phänomen ist heute in theoretischer und klinischer Hinsicht gleich groß. Seitdem Fähräus²⁾ die Aufmerksamkeit auf die fast konstant bestehende Beschleunigung der Blutkörperchensenkung bei Gravidität gelenkt hat, haben zahlreiche Autoren die Senkungsgeschwindigkeit bei verschiedenen Erkrankungen geprüft. Übereinstimmend hat sich dabei, insbesondere aus den interessanten Versuchen von Linzenmeier³⁾, eine vollkommene Bestätigung der Angaben von Fähräus ergeben. Die beschleunigte Senkung erscheint nach den vorliegenden Mitteilungen in der Tat, zumal in der 2. Hälfte der Schwangerschaft, als ein fast konstantes Merkmal.

Freilich lassen die vorliegenden Literaturangaben auch keinen Zweifel darüber, daß es sich nicht etwa um eine für die Gravidität

¹⁾ Vgl. insbesondere J. Müller, Handbuch der Physiologie des Menschen Bd. I, 4. Aufl., Koblenz 1844, sowie H. Nasse, Das Blut in mehrfacher Beziehung physiologisch und pathologisch untersucht. Bonn 1836.

²⁾ Fähräus, Hygiea 1918 und diese Zeitschr. 69, 355. 1918; vgl. auch Ber. Physiol. 2, 178. 1920.

³⁾ G. Linzenmeier, Arch. f. Gynäkol. 113, H. 3. 1920; Arch. f. d. ges. Physiol. 181, 69. 1920.

charakteristische Reaktion handelt; denn die gleiche Beschleunigung der Blutkörperchensenkung ist auch bei Geschwulstkranken, sowie in Übereinstimmung mit den Angaben der alten Literatur bei entzündlichen Krankheitsprozessen beobachtet worden. Auch bei Nerven- und Geisteskranken bestehen nach den Angaben von Plaut¹⁾, dessen Untersuchungen über die Verschiedenheit der Senkungsgeschwindigkeit unabhängig von Fähräus ausgeführt wurden, sowie von Runge²⁾, auf die hier nur kurz verwiesen sei, bemerkenswerte Differenzen. Wenn daher das Phänomen der beschleunigten Senkung wohl nicht als ein für einen bestimmten Zustand charakteristisches Zeichen aufgefaßt werden darf, so kann es, wie das schon Linzenmeier hervorgehoben hat, wohl als Hilfsmittel der Diagnostik in Betracht kommen und dadurch unter Umständen von einer praktisch-klinischen Bedeutung sein.

In theoretischer Hinsicht ist die Erscheinung in mehrfacher Beziehung von nicht geringem Interesse. Abgesehen von den Ursachen, die ihr zugrunde liegen, deutet das übereinstimmende Verhalten des Blutes bei der Gravidität mit demjenigen bei bösartigen Geschwülsten, Infektionsprozessen und wohl auch syphilitischen Erkrankungen, worauf die nach Plaut und Runge bestehende auffallend starke Beschleunigung bei Paralyse hinweist, auf gleichsinnige Blutveränderungen hin, wobei man das gemeinsame Moment vielleicht in der körperfremden Gewebswucherung, bzw. bei Infektionskrankheiten auch im Parasitenwachstum, bzw. in einem parallel gehenden Zellzerfall erblicken kann. Tatsächlich sind ja auch übereinstimmende Blutveränderungen bei den genannten Krankheitsprozessen und der Gravidität in anderer Hinsicht bekannt.

So sei nur daran erinnert, daß die Wassermannsche Reaktion, wofern sie mit ungeeigneten Extrakten oder auch mit aktivem Serum ausgeführt wird, leicht ihr für Syphilis charakteristisches Gepräge einbüßt und dann im allgemeinen gerade diejenigen Krankheitsgruppen oder körperlichen Zustandsänderungen mitumfaßt, für die auch die beschleunigte Blutkörperchensenkung charakteristisch ist. Nach den vorliegenden Angaben der Literatur dürfen wir annehmen, daß die gemeinsame Ursache hierbei

¹⁾ F. Plaut, Münch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 10.

²⁾ W. Runge, Münch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 33.

eine erhöhte Labilität der Serum-Eiweißkörper, insbesondere der Globuline ist. Bei Verwendung geeigneter Extrakte verschwindet daher bekanntlich das unspezifische Verhalten der Wassermann-Reaktion, wofern die Sera vorher inaktiviert werden. Durch den thermischen Eingriff des Inaktivierens wird infolge der Stabilisierung der Globuline ihre unspezifische Beeinflussung durch die Extrakte beseitigt, so daß nur noch die für Syphilis charakteristische Reaktionsfähigkeit bestehen bleibt¹⁾.

Ein gemeinsames Verhalten der Sera bei Gravidität und den genannten Krankheitsgruppen findet sich aber auch bei anderen Methoden²⁾, die zu diagnostischen Zwecken benutzt worden sind, so z. B. bei der Meiostragmir-Reaktion. Auch die von Calmette³⁾ zuerst als für Tuberkulose charakteristisch angegebene Reaktion, die darin besteht, daß das inaktivierte Serum von Tuberkulösen in Gemeinschaft mit Kobragift die Hämolyse von Pferdeblut vermittelt, tritt, wie die Prüfung zahlreicher Autoren gezeigt hat, auch in anderen Fällen, insbesondere bei Carcinom, Schwangerschaft und bei Stillenden ein, und es erscheint besonders bemerkenswert, daß die Reaktion nach den Angaben von Bauer und Lehndorff⁴⁾, Heynemann⁵⁾ im menschlichen Nabelschnurblut fehlt. Der letztere Befund ist deshalb von besonderem Interesse, weil, wie schon Linzenmeier angegeben hat, das Nabelschnurblut durch eine besonders verlangsamte Senkungsgeschwindigkeit ausgezeichnet ist.

Bereits die erwähnten älteren Angaben über das gleichsinnige Verhalten des Serums bei Gravidität, Geschwülsten usw. legen wohl die Annahme nahe, daß auch die Beschleunigung der Blutkörperchensenkung in einer Veränderung der Blutflüssigkeit die gemeinsame Ursache haben dürfte. Wie bereits von Sachs und mir⁶⁾ an anderer Stelle ausgeführt wurde, war es eigentlich eine willkürliche Abgrenzung, daß man

¹⁾ Vgl. hierzu H. Sachs, Kolloid-Zeitschr. 24, 113. 1919.

²⁾ Vgl. hierzu R. Kraus, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. I, Ref. 54, Beiheft S. 95. 1912.

³⁾ A. Calmette, Dtsch. med. Wochenschr. 1908, Nr. 40.

⁴⁾ F. Bauer und H. Lehndorff, Wien. med. Wochenschr. 1909, Nr. 28; Fol. Serol. 3, 87. 1909.

⁵⁾ Th. Heynemann, Arch. f. Gynäkol. 90, H. 2. 1909.

⁶⁾ H. Sachs und K. von Oettingen, Naturhistor. med. Verein Heidelberg 9. II. 1921; Münch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 12.

sich bei der Untersuchung der Blutflüssigkeit nach serologischen Grundsätzen fast immer mit der Prüfung des Bluteserums begnügte und damit die, wie man wohl sagen darf, labilste Eiweißquote des Blutes, das Fibrinogen, von der Prüfung ausschloß. Tatsächlich haben schon die Beobachtungen von Johannes Müller unzweideutig ergeben, daß die Beschleunigung der Blutkörperchensenkung durch das Defibrinieren des Blutes stark vermindert oder aufgehoben wird. Die interessanten Untersuchungen von Höber¹⁾, Linzenmeier u. a. haben in Übereinstimmung damit ergeben, daß die Senkungsbeschleunigung bei Gravidität durch den Gerinnungsvorgang des Blutes verschwindet oder stark abnimmt, sie lassen es dabei dahingestellt, ob das Fibrinogen selbst oder ein mit der Fibrinbildung aus dem Plasma entfernter Stoff die Ursache der Senkungsbeschleunigung ist. In dem Umstand, daß jedenfalls die senkungsbeschleunigende Wirkung des Plasmas auch durch negative Adsorbentien aufgehoben werden kann, erblicken die Autoren einen Beweis für die von Höber, Fähräus und Linzenmeier vertretene Anschauung, daß schließlich eine Herabsetzung der negativ-elektrischen Ladung der Blutkörperchen zu der Senkungsbeschleunigung führt.

Freilich erscheint, auch wenn man dieser Betrachtung folgt, das Phänomen noch keineswegs vollständig geklärt, wie dies schon Linzenmeier hervorhebt. So ist die von ihm erwähnte Abhängigkeit der Senkungsgeschwindigkeit von der Temperatur wohl nicht ohne weiteres dem Verständnis zugänglich. Sie deutet aber vielleicht auf eine Abhängigkeit von sekundären physikalischen Momenten hin. Jedenfalls erschien es in mehrfacher Hinsicht von Interesse, die Erscheinung der beschleunigten Senkung einer weiteren Analyse zu unterziehen.

Da meine Versuche im wesentlichen der Aufklärung des Wesens der Senkungsbeschleunigung galten, habe ich mich bei der Bestimmung der Senkungsgeschwindigkeit im allgemeinen mit approximativen Schätzungen begnügt, ohne quantitativ vergleichbare Werte anzustreben. In der Mehrzahl der Versuche wurde daher auch nur die Senkungsgeschwindigkeit im Graviditenblut und im Nabelschnurblut vergleichend bestimmt. Es handelt sich hierbei

¹⁾ R. Höber, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 16; Ber. Phys. 2, 178. 1920.

bekanntlich um Extreme, indem der starken Senkungsbeschleunigung bei Gravidität eine außerordentliche Verlangsamung der Senkung gegenüber dem Blut normaler Erwachsener im Nabelschnurblut gegenübersteht.

Methodisch wurde Citratblut verwendet; um einen unnötigen Überschuß an Natriumcitrat zu vermeiden, verwendete ich eine 2proz. Natriumcitratlösung, die sich bei der Prüfung gegenüber roten Blutkörperchen der 0,85proz. Kochsalzlösung nur geringgradig hypertonisch erwies und mischte ein Teil der 2proz. Natriumcitratlösung mit 9 Teilen Blut. Fast immer gelang es, derart die Gerinnung zu vermeiden. In manchen Fällen benutzte ich allerdings eine stärkere Natriumcitratlösung, indem ich 2 Teile 5proz. Natriumcitrat mit 8 Teilen Blut mischte. Es hatte nämlich den Anschein, daß die höhere Natriumcitratkonzentration zuweilen Differenzen in den Eigenschaften des Blutplasmas, über die von Sachs und mir (l. c.) schon an anderer Stelle berichtet worden ist, und auf die ich später noch zurückkommen werde, deutlicher hervortreten läßt. Für die Gesamtheit der im folgenden mitzuteilenden Ergebnisse sind aber diese verhältnismäßig seltenen Abweichungen der Versuchsanordnung ohne Belang.

In kasuistischer Hinsicht konnte ich bei der Untersuchung von 293 Blutproben die vorliegenden Erfahrungen von Fähræus und der anderen Autoren durchaus bestätigen. Von 168 schwangeren Frauen wies das Blut in 166 Fällen eine starke Senkungsbeschleunigung auf, die besonders in den letzten Monaten der Schwangerschaft außerordentlich hochgradig war. Immerhin möchte ich auf zwei Ausnahmen von dieser Regel besonders hinweisen. Im Gegensatz dazu war das Blut der Neugeborenen (Nabelschnurblut) durch eine außerordentlich langsame Blutkörperchensenkung ausgezeichnet. In der Mitte dieser beiden Extremen standen die Blutproben von normalen Erwachsenen. In 11 Fällen von Geschwülsten, fieberhaften Erkrankungen konnte auch ich in Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur eine stark beschleunigte Senkung der roten Blutkörperchen beobachten. Auch unter den normalen Blutproben fand ich zweimal beschleunigte Senkung. Es handelte sich hierbei aber um Menstruierende, bei denen ja der dem Gravidenblut sich nähernde Charakter der Blutkörperchensenkung bereits bekannt ist. In Übereinstimmung mit Linzenmeier und anderen kann ich also auch nach meinen Erfahrungen angeben, daß die beschleunigte Senkung in den späteren Monaten der Gravidität ein fast konstantes Merkmal ist, wenn es auch deshalb, weil auch bei anderen pathologischen Vorgängen die Sen-

kung beschleunigt erscheint, nicht als ein diagnostisches, für die Schwangerschaft spezifisches Merkmal betrachtet werden kann.

I.

Was nun meine Untersuchungen über das Wesen der Blutkörperchen Senkung anlangt, so konnte ich zunächst in zahlreichen Versuchen die Abhängigkeit der Senkungsgeschwindigkeit von den Eigenschaften des Blutplasmas bestätigen. Bei äußerer Betrachtung gelingt es in Übereinstimmung mit den Autoren, bevor noch eine deutliche Senkung wahrnehmbar ist, schnell senkendes Blut von langsam senkenden durch die agglutinationsartige Zusammenballung der roten Blutkörperchen zu mehr oder weniger größeren Partikelchen zu unterscheiden. Allerdings zeigt dieser Vorgang beim Aufschütteln eine mehr oder weniger große Neigung zu Reversibilität, wie sie in diesem Grade bei den eigentlichen Agglutinationsvorgängen (Rizin, Immunagglutinin) wohl kaum eintritt.

Daß die Senkung der Ausdruck einer Wechselbeziehung zwischen roten Blutkörperchen und Plasma ist, ergibt sich ohne weiteres aus dem Umstand, daß bei Ersatz des nach dem Zentrifugieren abgegossenen Plasmas durch physiologische Kochsalzlösung die Senkung aufgehoben bzw. stark verlangsamt ist (vgl. hierzu Linzenmeier [l. c.] u. a.), und daß es sich hierbei nicht um eine Wirkung von Elektrolyten handelt, ergab das gleichsinnige Verhalten bei Ersatz des Plasmas durch isotonische Rohrzuckerlösung. Im gleichen Sinne spricht die Tatsache, daß bei Überführung der Blutkörperchen aus schlecht senkendem Blut in das Plasma von gut senkendem Blut und umgekehrt, die Blutkörperchen, gleichgültig, welcher Herkunft sie sind, sich in dem Plasma aus gut senkendem Blut bei weitem rascher senken als im anderen Falle. — Allerdings spielt bei derartigen Versuchen, über die schon von Höber, Linzenmeier und Plaut berichtet wurde, die Isoagglutination nicht selten eine die Beurteilung störende Rolle. Ich habe aber in zahlreichen Versuchen die Interferenz von Isoagglutininen ausschließen können und dabei gesehen, daß sich die Blutkörperchen von Nichtgraviden im Graviden-Plasma ebenso stark, zuweilen sogar stärker senkten als die Blutkörperchen von Graviden,

während sich im Plasma von Nichtgraviden beide Blutkörperchensorten gleich stark senkten.

Nach Höber ist allerdings in der Senkungsgeschwindigkeit zwischen Graviden-Blutkörperchen und Nichtgraviden-Blutkörperchen im Austauschversuch zeitlich ein gewisser Unterschied zugunsten der ersteren vorhanden. Wenn ich dies nicht gesehen habe, so liegt das möglicherweise daran, daß ich die Blutkörperchen zum Vertauschungsversuch zunächst mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung wusch, um die anhaftenden Plasmareste zu beseitigen. Daß dieses Auswaschen der Blutkörperchen von Einfluß ist, zeigt das folgende Versuchsbeispiel:

Je 1 ccm Gravidenplasma wurde mit je 0,25 ccm Blutkörperchensediment gemischt, und zwar

1. Gravidenblutkörperchen, mit Kochsalzlösung gewaschen;
2. Nabelschnurblutkörperchen, mit Kochsalzlösung gewaschen;
3. Gravidenblutkörperchen, ungewaschen;
4. Nabelschnurblutkörperchen, ungewaschen.

Tabelle I.

Die Senkung betrug nach 10 Minuten in			
Röhrchen 1 mm	Röhrchen 2 mm	Röhrchen 3 mm	Röhrchen 4 mm
2—3	2—3	4	2—3

Es ergibt sich also, daß es durch Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung gelingt, im Blutsediment die an und für sich in Übereinstimmung mit Höber bestehenden zeitlichen Unterschiede (Röhrchen 3 und 4) zu verwischen¹⁾.

Man wird das als Beweis dafür betrachten dürfen, daß die primäre Veränderung der Blutflüssigkeit, die zu einer beschleunigten Blutkörperchensenkung führt, lediglich im Plasma vorhanden ist und die Blutkörperchen erst sekundär getroffen werden, eine Annahme, die wohl auch mit den von Fähräus, Höber und Linzenmeier vertretenen Anschauungen übereinstimmen dürfte.

¹⁾ In einer soeben erschienenen Arbeit, die mir erst nach Beendigung dieser Untersuchungen bekannt geworden ist, auf die ich aber an späterer Stelle noch eingehen werde, hat Linzenmeier (Arch. f. d. ges. Physiol. 186, 272. 1921) über einen ähnlichen Versuch berichtet, dabei allerdings trotz des Waschens der Blutkörperchen im Normalserum noch immer einen Unterschied der Blutkörperchen aus gut und schlecht senkendem Blut nach längerer Zeit feststellen können, nicht aber im Gravidenserum.

Für die ausschließliche Bedeutung des Plasmas spricht auch der Umstand, daß die Senkungsgeschwindigkeit beim Verdünnen des Plasmas sehr rasch eine starke Abnahme erleidet.

Je 0,3 ccm gewaschenes Blutsediment aus Gravidenblut wurden mit je 1 ccm konzentriertem bzw. 2- und 4fach verdünntem normalen und Gravidenplasma gemischt. Zur Kontrolle wurde in dem letzten Röhrchen das Plasma durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt. Das Ergebnis zeigt Tabelle II.

Tabelle II.

1 ccm Plasma	Senkung von 0,3 ccm Gravidenblut nach 15 Minuten durch	
	Normalplasma mm	Gravidenplasma mm
Konzentriert	4	12
2-fach verdünnt	1	2
4- " "	1	1
Kontrolle "	1	1

Wie sich aus der Tabelle ergibt, ist sowohl im Normalplasma als auch im Gravidenplasma schon bei doppelter Plasmaverdünnung die durch das Plasma bedingte Senkungsbeschleunigung fast oder ganz aufgehoben (vgl. hierzu gleichsinnige Angaben der an anderen Stellen angeführten Literatur). Die Ursache hierfür ist keinesfalls allein in der Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung zu suchen; denn auch bei Herabsetzung der Plasmamenge, ohne Auffüllen physiologischer Kochsalzmenge auf gleiches Volumen, tritt annähernd die gleiche Verlangsamung der Blutkörperchensenkung ein, wie es folgende Tabelle III zeigt:

Tabelle III.

Menge des Plasmas ccm	Senkung von Graviden-Blutkörperchen nach 20 Minuten durch	
	Normalplasma mm	Gravidenplasma mm
1,0	3	15
0,5	2	3

Es ist also auch die Verminderung der absoluten Plasmamenge, bzw. die Veränderung des Verhältnisses zwischen Blutkörperchen- und Plasmamenge für die Verminderung der Senkungsgeschwindigkeit von Bedeutung. Es ergänzen diese Befunde daher wohl die in ihrem Wesen gleichsinnigen Erfahrungen von Linzenmeier und

Plaut. Gleichwohl sprachen aber einige Beobachtungen von mir dafür, daß nicht nur der absoluten Plasmamenge und dem Verhältnis zwischen Blutkörperchenmenge und Gesamtlüssigkeitsvolumen, sondern auch dem Medium, mit dem das Plasma verdünnt ist, eine wesentliche Rolle zugesprochen werden muß. Ich habe nämlich Senkungsversuche vorgenommen, indem ich Gravidenplasma einerseits mit physiologischer Kochsalzlösung, andererseits mit dem kaum zu einer Senkung führenden Neugeborenenplasma verdünnte und dabei deutliche Unterschiede feststellen können, wie sich aus folgendem Beispiel ergibt (Tabelle IV)

Tabelle IV.

Gravidenplasma ccm	Nabelschnurplasma ccm	Physiol. Kochsalzlösung ccm	Senkung von 0,25 ccm Blutkörperchen nach	
			15 Minuten mm	80 Minuten mm
1	—	—	4	8
0,5	0,5	—	1	5
0,5	—	0,5	0	2
—	1	—	0	1

Während sich also die Senkung des Gravidenplasma bei Verdünnung mit Kochsalzlösung von 8 auf 2 mm vermindert, beträgt sie bei gleicher Verdünnung mit Nabelschnurplasma 5 mm, obwohl das letztere unter gleichen Bedingungen im unverdünnten Zustande nur die minimale Senkung von 1 mm zeigt. Der Versuch spricht zugleich dafür, daß nicht etwa, wie man wohl von vornherein annehmen könnte, im Neugeborenenplasma Hemmungsstoffe vorhanden sind, die gegenüber den die Senkung bedingenden Stoffen antagonistisch wirken; denn in diesem Falle müßte man ja gerade bei Verdünnen des Gravidenplasmas mit Neugeborenenplasma eine besonders starke Verminderung der Senkungsgeschwindigkeit erwarten. Es zeigt sich aber, daß gerade umgekehrt das Nabelschnurplasma als Verdünnungsmedium die Senkung deutlich weniger verzögert als die physiologische Kochsalzlösung. Da nun andererseits das Neugeborenenplasma in dem vorliegenden Versuche kaum an und für sich einen Einfluß auf die Senkung bewirkt, so darf man wohl die Schlußfolgerung ziehen, daß für die Senkungsbeschleunigung nicht allein die Anwesenheit eines bestimmten Stoffes im Plasma

maßgebend ist, sondern daß für die Wechselwirkung, die sich zwischen dem wirksamen Agens des Plasmas und den Blutkörperchen vollzieht, zugleich der Beschaffenheit des Mediums eine wesentliche Bedeutung zukommt.

Erwähnenswert dürfte dabei noch sein, daß sich die gleichen Verhältnisse auch dann ergaben, wenn an Stelle des Plasmas Serum zur Verdünnung benutzt wurde (siehe Tabelle V).

Tabelle V.

Graviden- plasma ccm	Nabelschnur- plasma ccm	Graviden- serum ccm	Phys. Koch- salzlösung ccm	Senkung von 0,25 ccm Blut- körperchen nach	
				15 Minuten mm	25 Minuten mm
1,0	—	—	—	5	8
0,75	0,25	—	—	4	7
0,75	—	0,25	—	4	7
0,75	—	—	0,25	3	5
—	0,75	0,25	—	1	1

Es ergibt sich also auch aus diesem Versuche, in dem nur eine geringgradige Verdünnung des Gravidenplasmas vorgenommen wurde, daß sowohl durch Neugeborenenplasma als auch durch Graviden Serum, die beide an und für sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen kaum eine Senkung bewirken, die Senkungsbeschleunigung deutlich weniger vermindert wird, als bei Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung.

Man kann daher annehmen, daß die Reaktion, die zwischen den Blutkörperchen und Plasmabestandteilen vor sich geht, wesentlich von der allgemeinen Plasma-beschaffenheit bzw. Plasmastruktur abhängig ist. Schon bei geringgradigem Verdünnen des Plasmas mit physiologischer Kochsalzlösung nimmt die zur Senkungsbeschleunigung führende Reaktionsfähigkeit ab, und es dürfte nur der extreme Ausdruck dieser Abhängigkeit der sich vollziehenden Reaktion vom Medium sein, wenn sich die Gravidenblutkörperchen, wie schon hervorgehoben wurde, beim Aufnehmen in physiologischer Kochsalzlösung überhaupt nicht mehr von anderen unterscheiden. Es handelt sich eben bei den Blutkörperchen augenscheinlich um eine reversible Veränderung, wobei die Reversibilität in sehr hohem Grade von der Beschaffenheit des Mediums abhängig ist. — Auch nach Fähräus, Höber und Linzenmeier, die ja den eigent-

lichen Grund für die beschleunigte Senkung in einer herabgesetzten negativen Blutkörperchenladung erblicken, erfolgt die Ladungsdifferenz dadurch, daß die die Plasmahaut aufbauenden Eiweißkörper neutralisiert werden durch Adsorption, und Linzenmeier hat bereits zur Erklärung der Tatsache, daß auch Blutkörperchen mit starkem Senkungsvermögen das letztere in physiologischer Kochsalzlösung verlieren, ausgeführt, daß elektropositive, agglutinierende Bestandteile, die der Blutkörperchenoberfläche durch Adsorption anhaften, in physiologischer Kochsalzlösung die Blutkörperchen mehr oder weniger verlassen¹⁾.

II.

Man wird unter diesen Umständen nicht fehlgehen, wenn man die Frage des Adsorptionsvorganges in den Mittelpunkt der Betrachtung stellt. Es spricht in diesem Sinne vielleicht, daß man durch eine erhöhte Salzkonzentration, die ja auf Adsorptionsvorgänge von hemmendem Einflusse ist, die Senkungsgeschwindigkeit bis zu einem gewissen Grade verändern kann. So erhält man, wie das folgende Beispiel zeigt, schon beim Auffangen des Blutes mit 2% und 5% Natr. citrat-Lösung gewisse Unterschiede (siehe Tabelle VI).

Tabelle VI.

	Senkung nach		
	10 Minuten mm	20 Minuten mm	30 Minuten mm
Gravidenblut 1 (2proz. Natr. citr.) . . .	3	12	30
" 1 (5 " " ") . . .	2	10	22
" 2 (2 " " ") . . .	3	10	28
" 2 (5 " " ") . . .	2	8	20

Diese Erfahrungen, die übrigens auch Angaben von Popper und Wagner²⁾ entsprechen, veranlaßten mich gerade, die Blutproben in 2proz. Natr. citr.-Lösung aufzufangen, um möglichst

¹⁾ Es dürfte in diesem Zusammenhange auch ein Hinweis auf die Arbeiten von Brinkman und van Dam (diese Zeitschr. 103, 35 u. 52. 1920) nicht ohne Interesse sein. Ohne auf ihren Inhalt hier näher einzugehen, sei doch hervorgehoben, daß die genannten Autoren den Blutkörperchen im Serum bzw. im Plasma eine isolierende adsorbierende Schicht vindizieren, die sie in physiologischer Kochsalzlösung verlieren.

²⁾ E. Popper und R. Wagner, Med. Klin. 1920, Nr. 46.

günstige Bedingungen für die Senkungserscheinungen zu haben¹⁾. Bei weiterer Steigerung des Natr. citr.-Gehaltes und noch mehr bei Zusatz von Kochsalz erhält man, wie das folgende Beispiel zeigt, noch stärkere Hemmungen der Senkungsgeschwindigkeit.

Es wurden je 1 ccm Gravidenblut und Normalblut mit

a) 0,5 ccm 0,85 proz. Kochsalzlösung,

b) 0,5 „ 20 proz. Natr. citr.-Lösung,

c) 0,5 „ 30 proz. NaCl-Lösung

gemischt (Tabelle VII).

Tabelle VII.

	Senkung nach 1 Stunde		
	a) 0,85 % NaCl mm	b) 20% Natr. citr. mm	c) 30 % NaCl mm
Gravidenblut . . .	11	5	2
Normalblut	4	2	1

Von ähnlichen Gesichtspunkten aus habe ich auch den Einfluß verschiedener Temperaturen auf die Senkungsgeschwindigkeit geprüft. Wenn auch meine Versuche in dieser Richtung die Angaben von Fähräus und Linzenmeier in bezug auf die Verzögerung der Senkung bei Temperaturerniedrigung bestätigen, so darf ich vielleicht doch ein Versuchsbeispiel anführen, weil es bei verschiedenen Plasmen immerhin einige Unterschiede aufweist (Tabelle VIII):

Tabelle VIII.

	Senkung nach 80 Minuten bei		
	b) 0° mm	b) Z. T. ca. 20° mm	c) 37° (Wasserbad) mm
Gravidenplasma . . .	5	20	20
Normalplasma	3	8	10
Nabelschnurplasma . .	1	3	6

Der Versuch ist insofern instruktiv, als er die ausgesprochene Abhängigkeit von der Temperatur, entsprechend den Angaben der Autoren bestätigt, zugleich aber zeigt,

¹⁾ Es ist daher wohl möglich, daß überhaupt im Citratblut, zumal bei Verwendung 5 proz. Natr. citr.-Lösung die Senkungsgeschwindigkeit durch den Citratzusatz eine Verlangsamung erfährt. In diesem Sinne würden Angaben Linzenmeiers sprechen, nach denen die Senkung in Hirudinblut rascher verläuft als im Citratblut. Allerdings bezieht Linzenmeier diesen Unterschied auf die durch das Auffangen des Blutes in Citratlösung erfolgte Verdünnung.

daß einerseits in dem benutzten stark senkenden Gravidenblut das Optimum bei Zimmertemperatur erreicht ist¹⁾, im schlecht senkenden Nabelschnurblut dagegen bei 37° eine erhebliche Beschleunigung der Senkung gegenüber dem Verhalten bei Zimmertemperatur eintritt. Auch der letztere Umstand spricht dafür, daß im Nabelschnurblut das zur Senkung führende Agens vorhanden ist, nur eben in so geringer Konzentration, daß es erst unter den optimalen Bedingungen, die durch die Temperaturerhöhung gegeben werden, zum Ausdruck gelangt.

Bemerkenswert erscheint mir nun, daß auch in der Kälte, bei der die Blutkörperchensenkung stark verzögert oder aufgehoben ist, die Agglomeration der roten Blutkörperchen in der Regel ebenso, vielleicht sogar noch stärker zum Ausdruck kommt als bei Zimmertemperatur. Wenn trotzdem in der Kälte die Senkung unterbleibt, so darf man schließen, daß die Zusammenballung oder „Agglutination“ der roten Blutkörperchen an und für sich noch nicht genügt, um eine Senkungsbeschleunigung herbeizuführen. Augenscheinlich kommt die physikalische Beschaffenheit des Plasmas noch als weiteres Moment hinzu. Tatsächlich kann man beobachten, daß das Plasma durch die Temperaturerniedrigung schwerflüssiger und zäher wird. Vielleicht bewirkt also die Temperaturerniedrigung eine Zunahme der Viscosität, und man kann wohl annehmen, daß diese Viscositätssteigerung ein Hindernis für die Blutkörperchensenkung darstellt.

Schon Linzenmeier hat einen gewissen Gegensatz darin erblickt, daß visköse Stoffe zur Blutkörperchenagglutination und beschleunigten Senkung führen, während die innere Reibung eigentlich die Senkung erschweren müßte. Nach orientierenden Versuchen, die noch nicht abgeschlossen sind, möchte ich allerdings glauben, daß auch bei der Gelatine der hemmende Einfluß der Viscosität zur Geltung kommt, indem das Maximum der Senkungsgeschwindigkeit an eine bestimmte Gelatinekonzentration gebunden ist, während höhere Gelatinekonzentrationen die Senkung hemmen können.

Vielleicht ist die stark verlangsamte Senkung, die das Nabelschnurblut gegenüber dem Blut normaler Erwachsener aufweist, zum Teil auf eine relative Viscositätssteigerung zurückzuführen, was mit den Angaben der Literatur²⁾ übereinstimmen würde.

¹⁾ In einem von Linzenmeier angeführten Versuchsbeispiel nimmt allerdings die Senkungsgeschwindigkeit auch im Gravidenblut bei 37° zu.

²⁾ Vgl. hierzu von Jaschke, Physiologie usw. des Neugeborenen. Wiesbaden 1917.

Abderhalden¹⁾ hat jüngst die auch von ihm beobachtete Tatsache, daß die Blutkörperchen im Nabelschnurblut sich sehr langsam senken, zum Teil darauf zurückzuführen gesucht, daß die Zahl der Blutkörperchen im Nabelschnurblut erhöht ist. Wenn dem so wäre, so könnte es gelingen, durch eine relative Verminderung der Blutkörperchenmenge im Nabelschnurplasma eine Senkung zu erzielen, während man zugleich daran denken könnte, durch eine Herabsetzung der Blutkörperchenmenge im Gravidenplasma die Senkung noch zu verstärken. Tatsächlich trifft in letzterer Hinsicht das Umgekehrte zu, wie folgendes Versuchsbeispiel zeigt.

Es wurden 0,25 ccm und 0,05 ccm Blutkörperchensediment aus Graviden- bzw. Nabelschnurblut mit je 1 ccm der entsprechenden Plasmen und je 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung gemischt. Das Ergebnis zeigt Tabelle IX.

Tabelle IX.

Plasma und Blutkörperchen von	Senkung nach 15 Minuten mit	
	0,25 ccm Blut mm	0,05 ccm Blut mm
Graviden	8	2
Nabelschnur	0,5	1
Gravidenblutkörperchen und Kochsalzlösung	0	1

Die Tabelle zeigt zunächst, daß im Gravidenplasma die Senkungsgeschwindigkeit bei Herabsetzung der Blutkörperchenmenge abnimmt. Wenn auch diese Differenz meist nur einen verhältnismäßig kurzen zeitlichen Charakter hatte, so waren die Unterschiede doch regelmäßig zu beobachten, und sie entsprechen wohl auch der Angabe Linzenmeiers, daß bei Verwendung von kleineren Blutkörperchenmengen, als er sie als optimale fand, die Trennungsgrenze verwaschen und nicht mit Bestimmtheit abzulesen ist. Man darf aus diesem Ergebnis aber wohl den Schluß ziehen, daß im Schwangerenblut bei Verminderung der Blutkörperchenmenge unter ein gewisses Maß die Senkungsgeschwindigkeit abnimmt, und dieses Ergebnis dürfte um so bemerkenswerter erscheinen, als im Nabelschnurblut gerade das Umgekehrte zutrifft. Allerdings darf man daraus nicht den Schluß ziehen, daß das Nabelschnurplasma bei verminderter Blutkörperchenmenge senkungsbeschleunigende

¹⁾ E. Abderhalden, Fermentforschung Bd. IV, S. 230. 1920.

Eigenschaften gewinnt. Denn die Tabelle zeigt ja zugleich, daß auch beim Aufschwimmen der Blutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung die Senkung mit der Abnahme der Blutkörperchenmenge zunimmt.

Die gegensätzliche Erscheinung im Gravidenblut dürfte wohl der bei vielen kolloidchemischen Reaktionen zu beobachtenden Abhängigkeit von einem optimalen Mengenverhältnis zwischen den beiden Komponenten entsprechen. Vielleicht kann man daran denken, daß die Blutkörperchen, wenn ihre Menge verhältnismäßig klein ist, so viele Stoffe aus dem Gravidenplasma „adsorbieren“, daß sie gewissermaßen mit einer Schutzkolloidhülle umzogen sind. Möglicherweise haften ihnen dabei so viele elektrosensitive Plasmabestandteile an, daß die elektropositive Außenschicht die Suspensionstabilität steigert.

III.

Die Frage nun, welche Bestandteile im Plasma es sind, die zur beschleunigten Senkung in der Gravidität führen, ist vielfach erörtert und experimentell geprüft worden. Besonders die Arbeiten der Höberschen Schule (Höber, Fähräus, Linzenmeier) haben gezeigt, daß man die senkungsbeschleunigende Wirkung durch Ausschütteln des Plasmas mit solchen Adsorbentien, die, wie Kaolin, Bolus alba, Tierkohle, positive Teilchen adsorbieren, entfernt werden. Aus dem Umstand, daß durch die Gerinnung die Senkungsbeschleunigung aufgehoben wird, wurde geschlossen, daß das Fibrinogen der senkungsbeschleunigende Stoff ist oder die verantwortlich zu machende Substanz bei der Fibrinbildung aus dem Plasma mitgerissen wird. Ich konnte nun zunächst in Ausschüttelungsversuchen mit Bolus alba die Angaben Linzenmeiers über die Aufhebung der Senkungsbeschleunigung vollkommen bestätigen, suchte sie aber zugleich insofern zu ergänzen, als ich durch Einführung von Fibrinogen in das „Bolusplasma“ die ursprünglichen Verhältnisse wieder herzustellen versuchte. Dabei habe ich allerdings von einer Reindarstellung des Fibrinogens abgesehen und mich damit begnügt, die Fibrinogenfraktion aus verschiedenen Plasmaproben zu isolieren und ihr Verhalten in bezug auf die Blutkörperchensenkung zu prüfen.

Versuche mit einer partiellen Kochsalzsättigung des Plasmas führten bereits zu mehr oder weniger deutlichen Ergebnissen; häufiger aber waren die Verhältnisse nicht einwandfrei zu rekonstruieren. Es mag das wohl zum Teil daran gelegen haben, daß ich einfach das nach partieller Kochsalzlösung abzentrifugierte Fibrinogen in andere Medien überführte und so

immerhin dem Sediment eine nicht unerhebliche Kochsalzmenge anhaftete, die die daran angeschlossenen Senkungsversuche ungünstig beeinträchtigte.

Regelmäßigere Resultate erhielt ich aber bei der Ausfällung des Plasmas mit verdünntem Alkohol. Zu diesem Zwecke ging ich folgendermaßen vor.

Es wurden

- I. 2 ccm natives Gravidenplasma,
- II. 2 ccm desselben Gravidenplasmas nach Schütteln mit Bolus und der Entfernung des letzteren durch Zentrifugieren („Bolusplasma“),
- III. 2 ccm des gleichen „Bolusplasmas“ unter Zusatz des aus 2 ccm Gravidenplasma durch Fällen mit 5 ccm 3fach verdünnten Alkohols erhaltenen Sediments

mit je 0,5 ccm Gravidenblutkörperchen gemischt. Die sich ergebende Senkung zeigt Tabelle X.

Tabelle X.

Je 2 ccm	Senkung nach	
	5 Minuten mm	10 Minuten mm
Gravidenplasma	3	12
Bolusplasma	0	1
Bolusplasma + Fibrinogen . .	5	13

Die Tabelle zeigt in Übereinstimmung mit den Angaben Linzenmeyers, daß Gravidenplasma durch Schütteln mit Bolus seine Wirkung auf die Blutkörperchensenkung vollkommen eingebüßt hatte. Zugleich ergibt sich aber, daß die Auflösung des aus dem Gravidenplasma gewonnenen Fibrinogensedimentes im Bolusplasma die starke Senkungsgeschwindigkeit wieder herstellt, sogar vielleicht etwas verstärkt hat.

In weiteren Versuchen habe ich das aus Gravidenplasma gewonnene Fibrinogensediment einerseits in Neugeborenenplasma, andererseits in Gravidenserum gelöst.

Je 2 ccm Gravidenplasma wurden mit je 5 ccm 3fach verdünnten Alkohols gefällt, die Niederschläge abzentrifugiert. Die Niederschläge wurden

- I. in 2 ccm Gravidenserum (zur Vermeidung der Gerinnung unter Zusatz von 0,4 ccm 5proz. Natriumcitrat),
- II. in 2 ccm Neugeborenenplasma

gelöst.

Das Ergebnis unter Berücksichtigung der Kontrollen, wobei dem Gravidenserum $\frac{1}{6}$ Teil 5proz. Natriumcitrat zugesetzt wurde, zeigt Tab. XI.

Tabelle XI.

	Senkung nach	
	5 Minuten mm	10 Minuten mm
Gravidenserum + Fibrinogen . .	5	10
Neugeborenenplasma + Fibrinogen	3	4
Gravidenserum	1	1
Nabelschnurplasma	0	0
Gravidenplasma	4	10

Wie die Tabelle zeigt, bewirkt der Zusatz des Fibrinogensedimentes zum Nabelschnurplasma eine deutliche Verstärkung der Senkung. Allerdings ist die Senkungsbeschleunigung weit stärker bei Einführen des Fibrinogensedimentes in das Gravidenserum, und man darf wohl schon hieraus schließen, daß auch die Serumbestandteile im Gravidenblut für die Senkungsbeschleunigung nicht gleichgültig sind.

Besondere Versuche zeigten, daß das Fibrinogensediment zwar auch beim Aufnehmen in physiologischer Kochsalzlösung zu einer beschleunigten Blutkörperchensenkung führte; jedoch blieb die Senkungsgeschwindigkeit dabei in der Regel gegenüber derjenigen zurück, die beim Aufnehmen des Fibrinogensedimentes in Nabelschnurplasma oder in Gravidenserum zu beobachten war¹⁾.

Läßt die oben erwähnte Tatsache, daß die Aufnahme des Fibrinogensedimentes in Gravidenserum zu einer stärkeren Senkungsgeschwindigkeit führte als in Nabelschnurplasma, bereits vermuten, daß auch im Serum bei Gravidität senkungsbeschleunigende Stoffe vorhanden sind, so zeigten besonders darauf hin gerichtete Versuche, daß man auch im defibrierten Blut, insbesondere bei Vergleich von Graviden- und Neugeborenenblut, recht deutliche Unterschiede in der Senkungsgeschwindigkeit beobachten kann.

¹⁾ In der schon erwähnten neuesten Arbeit berichtet auch Linzenmeier, daß das aus Pferdeblut nach Hammersten dargestellte Fibrinogen eine starke Wirkung auf die Senkung der roten Blutkörperchen ausübt. In meinen Versuchen, in denen ich freilich von einer Reindarstellung des Fibrinogens abseh und das Fibrinogen nur aus Gravidenplasma herstellte, war jedenfalls das in schlecht senkendem Plasma oder Serum gelöste Sediment wirksamer als an und für sich.

Als Beispiel diene folgender Versuch, in dem einerseits Citratblut, andererseits durch Schütteln mit Glasperlen defibriertes Blut in hohen Reagensgläsern zum Senkungsversuch diente.

Tabelle XII.

	Senkung nach 2 Stunden mm
Gravidencitratblut	10
Nabelschnurcitratblut	0,5
Graviden-defibriertes Blut	4
Nabelschnur-defibriertes Blut	0

Die Unterschiede sind also auch bei defibriertem Blut, wenn auch die absolute Senkungszeit erheblich vermindert ist noch deutlich vorhanden, und gleichsinnige Unterschiede ergaben sich auch, wenn das durch spontane Gerinnung gewonnene Serum mit Blutkörperchen aus Citratblut, die wiederholt mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen waren, gemischt wurden.

Daß die Unterschiede im defibrierten Blut bzw. im Serum prinzipiell ebenso vorhanden sind wie im Plasma, spricht wohl dafür, daß man nicht absolut nur die Fibrinogenquote für die Verschiedenheit der Senkung verantwortlich machen kann. Man wird freilich — das zeigt die hervorragende Überlegenheit des Plasmas gegenüber dem Serum — annehmen müssen, daß mit dem Ausscheiden der Fibrinogenfraktion bei der Gerinnung die Blutflüssigkeit einen für das Zustandekommen der Senkung wesentlichen Faktor einbüßt. Andererseits wird man aber gerade dann, wenn man an einen Adsorptionsvorgang beim Zustandekommen der Blutkörperchensenkung denkt, berücksichtigen dürfen, daß sich die verschiedenen Eiweißfraktionen der Blutflüssigkeit im wesentlichen durch den Grad ihrer Stabilität unterscheiden. Man darf annehmen¹⁾, daß von der labilsten Quote, dem Fibrinogen, bis zu dem relativ stabilen Albumin eine kontinuierliche Reihe besteht, in der die sog. Globulinfraktion eine Mittelstellung zwischen dem Fibrinogen und dem Albumin einnimmt. Nimmt man daher an, daß die Ursache der verschiedenen Senkungsgeschwindigkeit der Blutkörperchen wenigstens zu einem wesentlichen Teil in der Verschiedenheit der Stabilität der Ei-

¹⁾ Vgl. hierzu E. Herzfeld und R. Klinger, diese Zeitschr. 63, 228. 1917.

weißkörper in der Blutflüssigkeit bedingt ist, so erklärt es sich ohne weiteres, daß man mit dem Plasma weit markantere Ergebnisse erhält als mit dem Serum, daß aber auch im Serum Unterschiede immerhin noch feststellbar sind. Wenn man der entwickelten Auffassung folgt, so müßte eben bei einer Senkungsbeschleunigung die Labilität der Eiweißkörper im allgemeinen eine erhöhte sein, und daß sie im Plasma in Form der Blutkörperchensenkung so deutlich zum Ausdruck kommt, würde nur daran liegen, daß sich die Labilitätsveränderung in der Fibrinogenquote am deutlichsten zeigen muß.

IV.

Im Sinne dieser Annahme sprechen Versuche, über die von Sachs und mir bereits berichtet worden ist¹⁾. Wir haben nämlich durch Bestimmung der Koagulierbarkeit und der Fällbarkeit verschiedener Plasmaarten durch geeignete Zusätze von Kochsalz, Ammonsulfat oder verdünntem Alkohol zeigen können, daß man mit diesen Verfahren sehr erhebliche Unterschiede in der Stabilität des Plasmas bei verschiedenen Zuständen und Krankheiten feststellen kann, und was in diesem Zusammenhang von ganz besonderem Interesse ist, ist der Umstand, daß sich gerade diejenigen Plasmen besonders labil erwiesen, bei denen auch eine stark beschleunigende Wirkung auf die Blutkörperchensenkung festzustellen war. Die Methoden, deren wir uns bedienten, waren folgende:

- a) kurzes Erwärmen der Plasmen im Wasserbad bei 55°;
- b) Mischen von 0,5 ccm Plasma mit 0,4 ccm gesättigter Kochsalzlösung;
- c) Mischen von 0,5 ccm Plasma mit 0,2 ccm halbgesättigter Ammonsulfatlösung;
- d) Mischen von 0,2 ccm Plasma mit 1,0 ccm 6fach in physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Alkohols.

Über die Ergebnisse im einzelnen ist, wie erwähnt, bereits von Sachs und mir berichtet worden. Ich begnüge mich daher, hier ein Versuchsbeispiel im Vergleich mit der Blutkörperchensenkung anzuführen (Tabelle XIII).

¹⁾ H. Sachs und Kj. von Oettingen, Naturhist. Verein Heidelberg, Sitzung am 9. II. 1921. Münch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 12.

Tabelle XIII.

	Erwärmen auf 55°	Kochsalz- fällung	Ammon- sulfat- fällung	Alkohol- fällung	Senkung nach 30 Minuten mm
Nabelschnurplasma	Trübung	—	—	—	2
Normalplasma	feine Flockg.	+	+	+	10
Schwangerenplasma	grobe	++++	++++	++	25

Die Zahl der + Zeichen entspricht dem Grade der zu beobachtenden Ausfällung.

Es ergibt sich aus dieser Tabelle, daß die verschiedenen Plasmareaktionen, die als Reaktionen auf die Kolloidstabilität des Plasmas aufgefaßt werden können, der Senkungsgeschwindigkeit proportional sind, und da in zahlreichen Versuchen sich der entsprechende Parallelismus ergab, kann man wohl nicht von Zufälligkeiten sprechen, darf vielmehr in dieser Parallelität eine Gesetzmäßigkeit erblicken.

Das Ergebnis, zu dem ich daher auf Grund der von Sachs und mir bereits mitgeteilten Versuche über das Wesen der Blutkörperchensenkung gelange, stimmt in gewisser Hinsicht mit der schon erwähnten jüngsten Arbeit von Linzenmeier¹⁾ überein, von der ich erst nach Niederschrift dieser Arbeit Kenntnis erhielt.

Auch Linzenmeier neigt nämlich neuerdings zu der Ansicht, daß nicht das Fibrinogen oder die Globuline als chemische Individuen, sondern ihre Dispersität für den Senkungsvorgang wesentlich sind. In diesem Sinne führt er Beobachtungen an, nach denen sich beim Verdünnen des Plasmas mit Wasser die Senkung vermindert, und nach denen beim Lagern des Plasmas das Senkungsvermögen abnimmt. In letzterer Hinsicht habe auch ich gleichsinnige Beobachtungen gemacht, und ich möchte glauben, daß der verhältnismäßig raschen Abnahme der senkungsbeschleunigenden Wirkung beim Lagern des Serums manche früher negativen Beobachtungen in dieser Hinsicht zuzuschreiben sind. Auch Linzenmeier gibt an, daß das Pferdeserum schon nach mehrstündigem Aussetzen einer Temperatur von 38° seine Wirkung auf die Senkung der roten Blutkörperchen verliert. Allerdings schreibt er seinen vorläufigen Untersuchungen in bezug auf die Frage der Dispersität nur einen provisorischen Charakter zu.

Durch den hier beschriebenen Parallelismus zwischen Senkungsbeschleunigung und Plasmareaktionen dürfte wohl aber die Annahme, daß Labilität und Blut-

¹⁾ E. Linzenmeier, Arch. f. d. ges. Physiol. 186, 272. 1921.

körperchensenkung in ursächlichen Beziehungen zu einander stehen, eine nicht unerhebliche Stütze erfahren, und man gelangt daher dazu, in dem Grade der Blutkörperchensenkung im wesentlichen eine Funktion der physikalischen Struktur der Plasmakolloide, also vor allem der Eiweißkörper des Blutes, zu erblicken.

Für die Abhängigkeit der Senkung von der Labilität des Plasmas spricht auch die schon von Linzenmeier beobachtete Aufhebung der senkungbeschleunigenden Wirkung durch Inaktivieren, d. h. Erwärmen des Plasmas auf 55°. Wenn ich mich auch hiervon überzeugen konnte, so möchte ich auf die Versuche im einzelnen keinen allzu großen Wert legen, weil, wie schon erwähnt, bereits bei kurzdauerndem Erwärmen des Plasmas eine mehr oder weniger starke Koagulation eintrat, die besonders stark bei Gravidenplasma zu beobachten war.

In einer soeben erschienenen Arbeit hat Starlinger¹⁾ in einer Reihe von Versuchen festgestellt, daß hoher Fibrinogengehalt stets mit hoher, niedriger Fibrinogengehalt stets mit geringer Senkungsgeschwindigkeit parallel geht. Starlinger schloß dabei aus der Differenz der mittels refraktrometrischer Bestimmungen in Serum und Plasma erhaltenen Werte des Eiweißgehaltes auf den Fibrinogengehalt. Es würde das den älteren Erfahrungen entsprechen, nach denen bei Zuständen mit erhöhter Senkungsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen in der Regel eine Hyperinose, bei solchen mit verlangsamer Senkung dagegen eine Fibrinogenverminderung vorhanden ist. Fraglich erscheint es nur, ob man von einer quantitativen Variation des Fibrinogengehaltes im früheren Sinne sprechen kann. Wenn man nämlich annimmt, daß die Unterschiede der Blutzusammensetzung physikalisch-chemischer Art sind und demnach die Beschleunigung mit einer erhöhten Labilität (grober Dispersität) verbunden ist, so erscheinen die wechselnden Differenzen im Eiweißgehalt zwischen Serum und Plasma nur als Ausdruck der verschiedenen Labilität, deren Zunahme eben ein größeres Verschwinden des Eiweißgehaltes bei der Defibrinierung oder Gerinnung bzw. bei den zur Fibrinogenfällung führenden Eingriffen bedingt. Der wesentliche Unterschied zwischen diesen beiden Betrachtungsweisen ist aber darin gelegen, daß bei der Annahme verschiedener Labilität die im Plasma vorhandenen Unterschiede, wenn auch in stark vermindertem Aus-

¹⁾ W. Starlinger, diese Zeitschr. 114, 129. 1921.

maße, auch im Serum vorhanden sein müssen, was, wie schon hervorgehoben wurde, tatsächlich der Fall ist.

Starlinger geht nun bei seinen weiteren Schlußfolgerungen von den von Herzfeld und Klinger entwickelten Anschauungen¹⁾ aus und nimmt in diesem Sinne an, daß die normale Suspensionsstabilität der roten Blutkörperchen durch Adsorption von Eiweißabbauprodukten oder auch von Lipoiden und Lipoidspaltprodukten bedingt wird, die gewissermaßen als Lösungsvermittler fungieren. Von diesem Gesichtspunkte aus glaubt Starlinger, daß ein hoher Gehalt an niedrigdispersen Eiweißkörpern (Fibrinogen) „durch Beraubung der Erythrocytenoberflächen an Polypeptiden“ eine verminderte Suspensionsstabilität und erhöhte Agglutination bewirkt. Diese Auffassung Starlingers würde also in physiko-chemischer Hinsicht primär der hier entwickelten nahekommen, sich aber grundsätzlich dadurch unterscheiden, daß nach Starlinger gewissermaßen die grobdispersen Eiweißkörper des Plasmas das Adsorbens wären, die der Blutkörperchenoberfläche die für ihre Stabilität erforderlichen Eiweißabbauprodukte entnehmen.

Wenn man allerdings der von Starlinger entwickelten Anschauung folgt, so ist es kaum verständlich, daß die sich im Gravidenplasma stark senkenden Blutkörperchen bei Übertragung in physiologische Kochsalzlösung oder auch bei Übertragung in das Plasma aus schlecht senkendem Blute ihr Senkungsvermögen einbüßen. Denn die nach Starlinger zur Wiederherstellung ihrer Suspensionsstabilität notwendigen Abbauprodukte stehen ihnen ja, zum mindesten in physiologischer Kochsalzlösung, nicht zur Verfügung.

Demgegenüber dürften die von Starlinger angeführten Beweise zugunsten seiner Betrachtung vielleicht auch anderer Erklärung zugänglich sein. Die von Starlinger angeführte Tatsache, daß ein erhöhter Natriumcitratgehalt und noch mehr ein erhöhter Kochsalzgehalt die Senkung hemmt, steht mit meinen Erfahrungen in Einklang. Nach Starlinger wird dabei durch verstärkte Hydrolyse eine Anreicherung der Abbauprodukte erzielt. Es ist aber für das Wesen des Vorganges ohne Bedeutung, ob man die Wirkung der Salzkonzentration einfach in einer „Stabilisierung“ erblickt. In jedem Falle müßte dadurch die Reaktion zwischen Blutkörperchen und Plasma leiden. Andere von Starlinger erhobene Befunde stimmen z. T. mit den von mir gemachten Erfahrungen überein, ohne daß sich daraus ein zwingender Beweis für die von ihm vertretene Betrachtungsweise ergeben dürfte.

Jedenfalls aber dürfte man wohl als primäre Ursache der beschleunigten Senkungsgeschwindigkeit die physikalische Struktur der Blutflüssigkeit gelten lassen. Daß sich auch in anderer Hinsicht mittels stalagmometrischer Bestimmungen, physikalische Differenzen zwischen Graviden- und Nabelschnurplasma zeigen, ist von Sachs und mir bereits mitgeteilt worden. So war das Nabelschnurplasma bei

¹⁾ E. Herzfeld und R. Klinger, diese Zeitschr. 83, 42. 1907.

der Bestimmung mittels des Traubeschen Stalagmometers in der Regel durch eine niedrige, das Schwangerenplasma meist durch eine hohe Tropfenzahl ausgezeichnet. Von Interesse dürfte dabei sein, daß das Gravidenplasma bei Temperaturverminderung eine erhebliche Abnahme der Tropfenzahl zeigte, während die Tropfenzahl im Nabelschnurplasma sich in der Kälte kaum veränderte. Die Abnahme der Tropfenzahl im Gravidenplasma in der Kälte stimmt also mit der Abnahme der Senkungsgeschwindigkeit überein. Soweit daher die bisherigen Versuche ein Urteil zulassen, scheint mit der verschiedenen Senkungsgeschwindigkeit auch ein Unterschied der Oberflächenspannung parallel zu gehen, der im Serum, wenigstens in diesem Grade, nicht nachzuweisen ist¹⁾.

Wenn ich zusammenfasse, so ergibt sich, daß in der Regel der Senkungsbeschleunigung der roten Blutkörperchen eine erhöhte Labilität der Bluteiweißkörper zu entsprechen scheint. Man darf sich daher vielleicht vorstellen, daß die roten Blutkörperchen gewissermaßen als „Fällungsmittel“ geringen Grades fungieren, die aus labilem Plasma

¹⁾ Verwiesen sei hierbei auf die Untersuchungen von Schemensky (diese Zeitschr. 105, 229, 1920; Münch. med. Wochenschr. 27, 43, 49, 1920), nach denen der erhöhten Senkungsgeschwindigkeit im Blute in der Regel eine Steigerung des „stalagmetrischen Quotienten“ im Urin parallel geht. Nach Bechhold und Reiner (Münch. med. Wochenschrift 1920, Nr. 31) läßt sich sogar die Senkungsgeschwindigkeit im normalen Blut durch Zusatz pathologischer Urinbestandteile erheblich vergrößern. Ob allerdings die Steigerung des stalagmetrischen Quotienten im Urin, für die Bechhold und Reiner (diese Zeitschr. 108, 98, 1920) hauptsächlich Eiweißabbauprodukte („Stalagmone“) verantwortlich machen, die von uns beobachtete Steigerung der Tropfenzahl im Plasma entspricht, möchte ich dahingestellt sein lassen.

Bemerkenswert dürfte jedenfalls sein, daß die von uns im Plasma beobachteten Unterschiede im Serum kaum mehr vorhanden waren. Nach früheren Untersuchungen von Kisch und Remertz (Internat. Zeitschr. f. physik.-chem. Biologie 1, 354, 1914; Münch. med. Wochenschr. 20, 1914) hat das Foetalserum sogar eine bedeutend niedrigere Oberflächenspannung als das mütterliche. Zwar haben auch wir im Nabelschnurserum im Gegensatz zum Verhalten des Plasmas öfter eine höhere Tropfenzahl als im mütterlichen gefunden, glaubten aber diesen Unterschied, da die von uns benutzten Nabelschnursera immer mehr oder weniger hämoglobinhaltig waren, auf den Hämoglobingehalt beziehen zu sollen. (Über frühere physikalisch-chemische Untersuchungen von Bluteseris vergleiche Traube, Internat. Zeitschr. f. physik.-chem. Biologie 1, 389, 1914).

leichter Stoffe (vielleicht auch Lipoide oder Lipoid-Eiweißverbindungen, vgl. Brinkmann und van Dan, Kürten) aufnehmen als aus stabilem. Die Senkungsbeschleunigung würde in diesem Sinne als ein Ausflockungsvorgang erscheinen, dessen Stärke eine Funktion der Plasmalabilität ist.

Es stimmen damit ältere Erfahrungen überein, nach denen im Nabelschnurplasma normale Antikörperwirkungen (Amboceptoren, Agglutinine) häufig fehlen. Sie dürften eben, wie schon von Sachs und mir ausgeführt worden ist, zu einem wesentlichen Teil nur als der Ausdruck geeigneter Labilität der Plasma- bzw. Serumeiweißkörper erscheinen¹⁾. Es entspricht auch durchaus dieser Betrachtung, daß man bei Verwendung von Bakterien, die ja als „Adsorptionsmittel“ weit geeigneter sind als rote Blutkörperchen, im Gravidenserum häufig starke Agglutinationswirkungen nachweisen kann, wie das Löwenthal und Bertkau²⁾ und neuerdings Vorschütz³⁾ gezeigt haben. Auch von Sachs und mir ist an anderer Stelle über derartige Versuche kurz berichtet worden, und es dürfte im gleichen Sinne sprechen, daß wir, besonders bei Verwendung des Fleckfieber-*Proteus-Bacillus X₁₉*, gelegentlich, aber nicht immer, nur im Gravidenplasma, nicht im Gravidenserum, Agglutinationswirkung feststellen konnten⁴⁾. Es soll versucht werden, diese Verhältnisse weiter aufzuklären.

Die Frage, wodurch nun die Verschiedenheiten der physikalischen Plasmastruktur bedingt sind, muß ich freilich offen lassen. Die neueren, mir erst nach Abschluß dieser Arbeit bekannt gewordenen Untersuchungen von Abderhalden⁵⁾, über die Abhängigkeit der Senkungsgeschwindigkeit von dialysablen Stoffen, und diejenigen von Kürten⁶⁾, nach denen Lecithinzusatz, wie

¹⁾ Vgl. hierzu H. Dold, *Med. Klin.* 1921, Nr. 2, nach dessen Ausführungen es sich bei der Normalagglutination „um eine Ausfällung gewisser labiler Quoten der Serumglobuline handelt“.

²⁾ W. Löwenthal und Bertkau, *Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.* 83 (I), 315. 1919. — W. Löwenthal, *Zeitschr. f. Immunitätsforsch.* 30, 439. 1920.

³⁾ J. Vorschütz, *Arch. f. d. ges. Physiol.* 186, 290. 1921.

⁴⁾ Vgl. hierzu die Angaben von v. Gonzenbach und Uemura (*Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.* 78 [I], 504. 1916) über stärkere bactericide Wirkungen des Plasmas gegenüber dem stabileren Serum.

⁵⁾ E. Abderhalden, *Fermentforschung* 4, 230. 1921.

⁶⁾ H. Kürten, *Arch. f. d. ges. Physiol.* 185, 248. 1920.

schon Linzenmeier gezeigt hat, die Senkung hemmt, während Cholesterin zu einer Senkungsbeschleunigung führt, würden mit der hier entwickelten Vorstellung vereinbar sein. Durch eine Vielheit von Ursachen kann ja die Kolloidstabilität der Blutflüssigkeit Veränderungen erfahren. Ich darf es aber unterlassen, auf die hier bestehenden Möglichkeiten näher einzugehen, da ihre Ergründung nicht in den Bereich meiner Untersuchungen fällt. Als wesentliches Ergebnis der letzteren möchte ich aber den Parallelismus zwischen Senkungsgeschwindigkeit und der Stabilität der Blutflüssigkeit betrachten.

Zusammenfassung.

1. Die Erfahrungen über die Beschleunigung der Blutkörperchensenkung, insbesondere bei Gravidität, wurden bestätigt.

2. In Übereinstimmung mit den bisher vorliegenden Angaben der Literatur ergaben die ausgeführten Versuche, daß die primäre Ursache für die beschleunigte Senkungsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen in der Blutflüssigkeit gelegen ist. Es sprechen dafür u. a. die Erfahrungen bei Austauschversuchen, die Abhängigkeit der Senkungsgeschwindigkeit von der Beschaffenheit des Mediums, sowie die Hemmung der Senkungsgeschwindigkeit durch erhöhten Salzgehalt und Temperaturniedrigung.

3. Im Gravidenblut nimmt die Senkungsgeschwindigkeit bei Herabsetzung der Blutkörperchenmenge innerhalb gewisser Grenzen ab.

4. Durch Aufnehmen des durch Fällung mit verdünntem Alkohol aus Gravidenplasma erhaltenen Niederschlages in Nabelschnurplasma gelingt es dem letzteren eine senkungsbeschleunigende Wirkung zu verleihen. Ebenso kann durch Aufnahme des Alkoholniederschlags in das durch Schütteln mit Bolus seiner Wirkung beraubte Gravidenplasma die senkungsbeschleunigende Funktion wiederhergestellt werden.

5. Die Unterschiede, die in bezug auf die Senkungsgeschwindigkeit zwischen Gravidenblut und Nabelschnurblut bestehen, lassen sich auch im defibrinierten Blut nachweisen, wenn auch hierbei die absoluten Senkungszeiten stark vermindert sind.

6. Es wird daher angenommen, daß die Unterschiede der Senkungsgeschwindigkeit nicht durch Vermehrung oder Ver-

minderung einer bestimmten Eiweißsubstanz bedingt sind, sondern daß die physikalische Struktur der Eiweißkörper der Blutflüssigkeit hierfür maßgebend ist.

7. In diesem Sinne sprechen Versuche, in denen sich ein Parallelismus zwischen Senkungsgeschwindigkeit und dem Grade der Plasmalabilität ergab. Insbesondere konnten Nabelschnurplasma und Gravidenplasma durch Prüfung der Koagulierbarkeit, sowie durch Fällung mit partieller Kochsalzsättigung oder verdünntem Alkohol scharf voneinander unterschieden werden. Die Prüfung des Blutplasmas mittels der benutzten Reaktionen führt nach den bisherigen Erfahrungen in kasuistischer Hinsicht zu den gleichen Ergebnissen wie die Prüfung der Senkungsgeschwindigkeit.

8. Es wird daher in der derart nachweisbaren Veränderung der Stabilität des Blutplasmas die primäre Ursache für die Verschiedenheit der Senkungsgeschwindigkeit der Blutkörperchen erblickt. Die Versuchsergebnisse, die im Verein mit den Angaben der Literatur zu dieser Betrachtungsweise führen, werden eingehend erörtert.

Bahnung im intermediären Zuckerstoffwechsel.

Von
H. Staub.

(Aus dem Laboratorium der medizinischen Universitätsklinik in Basel.)

(Eingegangen am 12. März 1921.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

Unter „**Bahnung**“ irgendeines physiologischen Vorganges verstehen wir seine Ermöglichung, Beschleunigung oder Erleichterung durch einen vorausgehenden Prozeß. Aus physiologischer Chemie und Physiologie können Beispiele für diesen weit gefaßten Begriff der „**Bahnung**“ angeführt werden. Das bekannteste Beispiel stellt die Physiologie des Nervensystems: Wir wissen, daß die höheren psychischen Funktionen wie Assoziationsvermögen, Gedächtnis, Verbindungen zwischen den rezeptiven und motorischen Zentren normalerweise um so prompt funktionieren, je besser die betreffenden Funktionen vorher eingeübt worden sind.

Verworn¹⁾ verwendet hierfür den Ausdruck „**Ausschleifen**“ der Nervenbahnen. Eine Art **Bahnung** liegt auch vor, wenn unter dem Einfluß des Trainings der Stoffverbrauch für die gleiche Arbeitsleistung sinkt, wie aus zahlreichen Stoffwechseluntersuchungen hervorgeht. Neuerdings bringt Skramlik²⁾ ein gutes Beispiel für die **Bahnung** der Reizleitung im Froschherzen. Wurde zuerst der Vorhof gereizt und rechtläufig die Kammer erregt, so trat nach ein- oder mehrmaliger rechtläufiger Erregung jetzt bei Reizung der Kammer auch rückläufig eine Erregung des Vorhofes ein. Durch den rechtläufigen Vorgang wurde der rückläufige gebahnt. Wodurch diese „**Bahnung**“ von Lebensvorgängen letzten Endes zustande kommt, ist noch unbekannt.

Bei Blutzuckeruntersuchungen am Menschen nach Bangscher Mikromethode unter verschiedenen physiologischen Be-

¹⁾ Allg. Physiologie, 6. Aufl. 1915, S. 620.

²⁾ Arch. f. d. ges. Physiol. 180. 1920.

dingungen, über welche ich an anderer Stelle ausführlich berichten werde, wurden Resultate erhalten, die als Beispiel für eine Bahnung intermediärer Stoffwechselforgänge anzusehen sind.

Schon vor einer Reihe von Jahren hat F. Hofmeister¹⁾ die Beobachtung gemacht, daß hungernde Hunde nach Kohlehydratdarreichung Zucker bereits bei Dosen ausscheiden, bei denen normale Hunde dies nicht tun. Eine solche vermehrte Zuckerausscheidung des hungernden Organismus ist vielfach an Tieren und auch an Menschen bestätigt worden. Sie erscheint paradox, weil man ja annehmen müßte, daß die Assimilationsfähigkeit des hungernden Organismus besonders groß sei, und daß es deshalb selbst bei größeren Dosen dargereichten Kohlehydrats nicht zur Zuckerausscheidung kommen müsse.

Diese Versuchsanordnung ist nicht eindeutig, da sie nur über die Zuckerausscheidung, nicht aber über die eigentliche Kohlehydratassimilation etwas auszusagen vermag. Durch meine Blutzuckeruntersuchungen am gesunden Menschen, die den Verlauf der Resorption und Assimilation kleiner Zuckermengen deutlich zeigen, ließ sich aber einwandfrei feststellen, daß die Kohlehydratassimilation während der „absoluten Inanition“, d. h. nach 15stündigem Hunger, tatsächlich vermindert ist.

Ich führe hier 2 Versuchsreihen an.

Zur Erklärung der Abbildungen sei Folgendes angeführt: In einer früheren Mitteilung²⁾ konnte gezeigt werden, daß auf 20 g perorale Traubenzuckerzufuhr Veränderungen im Blutzuckerspiegel sich einstellten, die sich in einer „Blutzuckerkurve“ festlegen ließen. Die Kurve ist in einem rechtwinkligen Koordinatensystem durch die Variablen Zeit als Abscisse und Blutzuckerprozentgehalt als Ordinate bestimmt. Die Höhe des Blutzuckeranstieges und die Dauer der Hyperglykämie wurden als die Faktoren erkannt, die für die Deutung des Ablaufs der intermediären Stoffwechselforgänge ausschlaggebend sind. Es zeigte sich weiter, daß die Höhe des Blutzuckeranstieges und die Dauer der Hyperglykämie einen Maßstab darstellen für das Assimilationsvermögen eines Individuums zur Zeit der Kurvenaufnahme. Hoher Anstieg der Blutzuckerkurve und lange Dauer der Hyperglykämie sind die Stigmata für eine verminderte Assi-

¹⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 26. 1890.

²⁾ Zeitschr. f. klin. Med. 91. 1921.

milationsfähigkeit und umgekehrt. Vorbedingungen sind, daß Kurven vom gleichen Individuum unter den gewählten verschiedenen physiologischen Bedingungen untereinander verglichen werden, und daß den Versuchen stets möglichst gleiche Vorbereitungsperioden vorangehen.

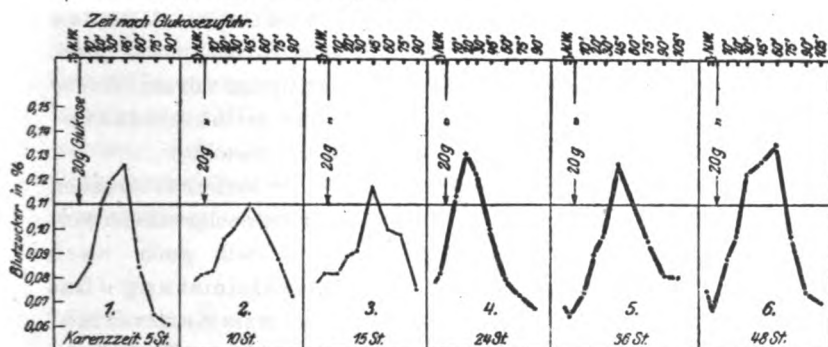


Abb. 1.

In den Reihen Abb. 1 und Abb. 2 ging dem Versuch jedesmal eine bestimmte reichliche Kohlehydratmahlzeit voraus. Nach dieser letzten Mahlzeit blieb die Versuchsperson 48 Stunden bei Bettruhe ohne Nahrungszufuhr. Während dieser Inanitions-

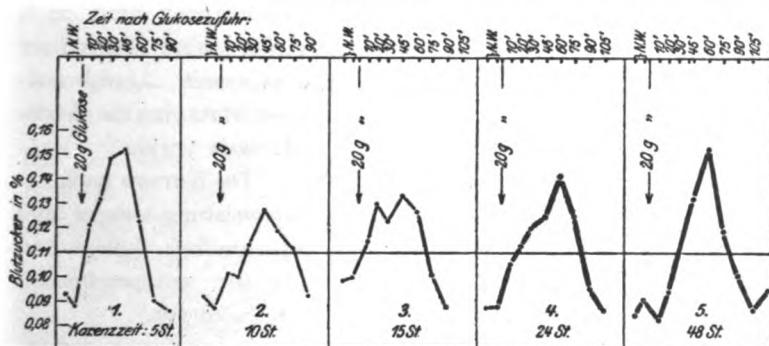


Abb. 2.

zeit wurden nach 5, 10, 15 usw. Stunden jeweiligen Blutzuckerkurven bestimmt. (N. W. auf der Abszisse bedeutet Nüchternwerte, d. h. Blutzuckerwerte vor Einnahme der Glucose. Auf der Abszisse stellt die Strecke 1 mm die Zeit von 5 Minuten dar.)

Aus den Abbildungen ist ersichtlich, daß in der 10. Karenzstunde die Blutzuckerkurven den geringsten Ausschlag zeigen,

die Kurven in späteren Karenzstunden dann aber, im Vergleich zu den Kurven nach 10stündiger Karenz, höher ansteigen und längere Dauer der Hyperglykämie aufweisen. Das heißt nach dem oben Gesagten, daß in der 10. Stunde nach Einnahme einer Kohlehydratmahlzeit ein Optimum der Kohlehydratassimilation und bei längerer Karenz nach 15 und mehr Stunden (während der „absoluten Inanition“)

eine in bezug auf jenes Optimum verminderte Assimilationsfähigkeit besteht.

In weiteren Versuchen konnte nachgewiesen werden, daß auch nach Arbeitsleistung das Assimilationsvermögen für Traubenzucker vermindert ist, wie aus den folgenden Kurven Abb. 3 und 4 hervorgeht.

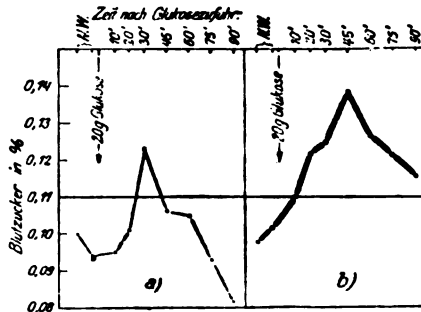


Abb. 3.

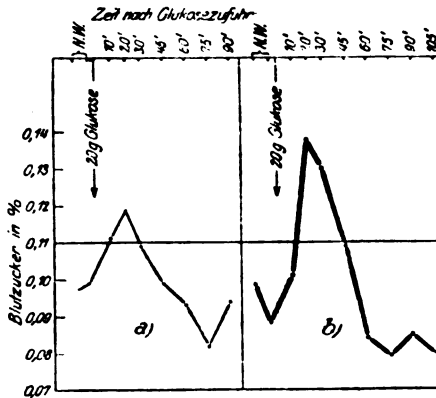


Abb. 4.

Abb. 3 und 4. a) Ruhekurven. b) Arbeitskurven¹⁾.

„Ruhe“- und „Arbeitskurven“ sind nach gleich langer 15stündiger Karenzzeit aufgenommen. Stets ging die gleiche Mahlzeit voraus.

Die Kurven nach Arbeitsleistung steigen hier einwandfrei höher an als die entsprechenden „Ruhekurven“.

Ferner zeigte sich auch, daß nach einer vorausgehenden, möglichst reinen Eiweiß-Fettdiät die Kohlehydratassimilationsfähigkeit erniedrigt ist. Die angeführten Kurven Abb. 5 und 6 demonstrieren diesen Befund. Die Vergleichskurven a in beiden Abb. 5 und 6 sind nach 2tägiger Kohlehydratkost, die Kurven b in beiden Abbildungen nach 2tägiger Eiweiß-Fettkost bestimmt. Zwischen letzter Nah-

¹⁾ Es wurde jeweils 2 Stunden an einem Tretergestaten gearbeitet; das Körpergewicht wird pro Minute rund 80mal 20 cm hoch gehoben.

rungsaufnahme und Bestimmung der Kurven liegen 15 Stunden Karenzzeit.

Das Gemeinsame aller dieser Befunde ist, daß nach Glykogenreduktion (vorausgehende längere Karenzzeit; Arbeit; Eiweiß-Fettdiät) die Assimilationsfähigkeit für die ersten nachher zugeführten Kohlehydrate vermindert ist. Bekanntlich führen alle diese Prozesse, die eine erhebliche Reduktion des Glykogenbestandes erzeugen, zu einer Acidosis. Nach den Tierexperimenten von Elias und seinen Mitarbeitern¹⁾ kann angenommen werden, daß die Säuerung des Organismus zu vermehrter Glykogenmobilisation in der Leber und damit zu einer höheren Hyperglykämie oder verminderten Kohlehydratassimilations-

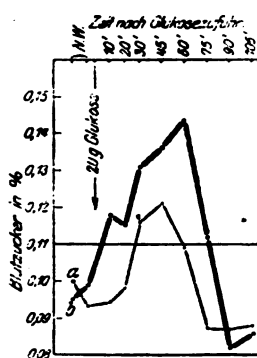


Abb. 5.

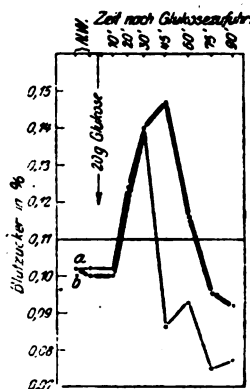


Abb. 6.

fähigkeit führt. Eine darauf sich gründende Erklärung unserer Befunde ist aber in 3 Punkten unklar: 1. Aus den Karenzversuchen Abb. 1 und 2 ersehen wir, daß die Ausgangswerte („N. W.-Werte“) der Blutzuckerkurven mit zunehmender Karenzzeit eher niedriger werden. Bestände aber bei Acidosis, welche ja im weiteren Verlauf der Inanition immer mehr zunimmt, eine vermehrte Glykogenmobilisation in der Leber, so müßten wohl die Ausgangswerte („N. W.-Werte“) der Blutzuckerkurven höher werden als vor Eintritt der Acidosis; die Kurven in der „absoluten Inanition“ müßten von einem höheren Niveau ausgehen als diejenigen in der „relativen Inanition“. Der Versuch zeigt aber das Gegenteil. 2. Ist nicht zu verstehen, warum die vermehrte Glyko-

¹⁾ Diese Zeitschr. 46 u. 52. 1913 und 90. 1918.

genmobilisation erst auf Zufuhr von Glucose manifest wird. 3. Erklärt der Eliassche Befund nicht den steilen Abfall der Kurven, der das Einsetzen guter Assimilation anzeigt.

Wir werden den Versuchsergebnissen gerechter durch die Annahme einer „Bahnung“ im Zuckerhaushalt. Der Organismus hat das Bestreben, einen konstanten Blutzuckergehalt aufrechtzuerhalten. Wird der Blutzuckergehalt durch Zuckerezufuhr erhöht, so wird der Körper bemüht sein, die alimentäre Hyperglykämie möglichst rasch zum Verschwinden zu bringen, um das Gleichgewicht zwischen Zuckergehalt im Blut und den Geweben wiederherzustellen. Vermag der Organismus ein allzu hohes Ansteigen der alimentären Hyperglykämie zu verhindern und das

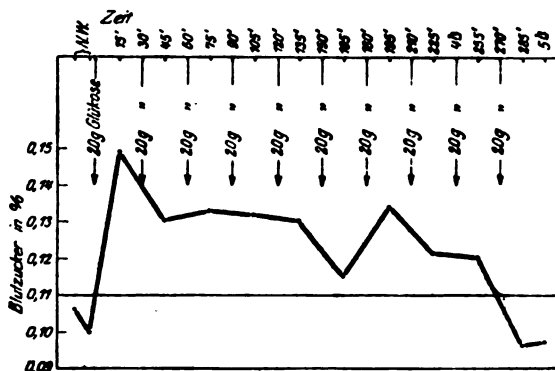


Abb. 7.

Gleichgewicht rasch wiederherzustellen, so beweist das, daß die den Zuckerhaushalt regulierenden Funktionen gebahnt sind, d. h. bereit sind, sofort gestellten Anforderungen gerecht zu werden. Nach unseren Versuchsergebnissen sind diese regulatorischen Funktionen gebahnt, wenn der Glucoseeinnahme bereits Kohlehydratassimilation voranging. Beispiele dafür sind die Kurven nach 10 und 15 Stunden Karenzzeit in Abb. 1 und 2. Die reichliche Kohlehydratmahlzeit, die den Versuchen vorausging, ist der „bahnende Prozeß“ und die geringeren Anstiege der Blutzuckerkurven zeigen, daß der Vorgang der Zuckerassimilation im Moment der Kurvenaufnahme „gebahnt“ ist. (Daß die ersten Kurven in den beiden Versuchsergebnissen Abb. 1 und 2 hoch ansteigen, ist durch das mangelnde Bedürfnis des Organismus nach Zucker auf dem Höhepunkt der Zuckerresorption aus der vorangehenden reichlichen Kohlehydrat-

mahlzeit zu erklären.) Ein weiteres Beispiel bildet die bereits publizierte Kurve Abb. 7. Wiederholte Zufuhren von 20 g Glucose in Abständen von 30 Minuten erhöhen hier schließlich den Blutzuckerspiegel nicht mehr; die ersten Glucoseportionen bahnen das Assimilationsvermögen für die folgenden.

Sind die Funktionen, welche den Zuckerhaushalt regulieren, nicht gebahnt, d. h. treten sie nicht sofort in Tätigkeit, wenn eine alimentäre Hyperglykämie auftritt, so steigt der Blutzucker nach Glucosezufuhr höher an und es dauert längere Zeit, bis der normale Blutzuckergehalt wieder erreicht ist. Die Hyperglykämie hält jetzt so lange an, bis der Regulationsmechanismus in Tätigkeit gesetzt ist. Nach unseren Versuchen sind diese den Zuckerstoffwechsel regulierenden Funktionen nicht gebahnt, wenn glykogenreduzierende Prozesse vorausgingen, die Funktion der Zuckerassimilation also nicht geübt worden war. Wir finden deshalb bei Zufuhr von 20 g Glucose nach längerer Karenz, Arbeitsleistung und Eiweiß-Fettdiät das verminderte Assimilationsvermögen, wie die Kurven demonstrieren.

Eine „Bahnung“ im Sinne der einleitend angeführten Definition liegt demnach unzweifelhaft vor. Es kommt, um einen militärischen Ausdruck zu gebrauchen, auf die „Bereitschaftsstellung“ des komplizierten Zuckerregulationsmechanismus an. Diese „Bereitschaftsstellung“ für Kohlehydratassimilation wird durch Kohlehydratzufuhr erstellt, nach Glykogenverlust findet sie sich nicht vor.

Wie können wir uns diesen „Bahnungsvorgang“ im intermediären Zuckerstoffwechsel erklären?

Es sind vorwiegend 2 Prozesse, welche die alimentäre Hyperglykämie zum Verschwinden bringen und die Konstanz des Blutzuckergehaltes aufrechtzuerhalten bestrebt sind: Der eine ist die Deponierung des überschüssigen Zuckers als Glykogen, der andere der Abbau des Zuckers. Unter normalen Verhältnissen (normaler Ernährungszustand, normale Ernährungsverhältnisse, nicht erschöpfende Arbeit) gehen beide Prozesse nebeneinander her und zeigen sich auch sehr großen Ansprüchen in bezug auf Kohlehydratassimilation gewachsen. Ist einer der beiden oder sind beide Prozesse gehemmt, so entsteht verminderte Assimilationsfähigkeit.

Eine verminderte Assimilationsfähigkeit sehen wir in unseren Versuchen immer dann, wenn Kohlehydratmangel besteht, und umgekehrt gutes Assimilationsvermögen, wenn Kohlehydrat vorher zugeführt wurde oder der Glykogenbestand nicht reduziert ist. Es sind demnach die Kohlehydrate selbst, welche die beiden Prozesse der Glykogenanlagerung und des Zuckerabbaues fördern. Da beide Prozesse wohl fermentativer Natur sind, liegt es nahe, anzunehmen, daß die Kohlehydrate die Bildung der Fermente, oder die Aktivierung von Zymogenen, die zu ihrer Assimilation nötig sind, auslösen. Daß vom Substrat selbst ein Reiz auf die Fermentbildung ausgeht, haben die zahlreichen Arbeiten von Weinland¹⁾, Abderhalden und Mitarbeitern²⁾, Röhmann und Kumagai³⁾, Dienert⁴⁾, Euler und Mitarbeitern⁵⁾ und in jüngster Zeit wieder die Untersuchungen von E. Köhler⁶⁾ über die Fermentbildung bei der Hefegärung gezeigt. Besteht diese Annahme einer Reizwirkung der zugeführten Kohlehydrate auf die fermentative Tätigkeit im Zuckerhaushalt zu Recht, so liegt nach unseren Versuchen während der „absoluten Inanition“, also nach 15 bis 48 Stunden Karenz, nach kohlehydratfreier Ernährung und nach erschöpfender Arbeit eine relative Insuffizienz der Fermentfunktion vor (hohe und längerdauernde alimentäre Hyperglykämie). Diese relative Insuffizienz wird manifest bei kleiner Glucosezufuhr; sie dauert aber nur kurze Zeit, dann tritt schon die bahnende Reizwirkung der zugeführten Glucose auf, der zugeführte Zucker wird assimiliert und der normale Blutzuckerspiegel, etwas später als bei optimaler Fermenttätigkeit, wieder erreicht.

Die optimale Fermentwirkung liegt, wie unsere Karenzversuche zeigen, in der 10. bis 15. Stunde nach Einnahme einer

¹⁾ Weinland, Zeitschr. f. Biol. 47, 279. 1906.

²⁾ Abderhalden und Brahm, Kapfberger, Rathsmann, Wildermuth, Zeitschr. f. physiol. Chemie 64, 429, 1909; 69, 23, 1910; 71, 367, 1911; 90, 338, 1914.

³⁾ IXième Congrès internat. de Physiol. Groningue 1913. Diese Zeitschr. 57, 375. 1913 und 100, 15. 1919.

⁴⁾ Compt. rend. 128, 539 u. 617 und 129, 63. 1899.

⁵⁾ Euler und Johansson, Meyer, Johansson, Cramér, Dernby, Zeitschr. f. phys. Chemie 76, 246. 1912; 79, 247. 1912; 84, 97. 1913; 88, 430. 1913; 89, 272 u. 408. 1914.

⁶⁾ Diese Zeitschr. 112, 236. 1920.

Kohlehydratmahlzeit. Die Kohlehydrate aus der vorangehenden Mahlzeit wirken in diesen Zeitpunkten noch als Aktivatoren des fermentativen Glykogenanbaues und Zuckerabbaues nach. Bei mehrmaliger Zufuhr kleiner Zuckermengen sind es die ersten Zuckerportionen, welche die Fermenttätigkeit verbessern.

Die „Bahnung“ der Kohlehydratassimilation ist also nach diesen Ausführungen durch den aktivierenden Einfluß zugeführter Kohlehydrate oder vorhandener Glykogendepots auf die fermentativen Vorgänge im Zuckerhaushalt zu erklären. Durch die Kohlehydratassimilation selbst wird im komplizierten intermediären Zuckerstoffwechselmechanismus diejenige „Bereitschaftsstellung“ geschaffen, welche ein gutes Assimilationsvermögen gewährleistet. Damit hätten wir auch eine befriedigende Erklärung für die paradox erscheinende verminderte Kohlehydratassimilationsfähigkeit des hungernden Organismus gefunden, sie ist bedingt durch den Mangel an wirksamen Zuckerassimilationsfermenten während der absoluten Inanition.

Die Annahme einer Beeinflussung der spezifischen fermentativen Tätigkeit durch perorale Zufuhr von Kohlehydraten, wie sie aus meinen Befunden gerechtfertigt erscheint, eröffnet neue Ausblicke in die Fermentbildung im menschlichen Organismus. Bis jetzt ist Fermentbildung nur dann nachgewiesen worden, wenn körperfremde Stoffe ins Blut gelangten, sei es durch parenterale oder durch sehr reichliche, nicht mehr physiologische, perorale Zufuhr. Das waren die sogenannten „Antifermente“ oder „Abwehrfermente“. Anscheinend lösen aber auch die gewöhnlichen alltäglichen Nährstoffe, in physiologischen Mengen und auf physiologischem Wege zugeführt, spezifische Fermentbildung aus und fördern so selbst ihre Assimilation.

Den Namen „Abwehrfermente“ für diese Katalysatoren der Kohlehydratassimilation zu gebrauchen, geht wohl nicht an, sie wehren den Zucker nicht ab. Wenn man diese Fermente mit einem besonderen Namen bezeichnen will, so kann man sie vielleicht nach einem Vorschlag von Prof. Spiro „Gleichgewichtsfermente“ nennen. Sie dienen dazu, das Gleichgewicht, das durch plötzliche zu hohe Konzentration eines zugeführten Stoffes im Blut gestört ist, wiederherzustellen. Das gleiche kann im

Grunde auch von der Invertase und den proteolytischen Fermenten gesagt werden¹⁾).

Der Nachweis der Bahnung im Zuckerhaushalt hat auch praktische Bedeutung. Bei einem Diabetiker, der längere Zeit kohlehydratfrei ernährt wurde, wird die Funktion der Kohlehydratassimilation nicht gebahnt sein. Er wird deshalb auf die erste Kohlehydratzufuhr nach dieser Kohlehydratkarenzzeit ein erheblich vermindertes Assimilationsvermögen zeigen und schon auf auffallend geringe Kohlehydratzufuhren mit Glykosurie reagieren. Diese Toleranzverminderung kann dann nicht ausschließlich auf die diabetische Stoffwechselstörungen bezogen werden. Es addiert sich in diesem Falle die Stoffwechselstörung zur mangelnden Bereitschaftsstellung für Zuckerassimilation infolge der vorausgehenden Kohlehydratkarenz, beide Faktoren machen den Organismus unfähig, zugeführte Kohlehydrate zu bewältigen und täuschen einen schwereren Diabetes vor, als in der Tat vorliegt. Es wird hier dann alles darauf ankommen, anfänglich möglichst kleine Dosen Kohlehydrate zuzuführen und die täglichen Mengen noch in *refracta dosi* zu geben.

Die vorliegenden Versuchsergebnisse weisen außerdem darauf hin, wie wichtig es ist, bei einem frischen Diabetesfall zuerst, wie z. B. von Noorden vorschreibt, die Toleranzgrenze zu bestimmen und von dieser Toleranzgrenze, nicht von kohlehydratfreier Kost aus, die diätetische Behandlung zu beginnen. Wenn noch eine, wenn auch nur geringe Kohlehydrattoleranz besteht, so bleibt so die „Bereitschaftsstellung“ für Kohlehydratassimilation erhalten; wird die Kur aber ohne zwingenden Grund mit kohlehydratfreier Kost eingeleitet, so geht diese Bereitschaftsstellung verloren und die durch die Stoffwechselstörung verminderte Toleranz wird durch die physiologisch mangelnde „Bereitschaftsstellung“ noch weiter vermehrt.

Herrn Prof. Spiro danke ich für die Anregungen bei der Abfassung dieser Arbeit.

¹⁾ Vergleiche meinen Vortrag „Über Fermentbildung“ auf der Winterversammlung der „Schweizerischen chemischen Gesellschaft“ 26. II. 1921 in Burgdorf. *Helvetica chimica acta* Bd. IV, Heft 3, pag. 281. 1921.

Über den Einfluß des Wassergehaltes auf die Adsorptionsleistung einer aktiven Kohle.

Von

Heinrich Herbst (Jena).

(Eingegangen am 15. März 1921.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

I.

In folgenden Zeilen will ich versuchen, den Einfluß des Wassergehaltes auf die Adsorptionsleistung von aktiven Kohlen klar zu stellen. Diese Frage hat eine große Bedeutung, denn in der Technik werden aktive Kohlen vielfach zur Beseitigung und Unschädlichmachung giftiger Gase angewandt, man denke nur an die Gasmasken und Gasschutzgeräte während des Krieges und an unsere heutigen „Industriemasken“. Gerade bei der Anwendung der „aktiven“ Holzkohlen zu Gasschutzzwecken spielt aber der Einfluß des Wassergehaltes eine große Rolle, denn einmal nehmen die aktiven Kohlen, weil sie zum Teil stark hygroskopisch sind, Wasser aus der feuchten Außenluft auf und andererseits auch aus der feuchten Atemluft des Maskenträgers oder gar aus anderen feuchten, imprägnierten Massen des Schutzgerätes.

Feuchten wir eine Holzkohle in verschiedenem Grade mit Wasser, z. B. 10, 20, 30, 40, 50, 60%, so ist bis zu einem Wassergehalt von 50% der Kohle äußerlich eigentlich nicht anzusehen, daß sie so viel Wasser enthält, die Kohle erscheint dem Augenschein nach trocken; dabei kann man sagen, daß die feuchte Kohle etwas dunkler erscheint als die trockene. Nur unter dem Mikroskop kann man bei etwa 30facher Vergrößerung bei der 50% H_2O enthaltenden Kohle sehen, daß sie feucht ist.

Das Wasser wird in dem feinen Capillarsystem der Holzkohle sehr fest gehalten und sie zeigt deshalb unterhalb 50% Wassergehalt keine Spur von Abtropferscheinung und erst bei

über 50–60% tritt ein Abtropfen ein; ganz im Gegensatz zu anderen Trägermaterialien wie Diatomit, Bimstein, Koks usw.; so zeigt z. B. je nach Sorte Diatomit schon ein Abtropfen bei etwa 30–45% Wassergehalt. Das Wasser sackt beim Diatomit bei über 30–40% beim Lagern einfach nach unten ab. Diese Erscheinung spielt eine große Rolle beim Lagern von Ateineinsätzen, denn die Ateineinsätze werden durch das Abtropfen teils unbrauchbar oder in der Leistung stark beeinflußt.

An der Oberfläche der Holzkohle können nun zwei verschiedene Vorgänge stattfinden, einmal eine reine Adsorption und zweitens kann neben der reinen Adsorption infolge der katalytischen Wirkung des „aktiven“ Kohlenstoffes noch eine gewöhnliche chemische Reaktion stattfinden, besonders wenn die Kohle Wasser oder neben Wasser noch Salze und dergleichen enthält, auf welcher letzteren Punkt ich in einer besonderen Abhandlung zu sprechen komme. Der Wassergehalt einer Adsorptionskohle kann sich nun hauptsächlich in 2 Richtungen äußern: Nämlich erstens kann die adsorbierte Menge und zweitens kann die Adsorptionsgeschwindigkeit beeinflußt werden. Der Einfluß des Wassers ließ sich am zweckmäßigsten bei einem halb quantitativen, halb praktischen Prüfverfahren, das gleichzeitig beide Eigenschaften berücksichtigt, verfolgen und zwar wurde jeweils eine bestimmte Menge Kohle etwa 260 ccm von bestimmter Körnung oder Siebung (1,25–2,5 mm) in zwei Schichten in einem Ateineinsatz in einer bestimmten Schichthöhe (etwa 40 mm) und bestimmtem Querschnitt (etwa 61 qcm) verpackt und gegen ein bestimmtes Giftgas geprüft. Die Prüfung geschah in der Weise, daß ein Giftgasstrom von bestimmter Giftgaskonzentration $\left(\frac{\text{mg}}{\text{cbm}}\right)$ mit einer bestimmten Stromstärke $\left(\frac{\text{Liter}}{\text{Minute}}\right)$ durch den Ateineinsatz geleitet wurde. Die Konzentration wurde durch Mischen des Giftgases mit einem Luft- oder Stickstoffstrom hergestellt. Es wurde dabei die Zeit (in Minuten) beobachtet, innerhalb welcher der Ateineinsatz das Giftgas vollkommen zurückhält, diese Zeit bezeichnet man als Resistenz, auf diese Weise gewinnt man gleichzeitig ein Urteil über die praktische Verwendbarkeit der Kohlensorte. Zur Prüfung der reinen Adsorptionsleistung eignet sich sehr gut Chlorpikrin, welches von der aktiven Kohle

in hohem Maße adsorbiert wird. Es wurde so das Verhalten einer großen Anzahl von Kohlensorten bei zunehmendem Wassergehalt gegen verschiedene Gase oder Dämpfe untersucht. — Hier will ich jedoch nur an einigen Beispielen die Haupteigenschaften der Adsorptionskohlen bei Feuchten mit Wasser darlegen.

Es wurde unter anderen geprüft gegen

Prüfgas	Molekulargewicht	Prüfkonzentration	Prüf-Stromstärke	1 Minute Resistenz
		mg cbm	Liter Minute	entspricht einer adsorbierten Menge von mg
Chlorpikrin CCl_3NO_2	164,4	7750	20	155
Chlor Cl_2	71	14800	20	296
Phosgen COCl_2	99	6200	30	186
Blausäure HCN	27	1000	20	20

Bemerken möchte ich an dieser Stelle, daß für Gasschutz zwecke nur gekörnte Kohlen von etwa 1—4 mm in Frage kommen.

Die bekannten Entfärbungspulver, die zum Teil Ruß darstellen, sind nicht brauchbar wegen zu großem Atemwiderstand und wegen der Staubwirkung.

In den beifolgenden Tabellen I—IV und Abb. 1 sind die Prüfergebnisse einer guten W.-Holzkohle, einer mittelguten G.-Holzkohle und einer schlechten für Gasschutz zwecke bereits unbrauchbaren C.-Braunkohle, sowie einer ganz schlechten überhaupt unbrauchbaren gewöhnlichen Meiler- oder Retortenkohle zusammengestellt.

Die W- und G-Holzkohle sind nach dem Chlorzinkverfahren des Österreichischen Vereins für chemische und metallurgische

Tabelle I.
W.-Kohle gekörnt, Siebung 1,25—2,5 mm.
Litergewicht: 294 g.

Wassergehalt . . . %	0	5	10	15	20	25	30	35	40	50	60
Chlorpikrinleistung Min.	243	194	231	—	208	163	152	85	37	3	2
Atemwiderstand . mm	5,5	5,9	5,5	—	5,5	6,6	6,6	6,5	6,1	4,7	2,5
Chlorleistung . .Min.	17	18	19	23	26	27	33	—	37	25	0
Atemwiderstand . mm	5,5	5,8	5,4	5,3	5,6	5,5	5,9	6,0	5,9	5,1	2,3
Phosgenleistung .Min.	14	14	16	21	23	33	33	32	34	0	0
Atemwiderstand . mm	5,7	5,5	5,5	5,5	5,4	5,1	5,5	6,3	6,0	5,0	3,0
Blausäureleistung .Min.	14	9	8	7	7	7	8	8	6	2	1
Atemleistung . . mm	5,4	5,9	5,5	5,3	5,0	5,2	5,9	6,0	5,8	5,2	2,6

Produktion (D.R.P. 290656) hergestellt, welches Verfahren bisher allein den hohen Anforderungen genügt, die an eine für Gasschutz Zwecke geeignete „aktive“ Kohle gestellt wurden. Die beste nach diesem Verfahren hergestellte Kohle liefert zur Zeit die Firma Fr. Bayer & Co., Leverkusen.

Tabelle II.

G.-Kohle, gekörnt, Siebung 1,25—2,5 mm
Litergewicht: 220,9 g.

Wassergehalt . . . %	0	5	10	15	20	25	30	35	40	50	65
Chlorpikrinleistung Min.	169	168	155	167	140	169	125	89	56	5	0
Atemwiderstand . mm	6,0	5,1	5,2	5,5	5,7	5,0	5,3	5,5	5,5	4,1	2,1
Chlorleistung . . Min.	11	11	15	19	21	25	24	27	27	21	0
Atemwiderstand . mm	5,8	5,5	5,3	5,5	5,3	5,1	5,2	5,0	5,0	4,3	2,3
Phosgenleistung . Min.	9	11	14	14	20	15	20	20	15	0	0
Atemwiderstand . mm	6,3	5,3	5,7	5,7	6,1	4,9	5,5	5,8	5,3	4,3	2,0
Blausäureleistung . Min.	10	7	6	8	8	5	6	5	4	2	1
Atemwiderstand . mm	6,0	6,0	5,4	5,6	5,7	5,7	5,5	5,7	5,1	4,2	2,1

Tabelle III.

C.-Kohle, gekörnt, Siebung 1,25—2,5 mm

Wassergehalt %	0	5	10	20	30	40	50
Chlorpikrinleistung . Minuten	96	104	104	92	56	—	0
Atemwiderstand mm	6,1	6,1	6,1	6,3	6,3	—	2,1

Tabelle IV.

gewöhnliche Meiler- oder Retortenholzkohle, gekörnt,
Siebung 1,25—2,5 mm.

Wassergehalt %	0	5	10	20	30	40	50
Chlorpikrinleistung . Minuten	0	0	0	0	0	0	0
Phosgenleistung "	0	0	0	0	0	0	0
Chlorleistung "	0	0	0	0	0	0	0
Blausäure "	0	0	0	0	0	0	0

Aus den Tabellen I—IV und der Abb. 1 ersieht man deutlich, daß der Wassergehalt von ausschlaggebender Bedeutung ist; außerdem tritt hervor, daß die verschiedenen Gase oder Dämpfe eine verschiedene Affinität für Kohle zeigen, und zwar ist die Adsorptionsleistung für Chlorpikrin von den oben angeführten Adsorptiven am größten. Für Blausäure dagegen ist die Leistung äußerst gering, das liegt einmal an dem niedrigen Molekulargewicht, an dem chemischen Aufbau bezüglich der geringen Affini-

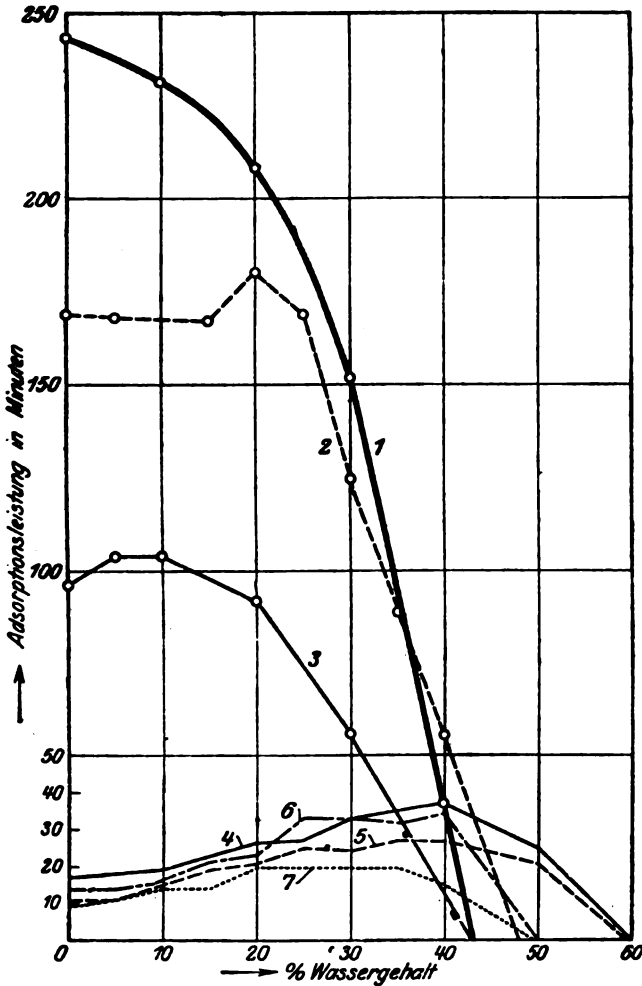


Abb. 1.

Nr.	Kohlensorte	W.	Prüfgas	Chlorpikrin.	Symbol
1.	"	G.	"	"	○——○
2.	"	G.	"	"	○- - -○
3.	"	C.	"	"	○——○
4.	"	W.	"	Chlor.	○——○
5.	"	G.	"	"	- - - - -
6.	"	W.	"	Phosgen.	○——○
7.	"	G.	"	"

tät der Bismutsäure zum Kohlenstoff. Wir ersehen also aus obigen Beispielen, daß es Stoffe gibt, die von einer guten Adsorptionskohle sehr stark adsorbiert werden, und Stoffe, die infolge

ihrer chemischen Natur von derselben guten Adsorptionskohle sehr schlecht adsorbiert werden.

Für die Stoffe, die sehr schlecht adsorbiert werden, die also nur eine geringe Affinität zum Kohlenstoff haben wie z. B. Blausäure oder Kohlenoxyd, kann natürlich durch die Anwendung von reiner Adsorptionskohle kein besonders großer Schutz erzielt werden, wir müssen deshalb in solchen Fällen besondere Maßnahmen treffen, auf die ich an anderer Stelle noch zu sprechen komme.

Aus der Abbildung erschen wir außerdem deutlich den grundlegenden Unterschied zwischen der reinen Adsorption, z. B. bei Chlorpikrin und Blausäure und der neben der reinen Adsorption stattfindenden Adsorptionsreaktion z. B. bei Chlor und Phosgen. Der Verlauf der reinen Adsorption ist am deutlichsten an der Chlorpikrinkurve bei der W.-Kohle zu sehen. Die aktiven Kohlen zeigen im allgemeinen die höchste „reine Adsorptionsleistung“ im trockenen Zustand, während bei Wasserzusatz die Leistung abnimmt, und zwar tritt bei zunehmendem Wassergehalt bis 20 bzw. 25% Wasser zunächst eine langsame Abnahme und bei einer weiteren Steigerung des Wassergehaltes eine sehr schnelle, fast geradlinige, dem Wassergehalt proportionale Abnahme ein; so beträgt die Adsorptionsleistung bereits bei 30% Wasser nur noch 60%, bei 40% Wasser nur noch 15% und bei einem Wassergehalt von 50% und darüber ist praktisch keine Adsorptionsleistung mehr vorhanden. In der beifolgenden Tabelle V und Abb. 2 ist für eine gute Adsorptionskohle für Chlorpikrin die prozentuale reine Adsorptionsleistung mit zunehmendem Wassergehalt angegeben, wenn man die maximale Leistung der trockenen Kohle gleich 100% setzt und zwar gilt die Tabelle für obige Prüfbedingungen. Außerdem ist aber in der Tabelle noch die reine Adsorptionsleistung angegeben in der Annahme, daß die Leistung von Anfang an direkt proportional dem Wasserzusatz abnimmt und daß bei 45% Wasser keine Leistung mehr vorhanden ist. Dieser geradlinige Abfall (in der Abb. 2 gestrichelt gezeichnet), stellt einen Grenzwert dar, der annähernd bei Prüfung mit sehr hoher Konzentration (z. B. Chlorpikrin, Konzentration $38\,700 \frac{\text{mg}}{\text{cbm}}$ bei Stromstärke 20 l pro Minute) erreicht wird.

Tabelle V.

Wassergehalt %	Reine Adsorptionsleistung %	Grenzwert der reinen Adsorptionsleistung %
0	100	100
10	95	77
20	85	55
25	75	44
30	60	33
35	40	22
40	15	11
45	0	0
50	0	0

In der Technik wird man sicherheitshalber mit einem direkten geradlinigen Abfall der reinen Adsorptionsleistung mit steigendem Wassergehalt rechnen, besonders wenn die aktiven Kohlen zu Gasschutzzwecken gebraucht werden, und wenn die Giftgase sich in abgeschlossenen Räumen entwickeln, wobei oft erhebliche Giftgaskonzentrationen auftreten können. Die Konzentrationen, die im freien Gelände vorkommen, sind ja geringer.

Aus der obigen Tabelle V. ersehen wir also deutlich, daß für die Prüfung der „reinen Adsorptionsleistung“ vor allen Dingen die trockene Kohle maßgebend ist.

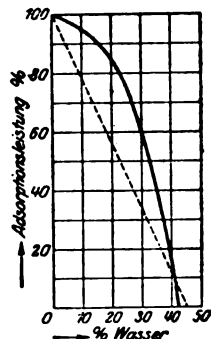


Abb. 2.

Bei der Betrachtung von Adsorptionskurven für Chlorpikrin fällt sofort auf, daß ein weitgehender Unterschied zwischen den aktiven Kohlenarten bis etwa 20% Wassergehalt besteht, von hier ab nähern sich die Kurven einander schnell und laufen eventuell bis zum Nullwert zusammen. Das heißt, solange sich nicht ausgeprägte Wasserhäutchen um das Kohlenkorn bilden, die sich bei etwa 20% Wasser zu bilden beginnen, ist jeweils die Struktur des Kohlenkorns für die Leistung, besonders für die Adsorptionsgeschwindigkeit, maßgebend.

Die sich bei über 20–25% bildenden äußerst feinen Wasserhäutchen verwischen die Strukturunterschiede und rufen den schnellen Leistungsabfall bedingt durch die Abnahme der Adsorptionsgeschwindigkeit hervor.

An dieser Stelle möchte ich noch folgende Fragen erörtern. Ist bei obigen Prüfbedingungen z. B. für Chlorpikrin die Kohle völlig verbraucht, wenn der Ateinsatz „durch“ ist, d. h. wenn der Einsatz das Giftgas von der betreffenden Konzentration und Stromstärke durchläßt?

Bei den obigen Prüfverfahren adsorbiert ein Ateinsatz, der das Giftgas eine Minute zurückhält, etwa 154 mg Chlorpikrin. Hält also im Mittel ein mit trockener Kohle gepackter Ateinsatz 250 Minuten, so hat er $154 \cdot 250 = 38\,800$ mg Chlorpikrin adsorbiert. Ein solcher Ateinsatz enthält etwa 65 g Kohle. Nach meinen Versuchen¹⁾ adsorbiert nun 1 g einer derartigen guten trockenen Kohle etwa 1260 mg Chlorpikrin bei völliger Absättigung. Also müßte ein Ateinsatz etwa $1260 \cdot 65 = 82\,000$ mg Chlorpikrin adsorbieren. Wir sehen also hieraus, daß unter obigen Prüfbedingungen die Kohle im Ateinsatz nur ungefähr zur Hälfte ausgenutzt wird.

Haben nun unsere technisch hergestellten Kohlen schon ihre Maximalleistung erreicht oder können wir die Adsorptionsleistung noch steigern und wie hoch?

Hierzu ist zu bemerken, daß unsere bisher besten technisch brauchbaren Adsorptionskohlen bei weitem noch nicht die Maximalleistung erreicht haben, sie zeigen etwa eine Aktivität von 50–55%, es ist also noch eine Leistungssteigerung von 45–50% möglich. Im Laboratorium konnte ich aktive Kohlen mit etwa 95% Aktivität herstellen, im technischen Maßstab dagegen kann man eine Aktivität von 80% erreichen, das bedeutet eine Steigerung um 30%. Das bedeutet auf unser obiges Chlorpikrinverfahren übertragen, daß die Adsorptionsleistung eines Ateinsatzes, die bisher etwa 250 bis höchstens 300 Minuten betrug, theoretisch auf 500–600 Minuten gebracht werden könnte, wenn wir Adsorptionskohlen mit einer Aktivität von 100% herstellen könnten. Bei einer für die Technik zunächst erreichbaren Steigerung der Aktivität um 30% würde das eine Resistenz von etwa 400–450 Minuten bedeuten.

Wenn nun, wie ich an anderer Stelle²⁾ angeregt habe, die Adsorptionskonstanten des Kohlenstoffes für die verschiedensten Adsorptive einmal systematisch für die verschiedensten organi-

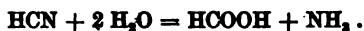
¹⁾ H. Herbst, diese Zeitschr. 115, 204. 1921.

²⁾ H. Herbst, l. c.

schen oder anorganischen Stoffgruppen festgelegt sind, so sind wir jederzeit in der Lage im voraus zu berechnen, wie lange ein Ateemeinsatz den betreffenden Stoff bei bestimmter Konzentration zurückhält, wenn wir nur die Eigenschaften der betreffenden Kohlensorte, vor allem die Aktivität und Ultraporosität kennen. Die Adsorptionskonstante gibt an, wieviel 1 g 100% aktiver Kohlenstoff von dem betreffenden Adsorptiv maximal adsorbiert.

An dieser Stelle möchte ich noch erwähnen, daß die gewöhnliche Meiler- oder Retortenholzkohle keine Adsorptionsleistung für Chlorpikrin unter den obigen Bedingungen zeigt. Das ist für derartige nicht nach besonderen Verfahren hergestellte Holzkohlen sehr charakteristisch und diese nach den gewöhnlichen trockenen Destillationsverfahren hergestellte Holzkohlen, wobei es oft auf die Gewinnung von viel flüssigen Destillationsprodukten ankommt, gehören deshalb auch nicht zu den „aktiven“ Kohlen, trotzdem sie absolut genommen natürlich auch eine geringe statische Adsorptionsleistung zeigen. Der gewöhnlichen Meiler- oder Retortenholzkohle fehlen vor allen Dingen die Hauptmerkmale einer aktiven Kohle, nämlich erstens große adsorbierte Menge, zweitens große Adsorptionsgeschwindigkeit und drittens gute Ultraporosität.

Die Adsorptionleistung für Blausäure erreicht auch ihren höchsten Wert im trockenen Zustand und nimmt mit ansteigendem Wassergehalt ab, um bei etwa 50% Wasser O-Werte zu erreichen. Die Leistung an und für sich ist ja — wie schon gesagt — sehr gering! Wir werden bei einer späteren Abhandlung sehen, wie ganz anders das Verhalten der Blausäure ist, wenn die Kohle neben Wasser noch Salze usw. enthält, die eine Adsorptionsreaktion ermöglichen. Denn für gewöhnlich findet eine Einwirkung der Blausäure auf das Wasser etwa in dem Sinn der folgenden Gleichung nur langsam statt, was praktisch nicht in Frage kommt.



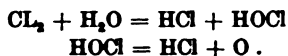
II.

Wir kommen nun zur Betrachtung der Kurven von Chlor und Phosgen und zwar haben wir hier den Fall vorliegen, wo neben der reinen Adsorption noch infolge der katalytischen Wirkung des aktiven Kohlenstoffes eine gewöhnliche chemische Re-

aktion stattfindet. Während wir bei der „reinen Adsorption“ eine Abnahme der Leistung mit ansteigendem Wassergehalt feststellten, haben wir ganz im Gegensatz dazu bei der mit einer gewöhnlichen chemischen Reaktion verbundenen Adsorption eine Zunahme der Leistung mit ansteigendem Wassergehalt und zwar steigt die Adsorptionsleistung proportional der Wasserzunahme bis zu einem Maximum und fällt dann wieder schneller ab.

Für Chlor nimmt die Leistung zunächst langsam proportional mit dem Wassergehalt zu; die Maximumleistung wird bei etwa 30% Wassergehalt erreicht, der schnelle Abfall beginnt bei etwa 40%.

Der Vorgang stellt sich etwa folgendermaßen dar: Erstens wird eine gewisse Menge Chlor rein adsorbiert und zweitens tritt daneben noch eine chemische Einwirkung des Chlors auf das Wasser ein. Es findet etwa folgende Umsetzung statt.



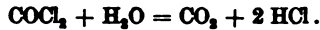
Diese Reaktion, die im Dunklen gewöhnlich nur langsam verläuft, wird durch die katalytische Wirkung des aktiven Kohlenstoffes sehr beschleunigt und verläuft quantitativ.

Die katalysierende Wirkung des aktiven Kohlenstoffes nimmt nun ab mit der Abnahme der reinen Adsorptionsleistung, d. h. mit zunehmendem Wassergehalt. Andererseits verläuft die hydrolytische Reaktion um so schneller, je mehr Wasser vorhanden ist. Es ergibt sich also daher in praxi ein Geschwindigkeitsmaximum.

Für Phosgen nimmt die Leistung etwas schneller proportional dem Wassergehalt zu, erreicht ebenfalls ein Maximum und fällt dann sehr schnell ab, um bei allen Kohlen bei etwa 50% Wasser Nullwerte zu erreichen.

Der Maximalwert von strukturell gut erhaltenen Holzkohlen wird bei 25% erreicht, dauert bis etwa 40% und stürzt dann schnell ab. Die strukturell schlecht erhaltenen Holzkohlen mit koksartigem Aussehen, bei denen die Struktur durch „Verkoken“ oft völlig zerstört ist, erreichen ihr Maximum schon bei 20% Wasser, behalten es bis 30% bei und fallen dann ab. Das Maximum derartiger „verkokter“ Kohlen liegt auch beträchtlich niedriger als das der strukturell gut erhaltenen Kohlen! Bei der Phosgen-

Adsorption findet auch eine durch den aktiven Kohlenstoff katalysierte Hydrolyse und zwar nach folgender Gleichung statt:



Das obige Verhalten ist auch erklärlich: Zunächst ist bei den strukturell gut erhaltenen Holzkohlen eine bessere ausgebildete Oberfläche vorhanden, die auch eine größere Adsorptionsreaktion bedingt, denn falls bei der Reaktion (Hydrolyse) ein Wassermangel eintritt, kann dieses schnell ergänzt werden (gute Dochtwirkung) und so lange wirken, bis alles Wasser verbraucht ist, und erst dann erfolgt schneller Abfall. Bei den strukturell schlecht erhaltenen „verkokten“ Adsorptionsholzkohlen, bei denen das Wasser zum Teil sackartig in Höhlen eingeschlossen ist, wird durch die schlechte Oberflächenausbildung und innere Gapillarausbildung eine geringere Wirkung bedingt, denn das zur Reaktion nötige Wasser läuft nur langsam und teilweise nach. Das Wasser kann deshalb nicht voll ausgenutzt werden. Die Adsorptionsgeschwindigkeit ist deshalb also kleiner, die Maximalleistung liegt tiefer und der Abfall beginnt eher.

Die gewöhnliche Meiler- und Retortenholzkohle weist sowohl für Chlor als auch für Phosgen keine Leistung auf.

Hier möchte ich noch auf eine Erscheinung zu sprechen kommen, die technisch eine gewisse Bedeutung hat. Es hat sich nämlich gezeigt, daß sich Kohlen mit über 50–60% Wasser nicht mehr richtig im Atemeinsatz verpacken lassen. Die Holzkohlen zeigen nämlich die Eigenschaft beim Tränken mit Wasser etwas zu „quellen“. Infolgedessen ist keine so feste und sichere und gleichmäßige Packung zu erzielen. Das zeigt sich vor allen Dingen daran, daß der Atemwiderstand der Kohle bei über 50–60% Wassergehalt stark abfällt. Es bilden sich bei der feuchten, weniger festen, man kann sogar sagen weichen Kohle größere Kanäle; das Gefüge ist locker und leicht durch Erschütterungen zu beeinflussen. Besonders gefährlich ist diese Kanalbildung dann, wenn eine sehr naß gepackte Kohle im Atemeinsatz nachträglich eintrocknet! In den Tabellen 1–2 ist auch der Atemwiderstand jedes Einsatzes mit angegeben und zwar gemessen in Millimeter Wassersäule bei 30 l pro Minute Luftgeschwindigkeit. Wir sehen deutlich, daß bereits bei 40% Wasser der Atemwiderstand beginnt kleiner zu werden. Bei 50% Wasser

beträgt der Atemwiderstand nur noch die Hälfte, bei 60% Wasser nur noch $\frac{1}{3}$ des normalen.

Bei derartig geringem Atemwiderstand tritt es dann oft ein, daß der Ateemeinsatz infolge der schlechten Packung „Nullwerte“ ergibt, d. h. keine Leistung aufweist.

Wenn man das Versuchsmaterial überblickt, so kann man etwa sagen: Wenn eine Adsorptionskohle eine große Chlorpikrinleistung hat, so hat sie auch im allgemeinen eine große Chlor- und Phosgenleistung. Hat eine Kohle eine kleine Chlorpikrinleistung, so hat sie auch im allgemeinen eine kleinere Chlor- und Phosgenleistung. Besitzt eine Kohle überhaupt keine Leistung für Chlorpikrin, ist sie also nicht aktiv, wie z. B. gewöhnliche Meilerholzkohle, so hat sie auch keine Chlor- oder Phosgenleistung. Man kann deshalb mit anderen Worten sagen: Ist die reine Adsorptionsleistung einer aktiven Kohle groß, so ist auch die Adsorptionsreaktionsleistung groß. Im allgemeinen entspricht einer niedrigen z. B. reinen Adsorptionsleistung z. B. gegen Chlorpikrin auch eine niedrige Leistung gegen Chlor oder Phosgen, also eine niedrige katalytische Reaktionsleistung. Wenn dagegen keine reine Adsorptionsleistung [Aktivität]¹⁾ vorhanden ist, so kann auch keine katalytische Adsorptionsreaktion stattfinden, oder die Geschwindigkeit der Adsorptionsreaktion ist so gering, daß sie praktisch nicht in Erscheinung tritt! Betrachten wir z. B. den Fall des völligen Versagens der Meilerholzkohle gegen Chlor und Phosgen, so liegt das Versagen nicht etwa daran, daß die Meilerholzkohle keine so große Oberfläche hat, denn die Oberflächenausbildung der Meilerholzkohle ist fast ebensogut wie die anderer guter Kohlen, sondern es liegt lediglich nur daran, daß die Meilerholzkohle nur eine sehr geringe reine Adsorptionsleistung oder Aktivität hat, wodurch auch nur eine sehr geringe katalytische Wirkung ausgeübt wird, die praktisch überhaupt bedeutungslos ist. Die „große“ Fläche oder Oberfläche allein macht also die katalytische Wirkung nicht aus, vor allen Dingen nicht die Geschwindigkeit. Wir gewinnen hiermit also einen Einblick in die Wirkungsweise der Adsorptionskatalysatoren und erkennen, daß,

¹⁾ H. Herbst, Über die Verbesserung der Adsorptionsleistung von Holzkohlen. Diss. Berlin 1920.

wenn die reine Adsorptionsleistung des Katalysators (seine Aktivität) groß ist, auch die durch ihn bewirkte oder beschleunigte katalytische Adsorptionsreaktion groß ist. Ist die reine Adsorptionsleistung des Katalysators klein, so ist auch die katalysierte Wirkung klein. Ist die Aktivität des Katalysators gleich Null, so ist auch die katalysierte Reaktion gleich Null. Die katalytische Reaktion und besonders die katalytische Reaktionsgeschwindigkeit hängt von der „Aktivität“ des Katalysators ab, und damit von der Reinheit, dem chemischen Aufbau und der räumlichen Anordnung. Eine bestimmte Menge Katalysator kann nur eine bestimmte Menge katalysieren, denn wenn das Endprodukt, welches bei der Katalyse auftritt, nicht entfernt wird, muß die Katalyse zum Stillstand kommen. Ist z. B. bei der Chlorhydrokatalyse alles Wasser verbraucht, so hört die Reaktion eben auf. Die Hydrokatalyse ist allein begrenzt durch die vorhandene Wassermenge. Zweitens kann natürlich die Adsorptionskatalyse stark herabgesetzt oder überhaupt unmöglich gemacht werden, wenn der Adsorptionskatalysator durch Adsorption anderer Gase oder Dämpfe ganz oder zum Teil abgesättigt und damit in der Leistungsfähigkeit herabgesetzt wird. Die Adsorptionskatalyse kann beschleunigt werden, wenn man die entstehenden Produkte entfernt oder chemisch bindet. Andererseits bietet sich auch die Möglichkeit, die Adsorptionsleistung für Stoffe, die nur eine kleine Adsorptionskonstante für Kohlenstoff haben und deshalb nur schwach adsorbiert werden, wie z. B. Blausäure oder Kohlenoxyd, durch künstliche Hervorrufung oder Anwendung einer Adsorptionskatalyse zu verstärken.

III.

Nachdem wir im vorangehenden den Einfluß des Wassers auf die Adsorptionsleistung kennengelernt haben, will ich nun noch einen praktisch wichtigen Fall besprechen, nämlich die Wasseraufnahme der Adsorptionskohle im Atemeinsatz bei der menschlichen Veratmung, ausgehend von verschiedenen gefeuchteten Kohlen und bei verschiedener Atmungsdauer. Der Wassergehalt der in dem Einsatz verpackten Kohlen wird durch die menschliche Veratmung grundlegend beeinflußt. Bei der großen Wichtigkeit des Wassergehaltes beim Vorgang der Adsorption ist es sehr wesentlich zu wissen, wie die Wasserauf-

nahme bei verschiedenen feuchten Kohlen bei der Veratmung verläuft, denn erst dann sind wir in der Lage festzustellen, wie hoch der Feuchtigkeitsgrad der zu verpackenden Kohlen sein muß, um Maximalleistungen zu erzielen. Es wurden zu dem Zweck verschieden gefeuchtete Kohlen in Atemsätze in 2 Schichten, davon etwa 60 ccm Mundschiehtkohle und etwa 230 ccm Außenschichtkohle, verpackt, mit Wollappen auf unterem Sieb zum Staubschutz, und verschiedene lange Zeit bis zu 5 Stunden von Männern veratmet.

Nach dem Veratmen wurde jeweils der Wassergehalt der Außenschicht und Mundschieht analytisch bestimmt, auch wurde der Atemwiderstand (A.-W.) vor und nach der Veratmung gemessen. Die Versuche sind in beifolgender Tabelle zusammengestellt. Die Lufttemperatur betrug etwa 20° C.

Tabelle VI.
Wasseraufnahme von aktiver Kohle beim Veratmen.

Ausgangsmaterial		Wassergehalt in Prozenten					
		unveratmet	veratmet nach				
			1 Std.	2 Std.	3 Std.	4 Std.	5 Std.
I. W.-Kohle getrocknet	Außenschicht A _I	0,64	6,0	8,6	12,7	12,6	15,4
	Mundschieht M _I	0,64	16,42	23,6	32,9	35,8	40
	Atemwiderstand mm	—	—	—	6,5—8,5	6,5—10,3	6,5—25
II. L.-Kohle angeliefert	Außenschicht A _{II}	10,65	18,3	14,8	16,8	18,35	19,8
	Mundschieht M _{II}	10,65	22,36	30,3	36,5	39,7	41,8
	Atemwiderstand mm	—	6,3—7,1	6—7,9	6,0—8	6,1—8	6,1—9,8
III. W.-Kohle getränkt	Außenschicht A _{III}	31,5	31	34,5	32,6	33,9	33,7
	Mundschieht M _{III}	31,5	35,6	39,1	41,4	—	42,7

Aus obiger Tabelle VI und Abb. 3 ersehen wir erstens deutlich, daß die Hauptwasseraufnahme in der Mundschieht stattfindet. Die Mundschiehtkohle ist nach einer mehrstündigen Veratmung immer erheblich feuchter als die Außenschichtkohle, bei der Veratmung steigt also der Wassergehalt in der Mundschiehtkohle bedeutend schneller an als in der Außenschicht. Im allgemeinen gibt die trockene Kohle bei der Veratmung einen schnellen Anstieg des Wassergehaltes. Bei einer Ausgangskohle von 10% Wassergehalt geht der Anstieg etwas langsamer vor sich

und bei einem Wassergehalt von 30% geht der Anstieg noch langsamer vor sich! Wir ersehen also deutlich, daß bei obiger Außentemperatur von 20°C die Mundschichtfeuchtigkeit ein Maximum nach 5–6 Stunden Veratmungsdauer bei etwa 44–45% Wassergehalt erreicht. Die Außenschicht scheint auch einen Maximalwert anzunehmen, der aber niedriger als der der Mundschicht ist und bei obiger Temperatur etwa bei 34% Wassergehalt liegt. Der Maximalwert der Außenschicht wird aber von der trockenen gepackten Kohle schätzungsweise erst nach 12stündigem Atmen erreicht. Die Feuchtigkeitsunterschiede der Mundschicht und Außenschicht gleichen sich natürlich beim Nichtgebrauch und längerem Lagern wieder aus.

Wir können nun an eine aktive Kohle im wesentlichen zwei Anforderungen stellen, einmal die Erzielung einer sehr hohen, reinen Adsorptionsleistung“ und zweitens eine möglichst große „katalytische Adsorptionsreaktionsleistung“. Der Wassergehalt wirkt nun auf diese beiden Faktoren in entgegengesetzter Weise ein, denn mit zunehmendem Wassergehalt fällt die reine Adsorptionsleistung, während die katalytische Adsorptionsreaktion ansteigt

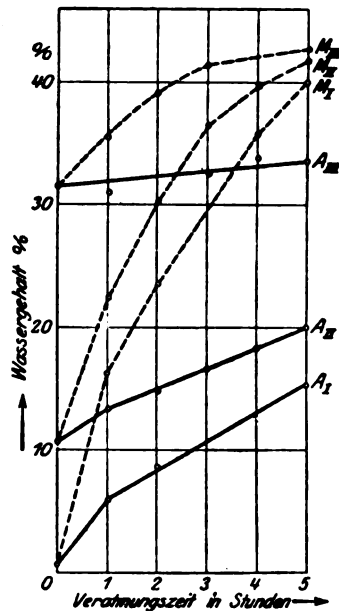


Abb. 8.

Stellt man also an eine aktive Kohle lediglich die Anforderung einer sehr großen, reinen Adsorptionsleistung, so muß man die Kohle möglichst trocken anwenden. Die Anwendung einer trockenen Kohle ist aber in praxi dadurch beschränkt, daß die ganz trockene Kohle zu viel Kohlenstaub entwickelt, der die direkte Verwendung im Ateemeinsatz unmöglich macht oder man müßte denn gerade den Kohlenstaub wieder unschädlich machen durch geeignete Staubfilter, wie z. B. Wollgewebe, dadurch wird aber der Atemwiderstand unnötig erhöht. Man kann deshalb die Kohle nicht staubtrocken verpacken, sondern es ist aus dem

Grunde ein Wassergehalt von 3–5% angebracht, wodurch die Staubwirkung erheblich herabgedrückt wird.

Stellen wir nun die Anforderung einer möglichst großen katalytischen Adsorptionsreaktion, so gilt, wie schon gesagt, daß die Leistung mit ansteigendem Wassergehalt steigt. Im allgemeinen erreichen wir in praxi bei 20–30% Wassergehalt das Maximum der Leistung. Bei einem Wassergehalt von 40% und darüber ist eine sichere Verpackung nicht mehr möglich, auch ist bei 40% das Leistungsmaximum bei manchen Kohlesorten bereits überschritten. Auch ein Verpacken der Kohle mit über 30% bis 35% Wassergehalt ist völlig zwecklos und es bringt den Maskenträger zweifellos in Gefahr, denn durch das Veratmen steigt dann der Wassergehalt zu hoch, die reine Adsorptionsleistung wird zu niedrig, der Atemwiderstand wird durch die Wasseraufnahme zu hoch und ist mit einem Versagen des Ateemeinsatzes zu rechnen.

Es genügt, wenn wir das Maximum der katalytischen Leistung beim praktischen Gebrauch erzielen wollen, vollständig, wenn wir die Kohle mit etwa 10–12% Wasser verpacken. Durch das Veratmen nimmt die Kohle noch genügend Feuchtigkeit auf, so daß eine mit 11% Wasser verpackte Mundschicht nach einer Stunde Veratmung bereits 22% Wasser und nach 2 Stunden bereits 30% Wasser hat, während die Außenschicht nach einer Stunde etwa 13% und nach 2 Stunden etwa 15% Wasser enthält. Es ist daher auch für die katalytische Adsorptionsreaktion nicht nötig, die Kohle mit einem größeren Wassergehalt als höchstens 15% zu verpacken. Zu berücksichtigen ist dabei, daß die Kohle auch beim Lagern noch Feuchtigkeit aus der feuchten Außenluft aufnehmen kann, oder gar aus anderen feuchten Schichten des Ateemeinsatzes. Es ist immer besser, wenn die Kohle fähig ist, noch etwas Wasser aufzunehmen, als wenn eine zu feucht gepackte Kohle im Ateemeinsatz austrocknet und dadurch Mißstände hervorruft.

Wir haben also festgestellt: Hohe reine Adsorptionsleistung erfordert trockene Kohle, praktisch 3–5% Wasser. Starke hydrokatalytische Adsorptionsreaktion erfordert feuchte Kohle, praktisch 10–15% Wassergehalt. Lassen sich diese beiden Anforderungen nun gleichzeitig erfüllen? Diese Forderung läßt sich nur bis zu einem gewissen Grade erreichen: Da in einem Ateemeinsatz beim Veratmen die Mundschicht immer bedeutend feuchter ist als die Außenschicht, so wird man möglichst die hydro-

katalytische Adsorptionsreaktion in der Mundschrift stattfinden lassen, während man in der trockenen Außenschicht oder Mittelschicht die reine Adsorptionsleistung vor sich gehen läßt.

Was ist nun wichtiger? Die reine Adsorptionsleistung oder die katalytische Reaktion? Hierzu ist zu bemerken, daß die reine Adsorptionsleistung von der Größe der Adsorptionskonstanten und damit von der chemischen Natur des Adsorptives abhängt.

Für eine Reihe von Stoffen ist diese Adsorptionskonstante klein. Für eine gewisse Anzahl dieser Stoffe mit kleinen Adsorptionskonstanten bietet sich nun, wenn sie mit Wasser neben der reinen Adsorption eine hydrokatalytische Reaktion eingehen, die Möglichkeit, die praktische Adsorptionsleistung erheblich zu steigern. Bei manchen Stoffen kann man z. B. die Leistung, die die Kohle trocken zeigt, bei einem Wassergehalt von etwa 25 bis 30% verdoppeln. Wir können also praktisch die Adsorptionsleistung für Stoffe, die eine hydrokatalytische Wirkung eingehen, über die „reine Adsorptionsleistung“ hinaus steigern! Das ist natürlich praktisch sehr wesentlich.

Es ist nun die Frage zu beantworten, wie wirkt ein Wassergehalt von etwa 10—15% auf die reine Adsorptionsleistung? Ist dabei der Schaden, den die reine Adsorptionsleistung erfährt, größer als der Nutzen? Das ist im großen ganzen zu verneinen, denn der Abfall beträgt ja im allgemeinen bei 10—15% Wassergehalt etwa 5—15%; berücksichtigt man dabei die Veratmung, so kann man sagen, daß der Abfall etwa 15—25% beträgt.

Es kommt nun aber sogar vor, daß bei Kohlen, die für Stoffe (z. B. Chlorpikrin), für sie normalerweise nur eine reine Adsorptionsleistung zeigen, ausnahmsweise die Adsorptionsleistung mit zunehmendem Wassergehalt bis 15 und 20% noch etwas ansteigt und ein kleines Maximum bildet, um dann etwa ab 20% normal schnell abzufallen. Diese kleinen Maxima beruhen eben darauf, daß die Kohle neben Wasser noch geringe Mengen anderer Stoffe (Salze usw.) enthält, die auf Chlorpikrin chemisch einwirken können. Wir können also sagen, daß ein Wassergehalt von 10% bei der Verpackung der Kohle für die reine Adsorptionsleistung nicht so schädlich ist, besonders wenn man bedenkt, daß durch die hydrokatalytische Wirkung viele Stoffe, die nur eine kleine Adsorptionskonstante haben, im bedeutend größeren Maße unschädlich gemacht werden können, wodurch sich also der Schutzbereich vergrößert.

Die quantitative Bestimmung von Dextrose und Lävulose in einer Lösung.

Von
Hans Murschhauser.

(Aus der akademischen Kinderklinik in Düsseldorf.)

(Eingegangen am 16. März 1921.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Zur quantitativen Bestimmung von Dextrose und Lävulose nebeneinander sind verschiedene Methoden ausgearbeitet worden.

Nach der einen wird die zu untersuchende Lösung, die in toto ca. 1% Zucker enthalten soll, sowohl mit Fehlingscher Kupfer- als Sachscher Quecksilberlösung titriert. Der Gehalt an Dextrose und Lävulose wird aus der Anzahl der zur vollständigen Reduktion bestimmter Mengen beider Metallsalzlösungen benötigten Kubikzentimeter Zuckerlösung durch Aufstellung einer Gleichung mit 2 Unbekannten errechnet. Diese von Soxhlet inaugurierte Methode¹⁾ beruht auf der verschiedenen Reduktionskraft der beiden Zuckerarten gegenüber den angewandten Reagentien.

Für die Schaffung einer anderen Methode suchte Sieben²⁾ das verschiedene Verhalten der beiden Glykosen gegen Salzsäure heranzuziehen. Er ging dabei so vor, daß er in einer Portion das gesamte Reduktionsvermögen der Lösung mit Fehlingscher Lösung bestimmte und in einer zweiten das nach der Zerstörung der Lävulose durch Salzsäure restierende, das von der Dextrose allein herrühren sollte.

Nach Sieben, Herzfeld³⁾, Wichmann⁴⁾, Dammüller⁵⁾ liefert dieses Verfahren nur dann einigermaßen befriedigende Resultate, wenn wie im Invertzucker Dextrose und Lävulose in annähernd gleichem Mengenverhältnis vertreten sind. Aus der Abnahme des Traubenzuckergehaltes reiner Dextroslösungen beim Erhitzen mit Salzsäure unter denselben Bedingungen ist aber, wie Sieben selbst erkannte, ersichtlich, daß diese

¹⁾ König, Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel Bd. III (1), S. 434.

²⁾ Z. d. Ver. d. d. Zuckerind. 1884, S. 837 u. 865.

³⁾ Z. d. Ver. d. d. Zuckerind. 1888, S. 742.

⁴⁾ Z. d. Ver. d. d. Zuckerind. 1891, S. 327 u. 727.

Übereinstimmung der gefundenen Traubenzuckermenge mit der vorhandenen zum Teil auf eine Kompensation des zerstörten Traubenzuckers mit einem Rest nicht zerstörter Lävulose zurückzuführen ist. Ganz außer acht gelassen ist hierbei die Tatsache, daß das Reduktionsvermögen der Lävulose ein anderes ist als das der Dextrose.

Nach einer dritten Methode wird der Gehalt einer Lösung an Dextrose und Lävulose aus der Kombination der Resultate der Zuckerbestimmung mittels Fehlingscher Lösung und der Polarisation durch Aufstellung einer Gleichung mit 2 Unbekannten ermittelt. Die Methode ist von C. Neubauer¹⁾ zuerst angewandt worden. Seine Berechnungsweise hat im Laufe der Jahre Wandlungen erfahren, die zum Teil durch die Aufstellung genauerer Konstanten für die spezifische Drehung der beiden Glykosen bedingt waren. Die Methode geht von der Voraussetzung aus, daß der Gesamtzucker bekannt ist. Das trifft jedoch nicht zu, weil von vornherein nicht feststeht, in welchem Verhältnis Dextrose und Lävulose vorhanden sind, beide Zuckerarten aber Fehlingsche Lösung in verschiedenem Grade reduzieren. Darin aber liegt die Schwäche der Methode.

Die Untersuchung eines mir in jüngster Zeit vorgelegten Harnes, in dem ich die Gegenwart verschiedener Zuckerarten vermutete, gab mir Veranlassung, die Frage der Bestimmung von Dextrose und Lävulose nebeneinander von dieser Seite aus in Angriff zu nehmen, ehe die Entscheidung über die Verwendbarkeit der Salzsäuremethode, mit der ich mich seit einiger Zeit beschäftigte²⁾, gefallen war.

Auf der Suche nach Daten für das Reduktionsvermögen der Lävulose gegen Fehlingsche Lösung fiel mir die Mannigfaltigkeit in der Methodik auf, die zur Bestimmung der verschiedenen Zuckerarten, ja selbst der Dextrose allein, in Anwendung gebracht wurde. Bei den verschiedenen Methoden zur gewichtsquantitativen Bestimmung von Dextrose schwankt nicht nur die Menge der angewandten Fehlingschen Lösung, sondern auch der Grad der Verdünnung mit Wasser, die Art des Erhitzens und die Kochdauer. Die Seignettesalzlösung ist bald nach Fehling, bald nach Allihn bereitet. In allen Fällen wird auf die Wichtigkeit des genauen Einhaltens der Versuchsbedingungen hingewiesen, von dem das Ergebnis abhängt. Jedes Verfahren hat deshalb auch seine besonderen Tabellen, in denen die dem gewogenen Kupfer oder Kupferoxydul entsprechenden Mengen Dextrose angegeben werden.

¹⁾ B. B. 1877, 10. 827.

²⁾ Diese Zeitschr. 104, 214.

Nur an einer Stelle der Literatur, bei der Bestimmung des Traubenzuckers nach Allihn finde ich in Röttgers Lehrbuch der Nahrungsmittelchemie S. 818 eine Angabe, die von dem eben gegebenen Hinweis abweicht. Es heißt da: „Für die Tabelle III schreibt Allihn eine andere Zusammensetzung der Seignettesalzlösung vor; doch ist auch die nach der Fehlingschen Vorschrift bereitete Lösung verwendbar.“ Aus einem Vergleich der den Tabellen von E. Wein einerseits und F. Allihn andererseits zu entnehmenden Werte für Cu und Dextrose geht hervor, daß die verschiedene Zusammensetzung der Seignettesalzlösung sowie eine verschieden gewählte Kochzeit zwischen 0,100 und 0,450 g Cu Unterschiede von ca. 1 mg für Dextrose veranlassen.

Da ich diese Beobachtung nicht ohne weiteres auf die Lävulose zu übertragen mich berechtigt fühlte, andererseits aber für die Reduktionsverhältnisse der Lävulose nur eine Tabelle auffand, deren Werte sich auf eine Methodik beziehen, die mit keiner der für die Dextrosebestimmung angewandten völlig harmoniert, so blieb mir nichts anderes übrig, als die Reduktionsverhältnisse der Lävulose zum Studium der vorliegenden Frage für einen kleinen Konzentrationsbereich festzulegen.

Von allen Methoden zur quantitativen Bestimmung von Dextrose erscheint mir seit langem die von E. Pflüger¹⁾ gearbeitete als die zuverlässigste. Ich habe sie deshalb als Grundlage zur Ermittlung des Reduktionsvermögens von Lävulose herangezogen.

Ich bin dabei nach der Pflügerschen Vorschrift so vorgegangen, daß ich in einem Becherglas von 300 ccm 30 ccm Fehlingscher Kupfersulfatlösung mit 30 ccm Allihnscher Seignettesalzlösung mischte, mit 20 ccm der zu untersuchenden Zuckerlösung und 65 ccm Wasser versetzte und wieder vermengte. Das Becherglas wurde in ein durch mehrere Brenner erhitztes großes Wasserbad mit kochendem Wasser versenkt und vom Moment des Einsetzens genau 30 Minuten in dem Bade belassen. Die aus dem Wasserbade entnommene Mischung wurde sofort mit 130 ccm kaltem Wasser versetzt. Nach dem Absetzen des Kupferoxyduls wurde durch einen gewogenen Goochtiiegel filtriert, das Oxydul auf dem Tiegel gesammelt, mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen. 30 Minuten bei 110° getrocknet und schließlich gewogen.

¹⁾ Arch. f. d. ges. Phys. 114, 242. 1906.

Die zu den Versuchen dienende Lävuloselösung war ca. 1,0 proz. Die Reinheit des von Kahlbaum bezogenen, aus Inulin hergestellten Präparates wurde durch Polarisation seiner Lösungen in verschiedenen Konzentrationen kontrolliert. Bei Anwendung von 20 ccm der ca. 1,0 proz. Lösung kamen also ca. 0,2 g des Zuckers zur Bestimmung. Um die Verwendungsmöglichkeit der im folgenden beschriebenen Methode zur quantitativen Bestimmung von Dextrose und Lävulose nebeneinander zu erweitern, habe ich die Menge Lävulose innerhalb einer geringen Breite variiert. Ich stelle in der folgenden kleinen Tabelle die den jeweils angewandten Mengen Lävulose entsprechenden Kupferoxydulmengen einander gegenüber, sowie zum Vergleiche die denselben Kupferoxydulmengen entsprechenden Werte für Dextrose, die aus der Pflügerschen Tabelle entnommen sind.

1. Abgewogen: 5,9824 g Lävulose, in destilliertem Wasser gelöst, auf 300,0 ccm ergänzt. Diese Lösung, im Verhältnis 1 : 1 mit destill. Wasser verdünnt, ergab im 189,4 mm-Rohre eine Drehung $\alpha^{20} = -1,755^\circ$. 20,0 ccm dieser verdünnten Lösung (= 0,19941 g Lävulose) lieferten 0,4141 Cu_2O .

2. Abgewogen: 5,0359 g Lävulose, gelöst mit Wasser zu 500,0 ccm. 100,0 ccm dieser Lösung = 1,0072 g Lävulose.

20,00 ccm dies. Lös.	= 0,20144 g Läv.,	ergab. 0,4181 Cu_2O	= 0,1860 Dextr.
21,02 „ „ „	= 0,21167 „ „ „	0,4357 „ „	= 0,1954 „
22,00 „ „ „	= 0,22158 „ „ „	0,4499 „ „	= 0,2032 „
19,00 „ „ „	= 0,19137 „ „ „	0,3984 „ „	= 0,1755 „
18,00 „ „ „	= 0,18129 „ „ „	0,3797 „ „	= 0,16605 „
17,00 „ „ „	= 0,17122 „ „ „	0,3583 „ „	= 0,1553 „
16,00 „ „ „	= 0,16115 „ „ „	0,3414 „ „	= 0,1470 „
15,00 „ „ „	= 0,15108 „ „ „	0,3196 „ „	= 0,1367 „
10,00 „ „ „	= 0,10072 „ „ „	0,2195 „ „	= 0,0914 „
5,00 „ „ „	= 0,05036 „ „ „	0,1154 „ „	= 0,0459 „

Wie man sieht, reduziert die Lävulose Fehling-Allihnsche Lösung weniger stark als Dextrose. Die Konsequenz hiervon ist, daß das ausgeschiedene Kupferoxydul für sich nicht die Gesamtmenge des wirklich vorhandenen Zuckers widerspiegelt, wenn beide Glykosen in Frage kommen, und daß der wahre Zuckergehalt einer Lösung nach Feststellung deren Drehung nur unter Berücksichtigung des Reduktionsverhältnisses beider Glykosen entschieden werden kann. Nur unter diesen Umständen wird auch das wahre prozentuale Verhältnis der beiden Zuckerarten zueinander gefunden werden können.

Nachdem nunmehr das Reduktionsverhältnis der Lävulose festgelegt war, konnte ich dazu übergehen, Bestimmungen von Dextrose und Lävulose nebeneinander in Lösungen vorzunehmen, die ca. 1% Gesamtglykosen enthielten, und in denen das Verhältnis der beiden Glykosen zueinander variierte.

In allen Fällen wurde das Reduktionsvermögen von 20 ccm sowie die Drehung dieser Lösungen im polarisierten Lichte ermittelt.

Die Zahlen für die Drehung beziehen sich auf eine Rohrlänge von 189,4 mm. Eine 1 proz. reine Dextroselösung muß also einen Drehungswinkel von $+1,00^\circ$ aufweisen, eine 1 proz. Lösung von Lävulose einen solchen von $-1,760^\circ$.

Für die zu bereitenden Mischungen diene einerseits eine Lösung, die 5,9824 g Lävulose in 300 ccm Wasser enthielt (entspr. 1,9941%); andererseits wurde eine Lösung von 5,937 g Dextrose in 300,0 ccm Wasser bereitet (entspr. 1,9790%).

Der Gang der Untersuchung und Berechnung sei an dem Beispiel (1) einer Lösung beschrieben, die sich aus 25,0 ccm obiger Dextroselösung, 25,0 ccm obiger Lävuloselösung und 50,0 ccm Wasser zusammensetzte.

Diese Lösung enthielt nach der Herstellung = 0,4985% Lävulose und 0,49475% Dextrose.

Nach dem Reduktionsverfahren mit Fehling-Allihnscher Lösung wurde gefunden:

20,00 ccm Lösung = 0,4279 Cu_2O ; diese entsprechen nach der Tabelle von Pflüger = 0,1912 Dextrose = 0,9560% Dextrose;
0,4279 Cu_2O entsprechen nach den von mir gefundenen Zahlen für Lävulose = 0,2071 g = 1,0355% Lävulose.

Die Drehung einer 0,9560 proz. Dextroselösung im 189,4 mm-Rohr beträgt $\alpha = +0,956^\circ$; die Drehung einer 1,0355 proz. Lävuloselösung bei derselben Rohrlänge $\alpha = -1,822^\circ$.

Besteht der in Lösung befindliche Zucker zu 100% aus Dextrose, so haben wir also eine Drehung von $+0,956^\circ$ zu erwarten, besteht er zu 100% aus Lävulose, so müssen wir einer Drehung von $\alpha = -1,822^\circ$ begegnen.

In Wirklichkeit ergab die polarimetrische Untersuchung eine Drehung von $\alpha = -0,375^\circ$. Um nun das prozentuale Verhältnis

kennen zu lernen, in dem die beiden Glykosen in der vorliegenden Lösung zueinander stehen, bedienen wir uns zunächst einer graphischen Darstellung der durch Analyse gewonnenen Ergebnisse.

Wir tragen in ein Millimeter-Quadratnetzpapier die Drehungszahlen als Ordinaten ein, derart, daß wir auf der Abszisse mit dem Werte $-1,822^\circ$ beginnen; der Wert $-1,722$ liegt 10 mm höher und so fort bis zum Werte $+0,956^\circ$. Die beiden Endpunkte der so erhaltenen Strecke stellen alsdann die Drehungswerte für 100%

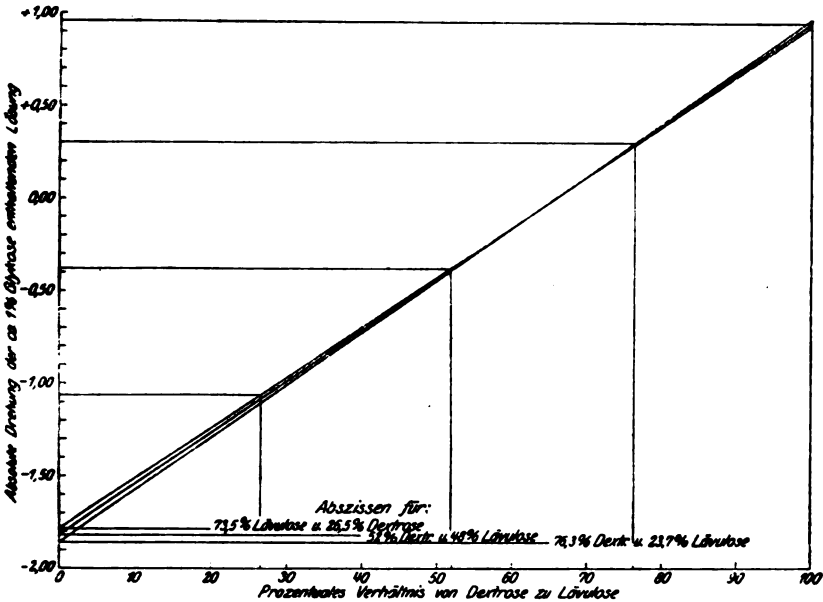


Abb. 1.

Lävulose einerseits und 100% Dextrose andererseits dar; zwischen ihnen liegen die Drehungswerte für die verschiedenen prozentualen Verhältnisse zwischen den beiden Glykosen.

Um dieses Verhältnis zu ermitteln, legen wir auf der Abszisse einen Maßstab an, der von dem Punkte $-1,822^\circ$ mit 0 beginnend 100 gleiche Teile umfaßt. Aus den Strecken 0 bis 100 und $-1,822^\circ$ bis $+0,956^\circ$ konstruieren wir ein Rechteck und ziehen von 0 aus die Diagonale nach der gegenüberliegenden Ecke. Ziehen wir nun von dem Punkte $-0,375$ für den experimentell gefundenen Drehungswinkel eine Parallele zur Abszisse bis zur Diagonale und fällen von dem Schnittpunkte der beiden Linien das Lot auf

die Abszisse, so erfahren wir das prozentuale Verhältnis der Teilstrecken ($-1,822^\circ$ bis $-0,375^\circ$) und ($-0,375^\circ$ bis $+0,956^\circ$). In dem vorliegenden Versuch entfallen nach Zeichnung 52% des gesamten Drehungsbereiches auf Dextrose und 48% auf Lävulose. Um aus diesen Zahlen den wahren Prozentualgehalt an den beiden Glykosen zu erhalten, müssen diese mit den oben angegebenen, aus den Reduktionsverhältnissen für den betreffenden Zucker ermittelten Werten multipliziert werden. Wir erhalten alsdann:

$$\begin{aligned} 0,9560 \cdot 0,52 &= 0,4971\% \text{ Dextrose und} \\ 1,0355 \cdot 0,48 &= 0,4970\% \text{ Lävulose} \\ \text{Zusammen} &= 0,9941\% \text{ Glykosen.} \end{aligned}$$

Nach den oben gemachten Angaben enthält die Lösung:

$$\begin{aligned} &0,49475\% \text{ Dextrose und} \\ &0,49852\% \text{ Lävulose} \\ \text{Zusammen} &0,9933\% \text{ Glykosen.} \end{aligned}$$

Die Differenz zwischen den gefundenen und wirklich vorhandenen Mengen beträgt somit für die Dextrose = +0,48, für die Lävulose -0,30%, für den Gesamtzucker = +0,08%.

Auch ohne die Anwendung einer Hilfszeichnung läßt sich das Verhältnis zwischen den beiden Zuckern errechnen. Bezeichnen wir die Strecke von $-1,822$ bis zum Teilstrich der abgelesenen Drehung ($-0,375$) mit a , die Strecke von hier bis zum Endpunkte auf der Plusseite ($+0,956^\circ$) mit b , die Verhältniszahlen von Dextrose und Lävulose mit x und y , dann haben wir: $a + b = 100$, und ferner $(a + b) : 100 = a : x$; also

$$2,778 : 100 = 1,447 : x;$$

$$x = 52,0 \quad y = 100 - 52,0 = 48.$$

Die Zahlen sind, wie oben angegeben, mit den entsprechenden Werten aus der Reduktionsbestimmung zu multiplizieren.

Beispiel 2. 25,0 ccm obiger Dextroselösung + 75,0 ccm obiger Lävuloselösung + 100,0 ccm Wasser. 20 ccm dieser Lösung ergaben:

$$0,4215 \text{ Cu}_2\text{O} = 0,1878 \text{ Dextrose} = 0,9390\% \text{ Dextrose};$$

$$\alpha^{20} = +0,9390^\circ \text{ im } 189,4 \text{ mm-Rohre}$$

$$0,4215 \text{ Cu}_2\text{O} = 0,2031 \text{ Lävulose} = 1,0155\% \text{ Lävulose};$$

$$\alpha^{20} = -1,7873^\circ \text{ im } 189,4 \text{ mm-Rohre}$$

$$\text{Beobachteter Drehungswinkel } \alpha = -1,065^\circ.$$

Nach $(a + b) : 100 = a : x$ ergibt sich:

$$x = \frac{0,722 \cdot 100}{2,727} = 26,48\% \text{ für Dextrose};$$

$$y = 100 - 26,48 = 73,52\% \text{ für Lävulose.}$$

Daraus errechnen wir einen Gehalt der Lösung:

an Dextrose von 0,2487%,
 an Lävulose von 0,7466%,
Zusammen 0,9953%.

Nach der Bereitung enthält die Lösung:

0,2474% Dextrose,
0,7478% Lävulose,
 Zusammen 0,9952%.

Die Differenz beträgt für Dextrose + 0,5%, für Lävulose - 0,16%;
 der Gesamtzucker ist in beiden Fällen derselbe.

Zur Kontrolle sei die aus den Analysenergebnissen errechnete mit der beobachteten Drehung verglichen.

Berechnet aus den obigen Zahlen für Dextrose: $\alpha = +0,2487$,
 " " " " " für Lävulose: $\alpha = -1,3140$ °
Berechnet $\alpha = -1,0653$ °

Die beobachtete Drehung betrug: $\alpha = -1,065$ °.

Beispiel 3. 25,0 ccm Lävuloselösung + 75,0 ccm Dextroselösung
 + 100,0 ccm Wasser.

20,0 ccm der Lösung ergaben:

0,4353 Cu₂O = 0,1952 Dextrose = 0,9760% Dextrose;
 $\alpha = +0,9760$ ° (im 189,4 mm-Rohre).
 = 0,2115 Lävulose = 1,0575% Lävulose;
 $\alpha = -1,861$ ° (im 189,4 mm-Rohre).

Die beobachtete Drehung im 189,4 mm-Rohre betrug: $\alpha = +0,305$ °.

Die aus dem gefundenen Cu₂O berechneten Mengen Lävulose und Dextrose ergeben einen Drehungswinkel im Gesamtwerte von 2,837°; α beträgt 2,166; daraus ergibt sich ein procentuales Verhältnis der Drehungen für die vorhandenen Mengen von Dextrose und Lävulose = 76,35 : 23,65. Aus diesem errechnet sich ein Gehalt der Lösung von 0,7452% Dextrose

und 0,2501% Lävulose;

Zusammen 0,9953% Glykosen.

Nach Bereitung enthält die Lösung 0,7421% Dextrose
und 0,2492% Lävulose

Zusammen 0,9913%.

Die Differenz beträgt + 0,4% in toto.

Kontrolle durch die Drehung:

Nach Analyse $\alpha = +0,745$ ° für Dextrose,
 $\alpha = -0,440$ ° für Lävulose,

Berechnetes Ergebnis = + 0,305°.

Die Polarisation ergab: + 0,305°.

Ganz einfach gestaltet sich die Rechnung, wenn reine Dextrose- oder Lävuloselösungen vorliegen. Ich führe auch diese Beispiele hier an, da sie einerseits für die Feststellung der Reinheit der verwendeten Zucker, andererseits für die qualitative Ermittlung derselben von Wert sein können.

Dextroselösung.

50,0 ccm obiger Dextroselösung (1,979%) + 50,0 ccm Wasser.

20,0 ccm der Lösung ergaben 0,4404 Cu_2O ; diese Kupferoxydmenge, als reine Dextrose gerechnet, entspricht 0,19793 g D = 0,9895% D, $\alpha = +0,9895^\circ$; als reine Lävulose gerechnet = 0,2155 g Lävulose = 1,0775% Lävulose; $\alpha = -1,896^\circ$.

Die beobachtete Drehung war $\alpha = +0,990^\circ$; nach obigen Formeln berechnet sich daraus ein Dextrosegehalt von 0,9893%, eine Zahl, die sich mit der wirklich vorhandenen Menge vollständig deckt.

Lävuloselösung.

Die zur Analyse verwendete Lösung war durch Mischen von 50 ccm obiger Lävuloselösung (1,9941%) mit 50,0 ccm Wasser bereitet worden.

20,0 ccm dieser Lösung ergaben: 0,4141 Cu_2O ; diese Menge, als Dextrose ausgedrückt, ergibt 0,1839 g D = 0,9195% Dextrose; dann betrüge $\alpha = +0,9195^\circ$; als reine Lävulose gerechnet entspricht die Kupferoxydmenge = 0,19941 g = 0,99705% Lävulose; in diesem Falle beträgt der Drehungswinkel $\alpha = -1,755^\circ$. Da die beobachtete Drehung der Lösung $-1,755^\circ$ war, besteht der gelöste Zucker zu 100,0% aus Lävulose.

Aus den im vorstehenden gegebenen Resultaten läßt sich leicht die Folgerung ableiten, daß der aus der Vernachlässigung des Reduktionsvermögens der Lävulose entspringende Fehler um so größer wird, je höher der relative Lävulosegehalt der Lösung ansteigt.

Die beschriebene Methode erfordert eine strenge Einhaltung der gegebenen Versuchsbedingungen; vor allem ist die Bestimmung des Reduktionsvermögens der Zuckerlösung nach E. Pflüger aufs exakteste auszuführen. Die Ermittlung des Drehungsvermögens kann erst nach Ablauf der Mutarotationsperiode erfolgen; die Temperatur von $20^\circ,0$ ist einzuhalten, da das Drehungsvermögen der Lävulose von der Temperatur stark beeinflußt wird. Wird ein 189,4 mm-Rohr verwendet, so gilt die vorliegende Berechnungsart; für Polarisationsröhren anderer Dimensionen hat eine entsprechende Umrechnung zu erfolgen.

Vergleichende Untersuchung über die gärungshemmende Wirkung einiger Chlorderivate des Methans, Äthans und Äthylens.

Von
H. Plagge.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 16. März 1921.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, die Giftigkeitsgrade einiger Chlorderivate des Methans, Äthans und Äthylens durch ein Maß ihrer Einwirkung auf freie, lebende Zellen, nämlich Hefezellen im Zustande der Gärtätigkeit, auszudrücken. Bezugskörper soll das Chloroform sein, dessen gärungshemmende Wirkung ja seit langem bekannt ist. Den Begriff der Giftwirkung übernehme ich von Euler und Lindner¹⁾, die ich hier wörtlich zitiere:

„Von Giftwirkungen werden wir im allgemeinen dann sprechen, wenn normale Lebensfunktionen einer Zelle oder eines Zellkomplexes durch stoffliche Einwirkung gehemmt werden, sei es zeitweise, sei es dauernd. Was besonders die Hefe betrifft, so kommen, praktisch genommen, 2 Effekte in Betracht:

1. die Verzögerung oder Verhinderung der Entwicklung;
2. die Hemmung der Gärwirkung.

Sind die Hefezellen dauernd gärungs- und entwicklungsunfähig, so werden wir sie als tot bezeichnen können.“

Die Schwierigkeit der Beurteilung von Effekt 1 liegt auf der Hand. Am bequemsten und sichersten zu beurteilen ist Effekt 2, dessen Nachweis wir uns deshalb in jedem Falle zu erreichen bemüht haben. Dementsprechend würde man also einen guten Maßstab für die Giftigkeit einer Substanz haben, wenn man feststellt, welche kleinste Menge eines gelösten Stoffes, innerhalb

¹⁾ Euler und Lindner, Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung. 1915, S. 304f.

einer bestimmten Zeit, bei bestimmter Temperatur, bei bestimmtem Druck, bei bestimmter Zuckerkonzentration, eine bestimmte Menge Hefe, von bestimmtem Alter tötet.

Diese Forderungen beanspruchen nicht alle dieselbe Beachtung. So spielen Druckschwankungen kaum eine Rolle¹⁾. Desgleichen kann die Zuckerkonzentration innerhalb weiter Grenzen vernachlässigt werden²⁾.

Dagegen ist es bekannt, daß das Temperaturoptimum auf etwa 30° C liegt. Ebenso ist es bekannt, daß Gärkraft und Widerstandsfähigkeit mit zunehmendem Alter abnehmen³⁾.

Bei meinen Versuchen habe ich mich einer von Herrn Dr. Joachimoglu vorgeschlagenen Methode bedient und immer mit den gleichen Hefemengen gearbeitet. Abgewogene Mengen Hefe wurden in Lösungen der zu untersuchenden Stoffe von wechselnder Konzentration verrieben, Rohrzucker zugefügt und das Ganze bei 30° C und gewöhnlichem Druck 20 Stunden der Gärung überlassen. Der Wechsel der Konzentration wurde durch Verdünnung der Stammlösung des zu untersuchenden Stoffes mit Leitungswasser erzielt. Welchen Wert die genaue Angabe der Dauer der Einwirkung hat, mag man aus Versuch Tabelle VII ersehen (vgl. auch die Beobachtungen von Claude Bernard und C. Wehner, s. w. u.). Mit Rücksicht auf das Ergebnis dieses Versuches habe ich von dem jedesmaligen Nachweis der dauernden Gäruntüchtigkeit der benutzten Hefe absehen zu können geglaubt. Ich begnügte mich vielmehr damit, anzugeben, bei welcher Konzentration ceteris paribus Hemmung der Gärung, d. h. keine CO₂-Produktion beobachtet wurde. Für die gewonnenen Zahlen erhebe ich auch nicht den Anspruch, daß sie die absolut kleinsten Konzentrationen darstellen, doch dürfte der Fehler nur gering sein und kommt für eine vergleichende Untersuchung nicht in Frage.

Um eine größere Löslichkeit der zu untersuchenden Körper zu erzielen, wurde den Lösungen in manchen Fällen bis zu 4% Alkohol zugefügt, nachdem durch eine besondere Versuchsreihe (Tabelle III) festgestellt worden war, daß bei 10% Alkohol erst sich eine geringe Verzögerung der Gärung bemerkbar macht. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Angaben Oppen-

¹⁾ Dasselbst S. 303.

²⁾ Dasselbst S. 340.

³⁾ Duclaux, *Traité de la Microbiologie* 1900, Bd. III, S. 491.

heimers¹⁾ und Heiducks.²⁾ Der Vorsicht halber wurde überdies festgestellt (Tabelle II), daß die Resultate sich nach 4 proz. Alkoholzusatz nicht ändern. Die jeweiligen Komponenten der betreffenden Lösungen sind jedesmal am Kopf der Tabellen angegeben. In sämtlichen Versuchen waren 0,5 g Hefe zugegen, Zucker 1 g.

Es wurde gewöhnliche, im freien Handel zu habende Hefe benutzt. Die Narkotica wurden geliefert von C. A. F. Kahlbaum, Berlin. Von Dr. Alexander Wacker zur Verfügung gestelltes Dichloräthylen wurde durch Destillation vorher gereinigt. Die Gärung erfolgte im Brutschrank in den gewöhnlichen Einhornschen Kölbchen. Nur in Versuch Tabelle XX, der zur Illustration der Fälle dienen soll, in denen keine vollständige Hemmung, sondern nur Verzögerung der Gärgeschwindigkeit erreicht wurde, verlief die Gärung bei Zimmertemperatur im Buchnerschen Kölbchen. Der dabei durch Entweichen der CO₂ stattfindende Gewichtsverlust wurde durch Wägen festgestellt.

Tabelle I.

14. XII. 20.

I. Reihe der Versuche mit Chloroform CHCl₃. Lösung 5 : 1000 in Leitungswasser.

Nr.	Leitungswasser	CHCl ₃ -Lösung	Hefe g	Rohrzucker g	Resultat*)
1	40	—	0,5	—	—
2	40	—	0,5	1,0	+
3	25	15	0,5	1,0	+
4	20	20	0,5	1,0	—
5	15	25	0,5	1,0	—
6	10	30	0,5	1,0	—

Wirksame Konzentration, Mole im Liter bei 4 : 0,031.

Tabelle II.

17. I. 21.

II. Reihe der Versuche mit Chloroform CHCl₃ in Lösung 5 : 1000 (Aqua dest. + 40 Alcohol abs. + 7 g NaCl + 0,1 g CaCl₂).

Nr.	Leitungswasser	CHCl ₃ -Lösung	Hefe g	Rohrzucker g	Resultat*)
1	40	—	0,5	—	—
2	40	—	0,5	1,0	+
3	25	15	0,5	1,0	+
4	20	20	0,5	1,0	—
5	15	25	0,5	1,0	—
6	10	30	0,5	1,0	—

Mole im Liter bei 4 : 0,031 (vgl. I, Reihe 4).

*) + bedeutet Gärung, — Hemmung.

¹⁾ Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen. Spez. Teil, S. 430. Leipzig 1909.

²⁾ Zeitschr. f. Spiritusind. 5, 183. 1882.

Tabelle III.

10. I. 21.

Versuche mit Alkohol C_2H_5OH .

Nr.	Alkohol abs. ccm	Leitungswasser	Hefe g	Rohrzucker g	Resultat
1	0	ad 100	0,5	1,0	Lebhafte Gärung
2	1	" 100	0,5	1,0	Gärung
3	4	" 100	0,5	1,0	"
4	6	" 100	0,5	1,0	"
5	10	" 100	0,5	1,0	Geringe Hemmung
6	15	" 100	0,5	1,0	Hemmung
7	20	" 100	0,5	1,0	"

Tabelle IV.

16. XII. 20.

I. Reihe der Versuche mit Dichlormethan CH_2Cl_2 in Lösung 10 : 1000 (Leitungswasser).

Nr.	Leitungswasser	CH_2Cl_2 -Lösung	Hefe g	Rohrzucker g	Resultat*)
1	40	—	0,5	—	—
2	40	—	0,5	1,0	+
3	25	15	0,5	1,0	+
4	20	20	0,5	1,0	+
5	15	25	0,5	1,0	+
6	10	30	0,5	1,0	+

Tabelle V.

17. XII. 20.

II. Reihe der Versuche mit Dichlormethan CH_2Cl_2 in Lösung 10 ; 1000 (Aqua dest. + 7 g NaCl + 0,1 g $CaCl_2$).

Nr.	Leitungswasser	CH_2Cl_2 -Lösung	Hefe g	Rohrzucker g	Resultat*)
1	40	—	0,5	—	—
2	40	—	0,5	1,0	+
3	—	40	0,5	1,0	+

Tabelle VI.

25. I. 21.

III. Reihe der Versuche mit Dichlormethan CH_2Cl_2 in Lösung 15 : 1000 (Aqua dest. + 40 Alkohol abs. + 7 g NaCl + 0,1 g $CaCl_2$).

Nr.	Leitungswasser	CH_2Cl_2 -Lösung	Hefe g	Rohrzucker g	Resultat*)
1	40	—	0,5	—	—
2	40	—	0,5	1,0	+
3	—	40	0,5	1,0	—

Wirksame Konzentration, Mole im Liter bei 3 : 0,28846.

*) + bedeutet Gärung, — Hemmung.

Tabelle VII.

25. I. 21.

Versuche mit Hefe nach Einwirkung von Dichlormethan, folgender Waschung, Zentrifugierung und neuer Beschickung mit Rohrzuckerlösung.

1. Nach 20 stündiger Einwirkung: Keine Gärung	} in 20 Stunden.
2. „ 5 „ „ „ „	
3. „ 2 „ „ Gärung	

Tabelle VIII.

17. XII. 20.

I. Reihe der Versuche mit Tetrachlormethan CCl_4 in Lösung 0,5 : 1000 (Aqua dest. + 7 g NaCl + 0,1 g CaCl_2).

Nr.	Leitungswasser	CCl_4 -Lösung	Hefe g	Rohrzucker g	Resultat*)
1	40	—	0,5	—	—
2	40	—	0,5	1,0	+
3	20	20	0,5	1,0	+
4	15	25	0,5	1,0	+
5	10	30	0,5	1,0	+

Tabelle IX.

18. XII. 20.

II. Reihe der Versuche mit Tetrachlormethan CCl_4 in Lösung 0,5 : 1000 (Aqua dest. + 7 g NaCl + 0,1 g CaCl_2).

Nr.	Leitungswasser	CCl_4 -Lösung	Hefe g	Rohrzucker g	Resultat*)
1	40	—	0,5	—	—
2	40	—	0,5	1,0	+
3	—	40	0,5	1,0	+

Höchste angewandte Konzentration: Mole im Liter bei 3: 0,0051.

Tabelle X.

11. I. 21.

Versuche mit Äthylendichlorid CH_2Cl in Lösung 6,8 : 1000 CH_2Cl
(Aqua dest. + 10 Alkohol abs. + 7 g NaCl + 0,1 g CaCl_2).

Nr.	Leitungswasser	CH_2Cl -Lösung CH_2Cl	Hefe g	Rohrzucker g	Resultat*)
1	40	—	0,5	—	—
2	40	—	0,5	1,0	+
3	20	20	0,5	1,0	+
4	15	25	0,5	1,0	+
5	10	30	0,5	1,0	—

Wirksame Konzentration, Mole im Liter bei 5 : 0,065.

*) + bedeutet Gärung, — Hemmung.

Tabelle XI.

25. I. 21.

I. Reihe der Versuche mit Äthylidenchlorid $\begin{array}{l} \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CHCl}_2 \end{array}$ in Lösung
3,5 : 1000 (Aqua dest. + 20 Alkohol abs. + 7 g NaCl + 0,1 g CaCl_2).

Nr.	Leitungswasser	$\begin{array}{l} \text{CH}_2 \\ \\ \text{CHCl}_2 \end{array}$ -Lösung	Hefe g	Rohrzucker g	Resultat*)
1	40	—	0,5	—	—
2	40	—	0,5	1,0	+
3	—	40	0,5	1,0	+

Tabelle XII.

25. I. 21.

II. Reihe der Versuche mit Äthylidenchlorid $\begin{array}{l} \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CHCl}_2 \end{array}$ in Lösung
4,0 : 1000 (Aqua dest. + 20 Alkohol abs. + 7 g NaCl + 0,1 g CaCl_2).

Nr.	Leitungswasser	$\begin{array}{l} \text{CH}_2 \\ \\ \text{CHCl}_2 \end{array}$ -Lösung	Hefe g	Rohrzucker g	Resultat*)
1	—	40	0,5	1,0	+

Tabelle XIII.

III. Reihe der Versuche mit Äthylidenchlorid $\begin{array}{l} \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CHCl}_2 \end{array}$ in Lösung
5,0 : 1000 (Aqua dest. + 20 Alkohol abs. + 7 g NaCl + 0,1 g CaCl_2).

Nr.	Leitungswasser	$\begin{array}{l} \text{CH}_2 \\ \\ \text{CHCl}_2 \end{array}$ -Lösung	Hefe g	Rohrzucker g	Resultat*)
1	—	40	0,5	1,0	—

Wirksame Konzentration, Mole im Liter bei XIII: 0,0584.

Tabelle XIV.

12. I. 21.

Versuche mit Tetrachloräthan $\begin{array}{l} \text{CHCl}_2 \\ | \\ \text{CHCl}_2 \end{array}$ in Lösung 1,25 : 1000
(Aqua dest. + 7 g NaCl + 0,1 g CaCl_2).

Nr.	Leitungswasser	$\begin{array}{l} \text{CHCl}_2 \\ \\ \text{CHCl}_2 \end{array}$ -Lösung	Hefe g	Rohrzucker g	Resultat*)
1	40	—	0,5	—	—
2	40	—	0,5	1,0	+
3	20	20	0,5	1,0	+
4	15	25	0,5	1,0	—
5	10	30	0,5	1,0	—

Wirksame Konzentration, Mole im Liter bei 4: 0,007.

*) + bedeutet Gärung, — Hemmung.

Tabelle XV.

14. I. 21.

Versuche mit Pentachloräthan C_2HCl_5 in Lösung 0,1 : 1000
(Aqua dest. + 40 Alkohol abs. + 7 g NaCl + 0,1 g $CaCl_2$).

Nr.	Leitungswasser	C_2HCl_5 -Lösung	Hefe g	Rohrzucker g	Resultat*)
1	40	—	0,5	—	—
2	40	—	0,5	1,0	+
3	—	40	0,5	1,0	+

Höchste angewandte Konzentration, Mole im Liter bei 3: **0,00088**.

Tabelle XVI.

Versuche mit Hexachloräthan CCl_3 in Lösung 0,01 : 1000
(Aqua dest. + 40 Alkohol abs. + 7 g NaCl + 0,1 g $CaCl_2$).

Nr.	Leitungswasser	CCl_3 -Lösung	Hefe g	Rohrzucker g	Resultat*)
1	40	—	0,5	—	—
2	40	—	0,5	1,0	+
3	—	40	0,5	1,0	+

Höchste angewandte Konzentration, Mole im Liter bei 3: **0,00009**.

Tabelle XVII.

18. I. 21.

Versuche mit Dichloräthylen $CHCl$ in Lösung 1,0 : 1000 (Aqua dest. + 7 g NaCl + 0,1 g $CaCl_2$).

Nr.	Leitungswasser	$CHCl$ -Lösung	Hefe g	Rohrzucker g	Resultat*)
1	40	—	0,5	—	—
2	40	—	0,5	1,0	+
3	—	40	0,5	1,0	+

Stärkste angewandte Konzentration, Mole im Liter bei 3: **0,018**.

Tabelle XVIII.

18. I. 21.

Versuche mit Trichloräthylen $CHCl$ in Lösung 0,8 : 1000 (Aqua dest. + 20 Alkohol abs. + 7 g NaCl + 0,1 g $CaCl_2$).

Nr.	Leitungswasser	$CHCl$ -Lösung	Hefe g	Rohrzucker g	Resultat*)
1	40	—	0,5	—	—
2	40	—	0,5	1,0	+
3	—	40	0,5	1,0	+

Stärkste angewandte Konzentration, Mole im Liter bei 3: **0,009**.

*) + bedeutet Gärung, — Hemmung.

Tabelle XIX.

19. I. 21.

Versuche mit Tetrachloräthylen $\begin{matrix} \text{CCl}_2 \\ \parallel \\ \text{CCl}_2 \end{matrix}$ in Lösung 0,05 : 1000
(Aqua dest. + 20 Alkohol abs. + 7 g NaCl + 0,1 g CaCl_2).

Nr.	Leitungswasser	$\begin{matrix} \text{CCl}_2 \\ \parallel \\ \text{CCl}_2 \end{matrix}$ -Lösung	Hefe g	Rohrsucker g	Resultat*)
1	40	—	0,5	—	—
2	40	—	0,5	1,0	+
3	—	40	0,5	1,0	+

Stärkste angewandte Konzentration, Mole im Liter bei 3 : 0,0005.

*) + bedeutet Gärung, — Hemmung.

Tabelle XX.

28. I.—4. II. 21.

Entwickelte CO_2 -Mengen bei 2 Gärversuchen.

A: ohne Chloroformzusatz, B: mit Zusatz von 50 Volum-% einer gesättigten Chloroformlösung.

Nach Stunden	Gefeierte CO_2 -Mengen in mg bei		Nach Stunden	Gefeierte CO_2 -Mengen in mg bei		Nach Stunden	Gefeierte CO_2 -Mengen in mg bei	
	A	B		A	B		A	B
3	14	9	47	489	160	121	845	505
6	52	18	50	524	180	145	859	620
9	86	27	53	551	190	169	866	731
23	229	57	56	572	198	192	871	841
26	274	71	71	649	241	195	871	857
29	311	84	73	671	256	216	872	893
32	346	104	97	772	343	240	872	917

Graphische Darstellung dieser Zahlen s. S. 142.

Vor Eingehen auf die Resultate vorstehender Versuche sei ein kurzer geschichtlicher Rückblick gestattet:

Von den Körpern, die den Gegenstand dieser Untersuchung bilden, ist das Chloroform der einzige, der in bezug auf seine Wirkung auf die alkoholische Gärung schon geprüft ist. Die Hemmung resp. völlige Aufhebung der Gärbarkeit nach Chloroformzusatz war schon Liebig¹⁾ bekannt. Die bei seinen Versuchen angewandte Methode sei hier, des Interesses wegen, kurz angedeutet:

Bestimmte Mengen Zucker, Hefe und Wasser und wechselnde Mengen Chloroform brachte er zusammen und untersuchte die verschiedenen Mischungen nach verschiedenen Zeiten der Gärung. Die dann noch unvergorenen Zuckermengen bestimmte er durch Titration mit Fehlingscher Lösung und gelangte so zu einer Beurteilung des jeweiligen Gärungsverlaufes im Sinne einer mehr oder weniger starken Hemmung.

¹⁾ Liebig, Sitzungsber. d. Bayr. Akad. d. Wiss. 2, 407. 1869.

Das Wiederaufleben der Hefe nach Wiederaufhebung der zu kurzen Chloroformeinwirkung (vgl. auch Tabelle III) war schon von Claude Bernard¹⁾ beobachtet und beschrieben worden. Desgleichen von C. Wehmer²⁾, ebenfalls bei Versuchen mit Chloroform.

Salkowski³⁾ sagt gelegentlich einer Untersuchung über die desinfizierende Kraft des Chloroforms:

„Es gären Rohr- und Traubenzuckerlösungen mit Hefe und etwas Chloroform durchgeschüttelt nicht. Dagegen ist schon am nächsten Tage der Rohrzucker in Invertzucker übergegangen. Der Grund der Invertierung liegt darin, daß das invertierende Ferment der Hefe, als lösliches Ferment, vom Chloroform nicht angegriffen wird.“

Dieses verschiedene Verhalten der Zymase und der Invertase ist natürlich für die kritische Bewertung meiner vorgenommenen Giftigkeitszahlen von größter Bedeutung, und ich darf deshalb hier mit einem Satz aus dem bereits einmal zitierten Buch von Euler und Lindner⁴⁾ die hier in Betracht kommenden modernen Anschauungen über die Gärung streifen:

„Die Zymase ist in der lebenden Hefe als chemischer Komplex ganz oder teilweise an das Protoplasma gebunden. Wird die vitale Tätigkeit der Zelle dauernd oder zeitweilig aufgehoben, so wird auch die gärungs-erregende Gruppe des Protoplasmas, also die an das Protoplasma gebundene Zymase inaktiviert; wirksam bleibt nur derjenige Teil des Gärungsenzymes, welcher frei ist oder bei der Entwässerung der Hefe im Vakuum oder durch Alkohol freigemacht wird.“

Und dieser freie Teil ist so gering, wie wir auch durch Rubner⁵⁾ bestätigt finden, daß seine Wirkung hier vernachlässigt werden kann. Überdies zeigt ein Blick auf die Ergebnisse Duchaceks⁶⁾ bei Versuchen mit Chloroform und Hefepreßsaft, daß die von mir ermittelte wirksame Konzentration Chloroform bei weitem nicht zu einer chemischen Wirkung auf die Zymase ausreicht, mit anderen Worten, daß es sich bei den von mir erzielten Gärungshemmungen in der Tat um vitale Reaktionen handelt. Für die anderen Körper wären Versuche mit Hefepreßsaft natürlich zur Bestätigung noch anzustellen.

Das Fazit der in Tabelle I—XIX wiedergegebenen Versuche ist in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Konzentration, Mole im Liter, die nötig ist, um die Gärkraft von 0,5 g Hefe zu hemmen bei:

¹⁾ Claude Bernard, *Leçons sur les phénomènes de la vie*, 1, 276. Paris 1878.

²⁾ C. Wehmer, *Chem.-Ztg.* 1, 164. 1899.

³⁾ Salkowski, *Dtsch. med. Wochenschr.* 1888, S. 1941.

⁴⁾ Euler und Ugglass, *70*, 279. 1911. Zitiert nach Euler und Lindner, *Chemie der Hefe usw.* S. 313. Leipzig 1915.

⁵⁾ Rubner, *Arch. f. Physiol. Suppl.* S. 59. Leipzig 1913.

⁶⁾ Duchaceck, *diese Zeitschr.* 18, 266.

Dichlormethan	0,23346
Chloroform	0,031
Tetrachlormethan	?
Äthylendichlorid	0,065
Äthylidenchlorid	0,0584
Tetrachloräthan	0,007
Pentachloräthan	?
Hexachloräthan	?
Dichloräthylen	?
Trichloräthylen	?
Tetrachloräthylen	?

Bezeichnet man die Wirksamkeit des Chloroforms gegenüber Hefe mit 1, so beträgt die spezifische Wirksamkeit gegenüber Hefe, d. h. die Zahl, welche angibt, um wieviel wirksamer der betreffende Stoff ist, als Chloroform bei:

Äthylidenchlorid	$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CHCl}_2 \end{array}$	0,0584
Äthylendichlorid	$\begin{array}{l} \text{CH}_2\text{Cl} \\ \\ \text{CH}_2\text{Cl} \end{array}$	0,476
Dichlormethan	CH_2Cl	0,133
Chloroform	CHCl_3	1,000
Tetrachloräthan	$\begin{array}{l} \text{CHCl}_2 \\ \\ \text{CHCl}_2 \end{array}$	4,428

Die nachfolgende Übersicht, in der die Körper, deren Wirksamkeit ermittelt wurde, ihrer steigenden Wirksamkeit (in der zur Tötung von 0,5 g Hefe nötigen Konzentration ausgedrückt nach angeordnet sind, zeigt die Beziehungen zu Chlorgehalt, Mol.-Gew., Wasserlöslichkeit, Siedepunkt und spezifischem Gewicht.

(Die aus der Reihe fallenden Zahlen sind eingeklammert.)

Tabelle XXI.

	Zahl der Cl-Atome	Cl-Gehalt in Gewichts-Prozent.	Molekular-Gewicht	Spezi-fisches Gewicht	Siede-punkt in ° C	Wasser-löslichkeit in g pro Liter
Äthylidenchlorid . . .	2	71,66	98,95	1,1750	(59)	4,11
Äthylendichlorid . . .	2	71,66	98,95	1,2521	(83,5)	8,51
Dichlormethan	2	84,50	(84,94)	1,3222	40	13,22
Chloroform	3	89,10	119,39	1,4890	60	7,445
Tetrachloräthan . . .	4	(84,5)	167,90	1,6002	147	2,0

Man sieht, daß die so ermittelte Wirksamkeit wächst: 1. mit der Zahl der Chloratome, 2. mit dem Chlorgehalt (Ausnahme Tetrachloräthan), 3. mit dem Mol.-Gew. (Ausnahme Dichlor-

methan), 4. mit dem Siedepunkt (Ausnahme die beiden Isomeren), 5. mit dem spezifischen Gewicht. Das Tetrachloräthan gilt auch in anderen Zusammenstellungen¹⁾ für wirksamer als Chloroform und fällt also auch dort hinsichtlich des Chlorgehalts aus der Reihe.

Zu Wasserlöslichkeit sind keine Beziehungen erkennbar.

Leider hat die hier angewandte Methode nicht für alle Körper eine Zahl ergeben. Das hat seinen Grund in der geringen Wasserlöslichkeit der fehlenden Körper, die es nicht gestattet, die Konzentration über einen gewissen Grad zu treiben, auch nicht bei Zusatz erlaubter Mengen Alkohol. Wenn es aber richtig ist, was Bokorny²⁾ auch für die Katalytischen³⁾ oder Kontaktgifte annehmen möchte, daß nämlich lediglich das Verhältnis Giftmenge: Protoplasmamasse für die Giftwirkung maßgebend ist, so müßte man in diesen Fällen durch Heruntergehen mit der Hefemasse zum Ziele kommen können. Um wenigstens in etwas zur Klärung dieser Frage beizutragen, habe ich mit CHCl_3 in der für 0,5 g Hefe tödlichen Konzentration (vgl. Tab. I und II) und größeren und kleineren Hefemengen folgende Versuche ausgeführt:

Tabelle XXII.

Nr.	Hefe g	Gesättigte Chloroformlösung	Leitungs- Wasser	Zucker g	Resultat*)
1	0,3	20	20	1,0	—
2	0,5	20	20	1,0	—
3	0,7	20	20	1,0	+
4	1,0	20	20	1,0	+
5	1,0	—	40	1,0	+

*) + bedeutet Gärung, — Hemmung.

Man sieht, daß, während bei Anwesenheit von nur 0,5 g Hefe keine Gärung aufgetreten ist, bereits 0,7 g durch dasselbe Quantum derselben Lösung nicht mehr gehemmt werden. Das scheint in der Tat dafür zu sprechen, daß nicht die Konzentration der Lösung, sondern lediglich das Verhältnis der dargebotenen Giftmenge zu

¹⁾ Heffter und Joachimoglu, Vierteljahrsschr. f. gerichtl. Med. u. öffentl. Sanitätswesen 48, 2. Suppl. S. 161. 1914. -- Fraenkel, Arzneimittelsynthese. 4. Aufl. S. 445. Berlin 1919. — Lehmann, Arch. f. Hyg. 74, 47. 1911. — Ploetz, diese Zeitschr. 103, 270. 1920.

²⁾ Bokorny, Arch. f. d. ges. Physiol. 156. Bonn 1914.

³⁾ Loew, Natürliches System der Giftwirkungen. München 1893, S. 23.

Protoplasammasse ausschlaggebend für den Grad der Giftwirkung auf Hefezellen auch sogenannter katalytischer Gifte ist, sei es, daß die für eine bestimmte Hefemenge gerade tödliche, in gelöster Form an die Zelle herangebrachte Dosis quantitativ oder nur zu einem bestimmten Prozentsatz (für den möglicherweise auch hier der Teilungskoeffizient Lipoidlöslichkeit : Wasserlöslichkeit bestimmend ist) von den Zellen locker gebunden wird. Das letztere wird durch folgende Beobachtungen wahrscheinlich gemacht:

Ich durfte annehmen, daß die im vorigen Versuche Nr. 4 anwesende Hefe im Gewicht von 1,0 g alles Chloroform gebunden haben mußte. Zur Probe habe ich in diesem Falle die Hefe durch Berkefeld-Filter abfiltriert, wobei durch passenden Abschluß Sorge getragen wurde, daß kein Chloroform abdunsten konnte. Das Filtrat roch nicht nach Chloroform, zeigte aber ganz schwach positive Isonitrilreaktion.

Da es mir an Zeit mangelte, im Sinne dieses gewonnenen Standpunktes noch einmal sämtliche Körper mit einer bedeutend kleineren Hefemenge durchzuprobieren, so mußte ich mich darauf beschränken, an einem Beispiel die Möglichkeit zu zeigen, daß Hemmung durch Heruntergehen mit der Hefemenge erreicht werden kann. Ich wählte dafür Dichloräthylen. 40 ccm einer gesättigten Lösung dieses Körpers vermochten, wie man aus Tabelle VII ersehen möge, die Gärkraft von 0,5 g Hefe nicht zu unterdrücken. Ich habe nun dieselbe Menge derselben Lösung auf 0,4; 0,25; 0,15 und 0,05 g Hefe einwirken lassen. Nach 4stündiger Gärung im Brutschrank bereits konnte festgestellt werden:

bei 0,4 g	Gärung
„ 0,25 „	„
„ 0,15 „	„
„ 0,05 „	keine Gärung.

Auch nach 20 Stunden zeigte sich in dem Röhrchen mit 0,5 g keine Gärung. Was zu beweisen war. Dementsprechend würde man auch wohl besser die Giftigkeitsskala nach der Dosis letalis für beispielsweise 0,5 g Hefe bestimmen. Dies ist in folgender Übersicht geschehen. Zugleich sind wieder Zahl der Chloratome, Mol.-Gew., Chlorgehalt und spezifisches Gewicht zur Feststellung ev. vorhandener Beziehungen daneben angeführt. (Die aus der Reihe fallenden Zahlen sind eingeklammert.)

Tabelle XXIII.

	Dosis letalis für 0,5 g Hefe g	Zahl der Cl- Atome	Cl- Prozente	Molekular- Gewicht	Spezifisches Gewicht
Dichlormethan	0,7932	2	85,5	84,94	1,3223
Tetrachloräthan	0,5000	(4)	84,5	(167,9)	(1,6002)
Äthylendichlorid	0,2554	2	(71,66)	98,95	1,2521
Äthylidenchlorid	0,2350	2	(71,66)	98,95	1,1750
Chloroform	0,1489	3	89,1	119,39	(1,4890)

Die Reihenfolge der so gemessenen steigenden Wirksamkeit ist, wie man sieht, eine ganz andere als die an der wirksamen Konzentration gemessene. Dichlormethan erscheint überall an der richtigen Stelle. Das Tetrachloräthan erscheint hier an der ihm auf Grund seines Chlorgehaltes zukommenden Stelle. (Die Chloratomzahl würde eine andere Stelle verlangen.) Dagegen sind es jetzt die Isomeren Äthylendichlorid und Äthylidenchlorid die mit ihrem geringen Chlorgehalt eine Ausnahmestellung einnehmen. In der Tabelle für Mol.-Gew. ist es wieder das Tetrachlormethan, das sich nicht in die Reihe einpaßt. Demnach scheint soviel sicher zu sein, daß die Abhängigkeit der Wirkung von physikalischen Eigenschaften sich nicht durch eine einfache Regel ohne Ausnahme ausdrücken läßt. Das kann auch nicht wunder nehmen, wenn man beachtet, daß 2 Stoffe, die sich hinsichtlich einer Eigenschaft, z. B. des Chlorgehaltes, sehr nahe stehen, in anderer Beziehung die größten Unterschiede darbieten:

Tabelle XXIV.

	Cl- Pro- zente	Molekular- Gewicht	Wasser- löslichkeit in g pro Liter	Siedepunkt C
z. B. Dichlormethan	84,5	89,94	13,22!	40—41!
und Tetrachloräthan	84,5	167,9	2,0!	147'
oder auch				
Chloroform	89,1	119,39	7,445!	60!
und				Schmelzpunkt
Hexachloräthan	89,86	226,76	0,01!	185!

Vielmehr gilt es, nicht allein die Gesamtheit der physikalischen und chemischen Eigenschaften des betreffenden Körpers mit einem Blick zu übersehen, sondern dazu dem spezifischen Chemismus der Hefezelle Rechnung zu tragen. Dieser selbst ist zwar ziemlich genau bekannt, doch über seine funktionelle und Lebenswichtigkeit für die Zelle weiß man recht wenig, so daß es nicht

der Zweck dieser Arbeit sein kann, bei diesen Problemen zu verweilen. Deshalb auch sehe ich davon ab, auf die Meyer-Overtonsche Theorie in diesem Zusammenhang Bezug zu nehmen. Denn die Lipoide spielen vielleicht für das Eindringen des Narkoticums in die Hefezelle dieselbe Rolle, wie bei Nervenzellen und roten Blutkörperchen, ob aber der beobachtete Gifteffekt, die Gärhemmung, unmittelbare Folge ihrer Durchtränkung mit Narkoticum ist, dürfte fraglich sein.

Auf einen anderen Weg, um zu sämtlichen Giftigkeitszahlen zu gelangen, mache ich durch die in Abb. 1 wiedergegebene Kurve aufmerksam. Sie veranschaulicht die in Tabelle XX angegebenen Zahlen.

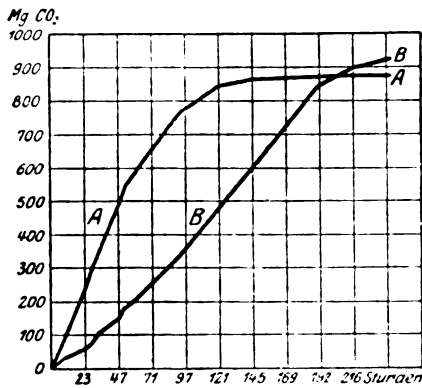


Abb. 1.

Zur Erläuterung diene folgendes:

Linie A gibt das Bild eines durch 10 Tage hindurch beobachteten gewöhnlichen Gärverlaufs wieder, Linie B das eines mit 50 Volumprozent einer gesättigten Chloroformlösung versetzten. Man sieht an Linie B, daß die Gärkraft nicht im min-

desten geschädigt ist, daß vielmehr der Unterschied gegen A in dem beträchtlich verlangsamten Tempo der CO₂-Produktion liegt. Z. B. werden 85 mg CO₂ bei A in 9 Stunden, bei B dagegen erst in 29 Stunden geliefert. Anders ausgedrückt, die Gärgeschwindigkeit ist durch den Chloroformzusatz um rund das Dreifache herabgesetzt. In derselben Weise ließe sich die Herabsetzung der Gärgeschwindigkeit auch bei den anderen Körpern feststellen.

Ein Vergleich meiner, durch Beobachtung der Einwirkung auf Hefezellen gewonnenen Giftigkeitsskala, mit einer auf anderem Wege gewonnenen (z. B. durch Beobachtungen an Kaulquappen, Fischen usw.) ist natürlich nicht ohne weiteres statthaft. Denn der Effekt der Giftwirkung der zu untersuchenden Stoffe gegenüber Hefe ist von dem Effekt in anderen Fällen möglicherweise wesensverschieden. Beim Menschen zum Beispiel ist es die elektive Einwirkung dieser Stoffe auf Nervenelemente, die eine successive

Ausschaltung der Hirnzentren bewirkt und so jenen Ablauf von Symptomen bis zum Tode durch Atemlähmung bedingt, den wir im Verlauf einer Narkose sehen können. Sicher ist, daß der Tod, d. h. der Zustand des vollendeten Abgestorbenseins sämtlicher Körperzellen nur die mittelbare Folge der Gifteinwirkung ist, während die Hemmung, das vollständige Stocken der Lebensfunktionen und der schließliche Tod der Hefezellen, vielleicht das Resultat einer unmittelbaren Einwirkung auf das Endoplasma, vielleicht aber auch erst das Schlußglied einer Kette noch komplizierterer Vorgänge darstellt.

Zusammenfassung.

1. Äthylidenchlorid $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CHCl}_2 \end{array}$, Äthylendichlorid $\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{Cl} \\ | \\ \text{CH}_2\text{Cl} \end{array}$ Dichlor-
methan CN_2Cl_2 , Chloroform CHCl_3 und Tetrachloräthan $\begin{array}{c} | \\ \text{CHCl}_2 \end{array}$

sind für Hefezellen giftig. Ihre Wirkung ist je nach der dargebotenen Giftmenge und Dauer der Einwirkung eine die Gärungsgeschwindigkeit verlangsamende, reversible, bis eine die Gärkraft völlig und dauernd aufhebende, d. h. für die Hefezelle tödliche.

2. Maßgebend für den Grad ihrer Wirksamkeit auf Hefezellen ist nicht die Konzentration der Lösung, sondern die einer bestimmten Hefemenge angebotene Giftmenge.

Die elektrische Ladung des Hämoglobins.

Von

L. Michaelis und Y. Airila.

(Eingegangen am 16. März 1921.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Frühere in unserem Laboratorium angestellte Versuche¹⁾ hatten ergeben, daß elektrische Kataphoreseversuche sich besonders leicht mit Hämoglobinlösungen ausführen lassen, weil die Beobachtung der Wanderung infolge der Eigenfarbe direkt möglich ist. Wie damals gezeigt wurde, hängt der Sinn der Ladung von der Konzentration der Wasserstoffionen ab. Der isoelektrische Punkt ließ sich mit ziemlich guter Schärfe bestimmen; er entspricht $p_h = 6,8$, unabhängig von der Natur und der Konzentration der angewandten Puffermischung, als welche Phosphate und Kakodylate verwendet wurden, ferner unabhängig davon, ob das Hämoglobin in reiner Form oder vermischt mit Serumweißkörpern verwendet wurde. Ist in der Lösung $p_h = 6,8$, so wandert das Hämoglobin im elektrischen Felde gar nicht, ist p_h nur wenig kleiner als 6,8, z. B. 6,6, so beobachtet man eine schwache, aber deutliche Bewegung zur Kathode; wird p_h noch kleiner, so wird die Kataphoresesgeschwindigkeit des Hämoglobins immer größer. Bei $p_h > 6,8$ beobachtet man ganz die entsprechenden Erscheinungen mit umgekehrter Wanderungsrichtung. Das Hämoglobin zeigt also in bezug auf seine Ladung und ihre Abhängigkeit von p_h genau dasjenige Verhalten, welches eine echt gelöste Aminosäure zeigen würde, deren isoelektrischer Punkt bei $p_h = 6,8$ liegt. Bezeichnen wir unter Benutzung der kürzlich vorgeschlagenen Definitionen²⁾ als den Ladungsgrad eines Ampholyten das Zahlenverhältnis der geladenen Moleküle zu den gesamten Molekülen, wobei wir positiv

¹⁾ L. Michaelis und D. Takahashi, diese Zeitschr. 29, 439. 1910; L. Michaelis und H. Davidsohn, diese Zeitschr. 41, 102. 1912.

²⁾ L. Michaelis, diese Zeitschr. 103, 225. 1920.

geladene Moleküle positiv und negativ geladene negativ zählen, so ist dieser Ladungsgrad im isoelektrischen Punkt gleich 0 und steigt bei Änderungen von p_h beiderseits bis zu einem Grenzwert an, der unter der Voraussetzung, daß es sich um einen beiderseits (d. h. sowohl als Säure wie als Base) einwertigen Ampholyten handelt, bei steigender Ansäuerung sich dem Grenzwert + 1, bei steigender Alkalisierung dem Grenzwert - 1 nähert. Die Annahme eines beiderseitig einwertigen Ampholyten dürfte nun allerdings für das Hämoglobin kaum zutreffen. Trotzdem aber müßte wenigstens die Erscheinung bestehen bleiben, daß die Wanderungsgeschwindigkeit, welche im isoelektrischen Punkt = 0 ist, mit der Änderung von p_h eindeutig und stetig wächst. Daß dies der Fall ist, hatten wir auf Grund unserer früheren Versuche keinen Grund zu bezweifeln. Das soeben Gesagte können wir kurz in folgendem Leitsatz zusammenfassen: Hämoglobin hat bei $p_h = 6,8$ gar keine Ladung; bei abnehmendem p_h erhält es eine ständig zunehmende positive Ladung, bei zunehmendem p_h eine stetig zunehmende negative Ladung.

Diese Annahme, an der uns ein Zweifel nicht möglich schien, wird nun von H. Straub und C. Meier¹⁾ bestritten. Sie kommen durch eine indirekte Methode, nämlich durch eine gasanalytische Methode zu dem Resultat, daß die Änderung der Ladung des Hämoglobins bei Änderung von p_h nicht stetig, sondern sprunghaft erfolgt, in der Weise, daß innerhalb eines ganz bestimmten Intervalles von p_h die Ladung des Hämoglobins = 0 sei und außerhalb dieses Intervalls stets maximale Ladung bestehe. Sie kommen etwa zu folgender Auffassung über die Natur des Hämoglobins: Bei $p_h < 7,0$ verhält sich Hämoglobin wie eine starke, vollkommen dissoziierte Säure, bei $p_h > 7,0$ verliert es plötzlich überhaupt jede Eigenschaft als Säure. Wir hatten schon darauf hingewiesen, daß die Beweisführung von Straub und Meier nicht bindend ist. Die Eigenschaften, die die Autoren dem Hämoglobin zuschreiben, sind so absonderlich und unvereinbar mit allem, was wir bisher wissen, daß man eine andere, direktere Beweisführung verlangen muß, als die sehr indirekte auf vielerlei Annahmen und Schlußfolgerungen beruhende von Straub und Meier. Wäre diese Anschauung richtig, so müßte man sie auch

¹⁾ Straub u. Meyer, diese Zeitschr. **90**, 365. 1918 und **109**, 47. 1920.

mit der direktesten Methode, der elektrischen Kataphorese, beweisen können. Die Wanderungsgeschwindigkeit des Hämoglobins müßte bei jedem beliebigen p_h , sofern es $> 7,0$ ist, die gleiche sein; und sie müßte von $p_h = 7$ an über ein ganz bestimmtes p_h -Bereich hin gleich 0 sein, nämlich zwischen $p_h = 7,0$ und $6,39$. Bei $p_h = 6,39$ müßte dann das Hämoglobin plötzlich wieder maximale Wanderungsgeschwindigkeit, aber im entgegengesetzten Sinne erhalten.

Da nun unsere in früheren Jahren angestellten kataphoretischen Versuche nur zur Feststellung des isoelektrischen Punktes geschahen und eine quantitativ vergleichbare Protokollierung über die Wanderungsgeschwindigkeit außerhalb des isoelektrischen Punktes nicht gemacht wurde, so hielten wir es für angebracht, die Versuche nach dieser Richtung zu ergänzen. Hierbei mußte sich ja ergeben, ob die Anschauungen von Straub und Meier richtig sind oder nicht. Eine Übersicht über die Versuche ergibt das Diagramm 1. Auf der Abszisse ist p_h , auf der Ordinate die Wanderungsgeschwindigkeit des Hämoglobins dargestellt.

Wären die Anschauungen von Straub und Meier richtig, so müßte in dem schraffiert gezeichneten p_h -Bereich zwischen $7,0$ und $6,39$ die Geschwindigkeit, überall = 0 sein, und außerhalb dieses schraffierten Bereichs müßte sie überall einen ganz bestimmten, stets gleichen Wert haben, den wir in dem Diagramm in willkürlicher Weise durch die Linien AB und EF aufzeichnen. Willkürlich ist hierbei nur die Länge der Linien BC und DE , der stufenartige Charakter der ganzen Figur $ABCDEF$ müßte im Sinne der Straubschen Theorie auf alle Fälle bestehen bleiben.

Die wirklichen Versuchsergebnisse stimmen mit dieser Theorie nicht einmal in größter Annäherung überein. Die Wanderungsgeschwindigkeit ändert sich vielmehr in durchaus stetiger allmählicher Weise zu beiden Seiten des isoelektrischen Punktes. Hiermit erachten wir die Anschauungen von Straub und Meier über die sprungweise Umladung des Hämoglobins als widerlegt.

Wenn wir versuchen wollen, die Form der von uns erhaltenen Kurve näher auszudeuten, so können wir folgendes sagen: Wollten wir das Hämoglobin als einen beiderseits einwertigen Ampholyten auffassen, so müßte die von uns gezeichnete Kurve formal ziemlich genau dieselbe sein wie die Dissoziationsrestkurve eines Ampholyten. Zu beiden Seiten des isoelektrischen Punktes erfüllt unsere Kurve diese Bedingungen zunächst recht gut;

links bis zu dem Punkt 23, rechts bis zum Punkt 27. Von hier müßten die Kurven theoretisch nach *G* bzw. *H* weitergehen. Daß dies in Wirklichkeit nicht der Fall ist, erklärt sich ungezwungen aus der Annahme, daß das Hämoglobin in stufenweiser Dissoziation mehrwertige Ionen bildet. Man bemerkt in der Kurve unterhalb des Punktes 23 und etwa bei 28 eine leichte Deformierung. Die Fehlergrenzen der Methode gestatten nicht mit völliger Sicherheit zu entscheiden, ob diese Abbiegungen realen Verhältnissen entsprechen. Auffällig ist es aber immerhin, daß sie gerade an den theoretisch zu erwartenden Stellen liegen. Unter diesen Umständen könnten wir aus unseren Versuchen die beiden (erststufigen) Dissoziationskonstanten des Oxyhämoglobins abschätzen. Es wäre k_1 etwa $= 10^{-7.8}$, und $k_2 = \frac{k_w}{10^{-4.5}} = 10^{-3.3}$. Diese Zahlen sind aus den genannten Gründen zunächst noch mit Vorsicht anzuwenden, sie bedürften noch weiterer Untersuchungen und können nicht in demselben Grade als gesichert betrachtet werden wie der isoelektrische Punkt.

Die Technik der Kataphoreseversuche war die gleiche wie in den anderen aus unserem Laboratorium hervorgegangenen Arbeiten. Als Pufferlösungen wurden folgende Mischungen angewendet:

Versuche Nr.:

Borat-Natronlauge 33, 32, 26, 31, 29;
 Borat-Salzsäure 28, 27, 30;
 Phosphat 16, 15, 14, 7, 6, 8, 9, 10, 18, 4, 13, 12, 17;
 Natriumacetat-Essigsäure . 23, 21, 22, 20.

Die Konzentration der Pufferlösungen war in allen Versuchen derart, daß der Gehalt an Puffersalzen $\frac{1}{30}$ bis $\frac{1}{45}$ molar war. Die Mittelflüssigkeit unterschied sich von der Seitenflüssigkeit nur durch ihren Gehalt an Hämoglobin. Dieses wurde hergestellt, indem Hammelblut in kleinen Portionen mit 0,85 proz. Kochsalzlösung durch wiederholtes Zentrifugieren völlig serumfrei gewaschen und der Blutkörperchenbrei zum Schluß in etwas destilliertem Wasser aufgelöst wurde. Der Gehalt der Mittelflüssigkeit an Hämoglobin betrug in allen Versuchen etwa 9,5% des Gehaltes des Hammelblutes. In allen Versuchen wurde p_h sowohl bei der Seitenflüssigkeit wie bei der Mittelflüssigkeit vor und nach dem Versuch elektrometrisch gemessen. Auf diese Weise wurde kontrolliert erstens, inwieweit sich die Mittelflüssigkeit von der Seitenflüssigkeit im p_h unterschied, zweitens inwieweit eine Änderung des p_h durch den Stromdurchgang stattgefunden hat. Die Unterschiede waren in allen Fällen nur unbedeutend. Insbesondere war bei der Mittelflüssigkeit nie eine merkliche Änderung der p_h eingetreten. In das Diagramm wurde

das p_h der Mittelflüssigkeit eingetragen. Die Klemmspannung betrug in allen Versuchen 110 Volt. Die Geschwindigkeit der Kataphorese wurde gemessen durch Beobachtung der Zeit, inner-

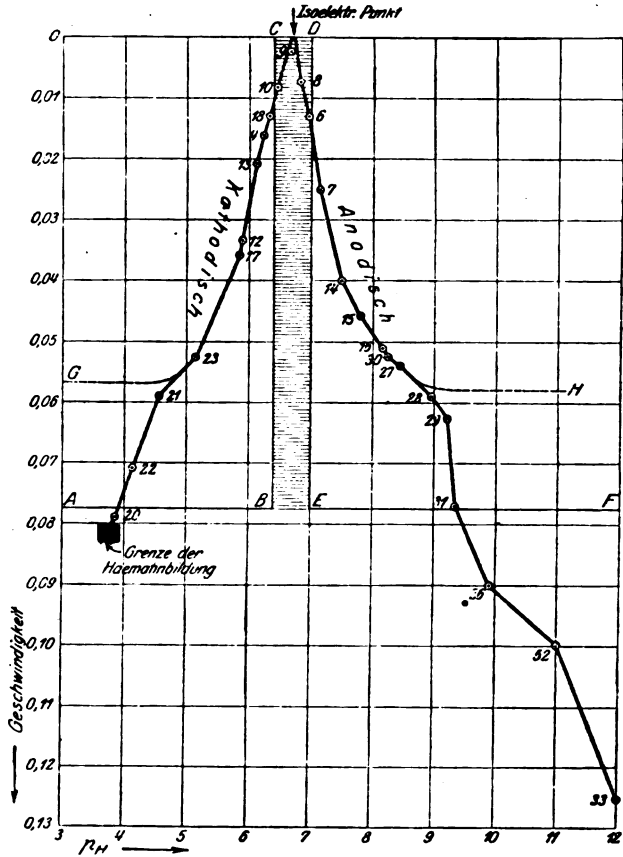


Abb. 1. Abszisse = p_h . Ordinate = Kataphoresegeschwindigkeit des Hämoglobins. Die positive Richtung der Ordinate geht von oben nach unten, die Nummern stimmen mit den Protokollnummern der Tabelle überein. Die gebrochene Linie $ABCDEF$ wäre die nach der Theorie von Straub und Meier zu erwartende. Statt dessen findet sich in Wirklichkeit die ausgezogene Kurve. Die punktierten Kurvenstücke G und H wären etwa die zu erwartenden Fortsetzungen der ausgezogenen Kurve, wenn das Hämoglobin ein sowohl als Säure wie als Base einwertiger Ampholyt wäre. Der linke Schenkel der Kurve läßt sich über den Versuchspunkt 20 hinaus nicht verfolgen, weil bei $p_h < 3,7$ das Hämoglobin sich zu schnell in Hämatin umwandelt.

halb deren das Hämoglobin die Hälfte der Hahnbohrung durchwandert hatte. Der reziproke Wert der Minutenzahl wurde als Geschwindigkeit bezeichnet. Diese stellt nur Relativwerte dar. Wir begnügen uns mit solchen, da verschiedene Umstände bei

dem Apparat in seiner jetzigen Konstruktion die Angabe von absoluten Zahlen erschweren, insbesondere der Umstand, daß es schwierig ist, den Voltabfall pro Zentimeter genau anzugeben. Für unsere Zwecke genügen aber die relativen Zahlen. Die folgende Tabelle enthält die näheren Angaben über die Versuche.

Versuch-Nr.	Puffer	p_A in der Seitenflüssigkeit		p_A in der Hämoglobininlösung (Mittelflüssigkeit)		Geschwindigkeit
		vorher	nachher Anode/Kat.	vorher	nachher	
4	sek. + prim. Phosphat 1	5,90	5,90; 5,91	6,05	6,05	$\frac{1}{60}$
6	" + " " 5	6,92	6,92; 6,94	6,97	6,99	$\frac{1}{135}$
7	" + " " 6	7,07	7,06; 7,09	7,15	7,17	$\frac{1}{40}$
8	" + " " 4	6,79	6,70; 6,81	6,82	6,82	$\frac{1}{135}$
9	" + " " 3	6,55	6,30; 6,18	6,66	6,66	$\frac{1}{400}$
10	" + " " 2	6,40	6,38; 6,43	6,47	6,47	$\frac{1}{300}$
12	" + " " 0,25	5,60	5,62; 5,64	5,89	5,91	$\frac{1}{30}$
13	" + " " 0,5	5,67	5,68; 5,70	6,13	6,10	$\frac{1}{48}$
14	" + " " 8	7,45	7,25; 7,45	7,51	7,50	$\frac{1}{35}$
15	" + " " 9	7,81	7,79; 7,81	7,81	7,79	$\frac{1}{32}$
16	" + " " 9,75	8,24	8,21; 8,26	8,14	8,14	$\frac{1}{12,5}$
17	" + " " 0,1	5,04	4,98; 5,21	5,86	5,83	$\frac{1}{25}$
18	" + " " 1,5	6,18	6,16; 6,25	6,38	6,34	$\frac{1}{78}$
19	" + " " 3	6,55	6,30; 6,18	6,66	6,66	$\frac{1}{400}$
20	Natriumacetat-Essigsäure 2	3,77	3,75; 3,72	3,84	3,84	$\frac{1}{12}$
21	" " " 5	4,40	4,25; 4,42	4,57	4,57	$\frac{1}{17}$
22	" " " 3,3	3,98	3,93; 4,00	4,14	4,14	$\frac{1}{14}$
23	" " " 8	4,86	4,82; 4,85	5,14	5,12	$\frac{1}{19}$
26	Borat-Natronlauge 6 . . .	10,03	9,99; 10,05	9,90	9,90	$\frac{1}{11}$
27	" -Salzsäure 6 . . .	8,54	8,54; 8,50	8,47	8,49	$\frac{1}{18}$
28	" " 8 . . .	9,01	9,03; 8,99	8,97	8,99	$\frac{1}{17}$
29	" -Natronlauge 10 . . .	9,24	9,24; 9,26	9,23	9,21	$\frac{1}{16}$
30	" -Salzsäure 5,5 . . .	8,30	8,25; 8,30	8,23	8,22	$\frac{1}{19}$
31	" -Natronlauge 8 . . .	9,46	9,40; 9,51	9,37	9,37	$\frac{1}{13}$
32	" " 5 . . .	11,0	11,0	11,0	11,0	$\frac{1}{10}$
33	" " 3 . . .	12,0	12,0	12,0	12,0	$\frac{1}{8}$

Die Zahl hinter dem Namen der Puffer bedeutet, daß n Teile des 1. Pufferbestandteils mit 10-n Teilen des zu zweit genannten vermischt werden.

Zusammenfassung.

Hämoglobin hat nur bei demjenigen p_A , welches seinem isoelektrischen Punkt entspricht, die Kataphoresegeschwindigkeit = 0. Mit steigendem bzw. fallendem p_A wird die Kataphoresegeschwindigkeit in anodischer bzw. kathodischer Richtung in völlig stetiger Weise größer. Eine sprunghafte Änderung im Sinne der Theorie von Straub und Meier findet nicht statt. Die Änderung der Ladung des Hämoglobins bei wechselndem p_A geschieht so, wie es bei einem gewöhnlichen Ampholyten zu erwarten ist.

Über den Zusammenhang von Dunkelwirkung fluoreszierender Stoffe und Photodynamie auf Zellen.

Von

A. Jodlbauer und F. Haffner.

(Aus dem pharmakologischen Institut München.)

(Eingegangen am 19. März 1921.)

Schon bei den ersten Untersuchungen über die photodynamische Wirkung fluoreszierender Stoffe, wobei als biologische Objekte Paramäcien gedient hatten, waren Beobachtungen gemacht worden, die an einen ursächlichen Zusammenhang von Photodynamie und Dunkelwirkung dieser Stoffe denken ließen. Besonders fiel das Parallelgehen der Giftigkeit der Farbstoffe der Fluoresceinreihe im Dunkeln und ihrer photodynamischen Wirksamkeit auf [Jodlbauer und v. Tappeiner¹⁾]. Busck²⁾ beobachtete dann die Dunkelwirkung auf Serum, Flexner³⁾ die auf Tetanolyisin. Da aber zu diesen Dunkelwirkungen — im Gegensatz zu den Lichtwirkungen — sehr hohe Giftkonzentrationen nötig sind, da ferner die Lichtwirkung im Gegensatz zu den Dunkelwirkungen ein Oxydationsvorgang ist, wurde ein Zusammenhang von Dunkelwirkung und Lichtwirkung für unwahrscheinlich gehalten⁴⁾.

Seitdem liegen neuere Beobachtungen vor, die dazu drängen, diese Annahme zu revidieren.

Nachdem vor längerer Zeit bereits Fr. H. von Tappeiner⁵⁾ berichten konnte, daß Eosin und dichloranthracendisulfonsaures Natrium die Auflösung roter Blutkörperchen durch Wärme im

¹⁾ Arch. f. klin. Med. **80**, 432. — Ferner Jodlbauer und Busck, Arch. intern. de Pharmacodyn. et de Thérap. **15**, 265. 1905.

²⁾ Diese Zeitschr. **1**, 425. 1906.

³⁾ Journ. of experim. med., 8. Jan. 1906.

⁴⁾ Diese Zeitschr. **13**, 24. 1908.

⁵⁾ Diese Zeitschr. **13**, 1. 1908.

Dunkeln zu beschleunigen vermögen, ergaben Versuche, die wir im Anschluß an unsere Untersuchungen über den Zusammenhang von Hämolyse und Flockung der Blutkörperchenkolloide durch Wärme anstellten, daß die Wärmeflockung der Blutkörperchenkolloide durch diese beiden Stoffe ebenfalls gefördert wird, und zwar bereits in relativ niederen Konzentrationen.

Um die Frage nach dem Zusammenhang von Dunkelwirkung und Photodynamie zu entscheiden, wurde unter Mitarbeit von Grabinger¹⁾ eine größere Anzahl fluoreszierender und photodynamisch wirksamer Stoffe aus verschiedenen chemischen Gruppen, sowie eine Anzahl von nicht photodynamisch wirkenden Stoffen ähnlicher Konstitution auf ihre Dunkelwirkung auf rote Blutkörperchen geprüft. Manche dieser Stoffe zeigen bereits bei Zimmertemperatur eine lytische Wirkung (siehe Spalte I der folgenden Tabelle). Bei vielen, die sich bei Zimmertemperatur als unwirksam erwiesen, liegt der Grund zum Teil darin, daß die zur Lyse notwendige Konzentration wegen der zu geringen Löslichkeit in physiologischer Kochsalzlösung nicht herstellbar ist. Dies läßt sich daraus schließen, daß diese bei Zimmertemperatur nicht wirkenden Stoffe die viel leichter beeinflussbare Wärmehämolyse zu beschleunigen vermögen.

Mittels der Wärmehämolyse und Wärmeflockung war also eine vergleichende Untersuchung der Dunkelwirkung dieser Stoffe auf rote Blutkörperchen durchführbar.

Die Versuchsanordnung war folgende: Rinderblutkörperchen wurden durch mehrmaliges Waschen mit 0,9proz. NaCl vom Serum befreit. Um eine durch den Farbstoffzusatz bedingte Reaktionsverschiebung hintanzuhalten bzw. einzuschränken, wurde der Blutkörperchensuspension ein dem Neutralpunkt entsprechendes Puffergemisch aus gleichen Teilen von $\frac{1}{3}$ -primärem und $\frac{2}{3}$ -sekundärem Natriumphosphat zugesetzt. Die Gesamtkonzentration des Phosphats war $\frac{1}{30}$, die der Blutkörperchen 0,5%.

Zu je 9 ccm dieses Gemenges kam 1 ccm der zu untersuchenden Lösungen. Diese Mischung wurde dann in gleichweiten Reagensgläsern teils bei Zimmertemperatur, teils in einem auf 56° C erwärmten Wasserbade beobachtet.

Vergleicht man zunächst die Wirkung der untersuchten Stoffe im Dunkeln auf die Lyse bei 18° C und bei 56° C, so sieht man, daß die Stoffe, die bereits bei Zimmertemperatur lysierend wirken, die Wärmehämolyse am stärksten beschleuni-

¹⁾ Diss. München, Dezember 1919.

Wirkung auf rote Blutkörperchen im Dunkeln.

Nr.	Untersuchte Stoffe	I. Lyse bei Zimmertemperatur in Konzentrationen		II. Lyse bei 56° C in Konzentrationen		III. Flockung lysierter Blutkörperchen bei 56° C in Konzentrationen		Photodynamische Wirksamkeit auf Zellen*)	
		1/100 mol	1/1000 mol	1/1000 mol	1/10000 mol	1/1000 mol	1/10000 mol		1/100000 mol
I. Fluoreszierende Stoffe.									
Fluoresceingruppe:									
1	Dibromfluorescein-Na	48 ^h -		80'		130'		Photodynamischer Wirkungs-wert auf Paramäcien nach Jodlbauer und Busck**) Wirkung des Fluorescein-natrium = 1 gesetzt 5 6 15 50 750 meist stark wirksam	
2	Tetrachlorfluorescein-Na	48 ^h -		72'		105'			
3	Tetrabromfluorescein-Na (Eosin)	48 ^h -		70'	90'	105'			
4	Tetraiodfluorescein-Na	3 ^h +		32'		62'			
5	Dichlortetrabromfluorescein-Na	5' +	48 ^h +	27'	20'	56'	90'		
6	Tetrachlortetrabromfluorescein-Na	<1' +	5' +	2'	13'	20'	60'		
7	Tetrachlortetraiodfluorescein-Na (Ros. beng.)	<1' +		<1'		bleibtklar			
8	Diäthylrhodaminäthylester-Cl	20' +		40'		25'			
9	Diäthylrhodamin-Cl	48 ^h +		30'		120'			
10	Diäthylrhodaminsulfosaures Na	48 ^h -		80'		150'			
Anthracengruppe:									
11	β -Anthracendisulfosaures Na	48 ^h -		90'		135'		sehr schwach wirks.	
12	Dichloranthracendisulfosaures Na	48 ^h -		60'		105'		stark wirksam	
Acridingruppe:									
13	Methylacridin-Cl	3 ^h +		90'				stark wirksam	
14	Chrysanilin-Cl	(1/100 mol 3 ^h +)		45'	70'	90'	115'		
Phenazingruppe:									
15	Diamidophenazin-Cl	3 ^h +		60'		40'		stark wirksam	
16	Neutralrot	30 ^h +		70'		108'			
17	Phenosafranin-Cl			60'		5 1/2'		schwach wirksam unwirksam	
18	Rosindulin-Cl			4'		160'			
19	Phenylrosindulintrisulfos. Na (Azocarmin)	48 ^h -		87'		180'			
20	Fuorindisulfosaures Na	48 ^h -		95'		90'			
Phenoxazingruppe:									
21	Nilblau A		(1/10000 mol 48 ^h +)	30'	60'	44'		stark wirksam	

22	Methylenblau BG	48 ^a -	43'	70'	75'	120'	stark wirksam
23	Methylengrün	48 ^a -		57'	80'	70'	
24	Thionin-Cl		43'	76'		110'	
25	Cyanin (Merck)	6 ^b +	20'	20'	30'	76'	wirksam
26	Chinolinrot			50'		30'	
27	β -Naphtholtrisulfosaures Na	48 ^a -	90'		185'		sehr schwach bis unwirksam
28	α -Naphthylamdisulfosaures Na	48 ^a -	85'		180'		
29	β -Naphthionsaures Na	48 ^a -	90'		180'		
30	Naphthionsaures Na	48 ^a -	100'	90'			
31	Anthrachinongruppe: Anthrachinonmonosulfosaures K	48 ^a -	105'				schwach wirksam
32	Harmalin-Cl	48 ^b +	45'				mäßig wirksam
33	Phenylchinolin-Cl	15' +	6 ^b +	45'	102'	180'	stark wirksam
34	Chinin-Cl	3 ^a +	40'	90'		90'	mäßig wirksam
35	Äsculin	48 ^b -	95'			180'	unwirksam
II. Nichtfluoreszierende Stoffe.							
Monozofarbstoffe:							
36	Viktoriaviolett 4 BS	48 ^b -	60'				
37	Tropäolin O		95'				
38	" 000	($\frac{1}{100}$ mol 48 ^b -)	48'			77'	
Diazofarbstoffe:							
39	Kongorot		3'	25'	75'	90'	
40	Azoblauf			60'		67'	bleibt klar
41	Triphenylmethanfarbstoffe:						
42	Malachitgrün	3 ^a +	5'	60'		7'	unwirksam
43	Krystallviolett			11'		20'	
44	Methylgrün	3 ^a +	3'	67'		90'	
45	Viktoriablau B		50'				
Aus andern Gruppen:							
45	Indigocarmin (B)	48 ^b -	25'	85'			
46	Indigotin P	48 ^a -		77'	52'	40'	
47	Hämatoxylin	3 ^a +		32'			

*) v. Tappeiner und Jodlbauer: Die sensibilisierenden Wirkungen fluoreszierender Substanzen. Leipzig 1907, S. 5 ff.

**) Jodlbauer und Busch: Archiv intern. de Pharmakodyn. et de Thérapie 14, 266.

gen. Von den Stoffen, die bei Zimmertemperatur noch keine nachweisbare Wirkung auf die Blutkörperchen besitzen, zeigen viele bei 56° C starke Förderung der Hämolyse, so das Dibrom-, Tetrachlor-, Tetrabromfluorescein, das dichloranthracendisulfosaure Natrium, das Methylenblau, Methylengrün, Viktoria-violett.

Auch auf die Wärmehämolyse so gut wie unwirksam erwiesen sich anthracendisulfosaures Natrium, Azocarmin, fluorindindisulfosaures Natrium, alle untersuchten Stoffe der Naphthalin-gruppe, anthrachinonmonosulfosaures Natrium und Äsculin.

Was die der Wärmehämolyse folgende Flockung der Blutkörperchenkolloide betrifft, so kommt es in den reinen Blutkörperchenauflösungen nach durchschnittlich 150 Minuten zur Bildung kleinster Flöckchen, die den Glühfaden aber nicht verdecken. Bei Gegenwart von Farbstoffen, die die Lyse beschleunigen, tritt die Flockung viel rascher und außerdem viel massiger in Erscheinung: es kommt zu dichten, den Glühfaden vollständig verdeckenden Trübungen. Die Flockungsförderung einer Substanz ist um so ausgeprägter, je stärker sie die Wärmelyse beschleunigt, daher am stärksten bei den Stoffen, die schon bei 18° im Dunkeln hämolysieren. Dieselben oben aufgezählten Stoffe, die die Wärmelyse nicht oder kaum beschleunigen, zeigen auch keine oder nur eine minimale Förderung der Flockung.

Lyse und Flockungsförderung nehmen im allgemeinen mit der Konzentration der Farbstoffe zu. Schließlich gehen beide Phasen so ineinander über, daß die Lyse nur einige Sekunden lang und zuletzt gar nicht mehr zu beobachten ist.

Die Flockungsförderung durch die Farbstoffe beweist den Angriff dieser Stoffe an den Blutkörperchenkolloiden. Das Parallelgehen von Lyse und Flockungsförderung spricht für den inneren Zusammenhang von Lyse und Kolloidbeeinflussung. Daß es Farbstoffe gibt, die in hoher Konzentration stark lysierend wirken, während die Flockung vollständig ausbleibt, wie dies bei Kongorot und Rose bengale der Fall ist, läßt sich ebenfalls kolloidchemisch erklären, worauf in einer weiteren Mitteilung eingegangen wird.

Betreffs Zusammenhang von Konstitution der Farbstoffe und ihrer Wirkung auf die Blutkörperchenkolloide läßt sich sagen, daß mit der Zahl der eingeführten

Halogene die Wirkung steigert, was sich besonders in der Fluoresceinreihe und in der Anthracenreihe zeigt. Sulfonierung dagegen hemmt die Wirkung sehr stark: die sulfonsauren Salze der Phenazingruppe, fluorindisulfosaures Natrium und phenylrosindulintrisulfosaures Natrium (Azocarmin) sind als einzige dieser Gruppe so gut wie wirkungslos; ebenso alle als sulfosauren Salze untersuchten Naphthaline und Anthrachinonderivate. Schon Ehrlich¹⁾ fand, daß Vitalfarbstoffe durch die Sulfonierung ihre Aufnahmefähigkeit in die Zellen verlieren und zog den Schluß, daß die Unwirksamkeit der Sulfoverbindungen mit ihrer geringen Aufnahmefähigkeit durch die Zellen zusammenhängt.

Vergleicht man nun die in der Tabelle festgelegte Wirkung auf Lyse bzw. Flockung im Dunkeln mit ihrer photodynamischen Wirksamkeit, so ergibt sich:

1. In der Fluoresceinreihe geht die photodynamische Wirkung parallel ihrer Wirkung im Dunkeln.

2. Ebenso wie im Licht dichloranthracendisulfosaures Natrium viel stärker wirkt als die nichthalogensubstituierten anthracendisulfosauren Salze, ist auch seine Dunkelwirkung auf die Wärmehämolyse und Flockung stärker.

3. Die untersuchten Stoffe der Acridin-, Phenoxazin-, Thiazin- und Chinolingruppe sind im Lichte und im Dunkeln gleich wirksam.

4. In der Phenazingruppe zeigen Azocarmin und fluorindisulfosaures Natrium keine deutlich nachweisbare Licht- noch Dunkelwirkung im Gegensatz zu den anderen im Lichte und im Dunkeln stark wirksamen Stoffen dieser Reihe.

5. Die auf Zellen photodynamisch nur schwach wirksamen Körper der Naphthalin- und Anthrachinongruppe sind auch im Dunkeln so gut wie unwirksam.

6. Das photodynamisch stark wirksame Phenylchinolinchlorid wirkt im Dunkeln bereits bei Zimmertemperatur stark hämolisierend, viel schwächer das auch photodynamisch schwächer wirkende Chininchlorid. Das nur schwach photodynamisch wirkende Harmalin fördert nur die Wärmehämolyse und auch diese nur sehr mäßig. Dem photodynamisch unwirksamen Äsculin fehlt eine Dunkelwirkung.

¹⁾ Therap. Monatshefte 88. 1887.

Es erwiesen sich somit alle fluoreszierenden Stoffe, die photodynamisch wirksam sind, als Förderer der Lyse im Dunkeln (teils bereits bei Zimmertemperatur lysierend, teils nur die Wärmehämolyse beschleunigend). Bei manchen Gruppen (z. B. der Fluoresceingruppe) geht die photodynamische Wirkung nahezu parallel dieser Dunkelwirkung. Die wenigen fluoreszierenden Stoffe, die photodynamisch nicht oder kaum wirken, haben auch keine nennenswerte Dunkelwirkung.

Was die Wirkung dieser Stoffe auf Zellen betrifft, ist also ein Zusammenhang zwischen Photodynamie und Reaktionsfähigkeit im Dunkeln anzunehmen. Daraus darf aber nicht der Schluß gezogen werden, daß es sich bei der photodynamischen Wirkung nur um eine Steigerung der auch im Dunkeln durch diese Stoffe hervorgerufenen Reaktion handelt.

Denn viele nicht fluoreszierende und nicht photodynamisch wirkende Stoffe ähnlicher Konstitution fördern ebenfalls Lyse und Flockung zum Teil sogar sehr stark (s. Tab. Nr. 36—47).

Der Zusammenhang zwischen Photodynamie und Dunkelwirkung kann also nur darin bestehen, daß die im Dunkeln zum Ausdruck kommende Reaktionsfähigkeit der Stoff mit Zellen, bzw. mit Zellkolloiden eine Vorbedingung für den Eintritt der photodynamischen Wirkung darstellt, und dies vielleicht auch nur insoweit, daß diese Stoffe von der Zelle aufgenommen werden müssen, um photodynamisch wirken zu können.

Für diesbezügliche früher schon ausgesprochene Vermutungen [Jodlbauer und v. Tappeiner¹⁾, Straub²⁾, Neuberg³⁾, Viale⁴⁾] dürfte durch die vorliegende Arbeit ein Beweis erbracht sein.

Zusammenfassung.

Von den zur Untersuchung gekommenen fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Substanzen beschleunigen sehr viele in Konzentrationen, die im Dunkeln bei Zimmertemperatur als weitgehend ungiftig zu bezeichnen sind, die Wärmehämo-

¹⁾ Jodlbauer und v. Tappeiner, Arch. f. klin. Med. 80, 429 u. 480.

²⁾ Straub, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 51, 390. 1904.

³⁾ Neuberg und Galambos, diese Zeitschr. 61, 330 Anm. 1914.

⁴⁾ Viale, Arch. di science biol. 1, 78. 1919.

lyse und die Wärmeflockung der Blutkörperchenkolloide im Dunkeln.

Von denjenigen fluoreszierenden Stoffen, die ausgesprochene photodynamische Wirkung auf Zellen haben, fördern alle die Wärmehämolyse und Flockung, während bei den fluoreszierenden Stoffen, die keine merkliche photodynamische Wirkung haben, auch diese Dunkelwirkung nicht oder kaum in Erscheinung tritt.

Es besteht somit ein Zusammenhang von photodynamischer Wirkung auf Zellen und Dunkelwirkung, aber nur insofern, als die in der Dunkelwirkung zum Ausdruck kommende Reaktionsfähigkeit dieser Stoffe mit den Blutkörperchenkolloiden eine Vorbedingung für das Zustandekommen der photodynamischen Wirkung ist.

Die Differenzen in der photodynamischen Wirksamkeit von Stoffen derselben Gruppe (z. B. der Fluoresceinreihe) gegenüber Zellen beruht nicht auf Unterschieden ihres Sensibilisierungsvermögens für Licht, sondern auf Unterschieden ihrer Reaktionsfähigkeit mit den Zellkolloiden.

Über den Mangangehalt von (holländischen) Samen.

Von

D. H. Wester (den Haag, Holland).

(Eingegangen am 21. März 1921.)

Es ist ziemlich wahrscheinlich, daß Mangan in den biochemischen Prozessen gewisser Pflanzen eine wichtige Rolle spielt. Besonders in den letzten 25 Jahren wurde die „Manganfrage“ vielfach studiert¹⁾. Dennoch ist manches noch unaufgeklärt. Über den Mangangehalt von Pflanzen, Tieren, Wasser, Bodenarten usw. von holländischer Herkunft ist aber bisher fast nichts bekannt. Die Samen sind — soweit mir bekannt — überhaupt noch nicht studiert²⁾. Nur zerstreut findet man hier und da eine Angabe³⁾.

Das Untersuchungsmaterial — sorgfältigst gereinigte Samen — wurde mir in liebenswürdigster Weise von Herrn F. F. Bruyning, Direktor der Reichsversuchsstation für Samenkontrolle in Wageningen zur Verfügung gestellt. Die Samen wurden pulverisiert, soweit vorrätig 5–10 g genau abgewogen und der Wassergehalt bei 105°–110° bestimmt. Dann bestimmte ich in flachen Schälchen im Muffelofen bei Rotglühhitze den Aschengehalt. Die Asche wurde in ein Abdampfschälchen gebracht, mit warmer Salzsäure nachgespült, auf einem Sandbade bei gelinder Wärme zur Trockne eingedampft und dann noch 2 mal

¹⁾ Bezüglich einer ausführlichen Übersicht kann z. B. verwiesen werden nach Czapek, Biochemie der Pflanzen, Bd. II. 1920. Außer vielen deutschen Untersuchern (Schulze, Schroeder, Dittmann, Freund u. a.) haben in den letzten 10 Jahren besonders französische Untersucher viele wertvolle Daten gesammelt (z. B. Jadin und Astruc, 1912 bis heute, im Journ. de Pharm. et de Chim. und in Compt. rend.).

²⁾ Czapek (l. c.) behandelt die anderen Aschenbestandteile von Samen sehr ausführlich, über Mangan ist aber nur wenig zu berichten (S. 383).

³⁾ Man siehe z. B. Jadin und Astruc, Compt. rend. 2. 1914 und Wester, Ber. d. d. pharm. Ges. 1920, S. 376–381.

hintereinander mit einer angemessenen Menge Schwefelsäure (1 : 2) abgedampft. In ähnlicher Weise finden diese Manganuntersuchungen im allgemeinen statt. Man erhält auf diese Weise alles Mangan in löslicher, chloridfreier Form.

Der Mangangehalt wurde nach der Persulfatmethode bestimmt, die mir auf Grund meiner kritischen Studien der Methoden zur Manganbestimmung¹⁾ dafür am geeignetsten erscheint. Zu dem Zwecke wurde die Sulfatasche mit wenig Wasser gemengt und sofort in die von mir angegebenen Colorimeterröhrchen filtriert. Wurde mehr als etwa 8 ccm Filtrat erhalten, dann wurde dasselbe bis auf ein gewisses Quantum ergänzt und ein Teil desselben weiter untersucht. (Die Colorimeterröhrchen haben nämlich nur einen Inhalt von 10 ccm.) Hinsichtlich Einzelheiten dieser Bestimmungsweise kann auf meine schon erwähnten Mitteilungen verwiesen werden. Nur sei hervorgehoben, daß das Mangan mittels Kaliumpersulfat-Silbernitrat in Kaliumpermanganat übergeführt wird und die Menge desselben durch Vergleichung mit ebenso behandelter Mangansulfatlösung von bekannter Konzentration kolorimetrisch bestimmt wird. Zu gleicher Zeit wurde der Eisengehalt der Lösung, als Berlinerblau, annähernd bestimmt²⁾. Bei zu hohem Eisengehalt ist bekanntlich die Persulfatmethode unzuverlässig³⁾ und man muß durch Verdünnung oder Entfernung des Eisens versuchen sein Ziel zu erreichen.

Ich habe den Mangangehalt in mg Mangan auf 100 g getrocknetes Material und auf 100 g Asche ausgedrückt, um damit Zahlen zu schaffen, die mit denjenigen anderer Untersucher unmittelbar verglichen werden können⁴⁾.

Bei der Arbeitsweise kann auf Grund vergleichender Versuche folgendes hervorgehoben werden:

1. Mangan verflüchtigt sich bei dieser Arbeitsweise nicht.
2. Einmaliges Abdampfen mit Schwefelsäure treibt manchmal nicht alles Chlorid aus, weshalb zweimalige Behandlung zu empfehlen ist.

¹⁾ Wester, Recueil de travaux chim. des Pays-Bas. 1920, S. 414—422 und S. 600—602.

²⁾ In einigen Fällen ist dieser Gehalt in der Tabelle notiert worden.

³⁾ Man siehe Wester, Recueil de travaux chim. des Pays-Bas 1920, S. 408.

⁴⁾ Einige andere Untersucher berechnen den Gehalt an Mn_3O_4 oder drücken sich in Prozenten aus usw.

Tabelle I.

	Wassergehalt in %	Aschengehalt in %	Aschengehalt in % vom bei 110° ge- trochnetem Material	Anzahl mg Mn. auf 100 g getrocknetem Material	Anzahl mg Mn. auf 100 g Asche	Annähernde Menge Fe... in mg pro 100 g Asche
Familie Pinaceae.						
1. Pinus silvestris (Forn)	10	6,9	7,6	12,7	167,5	105
Familie Gramineae.						
§ Agrostideae.						
2. Phleum pratense L. (Thimotheusgras)	12	2,4	2,7	4,2	15,3	
3. Alopecurus pratensis L. (Wiesen-Fuchschwanz)	10,9	7,6	8,6	11,6	185,3	wenig
§ Avenae.						
4. Avena sativa L. (Gemeiner Hafer)	14	3,3	3,8	2,8	50,2	215
§ Festuceae.						
5. Cynosurus cristatus L. (Kammgras)	12,6	6,7	7,7	5,2	67,2	
6. Festuca pratensis Huds. (Schwingel)	12,8	3,7	4,3	15,8	364	
7. Festuca duriuscula L. (Schwingel)	13,4	3,8	4,4	12,1	269,1	anwesend
8. Dactylis glomerata L. (Knäulgras)	12,4	4,2	4,8	5,8	119,4	anwesend
9. Poa pratensis L. (Rispelgras)	12,6	7,5	8,6	5,3	60,9	
10. Poa trivialis L. (Rispelgras)	12,4	5,9	6,7	2	29,5	
§ Hordeae.						
11. Lolium italicum M. Br. (Italienischer Lolch)	13,1	3	3,5	4,5	129,8	eine Spur
12. Avena elatior L. (Französischer Lolch)	11,6	5	5,7	6,5	118,6	anwesend
13. Lolium italicum var. Westerwoldicum (Westerwoldscher Lolch)	12,7	4,8	5	4,7	94,9	
14. Lolium perenne L. (Englischer Lolch)	13,6	4,3	4,9	5,4	106,3	wenig
15. Triticum vulgare Vill. (Weizen)	15	1,9	2,2	2,8	123,5	eine Spur
16. Hordeum vulgare L. (Vierzellige Gerste)	12	2,2	2,5	1,14	45,1	47
Familie Liliaceae.						
§ Allieae.						
17. Allium porrum L. (Porree)	16,6	2,9	3,5	1,5	44	650
18. Allium cepa L. (Zwiebel)	14,7	4	4,7	1,2	32,1	428
Familie Moraceae.						
19. Cannabis sativa L. (Hanf)	13	5,2	6	3,45	57,5	70
Familie Chenopodiaceae.						
§ Beteae.						
20. Beta vulgaris var. crassa (Bete)	13,8	5,4	6,3	6,6	104,5	
21. Beta vulgaris var. rapa (Bete)	13,4	6,1	7	1,95	27,6	362
§ Atripliceae.						
22. Spinacia oleracea L. (Spinat)	15,4	3,8	3,9	2,4	61	153
Familie Papaveraceae.						
23. Papaver Somniferum L. (Gartenmohn)	7,2	9	9,6	8	81,3	
	7	9,1	9,8	3,1	31,5	96
Familie Cruciferae.						
§ Sinapeae.						
24. Brassica oleracea capitata var. rubra (Roter Kohl)	11,4	4,8	5,4	6,5	119,5	
25. Brassica oleracea capitata var. alba (Weißer Kohl)	8	4,5	5	2,45	48,7	

Tabelle I (Fortsetzung).

	Wassergehalt in %	Aschengehalt in %	Aschengehalt in % vom bei 110° ge- trocknetem Material	Anzahl mg Mn. auf 100 g getrocknetem Material	Anzahl mg Mn. auf 100 g Asche	Annahmerde Menge Fe... in mg pro 100 g Asche
25. <i>Brassica chapus rapifera</i> D. C. (Raps)	8,7	4,3	4,8	3,2	66,5	
27. <i>Brassica rapa</i> L. (Rübe)	7,7	4,2	4,5	2,1	45,7	
28. <i>Raphanus sativus</i> L. <i>preacox</i> (Rettich)	10,8	4	4,5	2,05	45,5	228
Familie Leguminosae.						
§ Trifolieae.						
29. <i>Trifolium incarnatum</i> L. (Inkarnatklec)	13,5	3,6	4,4	2,4	56,8	
30. <i>Trifolium repens</i> L. (Weißer Klee)	11,8	3,3	3,8	1,85	47,4	
31. <i>Trifolium hybridum</i> L. (Schwedischer Klee)	10,8	3,2	3,6	2	54,8	anwesend
32. <i>Trifolium pratense</i> L. (Deutscher Klee)	12,4	3,5	4	2,5	62,5	
	11	3,4	3,9	2,7	69,4	20
33. <i>Medicago sativa</i> L. (Luzerne)	9	2,9	3,3	1,6	47,5	20
34. <i>Medicago lupulina</i> L. (Hopfenklec)	13,8	2,5	2,9	0,8	27,9	280
§ Genisteae.						
35. <i>Lupinus luteus</i> L. (Gelbe Lupine)	12,7	3,4	3,9	67,8	1700	60
§ Hedysareae.						
36. <i>Ornithopus sativus</i> Brot (Sardellen)	13,8	4,3	5	11,1	225	28
§ Viciae.						
37. <i>Vicia faba</i> s. minor (Saubohne)	13	3	3,5	1,5	42,8	
38. <i>Vicia sativa</i> L. (Wicke)	10,9	3	3,8	1,5	43,1	152
39. <i>Pisum sativum</i> L. (Felderbsc)	14	2,4	2,8	0,4	15,5	300
Familie Linaceae.						
40. <i>Linum usitatissimum</i> (Flachs)	9,4	3,7	4,1	10,2	249,5	250
Familie Umbelliferae.						
§ Ammineae.						
41. <i>Apium graveolens</i> L. (Eppich)	12,6	5,8	6,8	1,4	20,4	etwa Spur
§ Dauceae.						
42. <i>Daucus carota</i> L. (Möhre)	12,8	7,4	8,5	5,8	67,9	
Familie Valerianaceae.						
43. <i>Valerianella olitoria</i> Poll (Rapünzchen)	10,2	9	10	4,6	45,4	
Familie Cucurbitaceae.						
44. <i>Cucumis sativus</i> L. <i>Anguria</i> (Gurke)	10	3,1	3,4	2,5	78,2	114
45. <i>Cucumis sativus</i> L. (Cucumber)	9	4	4,8	2,45	56	224
Familie Compositae.						
§ Lactucinae.						
46. <i>Lactuca sativa</i> L. (Lettich)	7,5	4,2	4,5	2,4	51,6	ziemlich viel
§ Cichorieae.						
47. <i>Scorzonera hispanica</i> L. (Schwarzwurz)			4	4,45	111	32
48. <i>Cichorium intybus</i> L. (Wegwarte)	10			1,7		

3. In 9 Fällen wurde kontrolliert, ob Mangan in der ungelösten Asche zurückgeblieben war. In keinem Falle konnte eine Spur nachgewiesen werden.

4. Die Zuverlässigkeit der ganzen Untersuchungsmethode ging unter anderem daraus hervor, daß zweifach ausgeführte Bestimmungen, sei es zur selben Zeit, sei es einige Monate später, sehr befriedigend übereinstimmten. Solche Bestimmungen wurden unter anderen an *Digitalis*¹⁾ und an diesem Samenmaterial ausgeführt. Als Beispiel habe ich diese Zahlen erwähnt bei *Papaver somniferum* und bei *Trifolium pratense*²⁾.

Das untersuchte Material wurde nach dem Englerschen System klassifiziert³⁾.

Vieles ist diesen Zahlen nicht zuzufügen; sie sprechen für sich. Nur folgendes sei aus denselben hervorgehoben. Erstens fällt uns auf, daß in allen untersuchten Samen, welche weit auseinandergehenden Pflanzenfamilien angehören, Mangan gefunden wurde. In der Mehrzahl der Fälle finden wir 2 bis 6 mg Mn auf 100 g getrocknetes Material. Auf 100 g Asche berechnet wurden in vielen Fällen etwa 50 mg Mn festgestellt, und in der weitest aus größten Anzahl der untersuchten Samen bleibt dieser Gehalt unter etwa 100 mg. Nur einige Samenarten zeigten einen erheblich höheren Mangangehalt. In dieser Hinsicht ist besonders auf die Samen von *Lupinus luteus* zu verweisen, welche 1700 mg Mn in 100 g Asche enthalten. Hierzu will ich aber bemerken, daß dieser Gehalt noch niedrig ist, wenn wir ihn mit demjenigen vergleichen, der für einige „Mangansammler“ in der Literatur gefunden wird: in Prozent Mn_2O_4 berechnet: in Eichenholz 3–5, Birkenholz 10–18, Blattsche von *Fagus silvatica* 9,5, Blattsche von *Lupinus albus* 8,96 [letzteres als Mangan⁴⁾].

Wenn wir die Zahlen von Arten desselben Geschlechts miteinander vergleichen, sehen wir durchwegs ziemlich große Übereinstimmung (*Lolium*-, *Allium*-, *Brassica*-, *Trifolium*-, *Vicia*- und

¹⁾ Wester, Über den Mangangehalt einiger *Digitalis*arten aus verschiedenen Gegenden, die Brauchbarkeit dieses Merkmals zur Unterscheidung der *Digitalis*arten und den Einfluß einer Mangandüngung. Ber. d. d. pharm. Ges. 1920, S. 376–381.

²⁾ Die Bestimmungen wurden in Zwischenräumen von 3½ Monaten angestellt. Möglicherweise ist dabei der Wassergehalt etwas zurückgelaufen.

³⁾ Engler und Gilg, Syllabus der Pflanzenfamilien. 7. Aufl. 1912.

⁴⁾ Man sehe Czapek, Biochemie I. c.

Cucumisarten). In einem Falle ist die Verwandtschaft geringer (Festuca), in einem anderen Falle gehen die Zahlen sogar sehr stark auseinander (Beta). Wenn wir einige Paragraphen untereinander vergleichen — was nur Zweck hat, wenn eine genügende Anzahl Repräsentanten untersucht werden — dann fällt uns unter anderem auf, daß die Paragraphen der Festucaceae und die Paragraphen der Hordeae offenbar manganreicher sind als die Paragraphen der Sinapeae.

Für die Arten innerhalb eines Paragraphen oder einer Familie gehen die Zahlen oft weit auseinander.

Einige Zahlen für Digitalis-Samen gedüngter und ungedüngter Pflanzen habe ich schon früher mitgeteilt¹⁾.

Chemisches Laboratorium der Kriegsakademie.

¹⁾ Wester, Mangengehalt einiger Digitalisarten usw. l. c.

Quantitative Messung der zeitlichen Coffeinausscheidung beim Menschen nach einer neuen biologischen Methode.

Von
Eduard Friedberg.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. B.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 21. März 1921.)

Die Ausscheidungsbedingungen des Coffeins im Harn nach Aufnahme in reiner Substanz oder in Form der Genußmittel wurden bisher nur mit verschiedenen Methoden der chemischen quantitativen Analyse untersucht. Alle diese Methoden litten aber an dem Unvermögen, auch ganz geringe Mengen des ausgeschiedenen Coffeins quantitativ festzulegen. Sie zwangen daher die einzelnen Autoren, sobald sie sich mit dieser Fragestellung beschäftigten, zu Versuchsanordnungen, die einem tieferen Eindringen in das Problem Abbruch taten.

So haben Krüger⁹⁾ Krüger-Schmidt¹⁰⁾ und Albanese³⁾ ihren Versuchstieren größere Mengen von Coffein über einen Zeitraum von vielen Tagen verabreicht, um dann den während dieser Zeit gesammelten Harn auf die Ausscheidungsgröße der aufgenommenen Substanz zu untersuchen. Die Autoren gingen also anscheinend von der Voraussetzung aus, daß eine Stapelung des Coffeins nach chronischer Aufnahme im Organismus stattfände und daß die Summierung der Coffeingaben auf längere Zeit hin auch eine Summierung der Coffeinausscheidung zur Folge haben müßte. Trotzdem aber der Coffeinnachweis in großen Harnmengen geschah, waren die im gesammelten Harn gefundenen Werte relativ gering. Ein genauerer Einblick in die Größe des Coffeinabbaues, in die Zeitdauer seiner Zerstörung oder seiner unzerstörten Ausscheidung war auf diesem Wege aber schwerlich zu erhalten, da es immer noch möglich war, daß geringe Mengen des Coffeins auf längere Zeitdauer hin ausgeschieden wurden, die sich dem Nachweis entzogen, weiterhin aber, weil bei der fortgesetzten Einnahme des Coffeins keine Anhaltspunkte für seine jeweilige Konzentration im Blute und für die Abhängigkeit der Ausscheidung von dieser zu erhalten waren.

Rost¹⁴⁾ ging bereits methodischer vor. Er sammelte nach einmaliger Coffeingabe den Harn seiner Versuchstiere über 1—5 Tage hin und konnte feststellen, daß der größte Wert der nachweisbaren Ausscheidungsmenge

des Coffeins schon nach 24 Stunden erreicht wurde. Er machte die interessante Beobachtung, daß die Coffeinausscheidung der einzelnen Tierarten verschieden große Werte hatte, und daß anscheinend zwischen der Diurese-
neigung der einzelnen Tierarten nach Coffein und zwischen der Ausscheidungsgröße dieser Substanz ein Zusammenhang bestand. Diese Feststellung von Rost hat aber nur den Charakter einer Vermutung und wird deshalb auch nur vorsichtig vorgetragen, da ja für den Beweis der Parallelität zwischen Diurese und Coffeinausscheidung die Untersuchung des zeitlichen Ablaufs der Coffeinelimination innerhalb der einzelnen Harnportionen fehlte.

Dazu kamen aber noch weitere Beobachtungen von Albanese⁸⁾ und Bondzynski-Gottlieb⁵⁾, die im Organismus des Hundes eine Umwandlung des Coffeins in 3-Methylxanthin nachwiesen, die also eine Entmethylierung des Coffeins im Tierkörper sicherstellten. Durch Krüger und Schmidt⁶⁾ wurde später eine Methode der Isolierung verschiedener Methylxanthine im Harn ausgebildet. Krüger⁹⁾ fand damit beim Hunde nach chronischer Coffeindarreichung neben Coffein auch Theophyllin, Theobromin, Paraxanthin und 3-Methylxanthin im gesammelten Harn. Die Gesamtmenge der Methylxanthine im Harn des Hundes entsprach jedoch lange nicht der eingegebenen Coffeinmenge. Während die Demethylierung des Coffeins beim Hunde besonders leicht an der 7-CH₃-Gruppe vorzugehen scheint (Aufreten des 3-Methylxanthins im Harn) setzt dieser Prozeß beim Kaninchen nach Krüger zuerst an der 3-Methylgruppe ein (Fehlen des 3-Methylxanthins im Harn).

Wenn auch diese Isolierungsmethoden im Harn nur bei chronischer Coffeindarreichung in großen Harnmengen möglich waren, so geben sie für uns doch die Wahrscheinlichkeit, daß der Entmethylierungsprozeß im Tierorganismus für die einzelnen Tierarten verschiedenartig und charakteristisch verläuft.

Während die Ausscheidungsmengen des Coffeins beim Tiere noch eine gewisse Größe betragen, zeigte es sich aus den Bestimmungen von Schneider¹⁷⁾ und Rost¹⁴⁾, daß beim Menschen der Prozentsatz des unverändert ausgeschiedenen Coffeins noch bedeutend geringer war. Schneider¹⁷⁾ erstrebte mit seiner Methode nur einen qualitativen Nachweis des Coffeins. Er gelang ihm nach einer Dosis von 0,2 g bei künstlicher Steigerung der Diurese. Rost fand nach innerlicher Aufnahme von 0,25 g Coffein im gesammelten Harn von 24 Stunden ebenfalls nur qualitativ nachweisbare Mengen, während nach 0,5 g nur 0,45–0,6% im Harn wieder erschienen. Ähnliche Ergebnisse hatte Albanese⁸⁾. Diese geringen Ausscheidungsmengen sprechen dafür, daß der Zerstörungsprozeß des Coffeins innerhalb des menschlichen Organismus seine eigenen Gesetze hat. Ob sie aber einen beschleunigten Abbau der Substanz beweisen, kann aus den vorliegenden Untersuchungen nicht entschieden werden. Denn es wäre auch hier möglich, daß eine langdauernde Elimination kleinster Mengen Coffeins stattfände, die sich dem chemisch-quantitativen Nachweis entziehen.

Alle früheren Untersuchungen hatten also zwar interessante Befunde und Anhaltspunkte für das Schicksal des Coffeins im

tierischen Organismus ergeben, sie waren aber infolge unzulänglicher Empfindlichkeit der Nachweismethode nicht dazu vorgedrungen, den kurzperiodischen zeitlichen Verlauf der Coffeinausscheidung in den einzelnen Harnmengen zahlenmäßig festzulegen.

Das gilt im höchsten Maße beim Menschen, bei denen die geringen Werte der Ausscheidungsmengen dieses Ziel ganz unmöglich machten.

Eine Methodik, die imstande wäre, auch ganz geringe Mengen von Coffein im Harn zu messen, könnte aber zweifellos noch weitere Aufklärungen über die Dauer der Coffeinausscheidung, über die Beziehungen von Diurese und Menge der ausgeschiedenen Substanz, über die Frage der Coffeingewöhnung und über die Bedingungen der Coffeinausscheidungen bei coffeinhaltigen Genußmitteln geben.

Eine derartige Methode habe ich auf Anregung und mit Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Straub ausgearbeitet.

Die Grundlagen der Methode.

I. Die leichte Löslichkeit des Coffeins und der anderen spezifischen Coffeinabkömmlinge in Chloroform ermöglicht es, diese Substanzen aus dem getrockneten Harn zu extrahieren und besonders auch von den in Chloroform so gut wie unlöslichen Harnstoff zu trennen.

II. Für qualitativen und quantitativen Bestimmung der so gewonnenen Substanzen bediente ich mich ihrer charakteristischen toxischen Einwirkung auf die quergestreifte Muskulatur des Frosches. Nach den Beobachtungen von Johannsen⁴⁾ und Schmiedeberg⁵⁾ bewirkt der Zusatz z. B. einer hochgradig verdünnten Coffeinlösung zu einer in Ringer gelagerten quergestreiften Muskelfaser der *Rana temporaria* eine plötzliche Veränderung in dieser. Die Faser gerät in Bewegung, in dem sie sich windend kontrahiert, sie wird undurchsichtig, grau gefärbt, die Querstreifung geht verloren, an einzelnen Teilen hebt sich das Sarkolemm ab. Gegen Ende der sichtbaren Giftwirkung zerfällt die Substanz innerhalb des Sarkolemm in Klumpen, zwischen den scholligen Zerfallsprodukten treten farblose durchsichtige Zwischenräume auf. Man hat den Eindruck einer Gerinnung

der Muskelsubstanz. Bei fallender Konzentrationen der Coffeinelösung werden die Erscheinungen undeutlicher, die Eigenkontraktion wird nicht mehr sichtbar, während feinere mikroskopische Veränderungen der Muskelsubstanz noch längere Zeit zu beobachten sind.

Die Eigenbewegung der Muskelfaser auf Zusatz des Koffeins ist nun bei meiner Methode der Vorgang, auf den es ankommt, während ich die Strukturveränderungen des Gewebes außer acht ließ. Es zeigte sich, daß diese Eigenkontraktion ziemlich scharf bei einer Konzentration des Coffeins von 1: 3500*) einsetzt.

Die Methode.

I. Die Extraktion des Coffeins aus dem Harn: Der durch Zusatz einiger Tropfen einer 5proz. Lösung von Na. carb. schwach alkalisch gemachte Harn wird auf dem Wasserbad unter Hinzufügen von wasserfreiem Gips eingedampft, der eingedampfte Rückstand darauf im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Zu dem bis zur Staubform feingepulverten Rückstand setzte ich zur Extraktion der Fettsubstanzen ca. 20 ccm Petroläther (50–80° Siedepunkt) hinzu, erhitze die Mischung eine Viertelstunde am Rückflußkühler, goß den Petroläther durch ein Filter ab und saugte den Rest des zurückgebliebenen Petroläthers noch vorsichtig mit der Wasserstrahlpumpe weg. Der so behandelte Rückstand wurde darauf mindestens mit 20 ccm Chloroform**) (wasserfrei) versetzt und eine Stunde lang am Rückflußkühler gekocht. Zur letzten Trocknung des Chloroforms diente der Zusatz von einigen Gramm Na. sulf. sicc. Abkühlung, Filtration, Destillation des Chloroforms. Der Destillationsrückstand wurde in $\frac{1}{4}$ bis 2 ccm erwärmter Ringerlösung gelöst.

II. Der biologische Nachweis des Coffeins. Die parallele Faserung des Muskulus sartorius der *Rana temporaria* läßt beim Zerzupfen mit Leichtigkeit isolierte Fasern gewinnen,

*) Als Lösungsmittel benutzte ich Ringerflüssigkeit, um bei der Reaktion unabhängig von osmotischen Vorgängen zu sein.

**) Die Wasserfreiheit des Chloroforms ist ein dringendes Erfordernis, da sonst durch leichte Löslichkeit des Harnstoffs im Wasser Mengen dieser Substanz in den Chloroformrückstand übergehen, die gelöst in Ringer eine Coffeinreaktion vortäuschen können. Harnstoff gibt ungefähr in einer 4proz. Lösung eine Eigenkontraktion der Muskelfaser.

von denen die dünnsten mit möglichst gleichem Durchmesser für den Versuch am geeignetsten sind. Die isolierte Muskelfaser brachte ich in einem Tropfen Ringerlösung unter das Mikroskop (Vergr. 1:80), überzeugte mich von ihrer Unversehrtheit, saugte die Ringerlösung ab, und tropfte stets $\frac{1}{10}$ ccm der zu prüfenden Lösung des Destillationsrückstandes auf die Faser. Erhielt ich darauf bei Beobachtung am Mikroskop eine deutliche Kontraktionsbewegung der ganzen Faser oder einzelner Teile, so verdünnte ich die Lösung des Destillationsrückstandes so lange mit Ringerlösung, bis ich an die Grenze der biologischen Reaktion gelangt war. Auf diese Weise schuf ich mir Anhaltspunkte für die Menge des Coffeins. Hatte ich z. B. ursprünglich den Destillationsrückstand in 1 ccm Ringerflüssigkeit gelöst und mußte ich bis zur Grenzreaktion 10fach verdünnen, so geschah die quantitative Berechnung des Coffeins durch die Formel $\frac{1 \cdot 10}{3500} = 2.8$ mg. (das Konzentrationsverhältnis 1:3500 gab bei Coffein die Grenzreaktion). Da ich den Destillationsrückstand mit immer kleineren Mengen von Ringerflüssigkeit auflösen konnte — ich ging bis auf $\frac{1}{4}$ ccm zurück — so liegt es auf der Hand, daß ich dadurch imstande war, außerordentlich kleine Mengen Coffeins nachzuweisen, nämlich bis zu $\frac{0,25}{3500} = \frac{1}{14}$ mg oder rund 0,00007 g.

Anmerkung: Es müssen möglichst frische Muskelfasern der *Rana temporaria* für den Versuch benutzt werden. Ein Aufbewahren des Muskels in Ringerlösung über ca. 1 Stunde verhindert das Zustandekommen guter Zupfpräparate. Leichte Beschädigungen frischer Fasern waren für den Schwellenwert der Muskelreaktion nicht von Bedeutung. Die Muskelfaser haftet nach Absaugen des Tropfens Ringerlösung oft nachhaltig an der Oberfläche des benützten Glasschälchens. Es ist notwendig, daß nach Hinzufügung der zu prüfenden Lösung die Faser frei herumschwimmt, da sonst der Kontraktionsvorgang verzögert werden kann.

Kontrollversuche zur Methode.

Es gelang mir nach einiger Übung, unbekannte Mengen von Coffein, die dem Harn zugesetzt waren, ziemlich genau zu bestimmen. So berechnete ich von 7 mg zugeführten Coffeins 6,4 mg und von 24 mg = 22,6 mg. Teilte ich die Coffein (22 mg) enthaltenden Harnmengen in gleiche Teile, so wurden auch die von mir bestimmten Coffeinwerte in den getrennten Portionen ziemlich identisch (11,6 mg und 10,9 mg). Umgekehrt konnte

ich bei gegebenen Coffeinemengen deren Konzentration, also die mir unbekannte Flüssigkeitsmenge, sehr genau feststellen. Bei 11 mg Coffein, gelöst in 7 ccm Ringerlösung, konnte ich 6,8 ccm der Flüssigkeit berechnen. In allen diesen Bestimmungen blieb ich immer unter einer Fehlerquelle von 10%, sobald ich nach kurzer Zeit in meiner Übungsfähigkeit zu Beobachtung der biologischen Reaktion keine Fortschritte mehr machte. Auch bei excessiver Fleischkost war es niemals unter Coffeinkarenz möglich, aus dem Harn mit meiner Methode Substanzen zu gewinnen, die eine ähnliche Muskelreaktion gaben, sobald ich die oben erwähnte Trocknung des Chloroforms durchgeführt hatte. Die Empfindlichkeit und Genauigkeit meiner Methode zeigte sich u. a. auch darin, daß ich imstande war, mit ihr den Coffeingehalt einer einzigen Kaffeebohne zu bestimmen. In einer einzigen gerösteten Bohne von 160 mg Gewicht waren 2 mg Coffein enthalten, also 1,25%, eine Feststellung, die mit dem von Lendrich und Nottbohm¹¹⁾ geschätzten Prozentgehalt des gerösteten Kaffees an Coffein übereinstimmt.

Kritik der Methode.

Wir können aus der Muskelreaktion im Destillationsrückstand des Chloroformextraktes des eingedampften Harnes nach Coffeinaufnahme nicht kurzweg schließen, daß wir es nur mit dem im Harn ausgeschiedenen Koffein allein zu tun haben. Wenn auch der Prozeß der Entmethylierung des Coffeins im menschlichen Organismus noch weniger geklärt ist als im tierischen, so haben wir aus den Untersuchungen von Albanese²⁾, Burian-Schur⁶⁾ Krüger-Schmidt¹⁰⁾ und Levinthal¹²⁾ alle Anhaltspunkte dafür, daß nur ein geringer Teil des Coffeins unverändert ausgeschieden wird, und daß ca. 10—35% als Purinbasen im Harn erscheinen, deren Natur nicht genügend bekannt ist.

Es könnten also auch die im tierischen Harn nach Coffeinaufnahme gefundenen Methylxanthine [Krüger⁹⁾] infolge Entmethylierung des Coffeins im menschlichen Organismus auch im menschlichen Urin auftreten und in den Chloroformextrakt übergehen. Durch die Alkalisierung des Harns wird zwar das Coffein mit größerer Leichtigkeit vom Chloroform aufgenommen, als Theobromin, Theophyllin, Paraxanthin usw., die Stoffe ausgesprochen sauren Charakters darstellen. Bei der Empfindlichkeit meiner

Methode kann aber von einer absoluten Trennung des Coffeins von diesen Methylxanthinen (J. Bock und Bech Larsen]⁴) durch die alkalische Reaktion wohl kaum die Rede sein.

Wir wissen nun aber, daß die obengenannten Methylxanthine eine ähnliche Giftwirkung auf den quergestreiften Muskel der *Rana temporaria* ausüben wie das Coffein [Schmiedeberg¹⁶), Dreser⁷), Secher]¹⁸). Sie können also durch dieses gleichartige Verhalten in der quantitativen biologischen Bestimmung enthalten sein, sofern sie genügend in Ringer löslich sind. Aus diesem Grunde habe ich die Grenzwerte der Konzentrationen auch dieser Substanzen zu bestimmen versucht, welche die für meine Methode maßgebende Kontraktionsbewegung des Muskels eben noch auszulösen vermögen.

Die Grenzwerte betragen:

Theobromin	1 : 3500
3-Methylxanthin	1 : 3500
Theophyllin	1 : 3000
Paraxanthin	1 : 3000
8-Methylxanthin in gesättigter Lösung:	negativ;
Xanthin in gesättigter Lösung:	negativ.

Wir können aus dieser Tabelle den wahrscheinlichen Schluß ziehen, daß 8 Methylxanthin und Xanthin in den Werten der biologischen Bestimmung nicht enthalten sind, da ihre schwere Löslichkeit keine genügenden Mengen wirksamer Substanz in Ringer übergehen läßt. Weiterhin können wir ohne größere Fehlerquellen den Grenzwert der Coffeinkonzentration von 1 : 3500 als Grundlage der quantitativen Anhaltspunkte annehmen, da die übrigen Methylxanthinkonzentrationen in ihren Grenzwerten unbedeutend voneinander abweichen. Meine quantitativen Berechnungen liegen also auf jeden Fall an der unteren Grenze.

Durch meine Methode wird also nach Coffeinaufnahme wahrscheinlich nicht allein unverändert ausgeschiedenes Coffein im Harn quantitativ nachgewiesen, sondern es sind in diesen Werten vielleicht auch noch spezifisch wirksame Methylxanthine einbegriffen, welche als Coffeinderivate beim Coffeinabbau im Organismus auftreten und im Harn ausgeschieden werden können. Da wir aber annehmen müssen, daß die Entmethylierung des Coffeins im Organismus gesetzmäßig verläuft, so erhalten wir durch die Methode quantitative Anhaltspunkte von gesetzmäßiger

Größe, die in ihren Komponenten keine besonderen Variablen darstellen und infolgedessen es gestatten, die Probleme der Coffeinausscheidung im Harn in Angriff zu nehmen.

Mit Rücksicht auf die mögliche Komplexheit des jeweils gemessenen Extraktes soll die erhaltene Summe der wirksamen Substanzen im folgenden als „Activ purin“ bezeichnet werden.

Die Versuche.

A. Coffeinum purum per os.

I. 10 mg Coffein in 50 ccm Wasser, per os, Trockenkost. Selbstversuch. Urinportionen stündlich.

1. 40 ccm Harn = $\frac{0,5^*)}{3} = 0,40$ mg Activ purin**).
2. 30 „ „ = $\frac{0,5}{2} = 0,5$ „ „ „
3. 40 „ „ = $\frac{0,5}{1} = 0,12$ „ „ „
4. 30 „ „ = $\frac{0,2}{1} =$ negativ.

II. 20 mg Coffein in 50 ccm Wasser, per os, Trockenkost. Selbstversuch. Urinportionen stündlich.

1. 50 ccm Harn = $\frac{1}{2} = 0,57$ mg Activ purin.
2. 70 „ „ = $\frac{0,5}{3} = 0,40$ „ „ „
3. 40 „ „ = $\frac{0,5}{3} = 0,40$ „ „ „
4. 35 „ „ = $\frac{0,5}{2} = 0,25$ „ „ „
5. 40 „ „ = $\frac{50}{1} =$ negativ.

III. 100 mg Coffein per os in 50 ccm Wasser, Trockenkost, Selbstversuch.

$$\frac{1}{2} \text{ Stunde nach Aufnahme in 60 ccm Harn} = \frac{1}{3,5} = 1 \text{ mg.}$$

IV. 200 mg Coffein per os in 100 ccm Wasser Trockenkost. Selbstversuch.

$$1 \text{ Stunde nach Aufnahme in 60 ccm Harn} = \frac{1}{4} = 1,2 \text{ mg.}$$

*) Bedeutet: Chloroformdestillationsrückstand wurde in 0,5 ccm Ringer aufgelöst. Bis zur Grenzreaktion war eine 3fache Verdünnung notwendig.

**) Berechnung nach der Formel $\frac{0,50 \cdot 3}{3500}$.

V. 100 mg Coffein per os, in 50 ccm Wasser, Trockenkost. Selbstversuch. Urinportionen stündlich bis Nr. 5. Zwischen 5 u. 6 2 Stunden. Wasserstoß von 700 ccm Wasser (in $\frac{1}{4}$ Stunde aufgenommen), 6 Stunden nach Coffeinaufnahme.

$$1. 60 \text{ ccm Harn} = \frac{1}{3} = 0,9 \text{ mg Activ purin.}$$

$$2. 60 \text{ „ „} = \frac{1}{10} = 2,8 \text{ „ „ „}$$

$$3. 70 \text{ „ „} = \frac{1}{3} = 0,9 \text{ „ „ „}$$

$$4. 50 \text{ „ „} = \frac{1}{3} = 0,9 \text{ „ „ „}$$

$$5. 50 \text{ „ „} = \frac{1}{2} = 0,57 \text{ „ „ „}$$

Wasserstoß 700 ccm.

$$6. 190 \text{ ccm Harn} = \frac{0,5}{1} = \text{negativ.}$$

$$7. 230 \text{ „ „} = \frac{0,5}{1} = \text{ „}$$

$$8. 94 \text{ „ „} = \frac{0,5}{1} = \text{ „}$$

VI. 250 mg Coffein in 100 ccm Wasser, per os, Trockenkost. Selbstversuch. Urinportionen bis 4 stündlich. Später unregelmäßig.

$$1. 80 \text{ ccm Harn} = \frac{1}{4} = 1,2 \text{ mg Activ purin.}$$

$$2. 70 \text{ „ „} = \frac{1}{3} = 0,9 \text{ „ „ „}$$

$$3. 164 \text{ „ „} = \frac{1}{11} = 3,1 \text{ „ „ „}$$

$$4. 220 \text{ „ „} = \frac{1}{16} = 4,5 \text{ „ „ „}$$

Mittagessen, ca. 300 ccm Flüssigkeitsaufnahme.

$$\text{nach } 6\frac{1}{2} \text{ Stdn. a. } 220 \text{ ccm Harn} = \frac{1}{6} = 1,7 \text{ mg Activ purin.}$$

$$\text{„ } 8 \text{ „ } 6. 100 \text{ „ „} = \frac{1}{7} = 2 \text{ „ „ „}$$

$$\text{„ } 9\frac{1}{2} \text{ „ } 7. 62 \text{ „ „} = \frac{0,5}{1} = \text{negativ.}$$

Abendessen, ca. 300 ccm Flüssigkeitsaufnahme.

$$8. 190 \text{ ccm Harn} = \frac{0,5}{1} = \text{negativ.}$$

VII. 4 Jahre alter Junge, Gewicht 31 kg. Trockenkost. 100 mg Coffein per os.

1. 50 ccm Harn = $\frac{1}{2}$ = 0,57 mg Activ purin.
2. 60 „ „ = $\frac{1}{8}$ = 2,2 „ „ „
3. 40 „ „ = $\frac{1}{3}$ = 0,9 „ „ „
4. 36 „ „ = $\frac{1}{2}$ = 0,57 „ „ „

Besprechung zu I—VII: Nach 10 mg per os aufgenommen kann bereits deutlich Coffein im Harn nachgewiesen werden (I). Dabei werden ca. 7,2% der eingegebenen Menge als Coffein oder als spezifische Coffeinderivate in 3 Stunden ausgeschieden. Nach 4 Stunden verschwand die Methylxanthinreaktion aus dem Harn. Im Verhältnis zu allen früheren Versuchen sind die Coffeinemengen, deren Nachweis noch im Harn gelingt, außerordentlich gering. 20 mg Coffein (II.) gaben nur gering erhöhte Werte. Bei Aufnahme von 100 mg per os (III.) gelingt die biologische Bestimmung von 1% der Menge schon nach einer $\frac{1}{2}$ Stunde. 200 mg per os (IV.) erhöhten bei Untersuchung des Harn nach einer Stunde die Ausscheidungsmengen kaum. Es zeigt sich also bei diesen Versuchen bereits, daß die Größe der Ausscheidung des Coffeins und der spezifischen Coffeinderivate nicht im gleichen Verhältnis zur Größe der aufgenommenen Mengen wächst, wenn die Diurese nicht eingesetzt hat, wenn also die Urinmengen einigermaßen übereinstimmen. Es fragt sich nun, in welcher Zeit bei gleichmäßigen Harnmengen die Höhe der Ausscheidung liegt, und wann diese endgültig abgeklungen ist. Versuch V. gibt die Höhe der Ausscheidung bei Trockenkost und Aufnahme von 100 mg Coffein nach der zweiten Stunde, und ein endgültiges Verschwinden des Methylanthine 7 Stunden nach der Aufnahme. Die Steigerung der Ausscheidungswerte nach der 2. Stunde (siehe auch VII.) gibt vermutlich das Maximum der Konzentration des resorbierten Coffeins im Blute an. Die Niere ist also noch befähigt, ohne sichtliche Diurese 2,8 mg zur Ausscheidung zu bringen. Bei höheren Gaben, also bei vermutlich höherer Konzentration des Coffeins im Blute, setzt die Diurese ein, auch unter relativ geringer Flüssigkeitszufuhr und sonst gleichmäßigen Lebensbedingungen. So erhielt ich bei Aufnahme von 250 mg Coffein und bei eingehaltener Trockenkost eine deutliche Steige-

zung der Harnflut (VI.) 3—4 Stunden nach Beginn des Versuchs. Parallel mit dieser Diurese geht eine erhöhte Ausscheidung der Methylxanthine im Harn, eine Erscheinung, auf die ich noch in einem speziellen Kapitel zurückkommen werde. Schon nach 9 $\frac{1}{2}$ Stunden verschwindet auch bei diesen hohen Dosen das Coffein aus dem Urin.

B. Coffein Na. benzoic. Subcutan.

VII. Coffein Na. benzoic. 0,25 mg. Suboutan Trockenkost. Selbstversuch. Urinportion stündlich.

1. 70 ccm Harn = $\frac{0,5}{1}$ = negativ
2. 120 „ „ = $\frac{1}{3}$ = 0,9 mg Activ purin.
3. 170 „ „ = $\frac{1}{12}$ = 3,4 „ „ „
4. 50 „ „ = $\frac{0,5}{2}$ = 0,25 „ „ „
5. 40 „ „ = $\frac{0,5}{1}$ = negativ.

VIII. Trockenkost, 7 Jahre alter Junge; Gewicht 38 kg. Subcutan 0,1 Coffein Na. benzoic.

1. 25 ccm Harn = negativ
2. 46 „ „ = $\frac{1}{2}$ = 0,57 mg Activ purin.
3. 60 „ „ = $\frac{1}{4}$ = 1,2 „ „ „
4. 20 „ „ = $\frac{1}{1}$ = 0,28 „ „ „
5. 25 „ „ = $\frac{0,5}{1}$ = negativ.

Besprechung zu VII.—VIII. Die subcutane Applikation des Coffeins als Coffein. Na. benzoic. hat unter Berücksichtigung der tatsächlichen Coffeinzufuhr keinen besonderen Einfluß auf die Höhe der Ausscheidungswerte oder auf die Dauer der Ausscheidung im Verhältnis zur Aufnahme per os. Bemerkenswert ist aber bei beiden Versuchen, daß ich nach einer Stunde nach der Injektion noch keine Methylxanthinreaktion im Harne erhielt, im Gegensatz zu den Ausscheidungsbedingungen des Coffeins in allen anderen Versuchsanordnungen. Wir müssen daraus schließen, daß die Resorptionsbedingungen des Coffeins bei subcutaner Applikation seines Salzes schlechter sind als bei der Aufnahme per os.

C. Coffein nach Kaffeetrinken.

IX. Dünner Kaffee, in 450 ccm wurden nach meiner Methode 75 mg Coffein bestimmt. Urinportionen stündlich.

1. 85 ccm Harn = $\frac{1}{4} = 1,2$ mg Activ purin.
2. 40 = $\frac{1}{2} = 0,6$ "
3. 62 = $\frac{1}{6,5} = 1,8$ "
- 80 = $\frac{1}{4,5} = 1,3$ "
5. 50 = $\frac{0,5}{2} = 0,25$ "
6. 50 = $\frac{0,5}{1} = \text{negativ.}$

X. Stärkerer Kaffee, in 450 ccm wurden 200 mg Coffein bestimmt. Urinportion stündlich.

1. 160 ccm Harn = $\frac{1}{9} = 2,5$ mg Activ purin.
2. 212 = $\frac{1}{20} = 5,6$ "
3. 300 = $\frac{1}{30} = 8,5$ "
4. 72 = $\frac{1}{17} = 4,8$ "
5. 46 = $\frac{1}{7} = 2$ "
6. 50 = $\frac{0,5}{2} = 0,25$ "
7. 32 = $\frac{0,25}{1} = \text{negativ.}$

Besprechung zu IX.—X.: Der qualitative Nachweis des Coffeins im gesammelten Harn nach Einnahme größerer Mengen von Kaffee wurde von Aubert und Schneider einwandfrei geführt. In meinen Versuchen zeigte es sich aber, daß auch ein schwacher Coffeingehalt des Kaffees (IX.) sehr deutlich in den einzelnen Urinportionen nachweis-

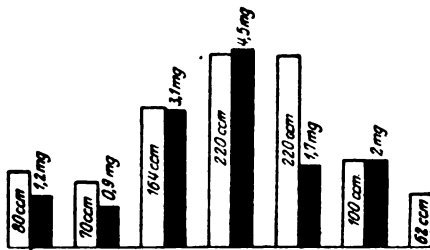


Abb. 1.

bar wird, daß weiterhin bei stärkeren Dosen mit der einsetzenden Diurese größere Mengen der Substanz im Harn er-

scheinen. Es ist fernerhin auffallend, daß die Ausscheidungsbedingungen der Methylxanthine nach stärkeren Kaffeegaben sich günstiger gestalten als bei Aufnahme des Coffeins in reiner Substanz (Abb. 1 und 2). Schon nach 5 Stunden bekam ich hier etwas über 10% der eingegebenen Coffeinemenge im Harn. Ob diese günstigeren Ausscheidungsbedingungen auf ein andersartig verlaufenden Abbauprozess des Kaffee-Coffeins im Sinne einer längeren Anwesenheit des unzerstörten Coffeins im Organismus beruhen, läßt sich nicht entscheiden.

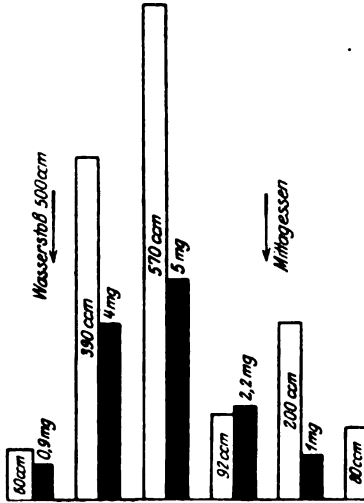


Abb. 2

D. Coffein in Dampfform.

XI. Rauchversuch. 4 g coffeinhaltiger Tabak (5% Coffein), Trockenkost, Urinportionen stündlich.

1. 134 ccm Harn = $\frac{1}{8} = 2,2$ mg Activ purin.
2. 36 „ „ = $\frac{1}{4} = 1,1$ „ „ „
3. 42 „ „ = $\frac{0,5}{2} = 0,25$ „ „ „

XII. Rauchversuch. 4 g coffeinhaltiger Tabak (5% Trockenkost)

1. 180 ccm Harn = $\frac{1}{3,5} = 1$ mg Activ purin.
2. 320 „ „ = $\frac{1}{7} = 2$ „ „ „
3. 120 „ „ = $\frac{0,5}{4} = 0,57$ „ „ „
4. 40 „ „ = $\frac{0,5}{1} = \text{negativ}$.

XIII. Rauchversuch. 7 g Zigaretten (2% Coffein). Urinportion stündlich. Trockenkost.

1. 156 ccm Harn = $\frac{1}{8} = 2,2$ mg Activ purin.
2. 54 „ „ = $\frac{1}{3,5} = 1$ „ „ „

$$3. \quad 70 \text{ ccm Harn} = \frac{1}{2} = 0,57 \text{ mg Activ purin.}$$

$$4. \quad 45 \text{ „ „} = \frac{0,5}{1} = \text{negativ.}$$

Besprechung zu XI.—XIII.: Nach den Untersuchungen von F. Netolitzky, der den Rauch der in England gebräuchlichen Teezigarette durch eine mit Wasser umspülte Glasröhre vermittle einer Wasserstrahlpumpe durchsaugte und die kondensierbaren Bestandteile des Rauches zur quantitativen Bestimmung des Coffeins auffing, konnten aus dem Rauch durchschnittlich 50% Coffein gewonnen werden. Es wurde bisher aber nicht bewiesen, ob dieser coffeinhaltige Rauch in den Luftwegen resorbiert wird, ob also die Teezigarette tatsächlich als Coffein-geußmittel eine Berechtigung hat. Ich unternahm aus diesem Grunde ausgiebige Rauchversuche mit coffeinhaltigem Tabak und Coffein-Zigaretten, die von der Firma Chemische Industrie

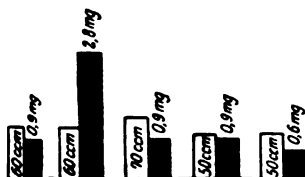


Abb. 3.

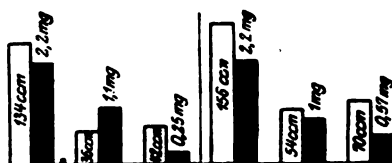


Abb. 4.

Abb. 5.

Phönix in Hamburg*) dem Institut freundlichst überlassen wurde. Der Tabak hatte einen Coffeingehalt von 5%, die Zigarette von 2%. Schon die diuretische Wirkung in den Rauchversuchen, die ich stets nach Trockenkost beobachten konnte, gaben mir dafür Anhaltspunkte, daß eine Resorption von Coffein aus dem Rauche im Organismus stattfinden muß. Die Ausscheidungsmengen des derartig aufgenommenen Coffeins waren nun tatsächlich beträchtlich. Nehmen wir für meine Versuche nach Netolitzky als die untere Grenze des Coffeingehaltes im Rauch den Wert von 25% an, so kommen Coffeinmengen von 70 mg bis 100 mg für die Coffeinresorption in der vorliegenden Versuchsreihe in Betracht. Tatsächlich beweisen nun die im Harn gefundenen Mengen der Methylxanthine, daß eine ziemlich vollständige Resorption des im Rauch vorhandenen Coffeins statt-

*) Die Coffeinisierung des Tabaks erfolgt nach einem DRP. Nr. 328 388 Kl. 79c. Es scheint demnach, daß das Coffeinrauchen aktuellere Bedeutung erlangen könnte.

finden muß. Abb. 3—5 geben diese Ausscheidungsbedingungen des im Rauch aufgenommenen Coffeins im Verhältnis zu annähernd gleichen Mengen dieser Substanz bei anderen Formen der Einverleibung wieder.

Es wird bei Vergleich besonders auffällig, wie bei den Rauchversuchen meist sofortige Diurese einsetzt, parallel mit dem Ausscheidungsgipfel der Methylxanthine, gewiß ein Anhaltspunkt dafür, daß die Resorption im Rauch besonders schnell vonstatten geht.

Die Coffeinausscheidung und Diurese.

In den vorliegenden Versuchen zeigte sich die interessante Tatsache, daß mit erhöhter Diurese die Ausscheidungsgröße der Methylxanthine in den einzelnen Harnportionen steigt (siehe bes. auch Abb. 1, 2, 4 und 5). Besonders instruktiv wird diese Beobachtung durch die Einschaltung eines Wasserstoßes eine Stunde nach Aufnahme des Coffeins.

Versuch XIV. 100 mg Coffein in 50 ccm Wasser, per os, Trockenkost, Selbstversuch. Wasserstoß 500 cm in 10 Minuten getrunken nach einer Stunde. Urinportion stündlich.

$$1. \quad 60 \text{ ccm Harn} = \frac{1}{3} = 0.9 \text{ mg Activ purin.}$$

Wasserstoß 500 ccm

$$2. \quad 390 \text{ ccm Harn} = \frac{1}{14} = 4 \text{ mg Activ purin.}$$

$$3. \quad 570 \text{ „ „} = \frac{1}{17.5} = 5 \text{ „ „ „}$$

$$4. \quad 92 \text{ „ „} = \frac{1}{8} = 2.2 \text{ „ „ „}$$

Mittagessen, etwa 300 ccm Flüssigkeit.

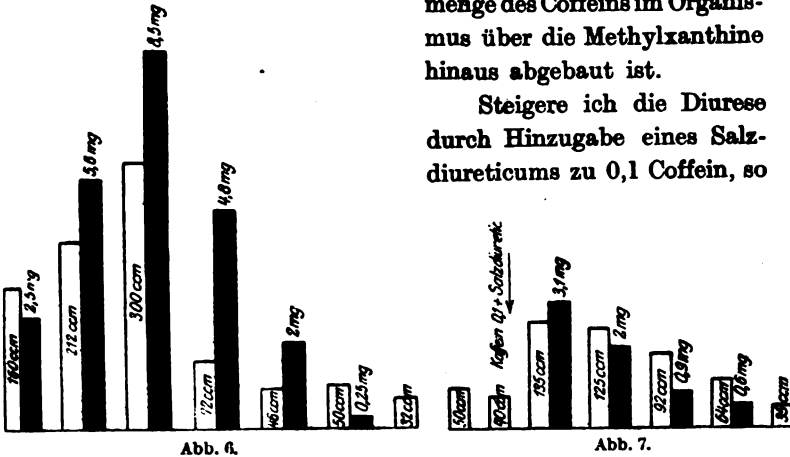
$$\text{Nach } 5\frac{1}{2} \text{ Stdn. } 5. \quad 200 \text{ ccm Harn} = \frac{1}{3.5} = 1 \text{ mg Activ purin.}$$

$$\text{„ } 6\frac{1}{2} \text{ „ } 6. \quad 80 \text{ „ „} = \frac{0.5}{1} = \text{negativ.}$$

Wir erhalten durch diesen Wasserstoß bei 100 mg Coffein per os eine Ausscheidungsgröße von etwa 13% der aufgenommenen Substanz, während wir bei Trockenkost (Versuch V.) nur etwa 6% nachweisen konnten. Die Gegenüberstellung von Abb. 3 und Abb. 6 gibt von diesen Bedingungen eine gute Vorstellung. Setzt der Wasserstoß aber um eine Zeit ein, in der die Coffeinausscheidung im Harn bereits aufgehört hatte (Versuch V), so gelingt es

nicht mehr, die geringsten Mengen der Substanz noch auszu-schwemmen. Wir müssen annehmen, daß tatsächlich um diese Zeit (also nach etwa 7 Stunden) bei der gegebenen Dosis die Hauptmenge des Coffeins im Organismus über die Methylxanthine hinaus abgebaut ist.

Steigere ich die Diuresis durch Hinzugabe eines Salzdiureticums zu 0,1 Coffein, so



erhalte ich dieselbe Erscheinung der Parallelität von Coffeinausscheidung und gesteigerten Harnmengen (Versuch XV, Abb. 7).

Versuch XV. Coffein 0,1 g gemeinsam mit einem Salzdiureticum in 20 ccm Flüssigkeit. Trockenkost. Selbstversuch. Urinportion stündlich.

1. 50 ccm Harn
2. 40 „ „

Aufnahme von Coffein + Salzdiureticum

3. 135 ccm Harn = $\frac{1}{11} = 3,1$ mg Activ purin.
4. 125 „ „ = $\frac{1}{7} = 2$ „ „ „
5. 92 „ „ = $\frac{1}{3} = 0,9$ „ „ „
6. 64 „ „ = $\frac{1}{2} = 0,6$ „ „ „
7. 35 „ „ = $\frac{0,25}{1} =$ negativ.

Wir müssen nun annehmen, daß bis zu einem gewissen Grade die Ausscheidungsgrößen des Coffeins im Harn einen Ausdruck für dessen Konzentrationsverhältnisse im Blute be-

deuten Das gilt aber, wie diese Versuche beweisen, nur bei einigermaßen gleichen Wassergehalt des Organismus. Bei künstlich gesetzter Hydrämie erhalten wir auch nach kleinen Dosen Ausscheidungswerte des Coffeins, welche denen nach großen Gaben gleichkommen (Versuch XIV). Es findet also in solchen Fällen eine Ausschwemmung des Coffeins aus dem Organismus statt.

Interessant ist ferner die Beobachtung, daß bei Versuch XIV die Harnflut auf den Wasserstoß hin nach ca. 4 Stunden über das doppelte der aufgenommenen Flüssigkeitsmengen betrug. Dosen von 0,1 g Coffein per os hatten bei mir in Vorversuchen niemals eine Diurese erzeugt, sobald ich auf Trockenkost oder auf mittlere Flüssigkeitsmengen gesetzt war. Die plötzliche Hydrämie verleiht also bereits kleinen Dosen von Coffein die Fähigkeit zu exzessiver diuretischer Wirkung. Wird der Wasserstoß aber an das Ende der Coffeinausscheidung gelegt, sind also kaum noch Coffeinmengen im kreisenden Blute, so verläuft die Ausscheidung der aufgenommenen Menge Wassers bedeutend langsamer, ihre Menge hält sich in den Grenzen des Normalen. Damit ist sehr nachdrücklich dargetan, wie die diuretische Wirkung des Coffeins von den beiden Faktoren abhängig ist: von dem Konzentrationsverhältnis des Coffeins im Blute und von dem augenblicklich mobilen Wasservorrat des Organismus.

Bei allen diesen Versuchen ist fernerhin zu beobachten, daß die Werte der Coffeinausscheidung nicht absolut proportional mit der Steigerung der einzelnen Harnmengen verlaufen, daß also das Konzentrationsverhältnis des Coffeins im Urin mit Anwachsen der Harnmengen sinkt. Im Versuch V haben wir bei Trockenkost und bei Aufnahme von 0,1 g Coffein per os eine Ausscheidung von 2,8 mg Coffein in 60 ccm Harn, also eine Konzentration des Coffeins im Harn von 1 : 22 000. Diese Konzentrationszahl scheint nun aber eine besondere Leistung der Niere zu bedeuten. Sie ist in diesem Fall wohl dadurch gegeben, daß zwar relativ große Mengen von Coffein im Blute zirkulieren, daß diese aber infolge der Trockenkost noch nicht imstande sind, eine die Ausscheidung begleitende Diurese zu erzeugen. Im Versuch VI wird die Diurese bei Trockenkost durch größere Mengen Coffeins gewissermaßen erzwungen, hier sinkt dann auf der Höhe der Harnflut das Konzentrationsverhältnis des Coffeins im Harn auf den Wert von etwa 1 : 50 000. Diese Verhältniszahl liegt anscheinend innerhalb

der von der Niere bevorzugten Ausscheidungskonzentration des Coffeins überhaupt. Wir haben sie ziemlich konstant in einer großen Anzahl der Versuche. Entsteht durch plötzliche Wasserzufuhr aber eine Hydrämie, so sinkt das Konzentrationsverhältnis des Coffeins im vermehrten Harn auf etwa 1:100 000.

Die Niere hat also anscheinend das Bestreben, das Coffein oder seine spezifische Derivate in möglichst niedrigen Konzentrationen im Harn auszuscheiden. Die Coffeindiurese bedeutet einen zweckmäßigen Weg dazu.

Coffeinausscheidung und Coffeinzerstörung.

Rost¹⁴⁾ fand beim Kaninchen nach innerlicher Aufnahme des Coffeins, daß nach den ersten 24 Stunden noch Coffeinmengen ausgeschieden werden, und daß diese Ausscheidung noch einige Tage andauern kann. Meine Versuche am Menschen sprechen sehr entschieden dafür, daß wir es im menschlichen Organismus mit einem besonders schnellen Abbau des Coffeins über die spezifischen Methylxanthine hinaus zu tun haben. Wenn wir z. B. im Versuch V am Ende der Coffeinausscheidung durch einen Wasserstoß 6 Stunden nach Coffeinaufnahme auch nicht mehr die geringsten Mengen der aufgenommenen Substanz herauschwemmen können, so beweist dies, wie schon oben erwähnt, eindringlich, daß die Zerstörung des Coffeins um diese Zeit in der Hauptsache erfolgt sein muß. Infolge der Empfindlichkeit meiner Methode können wir dann nicht mehr annehmen, daß infolge Stapelung dieser Substanz im Organismus ganz kleine Mengen von Coffein auf längere Zeit hinaus zur Ausscheidung gelangen. Trotzdem also z. B. das Kaninchen nach der Untersuchung von Rost im Verhältnis zum Menschen größere Coffeinmengen in gleichen Zeiten auszuscheiden vermag, so verschwindet seine Fähigkeit zur Ausscheidung der Substanz erst nach einigen Tagen. Diese große Abweichung in der Ausscheidungszeit muß meines Erachtens durch die langsamere Zerstörung des Coffeins im Kaninchenorganismus bedingt sein. Es sind also nur zum geringeren Teil die Diureseverhältnisse, welche die Ausscheidungszeit und damit auch die gesamte Ausscheidungsmenge bei den einzelnen Tierarten regeln, wie Rost vermutet hat, in der Hauptsache wohl muß dafür die verschiedenartige Schnelligkeit des Coffeinabbaues herangezogen werden.

Coffeinausscheidung und Coffeingewöhnung.

An sich widerspricht es dem Charakter eines bewährten Genußmittels, daß eine Gewöhnung an dieses im Sinne einer erhöhten Zerstörungsfähigkeit eintreten könnte, wie wir es beim Morphin kennen. Bock und Bech Larsen⁴⁾ beweisen denn auch durch ihre chemischen Analysen von Tierleichen, daß diese supponierte erhöhte Zerstörungsfähigkeit des Coffeins nach chronischer Aufnahme der Substanz beim Tiere nicht stattfindet. Ich habe zur Klärung dieser Frage 2 Kinder, die vorher niemals Coffein in reiner Substanz oder als Genußmittel erhalten hatten, dasselbe per os und subcutan gegeben und dabei keine größeren Abweichungen der Coffeinausscheidung im Vergleich zu meinen Selbstversuchen gesehen. Da ich Coffein als Genußmittel seit langen Jahren in größeren Dosen gebrauche, sprechen die parallelen Ausscheidungsbedingungen der beiden Versuchungsreihen gegen einen veränderten Abbau durch Gewöhnung.

Zusammenfassung.

1. Die von mir ausgearbeitete biologische Methode gestattet es, außerordentlich geringe Mengen von Coffein überhaupt quantitativ nachzuweisen. Die unterste Grenze der Bestimmbarkeit des Coffeins liegt ungefähr bei 0,00007 g.

2. Die nach Aufnahme von Coffein im Harn nachgewiesenen Ausscheidungswerte können wahrscheinlich nicht für die Coffeinausscheidung allein in Anspruch genommen werden. Es besteht die Möglichkeit, daß noch wirksame Methylxanthine in diesen quantitativen Anhaltspunkten einbegriffen sind, die durch Abbau des Coffeins im Organismus entstehen und im Chloroformextrakt aufgenommen, dieselbe biologische Reaktion aufweisen. Trotzdem erhalten wir durch die Methode einen wichtigen Einblick in die zeitlichen Ausscheidungsbedingungen der Substanz.

3. Die Höhe der Ausscheidung des Coffeins in den einzelnen Harnportionen ist zu einem gewissen Teil abhängig von der Menge des Harnes selbst. Gesteigerte Diurese ruft gesteigerte Coffeinausscheidung hervor.

4. Die Ausscheidungsmengen verhalten sich aber nicht absolut proportional zu den Harnmengen. Die Niere hat anschei-

nend die Neigung, daß Coffein in möglichst niedrigen Konzentrationen auszuschcheiden. Während wir bei der Trockenkost die höchsten Coffeinkonzentrationen in den einzelnen Harnportionen erhalten, fallen die Werte der Konzentration mit der Diurese stark ab.

5. Die diuretische Wirkung des Coffeins ist nur zum Teil abhängig von der Größe der eingegebenen Dosis, also von seiner wahrscheinlichen Konzentration im Blute. Zum anderen Teil aber wird sie bestimmt durch den Wassergehalt des Organismus. Bei Hydrämie genügen schon sehr kleine Dosen zu exzessiver diuretischer Wirkung.

6. Die geringsten Mengen per os aufgenommenen Coffeins, die im Harn noch nachweisbar werden, liegen bei 10 mg reiner Substanz.

7. Auch bei relativ geringen Kaffeegaben ist das Coffein im Harn bestimmbar.

8. Subcutane Applikation des Coffeins als Coffein. Nat. benz. hat die Besonderheit eines späten Erscheinens der Methylxanthine im Harn. Die Resorptionsbedingungen subcutaner Coffeinjektionen scheinen also schlechter zu sein als die Bedingungen der Aufsaugung nach Gaben per os.

9. Coffein wird auch beim Rauchen coffeinhaltigen Tabaks resorbiert. Die Ausscheidungswerte des so aufgesaugten Coffeins sprechen für eine schnelle und ziemlich vollständige Resorption des in den Rauch übergehenden Coffeins.

10. Das Verschwinden der Coffeinausscheidung im Harn bei allen Versuchen geschah auffallend rasch. Wir müssen daher einen schnellen Abbau des Coffeins in dem menschlichen Organismus über die Methylxanthine hinaus annehmen.

11. Eine Coffeingewöhnung im Sinne einer erhöhten Coffeinzerstörung bei chronischer Aufnahme besteht nicht.

Literatur.

- ¹⁾ Ach, N., Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **43**, 305. 1900. —
²⁾ Albanese, M., Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **35**, 456. 1895.
 — ³⁾ Aubert, H., Arch. f. d. ges. Physiol. **5**, 626. 1872. — ⁴⁾ Bock, J.,
 und Bech Larsen, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **81**, 15. 1917.
 — ⁵⁾ Bondzynski, St., und R. Gottlieb, Arch. f. experim. Pathol. u.

- Pharmakol. **36**, 54. 1895. — ⁶) Burian und Schur, Arch. f. d. ges. Physiol. **80**, 321. 1900. — ⁷) Dreser, H., Arch. f. d. ges. Physiol. **102**, 1. 1904. — ⁸) Johannsen, O., Über die Wirkung des Coffeins. Diss. Dorpat 1869. — ⁹) Krüger, M., Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **32**, 2818. 1899. — ¹⁰) Krüger, M., und P. Schmidt, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **32**, 2677. 1899. — ¹¹) Lendrich und Nottbohm, Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **17**, 241. 1909. — ¹²) Levinthal, W., Zeitschr. f. phys. Chemie **77**, 259. 1912. — ¹³) Netolitzky, F., Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **6**, 982. 1903. — ¹⁴) Rost, E., Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **36**, 62. 1895. — ¹⁵) Schmiedeberg, O., Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **2**, 2. 1874. — ¹⁶) Schmiedeberg, O., Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **35**, 2550. 1901. — ¹⁷) Schneider, R., Über das Schicksal des Coffeins und Theobromins im Tierkörper. Diss. Dorpat 1834. — ¹⁸) Secher, K., Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **77**, 83. 1914.
-

**Beiträge zum Studium der Giftwirkung.
Über die Wirkung des Chinins auf Invertase.**

Von
Peter Rona und Ernst Bloch.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des städt. Krankenhauses am Urban,
Berlin.)

(Eingegangen am 25. März 1921.)

Mit 16 Abbildungen im Text.

I. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Chininwirkung.

1. Die Einwirkung des Chinins auf Invertase ist bereits im Jahre 1875 von Nasse¹⁾ studiert worden. Nach ihm beschäftigten sich Duclaux²⁾ und v. Euler und Svanberg³⁾ mit derselben Frage, ohne jedoch genügende Rücksicht auf die Wasserstoffionenkonzentration des Systems zu nehmen. Da diese jedoch nicht nur für die Fermentwirkung entscheidend ist, sondern auch für die Chininwirkung, bestehen in den Befunden der erwähnten Forscher manche Unstimmigkeiten, die durch die folgenden Untersuchungen ihre Aufklärung finden.

Wir benutzten zu unseren Versuchen Hefeinvertase. Zu ihrer Gewinnung wurden 500 g Hefe mit etwa 1200 ccm dest. Wasser und 10 ccm Chloroform verrührt, 3 Tage stengelassen, dann mit Essigsäure schwach angesäuert, mit Kaolin durchgeschüttelt, durch ein Faltenfilter filtriert. Die so gewonnene Invertaselösung wurde im Eisschrank aufbewahrt.

¹⁾ Arch. f. d. ges. Physiol. 11, 138. 1875; vgl. auch die Dissertation von Baum (Rostock 1892), Zur Lehre vom Antagonismus.

²⁾ Traité de Microbiologie 2, 379. 1899.

³⁾ Fermentforschung 4, 1. 1920. Von weiteren Untersuchungen über Chininwirkung auf Fermente seien erwähnt: Wollberg (Pepsin.) Arch. f. d. ges. Physiol. 22, 291. 1880; Gromow und Grigoriew (Zymase.) Zeitschr. f. physiol. Chemie 42, 299. 1904; Laqueur (Autolyse.) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 55, 240. 1906.

Es wurde mit 3 Fermenten (F_1 , F_2 undialysiert, F_3 dialysiert) gearbeitet, deren Wirksamkeit entsprechend dem verschiedenen Reinheitsgrade etwas verschieden war. — Als Substrat wurde eine etwa 10proz. Rohrzuckerlösung verwandt. Da die Gesamtmenge des Versuchsgemisches (wenn nicht anders angegeben) 60 ccm betrug, war die Konzentration des Rohrzuckers in dem Versuch etwa 5%. Die Spaltung verlief im Wasserbade bei 30°. Die fermentative Spaltung wurde verfolgt, indem sofort bei Beginn des Versuches, dann zu bestimmten Zeiten 10 ccm dem Versuchsgemisch entnommen und mit 2 ccm gesättigter Sodalösung versetzt wurden¹⁾. Die Differenz des Drehungswinkels bei sofortiger und zur Zeit t vorgenommener Ablesung im Polarimeter ist das Maß für die Zuckerspaltung in der Zeit t . Bis zu einem Umsatz, der etwa $\frac{1}{5}$ des theoretisch möglichen Umsatzes beträgt, läßt sich der Verlauf der Spaltung durch die Formel $k = \frac{x}{t}$ mit genügender Genauigkeit wiedergeben²⁾. Die Konstante k wurde als Mittel von 3–4 gut übereinstimmenden Werten genommen. — Als Maß der Invertasevergiftung wurde die prozentuelle Hemmung, berechnet nach der Formel $h = \frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$ benutzt, worin k_0 die Konstante ohne, k_1 die Konstante mit Chininzusatz bedeutet.

Als Stammlösung des Chinins wurde eine $\frac{1}{20}$ Mol.-Lösung von Chininum hydrochloricum benutzt. Bei Sodazusatz fällt die Chininbase aus und muß (am besten bei Anwendung mehrfach zusammengelegten Filterpapiers) abfiltriert werden. Wie Kontrollversuche zeigten, tritt eine Alkalisplaltung des Rohrzuckers in den in Betracht kommenden Zeiten nicht ein. — Die H-Ionenkonzentration wurde durch Puffergemische (meist Phosphat- in wenigen Fällen Acetatgemische) konstant gehalten. Die Bestimmung der [H] erfolgte — vor dem Chininzusatz³⁾ — stets elektrometrisch. Die einzelnen Bestandteile des Gemisches wurden vor dem Zusammenmischen auf die gewünschte Temperatur vorgewärmt.

Um den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration zu prüfen, wurden zunächst mit drei verschiedenen Pufferlösungen drei Doppelversuche mit der gleichen Chininkonzentration ausgeführt. Bei diesen Versuchen wurde der Rohrzucker dem Gemisch (1 ccm $\frac{1}{20}$ Mol.-Chininlösung, 5 ccm $\frac{1}{3}$ Mol.-Phosphatlösung) gleich zugesetzt, vorgewärmt, während die Invertaselösung (2 ccm von F_3) zuletzt zugefügt wurde.

Den Verlauf des Versuches zeigt Tabelle I.

¹⁾ Vgl. L. Michaelis und M. Menten, diese Ztschr. 49, 333. 1913.

²⁾ Vgl. L. Michaelis und M. Menten l. o.

³⁾ Chinin vergiftet die Platinelektroden. Auch die Messung mittels Indikatoren führt bei Chiningegenwart zu ungenauen Ergebnissen. Vgl. hierzu L. Michaelis, diese Ztschr. 106, 83 und L. Michaelis und A. Gveman, diese Ztschr. 109, 165. 1920.

Tabelle I.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator		Geschwindigkeits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		Natriumphosphat primäres : sekundäres ccm	p_H		
1	—	4,5 : 0,5	5,53	0,0302	—
2	0,05	4,5 : 0,5	5,53	0,0202	33
3	—	3 : 2	6,38	0,0189	—
4	0,05	3 : 2	6,38	0,0103	45
5	—	0,5 : 4,5	7,85	0,0049	—
6	0,05	0,5 : 4,5	7,85	0,00	100

Wie man sieht, ist die hemmende Wirkung des Chinins bei den verschiedenen p_H verschieden. Bei derselben Chininkonzentration betrug sie bei p_H 5,53 33%, bei p_H 6,38 45%, bei p_H 7,85 100%.

Diese Verhältnisse zeigen eingehender die folgenden 13 Versuchsreihen.

Tabelle II.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator		Geschwindigkeits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		Phosphat primäres : sekundäres ccm	p_H		
1	0	4 : 1	6,03	0,015	—
2	0,3	4 : 1	6,03	0,0114	23,6

Tabelle III.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator		$k = \frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		Acetatgemisch Essigsäure : Acetat ccm	p_H		
1	0	4 : 1	4,15	0,0166	—
2	0,30	4 : 1	4,15	0,0144	13,4
3	0	2,5 : 2,5	4,86	0,0155	—
4	0,30	2,5 : 2,5	4,86	0,0128	17,3
5	0	1 : 4	5,29	0,0162	—
6	0,3	1 : 4	5,29	0,0123	24,1

Tabelle IV.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator		Geschwindigkeits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		Phosphat primäres : sekundäres ccm	p_H		
1	0	3,5 : 2,0	6,48	0,0141	—
2	0,30	3,5 : 2,0	6,48	0,0093	34
3	0	1 : 4	7,40	0,0117	—
4	0,30	1 : 4	7,40	0,0034	70,9

Tabelle V.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator		Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		Acetatgemisch Essigsäure : Natriumacetat ccm	p_H		
1	0	0,5 : 4,5	5,85	0,0146	—
2	0,3	0,5 : 4,5	5,85	0,0091	37,6

Tabelle VI.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator		Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		Phosphat primäres : sekundäres ccm	p_H		
1	0	3,1 : 1,9	6,78	0,0152	—
2	0,30	3,1 : 1,9	6,78	0,0089	41,4
3	0	0,5 : 4,5	7,66	0,0113	—
4	0,30	0,5 : 4,5	7,66	0,0029	74,3

Tabelle VII.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator		Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		Phosphat primäres : sekundäres ccm	p_H		
1	0	3 : 2	6,96	0,0149	—
2	0,3	3 : 2	6,96	0,0093	37,6
3	0	3,2 : 1,8	6,82	0,0138	—
4	0,3	3,2 : 1,8	6,82	0,0083	39,9
5	0	3,4 : 1,6	6,68	0,0145	—
6	0,3	3,4 : 1,6	6,68	0,0101	30,3

Tabelle VIII.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator		Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		Phosphat primäres : sekundäres ccm	p_H		
1	0	2,8 : 2,2	7,02	0,0143	—
2	0,3	2,8 : 2,2	7,02	0,0068	52,4
3	0	2,6 : 2,4	7,11	0,0132	—
4	0,3	2,6 : 2,4	7,11	0,0063	52,3

Tabelle IX.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator		Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		Phosphat primäres : sekundäres ccm	p_H		
1	0	3 : 2	7,23	0,0121	—
2	0,3	3 : 2	7,23	0,0046	62
3	0	3,2 : 1,8	7,30	0,0121	—
4	0,3	3,2 : 1,8	7,30	0,0047	61,2
5	0	3,5 : 1,5	7,39	0,0120	—
6	0,3	3,5 : 1,5	7,39	0,0023	80,8

Tabelle X.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator		Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		Phosphat primäres : sekundäres ccm	p _H		
1	0	3,6 : 1,4	6,43	0,0149	—
2	0,3	3,6 : 1,4	6,43	0,0105	29,5
3	0	4,5 : 0,5	5,68	0,0148	—
4	0,3	4,5 : 0,5	5,68	0,0128	13,5

Tabelle XI.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator		Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		Phosphat primäres : sekundäres ccm	p _H		
1	0	4,9 : 0,1	3,93	0,0152	—
2	0,3	4,9 : 0,1	3,93	0,0141	7,2
3	0	0,1 : 4,9	7,83	0,0078	—
4	0,3	0,1 : 4,9	7,83	0,0022	71,8

Tabelle XII.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator		Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		Phosphat primäres : sekundäres ccm	p _H		
1	0	4,7 : 0,3	5,00	0,0148	—
2	0,3	4,7 : 0,3	5,00	0,0125	15,5
3	0	3,8 : 1,2	6,34	0,0148	—
4	0,3	3,8 : 1,2	6,34	0,0104	29,7
5	0	0,3 : 4,7	7,54	0,0083	—
6	0,3	0,3 : 4,7	7,54	0,0015	81,9

Tabelle XIII.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator		Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		Acetatgemisch Essigsäure : Natriumacetat ccm	p _H		
1	0	4 : 1	4,07	0,0119	—
2	0,3	4 : 1	4,07	0,0113	5
3	0	2,5 : 2,5	4,66	0,0134	—
4	0,3	2,5 : 2,5	4,66	0,0106	20,9
5	0	1 : 4	5,23	0,0126	—
6	0,3	1 : 4	5,23	0,0094	25,4

Tabelle XIV.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator		Geschwindigkeits-Konst. $\frac{v}{i}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		Phosphat primäres : sekundäres ccm	p _H		
1	0	0,5 : 4,5	8,17	0,0056	—
2	0,3	0,5 : 4,5	8,17	0,0008	85,3
3	0	0,2 : 4,8	4,65	0,0128	—
4	0,3	0,2 : 4,8	4,65	0,0109	14,8

Gesamtvolumen bei diesen Versuchen 60 ccm. Benutzt wurde das schwachwirkende Ferment F₁, wovon in den Versuchen 2 und 14 10 ccm, in den anderen 12 ccm zugefügt wurden. Das Ferment wurde dem Gemisch zuletzt zugefügt.

Die Ergebnisse aller 13 Versuche sind in der Abb. 1 graphisch dargestellt. Wie man sieht, findet ein kontinuierliches Ansteigen der Chininwirkung mit wachsendem p_H statt. Dieser Befund stimmt mit den Erfahrungen überein, die man über die Giftigkeit von Alkaloidlösungen auf Zellen und Gewebe bereits vielfach gemacht hat¹⁾ und die diese Giftigkeit mit der Wirkung der freien Alkaloidbase in Zusammenhang gebracht haben. Die mitgeteilte Kurve hat die Form einer Dissoziationskurve und entspricht der mit steigendem p_H zunehmenden Dissoziation des Chininsalzes.

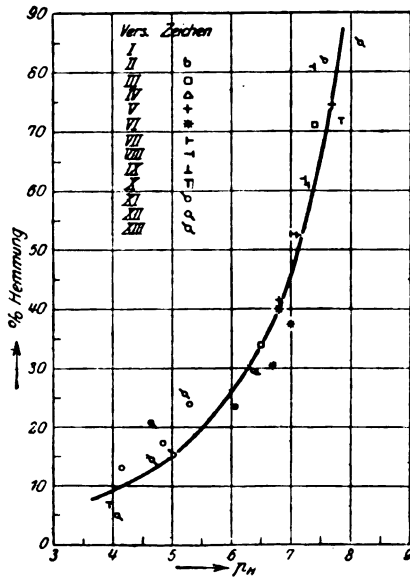


Abb. 1.

2. Chininwirkung auf Paramäcien.

Die Befunde, die wir bei der Chininwirkung auf Invertase bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration erhoben haben, wollten wir auch bei einem einzelligen Lebewesen prüfen und wählten dazu Paramäcien, da neuerdings u. a. auch Neuschloz²⁾ ge-

¹⁾ Vgl. Seite 193.

²⁾ Arch. f. d. ges. Physiol. 176, 223. 1919.

zeigt hatte, daß diese Infusorien sich zu ähnlichen Untersuchungen gut eignen. Die Paramäcien wurden aus einem Heuinfus gewonnen, ein einziges Exemplar von *Paramäcium aurelia* isoliert und in aus sterilisiertem Heu gewonnenen Infusen fortgezüchtet, so daß wir also mit einer reinen Linie, einer Individualkultur, arbeiteten¹⁾. Die Mikroorganismen wurden in mit Wattetau verschlossenen Erlenmeyerkölbchen gehalten und alle 2—3 Tage auf frischen Nährboden überimpft. Zur Prüfung der Chininwirkung wurden die Paramäcien abzentrifugiert, in etwa 5—10 ccm destilliertem Wasser suspendiert, die Suspension auf Reagensgläser verteilt so, daß auf jedes Reagensglas 1 ccm der Paramäcium-Aufschwemmung kam, und dann mit der Chininlösung zu gleichen Teilen zusammengebracht. Benutzt wurde Chininum hydrochloricum. Der Vergiftungsvorgang wurde unter dem Mikroskop verfolgt.

Auffallend war zunächst die außerordentlich verschiedene Resistenz der einzelnen Individuen gegenüber dem Chinin²⁾. Auf die zeitlichen Unterschiede im Absterben der Paramäcien bei Einwirkung von Giften ist auch von Barratt³⁾ und von Neuschlosz⁴⁾ hingewiesen worden. Es handelt sich dabei um ein allmähliches Absterben der Paramäcien, so daß zunächst nur einige Exemplare gelähmt werden, die Anzahl der gut beweglichen Paramäcien allmählich abnimmt und zuletzt nur einige Exemplare mit stark verlangsamter Bewegung übrigbleiben, die zuletzt der völligen Lähmung verfallen. Je nach der Konzentration der Chininlösung tritt nun das Absterben schnell ein oder es vergeht eine scheinbar wirkungslose Zeit, in der das Gift möglicherweise in den Zellen gespeichert wird. Da uns daran lag, Vergleichswerte zu bekommen, mußten wir die Resultate einigermaßen quantitativ festlegen. Zu diesem Zwecke haben wir die Zahl der noch lebenden Paramäcien im Gesichtsfelde abgeschätzt und auf Grund dieser Zählung den Wirkungsgrad des Chinins bemessen.

Die ausführlichen Versuchsreihen, die sich mit dem Schwellenwert der Giftkonzentration beschäftigt haben, wollen wir hier

¹⁾ Über Isolierung von Paramäcien vgl. auch Hansen, K: M., Compt. rend. de la soc. de biol. 83,700. 1920.

²⁾ Vgl. hierzu S. von Prowacek, Einführung in die Physiologie der Einzelligen. Teubner 1910.

³⁾ Zeitschr. f. allg. Physiol. 4, 458. 1904.

⁴⁾ l. c.

nicht mitteilen, nur bemerken, daß wir diesen bei einer Chininkonzentration von 1:25 000 fanden, während Neuschlosz schon bei 1:100 000 eine Giftwirkung beobachtete. Ferner lebten unsere Paramäcien in den mittleren Giftkonzentrationen erheblich länger. Im ganzen erwies sich also unser Stamm gegen Chinin weniger empfindlich als der von Neuschlosz.

Da wir die große Bedeutung der H⁺-Ionenkonzentration des Mediums bei unseren Untersuchungen an Invertase zu beobachten Gelegenheit hatten, schien es uns von Interesse, diese Verhältnisse bei der Chininwirkung auf die Paramäcien zu untersuchen. Wir stellten uns für diesen Zweck die verschiedenen [H⁺] mit Phosphatgemischen her (in 1/100 Mol.-Lösung), die von den in Betracht kommenden Puffern auch wegen ihrer Ungiftigkeit am geeignetsten waren. Die NH₃:NH₄Cl-Gemische kamen wegen ihrer großen Giftigkeit nicht in Frage¹⁾.

Die Versuche wurden so angestellt, daß die aus ihrer Nährlösung abzentrifugierten Paramäcien in einem Phosphatgemisch suspendiert wurden, dessen [H⁺] nach der colorimetrischen Methode von L. Michaelis²⁾ genau bestimmt wurde. Von Zeit zu Zeit wurden die colorimetrischen Methoden elektrometrisch kontrolliert; es ergab sich immer gute Übereinstimmung. Dann wurden genau wie in den oben beschriebenen Giftversuchen

Tabelle XV.

pH	Chininkonzentration 1:1600				Chininkonzentration 1:8200				Chininkonzentration 1:6400			
	+++	++	+	-	+++	++	+	-	+++	++	+	-
5.3			unwirksam				unwirksam					unwirksam
6.0	1 ^h 45'	3 ^h 10'		< 24 ^h			"					"
6.2	1 ^h 10'	3 ^h 10'		< 24 ^h			"					"
6.4	15'	> 5 ^h		< 24 ^h			"					"
6.6		15'	40'	1 ^h 15'	25'	45'	1 ^h 25'	3 ^h 20'				"
6.8	10'	20'	40'	1 ^h 30'	40'	50'	1 ^h 20'	1 ^h 50'				"
7.0	5'	15'	40'	1 ^h 30'	40'	1 ^h 30'	1 ^h 15'	2 ^h 45'	2 ^h			< 24 ^h
7.2	5'	5'	15'	30'	15'	30'	1 ^h 5'	2 ^h 35'				4 ^h 20'
7.4		5'	10'	15'	10'	15'	20'	40'	20'	40'	1 ^h 25'	5 ^h
7.6		5'	5'	20'	5'	15'	25'	45'	10'	40'	1 ^h 30'	2 ^h 25'
7.8			5'	10'	5'	10'	15'	20'	10'	50'	1 ^h 10'	1 ^h 50'
8.0				5'		5'		10'	5'	10'	20'	1 ^h

Es bedeuten +++ viel, ++ wenig, + vereinzelt, - keine Paramäcien im Gesichtsfeld.

¹⁾ Vgl. hierzu auch Bokorny, Arch. f. d. ges. Physiol. **64**, 262. 1896.

²⁾ Vgl. L. Michaelis und A. Gyemant, diese Zeitschr. **109**, 165. 1920.

gleiche Mengen Paramäciensuspension und Chininlösung zusammengebracht und der Absterbeprozess kontrolliert. Die Resultate geben wir in der Tabelle XV.

Man sieht in den einzelnen Längsspalten entsprechend dem wachsenden p_H ein fast kontinuierliches Sinken der Zeiten, die (bei gleichbleibender Chininkonzentration) zur Lähmung der Paramäcien nötig sind. Es ist auch aus der Tabelle ersichtlich, daß die Angabe einer „wirksamen“ Chininkonzentration ohne die gleichzeitige Feststellung der H-Konzentration nicht viel sagt. Schon durch eine ganz geringe Verschiebung der $[H^+]$ nach der saueren Seite tritt eine Unwirksamkeit der sonst unbedingt tödlichen Konzentration ein und zwar für $1/6400$ schon bei p_H 6,8, für $1/3200$ bei p_H 6,4. Unsere oben mitgeteilten Werte (S. 192) wurden gewonnen bei einem p_H von 7,0 bis 7,2.

Auch bei den Paramäcien haben wir, wie bei der Invertase, demnach allein mit der Wirksamkeit der freien Base zu tun. Hier spielt wohl, wie aus zahlreichen in diese Richtung fallenden Untersuchungen sich ergibt¹⁾, die Permeabilität der Zelle für die Base die entscheidende Rolle.

II. Abhängigkeit der Chininwirkung von der Chininkonzentration.

Die im Folgenden mitgeteilten Versuche wurden bei einer bestimmten H-Ionenkonzentration (in den ersten 3 Versuchen (Tabelle XVa—XVII) bei p_H 6,04, in den Versuchen XVIII—XX p_H 6,16, in den Versuchen XXI—XXIII $p_H = 6,00$) und variiert Chininkonzentration ausgeführt. Das Gesamtvolumen betrug 60 ccm. In den 3 ersten Versuchen wurde das 3 Tage lang dialysierte Ferment F_3 (je 2 ccm), in den Versuchen XVIII und XIX das mittelstarke Invertasepräparat F_2 (je 5 ccm) undialysiert, in den Versuchen XX—XXIII das Ferment F_2 dialysiert, angewendet. Durch die Dialyse ist das Ferment gegen Chinin bedeutend empfindlicher geworden.

Der Verlauf der Spaltung ist in den folgenden Tabellen und Abbildungen wiedergegeben:

¹⁾ Vgl. u. a. Harvey (nach Höber, Phys. Chemie der Zelle und Gewebe, S. 365 u. 394. 4. Aufl.); Barratt, l. c.; Gros, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **63**, 80. 1910; Pribram, Arch. f. d. ges. Physiol. **139**, 350. 1911; Traube, diese Zeitschr. **42**, 470. 1912. Ferner auch: Tröndle, diese Zeitschr. **112**, 259. 1920; Thieulin, R. Compt. rend. de la soc. de biol. **83**, 1347. 1920.

Tabelle XVa (Abb. 2).

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Relative Gift- menge	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0,00	0	0,0233	—
2	0,0156	2	0,0191	18,02
3	0,0313	4	0,0171	26,61
4	0,0625	8	0,0129	44,63
5	0,125	16	0,0086	63,10
6	0,25	32	—	—

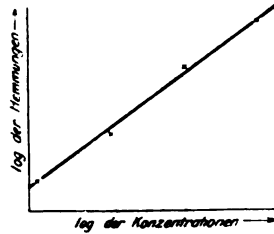


Abb. 2.

Tabelle XVI (Abb. 3 und 4).

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Relative Gift- menge	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0,00	0	0,0237	—
2	0,00625	2	0,0236	0,4
3	0,0125	4	0,0204	13,92
4	0,025	8	0,0176	25,74
5	0,050	16	0,0144	39,2
6	0,100	32	0,0093	60,76

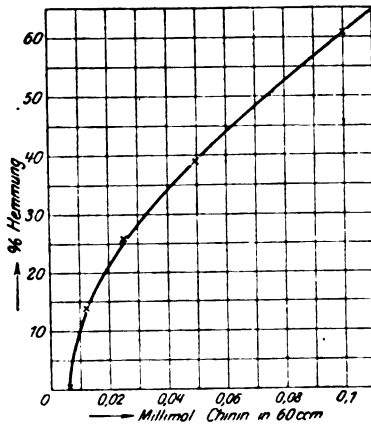


Abb. 3.

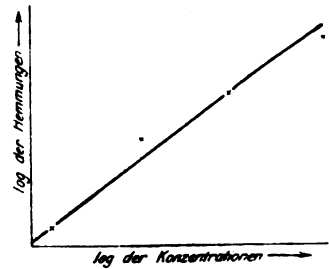


Abb. 4.

Tabelle XVII (Abb. 5).

Nr.	Millimol Chinin in 60 cem	Relative Gift- menge	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0,00	0	0,0247	—
2	0,0125	2	0,0205	17,00
3	0,0250	4	0,0180	27,10
4	0,050	8	0,0153	38,10
5	0,100	16	0,0107	59,10

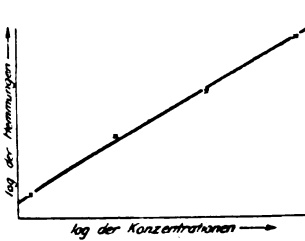


Abb. 5.

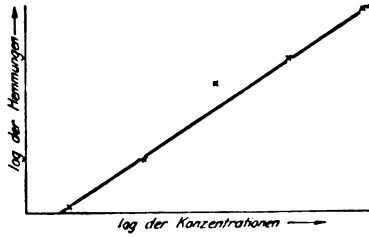


Abb. 6.

Tabelle XVIII (Abb. 6).

Nr.	Millimol Chinin in 60 cem	Relative Gift- menge	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0	0	0,0445	—
2	0,1	5	0,0391	12,1
3	0,18	9	0,0366	17,7
4	0,32	16	0,0304	31,7
5	0,56	28	0,0272	38,9
6	1,0	50	0,0187	58

Tabelle XIX (Abb. 7).

Nr.	Millimol Chinin in 60 cem	Relative Gift- menge	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0	0	0,0433	—
2	0,1	5	0,0349	19,4
3	0,18	9	0,0313	27,7
4	0,32	16	0,0288	33,5
5	0,56	28	0,0211	51,3
6	1,0	50	0,0165	61,9

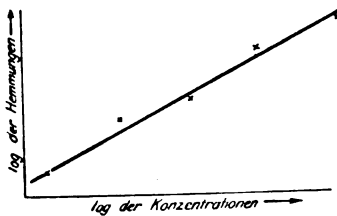


Abb. 7.

Tabelle XX (Abb. 8 und 9).

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Relative Gift- menge	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0	0	0,0291	—
2	0,0125	2	0,0234	19,6
3	0,025	4	0,0209	28,2
4	0,050	8	0,017	41,6
5	0,10	16	0,0115	60,5
6	0,20	32	0,0066	77,3

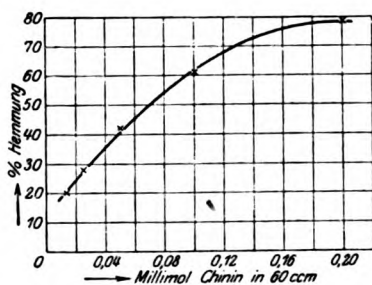


Abb. 8.

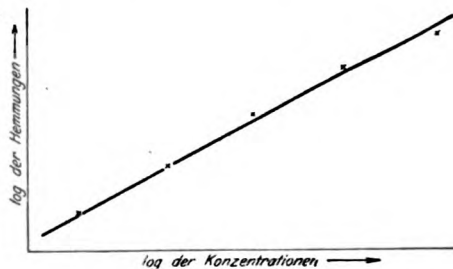


Abb. 9.

Tabelle XXI (Abb. 10).

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Relative Gift- menge	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0	0	0,0221	—
2	0,0125	2	0,0192	13,1
3	0,025	4	0,0178	19,5
4	0,050	8	0,0156	29,4
5	0,100	16	0,0106	52
6	0,200	32	0,0077	65,1

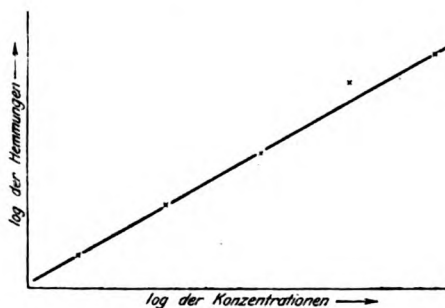


Abb. 10.

Tabelle XXII (Abb. 11).

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Relative Gift- menge	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0	0	0,0225	—
2	0,020	2	0,0182	19,1
3	0,040	4	0,0157	30,2
4	0,080	8	0,0135	40,0
5	0,160	16	0,0074	67,1

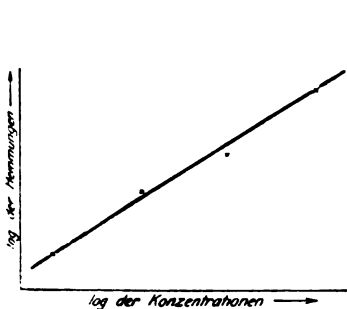


Abb. 11.

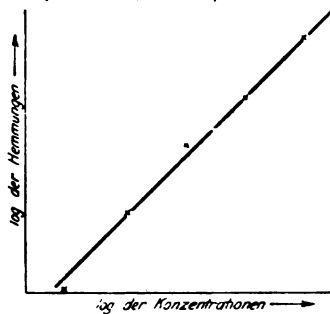


Abb. 12.

Tabelle XXIII (Abb. 12).

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Relative Gift- menge	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0	0	0,0223	—
2	0,010	1	0,0205	8,1
3	0,020	2	0,0189	15,2
4	0,040	4	0,0167	25,1
5	0,080	8	0,013	41,7
6	0,160	16	0,0091	59,2

Alle diese Versuche (namentlich die mit dem dialysierten Ferment angestellten) zeigen einen logarithmischen Verlauf der Kurven: Beim Auftragen der Logarithmen der Chininkonzentration auf der Abszisse und der Logarithmen der Hemmungen auf der Ordinate erhält man eine Gerade.

Nehmen wir an, daß die Hemmung der direkte Ausdruck für die an Invertase gebundene (adsorbierte) Chininmenge ist, so könnten wir die gefundene Konzentrations-Hemmungskurve als eine Adsorptionsisotherme betrachten, was aber nur dann eine Berechtigung hat, wenn die an Invertase gebundene Chininmenge klein ist gegen die gesamte Chininkonzentration. Bei den relativ hohen zur Vergiftung nötigen Chininkonzentrationen in der Lösung

ist es nicht von der Hand zu weisen, daß die adsorbierte Chininmenge analytisch vernachlässigt werden kann. Wir versuchten dies zu entscheiden, indem wir ein Invertase-Chininingemisch durch Kollodiumfilter ultrafiltrierten; da die Invertase selbst das Kollodiumfilter nicht passiert, müßte auch die adsorbierte Chininmenge zurückgehalten werden. Da aber, wie wir in Übereinstimmung mit Mannich und Wipperling¹⁾ fanden, das Chinin auch in reiner Lösung von dem Ultrafilter ziemlich stark adsorbiert wird, ist die Frage auf diesem Wege nicht entscheidbar. Allerdings sprechen auch noch andere Beobachtungen dafür, daß wir es hier zunächst mit einem Adsorptionsvorgang zu tun haben. Diesen Erscheinungen wollen wir uns jetzt zuwenden.

III. Der zeitliche Verlauf der Giftwirkung; Reversibilität der Vergiftung; Einfluß des Substrates, der Fermentmenge, der Temperatur.

Wir haben in den bisherigen Versuchen nicht angegeben, wie lange das Chinin auf das Ferment vor dem Zusatz des Rohrzuckers einwirkte, da wir in besonderen Versuchen gefunden haben, daß die Vergiftung mit nicht meßbarer Geschwindigkeit erfolgt und sofort den maximalen Wert erreicht. Die folgenden Tabellen illustrieren dieses Verhalten.

Tabelle XXIV.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Zuckerzusatz nach Chinin- zusatz Min.	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0	—	0,0260	—
2	0,05	0	0,0168	36,54
3	0,05	1	0,0167	35,82
4	0,05	30	0,0165	36,54

Gesamtvolumen 60 ccm; 2 ccm Ferment F₃; 10 ccm Regulator 3:1; p_H elektr. 6,04.

Tabelle XXV.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Zuckerzusatz nach Chinin- zusatz Min.	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0	—	0,0402	—
2	0,020	6	0,0317	21,1
3	0,020	20	0,0315	21,6
4	0,020	80	0,030	25,4

Gesamtvolumen 60 ccm. Ferment F₃ 5 ccm. p_H = 6,06.

¹⁾ C. Mannich und Gr. Wipperling, Ber. d. dtsh. pharmaz. Ges. 30, 348. 1920.

Tabelle XXVI.

Nr.	Millimol Chinin in 80 ccm	Zuckerszusatz nach Chinin- zusatz-	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{p_0} \cdot 100$
1	0	—	0,0399	—
2	0,010	15'	0,0345	13,5
3	0,010	30'	0,0340	14,8
4	0,010	60'	0,0340	14,8
5	0,010	22 ^b	0,0332	16,8
6	0,010	48 ^b	0,0343	14,0

Anordnung wie im Versuch 25.

Die Versuche zeigen also, daß das Gleichgewicht zwischen Chinin und Invertase mit nicht meßbarer Geschwindigkeit erreicht wird.

Für die Einsicht in das Wesen der Vergiftung der Invertase durch das Chinin war die Frage nach der Reversibilität des Vorganges von großer Bedeutung¹⁾ Dies wurde geprüft, indem wir Chinin bei alkalischer Reaktion einwirken ließen, dann durch Änderung des Puffergemisches (mittels Phosphatgemischen) die [H] nach der saueren Seite verschoben, und nach einer Weile den Rohrzucker zusetzten. Bei Reversibilität der Vergiftung mußte die Hemmung derjenigen Wirkung entsprechen, die Chinin in gleicher Konzentration hat, wenn es von vornherein bei der letzteren (sauerer) Reaktion wirkt. Im Falle der Irreversibilität mußte die Hemmung den der alkalischen Reaktion entsprechenden größeren Grad zeigen, auch wenn die Rohrzuckerspaltung selbst bei der saueren Reaktion verläuft²⁾.

Die Versuche zeigen, daß der Vorgang vollkommen reversibel ist. War z. B. die Hemmung (vgl. Tabelle XXVII) bei p_H 6,24 36,54%, die bei p_H 6,84 52,25%, so war bei einer nachträglichen Erhöhung der H von p_H 6,84 auf 6,24 die Hemmung (Mittel aus 2 Versuchen) 37,3%. — In einem anderen Versuch (vgl. Tabelle XXIX) betrug die Hemmung bei der ursprünglichen Reaktion von p_H 5,53 22,7%, war dieselbe Reaktion erst nach-

¹⁾ Vgl. hierzu Hata, diese Zeitschr. 17, 156. 1909; ferner M. Jacoby, ebenda 76, 275. 1916; Euler und Svanberg l. c.

²⁾ Die Hemmung, die Invertase durch Alkali erleidet, ist reversibel (vgl. L. Michaelis und H. Davidsohn, diese Zeitschr. 35, 386. 1911). Über einen anderen Weg zur Prüfung der Reversibilität vgl. S. 207.

träglich hergestellt, nachdem das Chinin mit dem Ferment eine halbe Stunde bei p_H 7,29 stand, so betrug die Hemmung 23,6%. Dies zeigen auch die Tabellen XXVIII. XXX und XXXI.

Tabelle XXVII.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator			Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		vor Chinin- zusatz prim. : sek.	nach Chinin- zusatz	End- gültiger p_H		
1	0	10 ccm 3 : 1	—	6,24	0,0260	—
2	0,05	10 ccm 3 : 1	—	6,24	0,0165	36,54
3	0	10 ccm 1 : 1	—	6,84	0,0199	—
4	0,05	10 ccm 1 : 1	—	6,84	0,0095	52,25
5	0,05	5 ccm 1 : 1	5 ccm primär	6,24	0,0158	39,22
6	0,05	5 ccm 1 : 1	5 ccm primär	6,24	0,0168	35,38

Tabelle XXVIII.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator			Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		vor Chinin- zusatz prim. : sek.	20' nach Chininzusatz	End- gültiger p_H		
1	0	10 ccm 9 : 1	—	5,53	0,0407	—
2	0,10	10 ccm 9 : 1	—	5,53	0,0201	50,6
3	0	10 ccm sek.	—	9,55	Infolge der alkalischen Reaktion keine Spaltung	
4	0,10	10 ccm sek.	—	9,55	0	0
5	0,10	1 ccm sek.	9 ccm primär	5,53	0,0172	57,75

Tabelle XXIX.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator			Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		vor Chinin- zusatz prim. : sek.	80' nach Chininzusatz	End- gültiger p_H		
1	0	10 ccm 9 : 1	—	5,53	0,0304	—
2	0,05	10 ccm 9 : 1	—	5,53	0,0235	22,7
3	0,05	1 ccm sek.	9 ccm primär	5,53	0,0232	23,6

Tabelle XXX.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator			Geschwindigkeits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		vor Chininzusatz prim.: sek.	15' nach Chininzusatz	Endgültiger p_H		
1	0	0,6 ccm sek. (p_H 7,29)	9,4 ccm prim.	5,35	0,0307	—
2	0,030	0,6 ccm sek. (p_H 7,29)	9,4 ccm prim.	5,35	0,0158	48,5
3	0,030	0,6 ccm sek. 9,4 ccm prim.	—	5,35	0,0173	43,6

Tabelle XXXI.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Regulator			Geschwindigkeits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
		vor Chininzusatz prim.: sek.	25' nach Chininzusatz	Endgültiger p_H		
1	0	1 ccm sek.	—	7,26	0,0164	—
2	0,03	1 ccm sek.	—	7,26	—	100
3	0	9 ccm prim. 1 ccm sek.	—	5,53	0,0336	—
4	0,03	9 ccm prim. 1 ccm sek.	—	5,53	0,0167	50,3
5	0,03	1 ccm sek. (p_H 7,29)	9 ccm prim.	5,53	0,0166	50,6

In den Untersuchungen über die Lipasevergiftung durch Atoxyl konnten Rona und Bach¹⁾ einen beträchtlichen Unterschied finden, je nach Zusatz des Giftes zum Ferment vor oder nach Zugabe des Substrates, des Tributyrins. Wir prüften daher, ob hier auch ähnliche Verhältnisse vorliegen, ob Unterschiede in der Giftwirkung, die von der Zeitfolge des Rohrzuckerzusatzes abhängen, zu beobachten sind.

Tabelle XXXII.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Reihenfolge	Geschwindigkeits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$	
1	0	Regulator Rohrzucker	nach 30' Ferment	0,0402	—
2	0,03	Regulator Ferment Chinin	nach 20' Rohrzucker	0,0315	21,6
3	0,03	Regulator Chinin Rohrzucker	nach 30' Ferment	0,0335	16,7

Angewendet Ferment F₃.

¹⁾ Diese Zeitschr. 111, 166. 1920.

Tabelle XXXIII.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Reihenfolge	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_2 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0	Regulator } nach 30' Fer- Rohrzucker } ment	0,0561	—
2	0,10	Regulator } nach 20' Rohr- Chinin } zucker Ferment }	0,0307	45,3
3	0,10	Regulator } nach 30' Fer- Chinin } ment Rohrzucker }	0,0312	44,4

Angewendet Ferment F₂.

Die Versuche zeigen, daß eine schützende Wirkung des Rohrzuckers nicht vorhanden ist.

Zu dem gleichen negativen Ergebnis kamen wir auch bei Variierung der Rohrzuckerkonzentration¹⁾. Wir fügten zu verschiedenen Mengen Rohrzuckerlösung (40, 20, 10 ccm) 5 ccm Ferment (F₂), 5 ccm Regulator ($p_H = 6,04$) und Chinin zu und füllten überall mit Wasser auf 60 ccm auf.

Tabelle XXXIV.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	10 proz. Rohrzucker- lösung in 60 ccm ccm	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_2 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0	40	0,0423	—
2	0,015	40	0,0368	13
3	0	20	0,0369	—
4	0,015	20	0,0331	10,3
5	0	10	0,0299	—
6	0,015	10	0,0246	17,7

Tabelle XXXV.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	10 proz. Rohrzucker- lösung in 60 ccm ccm	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_2 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0	20	0,0369	—
2	0,045	20	0,0257	30,4
3	0	10	0,0299	—
4	0,045	10	0,0200	33,1

Ein Einfluß der Rohrzuckerkonzentration konnte nicht beobachtet werden.

¹⁾ Vgl. hierzu auch Meyerhof, Arch. f. d. ges. Physiol. 157, 252. 1914; v. Euler und Swanberg. Fermentforschung I. c.

Wir mußten ferner den Einfluß prüfen, den die Temperatur, bei der die Zuckerspaltung verläuft, ausübt. Zu diesem Zwecke wurden Versuche mit gleicher Zusammensetzung bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt. Einige dieser Versuche sind in der folgenden Tabelle mitgeteilt.

Tabelle XXXVI.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Temperatur C°	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0	30	0,0388	—
2	0,10	30	0,0165	57,50
3	0	18	0,0240	—
4	0,10	18	0,0115	52,10

Tabelle XXXVII.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Temperatur C°	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0	40	0,039	—
2	0,05	40	0,0247	36,6
3	0	16	0,0127	—
4	0,05	16	0,0085	33,0

Die Temperatur, bei der die Spaltung verläuft, hat demnach auf den Grad der Hemmung keinen Einfluß.

Zum Schluß dieses Abschnittes seien die Versuche bei variiertem Fermentmenge mitgeteilt. In diesen Versuchen wurden bei gleichen Mengen von Rohrzucker, Regulator und Chinin verschiedene Mengen von Ferment zugesetzt. Das Gesamtvolumen betrug 60 ccm. $p_H = 5,95$. Als Ferment wurde F_3 benutzt.

Tabelle XXXVIII.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Invertase- lösung F_3 ccm	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0	1	0,0151	—
2	0,05	1	0,0122	19,2
3	0	2	0,0304	—
4	0,05	2	0,0235	22,7

Tabelle XXXIX.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Invertase- lösung F_3 ccm	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0	4	0,0439	—
2	0,015	4	0,0169	61,5
3	0	8	0,0847	—
4	0,015	8	0,0345	59,3

Tabelle XL.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Invertase- lösung F, ccm	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0	2	0,0257	—
2	0,01	2	0,0113	56
3	0	4	0,0514	—
4	0,01	4	0,0268	47,8

Tabelle XLI.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	Invertase- lösung F, ccm	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0	2	0,0254	—
2	0,010	2	0,0109	57,1
3	0	3	0,0366	—
4	0,010	3	0,0192	47,5
5	0	4	0,0492	—
6	0,010	4	0,0261	46,9

Der Versuch zeigt, daß die Geschwindigkeitskonstanten sich wie die Fermentmengen verhalten, daß aber die Hemmungen von der Fermentmenge unabhängig sind.

IV. Einfluß anderer Stoffe.

Der Einfluß der Stoffkombinationen soll einer späteren Untersuchung vorbehalten bleiben. Hier sollen nur einige Versuche mit NaCl mitgeteilt werden, da sie für die Theorie des Verlaufes des Prozesses von Bedeutung sein können¹⁾. Zu gleichen Mengen Ferment, Regulator und Rohrzucker wurden verschiedene Mengen NaCl zugesetzt. In je einer Kontrolle wurde der Einfluß des Salzzusatzes auf die Zuckerspaltung festgestellt: die von uns verwandten NaCl-Mengen hatten keinen Einfluß auf die Inver-

Tabelle XLII.

Nr.	Millimol Chinin in 60 ccm	m-NaCl-Lösung in 60 ccm	Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$
1	0	0	0,0446	—
2	0,030	0	0,0326	26,91
3	0	6	0,0427	—
4	0,030	6	0,0313	26,70
5	0	9	0,0418	—
6	0,03	9	0,0312	25,3

¹⁾ Vgl. hierzu u. a. Meyerhof, Arch. f. d. ges. Physiol. 157, 252. 1914; ferner Abderhalden und Fodor, Fermentforschung 4, 191. 1921. Wir kommen auf diesen Punkt später noch ausführlicher zurück.

tasewirkung; auch die Hemmung war mit und ohne Salz von derselben Größe. Gearbeitet wurde mit dem Ferment F_3 . p_H 6. Gesamtvolumen 60.

Die Tabellen zeigen, daß der Salzzusatz in den angegebenen Konzentrationen keinen Einfluß auf die Vergiftung hat.

V. Das Verhalten der Chininderivate.

Es war von Interesse zu prüfen, ob die Gesetzmäßigkeiten, die wir beim Chinin hydrochl. gefunden haben, auch bei den von Morgenroth in die Therapie eingeführten Chininderivaten zu finden sind. Namentlich sollte untersucht werden, wie die Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration, der Einfluß der verschiedenen Giftkonzentrationen, ferner die Reversibilität der Giftwirkung bei diesen Verbindungen sich verhalten.

1. Die Abhängigkeit von der H.-Ionenkonzentration wurde an Eucupinbihydrochloric. untersucht. Die Konzentration der verwendeten Lösung war $1/80$ molar; die in den einzelnen Versuchen benutzte Menge betrug 3 ccm (auf 60 ccm), so daß die Konzentration des Eucupinsalzes 0,625 millimolar war. Gearbeitet wurde mit dem dialysierten Ferment F_3 . Die geringe Löslichkeit der Eucupinbase zwang, mit geringen Giftmengen zu arbeiten; infolgedessen ist auch die erreichte maximale Hemmung im Vergleich zu Chinin gering.

Wir geben die Resultate in beistehender Tabelle wieder. k_1 bedeutet die Geschwindigkeitskonstante in der Kontrolle ohne Gift, k_2 mit Giftzusatz.

Tabelle XLIV.

p_H	k_1	k_2	$\frac{k_2}{k_1}$ in %
4,65	0,0469	0,0451	3,8
5,85	0,0461	0,0403	12,4
6,11	0,0382	0,0305	20,1
6,99	0,0254	0,0179	29,5
7,35	0,0195	0,0126	35,4
7,57	0,0140	0,0086	38,6

Auch hier kann man also mit sinkender H.-Ionenkonzentration, entsprechend der Dissoziation des Eucupinsalzes, zunehmende Giftwirkung des Eucupin. bihydrochl. ganz in derselben Weise, wie wir dies beim Chinin kennengelernt haben, beobachten.

2. Die Abhängigkeit der Wirkung von der Giftkonzentration wurde mit Optochin hydrochlor. geprüft. Die Giftwirkungen wurden in geometrischer Reihe mit der Basis 1,8 abgestuft. Regulator 5 ccm Phosphatgemisch (3 prim. 1 sek.) p_H 6,11. Alle folgenden Versuche wurden bei dieser H-Ionenkonzentration angestellt. Angewendet wurde das dialysierte Ferment F_3 .

Tabelle XLV (Abb. 13, 14).

Giftmenge Millimol in 60 ccm	k	h in %
—	0,0362	—
0,025	0,0303	16,3
0,045	0,0263	27,3
0,08	0,0194	46,4
0,145	0,0142	60,8

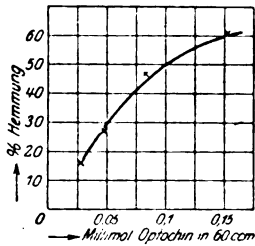


Abb. 13.

Tabelle XLVI (Abb. 15, 16).

Giftmenge Millimol in 60 ccm	k	h in %
—	0,0360	—
0,025	0,030	16,7
0,045	0,0259	28,1
0,08	0,0217	39,7
0,145	0,0154	57,2
0,26	0,0093	74,2

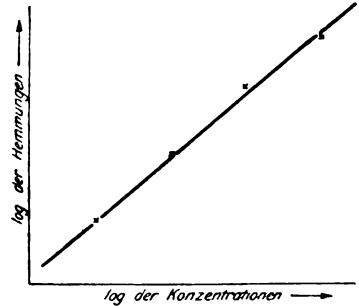


Abb. 14.

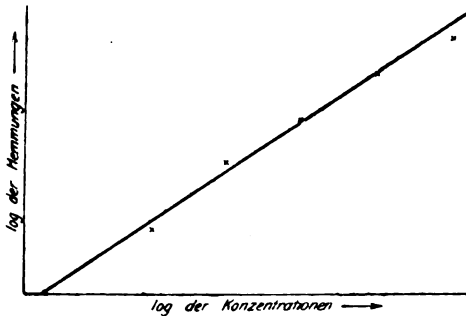


Abb. 15.

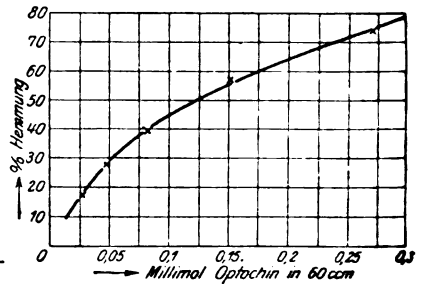


Abb. 16.

Die Tabellen XLV und XLVI und die dazu gehörenden Kurven (13—16) zeigen, daß die Optochinwirkung denselben Gesetzen folgt, wie wir sie bei dem Chinin beobachtet haben. Trägt man

die Logarithmen der angewandten Optochinkonzentrationen auf der Abszisse, die Logarithmen der Hemmungen auf der Ordinate auf, so liegen die Punkte auf einer Geraden.

3. Die Reversibilität der Vergiftung wurde mit Vuzin bihydrochloricum geprüft. Die Konzentration der Stammlösung war $\frac{1}{100}$ molar. Wir prüften die Frage auf die Weise, daß wir das Gift bei bestimmter Konzentration auf Invertase eine Zeitlang wirken ließen, und dann zu Beginn der Rohrzucker-spaltung die Vuzinkonzentration im Gemisch durch Zusatz der Rohrzuckerlösung auf $\frac{1}{3}$ herabsetzten. In einem gleichzeitig ablaufenden Vergiftungsversuch wurde das Ferment zuletzt zugesetzt, so daß die Vergiftung von vornherein bei der definitiven, geringeren Konzentration erfolgte. Wir kombinierten also die Prüfung der Reversibilität mit dem „Reihenfolgenversuch“.

Im folgenden Versuch wurde das dialysierte Ferment F_3 benutzt. Die Zusammensetzung des Gemisches war die folgende: Kolben I: 30 ccm Rohrzucker, 5 ccm Regulator, 22 ccm dest. Wasser, dann 3 ccm Ferment. Kolben II: 3 ccm Ferment, 5 ccm Regulator, 10,5 ccm dest. Wasser, 1,5 ccm Vuzin (Konzentration 0,469 millimolar); nach 30' zugefügt 30 ccm 10 proz. Rohrzuckerlösung, 10 ccm dest. Wasser. Die Vuzinkonzentration ist jetzt 0,156 millimolar. Kolben III: 30 ccm 10 proz. Rohrzuckerlösung, 5 ccm Regulator, 20,5 ccm dest. Wasser, 1,5 ccm Vuzin. Zu Beginn des Versuches 3 ccm Ferment zugefügt. Die Vuzinkonzentration ist 0,156 millimolar.

Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Rohrzuckerspaltung waren:

Tabelle XLVII.

Kolben	k
I	0,0365
II	0,0274
III	0,0272

Tabelle XLVIII.

Kolben	k
I	0,0304
II	0,0291
III	0,0292

In einem zweiten Versuch wurde mit einem schwach wirkenden dialysierten Ferment (F_4) gearbeitet. Die Anordnung der Versuche war die gleiche. Im Kolben II war die Vuzinkonzentration zuerst 0,312, dann 0,104 millimolar; im Kolben III gleich 0,104 millimolar.

In beiden Versuchen sind die Geschwindigkeitskonstanten der Kolben II und III absolut gleich, obwohl in II das Vuzin 30 Minuten lang bei einer 3 mal stärkeren Konzentration gewirkt hat als in I. Die durch Vuzin bedingte Invertasehemmung ist also reversibel. Ferner folgt aus den Versuchen, daß Rohrzucker Invertase gegen Vuzin nicht schützt.

Zusammenfassend können wir also sagen, daß die Invertasevergiftung durch die Chininderivate denselben Typus zeigt wie die Chininhemmung selbst. Sie ist abhängig von der Wasserstoffionenkonzentration, zeigt dieselbe Konzentrationskurve, ist vollkommen reversibel und wird von dem Substrat nicht beeinflusst.

4. Es war von Interesse, den Grad der Wirkung festzustellen, den äquimolekulare Mengen der verschiedenen Chininderivate haben. Den Versuchen war durch die geringe Löslichkeit des Vuzins eine relativ niedrig liegende Höchstgrenze gezogen. Um möglichst deutliche Hemmungen zu erhalten, wurde mit Konzentrationen gearbeitet, bei denen in den Vuzingemischen eben gerade eine leichte Trübung eintrat. Gearbeitet wurde mit dem dialysierten Ferment F_3 .

Versuch. Giftmenge: 0,125 Millimol in 60 ccm p_H (Acetatgemisch) 4,23.

Tabelle XLIX.

Gift	k	h in %
—	0,0484	—
Chinin	0,0431	10,9
Optochin	0,0448	7,4
Eucupin	0,0420	13,2
Vuzin	0,0338	30,2

Versuch. Giftmenge 0,0187 Millimol in 60 ccm p_H 6,14.

Tabelle L.

Gift	k	h in %
—	0,0381	—
Chinin	0,0336	11,8
Optochin	0,0322	15,6
Eucupin	0,0313	17,8
Vuzin	0,0226	40,7

Versuch. Giftmenge 0,0125 Millimol in 60 ccm p_H 6,14.

Tabelle LI.

Gift	k	λ in %
—	0,0365	—
Chinin	0,0310	15,1
Optochin	0,0321	12,1
Eucupin	0,0320	12,4
Vuzin	0,0261	28,5

Während also die hemmende Wirkung des Optochins und Eucupins innerhalb der Fehlergrenzen der des Chinins gleich ist, zeigt das Vuzin eine erheblich stärkere Wirkung. In diesem Zusammenhange mag darauf hingewiesen werden, daß Traube¹⁾ und Eschbaum²⁾ festgestellt haben, daß in der Chininreihe mit zunehmender Länge der substituierten Kohlenstoffkette die Oberflächenaktivität wächst und beim Vuzin ein Optimum erreicht.

VI. Chinin und Chinidin.

Es ergab sich schließlich noch die Fragestellung, wie weit die sterische Konfiguration des Chinins bei der Invertasevergiftung eine Rolle spielt, und damit die Aufgabe, vergleichende Versuche mit seinem optischen Isomeren, dem Chinidin, anzustellen.

Die ersten zwei orientierenden Versuche wurden mit Chinidinum sulfur ($1/160$ molar) und Chininum hydrochloricum ($1/80$ molar) angestellt. p_H 6,11. Ferment F_3 .

Tabelle LII.

Gift	Giftmenge in 60 ccm	k	in %
—	—	0,0354	—
Chinin	0,0375 Millimol	0,0266	24,9
Chinidin	0,0187 „	0,0196	44,6
—	—	0,0374	—
Chinin	0,05 Millimol	0,0248	33,7
Chinidin	0,025 „	0,0165	55,9
Chinin	0,075 „	0,020	46,5
Chinidin	0,0375 „	0,0146	61

Die beiden Versuche ergaben eine höhere Wirksamkeit des Chinidins.

¹⁾ Diese Zeitschr. 98, 197. 1919.

²⁾ Ber. d. dt. pharmaz. Ges. 28, 397. 1918.

Bei den folgenden Versuchen ist Chininum sulfuricum zum Vergleich herangezogen worden. Die Analyse der benutzten Präparate ergab:

Chinum sulfur. gef. 12,04% SO₄ 82,6% Chininbase,
Chinidinum sulfur. gef. 11,84% SO₄ 82,99% Chinidinbase,
berechne (für 2 H₂O) 12,5% SO₄ und 82,3% Base.

Ferner wurden die Oberflächenaktivitäten der Lösung beider Präparate mit dem Traubeschen Stalagnometer untersucht. In beiden Lösungen wurde die H⁺-Ionenkonzentration durch Regulatoren konstant gehalten (p_H 7,85). Die Chinin- bzw. Chinidinlösung war $\frac{1}{156}$ molar. Temperatur 18°.

Die Tropfenzahl betrug in

1 ccm Chinin sulfur., 14 ccm Regulator: 20,9;
1 ccm Chinidin sulfur., 14 ccm Regulator: 20,8;
1 ccm Chinin sulfur., 9 ccm Regulator: 23,0;
1 ccm Chinidin sulfur., 9 ccm Regulator 22,6.

Wasserwert: 19,4 Tropfen.

Die Lösungen hatten demnach (bei gleicher [H⁺]) die gleiche Oberflächenspannung, also die gleiche Basenmenge in der Lösung. In den folgenden Versuchen betrug p_H 6,11. Es wurde mit dem dialysierten Ferment F₄ gearbeitet.

Tabelle LIII.

Gift	Äquimol. Giftmenge ccm	k	h in %
—	—	0,0328	—
Chinin	3	0,0263	19,8
Chinidin	3	0,0224	31,7
Chinin	5	0,0256	22
Chinidin	5	0,020	39
—	—	0,0218	—
Chinin	2	0,0186	14,7
Chinidin	2	0,0158	27,5
Chinin	8	0,0143	34,4
Chinidin	8	0,0109	50
—	—	0,0339	—
Chinin	4	0,0254	25,1
Chinidin	4	0,0215	36,6
—	—	9,0354	—
Chinin	6	0,0267	24,6
Chinidin	6	0,0172	51,4
Chinin	7	0,0247	30,2
Chinidin	7	0,0176	50,3

Auch in diesen Versuchen fand sich die höhere Wirksamkeit des Chinidins im Vergleich zum Chinin. Die Dissoziationskonstante der Alkaloid-Invertaseverbindung wäre demnach für Chinin und Chinidin verschieden und zwar nach den Versuchsergebnissen zu urteilen für Chinin größer als für Chinidin.

Die mitgeteilten Untersuchungen ergaben, daß das Chinin auf Invertase, ebenso wie auf Paramäcien als Gift wirkt und daß diese Wirkung von der freien Alkaloidbase ausgeübt wird. Will man an dem prinzipiellen Unterschied einer „Adsorptionsverbindung“ und einer andersartigen „chemischen“ Bindungsweise zwischen Ferment und Chininbase festhalten, so liegt es nahe, eine Reihe der hier erhobenen Befunde im Sinne eines Adsorptionsvorganges — wenigstens für das erste Stadium des Prozesses — zu deuten¹⁾. Auf spezifische Beziehungen weist hingegen der Unterschied in der Wirkung des Chinins und Chinidins auf Invertase.

Zusammenfassung.

1. Die Größe der hemmenden Wirkung des Chinin. hydrochlor. auf Invertase hängt von der Wasserstoffionenkonzentration des Gemisches Alkaloidsalz-Ferment ab. Mit sinkender H-Ionenkonzentration nimmt sie zu, entsprechend dem Dissoziationszustande des Chininsalzes. Die Giftwirkung wird nur von der freien Base ausgeübt.

2. Dieselbe Rolle der Wasserstoffionenkonzentration konnte auch bei der Vergiftung von Paramäcien durch Chinin. hydrochlor. beobachtet werden.

3. Die Abhängigkeit der Giftwirkung von der Chininkonzentration zeigt gesetzmäßige Beziehungen. Trägt man die Logarithmen der Chininkonzentration auf der Abszisse, die Logarithmen der Hemmungen (der Hemmungskoeffizienten) auf der Ordinate auf, so erhält man eine Gerade.

4. Die Giftwirkung ist vollständig reversibel, sie erfolgt momentan und ist von der Temperatur (in den untersuchten Grenzen) unabhängig. Sie ist auch unabhängig von der Ferment- und von der Rohrzuckerkonzentration.

¹⁾ Zur Theorie der Hemmung der Katalyse durch Chinin vgl. auch Young, Amer. chem. Journ. 24, 297. 1902.

5. Die Chininderivate Optochin, Eucupin und Vuzin verhalten sich in ihrer Wirkung auf die Invertase ganz so wie das Chinin. Die Giftwirkung ist auch bei diesen Verbindungen abhängig von der Wasserstoffionenkonzentration, sie zeigt dieselbe Konzentrations-Hemmungskurve, sie ist vollkommen reversibel und wird vom Substrat nicht beeinflusst. Die Hemmung ist (unter vergleichbaren Bedingungen) bei Optochin und Eucupin der beim Chinin gleich, beim Vuzin ist sie erheblich größer.

6. Chinidin hat (unter vergleichbaren Bedingungen) eine stärker hemmende Wirkung als Chinin.

**Beiträge zum Studium der Giftwirkung.
Über die Wirkung des Chinins auf Serumlipase.**

Von
Peter Rona und Dora Reinicke.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des städt. Krankenhauses am Urban,
Berlin.)

(Eingegangen am 25. März 1921.)

Mit 12 Abbildungen im Text.

I.

In der vorhergehenden Arbeit konnten wir den Verlauf der Wirkung des Chinins auf Invertase in vielen Punkten genau verfolgen. Es hatte nun Interesse, die Wirkung des Chinins auf noch ein anderes Ferment zu untersuchen. Wir wählten dazu die Serumlipase, da wir über den Einfluß einer anderen Verbindung, des Atoxyls, auf dieses Ferment bereits genau orientiert sind¹⁾. Die Frage drängte sich von selbst auf, ob die Chininwirkung auch bei Lipase ähnlichen Gesetzen gehorcht wie bei der Wirkung auf Invertase, oder ob sich etwa Beziehungen wiederfinden, wie sie im System Lipase-Atoxyl vorhanden sind. Um das wesentlichste Resultat der Untersuchung vorwegzunehmen, können wir schon jetzt sagen, daß das letztere der Fall ist: die Abhängigkeit der Giftwirkung von der Giftkonzentration bei Chinin-Lipase zeigt nicht den Typ „Chinin-Invertase“, sondern den „Atoxyl-Lipase“. Die Giftwirkung ist auch hier dem Logarithmus der Giftkonzentration direkt proportional.

Zu unseren Versuchen benutzten wir zunächst Chininum hydrochloricum, als Serum Menschenserum. Als Maß der Vergiftung der Serumlipase diente das verminderte Spaltungsvermögen für Tributyrin¹⁾. Im allgemeinen war die Zusammensetzung des Versuches so, daß 50 ccm des mit Tributyrin gesättigten Wassers zu einem Gemisch bestehend aus 1 ccm Chininlösung, 1 ccm Serum (meist halbverdünnt) und 3 ccm Regulatormischung (meist 1 pr. und 10 sek. $\frac{1}{3}$ mol. Phosphat) zugefügt wurden, nachdem das

¹⁾ Vgl. Rona, P. und E. Bach, diese Zeitschr. **111**, 166. 1920.

Gemisch 1 Stunde ohne Tributyrin gestanden hatte. Das Gesamtvolumen war also 55 ccm. Der Verlauf der Spaltung wurde nach der stalagmometrischen Methode von Rona und Michaelis verfolgt. Die in diesen Versuchen benutzten Chininkonzentrationen waren so gering, daß sie die Oberflächenspannung des Wassers nicht beeinflussen; erst in späteren Versuchen mit Seren anderer Tierarten mußten Chininkonzentrationen angewendet werden, die eine geringe Korrektur der beobachteten Tropfenzahl erforderten.

Den Verlauf der an Serum von Menschen ausgeführten Untersuchungen illustrieren die folgenden Versuche:

Versuch 1. Zusammensetzung des Gemisches: 1 ccm halbverdünntes Menschenserum, 1 ccm Chininum hydrochlor. bzw. dest. Wasser, 3 ccm Regulator (1 pr., 7 sek. Phosphat). Nach 1 stündigem Stehen 50 ccm gesättigte wässrige Tributyrinlösung.

Tabelle I (Abb. 1).

Nr.	mg Chinin in 55 ccm	Relative Giftmenge	% -Tributyrin nach					Geschwindig- keits-Konst. $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_x}{k_0} \cdot 100$
			0'	60'	90'	120'	150'		
1	0	0	100	67	55	41	33	0,0072	
2	0,01	1	100	74	58	44	37	0,0067	6,9
3	0,03	3	100	74	64	53	44	0,0054	25
4	0,09	9	100	78	69	62	56	0,0040	44,5
5	0,27	27	100	91	78	71	69	0,0027	62,5
6	0,81	81	100	97	94	89	84	0,00105	86

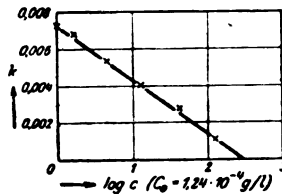


Abb. 1.

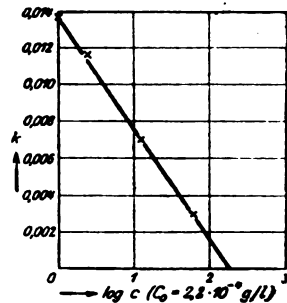


Abb. 2.

Versuch 2. Zusammensetzung wie in 1, nur 1 ccm unverdünntes Serum.

Tabelle II (Abb. 2).

Nr.	mg Chinin in 55 ccm	Relative Giftmenge	% -Tributyrin nach					Geschwindig- keits-Konst. $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_x}{k_0} \cdot 100$
			0'	80'	60'	90'	120'		
1	0	0	100	69	44	28	18	0,0137	—
2	0,03	1	100	74	50	37	25,5	0,0113	17,5
3	0,15	5	100	89	71	53	44	0,0070	49
4	0,75	25	100	94	91	78	70	0,0029	78

Wie aus den Tabellen und den beigefügten Kurven ersichtlich ist, nehmen die (nach der monomolekularen Reaktion berechneten) Konstanten in arithmetischer Reihe ab, wenn die Giftkonzentrationen geometrisch zunehmen.

Ebenso liegen die Verhältnisse bei den folgenden zwei Versuchen.

Versuch 3 und 4. Zusammensetzung wie in den obigen Versuchen.

Tabelle III (Abb. 3).

Nr.	mg Chinin in 55 ccm	Relative Giftmenge	% -Tributyrin nach					Geschwindig- keits-Konst. $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_t}{k_0} \cdot 100$
			0'	30'	60'	90'	120'		
1	0	0	100	61	34	23	18	0,017	—
2	0,01	1	100	63	41	28	21	0,014	17,5
3	0,03	3	100	71	—	38	31	0,011	35,5
4	0,09	9	100	74	61	46	38	0,008	53
5	0,27	27	100	83	76	71	61	0,005	71
6	0,81	81	100	92	90	86	74	0,002	88

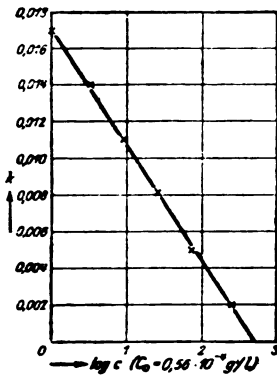


Abb. 3.

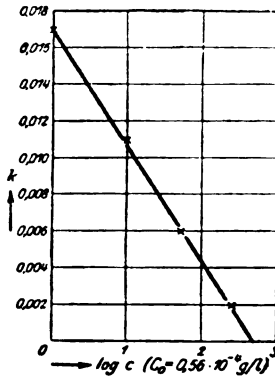


Abb. 4.

Tabelle IV (Abb. 4).

Nr.	mg Chinin in 55 ccm	Relative Giftmenge	% -Tributyrin nach					Geschwindig- keits-Konst. $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_t}{k_0} \cdot 100$
			0'	30'	60'	90'	120'		
1	0	0	100	61	34	23	18	0,017	—
2	0,03	1	100	67	—	38	31	0,011	35
3	0,15	5	100	90	71	61	51	0,006	65
4	0,75	25	100	95	92	85	74	0,002	89

Die folgenden Versuche wurden an Kaninchenserum ausgeführt. Da hier verhältnismäßig große Mengen Chinin (bis 50 mg in ca. 50 ccm) angewandt werden mußten, war es nötig, eine (im allgemeinen ganz geringe) Korrektur der beobachteten Tropfenzahl, die durch die Oberflächenspannung erniedrigende Wirkung der Chininbase eine Zunahme erfahren hat, anzubringen. Dabei wurde die Tropfenzahl der giftfreien Lösung als normal gesetzt.

Versuch 5. Zusammensetzung des Gemisches: 1 ccm Kaninchenserum (Verdünnung 1,5 : 10), 2 ccm Chinin. hydrochlor., 3 ccm Regulator (1 pr. 10 sek.). Nach 1 Stunde 50 ccm Tributyrinlösung.

Tabelle V (Abb. 5).

Nr.	mg Chinin in 56 ccm	Relative Giftmenge	% -Tributyrin nach					Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_x}{k_0} \cdot 100$
			0'	90'	120'	150'	180'		
1	0	0	100	50	34	23	15	0,0055	—
2	10	1	100	78	67	53	44	0,0030	45,5
3	20	2	100	84	—	67	55	0,0024	56,5
4	30	3	100	87	—	69	62	0,0021	62
5	40	4	100	84	—	70	66	0,0019	66
6	50	5	100	89	84	71	67	0,0018	67,5

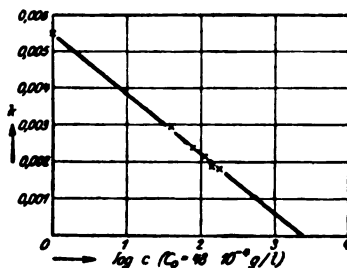


Abb. 5.

Wie aus der entsprechenden Kurve ersichtlich ist, gilt das logarithmische Gesetz auch hier.

Noch deutlicher ergibt sich dies aus den folgenden Versuchsreihen.

Versuch 6. Zusammensetzung: 1 ccm Kaninchenserum (1 : 2), 3 ccm Chinin hydrochlor. Nach 1 Stunde 3 ccm Regulator (1 pr. 12 sek. Phosphat), 50 ccm Tributyrin.

Tabelle VI (Abb. 6).

Nr.	mg Chinin in 57 ccm	Relative Giftmenge	% -Tributyrin nach				Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_x}{k_0} \cdot 100$
			0'	60'	90'	120'		
1	0	0	100	56	37	18	0,0072	—
2	1,85	1	100	60	44	27	0,0063	12,5
3	5,55	3	100	67	58	39	0,0051	29
4	16,66	9	100	74	64	50	0,0040	44,5
5	50,00	27	100	84	74	69	0,0028	61

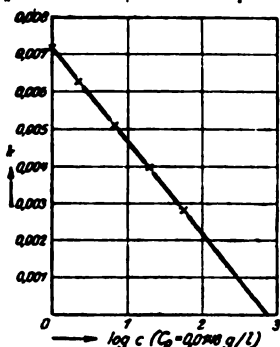


Abb. 6.

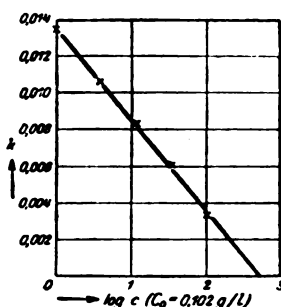


Abb. 7.

Tabelle VII (Abb. 7).

Nr.	mg Chinin in 57 ccm	Relative Giftmenge	% -Tributyrin nach						Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_x}{k_0} \cdot 100$
			0'	30'	45'	60'	75'	105'		
1	0	0	100	58	40	23	—	—	0,0134	—
2	2,22	1	100	67	53	37	24	—	0,0106	21
3	6,66	3	100	74	64	50	39	30	0,0083	38
4	20,0	9	100	83	79	63	54	44	0,0061	54,5
5	60,0	27	100	90	—	78	74	60	0,0037	72,5

Die höhere Chininkonzentration, die zu der Fermenthemmung beim Kaninchenserum nötig ist, steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen, die bei Atoxyl gemacht worden sind. Auch dort wurden namhafte Unterschiede in der (absoluten wie relativen) Giftempfindlichkeit der Sera verschiedener Tierarten gefunden. Namentlich große Resistenz zeigte die Meerschweinchenlipase gegen Atoxyl. Es ist nun bemerkenswert, daß diese Unterschiede bei dem Chininsalz noch viel ausgeprägter sind. Hier war die für Menschenlipase bereits tödliche Dosis noch unwirksam, und der fünftausendste Teil der für Meerschweinchenlipase noch unwirksamen Giftosis war beim Menschen schon wirksam¹⁾.

¹⁾ Siehe S. 225.

Ähnlich lagen die Verhältnisse für Maus, Ratte, Katze. Die Verhältnisse bei der Ratte zeigt Versuch 8.

Zusammensetzung des Gemisches: 1 ccm Rattenserum (1 : 5), 2 ccm Chininlösung, 3 ccm Regulator (1 : 12); nach 1 Stunde 50 ccm Tributyrin.

Tabelle VIII (Abb. 8).

Nr.	mg Chinin in 56 ccm	Relative Giftmenge	% Tributyrin nach						Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_x}{k_0} \cdot 100$
			0'	60'	90'	120'	150'	180'		
1	0	0	100	67	53	44	31	27	0,0052	—
2	1,0	1	100	69	62	50	34	29	0,0049	5,9
3	5,0	5	100	79	65	59	—	37	0,0036	31,4
4	10,0	10	100	80	71	62	—	45,5	0,0032	39,2
5	20,0	20	100	91	—	71	—	58	0,0024	55
6	40,0	40	100	93	89	74	—	64	0,0021	61

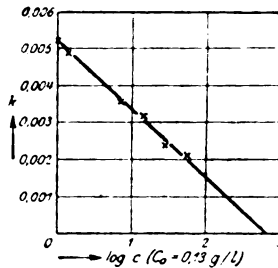


Abb. 8.

Wie man sieht, ist eine Hemmung der Esterspaltung erst von 5 mg Chinin. hydr. an in 56 ccm Lösung bemerkbar.

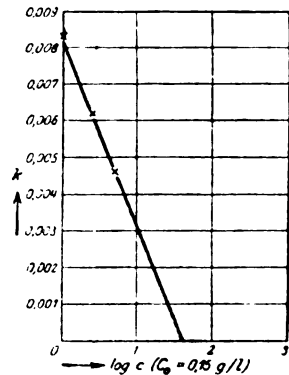


Abb. 9.

Noch deutlicher zeigt diese Verhältnisse der folgende Versuch mit Katzenserum.

Versuch 9. Zusammensetzung: 1 ccm Katzenserum (5fach verdünnt), 2 ccm Chininlösung. Nach 90 Minuten 50 ccm Regulator (1 : 12) mit Tributyrin gesättigt.

Tabelle IX (Abb. 9).

Nr.	mg Chinin in 56 ccm	Relative Giftmenge	% Tributyrin nach						Geschwindig- keits-Konst. $\frac{x}{t}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_x}{k_0} \cdot 100$
			0'	30'	60'	90'	120'	150'		
1	0	0	100	74	47	34	22	—	0,0083	—
2	1	1	100	74	47	33	22	—	0,0083	—
3	10	10	100	74	51	33	22	—	0,0083	—
4	20	20	100	75	62	44	28	23	0,0062	25,3
5	40	40	100	88	74	62	44	35	0,0046	45

Also erst 20 mg Chinin. hydrochl. (in 55 ccm) wirkten hemmend auf die Esterspaltung.

II.

Um zu prüfen, ob das Katzenserum eine Substanz enthält, die etwa wie ein Schutzkolloid auf die Lipase wirkt und so die Vergiftung durch Chinin verhindert, wurden Gemische von Menschen- und Katzenserum hergestellt und beobachtet, wie die Chinin-hemmung der Lipasewirkung im Menschenserum durch die gleichzeitige Anwesenheit von Katzenserum beeinflusst wird. Bei diesen Versuchen wurden Menschen- und Katzenserum so verdünnt, daß die Tributyrinspaltung in gleichen Zeiten in beiden Seren ungefähr die gleiche war. Als Giftkonzentration wurde eine solche gewählt, die beim Menschenserum eine ziemlich starke Hemmung hervorbrachte, aber nicht total hemmte, auf Katzenserum jedoch sicher gar nicht wirkte.

Den Verlauf eines solchen Versuches zeigt die folgende Tabelle.

Zusammensetzung der einzelnen Proben in dieser Reihe: in Nr. 1 und Nr. 4 1 ccm Menschenserum unverdünnt, in Nr. 2 und 5 1 ccm 5fach verdünntes Katzenserum, in Nr. 3 und 6 $\frac{1}{2}$ ccm Menschen- und $\frac{1}{2}$ ccm 5fach verdünntes Katzenserum. Nach 2 Stunden wurden hinzugefügt je 3 ccm Regulator (1 pr. 12 sek. Phosphat) und in Nr. 1, 2, 3 je 1 ccm dest. Wasser, in Nr. 4, 5, 6 je 1 ccm Chininlösung (= 0,2 mg). Nach dem Zufügen des Giftes wurde wieder $\frac{1}{2}$ Stunde gewartet und dann die Iributyrlösung (50 ccm) zugegeben.

Tabelle X.

Nr.	mg Chinin in 55 ccm	Art des Serums	% Tributyrin nach				Geschwindig- keits-Konst. $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_a}{k_0} \cdot 100$
			0'	30'	60'	90'		
1	0	1 ccm Menschenserum	100	62	43	29	0,0150	—
2	0	1 ccm Katzenserum . .	100	71	46	28	0,0127	—
3	0	$\frac{1}{2}$ ccm Menschenserum + $\frac{1}{2}$ ccm Katzenserum	100	68	41	27	0,0141	—
4	0,2	1 ccm Menschenserum	100	91	69	60	0,0060	60*)
5	0,2	1 ccm Katzenserum . .	100	71	43	28	0,0127	0**)
6	0,2	$\frac{1}{2}$ ccm Menschenserum + $\frac{1}{2}$ ccm Katzenserum	100	84	60	41	0,0092	34,7***)

*) bezogen auf 1, **) bezogen auf 2, ***) bezogen auf 3.

Man sieht zunächst aus dem Verlauf des Versuches, daß trotz Gegenwart des Katzenserums eine bedeutende Hemmung durch Chinin zu verzeichnen ist. Deutlich geht aus den Daten (vgl.

Nr. 1—3) hervor, daß die Spaltungswerte des Menschen- und des Katzenserums sich einfach addieren. Sowohl aus den Umsätzen wie aus den Geschwindigkeitskonstanten ist ersichtlich, daß bei den vorliegenden Mengenverhältnissen die in dem Gemisch beider Seren gewonnenen Werte für den Umsatz und die Geschwindigkeitskonstanten das arithmetische Mittel der Werte der einzelnen Seren betragen. Aus dem Versuch ergibt sich weiterhin, daß die Hemmung, die das Chinin auf die Lipase des Menschenserums ausübt, durch das Katzenserum nicht beeinflusst wird. Man kann die zu erwartende Hemmung aus den vorliegenden Daten berechnen.

$h_{M(\text{ensch})}$ ist = $\frac{k_1 - k_4}{k_1}$ (wobei die Indices die Nummern des Versuches bedeuten). Für $h_{M(\text{ensch}) + K(\text{atze})}$ gilt = $\frac{k_3 - k_4}{k_3}$. Setzt man für k_3 den Wert $\frac{k_1 + k_2}{2}$, für k_4 den Wert $\frac{k_1 + k_2}{2}$ ein, so erhält man schließlich (da $k_2 = k_3$) für $h_{M + K} = \frac{h_M \cdot k_1}{k_1 + k_2}$ oder $\frac{h_M \cdot k_1}{2k_2}$. Der berechnete Wert für $h_{M + K}$ ist 0,32, der gefundene 0,34.

Daß die Wirkungen der beiden Seren sich addieren, zeigt auch der folgende Versuch.

Versuch 10. Zusammensetzung: Nr. 1. 1 ccm Menschenserum; Nr. 2. 1 ccm 5fach verdünntes Katzenserum; Nr. 3. $\frac{1}{2}$ ccm Menschenserum + $\frac{1}{2}$ ccm Katzenserum. — Nach 18 Stunden wurden 1 ccm Chininum hydrochlor. (= 0,2 mg) und 3 ccm Regulatormischung (1 pr. 12 sek. Phosphat) zugefügt; nach weiteren 3 Stunden die Tributyrinlösung.

Nr.	Art des Serums	noch vorhandenes Tributyrin			Geschwindigkeits-Konst.
		0'	45'	70'	
1	1 ccm Mensch	100	80	91	0,0050
2	1 ccm Katze	100	64	46	0,0105
3	$\frac{1}{2}$ ccm Mensch, $\frac{1}{2}$ ccm Katze	100	71	58	0,0077

Zu dem gleichen Ergebnis führt auch der folgende Versuch.

Versuch 11. Zusammensetzung wie oben. Die einzelnen Bestandteile wurden in derselben Reihenfolge, aber Gift und Tributyrin unmittelbar hintereinander zusammengegeben.

Ähnlich lagen die Verhältnisse bei der Mischung von Menschen- und Meerschweinchen Serum. Wir können also die oben gestellte Frage dahin beantworten, daß die Resistenz von Katzen- (bzw. Meerschweinchen-) Serumlipase gegen Chinin, bei Zufügen dieser Serumarten zu Menschenserum, nicht auf die

Menschenserumlipase übertragbar ist, deren Empfindlichkeit gegen Chinin unverändert bestehen bleibt.

Tabelle XI.

Nr.	mg Chinin in 58 ccm	Art des Serums	% Tributyrin nach						Geschwindigkeits-Konst. $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-s}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_s}{k_0} \cdot 100$
			0'	20'	40'	60'	90'	110'		
1	0	1 ccm Menschenserum	100	80	53	47	30	24	0,0130	—
2	0	1 ccm Katzenserum . .	100	78	64	41	22	20	0,0152	—
3	0	1 ccm Menschenserum + 1 ccm Katzenserum	100	58	34	18	—	—	0,0272	—
4	0,2	1 ccm Menschenserum	100	91	84	—	67	60	0,0045	66*)
5	0,2	1 ccm Katzenserum . .	100	—	55	—	24	20	0,0150	0**)
6	0,2	1 ccm Menschenserum + 1 ccm Katzenserum	100	71	44	27	22	18	0,0197	27,5***)

*) bezogen auf 1, **) bezogen auf 2, ***) bezogen auf 3.

III.

Bevor wir die bis jetzt gewonnenen Befunde zusammenfassend betrachten, ist es noch nötig, auf zwei Punkte einzugehen, die sich gelegentlich der früheren Untersuchungen als wichtig für die Beziehungen Ferment-Gift erwiesen haben¹⁾.

Der erste Punkt betrifft die Reihenfolge, in der die einzelnen Bestandteile des jeweiligen Ferment-Giftgemisches zusammengegeben werden. Bei der Wirkung des Atoxyls auf Serumlipase war dies für die Größe der Giftwirkung maßgebend. So betrug die Hemmung, um nur ein Beispiel anzuführen, beim Vermischen von Tributyrin und Atoxyllösung und nachträglichem Zufügen des Serums 12%, beim Vermischen von Serum und Atoxyllösung und nachträglichem Zufügen von Tributyrin unter sonst gleichen Bedingungen 91%!

Wir variierten demnach die Reihenfolge der einzelnen Bestandteile und prüften, ob dadurch eine Änderung der Geschwindigkeitskonstanten auftritt.

Versuch 12. Zusammensetzung: Je 50 ccm Tributyrin, 3 ccm Regulator (1 pr. 7 sek. Phosphat), 1 ccm Menschenserum, 1 ccm Chininhydrochlor. (= 0,1 mg). Die Änderung der Reihenfolge ist aus den Angaben in der Tabelle ersichtlich.

Wie man sieht, hat die Reihenfolge der Zusätze keinen Einfluß auf den Verlauf der Tributyrinspaltung. Auch die Zeit des Einwirkens des Chinins auf die Lipase ist ohne Bedeutung.

¹⁾ Rona und Bach, l. c.

Tabelle XII.

Nr.	mg Chinin in 55 ccm	Reihenfolge	%Tributyryn nach				Geschwindigkeits-Konst. $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_x}{k_0} \cdot 100$
			0'	30'	60'	90'		
1	0	Regulator, Serum, Tributyrin	100	67	41	27	0,0143	—
2	0,1	Reg., Trib., Gift, dann Serum	100	80	60	46	0,0082	43
3	0,1	Reg., Trib., Serum, dann Gift	100	80	60	46	0,0082	43
4	0,1	Reg., Ser., Gift, dann Trib.	100	80	60	46	0,0082	43
5	0,1	Reg., Ser., Gift, nach 30' Trib.	100	80	60	46	0,0082	43
6	0,1	Ser., Gift, nach 30' Trib. u. Reg.	100	80	60	46	0,0082	43

Zu demselben Ergebnis führen auch die folgenden Versuche.

Versuch 13. Zusammensetzung: 1 ccm Menschenserum, 1 ccm Chinin. hydrochlor. (= 0,1 mg Chinin), 3 ccm Regulator (1 pr., 10 sek. Phosphat) 50 ccm Tributyrin.

Tabelle XIII.

Nr.	mg Chinin in 55 ccm	Reihenfolge	%Tributyryn nach						Geschwindigkeits-Konst. $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_x}{k_0} \cdot 100$
			0'	30'	45'	60'	75'	90'		
1	0	Reg., Serum, dann Tributyrin	100	62	48	39	33	—	0,0160	—
2	0,1	Reg., Serum, Gift dann Trib.	100	78	67	62	58	—	0,0079	51
3	0,1	Reg., Gift, Trib, nach 30' Ser.	100	78	71	62	58	49	0,0077	52
4	0,1	Reg., Ser., Gift, nach 60' Trib.	100	84	78	62	53	46	0,0077	52
5	0,1	Reg., Ser. Gift, nach 120' Trib.	100	84	74	62	55	46	0,0078	51

Versuch 14. Zusammensetzung wie oben.

Tabelle XIV.

Nr.	mg Chinin in 58 ccm	Reihenfolge *)	%Tributyryn					Geschwindigkeits-Konst. $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_x}{k_0} \cdot 100$
			0'	60'	120'	150'	180'		
1	0	Serum, Regulator . .	100	53	34	20	—	0,0102	—
2	0,1	Gift, Reg., dann Ser.	100	80	—	—	39	0,0052	49
3	0,1	Gift, dann Ser. u. Reg.	100	74	57	—	36	0,0052	49
4	0,1	Ser., Reg., dann Gift	100	77	56	—	36	0,0049	52
5	0,1	Ser., dann Gift, Reg.	100	74	57	—	34	0,0053	48
6	0,1	Gift, Ser., dann Reg.	100	74	—	52	36	0,0051	50

*) In allen Fällen wurde Tributyrin 15' nach dem letzten Bestandteil zugefügt.

Versuch 15. Zusammensetzung wie oben.

Der zweite Punkt von wesentlicher Bedeutung ist die Wasserstoffionenkonzentration des Gemisches. In der vorherigen Arbeit über die Wirkung des Chinins auf Invertase

Tabelle XV.

Nr.	mg Gift in 55 ccm	Reihenfolge	% Tributyrin nach				Geschwindig- keits-Konst. $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_a}{k_0} \cdot 100$
			0'	60'	120'	180'		
1	0	Regulator, Serum, Tributyrin	100	55	28	24	0,0107	—
2	0,1	Reg., Trib., Gift, dann Ser.	100	78	46	41	0,0062	42
3	0,1	Reg., Trib., Ser., dann Gift	100	74	49	41	0,0056	47
4	0,1	Reg., Ser., Gift, dann Trib.	100	71	49	41	0,0059	45
5	0,1	Reg., Ser., Gift, nach 30' Trib.	100	72	46	41	0,0060	44
6	0,1	Reg., Ser., Gift, nach 60' Trib.	100	71	49	39	0,0060	44
7	0,1	Reg., Ser., Gift, nach 120' Trib.	100	69	49	—	0,0061	43

konnte gezeigt werden, daß die Wirkung auf das Ferment allein von der Alkaloidbase abhängt und je nach dem Dissoziationszustand des Chininsalzes, der von der Wasserstoffionenkonzentration abhängt, die hemmende Wirkung des Alkaloids zu- oder abnimmt. Auch in den hier vorliegenden Fällen war zu erwarten, daß mit zunehmender Alkalinität die hemmende Wirkung des Chininsalzes zunehmen würde. Das war auch tatsächlich der Fall, wie dies die folgenden Versuche zeigen.

Versuch 16. Zusammensetzung: 1 ccm Menschenserum, 1 ccm Chinin. hydrochlor. (Nr. 3, 4) bzw. Chinin. phosphor. (Nr. 5, 6) (= 0,1 mg des Salzes), 3 ccm Regulator von der angegebenen Zusammensetzung, 50 ccm Tributyrin.

Tabelle XVI.

Nr.	mg Chl- nin in 55 ccm	Relative Gift- menge	Regulator		% Tributyrin nach					Geschwindig- keits-Konst. $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_a}{k_0} \cdot 100$
			pr.: sek	p _H	0'	60'	90'	120'	185'		
1	0	0	1:1	6,44	100	70	57	46	—	0,0062	—
2	0	0	1:12	7,60	100	41	23,5	—	—	0,0157	—
3	0,2	1	1:1	6,44	100	82	73	66	61	0,0035	43,5
4	0,2	1	1:12	7,60	100	73	—	53	47	0,0054	65,5
5	0,2	1	1:1	6,44	100	82	68	68	—	0,0033	46,9
6	0,2	1	1:12	7,60	100	75	61	57	—	0,0049	67,8

Wie man sieht, ist es für die Hemmung ohne Einfluß, welches Chininsalz man nimmt: die Hemmung ist in 3 und 5 oder 4 und 6 fast gleich. Hingegen wächst die Hemmung bedeutend mit der Abnahme der H Ionenkonzentration.

Dasselbe zeigen auch die folgenden Versuche:

Versuch 17. Zusammensetzung wie oben. Angewandt nur Chininum hydrochloricum.

Tabelle XVII.

Nr.	mg Chinin in 55 ccm	Relative Giftmenge	Regulator		% Tributyrin nach					Geschwindigkeits-Konst. $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-z}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_a}{k_0} \cdot 100$
			prim.: sek.	P_H	0'	60'	90'	120'	185'		
1	0	0	1:8	7,31	100	57	40	30	25	0,0100	—
2	0	0	1:1	6,44	100	83	62	52	50	0,0053	—
3	0	0	8:1	5,39	100	100	—	92	—	0,0007	—
4	0,2	1	1:8	7,31	100	81	62	55	48	0,0053	47
5	0,2	1	1:1	6,44	100	92	74	67	62	0,0034	36
6	0,2	1	8:1	5,89	100	100	—	100	—	0,0000	0

Versuch 18. Zusammensetzung wie oben.

Tabelle XVIII.

Nr.	mg Chinin in 55 ccm	Relative Giftmenge	Regulator		% Tributyrin nach				Geschwindigkeits-Konst. $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-z}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_a}{k_0} \cdot 100$
			prim.: sek.	P_H	0'	60'	90'	120'		
1	0	0	1:1	6,44	100	71	59	46	0,0061	—
2	0	0	1:7	7,34	100	47	32	24	0,0124	—
3	0	0	1:10	7,47	100	41	28	18	0,0143	—
4	0	0	1:12	7,60	100	44	26	19	0,0139	—
5	0,2	1	1:1	6,44	100	89	79	68	0,0030	51
6	0,2	1	1:7	7,34	100	79	68	57	0,0043	65
7	0,2	1	1:10	7,47	100	73	64	51	0,0053	63
8	0,2	1	1:12	7,60	100	75	66	53	0,0046	67

Anschließend mögen einige Versuche bei variierter Ferment-(Serum-) Konzentration angeführt werden. Zur Anwendung kam hierbei (Vers. 19) 1 ccm Menschenserum (1-2- oder 4 fach verdünnt), 1 ccm Chininlösung, 3 ccm Regulator (1 pr. 12 sek. Phosphat), 50 ccm Tributyrin.

Den Verlauf des Versuches zeigt folgende Tabelle.

Tabelle XIX.

Nr.	mg Chinin in 55 ccm	Relative Giftmenge	Serum	% Tributyrin nach							Geschwindigkeits-Konst. $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-z}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_a}{k_0} \cdot 100$
				0'	15'	30'	60'	90'	120'	180'		
1	0	0	unverdünnt	100	74	67	50	35	—	—	0,0117	—
2	0,04	1		100	91	80	60	44	—	—	0,0084	28
3	0,40	10		100	97	91	84	74	—	—	0,0031	73
1'	0	0	zweifach verdünnt	100	—	89	71	58	49	34	0,0059	—
2'	0,04	1		100	—	91	—	69	60	44	0,0043	22
3'	0,40	10		100	—	97	93	91	84	69	0,0017	71
1''	0	0	vierfach verdünnt	100	—	—	89	—	69	60	0,0030	—
2''	0,04	1		100	—	—	91	—	74	67	0,0023	23,5
3''	0,40	10		100	—	—	95	—	—	80	0,0007	76

Wie man sieht, ist die Hemmung prozentual die gleiche bei allen drei Serumkonzentrationen

IV.

Die vorliegenden Daten gestatten uns, ähnlich wie in den Untersuchungen über die Wirkung des Atoxyls auf die Serumlipase sowohl die „relative“ Giftempfindlichkeit (d. h. die Empfindlichkeit gegen die Konzentrationsänderungen des Giftes) des Fermentes, wie auch die absolute Giftempfindlichkeit (die eben wirksame — C_0 — und die eben tödliche Giftdosis — C_i —) und die „Giftbreite“ bei den verschiedenen Lipasearten zu bestimmen. Es ist $\log C_i = \frac{k_a}{x} + \log A$ und $\log C_0 = \frac{k_a + k_0}{x} + \log A$ ¹⁾. Die so erhaltenen Werte umgerechnet auf g für 1 l sind in der folgenden Tabelle XX zusammengestellt. Dabei ergibt sich, daß

Tabelle XX.

Versuchsreihe	Art des Serums	p_H	$\frac{x}{k_0}$	$\frac{k_0}{x}$	C_0 , g in 1 l	C_i , g in 1 l
—*)	Mensch	6,7	0,25	4,00	$1 \cdot 10^{-4}$	1,00
—*)	"	6,7	0,33	3,02	$2,4 \cdot 10^{-4}$	0,24
—*)	"	6,7	0,29	3,90	$1,46 \cdot 10^{-4}$	0,40
—*)	"	6,7	0,29	3,90	$1,55 \cdot 10^{-4}$	0,42
1	"	7,7	0,39	2,56	$1,24 \cdot 10^{-4}$	0,043
2	"	7,7	0,44	2,27	$2,20 \cdot 10^{-4}$	0,0405
3	"	7,7	0,37	2,70	$0,61 \cdot 10^{-4}$	0,029
4	"	7,7	0,38	2,64	$0,56 \cdot 10^{-4}$	0,028
5	Kaninchen	7,8	0,29	3,90	$48 \cdot 10^{-4}$	10
6	"	8,0	0,34	2,94	$148 \cdot 10^{-4}$	13
7	"	8,0	0,36	2,78	$102 \cdot 10^{-4}$	6,2
7a	"	8,0	0,357	2,80	$89,7 \cdot 10^{-4}$	4,2
9	Katze	8,0	0,64	1,56	0,15	5,59
8	Ratte	8,0	0,345	2,90	$130 \cdot 10^{-4}$	9,15
—**)	Maus	8,0	?	—	nicht erreicht	—
—**)	Meerschwein	5,8–6,7	?	—	"	—
—**)	"	8,0	?	—	~ 1	nicht erreichbar

*) Die zu den ersten 4 Versuchsreihen gehörigen ausführlichen Protokolle sind aus Raummangel nicht mitgeteilt.

***) Bei Konzentrationen bis zu 1 g Chininhydrochlor. In 1 l trat keine Hemmung auf.

C_0 für Menschenserumlipase ziemlich konstant ist; es variiert von $0,5 \cdot 10^{-4}$ bis $2,4 \cdot 10^{-4}$. Dagegen ist der Wert für C_i stark von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig. Solange bei der gleichen

¹⁾ Vgl. P. Rona und E. Bach, l. c.

[H'] gearbeitet wurde, traten auch hier nur kleine Schwankungen auf; erniedrigt man aber die [H'] in dem Maße, daß p_H von 6,7 auf 7,7 steigt, so bewirkt schon der 10. Teil der vorher als tödlich gefundenen Chininmenge totale Hemmung. Dem entspricht natürlich eine Verkleinerung der Giftbreite. Die Giftbreite ist der reziproke Wert des in der 4. Spalte angegebenen Ausdrucks für die relative Giftempfindlichkeit $\frac{x}{k_0}$. Dabei bedeutet „Giftbreite“ folgendes. Wählt man C_0 , die eben wirksame Giftmenge, als Einheit und trägt die Logarithmen der darauf bezogenen Konzentrationen als Abszissen auf, die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten als Ordinaten, so schneidet die entstehende Gerade die x -Achse in dem Punkte, der die total hemmende Giftmenge (bzw. deren Logarithmus) angibt. Die Strecke zwischen diesem Punkte und dem 0-Punkte (dem Logarithmus der als Einheit gewählten Konzentration C_0) ist gleich $\frac{k_0}{x}$, der „Giftbreite“. $\frac{k_0}{x}$ ist also $\log C_t$. Sinkt nun dieser Wert, der für $p_H = 6,7$ im extremen ersten Fall der Tabelle IV beträgt, bei $p_H 7,7$ auf etwa 2,5, so bedeutet dies, daß die Giftbreite von 10 000 auf etwa 300 zurückgeht. Man sieht daraus, welchen großen Einfluß die [H'] auf die Giftbreite hat.

Bei den anderen Tierarten, Kaninchen, Katze, Ratte ist, wie bereits auf S. 218 erwähnt, sowohl die eben wirksame Giftmenge, als auch die eben tödliche bedeutend, um mehr als das 100fache höher. Bei Maus und Meerschweinchen wurde mit den anwendbaren Chininkonzentrationen überhaupt keine Hemmung erzielt.

In den bisherigen Versuchen wurde Chinin. hydrochlor. benutzt, in der Versuchsreihe 21 einige andere Chininsalze: Lactat, Formiat, Phosphat. Diese Salze verhielten sich ganz so wie das Hydrochlorid. Auch hier sieht man die Enge der „Giftbreite“ bei der stärker alkalischen Reaktion von $p_H 7,7$ bis 8.

Tabelle XXI.

Art des Serums	Chininsals	p_H	$\frac{x}{k_0}$	$\frac{k_0}{x}$	C_0 , g in 1 l	C_t , g in 1 l
Mensch	Chloricum	7,7	0,39	2,56	$1,24 \cdot 10^{-4}$	0,043
"	Lacticum	8,0	0,467	2,15	$1,76 \cdot 10^{-4}$	0,024
"	Lacticum	8,0	0,407	2,45	$0,95 \cdot 10^{-4}$	0,0273
"	Formic.	8,0	0,460	2,18	$1,34 \cdot 10^{-4}$	0,0202
"	Phosphor.	8,0	0,57	2,70	$1,32 \cdot 10^{-4}$	0,066

Ergänzend haben wir auch nach anderer Richtung hin das Verhalten anderer Chininsalze (Lactat, Acetat, Phosphat, Formiat) untersucht, namentlich im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen Konzentration und Hemmungswirkung. Wie es zu erwarten war, traten Unterschiede gegenüber dem Hydrochlorid nicht auf; die anwesenden Anionen waren für die Hemmungswirkung gleichgültig. Dies zeigen die folgenden Versuche.

Versuch 22. Angewandt: Je 1 ccm Menschenserum (unverd.), 1 ccm Chinin. lactic., 3 ccm Regulator (1 pr. 12 sek.), 50 ccm Tributyrinlösung.

Tabelle XXII (Abb. 10).

Nr.	mg Chinin. l. in 55 ccm	Relative Giftmenge	% Tributyrin nach							Geschwindigkeits-Konst. $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_x}{k_0} \cdot 100$
			0'	45'	60'	75'	90'	105'			
1	0	0	100	53	39	30	23	—	0,0156	—	
2	0,015	1	100	60	46	37	30	—	0,0125	20	
3	0,062	4	100	69	58	46	39	33	0,0090	45	
4	0,250	16	100	84	78	—	69	60	0,0049	68,5	
5	1,000	64	100	—	93	—	91	—	0,0011	97	

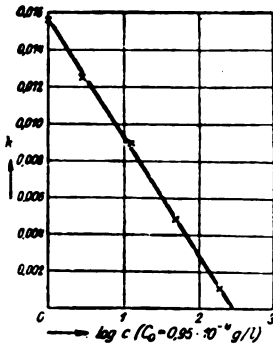


Abb. 10.

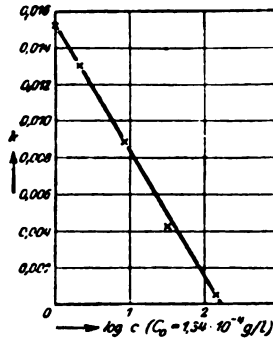


Abb. 11.

Versuch 23. Angewandt: Je 1 ccm Menschenserum (unverd.), 1 ccm Chinin. formiat., 3 ccm Regulator (1 pr. 12 sek.), 50 ccm Tributyrinlösung.

Tabelle XXIII (Abb. 11).

Nr.	mg Chinin. f. in 55 ccm	Relative Giftmenge	% Tributyrin nach							Geschwindigkeits-Konst. $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_x}{k_0} \cdot 100$
			0'	30'	45'	60'	75'	90'	105'		
1	0	0	100	69	50	36	30	—	0,0152	—	
2	0,015	1	100	75	56	45	39	30	0,0130	14,5	
3	0,062	4	100	77	69	60	49	41	0,0089	41,5	
4	0,250	16	100	87	81	77	72	69	0,0043	71,5	
5	1,00	64	100	100	—	97	—	89	0,0005	97	

Versuch 24. Angewandt: Je 1 ccm Menschenserum (unverd.), 1 ccm Chinin. phosphat., 3 ccm Regulator (1 pr. 12 sek.), 50 ccm Tributyrinlösung.

Tabelle XXIV (Abb. 12).

Nr.	mg - Chinin. ph. in 55 ccm	Relative Giftmenge	% Tributyrin nach					Geschwindig- keits-Konst. $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$	Hemmung $\frac{k_0 - k_s}{k_s} \cdot 100$
			0'	60'	90'	105'	120'		
1	0	0	100	64	41	38	31	0,0096	—
2	0,015	1	100	71	49	41	37	0,0082	14,4
3	0,062	4	100	75	57	47	44	0,0066	31,5
4	0,25	16	100	85	71	64	59	0,0043	55
5	1,00	64	100	97	83	76	71	0,0027	72

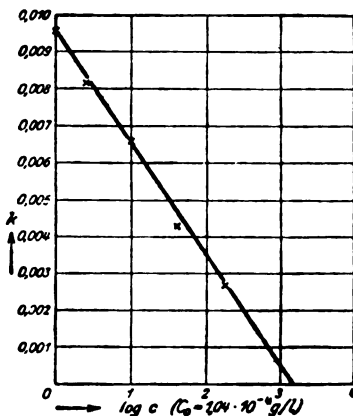


Abb. 12.

Wie man sieht, ist die gefundene Abhängigkeit der hemmenden Wirkung von der Konzentration dieselbe wie beim Chininum hydrochloricum.

V.

Die Möglichkeit, die Wirkung bestimmter Gifte an den Fermenten genau zu verfolgen, setzt uns naturgemäß auch in die Lage, Kombinationen von Giften an Fermentssystemen zu studieren. Hier seien zunächst die Untersuchungen mitgeteilt, die sich auf die vereinigte Wirkung von Chinin. hydrochlor. und Atoxyl beziehen. Die Versuchsanordnung war hierbei folgende: Serum (meist 1 ccm Menschenserum unverdünnt) und Gift standen 30–60' zusammen; dann wurde der Regulator (5 ccm $\frac{1}{6}$ mol. Phosphatgemisch 1 pr. 10 sek. p_H elektrom. 7,56) zugefügt und schließlich 50 ccm einer gesättigten wässrigen Tributyrinlösung.

Es wurden drei verschiedene Reihenfolgen gewählt:

1. Serum und Atoxyl allein etwa 30', dann Chinin.
2. Serum und Chinin allein etwa 30', dann Atoxyl.
3. Serum wurde zum fertigen Gemisch Atoxyl-Chinin zugegeben. Dann folgte immer der Regulator und Tributyrin.

Stets wurde eine Kontrolle ohne Gift angesetzt, meist 2 bis 3 Versuche mit jedem einzelnen Gift.

Betrachten wir zuerst die Versuche, bei denen das Ferment zuerst mit Chinin stand und dann erst Atoxyl zugefügt wurde, so sehen wir, daß nirgends eine Addition der Wirkungen zu beobachten ist, sondern die Hemmungen sich so verhalten, als ob das Atoxyl gar nicht zur Wirkung gelangt wäre (durch das Chinin von der Oberfläche „verdrängt“ wäre) und die Wirkung des Chinins allein zur Geltung käme. Hierbei ist zu bemerken, daß das schwächer hemmende Chininsalz in etwa 10fach höherer Konzentration als das Atoxyl angewandt wurde¹⁾

Tabelle XXV.

Versuchsreihe	Nr.	% -Hemmung bei		Gefunden : % -Hemmung bei Atoxyl + Chinin	Gef. Hemmung bei Atoxyl + Chinin im Vergleich zu Chinin = 100
		reinem Atoxyl	reinem Chinin		
2	7	35,5	76	76	100
—	8	35,5	64,4	62	100
8	9	80	34	33	100
9	7	38,5	35,5	34	100
10	7	18	40	36	90
11	7	36	37	38	100

Anders liegen die Verhältnisse in denjenigen Versuchen, bei welchen das Atoxyl längere Zeit mit dem Ferment stand (Tabelle XXVI) und das Chinin erst nachträglich zugefügt wurde. Hier sehen wir in einer Reihe von Versuchen (z. B. Versuchsreihe 10, 11, Tabelle XXVI) eine fast vollkommene Summierung der beiden Wirkungen, in anderen (Versuch 9, Nr. 6) ist die Addition zwar keine vollständige, aber die vereinigte Wirkung beider Verbindungen ist größer als die jeder einzelnen. In einem Fall (Versuch 9, Nr. 9) hat man den Eindruck, als ob das Atoxyl ganz allein wirksam gewesen wäre und das (schwächer wirksame) Chinin „verdrängt“ hätte.

¹⁾ Zur Anwendung kamen (in 58 ccm Gesamtvolumen) 0,05 bzw. 0,01 mg Atoxyl und 0,5 bzw. 0,1 mg Chinin.

Tabelle XXVI.

Versuchsreihe	Nr.	% -Hemmung bei		Gefunden: % -Hemmung bei Atoxyl + Chinin	Gef. Hemmung bei Atoxyl + Chinin im Vergleich zu		
		reinem Atoxyl	reinem Chinin		Atox. = 100	Chin. = 100	Atox. + Ch. = 100
8	8	80	34	93	120	300	—
9	6	38,5	35,5	57	150	160	77
—	9	38,5	18,5	37	100	200	65
10	6	18	40	52	300	130	90
—	9	18	10	25	140	250	90
11	6	36	37	67	180	180	92
—	9	36	24	57	160	240	95

Betrachten wir schließlich die Versuche, bei denen Chinin und Atoxyl gleichzeitig auf das Ferment gewirkt haben (Tabelle XXVII), so erhalten wir, wie zu erwarten war, Resultate, die zwischen denen der beiden vorherigen stehen. Eine Addition der Wirkungen war

Tabelle XXVII.

Versuchsreihe	Nr.	% -Hemmung bei		Gefunden: % -Hemmung bei Atoxyl + Chinin
		reinem Atoxyl	reinem Chinin	
4	7	90	64	71
	8	81	64	65
	9	64	64	65
5	7	69	63	69
	8	69	49	67
	9	69	32	63
6	7	79	42,5	62
	8	79	30	76
	9	79	17	79
8	10	80	34	43
9	8	38,5	35,5	37
	10	38,5	18,5	32,5
10	8	18	40	39
	10	18	10	13
11	8	36	37	57
	11	36	24	26

nirgends zu beobachten; diese liegen meist unterhalb der Atoxylwirkung, jedenfalls liegt die Hemmung (falls die Atoxylhemmung größer ist als die Chininhemmung) nie höher als es der reinen Atoxylwirkung entspricht. Die Chininwirkungen erfahren oft eine Zunahme. Auch hier hat es in mehreren Versuchen (z. B. Versuch 10 Nr. 8, Versuch 11 Nr. 11) den Anschein, als ob das Chinin das Atoxyl ganz oder zum Teil vom Wirkungsort verdrängt hätte. Andererseits verdrängt anscheinend das in sehr wirksamer Konzentration vorhandene Atoxyl das nur in schwacher Konzentration vorhandene Chinin (vgl. Versuch 6. Nr. 9).

Zusammenfassung.

1. Die hemmende Wirkung des Chinin. hydrochlor. auf Serumlipase verläuft nach demselben Typus wie die Hemmung der Lipasewirkung durch Atoxyl. Die Giftwirkung ist dem Logarithmus der Giftkonzentration direkt proportional.

2. Eine Schutzwirkung des Tributyrins (wie bei der Atoxylwirkung) konnte nicht beobachtet werden. Es war gleichgültig, in welcher Reihenfolge die einzelnen Bestandteile des Gemisches zugefügt worden waren.

3. Die hemmende Wirkung des Chininsalzes ist von der Wasserstoffionenkonzentration des Systems abhängig, indem sie bei stärker werdender alkalischer Reaktion zunimmt, entsprechend dem Dissoziationszustande des Chininsalzes.

4. Die verschiedenen Chininsalze unterscheiden sich in bezug auf die Giftwirkung nicht.

5. Auf Tierserum wirkt Chinin nur in Konzentrationen, die 100—1000 mal (und darüber) so groß sind wie die auf Menschenserum wirksamen. Mischt man Menschen- und Tierserum miteinander, so ist keinerlei „Schutzwirkung“ des letzteren zu beobachten, sondern die Lipasen der betreffenden Sera wirken ungestört nebeneinander und addieren ihre Wirkungen.

6. Kombiniert man Atoxyl und Chinin, so findet man, falls das Chinin zuerst dem Ferment zugefügt wurde, eine Verdrängung des Atoxyls von dem Ferment. Die Chininwirkung dokumentiert sich, als ob das Atoxyl nicht zugegen wäre. Läßt man jedoch das Ferment mit dem Atoxyl längere Zeit stehen, so beobachtet man in den meisten Fällen eine Addition der Wirkungen.

Beiträge zum Studium der Giftwirkung.

Über die Wirkung des m- und p-Nitrophenols auf Invertase.

Von

Peter Rona und Emerich Bach.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des städt. Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 25. März 1921.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Die Vergiftung von Invertase durch Schwermetallsalze (HgCl_2 , AgNO_3 , CuSO_4) und eine Reihe von organischen Verbindungen (hauptsächlich Anilinderivate) haben in neuerer Zeit v. Euler und Svanberg¹⁾ systematisch quantitativ verfolgt. Wir verdanken diesen sehr bedeutenden Untersuchungen wertvolle Einblicke in die stöchiometrischen Verhältnisse zwischen Ferment und Gift und den Chemismus der Fermentwirkung überhaupt. Wir bezwecken bei den hier mitgeteilten Versuchen über die Wirkungsweise der Nitrophenole auf Invertase neue Vergiftungstypen kennen zu lernen, um so allmählich ein besseres Verständnis des Wesens der Giftwirkung zu erlangen. Die aromatischen Nitrokörper sind als starke „Blutgifte“ bekannt. Lipschitz²⁾ hat gezeigt, daß die Giftwirkung der Nitrokörper hauptsächlich auf die Reduktionsprodukte (Hydroxylamine) zurückzuführen ist, die bei der durch Zelltätigkeit bewirkten Umwandlung der Nitrophenole entstehen. In der vorliegenden Abhandlung beschäftigen wir uns zunächst mit der reinen Nitrophenolwirkung.

Unsere Untersuchungen wurden nach verschiedenen Richtungen ausgedehnt. Es wurde untersucht:

¹⁾ Fermentforschung **3**, 330. 1920; **4**, 29 (hier Literatur), 142. 1920.

²⁾ Lipschitz, W. Zeitschr. f. physiol. Chemie **109**, 189. 1920; G. Hertwig und W. Lipschitz, Arch. f. d. ges. Physiol. **183**, 275. 1920.

1. Der zeitliche Verlauf der Vergiftung.
2. Der Zusammenhang zwischen Giftkonzentration und Wirkung.
3. Die relative Giftigkeit der verschiedenen Mononitrophenole.
4. Einfluß der Temperatur auf die Vergiftung.

Die Darstellung des Fermentes war dieselbe wie in der vorhergehenden Arbeit (vgl. S. 185). Zu den Nitrophenollösungen wurden Lösungen in 50% Alkohol benutzt. Bei der schweren Löslichkeit dieser Verbindungen in Wasser und ihrer verhältnismäßig geringen Giftigkeit konnten wässrige Lösungen nicht benutzt werden. Was die Wirkung des Äthylalkohols auf Invertase anlangt, so hemmt dieser in den angewandten Konzentrationen und bei Zimmertemperatur die Invertase gar nicht; über 30° wirkt Alkohol etwas schädigend. Die hier vorliegenden Verhältnisse sind aus folgender Tabelle¹⁾ ersichtlich.

Temperatur ° C	Zusatz	Geschwindigkeits- konstante bei 18°	Hemmung in %
18	Wasser	0,0186	—
18	50proz. Alkohol . .	0,0187	—
18	Abs. Alkohol . . .	0,0185	—
30	50proz. Alkohol . .	0,0186	—
35	50 „ „ . . .	0,0162	12,8
40	50 „ „ . . .	0,0144	22,5
40	Wasser	0,0185	—

Also bei 30° hemmt Alkohol das Ferment überhaupt nicht, bei 35° um etwa 13, bei 40° um etwa 23%. In wässriger Lösung wird das Ferment bei 40° nicht geschädigt.

Die Reaktion während der Spaltung wurde durch ein Gemisch von 4 Teilen $\frac{1}{10}$ -Essigsäure und 1 Teil $\frac{1}{10}$ -Acetat reguliert. Die H-Ionenkonzentration wurde elektrometrisch²⁾ öfter kontrolliert. Das p_H betrug in den Versuchen 4,1—4,2, die Spaltungen verliefen demnach beim Optimum der Invertase. Das Maß der Giftwirkung war die Abnahme der Geschwindigkeitkonstante bzw. die aus den Geschwindigkeitskonstanten berechneten Hemmkoeffizienten $k = \frac{k_0 - k}{k_0}$, wo k_0 die Geschwindigkeitskonstante ohne Gift, k die Geschwindigkeitskonstante mit Gift ist. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden nach der Formel $\frac{x}{t}$ berechnet (wo x die Drehungsverminderung, t die entsprechende Zeit in Minuten bedeutet). Da der Umsatz höchstens nur etwa ein Viertel des theoretisch Möglichen betrug, war dieses Vorgehen berechtigt³⁾. — Die Unterbrechung der Spaltung

¹⁾ Die näheren Versuchsdaten siehe am Schluß (vgl. Tabelle I).

²⁾ Die Messungen erfolgten in den Kontrollösungen ohne Gift.

³⁾ Vgl. hierzu u. a. L. Michaelis und M. Menten, diese Zeitschr. 49, 333. 1913.

erfolgte nach Einpipettierung von je 10 ccm des Gemisches in 2 ccm gesättigte Sodalösung, wodurch auch Multirotation aufgehoben wird.

Die gelbe Farbe der zur Polarisation kommenden Nitrophenollösungen (benutzt wurde ein Polarisationsapparat von Schmidt & Haensch mit 3teiligem Gesichtsfeld und Spektralbeleuchtung) störte die Ablesung so gut wie nicht. Die Drehungswinkel sind Mittelwerte von mindestens 6 Ablesungen.

I.

Zur Prüfung des zeitlichen Verlaufs der Vergiftung wurde das Ferment mit der betreffenden Nitrophenollösung vermischt und das Gemisch nach verschieden langem Zusammenstehen mit der Rohrzuckerlösung zusammengebracht und die Invertierung beobachtet.

Versuch 1. Es wurden 20 ccm Ferment mit 10 ccm einer 0,5 mol. (alkoholischen) m-Nitrophenollösung vermischt und je 3 ccm dieses Gemisches nach verschieden langem Stehen des Fermentes mit dem Gifte einer Rohrzuckerlösung (25 ccm ca. 10 proz. Rohrzuckerlösung, 10 ccm Essigsäure-Acetatmischung 4 : 1, 12 ccm dest. Wasser) zugefügt. Gesamtvolumen 50 ccm. Temperatur in allen Versuchen, wenn nicht anders angegeben, 18°.

Das Resultat dieser Versuchsreihe (vgl. Tabelle II) zusammengefaßt ist:

Einwirkungsdauer Min.	5	11	20	40	80	1200
Hemmung %	49,7	69,4	80,9	89,9	96,5	100

Wie wir sehen (vgl. Abb. 1) steigt die Giftwirkung in den ersten Minuten sehr rasch an, dann wird sie allmählich langsamer,

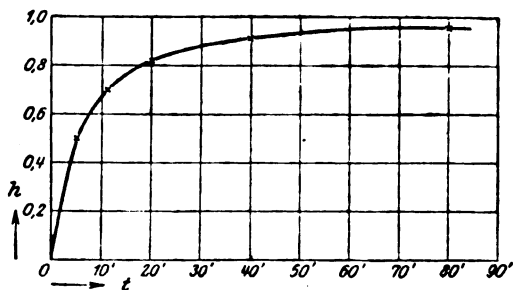


Abb. 1.

so daß nach einer Einwirkung von 5 Minuten die Hemmung 50% der totalen beträgt, aber auch nach einer Einwirkung von 80 Minuten die Inaktivierung noch nicht vollständig ist.

Versuch 3 (vgl. Tabelle III). Anordnung wie oben, nur die Konzentration des m-Nitrophenols 0,4 mol. (Abb. 2).

Einwirkungsdauer Min.	0,75	2	5	12	28	90	180
Hemmung %	14,5	18,4	25,2	32,8	46,4	73,4	86,5

In den folgenden zwei Versuchsreihen wurde p-Nitrophenol benutzt. Der Versuch verlief bei 41,6

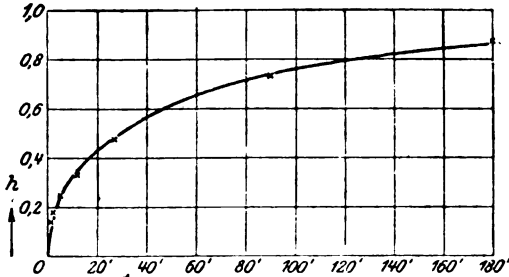


Abb. 2.

Im Versuch 4 (vgl. Tabelle IV) wurde gemischt: 1 ccm Ferment, 10 ccm Regulator (Essigsäure-Acetat $\frac{n}{10}$ 4 : 1), 1 ccm 1 mol. p-Nitrophenol-lösung. Nach verschiedener Einwirkungsdauer wurde diesem Gemisch 25 ccm ca. 10proz. Rohrzuckerlösung zugesetzt. Gesamtvolumen 37 ccm (Abb. 3, Nr. 3).

Einwirkungsdauer Min.	0,6	2	4	6	8	10	15
Hemmung %	53,9	77,1	82,8	85,0	88,0	95,4	100

Im Versuch 5 (vgl. Tabelle V) Anordnung wie in 4, nur halb so starke Giftkonzentration (Abb. 3, Nr. 4).

Einwirkungsdauer Min.	5	15	30	60	90
Hemmung %	23,0	40,5	54,7	70,2	73,7

Aus den beiden letzten Versuchen ersieht man, daß bei einer Verdoppelung der Giftkonzentration die Geschwindigkeit der Vergiftung nicht verdoppelt, sondern vervielfacht wird. So

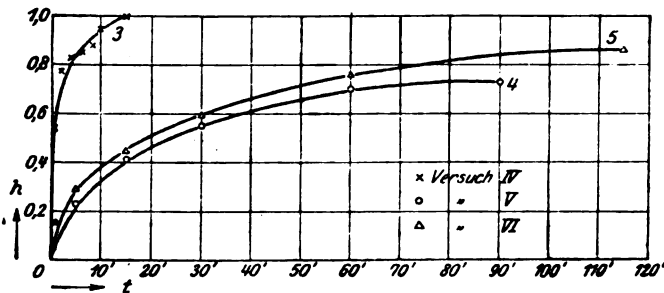


Abb. 3

homnte im speziellen Fall nach einer Einwirkungsdauer von 5 Minuten 1 cem 1 mol. p-Nitrophenol etwa zu 84%, 0,5 Mol dagegen nur zu 23%.

Versuch 6 (vgl. Tabelle VI). Anordnung wie in 4. Temperatur 42.2 (Abb. 3, Nr. 5).

Einwirkungsdauer Min.	1	5	15	30	60	120
Hemmung %	16,3	29,5	44,5	59,3	76,0	87,0

Die beigegebenen Abbildungen (1–3) geben ein übersichtliches Bild über den zeitlichen Verlauf der Giftwirkung. In diesen Kurven sind die Zeiten auf der Abszisse, die Hemmungskoeffizienten auf der Ordinate aufgetragen. Die Kurven steigen am Anfang sehr steil, dann werden sie flacher und laufen zum Schluß fast parallel zur Abszisse. Daß die Vergiftung bei geringerer Giftkonzentration selbst nach praktisch unendlicher Zeit nicht zu einer vollständigen Inaktivierung der Invertase führt, zeigt die Versuchsreihe 23 und 23a (S. 251), wo 1 cem 0,21 mol. p-Nitrophenol nach 24 Stunden Einwirkung eine Hemmung von 53,6% verursachte, diese aber selbst nach 7 Tagen nicht zugenommen hat: die Hemmung betrug nach 7 tägiger Einwirkung 52,7%.

II.

Bei der Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Giftwirkung und Giftkonzentration wurden 2 cem der Fermentlösung mit 1 cem des Giftes verschiedener Konzentration zusammengebracht. Dieses Gemisch stand 24 Stunden lang bei 18°, wobei praktisch die maximale Giftwirkung bei der gegebenen Konzentration erreicht wurde. Nach 24 Stunden wurde dann mit diesem Ferment-Giftgemisch nach Zufügen von Regulator und Wasser ca. 2,5 g Rohrzucker invertiert. Es wurde mit 3 verschiedenen Fermentpräparaten gearbeitet; verglichen wurden nur die an einem und demselben Präparat gewonnenen Ergebnisse.

In den folgenden Tabellen ist die hemmende Wirkung des m-Nitrophenols bei verschiedenen Konzentrationen des Giftes angegeben. Die Konzentration des m-Nitrophenols ist in g-Mol/Liter im Ferment-Giftgemisch, also die Konzentration während der 24stündigen Einwirkungsdauer angegeben. Wie wir später sehen werden, ist für die Größe der Hemmung nur diese Konzentration maßgebend.

I. Versuchareihen 7—10 (Ferment F₁) Tabellen VII—X. (Abb. 4¹)

m-Nitrophenol . . . g-Mol/Liter	0,010	0,021	0,043	0,063	0,083	
Hemmung %	2,7	4,4	14,4	28,7	46,2	
m-Nitrophenol . . . g-Mol/Liter	0,104	0,125	0,146	0,167	0,250	0,333
Hemmung %	65,3	75,3	89,8	96,4	99,4	100

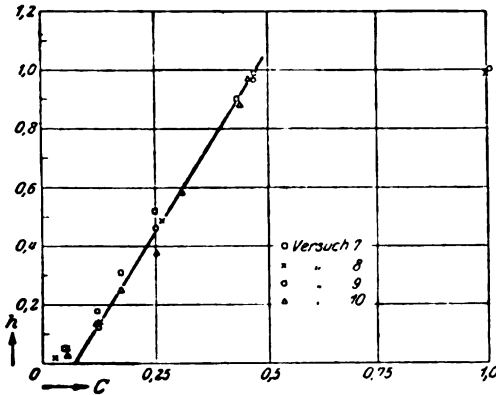


Abb. 4.

II. Versuchareihen 15—18 (Ferment F₂) Tabellen XV—XVIII. (Abb. 5)

m-Nitrophenol . . . g-Mol/Liter	0,042	0,067	0,075	0,079	0,083
Hemmung %	1,9	8,6	15,2	20,8	29,4
m-Nitrophenol . . . g-Mol/Liter	0,092	0,100	0,108	0,117	0,125
Hemmung %	39,7	62,9	70,1	84,4	95,4

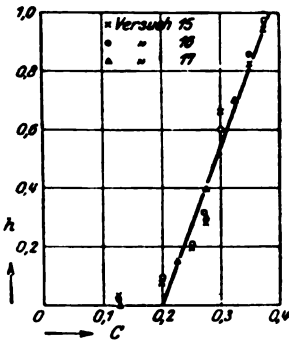


Abb. 5.

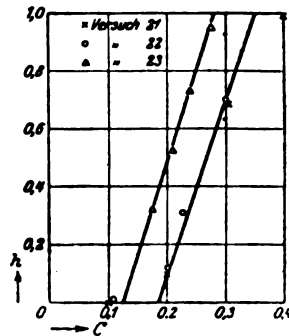


Abb. 6.

III. Versuchareihen 21—22. Ferment F₂. Tabellen XXI und XXII. (Abb. 6)

m-Nitrophenol . . . g-Mol/Liter	0,033	0,067	0,083	0,100	0,133
Hemmung %	0,3	10,1	30,9	69,1	100

¹) Abszisse: Konzentration der zugefügten Nitrophenollösung in g-Mol/Liter. Ordinate: die Hemmkoeffizienten.

Wie aus den Tabellen und Abbildungen 4, 5 und 6 ersichtlich ist, hat die wirksame Giftkonzentration einen Schwellenwert. Von diesem Schwellenwerte aufwärts steigt die hemmende Wirkung ganz proportional der Giftkonzentration; die Konzentrations-Hemmungskurve hat einen geradlinigen Verlauf. Die Abweichungen von der geraden Linie in der Nähe des Schwellenwertes und im Bereich der vollständigen Hemmung liegen innerhalb der Grenzen des Versuchsfehlers.

In den Parallelversuchen 9–10, 15–16, waren die Fermentkonzentrationen verschieden. Wie auch aus den nebenstehenden Tabellen ersichtlich, ist bei zweifacher Fermentkonzentration die hemmende Wirkung des Giftes die gleiche wie bei einfacher; der Wert der Hemmungskoeffizienten war demnach (in den angewandten Konzentrationen) von der Fermentkonzentration unabhängig.

Versuchsreihe 10 und 9			Versuchsreihe 16 und 15		
Giftkonzentration Mol/Liter	Ferment unverdünnt A	Ferment 2fachverdünnt A	Giftkonzentration Mol/Liter	Ferment unverdünnt A	Ferment 2fachverdünnt A
0,042	0,032	0,026	0,033	0,005	0
0,067	0,084	0,087	0,067	0,100	0,101
0,079	0,206	0,215	0,100	0,690	0,692
0,083	0,280	0,308	0,133	1,00	1,00
0,100	0,657	0,600			
0,117	0,826	0,862			
0,125	0,952	0,964			

In den folgenden Versuchen, die den Einfluß der Reihenfolge der Zusätze, die Rolle der Verdünnung, die Frage der Reversibilität zum Gegenstande haben, tritt deutlich hervor, daß wir es bei diesem Vergiftungstypus mit einem irreversiblen Vorgang zu tun haben. Es ist schon oben angedeutet worden, daß für die Größe der Giftwirkung nur diejenige Konzentration des Giftes maßgebend ist, die während der „Einwirkungsdauer“, d. h. während des Zusammenseins von Ferment und Gift vor dem Zufügen des Rohrzuckers besteht. Fügen wir, um nur ein Beispiel zu geben, zu einem Ferment-Regulatorgemisch (Gesamtvolumen 11 ccm) je 1 ccm 0,5 bzw. 1 molar m-Nitrophenollösung, so erhalten wir nur 14,9 bzw. 52,3 % Hemmung, während dieselbe Giftmenge, wenn sie, wie bei der üblichen Versuchsanordnung direkt mit dem Ferment, ohne vorherigen Pufferzusatz, zusammengebracht wird, bereits eine totale Fermentlähmung verursacht.

Vergleichen wir nun die Hemmungsgrößen der obigen Giftkonzentration (A) — also 0,042 (0,5/12) bzw. 0,083 ($\frac{1}{12}$) molar — mit einer (B), die folgenderweise hergestellt ist: 1 ccm von bzw. 0,125, 0,25 und 0,5 molarer m-Nitrophenollösung wurde mit 2 ccm des Fermentes zusammengebracht, so daß die Giftkonzentration im Gift-Fermentgemisch bzw. 0,042, 0,083 und 0,167 molar war. Bei dem Spaltungsversuch war das Gesamtvolumen in beiden Reihen 37 ccm (vgl. Tabelle XI.)

Die Hemmungen sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

Versuch B			Versuch A		
Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols molar, 1 ccm	Konzentration im Gift-Fermentgemisch	A in %	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols molar, 1 ccm	Konzentration im Gift-Puffer-Fermentgemisch	A in %
0,125	0,042	12,5	0,5	0,042	14,9
0,250	0,083	44,2	1,0	0,083	52,3
0,5	0,167	100			

Die Giftkonzentration war, obgleich im Versuch A die vierfache Giftmenge verwendet wurde, während der „Einwirkungs-dauer“ gleich. Dementsprechend zeigen auch die Hemmungskoeffizienten eine befriedigende Übereinstimmung.

Der folgende Versuch illustriert die Verhältnisse auch gut.

Im Versuch 14 (vgl. Tabelle XIV) wurden 2 ccm zweifach verdünntes Ferment (F₁) mit 10 ccm Acetatgemisch (4 Essigsäure, 1 Acetat) vermischt, dann 1 ccm m-Nitrophenol zugefügt. Nach 24stündigem Stehen wurden dann 25 ccm 10proz. Rohrzuckerlösung zugefügt.

1 ccm m-Nitrophenol molar	Konzentration des Giftes im Ferment-Acetat-Giftgemisch molar	$\frac{x}{t}$	A in %
0	0	0,0361	0
0,25	0,0192	0,0360	3,0
0,5	0,0385	0,0319	11,6

Die Hemmungen sind, wie der Vergleich mit obigem Versuch (B) lehrt, außerordentlich geringer als bei Zufügen des Giftes direkt zum Ferment.

Es könnte daran gedacht werden, daß der Einfluß der Verdünnung (die in unseren Versuchen durch das Hinzufügen von Puffer- und Rohrzuckerlösung stets erfolgt) erst nach längerer Zeitdauer — entsprechend etwa einer langsamen Ablösung des Giftes vom Ferment — in Erscheinung tritt. Wir haben zu diesem Zwecke das Ferment-Giftgemisch durch Zufügen

von Pufferlösung 4fach verdünnt, in verdünntem Zustande weitere 24 Stdn. stehengelassen und erst dann die Rohrzuckerlösung zugefügt. — Es ergab sich nun, daß die Hemmungskoeffizienten dieselben waren wie in den früheren Versuchen, bei welchen die Konzentration des Giftes im Ferment-Giftgemisch die gleiche war (vgl. Tabelle VII—VIII u. XII).

Konzentration des Giftes im Ferment-Giftgemisch molar	Hemmung aus Vers. 7 bis 11 in %	Hemmung aus Versuch 12 in %
0,042	14,4	13,7
0,083	46,2	45,7
0,167	100,0	100

Dasselbe ergibt sich aus den Versuchsreihen 18 und 20 (vgl. Tabellen XVIII u. XX).

Bei unserer Versuchsordnung hatten wir auf Grund der Beobachtungen angenommen, daß nach 24stündigem Stehen des Fermentes mit dem Gifte das Gift seine maximale Wirkung ausgeübt hat. Zur Unterstützung dieser Annahme soll noch die Versuchsreihe 19 dienen (vgl. Tabelle XIX). Hier war die Einwirkungsdauer 3 mal 24 Stunden. Trotzdem sind die Hemmungen nicht größer als in den Versuchsreihen 15—17 (vgl. Tabellen XV—XVII) mit 24stündiger Einwirkungsdauer (bei derselben Giftkonzentration).

Konzentration des Giftes im Ferment-Giftgemisch molar	Hemmung in % nach	
	24 h	72 h
0,042	1,9	0
0,083	29,4	28,4

In den beiden mitgeteilten Konzentrationsversuchen wurde stets m-Nitrophenol verwendet. Die Versuche, die mit p-Nitrophenol ausgeführt wurden (Versuchsreihe 23, Tabelle XXIII), zeigen, daß die bei m-Nitrophenol gefundenen Gesetzmäßigkeiten hier auch zu beobachten sind. Wenn man die zu dieser Versuchsreihe gehörende Kurve (vgl. Abb. 6) mit der zu den mit m-Nitrophenolversuchen 21—22 (die an demselben Fermentpräparat F₃ ausgeführt sind) gehörenden vergleicht, so sieht man, daß die beiden Konzentrations-Wirkungskurven parallel verlaufen. Die Giftwirkung des p-Nitrophenols ist etwas größer als die des m-Nitrophenols. Der Schwellenwert liegt etwas tiefer, ebenso die total hemmende Konzentration. Aus den mitgeteilten Daten ergibt sich für den Schwellenwert die Konzentration (im Ferment-Giftgemisch) bei p-Nitrophenol 0,042 Mol/l, bei m Nitrophenol 0,06 Mol/l; für die total hemmende Konzentration bei p-Nitrophenol ca. 0,093 Mol/l, bei m-Nitrophenol 0,12 Mol/l.

In Zusammenhang mit der Versuchsreihe 23 haben wir je 2 cem Ferment (F_3) mit 1 cem 0,21 mol. p-Nitrophenollösung stehengelassen, nach 4 und 7 Tagen zur Inversion einer Rohrzuckerlösung verwendet (vgl. Tabelle XXIIIa). Folgende Hemmungswerte wurden erhalten:

Einwirkungsdauer	Hemmung in %
24 Stdn.	53,6
96 „	46,4
168 „	52,7

Auch dieser Versuch zeigt also, daß die Hemmung nach 24 Stunden ihren Höhepunkt erreicht hat.

Zusammenfassend können wir aus den „Konzentrationsversuchen“ folgendes feststellen. Die Vergiftung durch Nitrophenole hat einen ausgesprochenen Schwellenwert. Dieser liegt bei verhältnismäßig sehr hoher Giftkonzentration. Beim Vergleich mit der Vergiftung mit Anilin¹⁾ ergibt sich, daß die Mononitrophenole der Größenordnung nach etwa 100 mal weniger giftig sind als Anilin oder Phenylhydrazin²⁾. Die Kurvenform ist eine gerade Linie, deren Gleichung $h = k(C - C_0)$ ist, wo k eine von der relativen Empfindlichkeit des Fermentes abhängige Konstante, C_0 der Schwellenwert, C die Giftkonzentration ist. Diese Kurvenform ist ähnlich wie die von Euler und Svanberg für $AgNO_3$ gefundene Kurve. Der Vorgang ist nicht reversibel. Die Konzentrations-Wirkungskurven zeigen ferner, daß die „Giftbreite“ sehr eng ist. Wie die Kurven 6–8 zeigen, führt schon die doppelte Höhe der eben wirksamen Giftkonzentration zu einer totalen Hemmung der Invertase³⁾.

Einen Einfluß der H-Ionenkonzentration auf die Giftwirkung konnten wir nicht feststellen⁴⁾.

Zur Prüfung dieser Frage wurde (vgl. Versuch 19, Tabelle XIX) die Einwirkung des Nitrophenols auf das Ferment bei verschiedenem p_H , einmal bei p_H 5,72, ein andermal bei p_H 3,95 durchgeführt. Nach 24stündiger Einwirkungsdauer wurde in beiden

¹⁾ Vgl. v. Euler und Svanberg, l. c.

²⁾ Verglichen sind dabei Giftmengen, die die Fermentaktivität etwa auf die Hälfte herabsetzen, wobei jedoch zu beachten ist, daß die verschiedenen Fermentpräparate sich gegen das Gift ungleich verhalten.

³⁾ Vgl. hierzu die Wirkung von $HgCl_2$ auf Urcase. M. Jacoby, diese Zeitschr. 76, 275. 1916.

⁴⁾ Dasselbe fanden v. Euler und O. Svanberg für Anilin. Fermentforschung 4, 29. 1920.

Lösungen die gleiche p_H (4,21) hergestellt, bei welcher die Rohrzuckerspaltung erfolgte. Die Hemmung betrug (bei gleicher Giftkonzentration) in der ersten Probe 19,8%, in der zweiten 17,9%. Die Abweichung liegt innerhalb der Fehlergrenzen.

III.

Die hemmende Wirkung des m-Nitrophenols auf Invertase wird von der Temperatur stark beeinflusst. Dies zeigen die folgenden Versuche (vgl. Tabelle XXIV—XXVIII).

Bei diesen war die Zusammensetzung der Lösungen wie bei den Konzentrationsversuchen; nur das Zusammenstehen des Ferment-Giftgemisches geschah bei verschiedenen Temperaturen im Wasserbad. Es wurde stets kontrolliert, ob die Giftwirkung eine maximale Höhe erreicht hat. Die Invertierung des Rohrzuckers geschah nach Abkühlung bei 18°. Die durch den Temperatureinfluß verursachte Schädigung des Fermentes ist ebenfalls vollständig irreversibel. In der folgenden Tabelle sind die Resultate der Versuche zusammengestellt. Die Giftkonzentrationen waren in allen Versuchen gleich.

Versuch	Temperatur • C	λ in %	$\frac{h_t + 10}{h_t}$
24	18	22,3	2,08
	30	54,1	1,72
	40	92,8	
25	18	28,7	1,75
	29	53,0	1,68
	40	94,0	
26	18	29,7	1,92
	25	46,8	2,01
	30	66,3	
27	18	29,9	2,10
	25	50,3	1,86
	30	68,6	1,71
	35	89,8	

Der durchschnittliche Temperaturkoeffizient, berechnet nach der van 't Hoff'schen Formel betrug für ein Fermentpräparat (F_2) 1,81, für ein anderes Fermentpräparat (F_3) 1,92.

Bei höheren Temperaturen wird das Ferment auch durch den angewandten 1 ccm 50proz. Alkohol ungünstig beeinflusst. Deshalb wurde bei jedem Temperaturversuch das Ferment-Alkoholgemisch demselben Temperatureinfluß unterworfen wie das Ferment-Giftgemisch. Das Ferment selbst wird ohne Zufügen von Alkohol bei 40° nicht geschädigt.

Zusammenfassung.

1. Die Vergiftung der Invertase durch m- und p-Nitrophenol erfolgt nicht momentan, sondern hat einen zeitlichen Verlauf.

2. Die Vergiftung der Invertase durch die Nitrophenole hat einen deutlichen Schwellenwert (der in der angewandten Versuchsanordnung und für das angewandte Ferment für m-Nitrophenol bei einer Konzentration von 0,06 Mol/l für p-Nitrophenol bei 0,04 Mol/l lag). Von diesem Schwellenwert aufwärts ist die hemmende Wirkung proportional der Giftkonzentration. Die Konzentrations-Hemmungskurve hat demnach einen geradlinigen Verlauf. Die Giftbreite ist sehr eng; bereits die doppelte Menge der eben wirksamen Konzentration bewirkt eine totale Hemmung der Invertase. Der Vorgang ist nicht reversibel. Ein Einfluß der H-Ionenkonzentration auf die Giftwirkung war nicht feststellbar.

3. Die hemmende Wirkung der untersuchten Nitrophenole auf Invertase wird von der Temperatur stark beeinflußt. Der durchschnittliche Temperaturkoeffizient der Hemmungen war 1,87.

Die theoretische Erörterung auch dieser Befunde, die im Gegensatz zu den Befunden bei Chinin für eine irreversible Zerstörung des Fermentes durch das Gift sprechen, soll, da die Untersuchungen fortgesetzt werden, erst später erfolgen.

Auszug aus den Protokollen.

Tabelle I (Versuch 1).

Zusammensetzung: 2 ccm Ferment, 1 ccm Alkohol oder Wasser. Nach Stehen bei verschiedenen Temperaturen: 10 ccm 4 : 1 Acetat, 12 ccm Wasser. 25 ccm (10%) Rohrzucker. Spaltung bei 18°.

Nr.	Zusatz	$k = \frac{x}{t}$	λ in %
1	Kontrolle mit 1 ccm Wasser. 24 Std. auf 18°	0,0186	—
2	1 ccm 50proz. Alkohol 24 Std. auf 18°	0,0187	0
3	1 ccm Alkohol absolut 24 Std. auf 18°	0,0185	0
4	1 ccm 50proz. Alkohol 5 Std. auf 30°	0,0186	0
5	1 ccm 50proz. Alkohol 5 Std. auf 30°	0,0162	12,8
6	1 ccm 50proz. Alkohol 5 Std. auf 35°	0,0144	22,5
7	1 ccm Wasser 5 Std. auf 40°	0,0185	0

Tabelle II (Versuch 2).

Zusammensetzung des Gemisches: 25 ccm 10proz. Rohrzuckerlösung. 12 ccm destilliertes Wasser, 10 ccm 4 : 1 Acetatgemisch, 3 ccm Ferment-Giftgemisch. (Ferment: zweimal verd. F., Gift: 0,5 Mol m-Nitrophenol). Temperatur 18°.

Nr.	Einwirkungs- dauer Minuten	$k = \frac{x}{t}$	λ in %
1	0	0,0199	—
2	5	0,0100	49,7
3	11	0,0061	69,4
4	20	0,0038	80,9
5	40	0,0020	89,9
6	80	0,0007	96,5
7	120	0	100

Tabelle III (Versuchsreihe 3).

Zusammensetzung des Gemisches wie in Tabelle II. Nur die Giftlösung war 0,4 Mol.

Nr.	Einwirkungs- dauer Minuten	$k = \frac{x}{t}$	λ in %
1	0	0,0222	—
2	0,75	0,0190	14,5
3	2,0	0,0181	18,4
4	5	0,0166	25,2
5	12	0,0149	32,8
6	28	0,0118	46,4
7	90	0,0059	73,4
8	180	0,0030	86,5

Tabelle IV (Versuchsreihe 4).

Zusammensetzung des Gemisches: 1 ccm zweimal verdünntes Ferment, 10 ccm 4 : 1 Acetat, 1 ccm Mol p-Nitrophenol. Nach verschiedener Einwirkungsdauer 25 ccm 10proz. Rohrzucker. Temp. = 41,6°.

Nr.	Einwirkungs- dauer Minuten	$k = \frac{x}{t}$	λ in %
1	0	0,0704	—
2	0,6	0,0324	53,9
3	2	0,0161	77,1
4	4	0,0121	82,8
5	6	0,0105	85,0
6	8	0,0084	88,0
7	10	0,0032	95,4
8	15	0	100

Tabelle V (Versuchsreihe 5).

Zusammensetzung des Gemisches: 1 ccm zweimal verdünntes Ferment, 10 ccm 4 : 1 Acetat. 1 ccm $m/2$ -p-Nitrophenol. Nach verschiedener Einwirkungsdauer 25 ccm 10proz. Rohrzuckerlösung. Gesamtvolumen 37 ccm. Temp. = 41,6°.

Nr.	Einwirkungs- dauer Minuten	$k = \frac{x}{t}$	h in %
1	0	0,0712	—
2	5	0,0548	23,0
3	15	0,0423	40,5
4	30	0,0322	54,7
5	60	0,0212	70,2
6	90	0,0187	73,7

Tabelle VI (Versuchsreihe 6).

Zusammensetzung des Gemisches wie bei Tabelle V. Nur Temp. = 42,2°.

Nr.	Einwirkungs- dauer Minuten	$k = \frac{x}{t}$	h in %
1	0	0,0716	0
2	1	0,0608	16,3
3	5	0,0512	29,5
4	15	0,0403	44,5
5	30	0,0295	59,3
6	60	0,0174	76,0
7	120	0,0094	87,0

Tabelle VII (Versuchsreihe 7).

Zusammensetzung des Gemisches: 2 ccm zweimal verd. Ferment F_1 , 1 ccm m-Nitrophenol. Nach 24 Std. 10 ccm 4 : 1 Acetatgemisch u. 25 ccm 10proz. Rohrzuckerlösung. Gesamtvolumen 38 ccm.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols Mol/Liter, 1 ccm	Konzentrat. des Giftes im Ferm.- Giftgemisch Mol/Liter	$k = \frac{x}{t}$	h in %
1	0	0	0,0375	0
2	0,031	0,010	0,0366	2,7
3	0,063	0,021	0,0354	5,5
4	0,125	0,042	0,0323	13,9
5	0,250	0,083	0,0192	48,8
6	0,500	0,167	0,0011	97,1
7	1,00	0,333	0	100

Tabelle VIII (Versuchsreihe 8).

Zusammensetzung des Gemisches bei Tabelle I.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols Mol/Liter, 1 ccm	Konzentrat. des Giftes im Ferm.- Giftgemisch Mol/Liter	$k = \frac{x}{t}$	A %
1	0	0	0,0362	0
2	0,125	0,042	0,0316	12,7
3	0,250	0,083	0,0197	45,6
4	0,500	0,167	0,0006	95,6
5	0,75	0,250	0,0002	99,4
6	1,00	0,333	0	100

Tabelle IX (Versuchsreihe 9).

Zusammensetzung des Gemisches wie bei Tabelle I.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols Mol/Liter, 1 ccm	Konzentrat. des Giftes im Ferm.- Giftgemisch Mol/Liter	$k = \frac{x}{t}$	A %
1	0	0	0,0400	0
2	0,0625	0,0208	0,0390	2,5
3	0,125	0,0417	0,035	12,5
4	0,1875	0,0625	0,0301	24,8
5	0,256	0,083	0,0247	38,3
6	0,3125	0,104	0,0168	58,0
7	0,375	0,125	0,0099	75,3
8	0,4345	0,146	0,0045	88,8
9	0,56	0,167	0,0019	95,3

Tabelle X (Versuchsreihe 10).

Zusammensetzung des Gemisches wie bei Tabelle I, nur Ferment unverd.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols Mol/Liter, 1 ccm	Konzentrat. des Giftes im Ferm.- Giftgemisch Mol/Liter	$k = \frac{x}{t}$	A in %
1	0	0	0,0753	0
2	0,0625	0,021	0,0713	5,3
3	0,1250	0,042	0,0615	18,3
4	0,1875	0,063	0,0508	32,5
5	0,250	0,083	0,0360	52,1
6	0,3125	0,104	0,0206	72,6
7	0,4375	0,146	0,00705	90,8
8	0,500	0,167	0,0018	97,6

Tabelle XI (Versuchsreihe 11).

Zusammensetzung des Gemisches: 2 ccm zweimal verd. Ferment (F₁).
1 ccm m-Nitrophenol. Nach 24 Std. Stehen 9 ccm 4 : 1 Acetatgemisch
und 25 ccm 10proz. Rohrzucker. Gesamtv. 37 ccm.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols Mol/Liter, 1 ccm	Konzentrat. des Giftes im Ferm.- Giftgemisch Mol/Liter	$k = \frac{x}{t}$	λ in %
1	0	0	0,0344	—
2	0,125	0,042	0,0301	12,5
3	0,250	0,083	0,0192	44,2
4	0,50	0,167	0	100

Tabelle XII (Versuchsreihe 12).

Zusammensetzung des Gemisches: 2 ccm zweimal verd. Ferment (F₁).
1 ccm m-Nitrophenol. Nach 24 Std. 9 ccm 4 : 1 Acetatgemisch. Die Lö-
sungen standen noch 24 Std. in dieser Verdünnung, dann 25 ccm Rohr-
zucker (10proz.) zugefügt. Die Zusammensetzung ist also zum Schluß wie
bei Versuch 5. Gesamtv. 37 ccm.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols Mol/Liter, 1 ccm	Konzentration des Giftes in der Ferment-Giftlösung Mol/Liter	$k = \frac{x}{t}$	λ in %
1	0	0	0,0344	—
2	0,125	0,042	0,0297	13,7
3	0,250	0,083	0,0187	45,7
4	0,50	0,167	0	100

Tabelle XIII (Versuchsreihe 13).

Zusammensetzung des Gemisches: 2 ccm zweimal verd. Ferment (F₁).
9 ccm 4 : 1 Acetatgemisch, 1 ccm m-Nitrophenol. Nach 24 Std. 25 ccm
(10proz.) Rohrzuckerlösung, Gesamtv. 37 ccm.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols Mol/Liter, 1 ccm	Konzentration des Giftes im Ferment- Acetat-Giftgemisch Mol/Liter	$k = \frac{x}{t}$	λ in %
1	0	0	0,0329	0
2	0,5	0,042	0,0279	14,9
3	1,0	0,083	0,0157	52,3

Tabelle XIV (Versuchsreihe 14).

Zusammensetzung des Gemisches: 2 ccm zweimal verd. Ferment (F₁). 10 ccm 4:1 Acetatgemisch. 1 ccm m-Nitrophenol. Nach 24 Std. 25 ccm (10 Proz.) Rohzuckerlösung. Gesamtv. 38 ccm.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenol	Konzentration des Giftes im Ferment-Acetat- Giftgemisch	$k = \frac{x}{t}$	h
	Mol/Liter, 1 ccm	Mol/Liter		
1	0	0	0,0361	0
2	0,25	0,0192	0,0350	3,0
3	0,50	0,0385	0,0319	11,6

Tabelle XV (Versuchsreihe 15).

Zusammensetzung des Gemisches: 2 ccm zweimal verd. Ferment (F₁). 1 ccm m-Nitrophenol. Nach 24 Std.: 12 ccm dest. Wasser, 10 ccm 4:1 Acetatgemisch, 25 ccm 10 Proz. Rohzuckerlösung. Gesamtv. 50 ccm.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenol	Konzentrat. des Giftes im Ferm.- Giftgemisch	$k = \frac{x}{t}$	A
	Mol/Liter, 1 ccm	Mol/Liter		
1	0	0	0,0195	—
2	0,125	0,04	0,0190	2,6
3	0,20	0,067	0,0178	8,7
4	0,238	0,079	0,0153	21,5
5	0,250	0,083	0,0135	30,8
6	0,30	0,10	0,0078	60,0
7	0,35	0,117	0,0027	86,2
8	0,375	0,125	0,0007	96,4

Tabelle XVI (Versuchsreihe 16).

Zusammensetzung des Gemisches wie in Tabelle XV. Ferment 2 ccm (unverd.).

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols	Konzentrat. des Giftes im Ferm.- Giftgemisch	$k = \frac{x}{t}$	A
	Mol/Liter, 1 ccm	Mol/Liter		
1	0	0	0,0379	0
2	0,125	0,042	0,0367	3,2
3	0,20	0,067	0,0347	8,4
4	0,238	0,079	0,0301	20,6
5	0,25	0,083	0,0273	28,0
6	0,30	0,10	0,0130	65,7
7	0,35	0,117	0,0066	82,6
8	0,375	0,125	0,0018	95,2

Tabelle XVII (Versuchsreihe 17).

Zusammensetzung des Gemisches wie in Tabelle XV. Ferment 2 ccm zweifach verd. F₂.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols Mol/Liter, 1 ccm	Konzentrat. des Giftes im Ferm.-Giftgemisch Mol/Liter	$k = \frac{x}{t}$	h in %
1	0	0	0,0204	0
2	0,125	0,042	0,0204	0
3	0,225	0,075	0,0173	15,2
5	0,25	0,083	0,0144	29,4
5	0,275	0,092	0,0123	39,7
6	0,325	0,108	0,006	70,1
7	0,375	0,125	0,001	94,6

Tabelle XVIII (Versuchsreihe 18).

Zusammensetzung: 2 ccm zweifach verd. Ferment (F₂), 1 ccm m-Nitrophenol; nach 24 stündigem Stehen: 12 ccm dest. Wasser, 10 ccm Acetatgemisch (4 Essigs., 1 Acetat ⁿ/₁₀); nach weiterem 24 stündigen Stehen: 25 ccm ca. 10 proz. Rohrzucker. Gesamtvolumen 50 ccm.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols Mol/Liter, 1 ccm	Konzentrat. des Giftes im Ferm.-Giftgemisch Mol/Liter	$k = \frac{x}{t}$	h in %
1	0	0	0,0185	0
2	0,275	0,092	0,0113	38,9
3	0,325	0,108	0,0059	68,1

Tabelle XIX (Versuchsreihe 19).

Zusammensetzung: 2 ccm zweifach verd. Ferment (F₂), 1 ccm m-Nitrophenol; nach 72 stündigem Stehen: 12 ccm dest. Wasser, 10 ccm Acetatgemisch (4 Essigs., 1 Acetat ⁿ/₁₀); 25 ccm Rohrzucker. Gesamtvolumen 50 ccm.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols Mol/Liter, 1 ccm	Konzentrat. des Giftes im Ferm.-Giftgemisch Mol/Liter	$k = \frac{x}{t}$	h in %
1	0	0	0,0183	0
2	0,125	0,042	0,0184	0
3	0,250	0,083	0,0131	28,4

Tabelle XX (Versuchsreihe 20).

Zusammensetzung: 2 ccm zweifach verd. Ferment (F_2), 1 ccm m-Nitrophenol; nach 48 stündigem Stehen: 12 ccm Wasser; nach weiterem 48 stündigem Stehen: 10 ccm Acetatgemisch (4 Essigs., 1 Acetat. $\frac{2}{10}$). 25 ccm 10proz. Rohrzuckerlösung. Gesamtv. 50 ccm.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols Mol/Liter, 1 ccm	Konzentrat. des Giftes im Ferm.- Giftgemisch Mol/Liter	$k = \frac{x}{t}$	h in %
1	0	0	0,0181	0
2	0,25	0,083	0,0126	30,4
3	0,50	0,166	0	100

Tabelle XXI (Versuchsreihe 21).

Zusammensetzung: 2 ccm zweifach verd. Ferment (F_2), 1 ccm m-Nitrophenol; nach 24 Stunden, 12 ccm dest. Wasser, 10 ccm Acetatgemisch (4 Essigs., 1 Acetat), 25 ccm ca. 10proz. Rohrzuckerlösung. Gesamtv. 50 ccm.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols Mol/Liter 1 ccm	Konzentrat. des Giftes im Ferm.- Giftgemisch Mol/Liter	$k = \frac{x}{t}$	h in %
1	0	0	0,00957	0
2	0,10	0,033	0,00953	0,5
3	0,20	0,07	0,00861	10,0
4	0,30	0,10	0,00297	69,0
5	0,40	0,133	0	100,0

Tabelle XXII (Versuchsreihe 22).

Zusammensetzung des Gemisches wie in Tabelle XXI, Ferment un-
verdünnt (2 ccm F_3).

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols Mol/Liter, 1 ccm	Konzentrat. des m- Nitrophen. in der Ferm.-Giftlösung Mol/Liter	$k = \frac{x}{t}$	h in %
1	0	0	0,0188	0
2	0,10	0,033	0,0188	0
3	0,20	0,066	0,0169	10,1
4	0,225	0,083	0,0130	30,9
5	0,30	0,10	0,0058	69,2
6	0,40	0,13	0	100

Tabelle XXIII (Versuchsreihe 23).

Zusammensetzung des Gemisches: 2 ccm Ferment (F₃); 1 ccm p-Nitrophenol. Nach 24 Stunden 10 ccm Acetatgemisch (4 Essigs., 1 Acetat) 25 ccm Rohrzuckerlösung (ca. 10 %). Gesamtvolumen 50 ccm.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols	Konzentrat. des p-Nitrophenols im Ferm.-Giftgemisch	$k = \frac{x}{t}$	h in %
	Mol/Liter	Mol/Liter		
1	0	0	0,0205	0
2	0,18	0,06	0,0139	32,2
3	0,21	0,07	0,0095	53,6
4	0,24	0,08	0,0056	72,7
5	0,27	0,09	0,0010	95,1
6	0,30	0,10	0	100

Tabelle XXIIIa (Versuchsreihe 23a).

Zusammensetzung wie oben. Die Konzentration des zugefügten p-Nitrophenols = 0,21 molar. Einwirkungsdauer vier- und siebenmal 24 Std.

Nr.	Zusatz	Einwirkungs-	$k = \frac{x}{t}$	h in %
		dauer Stunden		
1	1 ccm 50% Alkohol	96	0,0209	0
2	1 ccm 0,21 molar. p-Nitrophenol	96	0,0112	46,4
3	1 ccm 50% Alkohol	168	0,0205	0
4	1 ccm 0,21 molar. p-Nitrophenol	168	0,0097	52,7

Tabelle XXIV (Versuchsreihe 24).

Zusammensetzung des Gemisches wie bei Tabelle IX. Ferment: 2 ccm zweimal verd. F₃. Einwirkungsdauer bei 30° und 40° 3 1/2 Std., bei 18° 24 Std.

Nr.	Konzentration des zugefügten p-Nitrophenols	Konzentration des Giftes in der Ferm.-Giftlösung	Temperatur	$k = \frac{x}{t}$	h in %
	Mol/Liter, 1 ccm	Mol/Liter	C		
1	0	0	18	0,0184	0
2	0,25	0,083	18	0,0143	22,3
3	0	0	30	0,0185	0
4	0,25	0,083	30	0,0085	54,1
5	0	0	40	0,0139	0
6	0,25	0,083	40	0,0010	92,8

Tabelle XXV (Versuchsreihe 25).

Zusammensetzung des Gemisches wie in Tabelle XVII. Einwirkungs-
dauer bei 29° und 40° 2,5 Stdn., bei 18° 24 Stdn.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols Mol/Liter, 1 ccm	Konzentr. des Giftes im Ferm.- Giftgemisch Mol/Liter	Tem- peratur ° C	$k = \frac{x}{t}$	h in %
1	0	0	18	0,0181	0
2	0,25	0,083	18	0,0129	28,7
3	0	0	29	0,0183	0
4	0,25	0,083	29	0,0086	53,0
5	0	0	40	0,0149	18,6
6	0,25	0,083	40	0,0009	94,0

Tabelle XXVI (Versuchsreihe 26).

Zusammensetzung des Gemisches wie in Tabelle XVI. Ferment
2 ccm F₂. Gesamtvolumen 50 ccm. Einwirkungs-dauer bei 18° 24 Stdn.,
bei 25° 6 Stdn., bei 30° 3 Stdn.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols Mol/Liter, 1 ccm	Konzentr. des Giftes im Ferm.- Giftgemisch Mol/Liter	Tem- peratur ° C	$k = \frac{x}{t}$	h in %
1	0	0	18	0,0186	0
2	0,25	0,083	18	0,0131	29,7
3	0	0	25	0,0186	0
4	0,25	0,083	25	0,0099	46,8
5	0	0	30	0,0187	0
6	0,25	0,083	30	0,0063	66,3

Tabelle XXVII (Versuchsreihe 27).

Zusammensetzung des Gemisches wie in Tabelle XIX. Einwirkungs-
dauer bei 18° 24 St., bei 25° 5 Std., bei 30 und 35° 3 Std.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols Mol/Liter, 1 ccm	Konzentrat. des Giftes im Ferm.- Giftgemisch Mol/Liter	Temp. ° C	$k = \frac{x}{t}$	h in %
1	0	0	18	0,0154	0
2	0,25	0,083	18	0,0108	29,9
3	0	0	25	0,0151	0
4	0,25	0,083	25	0,0075	50,3
5	0	0	30	0,0153	0
6	0,25	0,083	30	0,0048	68,6
7	0	0	35	0,0128	16,9
8	0,25	0,083	35	0,0013	89,8

Tabelle XXVIII (Versuchsreihe 28).

Zusammensetzung: 2 ccm Ferment (F_1), 10 ccm Acetatgemisch (4 Essigsäure, 1 Acetat), 1 ccm m-Nitrophenol, 6 Std. auf 42° , dann bei 18° abgekühlt, Spaltung von 25 ccm 10 proz. Rohrzuckerlösung. Gesamtvolumen 38 ccm.

Nr.	Konzentration des zugefügten m-Nitrophenols	Konzentration des Giftes im Ferment-Puffer-Giftgemisch	$k = \frac{x}{t}$	h in %
	Mol/Liter, 1 ccm	Mol/Liter		
1	0	0	0,0315	0
2	0,125	0,0095	0,0285	9,5
3	0,25	0,019	0,0206	34,6
4	0,50	0,038	0,0029	90,8

Tabelle XXIX (Versuchsreihe 29).

Nr. 1. 2 ccm Ferment (F_3); 3 ccm $\frac{1}{10}$ -Natriumacetat, 1 ccm 0,3 molar p-Nitrophenol $p_H = 5,72$ (elektrom.). Nach 24 Std. zugefügt 10 ccm $\frac{1}{10}$ -Essigsäure, 9 ccm Wasser, 25 ccm ca. 10 proz. Rohrzuckerlösung.

Nr. 2. Kontrolle. Statt p-Nitrophenol 1 ccm Alkohol.

Nr. 3. 2 ccm Ferment (F_3); 3 ccm $\frac{1}{10}$ -Essigsäure, 1 ccm 0,3 molar p-Nitrophenol, $p_H = 3,95$ (elektrom.). Nach 24 Stunden 7 ccm $\frac{1}{10}$ -Essigsäure, 3 ccm Natriumacetat, 9 ccm Wasser, 25 ccm ca. 10 proz. Rohrzuckerlösung.

Nr. 4. Kontrolle mit 1 ccm Alkohol.

Die Konzentration des p-Nitrophenols während der 24 stündigen Einwirkungsdauer war 0,05 molar (1 ccm 0,3 Mol in 6 ccm). p_H zum Schluß in allen Lösungen 4,21.

Nr.	p_H während der 24 stünd. Einwirkung	$k = \frac{x}{t}$	h in %
1	5,72	0,0166	19,8
2	5,72	0,0207	0
3	3,95	0,0165	17,9
4	3,95	0,0201	0

Das Enzym Phosphatase-Phosphatase.

Von

H. P. Barendrecht.

(Aus dem Laboratorium der Niederl. Preßhefe- und Spiritusfabrik. Delft.)

(Eingegangen am 25. März 1921.)

Über die Bindung von Phosphorsäure an Hexosen unter dem Einfluß von Hefen-Enzym (Phosphatase-Wirkung) und über die Zersetzung der auf diese Weise aus allen gärfähigen Hexosen hervorgehenden Fructose-diphosphorsäure (Phosphatase-Wirkung) sind vor einigen Jahren verschiedene Abhandlungen erschienen.

Ob dieser Phosphorsäureverbindung im Gärungschemismus eine Rolle zukommt, ist noch nicht ausgemacht. Ob sie überhaupt bei der Überführung von Zucker in Alkohol und Kohlensäure beteiligt ist, wurde von Neuberg¹⁾ und Mitarbeitern als sehr zweifelhaft erwiesen.

Zweck dieser Mitteilung ist nicht, auf diese Fragen weiter einzugehen, sondern der, einigen merkwürdigen Tatsachen, welche von Euler und Ohlsén und von Neuberg gefunden und wohl wegen ihrer damaligen Unerklärlichkeit wenig beachtet zu sein scheinen, eine besondere Deutung zu geben. Euler und Ohlsén²⁾ haben festgestellt, daß die Phosphatase durch etwa halbstündliche Erwärmung auf 40° nicht wie alle anderen Enzyme in ihrer Wirkung geschwächt, sondern bedeutend verstärkt wird.

Neuberg zeigte, daß die ihm zur Verfügung stehenden Hefen in frischer Form nur sehr wenig, getrocknet aber sehr viel Phosphate verestern können und daß das Protoplasmagift Toluol die Veresterung etwas begünstigt.

Zuerst sei nun bemerkt, daß hier auch in anderer Beziehung etwas Besonderes vorliegt. Die Ansicht, daß für die Umkehrung

¹⁾ C. Neuberg und Mitarbeiter, diese Zeitschr. **83**, 244; **103**, 320.

²⁾ H. Euler und Mitarbeiter, diese Zeitschr. **37**, 314.

einer Enzymwirkung kein neues Enzym angenommen werden soll, sondern daß ein hydrolysierendes Enzym unter Umständen auch synthetisch wirken kann, hat sich allgemein durchgesetzt. Bei den verwirklichten Enzymsynthesen redet man von einer Umkehrung der Wirkung, so bei Maltase, Lipase, Glycosidase. Nur bei der enzymatischen Veresterung der Hexosen mit Phosphorsäure und deren Hydrolyse hat man ein synthetisierendes Enzym, Phosphatase und ein hydrolysierendes Phosphatase unterscheiden wollen. Dies ist doch wohl unberechtigt. In Anschluß an die übliche Enzymologie sollte es heißen: es gibt ein Enzym, die Phosphatase, das den Hexosediphosphorsäureester hydrolysieren kann, und die synthetische Wirkung dieses Enzyms ist auch wahrgenommen.

Wenn man nun näher untersucht, welche Umstände diese umgekehrte synthetische Wirkung der Phosphatase begünstigen, findet man auch volle Übereinstimmung mit den anderen Enzymen.

Vor kurzem habe ich in meiner Abhandlung „L'Urée et la théorie de l'action des enzymes par rayonnement“¹⁾ gezeigt, wie verschiedene experimentelle Ergebnisse zu der Hypothese führen, daß die Umkehrung einer Enzymwirkung durch Abschwächung der Enzymstrahlung hervorgerufen wird.

Eine weitere experimentelle Bestätigung dieser Auffassung bei einem anderen Enzym sind nun eben die von Euler und Ohlsén angegebene Verstärkung durch höhere Temperatur und alkalische Reaktion, sowie die von Neuberg angeführten Tatsachen.

Jedes hydrolysierende Enzym wird durch die drei Faktoren: höhere Temperatur, schädliche Reaktion und Zeit abgeschwächt. Bei den meisten bisher gelungenen Umkehrungen der Enzymwirkungen, z. B. Maltase und Glucosidase, hat sich Anwendung einer oder mehrerer dieser Faktoren zur Hervorrufung der synthetischen Wirkung als notwendig erwiesen.

Über das nach derselben Hypothese theoretisch zu erwartende Gleichgewicht zwischen Spaltung und Synthese durch ungeschwächtes Enzym, wie z. B. bei Lipase, verweise ich auf die Kapitel IX, X und XI meiner oben zitierten Abhandlung über Urease.

¹⁾ Recueil des travaux chim. des Pays-Bas **1**, 39. 1920 und Proc. K. Akad. Wetensch. Amsterdam **21**, S. 1126. 1919; **21**, S. 1307; **22**, S. 29; **22**, S. 126.

Zur Kenntnis der Wirkung blanker Metalle auf Toxine.

Von

F. Erdstein und L. Fürth.

(Aus der II. med. Klinik der Universität in Wien.)

(Eingegangen am 29. März 1921.)

Baumgarten und Luger haben seinerzeit über Versuche berichtet, welche sie über die Wirkung von blanken Metallen (Kupfer und Silber) auf Bakterientoxine angestellt hatten. Auf Grund dieser Untersuchungen kamen sie zu dem Schlusse, daß Diphtherie- und Tetanustoxin durch 3—8tägigen Kontakt mit Kupfer in seiner Giftwirkung sehr stark abgeschwächt werde; auch blankes Silber schien wirksam zu sein. Die Frage, ob das Gesamttoxin oder vielleicht nur die toxophore Gruppe durch den Kontakt mit dem blanken Metall geschädigt werde, wurde von den Autoren wohl erwogen, aber nicht näher studiert. Mit Rücksicht auf die evtl. praktische Bedeutung schien es uns wichtig, in eigens darauf gerichteten Versuchen diesen Punkt zu klären.

Zur Entscheidung dieser Frage wurden Immunisierungsversuche mit durch Metallkontakt abgeschwächten Toxinen angestellt. Wir konnten zunächst die Beobachtungen von Baumgarten und Luger bestätigen, daß das Toxin tatsächlich durch diesen Kontakt eine Abschwächung erfahre. Wir wählten folgende Versuchsanordnung: Trockenes Tetanustoxin¹⁾ wurde im Verhältnisse von 0,01 auf 100 in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Diese Lösung wurde in 2 Teile geteilt; die erste Portion diente als Kontrolle, während in die zweite eine dünne Spirale aus blankem Kupferdraht (35 cm lang, 0,5 mm Durchmesser, ca. 1,3 g Gewicht) gestellt wurde. Nach verschiedenen Zeiten, während welcher die beiden Toxinportionen unter gleichen Verhältnissen im Dunkeln im Eiskasten gehalten worden waren, wurden weiße Mäuse in die Schwanzwurzel injiziert. In einem Vorversuche

¹⁾ Für die Überlassung des Toxins sind wir Herrn Doz. Busson vom serotherapeutischen Institute in Wien zu besonderem Danke verpflichtet.

war festgestellt worden, daß 0,00002 g des trockenen Toxins bzw. 0,2 ccm unserer Lösung, der einfachen letalen Dosis entsprach.

Von zahlreichen gleichsinnigen Versuchen sei einer ausführlich mitgeteilt:

Versuch 1. Nach 24stündigem Kontakte des Toxins mit blankem Kupfer:

a) Kontrolltier: Eine weiße Maus von 20 g Gewicht erhielt am 2. XI. 1920 3 $\frac{1}{2}$ nachm. die einfach letale Dosis in die Schwanzwurzel. Am 3. XI. nachmittags traten leichte Spasmen der linken hinteren Extremität auf, dann entwickelte sich ein schwerer Tetanus, in dem das Tier in der Nacht des 5. XI. (nach ca. 80 Stunden) starb.

b) Einer weißen Maus von 15 g Gewicht wurde am 2. XI. 3 $\frac{1}{2}$ nachm. die einfach letale Dosis des gekupferten Toxins injiziert. Das Tier zeigte nach über 8 Tage langer Beobachtung keinerlei Zeichen von Tetanus.

In der Folge konnten wir uns auch davon überzeugen, daß Mäuse nach 24stündigem Kontakt der Toxinlösung mit Kupfer selbst die mehr- bis achtfach letale Dosis derselben glatt vertrugen.

Durch 4–8tägige Behandlung mit blanken Silberdrahtspiralen von gleichen Dimensionen wurde nur eine schwache Hemmung der Giftwirkung erzielt, indem die mit dem so vorbehandelten Toxin injizierten Mäuse im Gegensatz zu den Kontrolltieren durchschnittlich erst nach 48 Stunden Spasmen, nach 60 Stunden Tetanus zeigten und nach ca. 100 Stunden eingingen. Eine vollständige Entgiftung des Toxins konnte durch Vorbehandlung mit Silber bei wiederholten Versuchen nicht konstatiert werden.

Es lag nun auch nahe, im Verlaufe der Versuche die unbestimmte Größe der Metallwirkung durch Bekannte, also Metallsalzlösungen von bestimmter Konzentration, zu ersetzen. Auf die von Baumgarten und Luger angestellten Versuche über die Wirkung verdünnter Metallsalzlösungen auf Diastase gestützt, haben wir Vorversuche mit Diastase und verdünnter Kupfersulfatlösung angestellt, wobei wir in wiederholten Untersuchungen noch bei einer Verdünnung der äquimolekularen Kupfersulfatlösung von 1:10¹¹ eine Hemmung der Diastasewirkung beobachten konnten. In einer analogen Versuchsanordnung ersetzten wir nun die Kupfersulfatlösung durch eine Lösung des Tetanustoxins, welche, auf Eis stehend, durch 24 Stunden mit einer Kupferdrahtspirale beschickt war. Eine Hemmung der Diastasewirkung trat noch bei einer Verdünnung dieser Toxinlösung von 1:10⁶ ein.

Auf Grund dieser Ergebnisse ließ sich nun berechnen, daß in 24 Stunden in 50 ccm der Toxinlösung so viel Kupfer in Lösung gegangen war, als einer äquimolekularen Kupfersulfatlösung in der Verdünnung von 1:10⁵ entspräche.

Zur Entscheidung der Frage, ob durch die Einwirkung des Metalles eine allgemeine Schädigung des Toxins oder nur eine solche der toxophoren Gruppe desselben vor sich gehe, wurde folgender Immunisierungsversuch angestellt: eine der oben geschilderten Toxinlösung analoge wurde 24 Stunden lang mit einer Kupferdrahtspirale beschickt, dann wurde diese entfernt und Tiere durch längere Zeit mit wiederholten Injektionen dieses gekupferten Toxins behandelt. Von einer Reihe gleichsinniger Versuche soll im folgenden das Protokoll einer Beobachtung wiedergegeben werden.

Versuch 2. Am 19. I. 1921 erhielt eine weiße Maus von 15 g Gewicht um 11^h vorm. 0,4 ccm des gekupferten Toxins in die Schwanzwurzel. Nachdem das Tier bis 23. I. gesund blieb, erhielt es am 24. I. und von da ab täglich bis inkl. 5. II. 0,4 ccm dieser Lösung, wobei das Tier frei von jeden Erscheinungen blieb. Am 7. II. 11^h vorm. wurde nun dieser Maus gleichzeitig mit einem Kontrolltier von gleichem Gewicht die einfach tödliche Dosis der reinen Toxinlösung injiziert. Es zeigte sich nun, daß beide Tiere zu gleicher Zeit die ersten Krankheitserscheinungen zeigten und am 10. II. vormittags eingingen.

Auf Grund dieser Versuche glauben wir schließen zu können, daß es sich bei der Metallwirkung nicht um eine elektive Schädigung der toxophoren Gruppe*), sondern vielmehr um eine vollständige Destruktion des Giftes handle, wobei man sich wohl vorstellen darf, daß man es mit einer komplexen Metall-Toxinverbindung zu tun habe, wie sie für analoge Versuche mit Fermenten angenommen worden ist.

Eine Reaktivierung der durch Metallwirkung geschädigten Toxine, wie sie für Fermente durch neuere Arbeiten von Luger gezeigt worden war, waren wir nicht in der Lage festzustellen.

Literatur.

Baumgarten und Luger, Wien. klin. Wochenschr. 1917, S. 1222, 1224 u. 1259. — Luger, diese Zeitschr. 1921.

*) Eine inzwischen erschienene Arbeit Laubenheimers (Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. 92, H. 1) konnte bisher nicht mehr berücksichtigt werden.

Über die quantitative Bestimmung der Oxalsäure im Harn.

Von
E. Salkowski.

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

(Eingegangen am 1. April 1921.)

In Heft 5 und 6 des 114. Bandes dieser Zeitschrift gibt A. Bau unter Bezugnahme auf früher von ihm in technischen Zeitschriften veröffentlichte Mitteilungen ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Oxalsäure in Bier, Harn und anderen Materialien an. Die Arbeit enthält S. 243 auch eine vergleichende Bestimmung der Oxalsäure im Harn nach seinem Verfahren und einem früher von mir angegebenen inzwischen jedoch verlassenen¹⁾. Danach gab sein Verfahren auf 1 Liter berechnet 25,35 mg „Oxalation“ (C_2O_4)²⁾, um bei seiner Ausdrucksweise zu bleiben, das (angeblich) meinige dagegen nur 10,91 mg, also noch nicht halb soviel. Es ist selbstverständlich, daß ich genötigt bin, zu den Angaben von Bau Stellung zu nehmen, wenn sein Vergleich auch nicht mein neuestes Verfahren berücksichtigt.

Obwohl ich begreiflicherweise bisher nicht in der Lage war, die Angaben von Bau einer sachlichen Prüfung zu unterziehen, möchte ich mir doch einige Bemerkungen zu seiner Arbeit erlauben und die Gelegenheit benutzen, um mich unter Mitteilung einiger bisher nicht veröffentlichter Versuche über die ganze vorliegende Frage auszusprechen.

Alle Methoden zur Bestimmung der Oxalsäure im Harn, Gewebsauszügen und Nahrungsmitteln laufen schließlich darauf hinaus, die Oxalsäure als Calciumoxalat auszufällen und dieses

¹⁾ Siehe hierüber weiter unten.

²⁾ Warum nicht Oxalsäureion? Da alle in der Literatur vorliegenden Angaben sich auf wasserfreie Oxalsäure beziehen, so wird m. E. übrigens durch die Einführung von „Oxalsäureion“, wenn auch die Differenz geringfügig ist, der Vergleich unnötig erschwert.

durch Glühen in Calciumoxyd überzuführen. Dieses wird dann entweder gewogen oder nach Bau in $n/_{10}$ -Salzsäure gelöst und unter Anwendung von Methylorange als Indikator mit $n/_{10}$ -Lauge titriert¹⁾.

Von den Gründen, die Bau für dieses Verfahren anführt, sehe ich manches als stichhaltig an, manches nicht. Als richtig betrachte ich, daß es bei seiner Methode nicht immer gelingt, das Calciumoxyd ganz frei von anorganischen Beimengungen zu erhalten, welche dann mit gewogen und fälschlich als Calciumoxyd berechnet werden, als nicht stichhaltig betrachte ich den Einwand, daß es schwer sei, das Calciumoxyd ganz frei von Calciumcarbonat zu bekommen, — bei der stets sehr geringen Quantität von Calcium trifft das nicht zu — sowie ferner, daß Ätzkalk hygroskopisch sei. Dagegen ist zu sagen: die Wägung als Calciumoxyd zur Bestimmung des Calciums ist ein allgemein geübtes und als richtig anerkanntes Verfahren.

Die Unterschiede der verschiedenen Methoden liegen darin, wie man zu dem oxalsauren Kalk gelangt: nach der alten Methode fällt man denselben unter bestimmten Bedingungen dirckt aus dem Harn aus, nach den neueren von mir eingeführten²⁾ wird dagegen die Oxalsäure durch Eindampfen des Harnes, Ansäuern mit Salzsäure und Ausschütteln mit alkoholhaltigem Äther vorher einigermaßen isoliert.

Über das alte Verfahren von Neubauer, Fürbringer und Czapek habe ich mich l. c. ausführlich geäußert, es erübrigt sich daher, darauf zurückzukommen: ich habe es unbequem und unzuverlässig gefunden. Diesem Urteil schließt sich auch F. N. Schulz in der 11. Auflage von Hupperts Harnanalyse S. 216 an. Diese Umstände waren es, die mich³⁾ seinerzeit dazu bewogen haben, die Oxalsäure vor der Fällung als Calciumoxalat durch Ätherextraktion einigermaßen zu isolieren. Später haben auch Autenrieth und Barth³⁾ empfohlen, die Oxalsäure durch Ammoniak und Calciumchlorid zu fällen, Mac-Lean⁴⁾ hat dagegen in einer unter meiner Leitung ausgeführten Arbeit gezeigt, daß auch bei genauer Innehaltung der von den genannten Autoren gegebenen Vorschriften stets etwas Oxalsäure in Lösung bleibt.

¹⁾ Auch das Titrieren von Calciumoxalat mit Kaliumpermanganat ist eine gute Methode, im vorliegenden Falle jedoch nicht anwendbar, da es wohl kaum gelingt, dasselbe aus dem Harn ganz frei von organischer Substanz zu gewinnen.

²⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie **29** (nicht **31**, wie Mac Lean irrtümlich angibt,) 437. 1900.

³⁾ Autenrieth und Barth, Zeitschr. f. physiol. Chemie **35**, 327. 1902.

⁴⁾ Mac Lean, Zeitschr. f. physiol. Chemie **60**, 20. 1909.

Bau hat nun auf die alten Verfahren zurückgegriffen. Sein Verfahren unterscheidet sich von diesen nur durch Anwendung einer bestimmten, von ihm „Kalkessig“ genannten Mischung von Natriumacetat, Calciumchlorid und Essigsäure, betreffs deren auf das Original S. 222 verwiesen werden kann. Von dieser Mischung setzt man der zu prüfenden Flüssigkeit z. B. Harn $\frac{1}{6}$ des Volumens hinzu. Wegen des weiteren Verfahrens muß auf die, genaue Einzelheiten enthaltende, Beschreibung im Original verwiesen werden. Da das Calciumoxalat bis zu einem gewissen Grade in dem Gemisch und in dem zum Auswaschen erforderlichen Wasser löslich ist, so muß Bau Korrekturen¹⁾ anbringen. So beträgt bei Anwendung von 400 ccm Harn das direkt gefundene Oxalsäureion 3,3 mg, das in 480 ccm Filtrat enthaltene 1,6 mg, das in 150 ccm Waschwasser anzunehmende 0,68 mg, die Korrekturen betragen zusammen 2,28 mg; das sind beinahe 70% des direkt gefundenen Wertes! Derartig hohe Korrekturen erscheinen mir doch recht bedenklich. Wenn Bau auch die genauesten Vorschriften über das Filter (Schleicher und Schüll Nr. 589, Blauband von 9 cm Durchmesser) sowie über die Art des Filtrierens und des Auswaschens gibt, so wird man doch kaum, wie Bau es tut, von regelmäßig anwendbaren „Konstanten“ sprechen können, wenn ich auch zugebe, daß die Abweichungen, die von den angegebenen Zahlen unter Umständen eintreten können, nur gering sein mögen. Ich beschränke mich auf das für den Harn angeführte Beispiel, in anderen Fällen sind die Korrekturen noch größer. So führt Bau an: 200 ccm Bier mit 40 ccm Kalkessig gefällt, geben 0,44 mg Oxalsäureion, dazu in 240 ccm Filtrat 0,80 mg, in 115 ccm Waschwasser 0,52 mg, also in 200 ccm Bier 1,76 mg. Die „Korrekturen“ unter Anwendung von „Konstanten“ sind also gerade 3 mal soviel wie die direkt gefundene Quantität, die übrigens doch kaum über Spuren hinausgeht.

Bau hat nun, wie gesagt, in einem Falle (l. c. S. 243) unter Anwendung der „Konstanten“ auf 1 Liter Harn nach seinem Verfahren 25,35 mg Oxalsäureion gefunden, nach meinem nur 10,91 mg. Als mein Verfahren bezeichnet Bau das in der Zeitschr.

¹⁾ Auf Grund seiner Versuche stellt B. den Verlust an „Oxalation“ infolge der Löslichkeit des Calciumoxalats in 1 Liter Filtrat zu 3,42 mg, in 1 Liter Waschwasser zu 4,64 mg fest. Diese Zahlen werden dann von ihm allgemein angewendet. Auf diesen Punkt will ich hier nicht eingehen.

f. physiol. Chemie **29**, 437 angegebene aus dem Jahre 1900. Bau stützt sich darauf, daß dieses in dem im Jahre 1911 erschienenen Buche von Neuberg: Der Harn usw., S. 273, als das meinige angegeben ist. Das ist richtig, in der 1912 erschienenen 4. Auflage meines „Praktikums der physiologischen und pathologischen Chemie“ habe ich aber S. 174 und 268 ein wesentlich anderes Verfahren beschrieben, welches natürlich das allein für mich maßgebende ist. Ich könnte mir ja nun die Sache sehr leicht machen, indem ich erkläre, daß Bau ein nicht mehr geltendes Verfahren zum Vergleich benutzt hat, will das aber nicht tun, weil es mir sehr unwahrscheinlich ist, daß die große Differenz auf die Anwendung meines älteren Verfahrens statt des neueren zurückzuführen ist. Es scheint mir zweckmäßig, das neuere Verfahren aus meinem „Praktikum“ mitzuteilen, um die Unterschiede gegenüber dem älteren kennzeichnen zu können. Auf S. 174 heißt es bezüglich des Nachweises der Oxalsäure:

„500 ccm nicht filtrierter Harn werden mit Ammoniak und Chlorcalcium gefällt, dann, ohne zu filtrieren, stark eingedampft, mit Alkohol gefällt, der Niederschlag größtenteils auf ein Filter gebracht, mit Alkohol nachgewaschen, dann einmal mit Äther. Der in der Schale und auf dem Filter befindliche Niederschlag wird in verdünnter Salzsäure gelöst (etwa 100 ccm auf $\frac{1}{4}$ verdünnte Salzsäure), dann mehrmals mit dem gleichen Volumen alkoholhaltigen Äthers (9 Vol. Äther, 1 Vol. Alkohol) geschüttelt“ usw.

Bei der quantitativen Bestimmung ist angegeben, daß man mindestens 4 mal mit Äther schütteln muß.

Dieses neue Verfahren greift hinsichtlich der Fällung mit Ammoniak und Chlorcalcium, Eindampfen samt dem Niederschlag und Ausziehen des Eindampfungsrückstandes mit Alkohol, — jedoch nur in diesem Punkte — auf ein altes vergessenes Verfahren von Schultzen zurück. Ich bin so zu Werke gegangen, weil die so erhaltene ätherische Oxalsäurelösung weit weniger mit Harnbestandteilen verunreinigt ist, als die aus dem eingedampften Harn direkt erhaltene. Vergleichende Versuche nach dem „älteren“ und neueren Verfahren habe ich nicht ausgeführt, da sie mir entbehrlich erschienen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen meinem älteren und meinem neueren Verfahren liegt darin, daß bei letzterem weder eine Bildung von Oxalsäure noch ein etwaiges Entweichen von Oxalsäure mit den Wasserdämpfen

stattfinden kann, da die Oxalsäure schon vor dem Eindampfen gebunden ist. Die Ursache des Mankos in dem einen¹⁾ von Bau angeführten Versuche könnte also nur darin liegen, daß die Oxalsäure unvollständig in den Äther übergegangen ist. In der Tat gibt Bau an, daß er in dem ausgeätherten — also angeblich oxalsäurefreien — Harn nach seinem Verfahren noch 12,14 mg Oxalsäureion gefunden habe, im ganzen also 23,65 mg, die Differenz schrumpfe damit auf 2,30 mg²⁾ zusammen.

An die Möglichkeit, daß beim Eindampfen des Harnes Oxalsäure mit den Wasserdämpfen entweichen könnte, hat bisher niemand gedacht, da die Oxalsäure allgemein als mit Wasserdampf nicht flüchtig angesehen wird, ich habe auch nicht daran gedacht. Nun hat C. Th. Mörner³⁾ vor kurzem im Zusammenhang mit seinen Untersuchungen über die Einwirkung von Salpetersäure auf die Proteinstoffe Versuche mitgeteilt, aus denen hervorgeht, daß unter Umständen Oxalsäure auf dem Wasserbad entweichen kann. Diese Versuche habe ich wiederholt:

Es wurde in zwei Versuchsreihen 0,175 krystallisierte Oxalsäure = 0,125 wasserfrei in 50 ccm Wasser gelöst, in einer Platinschale von 9 cm Durchmesser auf dem Wasserbad, dessen Öffnung 7,6 cm betrug, zur Trockne gedampft (Mörner hat eine Porzellanschale von 13,5 cm Durchmesser mit einer Wasserbadöffnung von 9 cm benutzt). Mörner hat die Quantität der rückständigen Oxalsäure durch Titrieren mit Kaliumpermanganat bestimmt, mir erschien es einfacher, den Gewichtsverlust nach dem Eindampfen zur Trockne zu bestimmen. Die Platinschale wurde auf dem Wasserbade erhitzt, gut abgetrocknet und nach dem Abkühlen gewogen. Das Gewicht betrug 54,7344 g, mit 0,125 Oxalsäure wasserfrei mußte sie somit 54,8594 g wiegen.

Erste Versuchsreihe.

Gewicht nach 2stündigem Erhitzen 54,8388 g = 0,1044 Oxalsäure = 83,82%. Gewicht nach weiterem 1stündigen Erhitzen 54,8361 = 0,095 g = 76,48%. Jetzt der Rückstand wieder mit 50 ccm Wasser auf dem Wasserbad zur Trockne (etwa 1 Stunde). Gewicht 54,7920 g = 0,0576 Oxalsäure = 46,08%, nochmals mit 50 ccm zur Trockne. Rückständige Oxalsäure 0,0156 = 12,58%. Jetzt 1 Stunde trocken weiter erhitzt: 0,0004 g = 0,32%. Der Rückstand löst sich mit saurer Reaktion.

¹⁾ Soviel ich sehen kann, ist es der einzige vergleichende.

²⁾ Wenn B. fortfährt: „eine Zahl, die sich durch analytische Fehler ganz zwanglos erklären läßt“, so stimme ich ihm sachlich bei, die Äußerung erscheint mir nur befremdlich bei einem Autor, der auf 0,44 mg gefundene Oxalsäure in 200 ccm Bier Wert legt.

³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie 98, 105. 1916/17.

Zweite Versuchsreihe.

1. Mit 50 ccm Wasser zur Trockne, dann nach 2 Stunden weiter erhitzt. Rückständige Oxalsäure 6,44% der angewendeten.
2. Nach weiterem Erhitzen während 2 Stunden 58,08%.
3. Wiederum mit 50 ccm Wasser abgedampft, noch 1 Stunde erhitzt 37,76%, der Rückstand bildet eine aus lockeren Krystallen bestehende Masse.
4. Nochmals mit 50 ccm Wasser zur Trockne und noch 2 Stunden erhitzt. Aussehen des Rückstandes wie bei 3., Gewicht 0,8% der angewendeten (wasserfrei berechneten) Oxalsäure.

In Übereinstimmung mit den Angaben von Mörner geht aus den Versuchsreihen hervor, daß sich Oxalsäure beim Eindampfen und Trocknen auf dem Wasserbad bis auf ein Minimum verflüchtigen kann. Beim Eindampfen der wässrigen Lösung bilden sich an den Rändern der Flüssigkeit Krusten aus fester Oxalsäure. Nach Mörner ist die Abnahme der Oxalsäure beim Eindampfen zur Trockne auf Sublimation von diesen Krusten aus zurückzuführen, wenn auch, wie Mörner anführt, nur Siegfried im Journ. f. prakt. Chemie 139, 513 darauf hingewiesen hat, daß die Oxalsäure bereits einige Grade unter 100° zu sublimieren beginnt, allgemein eine höhere Temperatur hierzu für erforderlich angegeben wird. Zweifellos hat Mörner mit dieser Erklärung recht. Eine Verflüchtigung von Oxalsäure mit Wasserdämpfen ist damit nicht bewiesen. Ob eine solche stattfinden kann, mußte versucht werden.

200 ccm einer 1proz. Oxalsäurelösung (auf wasserhaltige Oxalsäure bezogen) wurden aus einem mit Glasschliff versehenen etwa 1 Liter enthaltenden Kolben unter ziemlich lebhaftem Sieden destilliert, zuerst 100, dann 50 ccm abdestilliert. Die Destillate reagierten neutral, in Reagenzglasproben war keine Oxalsäure nachweisbar. Die Destillate wurden vereinigt, einige Tropfen aus Natrium hergestellte Natronlauge hinzugesetzt, wobei stark alkalische Reaktion eintrat, dann auf dem Wasserbad auf etwa 15–20 ccm eingedampft, mit einigen Tropfen Chlorcalciumlösung versetzt, nach etwa 1stündigem Stehen zur Auflösung des Calciumcarbonats ganz schwach sauer gemacht: Die Flüssigkeit blieb stundenlang völlig klar. Am nächsten Tag fand sich am Boden des Bechergläschens ein weißlich Anflug. Die quantitative Bestimmung ergab 0,6 mg CaO = rund 1 mg Oxalsäure. Zweifellos handelt es sich dabei um mechanisch mit den Wasserdämpfen mitgerissene Oxalsäure.

Mörner hat gleichzeitig festgestellt, daß eine Verflüchtigung von Oxalsäure — wie nicht anders zu erwarten war, nicht stattfindet, wenn man der Lösung ein Calciumsalz hinzusetzt. Der

Mühe, diese Angabe zu kontrollieren, konnte ich mich wohl als überhoben betrachten. Ein Verlust von Oxalsäure beim Eindampfen des Harnes ist somit schon bei meinem ersten Verfahren ausgeschlossen und erst recht bei dem neuen, es bleibt also nur ein unvollständiger Übergang der Oxalsäure als Verlustquelle denkbar. Ausdrücklich möchte ich noch bemerken, daß ich an die Möglichkeit einer Verflüchtigung von Oxalsäure beim Eindampfen bei Empfehlung des neuen Verfahrens in meinem Praktikum nicht gedacht habe, sondern lediglich, wie bereits bemerkt, die größere Reinheit der ätherischen Oxalsäurelösung im Auge gehabt habe. Nach dieser Abschweifung kehre ich zu den Ausführungen von Bau zurück, zu denen ich noch einige Bemerkungen zu machen habe.

1. Bau nimmt zur Bestimmung filtrierten Harn, das könnte unter Umständen zu Verlusten führen, da doch mitunter oxalsaurer Kalk als solcher im Sediment vorhanden ist. Daß der dadurch verursachte Fehler ins Gewicht fallen könnte, glaube ich allerdings nicht, außer in besonderen Fällen.

2. Bau vermißt bei meiner Angabe, daß ich zur definitiven Fällung 10 proz. Chlorcalciumlösung benutzt habe, eine Erklärung darüber, ob ich unter Chlorcalcium wasserfreies oder krystallisiertes gemeint habe; dieser, übrigens ziemlich gleichgültige Punkt erledigt sich durch die Reagenzientabelle in meinem Praktikum: es ist wasserfreies gemeint.

3. Die Angabe von Bau, daß der oxalsaurer Kalk mitunter manchen Bakterienformen — kurzen dicken Stäbchen — täuschend ähnlich aussieht, kann ich bestätigen. Die bezügliche Sachlage ist folgende. Vor vielen Jahren wendete sich der jetzige Professor der gerichtlichen Medizin, Geh. Rat Lesser in Breslau, an mich mit der Bitte um Aufklärung über die Natur mikroskopischer stäbchenförmiger Gebilde, die er in einem Falle von Oxalsäurevergiftung im Mageninhalt gefunden hatte. Ich konnte ihm die entsprechende Aufklärung geben. Ob Prof. Lesser die Beobachtung publiziert hat, ist mir nicht bekannt, ich habe sie meines Wissens nicht veröffentlicht, sie nur regelmäßig bei Besprechung der Oxalsäure in der Vorlesung erwähnt. Ein Hinweis findet sich in einer Mitteilung „Zur Kenntnis des Pferdeharns“¹⁾. Es heißt daselbst bei der Beschreibung des Sedimentes: „Außer

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie 9, 241. 1885.

diesen Bestandteilen (nämlich Epithelzellen und Octaëdern von oxalsauren Kalk) fanden sich noch kurze dicke Stäbchen, die sich leicht und ohne wesentliche CO_2 -Entwicklung in Salzsäure lösten und wohl gleichfalls aus Calciumoxalat bestanden.“ Es handelt sich bei den Stäbchen um abortive Formen der von Feser und Friedberger¹⁾ beschriebenen Krystalle des oxalsauren Kalkes in quadratischen Prismen mit pyramidalen Endflächen, die auch Mac Lean²⁾ erwähnt.

4. Bau hat in einigen Fällen beim Stehenlassen von sterilisiertem Harn³⁾ eine Zunahme der Oxalsäure beobachtet. Dazu habe ich folgendes zu bemerken: Nachdem ich gesehen hatte, daß mit Chloroformzusatz längere Zeit aufbewahrter Harn auffallend wenig Harnsäure enthielt und die Vermutung ausgesprochen hatte, daß die Harnsäure unter Bildung von Oxalsäure oxydiert sein könnte, hat Luzzato⁴⁾, der unter meiner Leitung arbeitete, bei einem Hundeharn, der schon einige Zeit mit Chloroform konserviert gestanden hatte, 0,0647 Oxalsäure (auf 1 Liter berechnet) festgestellt, dann, nachdem der Harn noch 3 Monate gestanden hatte, 0,1385; die Oxalsäure hatte sich also verdoppelt. Ungewöhnlich große Mengen von Oxalsäure fand ich auch in einem jahrelang mit Chloroform konservierten Rinderharn. Mit Wahrscheinlichkeit konnte ich⁵⁾ diese Oxalsäure auf Oxydation von Allantoin beziehen, das, wie ich nachgewiesen habe, in beträchtlicher Quantität im Rinderharn vorkommt.

Man kann Bau, als technischem Chemiker, keinen Vorwurf daraus machen, daß er alle diese Einzelheiten in bezug auf Harn nicht kennt, es zeigt aber doch, daß es nicht zweckmäßig ist, wenn man seine Arbeit auf naturgemäß ferner liegende Gebiete ausdehnt, ein Vorgehen, von dem ich mich übrigens selbst nicht ganz freisprechen will.

Ob nun in der Tat das Verfahren von Bau die richtige Quantität der Oxalsäure ergibt — von den sogenannten Konstanten von Bau sehe ich dabei einstweilen ab —, die meinige viel zu wenig — das zu entscheiden muß der Zukunft vorbehalten bleiben.

¹⁾ Malys Jahresber. d. Tierchemie 4, 231. 1875.

²⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie 60, 22. 1909.

³⁾ Über die Art der Sterilisierung finde ich nichts angegeben.

⁴⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie 37, 234. 1902/03. Dasselbe ist auch die Frage, ob der Harn Oxalursäure enthält, ausführlich behandelt.

⁵⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie 42, 213. 1904.

Über die Gefäßwirkung organischer Kationen und ihre Beeinflussung durch anorganische Ionen.

Von

Werner Teschendorf.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Königsberg.)

(Eingegangen am 4. April 1921.)

Mit 15 Abbildungen im Text.

Die starken quartären Ammoniumbasen und das Guanidin besitzen nach Messungen von Bredig¹⁾ elektrische Leitfähigkeiten, welche denjenigen von Kali und Natron sehr nahe stehen, und sind ebenso weitgehend elektrolytisch dissoziiert wie die Alkalihydroxyde. Fühner²⁾ wies daher im Jahre 1906 darauf hin, daß die pharmakologischen Wirkungen ihrer verdünnten Lösungen, beziehungsweise der Lösungen ihrer Salze, mit demselben Recht als Ionenwirkung angesehen werden müssen, wie die der Alkalihydroxyde bzw. der Alkalisalze, und demnach die Curarin- und Muscarinwirkung der quartären Ammoniumverbindungen sowie die Guanidinwirkung als Wirkung einwertiger organischer Kationen zu betrachten ist. Im Jahre 1909 führten Höber und Waldenberg³⁾ unter anderem mit Guanidin, Tetramethyl-, Tetraäthylammoniumchlorid, und Tetrapropylammoniumjodid Untersuchungen aus, die die Einwirkung dieser Salze auf den Ruhestrom und die Erregbarkeit von Froschmuskeln aufklärten. Auch hier ergab sich bei den organischen Ionen eine weitgehende Übereinstimmung zwischen ihrer Wirkung und der einwertiger Kationen. Es zeigte sich nämlich, daß die organischen Ionen der genannten Verbindungen sich gegenüber der direkten Erregbarkeit von Froschmuskeln ungefähr wie Ammonium- und Caesiumionen verhielten, das elektrische Verhalten der Muskeln ungefähr wie Caesium beeinflußten und demgemäß eine Mittelstellung zwischen Kalium und Rubidium einerseits, Lithium und Natrium andererseits einnehmen.

Wie Kalium und Natrium werden auch organische Kationen durch Calcium antagonistisch beeinflusst, was Fühner (l. c.) für die Skelettmuskelwirkung des Guanidins, Loewi und Ishiazaka⁴⁾ für die Herzwirkung des Muscarins feststellten und neuerdings von Zondek⁵⁾ bestätigt worden ist. Andererseits besteht zwischen Guanidin und Baryt nach Fühner ein Synergismus, der sich an der glatten Muskulatur des Blutegels⁶⁾ und am Skelettmuskel des Frosches⁷⁾ leicht zeigen läßt. Es fragte sich, ob an der Gefäßmuskulatur ein ähnliches Verhalten von organischen zu anorganischen Ionen zu beobachten ist. Es sollen daher in folgendem eine Anzahl von Versuchen beschrieben werden, die an dem nach Laewen-Trendelenburg hergestellten Froschgefäßpräparat zur Klärung dieser Frage vorgenommen wurden. Geprüft wurden von organischen Basen in Form ihrer Chlorhydrate das Guanidin, das Cholinmuscarin (Nitrosocholin), das Acetylcholin, sowie das Tetramethyl-, Tetraäthyl- und Tetrapropylammoniumchlorid. Als zweiwertige anorganische Kationen fanden Calcium, Strontium, Barium und Magnesium Verwendung, gleichfalls in Form ihrer Chloride. Vergleichsweise wurden ferner Kalium- und Hydroxylionen herangezogen.

Die Wirkung der geprüften organischen Basen.

Die ersten Angaben über die Gefäßwirkung des Guanidins liegen zur Zeit in dem im Erscheinen begriffenen Kapitel aus dem Heffterschen Handbuch der Pharmakologie „Die Guanidingruppe“ von H. Fühner vor. Danach ist die Wirkung des Guanidins auf das periphere Gefäßgebiet des Frosches eine vasokonstriktorische. In folgender, mit freundlicher Erlaubnis von Herrn Prof. Fühner zum Abdruck gebrachten Tropfenkurve vom Laewen-Trendelenburgschen Präparat ist die Wirkung des salzsauren Guanidins und des Methylguanidins mit der Adrenalinwirkung quantitativ verglichen (Abb. 1). Es wirkten Guanidin 1:500 und Methylguanidin 1:1000 in der Dosis von je 1 ccm in den zuführenden Schlauch des Präparates injiziert etwa so stark wie 1 ccm Adrenalin in der Verdünnung 1:10 Millionen.

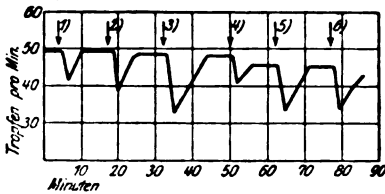


Abb. 1 (nach Fühner).

1. Injektion von 1 ccm Suprarenin 1:10 000 000.
2. " " 1 " Guanidin 1:500.
3. " " 1 " Methylguanidin 1:500.
4. " " 1 " Guanidin 1:1000.
5. " " 1 " Methylguanidin 1:1000.
6. " " 1 " Suprarenin 1:10 000 000.

Die zweite geprüfte organische Base war das Cholinmuscarin (synthetisches Muscarin, von Herrn Prof. Fühner nach Schmiedeberg und

Harnack⁹⁾ hergestellt und in einer Stammlösung 1 : 200 unter Chlorotonzusatz aufbewahrt). Bezüglich seines Angriffsortes, Zusammensetzung und Unterschiedes gegenüber dem Pilzmuscarin sei auf das Kapitel „Die Muscaringruppe“ von H. Fühner aus dem Heffterschen Handbuch verwiesen. Das Cholin hat nach Samuelson⁹⁾ eine geringe vasokonstriktorische Wirkung. Handowsky und Pick¹⁰⁾ sahen am peripheren Gefäßgebiet des Frosches Vasodilatation, wurden aber von Bauer und Fröhlich¹¹⁾ dahin berichtet, daß es sich doch um eine Gefäßverengung, wenn auch keine bedeutende, handle, die Handowsky und Pick nur deshalb entgangen war, weil sie das Cholin neben anderen Substanzen am gleichen Präparat geprüft hatten.

Dem Pilzmuscarin kommt nach Schmiedeberg¹²⁾ eine gefäß-erweiternde Wirkung am Kaninchenohr zu, die Fühner (l. c.) auch beim Cholinmuscarin beobachten konnte. Nach Dixon und Haliburton¹³⁾ wirkt Muscarin nicht eindeutig auf alle Gefäßgebiete, sondern erweitert nur die Pulmonal- und Gehirngefäße, verengt aber ähnlich wie Adrenalin die übrigen Gefäßgebiete. Full¹⁴⁾ fand am Carotisstreifen des Rindes eine mäßige Steigerung des Tonus nebst Verstärkung und Beschleunigung der rhythmischen Bewegungen, wie sie an derartigen Präparaten gesehen werden.

Nach Injektion von mehr als 1 mg Cholinmuscarin in den zuführenden Schlauch des Læwen-Trendelenburgschen Froschgefäßpräparates treten in der Skelettmuskulatur im Bereich des durchströmten Gefäßgebietes mehr oder weniger starke Muskelkontraktionen auf, die die Beobachtung der Gefäßwirkung stören. Nach Gaben von $\frac{1}{10}$ bis $\frac{1}{100}$ mg (jedesmal in 1 ccm Ringerlösung*) injiziert) tritt deutliche Hemmung der Abtropfgeschwindigkeit auf, allerdings schwankt die Empfindlichkeit der einzelnen Präparate.

Die Versuche fielen nach gleichmäßiger Vorbehandlung der Präparate mit weit geringeren Abweichungen aus. Sämtliche Versuche wurden auf frischen Präparaten nach etwa 1stündigem Durchströmen mit Ringerlösung begonnen. Längere Vorbehandlung wurde unterlassen weil eine Sensibilisierung (siehe bei Alday-Redonnet¹⁵⁾ der Präparate durch längeres Durchströmen mit Ringerlösung unerwünscht war. Der Druck der Flüssigkeit in der Mariottschen Flasche betrug etwa 7–10 cm. Die Salze waren, wenn nicht besonders angegeben, in Ringerlösung gelöst und wurden in Dosen von 1 ccm unter vorsichtiger Vermeidung von Druckschwankungen in den zuführenden Schlauch des Froschgefäßpräparates injiziert.

Das Acetylcholin erregt nach Dale¹⁶⁾ am Gefäßsystem die Vasodilatoren, nachgewiesen am Kaninchenohr nach Rischbieter. Demgegenüber zeigen Amseler und Pick¹⁷⁾, daß am Froschgefäßpräparat — sowohl an den Gefäßen der Extremitäten wie im Splanchnicusgebiet — das Acetylcholin in Verdünnungen von 1 : 10 000 bis 1 : 1 000 000 sehr stark gefäßkontrahierend wirkt.

Man kann das Acetylcholin noch weiter bis auf 1 : 100 Millionen und 1 : 1 Milliarde verdünnen, ohne an Warmfröschen deutliche Gefäßkontrak-

*) Zusammensetzung der Ringerlösung: Natrium bicarbonicum 0,1; CaCl₂ 0,1; KCl 0,075; NaCl 6,0; Aqua destillata ad 1000 0.

tion zu vermissen. Das geprüfte Salz war von Kahlbaum, Berlin-Adlershof geliefert (s. in Abb. 9).

Schließlich wurden das Tetramethyl-, das Tetraäthyl- und das Tetrapropylammoniumchlorid geprüft (ebenfalls von Kahlbaum bezogen). Nach Santesson und Koræen¹⁸⁾ ist die Wirkung des Tetramethylammoniumchlorids eine intensiv nervenlähmende und in Wirkungsweise und -stärke schwächer wirkenden Curaresorten als gleichstehend zu betrachten. Auch nach Böhm¹⁹⁾ wirkt es ausgesprochen auf die Nervenendigungen. Peiser²⁰⁾ der die drei Substanzen an Fröschen studierte, fand, daß das Methylprodukt sehr viel wirksamer war als das Tetraäthylammoniumchlorid. Andererseits sah er Reflexlosigkeit bei Fröschen beim Tetrapropylammoniumchlorid schneller eintreten, als beim Äthylprodukt. Das Tetramethylammoniumchlorid war aber das bei weitem wirksamste und am Froschherzen das einzige der drei, welches Stillstand in Diastole verursachte.

Das Tetraäthylammoniumchlorid hatte eine exzessive Guanidinwirkung, die sich durch Zuckungen von Skelettmuskeln, welche in Lösungen dieses Salzes hineingebracht wurden, bemerkbar machte. Ebenso war der von Fühner (l. c.) beschriebene Synergismus zwischen Guanidin und Baryt auch beim Tetraäthylammoniumchlorid und Bariumchlorid zu beobachten. Die von Jodlbauer²¹⁾ beschriebene Ähnlichkeit zwischen Guanidin und Tetramethylammoniumchlorid konnte Peiser nicht bestätigen.

Am Gefäßsystem ist die Wirkung der drei genannten quartären Ammoniumbasen meines Wissens bisher nicht näher untersucht worden. Jodlbauer stellte für Tetramethylammoniumchlorid in Blutdruckversuchen starke Reizwirkung auf den Vagus zentral wie peripher, zugleich aber auch eine starke Erregung der Gefäßnervenzentren fest. Am Laewen-Trendelenburgschen Froschgefäßpräparat ergaben sich folgende Verhältnisse: Das Tetramethylammoniumchlorid löste kräftige Gefäßkontraktionen aus, die noch nachzuweisen waren, wenn 1 ccm einer Lösung 1 : 10 000 bis 1 : 100 000 in den zuführenden Schlauch des Präparates injiziert wurden. (Abb. 2.) Sommerfrösche dürften noch für geringere Konzentrationen empfindlich sein. Bei Gaben von 1 mg traten im Präparat Zuckungen auf. Eine weitere Erscheinung, die auch bei den anderen organischen Basen sowie beim Bariumchlorid gesehen wurde, trat beim Tetramethylammoniumchlorid anscheinend stärker in Erscheinung: Beim Auswaschen der Substanz durch die nachfließende Ringerlösung war die Geschwindigkeit der Tropfenfolge meist unregelmäßig. Beispielsweise traten in der ersten Hälfte einer Minute ungefähr doppelt soviel Tropfen aus als in der zweiten. (Vgl. die Tropfenregistrierung mit dem Straubschen*) Tropfenzähler in Abb. 2).

Das Tetraäthylammoniumchlorid verursacht gleichfalls Gefäßkontraktion. Schon $\frac{1}{100}$ mg kann am Froschgefäßpräparat die Abtropf-

*) Cf. H. Fühner: Nachweis und Bestimmung von Salzen auf biologischem Wege, Berlin 1911 (Urban und Schwarzenberg S. 143).

geschwindigkeit herabsetzen, doch ist die Wirkung bei weitem nicht so stark wie beim Tetramethylammoniumchlorid. Größere Dosen verstärken die Gefäßwirkung nicht in entsprechender Weise, sondern rufen starke Zuckungen und Flimmern in den Skelettmuskeln hervor, anscheinend in noch höherem Grade wie das Guanidin. Beim Guanidin ist bei derartigen

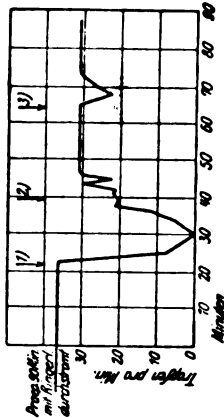


Abb. 2 (Präp. 67).
 1. Injektion von 1 ccm Tetramethylammoniumchlorid 1 : 10 000.
 2. Unregelmäßige Tropfenfolge, vgl. Registrierung.
 3. Injektion von 1 ccm Tetramethylammoniumchlorid 1 : 100 000.

Dosen die Gefäßwirkung ausgeprägter wie beim Tetraäthylammoniumchlorid. Es dürfte daraus zu schließen sein, daß die Tropfenabnahme beim Guanidin nicht Folge der Kontraktionen der quergestreiften Muskeln ist und durch Gefäßkompression zustande kommt. In diesem Fall müßte die Gefäßwirkung beim Tetraäthylammoniumchlorid stärker ausgeprägt sein als beim Guanidin. Es fanden sich aber mitunter so unempfindliche Froschgefäßpräparate, bei denen nach Gaben von Tetraäthylammoniumchlorid keine nennenswerte Gefäßwirkung zu beobachten war, die aber die Skelettmuskulatur des durchströmten Präparates sehr stark erregten.

Die dritte quartäre Ammoniumbase, das Tetrapropylammonium, setzt im Gegensatz zu den übrigen geprüften organischen Basen den Gefäßtonus vorwiegend herab. Dies läßt sich besonders gut zeigen, wenn das Froschgefäßpräparat durch Bestandteile der Ringerlösung oder andere gefäßkontrahierende Substanzen in einen leichten Tonus gebracht ist. An frischen Präparaten, bei denen durch die Durchströmung anscheinend noch keine merkliche Tonisierung erfolgt war, konnte nach Tetrapropylammoniumchlorid öfters geringe Abnahme der Tropfenzahl beobachtet werden. Nach Injektionen von weniger als 1 mg in den zuführenden Schlauch war keine Wirkung zu beobachten. Die Wirkung des Tetrapropylammoniumchlorids ist demnach keine starke. In Abb. 3 ist ein Präparat mit Adrenalin 1 : 10 000 durchströmt. Der dadurch erzeugte Gefäßtonus konnte durch Injektion von 2 ccm Tetrapropylammoniumchlorid 1 : 100 in die zuführende Kanüle gerade merkbar herabgesetzt werden. In gleicher Weise ist das Propylammoniumprodukt imstande, dem Tetramethylammoniumchlorid entgegenzuwirken. Hier gelang es durch 1 cc Tetrapropylammoniumchlorid

Zu Abb. 2. Registrierung (nach Straub) der austretenden Tropfen des Froschgefäßpräparates (Nr. 67). Minute 38—42

die Wirkung von 1 mg Tetramethylammoniumchlorid bei gleichzeitiger Injektion in die Durchströmungsflüssigkeit aufzuheben. (Abb. 4.) Muskelzuckungen waren im Gegensatz zum Tetraäthylammoniumchlorid beim Propylprodukt auch bei größeren Gaben nicht zu beobachten.

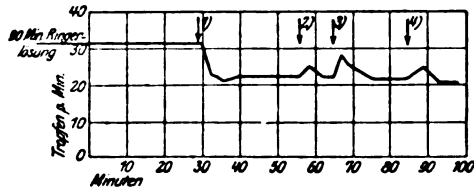


Abb. 3 (Präp. 71).

1. Durchströmung mit Adrenalin 1 : 10 000 000.
2. Injektion von 1,0 ccm Tetrapropylammoniumchlorid 1 : 100.
3. " " 2,0 " " 1 : 100.
4. " " 1,0 " ; Magnesiumchlorid 1 : 1000.

Fassen wir die Wirkung der drei letzten Substanzen zusammen, so ergibt sich für das Tetramethylammoniumchlorid eine recht starke kontrahierende Wirkung auf das periphere

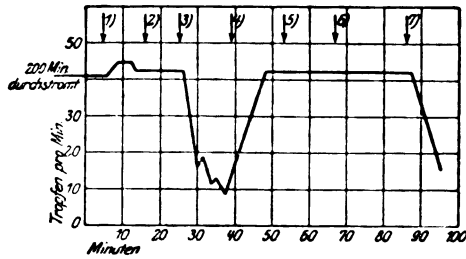


Abb. 4 (Präp. 65).

1. Injektion von 1,0 ccm Tetrapropylammoniumchlorid 1 : 100.
2. " " 1,0 " Tetramethylammoniumchlorid 1 : 10 000.
3. " " 1,0 " " 1 : 1000.
4. " " 1,0 " Tetrapropylammoniumchlorid 1 : 100.
5. " " 1,0 " " 1 : 1000.
6. " " 1,0 " Tetrapropylammoniumchlorid 1 : 100 + 1,0 ccm. Tetramethylammoniumchlorid 1 : 1000.
7. " " 1,0 " Tetramethylammoniumchlorid 1 : 1000.

Froschgefäßsystem. Das Tetraäthylammoniumchlorid hat geringe Gefäßwirkung, dagegen eine starke Wirkung auf die Skelettmuskulatur, die beim Durchspülen der Gefäße stark in Erscheinung tritt. Das Tetrapropylammoniumchlorid setzt im Gegensatz zu den vorigen vorwiegend den Gefäßtonus herab.

Die Wirkung der geprüften anorganischen Kationen.

Bevor wir den Einfluß der zweiwertigen anorganischen Kationen, Ca, Sr, Ba und Mg auf die Wirkung der beschriebenen or-

ganischen Basen betrachten, soll ein kurzes Bild über die Gefäßwirkung der erstgenannten gegeben werden.

Über die Gefäßwirkung des Calciums haben zuletzt Alday-Redonnet (l. c.) und A. K. E. Schmidt²¹⁾ Mitteilungen gemacht. Nach Alday-Redonnet wirkt Calciumchlorid im Sinne einer Gefäßverengung. Z. B. wurde beim Durchströmen des Präparates mit einer Ringerlösung, die ein Plus von 0,2% Calciumchlorid enthielt, die Ausflußgeschwindigkeit schon beträchtlich verlangsamt. Bis zu gewissem Grade konnte die Tonisierung durch Kaliüberschuß aufgehoben werden. Nach A. K. E. Schmidt wirkt Calciumchlorid stets gefäßerweiternd.

In unseren Versuchen war an frischen Präparaten, die wie beschrieben, 1 Stunde mit Ringerlösung durchströmt waren, regelmäßig eine Abnahme der Tropfenzahl an der Ausflußkanüle des Präparates festzustellen. (Abb. 5.)

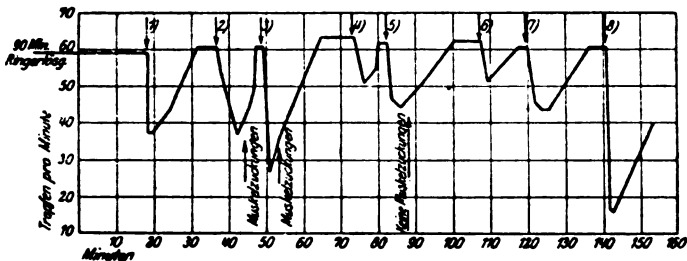


Abb. 5 (Präp. 1⁹).

1. Injektion von 1 ccm Kaliumchlorid 1 : 1000.
2. " " 1 " " 1 : 1000.
3. " " 1 " " 1 : 100.
4. " " 1 " Calciumchlorid 1 : 100.
5. " " 1 " " 1 : 100 + 1 ccm KCl 1 : 100.
6. " " 1 " " 1 : 100 + 1 " " 1 : 100.
7. " " 2 " Mischung $\frac{1}{2}$ Calciumchlorid 1 : 100 + $\frac{1}{2}$ KCl 1 : 100.
8. " " 1 " Kaliumchlorid 1 : 100.

Waren am Präparat bereits andere gefäßkontrahierende Substanzen geprüft, so fand sich oft auch nach 30 Minuten langem Auswaschen eine Zunahme der Tropfenzahl auf Calciuminjektionen. Injektionen in den Schlauch von 1 mg und darunter waren am frischen Präparat meist wirkungslos.

Auf die Gegenwirkung des Kaliums wurde näher eingegangen. Alday-Redonnet (l. c.) fand Durchströmung des Froschgefäßpräparates mit Ringerlösung von 0,1% Chlorkaligehalt an sich ohne jeden Einfluß auf die Abtropfgeschwindigkeit. A. K. E. Schmidt (l. c.) sah nach Erhöhung der KCl-Konzentration in der Durchströmungsflüssigkeit Gefäßverengung eintreten, wie denn auch schon Braun²²⁾ Erregung der Vasomotoren durch Kalium am Warmblüter beschrieben hat.

Nach Injektion von 1 ccm Kaliumchlorid 1 : 1000 in den zuführenden Schlauch des Froschgefäßpräparates konnte ich gleichfalls regelmäßig Verminderung der Abtropffolge wahrnehmen. $\frac{1}{10}$ -mg-Dosen blieben ohne merkliche Wirkung. Dosen von 10 mg (Abb. 5) riefen starke Gefäßkontraktion hervor und verursachten Zuckungen in den Skelettmuskeln, ähnlich, wenn auch schwächer, wie beim Guanidin.

Die Gefäßkontraktionen und die Muskelzuckungen lassen sich durch Calciumchlorid abschwächen, bzw. aufheben. (Abb. 5.) Wir sehen also, daß bei gleichzeitiger Injektion von Calcium- und Kaliumchlorid sich die kontrahierenden Wirkungen nicht addieren sondern deutlich abschwächen. Diese Beobachtung am Froschgefäßpräparat deckt sich demnach mit der Feststellung Höbers²⁴⁾ nach der das Calciumchlorid die Kontraktibilität von Muskeln gegenüber der lähmenden Wirkung des Kaliums schützt, das Calciumion dem Kaliumion daher entgegenwirkt.

Nach Höber (l. c.) sind das Strontium und Magnesium die nächstfolgenden Glieder einer Reihe von Ionen, die das Calcium in der erwähnten Gegenwirkung gegenüber dem Kalium vertreten können. Die fragliche Reihe stellt folgende Ionen zusammen:



Das Strontiumchlorid erhöht nach Rutkewitsch²⁵⁾ in schwächeren Lösungen die Reizbarkeit und Kontraktibilität des Herzmuskels. Stärkere Lösungen steigern die Kontraktibilität, setzen aber die Reizbarkeit herab. An den Coronargefäßen beschreibt Rutkewitsch geringe Verengung durch Strontiumchlorid. Ebenso verengern sich die Nierengefäße.

An den Froschgefäßen des Laewen-Trendelenburgschen Präparates schien Strontiumchlorid im allgemeinen sehr wenig wirksam zu sein. Nach Injektionen von 1 ccm einer 1–0,1 proz. Lösung in den zuführenden Schlauch des Präparates nahm gewöhnlich die Geschwindigkeit der austretenden Tropfen etwas ab. Andererseits konnte ähnlich wie beim Calcium an schwach tonisierten Präparaten (bes. nach vorausgegangenen Injektionen mit Gefäßkontraktion) bei einer Reihe von Präparaten Herabsetzung des Gefäßtonus gesehen werden. Ersetzte man das Calciumchlorid in der Ringerlösung äquimolekular durch Strontiumchlorid, so schien der sich einstellende Gefäßtonus (siehe bei Alday-Redonnet, l. c.) geringer zu sein. Gefäßverengende Substanzen schienen dann etwas stärker anzugreifen. Die Möglichkeit, daß diese Erscheinung durch eine sehr schnell einsetzende sensibilisierende Wirkung des Strontiums hervorgerufen wird, ist an sich diskutabel, war aber auf Grund der Versuche nicht eindeutig zu entscheiden. Jedenfalls ist Strontiumchlorid in der Durchströmungsflüssigkeit des Froschgefäßpräparates nicht als vollwertiger Ersatz für das Calcium zu gebrauchen.

Versuche mit Magnesiumchlorid sind von A. K. E. Schmidt (l. c.) in seiner soeben erschienenen Arbeit am Froschgefäßpräparat unternommen worden. Es bewirkt danach unmittelbar ein Nachlassen des Gefäßtonus. Dieses Ergebnis hatten auch unsere Untersuchungen. Nach einer anfänglichen Gefäßweiterung nimmt der Tonus im Gefäßpräparat auf Magnesiumgaben jedoch oft in merklicher Weise zu. (Abb. 6a), auch in anderen Fällen hält die Gefäßweiterung nur kurze Zeit an. Magnesiumchlorid kann das Calciumchlorid am Gefäßpräparat in gewisser Weise ersetzen, das geht schon aus den Versuchen von A. K. E. Schmidt gegenüber von Adrenalin hervor, kann aber auch an der Gegenwirkung gegenüber der Gefäßkontraktion bei Kaliumchlorid gezeigt werden. In Abb. 7 ist die verengende

Wirkung von 10 mg Kaliumchlorid durch gleichzeitige Injektion von 1 ccm Magnesiumchlorid 1 : 100 aufgehoben. Die halbe Menge Magnesiumchlorid hatte diese Wirkung noch nicht ausüben können, obwohl das Präparat durch mehrere in kurzen Pausen vorangehende Magnesiuminjektionen schon mit einem Überschuß von Magnesiumionen versehen war.

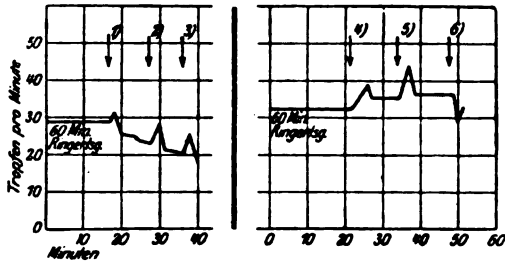


Abb. 6.

- a) Präp. 24. b) Präp. 48.
 1-3. Injektion von je 1 ccm Magnesiumchlorid 1 : 100.
 4. " " 0,2 ccm Magnesiumchlorid 1 : 100.
 5. " " 0,5 " " 1 : 100 + 1 ccm Bariumchlorid 1 : 10000.
 6. " " 1 " Bariumchlorid 1 : 10 000.

Das Bariumchlorid löst nach Untersuchungen von Handowsky und Pick (l. c.) sowie von Stroomann²⁴⁾ an den peripheren Gefäßen des Frosches starke Gefäßkontraktionen aus. Auch am Splanchnicusgebiet des

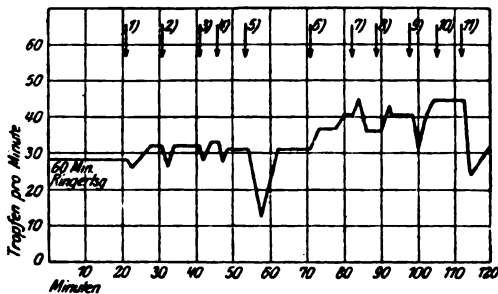


Abb. 7.

- 1-4. Injektion von je 0,1 ccm Kaliumchlorid 1 : 100.
 5. " " 1,0 ccm Kaliumchlorid 1 : 100.
 6 u. 7. " " je 0,1 ccm Magnesiumchlorid 1 : 100.
 8. " " 1,0 ccm Magnesiumchlorid 1 : 100.
 9. " " 1,0 " Kaliumchlorid 1 : 100 + 0,5 ccm Magnesiumchlorid 1 : 100.
 10. " " 1,0 " " 1 : 100 + 1,10 " " 1 : 100.
 11. " " 1,0 " " 1 : 100.

Frosches verläuft die Reaktion der Gefäße auf Bariumchlorid nach Am-seler und Pick (l. c.) in gleicher Weise. Die Gefäßkontraktion nach Bariumchlorid ist leicht zu bestätigen, da man sie an einigermaßen empfindlichen Präparaten noch bei Verdünnungen von 1 : 100 000 nachweisen kann.

Nach A. K. E. Schmidt (l. c.) kann die Gefäßkontraktion nach Bariumchlorid nicht durch Calciumchlorid gehemmt werden. Er folgert daraus einen verschiedenen Angriffspunkt für beide Substanzen. Das in seiner Wirkung dem Calcium bis zu gewissem Grade ähnliche Magnesium vermag jedoch dem Barium entgegenzuwirken. (Abb. 6b, Inj. 5.) Bei Zusatz von 0,5 ccm Magnesiumchlorid 1 : 100 zu 1 ccm Bariumchlorid 1 : 10 000 wird die Bariumwirkung vollständig durch die Gefäßerweiterung verdeckt, auch die nachfolgende Bariuminjektion erscheint noch recht schwach wirksam.

Versuche über die Beeinflussung der Wirkung der beschriebenen organischen Ionen durch die genannten anorganischen Ionen.

Wir haben eingangs erwähnt, daß das Calciumchlorid die Skelettmuskelwirkung des Guanidins nach Fühner (l. c.) antagonistisch beeinflußt und die Muscarinwirkung am Herzen hemmt (Loewi und Ishiazaka, Zondek [l. c.]). Das Muscarin verengt die Gefäße des Laewen-Trendelenburgschen Präpa

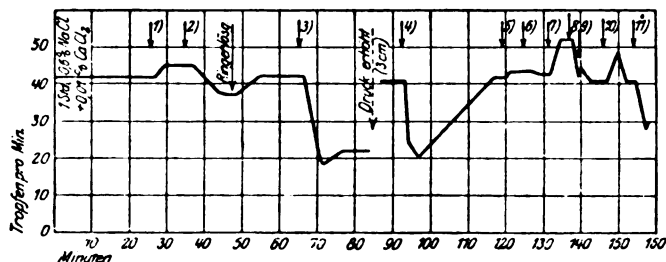


Abb. 8. (Präp. 42).

Durchströmung mit 0,6% NaCl + 0,01% CaCl₂.

1. Injektion von 1,0 ccm Muskarin 1 : 100 000.
2. " " " " 1 : 100 000.

Durchströmung mit Ringerlösung.

3. Injektion von 1,0 ccm Muskarin 1 : 100 000.
4. " " 1,0 " " 1 : 100 000.
5. " " 1,0 " Calciumchlorid 1 : 1000.
6. " " 1,0 " " 1 : 1000.
7. " " 1,0 " " 1 : 100.
8. " " 1,0 " " 1 : 1000 + 1,0 ccm Muskarin 1 : 100 000.
9. " " 1,0 " " 1 : 1000.
10. " " 1,0 " " 1 : 1000 + 1,0 " " 1 : 100 000.
11. " " 1,0 " Muskarin 1 : 100 000.

rates deutlicher als das Guanidin. Es läßt sich zeigen, daß die Muscarinwirkung an den Froschgefäßen in hohem Grade von der Zusammensetzung der Durchströmungsflüssigkeit abhängig ist.

Wir haben gesehen, daß Kalium- und Calciumchlorid an den Gefäßen einander entgegenwirken. Fortlassen des Kaliumchlorids aus der Ringerlösung wird also ein Überwiegen der Wirksamkeit der Calciumionen zur Folge haben. Durchströmt

man mit einer Flüssigkeit, die neben Natriumchlorid 0,1% Calciumchlorid enthält, so kann man zeigen, daß die Wirkung kleiner Muscarindosen aufgehoben, bzw. stark abgeschwächt ist. Sie tritt sofort wieder auf, wenn Kaliumchlorid in der Konzentration der Ringerlösung der Durchströmungsflüssigkeit zugefügt wird. (Abb. 8.)

Daß in der Tat das Calciumchlorid die Hemmung ausübt, zeigt der weitere Verlauf von Kurve 8. Nach einigen rasch aufeinanderfolgenden Calciuminjektionen wurde Muscarin mit Calcium zusammen in den Schlauch injiziert. Es war dabei zu erreichen, daß die Muscarinwirkung nicht nur abgeschwächt, sondern von der Calciumwirkung vollkommen verdeckt wurde, die sich an sensibilisierten und tonisierten Präparaten als Gefäß-erweiterung offenbarte.

Für das Guanidin mit seiner schwächeren Gefäßwirkung war der Calciumeinfluß nicht mit gleicher Deutlichkeit zu beobachten, in einer

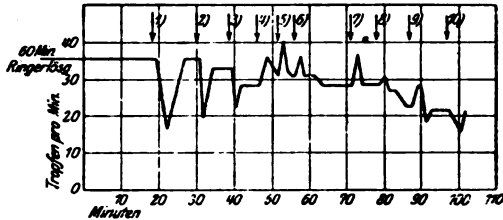


Abb. 9 (Präp. 25).

1—8.	Injektion von je 1,0 cem Acetylcholin 1 : 100 000 000.
4 u. 5.	„ „ „ 1 „ Calciumchlorid 1 : 100.
6 u. 7.	„ „ „ 1 „ Acetylcholin 1 : 100 000 000 + 1 cem Calciumchlorid 1 : 100.
8 u. 9.	„ „ „ 1 „ „ 1 : 10 000 000 + 1 „ „ 1 : 100.
10.	„ „ „ 1 „ „ 1 : 100 000 000.

Reihe von Präparaten erschien er nur angedeutet. Beim Acetylcholin war die hemmende Wirkung des Calciums deutlicher. Bei gleichzeitiger Injektion beider Substanzen in den zuführenden Schlauch des Präparates kann man sich davon überzeugen, daß bei geeigneter Dosierung die Gefäßkontraktion ausbleibt. In Abb. 9 folgten auf drei Injektionen von Acetylcholin 1 : 100 Millionen zwei Injektionen von je 10 mg Calciumchlorid, welche Beschleunigung der Abtropfgeschwindigkeit zur Folge hatten. Darauf folgten zwei Injektionen von je 2 cem einer Mischung beider Lösungen, bei denen nur die Calciumwirkung erkennbar war. Calciumchlorid wäscht sich bekanntlich leicht im Präparat aus. Fügte man zu den gleichen Calciummengen Acetylcholin in stärkerer Konzentration hinzu (Acetylcholin 1 cem 1 : 10 Millionen), so war nach Abklingen der Calciumwirkung eine Steigerung des Tonus durch das sich langsamer auswaschende Acetylcholin zu beobachten. Daß das Präparat danach aber auf Acetylcholin noch ansprach, zeigt die letzte Injektion von Acetylcholin 1 : 100 Millionen.

Auch nach Hinzufügen von Calciumchlorid 1 : 1000 zur Durchströmungsflüssigkeit ist Abschwächung bzw. Aufhebung der Wirkung des

Acetylcholins zu beobachten. Da nach Alday-Redonnet (l. c.) jedoch Calciumchlorid beim Durchströmen das Präparat in stärkeren Tonus versetzt, könnte man einwenden, daß die Wirkung des Acetylcholins in den erwähnten Verdünnungen nicht ausreicht, um weitere Kontraktion zu erhalten. Die vorstehende Kurve ist daher für den zweck der Beeinflussung der Acetylcholinwirkung durch Calciumchlorid als beweisender anzusehen.

Für das Tetramethylammoniumchlorid gilt bezüglich seiner Beeinflussbarkeit durch Calcium ungefähr dasselbe wie für das Acetylcholin. Wie schon erwähnt, wurden die drei Ammoniumprodukte gegen Ende des Winters an den Froschgefäßen geprüft, als die Empfindlichkeit der Präparate schon stark abgenommen hatte. Der Nachweis der antagonistischen Beeinflussung der Wirkung des Tetramethylammoniumchlorids durch Calcium stieß daher bereits auf Schwierigkeiten.

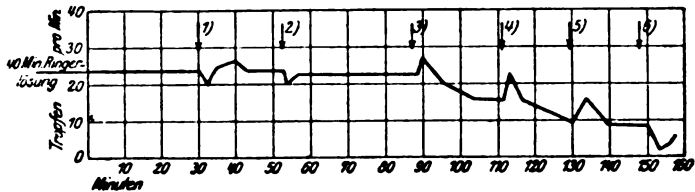


Abb. 10.

1. Injektion von 1,0 ccm Tetraäthylammoniumchlorid 1 : 100 000.
2. " " 1,0 " " " 1 : 100 000.
3. " " 1,0 " Calciumchlorid 1 : 100.
4. " " 1,0 " Tetraäthylammoniumchl. 1 : 100 000 + 1,0 ccm Calciumchl. 1 : 100.
5. " " 1,0 " " " 1 : 100 000 + 1,0 " " " 1 : 100.
6. " " 1,0 " " " 1 : 100 000.

Das Tetraäthylammoniumchlorid mit seiner exzessiven Guanidinwirkung schien schwerer im Präparat auswaschbar zu sein als das Methylprodukt. Nach der antagonistischen und gefäßerweiternden Calciumwirkung in Kurve 10 erfolgte jedenfalls immer stärkere Zunahme des Gefäßtonus durch das länger wirkende Tetraäthylammoniumchlorid, wenn es mit Calcium zusammen injiziert war. Vielleicht spielt hier eine Steigerung der Empfindlichkeit eine Rolle, zumal solche Präparate längere Zeit durchströmt waren.

Strontiumchlorid hat, wie oben geschildert, nur eine schwache Gefäßwirkung. Die Wirkung des Guanidins und der Tetraammoniumbasen schien es kaum zu beeinflussen. Muscarin gegenüber schien es eine abgeschwächte Calciumwirkung zu besitzen. In Durchströmungsversuchen, in denen es das Calciumchlorid äquimolekular in der Ringerlösung vertrat, blieb die vorher deutliche Muscarinwirkung zum Teil aus. Schien es somit die Präparate auch nicht in stärkerem Maße zu sensibilisieren, so war es um so auffallender, daß beim Acetylcholin Strontiumchloridin den meisten Versuchen eine erhebliche Wirkungsverstärkung hervorzubringen schien.

In Abb. 11 ist die Wirkung von Acetylcholin 1 : 1 Milliarde dargestellt. Darauf folgten an dem Präparat einige Injektionen von je 10 mg Strontium-

chlorid. Eine Mischung beider Konzentrationen hatte eine sehr viel stärkere Tropfenabnahme zur Folge. Bei stärkeren Konzentrationen von Acetylcholin ließen sich die Unterschiede nicht mehr so deutlich demonstrieren.

Beim Barium war im Hinblick auf die Untersuchungen von Fühner (l. c.) „Über den Synergismus von Giften“ darauf zu achten, ob der am Froschmuskel und Blutegelpräparat beobachtete Synergismus mit Guanidin und Tetraäthylammoniumchlorid (Peiser, l. c.) auch an den Gefäßen nachzuweisen war. Ein solcher Synergismus ließ sich mit keinem der Salze der geprüften organischen Basen nachweisen. Eher ließ sich eine Abschwächung der Wirkung der letzten bei gleichzeitiger Injektion mit Bariumchlorid nachweisen.

Durchströmte man ein Gefäßpräparat länger als 2 Stunden mit Ringerlösung, welcher etwas Bariumchlorid zugesetzt war, so trat auf Injektionen von Muscarin 1 : 10 000 resp. 1 : 100 000 eine erhebliche Zunahme der Tropfenzahl auf. (Abb. 12.)

Für Acetylcholin war die gleiche Erscheinung nicht zu beobachten. Beim Guanidin konnte nach längerer Bariumdurchströmung ähnliches nur andeutungsweise festgestellt werden. Die zunehmende Verminderung der Empfindlichkeit der Präparate gegen Winterende verhinderte die genauere Nachprüfung dieses Ergebnisses für die übrigen geprüften organischen Basen.

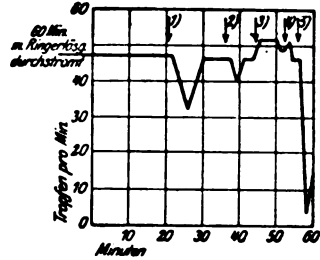


Abb. 11 (Präp. GS).

1. Injektion von 1 ccm Acetylcholin 1 : 1 000 000 000.
2. Injektion von 1 ccm Acetylcholin 1 : 1 000 000 000.
- 3 u. 4. Injektion von je 1 ccm Strontiumchlorid 1 : 100.
5. Injektion von 1 ccm Strontiumchlorid 1 : 100 + 0,1 ccm Acetylcholin 1 : 100 000 000.

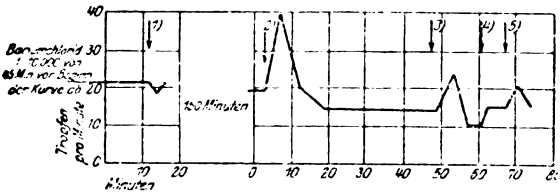


Abb. 12. Das Präparat wurde von 45 Minuten vor Beginn der Kurve an mit Ringerlösung + Bariumchlorid 1 : 10 000 bis zum Schluß durchströmt.

1. Injektion von 1 ccm Muskarin 1 : 10 000.
2. " " " " 1 : 10 000.
3. " " " " 1 : 10 000.
4. " " " " 1 : 100 000.
5. " " " " 1 : 100 000.

Die gefäßerweiternde Wirkung des Magnesiumchlorids dazu zu benutzen, die Gefäßverengung nach anderen Substanzen aufzuheben, hatte bei geeigneter Dosierung keine Schwierigkeiten. Ob es sich dabei um richtigen Antagonismus oder nur um eine Verdeckung der Gefäßverengung durch das Magnesium handelt, läßt sich um so schwerer entscheiden, als die Konzentrationen der zusammen wirkenden Stoffe stets recht ungleiche waren. Zu einer Muscarininjektion von $\frac{1}{100}$ mg ist es notwendig, 1 mg

Magnesiumchlorid hinzuzufügen, um die Muscarinwirkung zu unterdrücken. Muskelzuckungen nach Guanidin schwinden bei Zuführung von Magnesium. Im ganzen hat die Magnesiumwirkung den Salzen der geprüften organischen Basen gegenüber große Ähnlichkeit mit der des Calciums. Ein Unterschied scheint nur in der erwähnten antagonistischen Wirkung dem Barium gegenüber zu bestehen.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Die wirksamste organische Base, die wie alle Substanzen als Chlorid geprüft wurde, war das Acetylcholin, das bei gut empfindlichen Präparaten noch in einer Verdünnung von 1 : 1 Milliarde am Gefäßgebiet angriff. Das Tetramethylammoniumchlorid gab ähnliche Ausschläge in einer Verdünnung von 1 : 100 000, das Muscarin war etwas weniger wirksam. Sehr viel weniger wirksam waren Tetraäthylammoniumchlorid und das Guanidin, das letztere etwa 10 mal weniger als das Muscarin, oder noch schwächer. Zwischen Guanidin- und Tetraäthylammoniumionen bestehen weitgehende Ähnlichkeiten sowohl in der Stärke ihrer Gefäßwirkung wie in der Erregung von Muskelzuckungen in durchströmten Präparaten. Es ist auffällig, daß für die molekulare Leitfähigkeit des Guanidins und Tetraäthylammoniumhydroxyds Bredig (l. c.) in seinen eingangs erwähnten Messungen nahezu übereinstimmende Werte gefunden hat, die ihrerseits der des Natriums näher steht als der des Kali. Dementsprechend weist auch Fühner (l. c.) auf die Ähnlichkeit des Guanidiniums mit dem Na-Ion hin. Das Tetrapropylammoniumchlorid schließlich setzte den Gefäßtonus herab. Das letzte ähnelte in der Art seiner Wirkung am meisten von den anorganischen Kationen dem Calcium resp. Magnesium.

Der tonuserabsetzenden Wirkung des Magnesiums standen die mehr oder weniger an frischen Präparaten tonussteigernden Kationen Sr, Ca und Ba gegenüber. Strontium war überhaupt wenig wirksam, die Calciumwirkung war stets deutlicher. Am stärksten war die Gefäßkontraktion nach Bariumchlorid und zwar noch in sehr großer Verdünnung. Es ergibt sich eine auffallende Übereinstimmung mit Trendelenburgs²⁶⁾ Befunden an der isolierten Bronchialmuskulatur des Rindes. Dieser Autor stellt bei der Prüfung der gleichen zweiwertigen Kationen diese in gleicher Weise zusammen. Es ergibt sich also eine Reihe

Mg ↓, Sr →*), Ca ↑, Ba ↑,

*) Bei Trendelenburg: Sr = Ca(Sr, Ca).

wobei die Pfeilrichtung die Beeinflussung des Tonus andeuten soll. Bei der Hemmung der Gefäßkontraktion nach Zuführen organischer Ionen durch die angeführten zweiwertigen anorganischen Kationen läßt sich ungefähr die gleiche Reihenfolge feststellen. Die Stellung von Strontium und Calcium ist in diesem Zusammenhang zu vertauschen. Nach Höber (l. c.) werden fibrilläre Zuckungen, in welche Muskeln in reiner Kochsalzlösung verfallen, von den genannten zweiwertigen Kationen in der Reihenfolge $\text{Ca}, \text{Mg} > \text{Sr} > \text{Ba}$ gehemmt. Auch hier findet sich unverkennbar eine Ähnlichkeit. Barium hatte gegenüber den Salzen der geprüften organischen Basen die schwächste Hem-

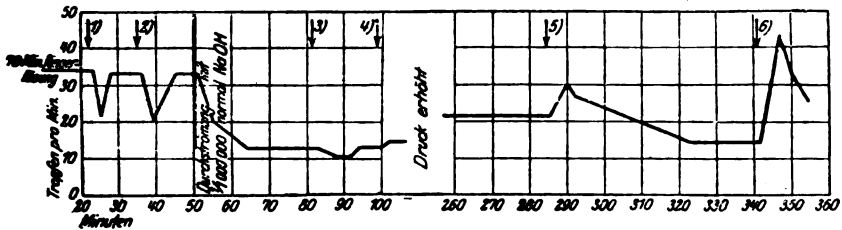


Abb. 13 (Präp. 60).

Präparat vor Beginn der Kurve 70 Minuten mit Ringerlösung durchströmt.

1. Injektion von 1 ccm Muskarin $\frac{1}{100\,000}$.

2. " " 1 " Natronlauge 1 : 100 000.

Durchströmung mit $\frac{1}{1\,000\,000}$ normaler Natronlauge.

3. Injektion von 1 ccm Muskarin 1 : 100 000.

4. " " 1 " " 1 : 10 000.

5. " " 1 " " 1 : 100 000.

6. " " 1 " " 1 : 10 000.

mungswirkung. Synergismus mit Guanidin oder Tetraäthylammoniumchlorid (Fühner, l. c.) fand an den Gefäßen nicht statt. Eine in diesem Sinne gedeutete Erscheinung war in einer Reihe von Fällen zwischen Strontium und Acetylcholin zu beobachten.

Bei Durchströmen mit Bariumchlorid in geringer Konzentration trat nach Muscaringaben Gefäßerweiterung auf. Diese Beobachtung dürfte mit der Gefäßerweiterung durch Bariumchlorid nach Adrenalindurchströmung in Parallele zu stellen sein, welche von Bauer und Fröhlich (l. c.) nachgewiesen wurde. A. K. E. Schmidt sah Umkehr der Adrenalinwirkung nach Kalium- und vereinzelt nach Calciumdurchströmung.

Eine Gefäßerweiterung durch Muscarin und Acetylcholin war an Präparaten zu beobachten, welche durch längere Durchströ-

mung mit OH-Ionen tonisiert waren. Gefäßkontraktion durch OH-Ionen hat Alday-Redonet nachgewiesen. In Abb. 13 gab 1 ccm einer $1/100\,000$ normalen Natronlauge (in den Schlauch injiziert) kräftige Gefäßkontraktion. (Injektion 2.) Darauf wurde mit $1/1\,000\,000$ normaler Natronlauge fast 4 Stunden durchströmt. Jetzt trat nach Muscaringaben deutliche Gefäßerweiterung auf. Abb. 14 zeigt dieselbe Erscheinung beim Acetylcholin nach $3\frac{1}{2}$ stündiger Durchströmung mit $1/1\,000\,000$ normaler Natronlauge. Inwieweit bei derartig langen Durchströmungen mit OH-Ionen die Erregbarkeit der Gefäßinnervation verändert ist, läßt sich schwer entscheiden. Nach Alday-Redonet (l. c.) sensibilisieren OH-Ionen das Präparat für Adrenalin. Die Innervationsverhältnisse auf Grund ähnlicher Beobachtungen näher zu erschließen, haben Kolm und Pic²⁷⁾ versucht. Doch dürfte ein Eingehen auf dieses Problem an dieser Stelle zu weit führen.

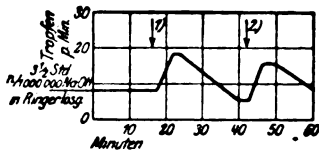


Abb. 14 (Präp. 61).

1 u. 2 Injektion von je 1 ccm Acetylcholin $1:10\,000\,000$. Nach $3\frac{1}{2}$ Stunden Durchströmung mit $1/1\,000\,000$ NaOH in Ringerlösung.

des Guanidins und der starken quartären Ammoniumbasen in ihrer Wirkung der des Kaliums sehr nahe stehen. Am Gefäßsystem des Frosches läßt sich für das Guanidin, Muscarin, Acetylcholin, Tetramethyl- und Tetraäthylammoniumchlorid die Ähnlichkeit mit dem Kaliumchlorid gleichfalls feststellen. Ebenso wie die Kaliwirkung wird die Wirkung der Chloride dieser organischen Basen durch Fortfall des Calciums aus der Ringerlösung im allgemeinen gesteigert. Hinzufügen von Kaliumchlorid zur Ringerlösung in einer Konzentration, die noch keine Gefäßverengung verursacht, hat gewöhnlich zur Folge, daß die Tonuszunahme durch die geprüften gefäßverengernden organischen Substanzen länger anhält als bei einfacher Ringerdurchströmung.

Die einzige der geprüften organischen Basen, die den Tonus herabsetzte, war das Tetrapropylammoniumchlorid. Diese Substanz stand in der Art ihrer Wirkung am Gefäßsystem zwischen der des Calciums und Magnesiums. Das Tetrapropylammoniumchlorid scheint somit den anderen geprüften organischen Basen gegenüber eine Ausnahme zu bilden. Vergleicht man es jedoch mit seinen

niederen Homologen, so wird seine Wirkung verständlicher: Das Tetramethylammoniumchlorid verursacht sehr starke Gefäßkontraktionen. Das Tetraäthylammoniumchlorid hat demgegenüber nur eine schwache Gefäßwirkung und bewirkt nur eine verhältnismäßig geringe Abnahme der Abtropfgeschwindigkeit am Froschgefäßpräparat. Beim Propylprodukt sehen wir nur an ganz frischen Präparaten geringe Verminderung der Tropfenzahl, an Gefäßen jedoch, bei denen ein gewisser Tonus besteht, wird derselbe herabgesetzt. Es ist ersichtlich, daß die Veränderung der Wirkung der einzelnen homologen Glieder der Reihe der Zahl der im Molekül vorhandenen Methylgruppen parallel geht.

Zusammenfassung.

Am Laewen-Trendelenburgschen Froschgefäßpräparat wurde eine Reihe organischer Basen in Salzform geprüft, deren Wirkung als einwertige organische Kationenwirkung anzusehen ist.

Die stärkste gefäßverengernde Wirkung hatte das Acetylcholin. Verdünnungen von 1 : 1 Milliarde waren an Sommerfröschen noch wirksam. Sehr viel weniger gefäßverengernd wirkte das Cholinmuscarin, noch weniger das Guanidin.

Die ersten drei Glieder aus der homologen Reihe der quartären Ammoniumbasen (wie die übrigen als Chloride geprüft) zeigten bedeutende Unterschiede in ihrer Gefäßwirkung: Das Tetramethylammoniumchlorid verengerte die Gefäße sehr stark und stand in seiner Wirkungsstärke zwischen dem Acetylcholin und dem Cholinmuscarin. Das Tetraäthylammoniumchlorid verhielt sich dem Guanidin außerordentlich ähnlich. Das Tetrapropylammoniumchlorid setzte im wesentlichen den Gefäßtonus herab.

Die gefäßkontrahierende Wirkung der geprüften organischen Kationen konnte durch zweiwertige anorganische Kationen im allgemeinen gehemmt werden, und zwar in der Reihenfolge Mg, Ca, Sr, Ba.

Umkehrwirkung ließ sich beim Muscarin erzielen, wenn das Froschgefäßpräparat längere Zeit mit Bariumchlorid in geringer Konzentration durchströmt war.

Die Muscarin- und Acetylcholinwirkung konnte eine Umkehrung erfahren, wenn der Durchströmungsflüssigkeit längere Zeit ein kleiner Überschuß von OH-Ionen hinzugefügt war.

Literatur.

- ¹⁾ Bredig, G., Über die Affinitätsgrößen der Basen. *Zeitschr. f. physikal. Chemie* **13**, 289. 1894; Beiträge zur Stöchiometrie der Ionenbewegung. *Ebenda* S. 191. — ²⁾ Fühner, H., Über organische Ionenwirkungen, speziell des Guanidins. *Zentralbl. f. Physiol.* **20**, Nr. 25, S. 838. 1906; Curarastudien I. Die periphere Wirkung des Guanidins. *Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol.* **58**, 1. 1907. — ³⁾ Höber, R. und H. Waldenberg, Über den Einfluß von Salzen starker organischer Basen auf den Ruhestrom und die Erregbarkeit von Froschmuskeln. *Arch. f. d. ges. Physiol.* **126**, 331. 1909. — ⁴⁾ Löwi, O. und T. Ishiazaka, Über die Wirkung des Muscarins auf das unzureichend gespeiste Froschherz und die Gegenwirkung des Calciums. *Zentralbl. f. Physiol.* **19**, Nr. 17, S. 593. 1905. — ⁵⁾ Zondeck, S. G., Über die Bedeutung der Calcium- und Kaliumionen bei Giftwirkung am Herzen. *I. Mitt. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol.* **87**, 342. 1920. — ⁶⁾ Fühner, H., Untersuchungen über den Synergismus von Giften IV. Die chemische Erregbarkeit usw. *Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol.* **82**, 51. 1917. — ⁷⁾ Fühner, H., Untersuchungen über den Synergismus von Giften. V. Guanidin-Barytmischungen. *Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol.* **88**, 179. 1920. — ⁸⁾ Schmiedeberg, O. und E. Harnack, Über die Synthese des Muscarins und über muscarinartig wirkende Ammoniumbasen. *Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol.* **6**, 101. 1877. — ⁹⁾ Handowsky, H. und E. P. Pick, Untersuchungen über die pharmakologische Beeinflussbarkeit des peripheren Gefäßtonus des Frosches. *Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol.* **71**, 89. 1913. — ¹⁰⁾ Bauer, J. und A. Fröhlich, Die Wirkung von Gefäßmitteln nach Adrenalinvergiftung. *Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol.* **84**, 33. 1919. — ¹¹⁾ Schmiedeberg, O. und R. Koppe, Das Muscarin, das giftige Alkaloid des Fliegenpilzes (*Agaricus muscarius*). Leipzig 1869. — ¹²⁾ Dixon, W. E. and W. D. Halliburton, The action of drugs upon the cerebral vessels. *Quarterly Journ. of experim. physiol.* **3**, 315. 1910. — ¹³⁾ Full, H., Versuche über die automatische Bewegung der Arterien. *Zeitschr. f. Biol.* **61**, 286. 1913. — ¹⁴⁾ Alday-Redonnet, Th., Sensibilisierung des Trendelenburgschen Froschpräparates zur Adrenalinmessung. *Diese Zeitschr.* **110**, 306. 1920. — ¹⁵⁾ Dale, H. H., The action of certain esters and ethers of Choline and their relation to Muscarine. *Journal of pharmacol. a. exp. therapeut.* **6**, 147. 1914/15. — ¹⁶⁾ Amseler, C. und E. P. Pick, Pharmakologische Studien am isolierten Splanchnicusgefäßgebiet des Frosches. *Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol.* **85**, 61. 1920. — ¹⁷⁾ Santesson und Koræen, (zit. nach Peiser). — ¹⁸⁾ Böhm, R., siehe bei C. G. Santesson, Versuche über die Nervenendwirkung methylierter Pyridin-, Chinolin-, Isochinolin- und Thallinverbindungen. *Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol.* **35**, 23. 1895. — ¹⁹⁾ Peiser, F., Pharmakologische Untersuchungen über die Wirkung von Tetramethyl-, -äthyl-, und -propylammoniumsalzen. *Inaug.-Diss. Königsberg* 1920. — ²⁰⁾ Jodlbauer, A., Über die Wirkung von Tetramethylammoniumchlorid. *Arch. internat. de Pharmacodyn. et Ther.* **7**, 183. 1900. — ²¹⁾ Schmidt, A. K. E., Über die

Bedeutung der Bestandteile der Ringerschen Lösung für die Gefäßregbarkeit überlebender Organe. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmacol. 89, 144. 1921. — ²³⁾ Braun, L., Über die Wirkung der Kalisalze auf das Herz und die Gefäße von Säugetieren. Arch. f. d. ges. Physiol. 103, 476. 1904. — ²⁴⁾ Höber, R., Beitrag zur Theorie der physikalischen Wirkungen des Calciums. Arch. f. d. ges. Physiol. 166, 531. 1917. — ²⁵⁾ Rutkewitsch, K., Die Wirkungen der Calcium- und Strontiumsalze auf das Herz- und Blutgefäßsystem. Arch. f. d. ges. Physiol. 129, 487. 1909. — ²⁶⁾ Stroomann, G., Studien über die Gefäßwirkungen der Digitaliskörper. Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. 2, 278. 1914. — ²⁷⁾ Trendelenburg, P., Physiologische und pharmakologische Untersuchungen an der isolierten Bronchialmuskulatur. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmacol. 69, 79. 1912. — ²⁸⁾ Kolm, R. und E. P. Pick, Über Änderung der Adrenalinwirkung nach Erregung der vagalen Endapparate. Arch. f. d. ges. Physiol. 184, 79. 1920.

Berichtigung

zur Mitteilung von T. Sasaki, diese Zeitschr. 114. 1921.

- Seite 65, Zeile 8 lies: Benzylierung statt Benzoylierung.
„ 65, „ 10 „ : N-Dibenzylglycinanhydrid statt N-Dibenzoylglycinanhydrid.
„ 65, „ 12 „ : Benzylgruppe statt Benzoylgruppe.
„ 66, unter Daten lies: Phenylharnstoff statt Phenylstoff.
„ 66, Zeile 6 von unten lies: N-Dibenzoldiacipiperacin statt N-Dibenzoyldiacipiperacin.

Hierzu als Anmerkung:

N-Dibenzylglycinanhydrid ist früher schon durch Ringschluß aus Benzyl-aminoessigsäure-ester von Mason und Winder (Chem. Soc. London, 1894, 190.) gewonnen. Ich habe dieselbe Substanz aus Glycinanhydrid erhalten, wenn auch schwierig, da leicht Ringspaltung eintritt.

Autorenverzeichnis.

- Airila, Y. s. Michaelis.
Barendrecht, H. P. Das Enzym Phosphatase-Phosphatase. S. 254.
Bach, Emerich s. Rona.
Basch, E. s. Meyer-Bisch.
Bloch, Ernst s. Rona.
Bornstein, A. und Robert Vogel. Die Wirkung des Pilocarpins auf die Blutzusammensetzung. S. 1.
Eisenhardt, W. u. R. Schaefer. Schwankungen im Chlorid-Stoffwechsel unter dem Einfluß der menstruellen Vorgänge. S. 34.
Erdstein, F. und L. Fürth. Zur Kenntnis der Wirkung blanker Metalle auf Toxine. S. 256.
Freudenberg, E. u. P. György. Über Kalkbindung durch tierische Gewebe. III. S. 50.
Friedberg, Eduard. Quantitative Messung der zeitlichen Coffeinausscheidung beim Menschen nach einer neuen biologischen Methode. S. 164.
Fürth, L. s. Erdstein.
György, P. s. Freudenberg.
Haffner, F. s. Jodlbauer.
Herbst, Heinrich. Über den Einfluß des Wassergehaltes auf die Adsorptionsleistung einer aktiven Kohle. S. 103.
Jodlbauer, A. und F. Haffner. Über den Zusammenhang von Dunkelwirkung fluoreszierender Stoffe und Photodynamie auf Zellen. S. 150.
Meyer-Bisch, Robert u. E. Basch. Über das Schicksal parenteral verabreichten Schwefels und seinen Einfluß auf den Stoffwechsel. S. 39.
Michaelis, L. und Y. Airila. Die elektrische Ladung des Hämoglobins. S. 144.
Murschhauser, Hans. Die quantitative Bestimmung von Dextrose und Lävulose in einer Lösung. S. 120.
Nordefeldt, E. Die Bedeutung der Acidität für die Oxynitrilsynthese und die Nichtexistenz des Rosenthalerschen syn-Emulsins. S. 15.
von Oettingen, K. j. Beiträge zur Frage der Senkungsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen im menschlichen Blute. S. 67.
Plagge, H. Vergleichende Untersuchung über die gärungshemmende Wirkung einiger Chlorderivate des Methans, Äthans und Äthylens. S. 129.
Reinicke, Dora s. Rona.
Rona, Peter u. Ernst Bloch. Beiträge zum Studium der Giftwirkung. Über die Wirkung des Chinins auf Invertase. S. 185.
Rona, Peter u. Dora Reinicke. Beiträge zum Studium der Giftwirkung. Über die Wirkung des Chinins auf Serumlipase. S. 213.
Rona, Peter u. Emerich Bach. Beiträge zum Studium der Giftwirkung. Über die Wirkung des m- und p-Nitrophenols auf Invertase. S. 232.

- Salkowski, E. Über die quantitative Bestimmung der Oxalsäure im Harn. S. 259.
- Samson, G. Über Blutveränderung nach peroraler Kochsalzgabe. S. 55.
- Sasaki, T. Berichtigung zur Mitteilung, diese Zeitschr. 114, 1921. S. 286.
- Schaefer, R. s. Eisenhardt.
- Staub, H. Bahnung im intermediären Zuckerstoffwechsel. S. 93.
- Teschendorf, Werner. Über die Gefäßwirkung organischer Kationen und ihre Beeinflussung durch anorganische Ionen. S. 267.
- Vogel, Robert s. Bornstein.
- Wester, D. H. Über den Mangan-gehalt von (holländischen) Samen. S. 158.
- Wilbrand, Eberhard. Schweißabsonderung und Blutzusammensetzung. S. 61.
-

Biochemische Zeitschrift

Beiträge
zur chemischen Physiologie und Pathologie

Herausgegeben von

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

unter Mitwirkung von

**M. Ascoli - Catania, L. Asher - Bern, M. Bergmann - Berlin-Dahlem, G. Bertrand - Paris,
A. Bleket - Berlin, F. Blumenthal - Berlin, A. Bonanni - Rom, F. Bottazzi - Neapel, G. Brödigk -
Karlsruhe i. B., F. Czapek - Leipzig, A. Darig - Wien, F. Ehrlich - Breslau, H. v. Euler - Stock-
holm, J. Feigl - Hamburg, R. Flexner - New York, J. Forsman - Lund, R. Fränkel - Wien,
E. Freund - Wien, H. Freundlich - Berlin-Dahlem, E. Friedberger - Greifswald, E. Friedmann -
Berlin, O. v. Fürth - Wien, F. Haber - Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger - Groningen, F. Hári -
Budapest, E. Hägglund - Åbo, A. Heffter - Berlin, V. Henri - Paris, V. Henriques - Kopen-
hagen, R. O. Herzog - Berlin-Dahlem, W. Heubner - Göttingen, R. Höber - Kiel, M. Jacoby -
Berlin, A. Koch - Göttingen, F. Landolt - Buenos Aires, L. Langstein - Berlin, P. A. Leoway -
New York, L. v. Liebermann - Budapest, J. Loeb - New York, S. Loewe - Dorpat, A. Loewy -
Berlin, A. Magnus - Levy - Berlin, J. A. Mandel - New York, L. Marchlewski - Krakau,
F. Mayer - Karlsbad, J. Meisenheimer - Greifswald, L. Michaelis - Berlin, H. Molitch - Wien,
J. Morgenroth - Berlin, E. Münzer - Prag, W. Nernst - Berlin, W. Ostwald - Leipzig, W. Palla-
din - St. Petersburg, J. K. Parnas - Lemberg, W. Paull - Wien, R. Pfeiffer - Breslau, E. P. Pick -
Wien, J. Pohl - Breslau, Ch. Porcher - Lyon, P. Rena - Berlin, H. Sachs - Heidelberg, S. Sa-
sakini - St. Petersburg, T. Sasaki - Tokio, A. Scheunert - Berlin, A. Schloßmann - Düsseldorf,
S. P. L. Sørensen - Kopenhagen, K. Spiro - Liestal, E. H. Starling - London, J. Stekane - Prag,
W. Straub - Freiburg i. B., A. Stutzer - Königsberg i. Pr., K. Suto - Kanasawa, H. v. Tappiner -
München, K. Thoms - Leipzig, H. Thoms - Berlin, P. Trendelenburg - Rostock, O. Warburg -
Berlin, W. Wischewski - Prag, A. Wehl - Danzig, J. Wohlgenuth - Berlin.**

Redigiert von

C. Neuberg - Berlin

Hundertundneunzehnter Band

Manusdruck



Berlin

Verlag von Julius Springer

1921

Druck der Spamersehen Buchdruckerei in Leipzig

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Meler, Klothilde und W. Krönig. Blutgasanalysen. IX. Narkose und kolloidale Ladung	1
Karczag, L. Studien über Oxydationskatalysen. II.	16
Petry, Eugen. Zur Kenntnis der Bedingungen der biologischen Wirkung der Röntgenstrahlen. I. Mitteilung	23
Hattori, Kenzo. Kolloidstudien über den Bau der roten Blutkörperchen und über Hämolyse. III. Ultramikroskopische Untersuchungen an Lipoiden	45
van Creveld, S. und E. Brinkman. Ein direkter Beweis für die Impermeabilität der Blutkörperchen des Menschen und des Kaninchens für Glucose	65
Neméc, A. und František Duchoň. Versuche über Vorkommen und Wirkung der Saccharophosphatase im Pflanzenorganismus	73
Hersberg, Kurt. Der Nachweis kleinster Milchezuckermengen im Harn durch Bildung von Formaldehyd	81
Joël, Ernst. Zur Visco- und Stalagmometrie des Harns	93
Lesser, E. J. Die räumliche Trennung von Glykogen und Diastase in der Leberzelle	108
Henriques, V. und B. Ege. Vergleichende Untersuchungen über die Glucosekonzentration in dem arteriellen Blut und in dem venösen Blut aus den Muskeln	121
Warburg, Otto. Physikalische Chemie der Zellatmung	134
Borech, Karl. Die wasserlöslichen Farbstoffe der Schizophyceen	167
Lövgren, Sture. Studien über die Urease	215
Landsteiner, Karl. Über heterogenetisches Antigen und Hapten. XV. Mitteilung über Antigene	294
Michaelis, L. und R. Krüger. Weitere Ausarbeitung der Indikatorenmethode ohne Puffer	307
Morschhauser, Hans. Welche Zuckerart wird vom Säugling im Harn ausgeschieden, wenn die für ihn festgestellte Assimilationsgrenze für Rohrzucker in der Nahrung überschritten wird. Eine Methode und ein Berechnungsmodus zur quantitativen Bestimmung mehrerer Zuckerarten nebeneinander im Harn	328
Autorenverzeichnis	339

Blutgasanalysen. IX.

Narkose und kolloidale Ladung.

Von

Klothilde Meier und W. Krönig.

(Aus der medizinischen Poliklinik der Universität Halle a. S.)

(Eingegangen am 5. April 1921.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Das Problem der Narkose kann bis heute noch nicht als gelöst betrachtet werden, trotzdem namhafte Forscher sich damit befaßt haben und verschiedene Theorien zu seiner Erklärung aufgestellt worden sind.

Während die Lipoidtheorie mit dem Hinweis auf die Lipidlöslichkeit der Narkotica und den Parallelismus zwischen Wirksamkeit und Teilungskoeffizienten nicht mehr als die Ursache der Aufnahme dieser Stoffe in die Zelle verständlich macht, dringt die Haftdrucktheorie etwas tiefer, durch die Betonung der mit der Aufnahme der Narkotica in die Zelle verbundenen veränderten Zellfunktion, auf die eine Erklärung der Narkose notwendigerweise hinauslaufen muß. Zunächst befaßt sie sich ebenso wie die Lipoidtheorie auch nur mit der Aufnahme der Narkotica, allerdings unter einem veränderten Gesichtspunkt. Als der wirksame Faktor gilt hier die Oberflächenaktivität der Narkotica, die mit der Wirksamkeit parallel geht, und zu der im umgekehrten Verhältnis der Haftdruck der Stoffe an Wasser steht. Nach Traube¹⁾ begünstigt das Bestreben die Grenzflächenspannung zu vermindern, die Aggregierung der Teilchen und die Verringerung der Löslichkeit derselben. Der Zustand der Oberfläche aber, an die die Anreicherung capillaraktiver Stoffe erfolgt, ist, soweit es sich um Zellen handelt, stets ein kolloidaler. Auch das Haupt-

¹⁾ I. Traube, diese Zeitschr. 54, 305. 1913.

lipoid in den Zellen, das Lecithin, ist ein Kolloid. Die kolloidchemische Seite der Frage der Narkose ist damit in den Vordergrund gerückt, und man kann daher, worauf Höber¹⁾ hinwies, von einer Kolloidtheorie der Narkose sprechen. Er definiert die Narkose als Hemmung gewisser Kolloidzustandsänderungen, die mit der Erregung einhergehen. Welche Erscheinungen gehen aber mit der Erregung einher? Nach dem Nernstschen Erregungsgesetz ist sie abhängig von Potentialdifferenzen, die ihren Sitz an den Membranen der Zelle haben und die bei Durchleitung eines Stromes erzeugt werden als Folge von Änderungen der Salzkonzentrationen. Andererseits können Veränderungen der Salzkonzentrationen selbst die Veranlassung zur Entstehung von Strömen werden, die mit der natürlichen Erregung in Zusammenhang stehen. Auf diese Weise entstandene elektrische Spannungsunterschiede können nach der Membrantheorie auch an der Oberfläche der ruhenden Zelle vorhanden sein. Soll also die Narkose die Erregungsvorgänge in der Zelle verhindern, so muß sie imstande sein auf die Ionenkonzentrationen und damit auf die elektrischen Verhältnisse der Zelle einzuwirken.

J. Loeb und R. Beutner²⁾ fanden denn auch, daß durch den Zusatz verschiedener Anaesthetica wie Alkohol und Äther zu einer wässrigen Lösung die Potentialdifferenz an der Grenzfläche von lebenden Zellen herabgesetzt wird. Diese Beeinflussung der elektromotorischen Kraft ist eine reversible. Allerdings liegen die zur Verwendung gekommenen Konzentrationen höher als die für die Narkose erforderlichen. Auch F. Verzar³⁾ findet durch Narkotica eine Abnahme der Polarisierbarkeit am narkotisierten Nerven.

Man kann nicht nur durch derartige elektrometrische Untersuchungen, sondern auch auf anderem Wege zu dem Nachweis gelangen, daß die Narkotica für die elektrischen Verhältnisse der Zelle von wesentlichem Einfluße sind. Aus der bekannten Fähigkeit der Alkohole Eiweiß zu fällen wird uns die Wirkung erkennbar, die oberflächenaktive Stoffe auf die Verminderung der Dispersität von Kolloiden haben.

Nach Versuchen von Batelli und Stern⁴⁾ geht dieser Fällung durch die Narkotica, die die Autoren besonders an Nucleoproteiden beobachtet

¹⁾ R. Höber, Arch. f. d. ges. Physiol. 120, 492. 1907 und Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. Leipzig und Berlin 1914.

²⁾ J. Loeb und R. Beutner, diese Zeitschr. 51, 288. 1913.

³⁾ F. Verzar, diese Zeitschr. 107, 98. 1920.

⁴⁾ F. Batelli und S. Stern, diese Zeitschr. 52, 226. 1913.

haben, ein Einfluß auf fermentative Prozesse parallel im Sinne einer Hemmung der Fermentwirkung, die von ihnen weniger als Lipoidwirkung, denn als Wirkung auf die unlöslichen Proteinkörper aufgefaßt wurde. Zu gleichen Versuchsergebnissen gelangten auch Warburg und Wiesel¹⁾. Mit Verwendung derselben Konzentrationen capillaraktiver Stoffe, wie sie die erwähnten Autoren benutzt haben, fanden Fühner und Neubauer²⁾ das Auftreten von Hämolyse von Rinderblutkörperchen, die in einer physiologischen Kochsalzlösung mit Zusatz der betreffenden Narkotica suspendiert waren. Nach Michaelis und Rona³⁾ liegt aber das Flockungsoptimum vieler Eiweißkörper z. B. auch der Nucleoproteide im isoelektrischen Punkt. Auch die Hämolyse der roten Blutkörperchen erfolgt nach Michaelis und Takahashi⁴⁾ dadurch, daß bei isoelektrischer Reaktion die Plasmahautkolloide eine starke Flockungstendenz zeigen und dadurch den Austritt des Hämoglobins ermöglichen. Die Neigung zum Ausfallen erklärt Freundlich durch den Verlust der abstoßenden Kraft, die in der gleichen Potentialdifferenz der einzelnen Teilchen liegt und die die Aneinanderlagerung derselben verhindert.

Also auch nach diesen Versuchen kommt den Narkotica die Fähigkeit zu, auf die Ladung von Kolloiden einzuwirken. Allerdings liegen die Konzentrationen, in denen diese Wirkung erzielt wurde, bedeutend höher als die Grenzkonzentration der narkotischen Wirksamkeit. Winterstein⁵⁾ betont deshalb, daß diese Wirkung zur Erklärung der Narkose nicht herangezogen werden dürfte.

In den von uns ausgeführten Versuchen über die Wirkung oberflächenaktiver Stoffe auf die kolloidale Ladung haben wir daher durchweg Konzentrationen verwendet, die unterhalb dieser toxisch wirksamen liegen.

Die Versuchsanordnung war folgende: Es wurde menschliches Blut durch Venenpunktion entnommen und durch Defibrinieren ungerinnbar gemacht, hierauf zentrifugiert und das Serum abpipettiert. Mit physiologischer Kochsalzlösung, der die Narkotica in der jeweils gewünschten Konzentration zugesetzt waren, wurde das Blut mehrmals gewaschen und damit auch der Rest von Serum entfernt. Ein Verflüchtigen der Narkotica wurde durch sorgfältiges Verschließen der Gläser zu verhindern gesucht. Das so vorbehandelte Blut wurde dann mit CO₂ titriert

¹⁾ O. Warburg und Wiesel, Arch. f. d. ges. Physiol. 144, 465. 1912.

²⁾ H. Fühner und E. Neubauer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 56, 333. 1907.

³⁾ Michaelis und Rona, diese Zeitschr. 27, 38. 1910 und 28, 193. 1910.

⁴⁾ Michaelis und Takahashi, diese Zeitschr. 29, 439. 1910.

⁵⁾ H. Winterstein, Die Narkose. Berlin 1919.

und dadurch, wie in den Versuchen von Straub und Meier¹⁾, eine Kohlensäurebindungskurve gewonnen. Geprüft wurde die Wirkung von Methylurethan, Äthylurethan und Äthylalkohol.

Werden die Blutkörperchen in reiner physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, so steigt die Kurve erst in flachem Bogen an, bis die Wasserstoffzahl $p_H = 6,67$ erreicht ist. In diesem Punkt sind die Plasmahautkolloide völlig entladen und es erfolgt eine plötzliche Mehraufnahme von CO_2 und zwar pro Mol-Hämoglobin ein Mol- CO_2 , eine Mehraufnahme, die sich in der Kohlensäurebindungskurve in einem Knick äußert. Ist diese Bindung erfolgt, dann wird nur mehr so viel CO_2 noch aufgenommen, als dem physikalischen Absorptionsvermögen entspricht. Die Kurve verläuft dann in einer leicht ansteigenden geraden Linie. Durch Zusatz verschiedener Kationen wird eine Verschiebung der Entladung gefunden, die in hohem Grade abhängig ist von der Art der Kationen und der verwendeten Konzentration. In Versuchen mit Alkalien bekamen Straub und Meier²⁾ das Auftreten der Entladung bei einer geringeren Wasserstoffzahl, also eine Verschiebung des Knicks nach der basischen Seite. Bei dem Zusatz von Erdalkalien³⁾ erhielten sie in schwächeren Konzentrationen eine gleichsinnige Wirkung wie bei den Alkalien, wenn auch in geringerem Maße, und mit steigender Konzentration eine antagonistische Wirkung mit Verschiebung des Knicks nach der Seite der höheren Wasserstoffionenkonzentration.

I. Methylurethan.

Setzt man zu der physiologischen Kochsalzlösung, die zum Waschen verwendet wird, ganz kleine Mengen von Methylurethan (Merck), so beobachtet man keine Abweichung vom gewöhnlichen Verlauf der Bindungskurve. Es tritt also bei einer 0,00004 molaren Lösung der Knick auf bei der Wasserstoffzahl $p_H = 6,67; 6,68; 6,69; 6,65$. Diese Konzentration erweist sich also als unwirksam. Bei Überschreitung einer bestimmten Mindestkonzentration, gewissermaßen eines „Schwellenwertes“, wird eine Beeinflussung der Entladung nachweisbar. Bei Zusatz von 0,0001 Mol-Methylurethan tritt der Knick auf bei $p_H = 6,79; 6,74; 6,77; 6,74; 6,77$. Ungefähr dieselbe Lage des Knickes zeigt die 0,001 molare Lösung bei $p_H = 6,75; 6,75$. Mit dem weiteren Ansteigen der Konzentration auf 0,01 Mol erscheint der Knick noch früher: bei $p_H = 6,90$. Bei der Konzentration 0,02 Mol und

¹⁾ H. Straub und Kl. Meier, diese Zeitschr. **89**, 156. 1918.

²⁾ H. Straub und Kl. Meier, diese Zeitschr. **98**, 228. 1919.

³⁾ H. Straub und Kl. Meier, diese Zeitschr. **109**, 47. 1920.

0,03 Mol wird die maximale Linksverschiebung erreicht mit der Wasserstoffzahl $p_H = 6,95; 6,96$ bzw. $6,94; 6,92; 6,96; 6,97$. Eine weitere Zunahme der Konzentration des Methylurethans in der Waschflüssigkeit ist nicht mehr imstande, die Entladung noch mehr zu begünstigen. Sie hat

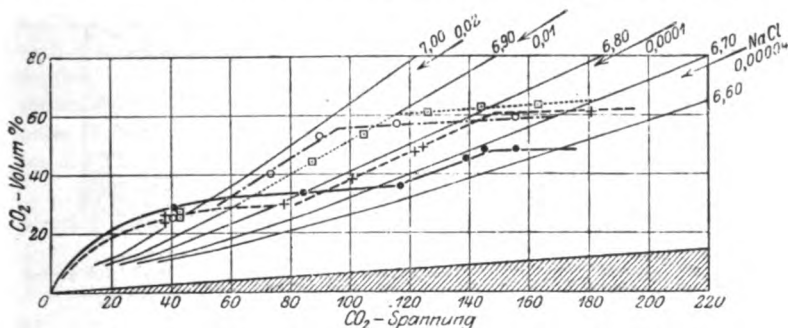


Abb. 1. Kohlensäurebindungskurven von Blutkörperchensuspensionen in physiologischer Kochsalzlösung mit Zusatz von Methylurethan. Abszisse: Partialdruck der Kohlensäure in mm Hg. Ordinate: Kohlensäurekapazität in Volumprozenten. Schraffiertes Dreieck am Unterrande: physikalisch absorbierte Kohlensäure. Die von der linken unteren Ecke ausgehenden Kurven verbinden Punkte gleicher Wasserstoffzahl.

- — — — ● Tabellen Nr. 1. Methylurethan 0,00004 Mol.
- + — — — + Tabellen Nr. 2. Methylurethan 0,0001 Mol.
- ····· □ Tabellen Nr. 4. Methylurethan 0,01 Mol.
- — — — ○ Tabellen Nr. 5. Methylurethan 0,02 Mol.

vielmehr zur Folge, daß der Knick wieder in geringem Maße nach rechts verlagert wird. Er tritt bei einer 0,04 molaren Lösung auf bei $p_H = 6,82, 6,81; 6,81$. Noch größere Konzentrationen zeigen sich wieder ohne Einfluß auf die Lage des Knickes. In vier Versuchen mit 0,2; 0,3; 0,4 und 0,6 molarer Lösung tritt er bei $p_H = 6,67$ auf. Der Verlauf der Kurven ist zu ersehen aus der beigegebenen Abb. 1. Vgl. die Versuchsprotokolle in Tabelle I—XII.

II. Äthylurethan.

Bei dem Zusatz von 0,00004 Mol-Äthylurethan (Merck) zu der Waschflüssigkeit fanden wir diese Konzentration ebenso wie bei Methylurethan unwirksam. Der erhaltene Knick ist wieder der Kochsalzknick bei $p_H = 6,65; 6,64$. Steigerung der zugesetzten Menge von Narkoticum auf 0,0001 Mol ruft die Entladung bei $p_H = 6,70; 6,71; 6,69; 6,69$ hervor, also eine weniger starke Wirkung wie dieselbe Konzentration von Methylurethan. Eine 0,0002 molare Äthylurethanlösung verschiebt den Knick bis zu $p_H = 6,89; 6,89; 6,90$. Mit der Konzentration von 0,01 Mol wird die maximale Linksverschiebung erreicht bei $p_H = 6,89; 6,92; 6,90$. Weiteres Ansteigen der Konzentration führt zu einer analogen Erscheinung wie beim Methylurethan: der Knick in der Kurve zeigt sich wieder bei einer höheren Wasserstoffionenkonzentration; bei einer 0,03 molaren Lösung tritt er auf bei $p_H = 6,76; 6,77; 6,78; 6,78$. In einem weiteren Versuch mit Verwendung einer 0,2 molaren Lösung lagen die entsprechen-

den Werte bei $p_H = 6,77; 6,77; 6,80$. Die Konzentration 0,5 Mol läßt den Knick wieder unbeeinflußt: $p_H = 6,67; 6,68; 6,66; 6,67$. Dasselbe Ergebnis

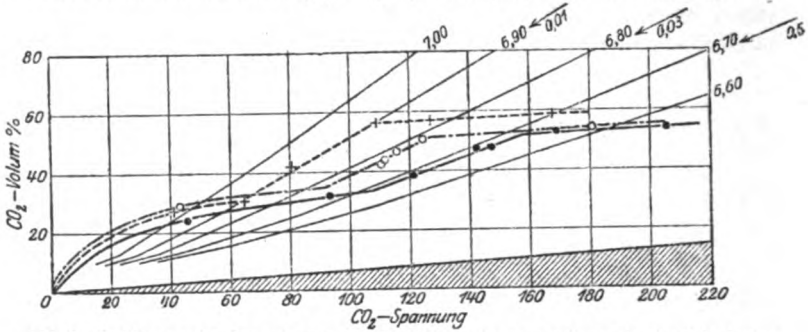


Abb. 2. Kohlensäurebindungskurven von Blutkörperchensuspensionen in physiologischer Kochsalzlösung mit Zusatz von Äthylurethan. Erklärung wie Abb. 1.

- + - - - + Tabellen Nr. 17. Äthylurethan 0,01 Mol.
- o - - - o Tabellen Nr. 18. Äthylurethan 0,08 Mol.
- - - - • Tabellen Nr. 20. Äthylurethan 0,5 Mol.

hat die Verwendung einer 0,8 molaren Lösung: $p_H = 6,65; 6,66; 6,65$ Vgl. den Verlauf der betreffenden Kurven in Abb. 2 und die Versuchsprotokolle in den Tabellen XII—XXI.

III. Äthylalkohol.

Der verwendete Äthylalkohol hatte 96,33 Gewichtsprozent. Sein spez. Gewicht war 0,8047. In einer Konzentration von 0,00035 Mol war

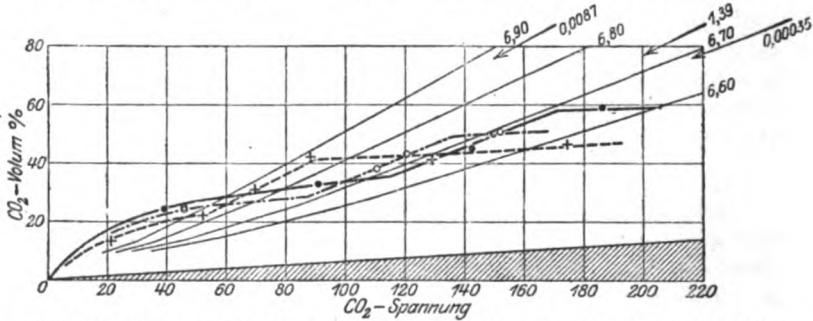


Abb. 3. Kohlensäurebindungskurven von Blutkörperchensuspensionen in physiologischer Kochsalzlösung mit Zusatz von Äthylalkohol. Erklärung wie Abb. 1.

- - - - • Tabellen Nr. 22. Äthylalkohol 0,00085 Mol.
- + - - - + Tabellen Nr. 25. Äthylalkohol 0,0087 Mol.
- o - - - o Tabellen Nr. 31. Äthylalkohol 1,39 Mol.

er wieder unwirksam. Der Knick trat also auf bei $p_H = 6,67; 6,67; 6,65$. In weiteren Versuchsreihen wurde mit Steigerung der Konzentration der Knick wieder nach links verschoben. Bei einer 0,00087 molaren Lösung erfolgte die Entladung bei $p_H = 6,72; 6,82; 6,79; 6,79$. Eine 0,0017 molare Lösung zeigte stärkere Wirksamkeit: Knick bei $p_H = 6,80$. Zwei weitere

Konzentrationen von 0,0087 Mol und 0,017 Mol bedingten den Knick bei $p_{\text{H}} = 6,85$; 6,85; 6,88 bzw. 6,85; 6,84; 6,85. Dies ist die maximale Beeinflussung der Entladung, die wir vom Äthylalkohol erhielten. Mit Zunahme der Konzentration nimmt die Wirkung wieder ab. Die Konzentrationen 0,087 Mol, 0,52 Mol und 0,87 Mol wiesen keine Verschiedenheit der Wirkung auf. Der Knick trat auf bei $p_{\text{H}} = 6,81$. In einem Versuch mit noch größerer Alkoholmenge, nämlich einer 1,39 molaren Lösung ergaben die im Knick liegenden Punkte die Werte $p_{\text{H}} = 6,72$; 6,73. Konzentrationen von 1,74 und 2,62 Mol blieben wieder auf die Lage des Knickes ohne Einfluß. Er lag bei $p_{\text{H}} = 6,87$. Siehe Abb. 3 und Tabellen XXI bis XXXII.

Wir haben also bei den von uns verwendeten Narkotica, dem Methylurethan, Äthylurethan und Äthylalkohol eine gleichsinnige Beeinflussung der Entladung der Plasmahautkolloide bei der Titration mit Kohlensäure gefunden. Sie wirken begünstigend auf die Entladung in mittleren Konzentrationen, während ganz kleine und ganz große Dosen unwirksam bleiben. Außerhalb der Breite der wirksamen Konzentrationen erhielten wir den Knick bei derselben Wasserstoffzahl, bei der wir ihn beim Waschen der Blutkörperchen mit physiologischer Kochsalzlösung bekommen, ohne irgendwelchen Zusatz. Die maximal wirksamen Dosen sind bei den verschiedenen Narkotica verschieden, nämlich: bei dem Methylurethan eine 0,02 molare Lösung, beim Äthylurethan 0,01 Mol und beim Äthylalkohol 0,017 Mol. Außerdem geht auch die maximale Verschiebung des Knicks bei den einzelnen Stoffen nicht gleich weit; beim Methylurethan bis $p_{\text{H}} = 6,95$, beim Äthylurethan bis $p_{\text{H}} = 6,90$ und beim Äthylalkohol bis $p_{\text{H}} = 6,85$. Da wir allerdings an den entscheidenden Punkten keine kleineren Abstufungen der Konzentration als 0,01 Mol durchgeprüft haben, so besteht die Möglichkeit, daß die maximal wirksame Konzentration sich noch um Bruchteile von 0,01 und damit auch der Knick sich um einen entsprechenden Betrag verschieben würde. Die von uns verwendeten Konzentrationen fallen mit denen zusammen, die von Fühner und anderen Autoren als narkotische bezeichnet werden. Allerdings sind die Dosen der maximalen Wirkung bei uns durchwegs etwas kleiner als die bei diesen Autoren angegebenen Werte. Es mag dies darauf zurückzuführen sein, daß unsere physikalische Methode mit Prüfung der Kohlensäurebindung vor der biologischen mit Beobachtung der Zellfunktion, die bei den erwähnten Arbeiten angewandt wurde, den Vorzug einer größeren Empfindlichkeit

des Maßstabes voraus hat. Andererseits fehlt bei uns die Kontrolle der narkotischen Wirkung durch diese Beobachtung der Funktionsstörung. Wir können aber einen Rückschluß darauf durch die Analogie mit den Ergebnissen jener Arbeiten ziehen, denn die von uns verwendeten Konzentrationen entsprechen im allgemeinen den dort als wirksam befundenen.

Es besteht indes noch die Schwierigkeit, den Mechanismus der Wirkung zu erklären. An der Spitze steht die Frage, wie capillaraktive Stoffe überhaupt auf die Ladung von Kolloiden einzuwirken vermögen.

Nach Freundlich und Rona¹⁾ kann diese Beeinflussung nur eine indirekte sein. Sie wäre denkbar auf zweierlei Weise. Entweder könnte durch die Narkotica eine Verdrängung von Elektrolyten aus der Oberfläche stattfinden. Es würden also Ionen, die geeignet sind, die Entladung der Zelle zu begünstigen, abgedrängt werden. Die Folge davon müßte aber eine Verzögerung oder Verhinderung der Entladung sein. Diese Möglichkeit haben Freundlich und Rona daher selbst schon abgelehnt. Oder aber die Narkotica entfalten einen Wirkungsmechanismus, den Freundlich und Rona als Sensibilisierung bezeichnet haben. Ihre Vorstellung darüber geht von der von Wo. Ostwald geäußerten Tatsache aus, daß die Nichtelektrolyte die Dielektrizitätskonstante eines Dispersionsmittels verändern können. Die Dielektrizitätskonstante der Narkotica ist bedeutend kleiner als die des Wassers. Werden nun aber diese Stoffe in eine Oberfläche aufgenommen, so müssen sie die Dielektrizitätskonstante derselben herabsetzen. Mit dieser Verringerung der Dielektrizitätskonstante nimmt die Kapazität und damit die Ladung der Kolloide ab. Die Entladung, die erst durch andere noch in der Lösung vorhandene Ionen erfolgt, muß dadurch begünstigt werden. In gleicher Weise wie Freundlich und Rona erklärt auch Labes²⁾ die Wirkung der Nichtelektrolyte auf die Ladung der Kolloide durch Sensibilisierung. Er fand bei seinen Versuchen über die Flockung von denaturiertem Eiweiß in Gegenwart von Narkotica keine Verschiebung, sondern eine Verbreiterung der Flockungszone. Diese Verbreiterung soll mit steigender Konzentration zunehmen.

Gegen die Auffassung einer sensibilisierenden Wirkung der Narkotica sprechen unsere Versuche. Wir fanden ja, daß das die Entladung begünstigende Prinzip nur bis zu einer gewissen Konzentration zunimmt. Nach Überschreiten dieser optimalen Konzentration nimmt dieses Prinzip an Wirksamkeit wieder ab, bis es schließlich seinen Einfluß völlig verliert. Von einer Sensibilisierung im Sinne von Freundlich und Rona kann also

¹⁾ Freundlich und Rona, diese Zeitschr. 81, 87. 1917.

²⁾ R. Labes, Arch. f. d. ges. Physiol. 186, 98. 1921.

hier nicht die Rede sein, denn diese müßte mit steigender Konzentration zunehmen. Ebenso konnte die von Laubes angegebene Verbreiterung der Zone, in der die Kolloide keine Ladung zeigen, in unseren Versuchen nicht festgestellt werden. Sie müßte darin zum Ausdruck kommen, daß unser Knick verschiedene Linien gleicher Wasserstoffzahl schneidet. Das trifft aber nicht zu. Die im Knick liegenden Werte folgen vielmehr genau der Linie einer Wasserstoffzahl. Unsere Auffassung wird auch unterstützt durch Versuche von Kruyt und van Duin¹⁾. Sie untersuchten in Gegenwart von Nichtelektrolyten (Amylalkohol und Phenol) die koagulierende Wirkung verschiedener Kationen auf das As_2S_3 -Sol. Dabei fanden sie daß bei Anwesenheit jener Stoffe der Fällungswert von ein- und dreiwertigen Kationen erniedrigt, der von zwei- und vierwertigen erhöht wurde. Auch wir haben bei den Narkotica eine gleichsinnige Beeinflussung der Entladung von hydrophilen Kolloiden gefunden, wie sie Straub und Meier bei den ein- und dreiwertigen²⁾ Kationen beobachtet haben und eine der Wirkung der zweiwertigen antagonistische. Diesen Parallelismus zwischen der Wirkung eines Narkoticums und der eines Elementes der Alkaligruppe fand auch Zondek³⁾ in Versuchen am Froschherzen mit Verwendung von Kalium und Chloralhydrat. Nach seinen Untersuchungen können die Kaliumionen den Einfluß des Chloralhydrates verstärken. Der erwähnte Antagonismus zu den Erdalkalien geht auch aus den Arbeiten von Höber und Gordon⁴⁾ hervor, die zeigten, daß die fällende Wirkung der Barium- und Calciumsalze auf Lecithin durch Narkotica gehemmt werden kann. Dagegen sollen nach anderen Autoren die Calciumsalze in kleinen Dosen ähnliche Wirkung haben wie die Narkotica. Auch Straub und Meier haben bei kleinen Konzentrationen der Erdalkalien zunächst eine Begünstigung der Entladung gefunden. Die Wirkung der Erdalkalien in kleinen Dosen und der Narkotica kann also auch nach diesen Versuchen als gleichartig betrachtet werden.

Die Erklärung dafür, wie die Narkotica auf die Ladungs-

¹⁾ Kruyt und van Duin, zit. nach Freundlich und Rona.

²⁾ H. Straub und Kl. Meier, diese Zeitschr. 111, 45. 1920.

³⁾ Zondek, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 87, 342. 1920.

⁴⁾ R. Höber und Gordon, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 5, 432.

verhältnisse der Kolloide einzuwirken vermögen, ist also noch eine unbefriedigende. Auch unsere bisherigen Versuche vermögen noch keine Klarheit zu geben.

Zusammenfassung.

Der Zusatz von Narkotica zu der physiologischen Kochsalzlösung, in der rote Blutkörperchen suspendiert sind, führt zu einer Begünstigung der Entladung der Plasmahautkolloide der Blutkörperchen. Dies wird nachgewiesen aus der Kohlensäurebindungskurve, die durch Titration mit Kohlensäure gewonnen wird.

Bei Verwendung reiner physiologischer Kochsalzlösung erfolgt die Entladung bei $p_H = 6,67$. Der Zusatz von Methylurethan hat in optimaler Konzentration eine Verschiebung der Entladung bis $p_H = 6,95$ zur Folge, bei Äthylurethan bis $p_H = 6,90$, bei Äthylalkohol bis $p_H = 6,85$.

Diese Wirkung tritt auf in denselben Konzentrationen, wie sie für das Zustandekommen einer narkotischen Wirkung erforderlich sind.

Versuchsprotokolle.

I. Methylurethan.

1. Abb. 1. Kurve 1. Punkte, ausgezogene Kurve.

Methylurethan 0,00004 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.						
CO ₂ -Spannung	40,2	84,2	138,9	144,9	155,8	155,8
CO ₂ -Kapazität	26,2	33,9	36,1	46,0	49,2	48,1
	29,6					
p_H	7,06	6,80	6,67	6,68	6,69	6,65
			Knick			

2. Abb. 2. Kurve 2; stehende Kreuze, gestrichelte Kurve.

Methylurethan 0,0001 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.						
CO ₂ -Spannung	38,0	77,8	100,0	122,4	124,4	180,2
CO ₂ -Kapazität	24,8	30,8	39,8	47,8	49,1	60,8
	26,2			45,1		
p_H	7,05	6,80	6,79	6,77	6,77	6,67
	7,08			6,74		
			Knick			

3. Methylurethan 0,001 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung		54,3	91,0	134,0	162,0	
CO ₂ -Kapazität		28,7	34,1	51,1	52,9	
		33,1			48,8	
p_H		6,95	6,76	6,75	6,67	
		6,71	Knick		6,64	

4. Abb. 1. Kurve 3. Quadrate, punktierte Kurve.

Methylurethan 0,01 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	42,1	87,5	104,6	126,2	144,9	163,0
CO ₂ -Kapazität	25,7	44,7	53,5	61,6	63,9	63,2
	27,1				59,5	
<i>p_H</i>	7,02	6,90	6,90	6,87	6,81	6,76
	7,05	Knick			6,78	

5. Abb. 1. Kurve 4. Ringe, ausgezogene Kurve mit Punkten.

Methylurethan 0,02 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	40,8	73,7	90,9	116,4	155,9
CO ₂ -Kapazität	25,5	40,0	53,2	57,5	59,1
	21,7				
<i>p_H</i>	7,04	6,95	6,95	6,88	6,74
	6,97	Knick			

6. Methylurethan 0,03 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	61,9	69,7	74,2	135,5	158,1
CO ₂ -Kapazität	32,7	35,8	42,4	43,9	47,3
			43,4		
<i>p_H</i>	6,94	6,92	6,92	6,88	6,83
		Knick			6,87

7. Methylurethan 0,04 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	31,9	73,0	95,2	106,0	198,8
CO ₂ -Kapazität	21,8	30,4	39,0	45,8	64,2
	22,5				
<i>p_H</i>	7,09	6,82	6,81	6,81	6,87
	7,10	Knick			

8. Methylurethan 0,2 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung .	16,9	40,1	85,0	114,0	160,5	166,1	221,0
CO ₂ -Kapazität .	18,1	27,1	33,4	37,8	40,6	42,3	47,2
	19,5		30,0	36,3		42,5	
<i>p_H</i>	7,31	7,06	6,79	6,69	6,54	6,55	6,44
	7,33		6,74	6,67		6,55	
				Knick.			

9. Methylurethan 0,3 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung .	29,2	82,0	104,9	120,2	122,4	144,5	186,7
CO ₂ -Kapazität .	15,3	29,8	32,1	36,6	36,9	41,2	44,1
	13,9						43,0
<i>p_H</i>	6,97	6,76	6,66	6,65	6,64	6,61	6,50
	6,92		Knick.				6,49

10. Methylurethan 0,4 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.						
CO ₂ -Spannung	66,1	88,0	122,6	146,5	154,5	196,6
CO ₂ -Kapazität	28,9	34,8	39,3	45,3	45,5	51,1
	30,4		39,2	47,2	44,9	48,7
<i>p_H</i>	6,84	6,79	6,67	6,63	6,62	6,54
	6,78		6,67	6,67	6,61	6,52
Knick.						
11. Methylurethan 0,4 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.						
CO ₂ -Spannung	19,2	67,4	122,0	134,8		171,3
CO ₂ -Kapazität	14,6	26,8	36,3	41,4		41,8
	14,3		33,1	44,1		
<i>p_H</i>	7,16	6,81	6,64	6,63		6,51
	7,15		6,60	6,68		
Knick.						
12. Methylurethan 0,6 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.						
CO ₂ -Spannung	29,4	99,0	132,6	149,6		172,7
CO ₂ -Kapazität	28,8	40,5	45,2	50,6		53,0
			41,9			
<i>p_H</i>	7,24	6,80	6,70	6,69		6,64
			6,67			
Knick.						
II. Äthylurethan.						
13. Äthylurethan 0,00004 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.						
CO ₂ -Spannung	41,7	98,6	145,4	152,1		231,9
CO ₂ -Kapazität	29,3	37,7	44,5	45,9		65,5
			44,6			
<i>p_H</i>	7,08	6,77	6,65	6,64		6,58
			6,65			
Knick.						
14. Äthylurethan 0,0001 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.						
CO ₂ -Spannung	43,1	78,1	111,5	136,5		144,6
CO ₂ -Kapazität	27,7	35,0	37,7	47,8		48,9
	26,4	31,3		45,0		
<i>p_H</i>	7,04	6,85	6,70	6,71		6,69
	7,02	6,80		6,69		
Knick.						
15. Äthylurethan 0,0002 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.						
CO ₂ -Spannung	18,5	57,1	88,3	125,4		187,3
CO ₂ -Kapazität	19,3	26,3	45,0	51,4		50,9
			44,2			
<i>p_H</i>	7,28	6,89	6,89	6,97		6,57
			6,90			
Knick.						

16. Äthylurethan 0,001 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	30,0	63,1	75,7	87,5	142,2
CO ₂ -Kapazität	21,8	28,4	35,9	42,1	57,0
	19,5				
<i>p_H</i>	7,11	6,88	6,89	6,89	6,77
	7,06	Knick.			

17. Abb. 2. Kurve 1. Kreuze, gestrichelte Kurve.

Äthylurethan 0,01 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	41,2	64,6	80,2	109,5	127,1	167,5
CO ₂ -Kapazität	27,2	30,4	41,9	56,1	57,0	58,6
<i>p_H</i>	7,06	6,89	6,92	6,90	6,83	6,70
		Knick.				

18. Abb. 2. Kurve 2. Ringe, ausgezogene Kurve mit Punkten.

Äthylurethan 0,03 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	43,5	110,6	11,5	116,3	124,7	180,1
CO ₂ -Kapazität	28,7	42,2	43,5	46,7	50,5	53,7
<i>p_H</i>	7,06	6,76	6,77	6,78	6,78	6,62
		Knick.				

19. Äthylurethan 0,2 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	40,8	75,5	100,0	120,1	142,0	204,4
CO ₂ -Kapazität	24,3	32,5	41,0	47,0	53,6	55,7
		38,3				
<i>p_H</i>	7,01	6,84	6,80	6,77	6,74	6,58
			6,77	Knick.		

20. Abb. 2. Kurve 3. Punkte, ausgezogene Kurve.

Äthylurethan 0,5 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	45,9	93,3	120,6	141,8	147,7	168,6	215,1
CO ₂ -Kapazität	23,9	36,6	38,9	47,8	47,0	53,0	53,7
		32,0	36,0				
<i>p_H</i>	6,93	6,78	6,67	6,68	6,66	6,65	6,52
		6,73	6,64	Knick.			

21. Äthylurethan 0,8 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	41,7	90,2	120,6	140,0	180,6	
CO ₂ -Kapazität	23,0	34,2	36,8	42,9	51,0	
	23,8	34,3	35,1	41,9	47,0	
<i>p_H</i>	6,98	6,77	6,65	6,65	6,59	
		6,99	6,77	6,63	6,66	6,56
		Knick.				

III. Äthylalkohol.

22. Abb. 3. Kurve 1. Punkte, ausgezogene Kurve.

Äthylalkohol 0,00035 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	39,7	90,7	142,2	159,4	186,3
CO ₂ -Kapazität	24,8	33,8	45,7	51,7	59,7
				52,3	
p _H	6,94	6,77	6,67	6,67	6,65
				6,67	

Knick.

23. Äthylalkohol 0,00087 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	42,9	82,3	96,2	116,3	201,2
CO ₂ -Kapazität	19,3	30,0	41,0	48,0	58,0
				47,3	
p _H	6,87	6,76	6,82	6,79	6,66
				6,79	

Knick.

24. Äthylalkohol 0,0017 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	31,1	58,0	85,9	110,8	185,8
CO ₂ -Kapazität	13,9	23,3	31,0	33,4	41,0
		17,5			42,2
p _H	6,89	6,80	6,85	6,65	6,47
	6,98				6,49

Knick.

25. Abb. 3. Kurve 2. Kreuze, gestrichelte Kurve.

Äthylalkohol 0,0087 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	22,3	52,3	69,4	88,2	129,7	174,8
CO ₂ -Kapazität	13,2	22,1	31,1	42,4	41,4	49,6
						46,8
p _H	7,04	6,85	6,85	6,68	6,67	6,59
						6,57

Knick.

26. Äthylalkohol 0,017 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	44,8	67,0	89,3	103,1	130,0	197,8
CO ₂ -Kapazität	26,8	29,2	39,0	47,1	42,4	55,4
		25,5				50,8
p _H	7,01	6,85	6,84	6,85	6,68	6,58
	6,99					6,54

Knick.

27. Äthylalkohol 0,087 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	41,2	69,1	100,4	127,3	164,9	208,1
CO ₂ -Kapazität	17,4	27,5	35,7	38,9	42,2	48,8
		21,2			43,4	
p _H	6,86	6,81	6,74	6,65	6,65	6,49
	6,95					6,57

Knick.

28. Äthylalkohol 0,52 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	33,0	56,1	83,6	102,7	134,7	223,3
CO ₂ -Kapazität	22,9	32,5	35,8	42,0	45,0	55,4
	21,7		32,2			
p _H	7,09	6,99	6,83	6,80	6,89	6,52
	6,07		6,79			
			Knick.			

29. Äthylalkohol 0,52 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	39,1	85,3	95,5	109,3	169,2
CO ₂ -Kapazität	21,4	36,2	42,2	46,8	52,9
	20,4				
p _H	6,98	6,82	6,84	6,81	6,65
	6,96				
			Knick.		

30. Äthylalkohol 0,87 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	29,9	58,3	81,2	105,3	123,6	173,7
CO ₂ -Kapazität	17,6	25,9	33,2	38,8	38,0	45,1
p _H	7,02	6,87	6,81	6,75	6,66	6,55
			Knick.			

31. Abb. 3. Kurve 3. Ringe, ausgezogene Linie mit Punkten.

Äthylalkohol 1,39 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	46,0	111,5	120,5	152,8
CO ₂ -Kapazität	24,8	38,3	43,1	50,9
	23,5			
p _H	6,97	6,72	6,73	6,68
	6,94			
			Knick.	

32. Äthylalkohol 1,74 Mol NaCl 0,85% ad 100,0 ccm.

CO ₂ -Spannung	82,0	107,0	124,9	144,1	150,2	186,3
CO ₂ -Kapazität	30,9	27,3	37,4	43,8	47,0	57,3
	28,9		41,8		46,9	55,3
p _H	6,77	6,72	6,64	6,65	6,65	6,63
	6,74		6,69		6,65	6,61
			Knick.			

Studien über Oxydationskatalysen. II.

Von

L. Karczag.

(Aus der III. Medizinischen Klinik der Kgl. Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 6. April 1921.)

Wir haben in unserer ersten Mitteilung¹⁾ die Haupteigenschaften des dreiwertigen Eisens als Katalysator kennengelernt und möchten nun über Versuche berichten, welche sich auf den zweiwertigen Ferrooxydator (FeSO_4) beziehen. — Es ließ sich mit Hilfe der Farbstoffmethode feststellen, daß sich der Ferrooxydator bez. seinen allgemeinen Eigenschaften ähnlich verhielt wie der Ferrioxydator, jedoch ließen die Versuche auch solche Eigenschaften erkennen, welche den Ferrooxydator von dem Ferrioxydator scharf unterscheiden.

Wie beim dreiwertigen Eisen konnten wir auch beim zweiwertigen feststellen, daß die Oxydation der Farbstoffe ohne Rücksicht auf chemische Konstitution und physikalisch-chemische Eigenschaften erfolgt, daß sie spontan ohne Rücksicht auf die chemische Reaktion des Milieus schon in der Kälte vor sich geht. — Was jedoch das zweiwertige Eisen vom dreiwertigen unterscheidet, ist vor allem die wesentliche Verkürzung der Entfärbungszeit.

Durch folgenden Versuch sollen diese Verhältnisse näher illustriert werden. Um große Differenzen beobachten zu können, haben wir diesmal konzentriertere 0,25 promill. Farbstofflösungen verwendet, im übrigen war die Versuchsanordnung dieselbe, wie wir dies im I. Teil unserer Mitteilung beschrieben haben. — Gleichzeitig haben wir als Kontrollen Versuche mit Ferrisulfat angestellt.

Kälteversuch, 2 ccm Farbstofflösung + 1 Tropfen Oxydator in 20 proz. Lösung + 2 Tropfen 20% H_2O_2 -Lösung.

¹⁾ L. Karczag, diese Zeitschr. 117, H. 1—2.

Farbstoff	FeSO_4	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$
	Entfärbungszeit	Entfärbungszeit
1. Krystallviolett . . .	sofort bis $\frac{1}{2}$ Min.	9 Min.
2. Lichtgrün		26 „
3. Pyromin		9 „
4. Fuchsin S.		7 „
5. Gentianaviolett . . .		13 „
6. Nilblau		14 „
7. Trypanrot		15 „
8. Malachitgrün		8 „
9. Methylenblau		17 „
10. Fuchsin	$1\frac{1}{2}$ Min.	30 „ noch gefärbt
11. Dahlia	$1\frac{1}{2}$ „	28 „
12. Fluorescein	2–3 „	4 „
13. Safranin	2–3 „	16 „
14. Azur II	4 „	19 „

Aus diesem Versuch ist ohne weiteres zu ersehen, daß die Entfärbungen in Gegenwart von Fe'' viel schneller ablaufen als in Gegenwart von Fe''' .

Als ein weiteres Unterscheidungsmerkmal des Ferrooxydators gegenüber dem Ferrioxydator wurde die Verlangsamung des Reaktionsverlaufes beim Reihenfolgenwechsel der einzelnen Komponenten gefunden. — Bringt man nämlich den Farbstoff vorher mit der Ferrosalzlösung in Berührung und fügt nachher H_2O_2 hinzu, so erfolgt die Entfärbung sehr schnell, bei Anwendung verdünnterer Farbstofflösungen sogar momentan. — Bringt man aber die Farbstofflösung zuerst mit Wasserstoff-superoxyd zusammen, und fügt nachher den Katalysator hinzu, oder mischt man vorher die Ferrosalzlösung mit H_2O_2 und gibt dieses Gemisch zu der Farbstofflösung, so erfolgen die Entfärbungen erheblich langsamer. Folgender Versuch zeigt uns klar die geschilderten Verhältnisse:

Kälteversuch: 2 ccm 0,25% Farbstofflösung, 1 Tropfen 20% FeSO_4 , 2 Tropfen 20% H_2O_2 .

Farbstoff	System:	System:
	Farbst. + Fe'' + H_2O_2	Farbst. + H_2O_2 + Fe''
	Entfärbungszeit	Entfärbungszeit
1. Krystallviolett	sofort bis $\frac{1}{2}$ Min.	$6\frac{1}{2}$ –7 Min.
2. Lichtgrün		13 „
3. Pyronin		3 „
4. Fuchsin S.		3 „
5. Gentianaviolett		5 „
6. Nilblau		5 „

Farbstoff	System:	
	Farbst. + Fe''-H ₂ O ₂ Entfärbungszeit	Farbst. + H ₂ O ₂ + Fe'' Entfärbungszeit
7. Trypanrot . . .		20 Min. noch gefärbt.
8. Malachgrün . . .		4 „ Niederschlag.
9. Methylenblau . . .		4 ¹ / ₂ „
10. Fuchsin	1-1 ¹ / ₂ Min.	20 „
11. Dahlia	1-1 ¹ / ₂ „	13 „ noch gefärbt.
12. Fluorescein	2-3 „	3 „ Niederschlag.
13. Safranin	2-3 „	6 ¹ / ₂ -7 „
14. Azur II	4 „	6 „

Ein so auffallendes Phänomen wie das zweiwertige Eisen zeigte keiner der untersuchten Oxydatoren wie Fe'', Cu, Mn, Co, Ni, Pt. — Selbst wenn diese Metallsalze zuerst mit der Farbstofflösung gekocht wurden, zeigten sich nach Abkühlen und Zugabe von H₂O₂ die charakteristischen „Momentreaktionen“ nicht.

In einer anderen Versuchsreihe wurde das Verhalten von Ferriammoniumsulfat und Ferroammoniumsulfat als Katalysatoren geprüft. Auch bei Anwendung dieser Salze zeigten sich die für die Ferroverbindungen charakteristischen oben bereits beschriebenen Phänomene.

Wenn man den Verlauf der Reaktionen mit Ferriverbindungen ins Auge faßt, so erkennt man, daß diese aus 2 Hauptphasen bestehen:

1. Zersetzung des H₂O₂ durch den Katalysator,
2. Verankerung des aktivierten Sauerstoffs mit dem Substrat, d. h. mit dem Farbstoff:

Verwendet man aber statt Ferri''- Ferroverbindungen als Katalysatoren, so verläuft neben den oben angegebenen beiden Hauptphasen noch eine dritte: Die Oxydation des zweiwertigen Eisens zum höherwertigen.

Demnach dürften beim Zusammenbringen des Systems: [Farbstoff + Fe''] + H₂O₂ folgende Hauptphasen nach- und nebeneinander verlaufen:

1. Komplexsalzbildung zwischen Fe''-Salz und Farbstoff,
2. Zersetzung des H₂O₂ durch Fe'',
3. Oxydation des Farbstoffes durch Verankerung des aktivierten Sauerstoffs,
4. Oxydation von Fe'' zu Fe'''.

Beim Zusammenbringen des Systems [H₂O₂ + Fe''] + Farbstoff dürften sich folgende Reaktionen abspielen:

1. Zersetzung von H_2O_2 ,
2. Oxydation von Fe'' zu Fe''' ,
3. Komplexsalzbildung zwischen Farbstoff und Fe'' , Fe''' ,
4. Oxydation des Farbstoffes.

Da die Entfärbungszeit beim Zusammenstellen des Systems [Farbstoff + H_2O_2] + Fe'' mit obigem [H_2O_2 + Fe''] + Farbstoff übereinstimmt, so ist es mit Recht anzunehmen, daß die Hauptphasen auch bei dieser Zusammenstellung ähnlich verlaufen. Bei den Systemen letzterer Art dominiert die Ferrisalz-
wirkung und dementsprechend ist auch die Entfärbungszeit wesentlich länger wie bei der Anwendung von Ferriverbindungen als Katalysator überhaupt. — Bei der Systemzusammenstellung [Farbstoff + Fe''] + H_2O_2 dominiert dagegen die Wirkung des Ferrooxydators, welche sich in den charakteristischen Momentreaktionen offenbart.

Es ist weiterhin sehr wahrscheinlich, daß die Oxydationen von Fe'' zu Fe''' durch große H_2O_2 -Konzentrationen begünstigt werden können, wie dies aus folgendem Versuch zu ersehen ist, bei dem durch Verminderung der H_2O_2 -Konzentration eine Beschleunigung des Reaktionsverlaufes erzielt werden konnte.

Im folgenden ist die Reaktionsdauer von einigen 0,01 proz. Farbstofflösungen mit 5 und 20 proz. H_2O_2 , bei einer Systemzusammenstellung von [Farbstoff + H_2O_2] + $FeSO_4$, nebeneinandergestellt:

	5 proz. H_2O_2	20 proz. H_2O_2
1. Dahlia	sofort	2 $\frac{1}{2}$ Minuten
2. Malachgrün	„	40 Sekunden
3. Mothylviolett	45 Sekunden	1' 20"
4. Fuchsin S.	26 „	1' 20"
5. Lichtgrün.	12 „	1' 5"
6. Neutralrot	10 „	1' 35"
7. Safranin	sofort	1' 48"
8. Fuchsin	7 Sekunden	2 Minuten
9. Methylenblau	15 „	2 „
10. Eosin	15 „	25 „

Auf Grund unserer Versuche können wir also über den Ferrooxydator zusammenfassend folgendes aussagen:

1. Ferrooxydator ist ein Kälteoxydator par excellence
- I. Ordnung.
2. Die Oxydationen werden erheblich schneller bewirkt als bei Anwendung von Ferrioxydator.
 3. Der Ferrooxydator besitzt die Fähigkeit, durch die einfache

Reihenfolgenänderung der Komponenten eine erhebliche Beschleunigung der Oxydationsgeschwindigkeit zu bewirken. Reaktionen, welche bei einer Systemzusammenstellung [Farbstoff + H_2O_2] + Fe'' oder [H_2O_2 + Fe''] + Farbstoff oft nur in mehreren Minuten vollständig werden, laufen bei einer Systemzusammenstellung [Farbstoff + Fe''] + H_2O_2 fast augenblicklich ab. Wir haben diese Reaktionen als „Momentreaktionen“ bezeichnet.

Über das Wesen der Momentreaktionen möchten wir nur kurz bemerken, daß diese nicht etwa auf Sensibilisierungserscheinungen zurückzuführen sind, sondern vielmehr als die spezielle Wirkung des Fe'' aufzufassen sind. Sie kommen besonders dort zum Vorschein, wo ihre Oxydation zum höherwertigen Eisen in den Hintergrund gedrängt wird. Auf die biologische Bedeutung dieser Erscheinungen werden wir in einer späteren Mitteilung zurückkommen.

Über den chemischen Grundprozeß der katalytischen Entfärbung der Farbstoffe haben wir bereits die Ansicht geäußert, daß dieser in einer Zerstörung des Farbstoffmoleküls infolge Überoxydation besteht. — Ich möchte an dieser Stelle einige Versuche anführen, welche meine obige Ansicht unterstützen. — Oxydiert man Aloin- oder Guajacölösung mit verdünnter Wasserstoffsuperoxyd und Kupfersulfat als Katalysator, so entstehen die bekannten roten bzw. blauen Farbstoffe. Setzt man nun einen Überschuß von H_2O_2 hinzu und unterhält weiter den Oxydationsprozeß, so werden die Farbstoffe vollkommen entfärbt.

Nimmt man die Oxydation mit fluoreszierenden Farbstoffen wie Pyronin, Fluorescein, Uranin, Eosin usw. vor, so werden sie unter Verlust ihrer Fluorescenz, als Zeichen der Zerstörung ihrer spezifisch gebauten Moleküle, entfärbt.

Eosin liefert bei energischer Oxydation aromatisch riechende Dämpfe, ebenfalls als ein Zeichen der Molekülzerstörung.

Phenolphthalein gibt nach der Oxydation mit H_2O_2 und Kupfer als Katalysator keine Farbsalze mit Alkalien.

Diese unter Zerfall des Moleküls verlaufenden Entfärbungen sind gar nicht verwunderlich, wenn wir diejenigen tiefgreifenden Veränderungen ins Auge fassen, welche organische Körper durch Einwirkung von H_2O_2 und Eisensalzen als Katalysatoren erleiden, wie dies bereits von Fenton, Sommer, Ruff, Neuberg usw. festgestellt wurde. Aber auch die technische Chemie lehrt uns

darüber, wie verschieden die Oxydationsmittel auf Farbstoffe einwirken können, daß bei der Darstellung der Farbstoffe die größte Vorsicht geboten ist, da sie bei „weitgetriebener Oxydation“ leicht zerstört werden können.

Wir möchten diese Vorgänge der katalytisch-oxydativen Molekülzerstörung der Farbstoffe deshalb hervorheben, weil wir damit eine Ansicht vertreten, welche vielleicht auch auf weiterem Gebiete ihre Geltung haben dürfte. So glaube ich, entgegen der herrschenden Auffassung, daß das Ausbleiben der bekannten Farbstoffreaktionen auf Oxydasen mit Guajactinktur, Aloin, Benzidin usw. und konz. H_2O_2 -Lösung auf eine Hemmung der Oxydasewirkung durch die hohe Wasserstoff-superoxydkonzentration zurückzuführen ist, die Ansicht zu vertreten, daß dieses auf einer katalytischen Zerstörung des Farbmoleküls infolge weitgetriebener Oxydation beruht.

In einer weiteren Serie von Versuchen haben wir die katalytischen Oxydationen von Farbstoffgemischen studiert, um so mehr, da wir in unseren bereits mitgeteilten Versuchen festgestellt haben, daß die Sauerstoffbeständigkeit der Farbstoffe eine recht verschiedene ist. Die Voraussetzung, daß in den Farbstoffgemischen zuerst der labilere Komponent zerstört wird und erst nachher die Oxydation der beständigeren einsetzt, hat sich nicht in jedem Falle bestätigt. Die Entfärbungen verlaufen oft ohne merklichen Übergang, und die Mischfarbe läßt nicht diejenige des beständigeren Komponenten zum Vorschein kommen. — Trotzdem haben wir Farbstoffkombinationen gefunden, welche die sukzessiv eintretenden Entfärbungen sehr schön erkennen lassen. Als Beispiele seien folgende Versuche angeführt:

1. Sukzessive Entfärbungen durch Fe^{+++} in der Kälte:

$FeCl_3$ 20%; H_2O_2 5%; Farbstofflösung 0,05%.

2 cm Dahliablau + 2 cm Säuregrün werden mit 1 Tropfen $FeCl_3$ und 2 Tropfen H_2O_2 versetzt und in der Kälte stengelassen. Die lila Mischfarbe schwindet allmählich, die Flüssigkeit färbt sich immer grüner, bis schließlich auch diese entfärbt wird.

2. $FeCl_3$ 20%; H_2O_2 20%; Farbstofflösung 0,05%.

Malachitgrün und Rubin werden zu gleichen Teilen (2—2 ccm) gemischt mit 1 Tropfen Katalysator und 2 Tropfen H_2O_2 versetzt. Die dunkellila Mischfarbe schwindet allmählich und die Flüssigkeit nimmt die rote Farbe des Rubins an, welche selbst bald entfärbt wird.

3. FeCl₃, 20%; H₂O₂, 20%; Farbstofflösung 0,01%.

Dahliablau und Fuchsin S zeigen die gleichen Veränderungen, indem bei Verlaufe der Oxydation die rote Farbe des Säurefuchsin zum Vorschein kommt, um schließlich gänzlich entfärbt zu werden.

Neben dieser Art der sukzessiven Entfärbungen in Farbstoffgemischen, welche auf die verschiedene Sauerstoffbeständigkeit der einzelnen Komponenten beruhen, haben wir noch eine zweite Art kennengelernt, welche durch die elektive Fähigkeit des angewandten Katalysators bedingt sind. Wir haben ja im Pt und Ni elektiv wirkende Katalysatoren kennengelernt, welche die Fähigkeit besitzen, gewisse Farbstoffe unter Entfärbung zu zerstören, wogegen andere selbst in der Siedehitze (fast) unberührt zu lassen. Diese Eigenschaft dieser Oxydatoren kommt auch in Farbstoffkombinationen zur Geltung. Als Beispiel sei folgender Versuch angeführt:

Platinchloridlösung 5%; H₂O₂, 20%.

Man mischt Malachitgrün und Fuchsin S zu je 2–2 ccm, gibt 1 Tropfen Platinchlorid und 2 Tropfen H₂O₂ hinzu und erhitzt zum Sieden. In einigen Sekunden geht die dunkellila Mischfarbe in die rote des Fuchsin S über.

Die Resultate unserer vorliegenden Mitteilung möchten wir in folgendem zusammenfassen.

Über die Natur des Ferrooxydaters wurde festgestellt, daß dieser als Kälteoxydator in die Gruppe der Oxydatoren I. Ordnung einzureihen ist, und daß sich dieser vom Ferrioxydator dadurch unterscheidet, daß die Oxydationen in seiner Gegenwart erheblich schneller bewirkt werden, wobei die Reihenfolge der zusammengebrachten Komponenten eine hervorragende Rolle spielt. — Bei der günstigen Systemzusammenstellung kommt die Wirkung des zweiwertigen Ferrooxydaters zum Vorschein, bei der ungünstigen dagegen auch diejenige, des durch Oxydation entstandenen Ferrioxydators.

Es wurden fernerhin Reagensglasversuche mitgeteilt, auf Grund deren wir als den chemischen Grundprozeß des Entfärbungsvorganges die katalytisch-oxydative Zerstörung des Farbstoffmoleküls betrachten. Schließlich wurden Versuche in vitro mitgeteilt, welche in Farbstoffgemischen ablaufen, und sowohl die verschiedene Sauerstoffbeständigkeit der einzelnen Komponenten wie die elektive Wirkung der Katalysatoren betreffen.

Zur Kenntnis der Bedingungen der biologischen Wirkung der Röntgenstrahlen.

I. Mitteilung

Von

Eugen Petry.

(Aus dem Zentralröntgeninstitut des Landeskrankenhauses Graz.)

(Eingegangen am 8. April 1921.)

Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß die Schädigung einzelner Zellgebiete durch die Röntgenstrahlen dereinst ihres mysteriösen Charakters vollständig entkleidet werden wird und sich uns dann als eine wohldefinierte, für den Bestand der Zelle selbst deletäre photochemische Veränderung eines wesentlichen Zellbestandteils darstellen wird, welche sich unter die anderen bekannten photochemischen Reaktionen einreihen wird. Von diesem Ziele, ja auch selbst von seiner direkten Verfolgung sind wir jedoch noch weit entfernt. Dazu fehlt uns so gut wie jede Kenntnis über das Verhalten der Plasmabestandteile gegenüber den Röntgenstrahlen.

Wir können uns aber trotzdem auch heute schon eine gewisse Vorstellung über die sich dabei abspielenden Vorgänge machen, wenn wir die Bedingungen prüfen, unter denen die Röntgen-schädigung zustande kommt. Durch Untersuchungen von Körnicke¹⁾ und von Schwarz²⁾ ist nun ein wichtiger Schritt in dieser Richtung getan: Es wurde gezeigt, daß ruhende (luft-trockene) Samen röntgenunempfindlich sind, auch für das Drei- unddreißigfache einer gegen Keimlinge derselben Species hoch-wirksamen Dosis. Dadurch ist zunächst bewiesen, daß die Strah-lenempfindlichkeit eines Zellterritoriums durch den jeweiligen physiologischen Zustand mitbedingt wird. Zweifellos müssen auch beim Zustandekommen dieser Unter-schiede letzten Endes chemische Verschiedenheiten maß-

gebend sein. Ohne weiteres ist jedoch dieser von Körnicke und Schwarz erhobene Befund nicht zu Rückschlüssen über die chemische Natur der Strahlenreaktion verwertbar, denn die Samenkeimung stellt keine einfache, einheitliche chemische Umwandlung dar, sondern sie besteht in einer durch das Nebeneinanderlaufen und Ineinandergreifen mehrerer recht verschieden gearteter Teilvorgänge gebildeten Änderung der Zusammensetzung und der Funktion des Samens, und wir würden die Unempfindlichkeit ruhender Samen erst dann zu Rückschlüssen über die Strahlenreaktion selbst verwerten können, wenn wir wüßten, welcher dieser Teilvorgänge für das Zustandekommen der Radiosensibilität verantwortlich zu machen ist. Dies können wir jedoch derzeit nicht entscheiden, denn ein kurzer Überblick zeigt uns, daß mehrere derselben dafür in Betracht kommen können.

Schon die den Keimungsprozeß einleitende Quellung muß uns geeignet erscheinen, das Substrat strahlenempfindlicher zu machen, da sie bei der Empfindlichkeit von Samen, Keimlingen, Moosen, Sporen usw. gegenüber der Einwirkung supramaximaler Temperaturen eine wesentliche Rolle spielt [Literatur bei Pfeffer³⁾ II, 293], die durch Untersuchungen Lewiths⁴⁾ über den Einfluß des Wassergehaltes auf die Koagulierbarkeit der Eiweißkörper eine theoretische Begründung erhielt.

Auch die an die Quellung sich anschließende Aktivierung der Profermente des ruhenden Samens führt lebenswichtige Zellbestandteile in eine gegen physikalische und chemische Agentien minder widerstandsfähige Form über.

Auch die daran sich anschließende fermentative Aufspaltung der hochmolekularen Reservestoffe muß durch Vermehrung der Zahl [Maquenne⁵⁾] und Art der Moleküle, sowie durch die Verkleinerung der Molekülgröße, welche die Ionisierbarkeit der Substanzen erhöht, auch die Bedingungen zum Ablauf von Lichtreaktionen, die ja vornehmlich Ionenreaktionen sind, durch Bildung „reaktionsfähigerer“ Systeme verbessern.

Besonders wichtig ist dabei, daß auch die bei photochemischen Prozessen beteiligten Katalysatoren vielfach niedrigmolekulare, nur in Ionenform wirksame Substanzen sind (siehe besonders Metallsalze). Es wäre also bei der Aufspaltung und nachfolgender Oxydation der Eiweißkörper gewiß Gegebenheit zur Bildung von Lichtkatalysatoren gegeben, auch von solchen (aus eisenhaltigen Eiweißkörpern), welche speziell für Röntgenstrahlen überdies noch die physikalischen Qualitäten optischer Sensibilisatoren mitbringen.

Auch der — aufbauende — Schlußakt der chemischen Differenzierung des Samens zur Keimpflanze kann durch Bildung eines neuen Zellbestandteils von besonderer Empfindlichkeit zum Auftreten der Radiosensibilität beitragen.

Noch mehr als die Quellung und die Änderung der chemischen Zusammensetzung könnte der dritte Teilvorgang der Keimung: der durch die Imbibition der Samenhülle ermöglichte Zutritt von Sauerstoff zum Samen und die dadurch eingeleitete Atmung zur Erlangung der Radiosensibilität des Samens beitragen. Lassen sich doch mannigfache Beziehungen zwischen Lichtreaktionen und Oxydationsvorgängen aufzeigen: ein beträchtlicher Teil der in vitro verlaufenden, gut charakterisierten Lichtreaktionen stellt Sauerstoff- (resp. Ladungs-) Übertragungen dar, so insbesondere die als Prototyp der biologischen Lichtvorgänge anzusprechenden metallkatalytischen Lichtreaktionen Neuberger's⁸); und für viele Lichtschädigungen lebender Organismen ist die Mitwirkung des Luftsaauerstoffs am Vorgange erwiesen, teils durch die Abhängigkeit des Effekts vom Sauerstoffgehalt der Atmosphäre [Bakterien Downes und Blunt⁹], „photodynamische“ Eosinwirkungen Tappeiners⁷); teils durch den Nachweis gesteigerten Sauerstoffkonsums unter Lichteinfluß, welcher in verschiedener Form von Hertel⁸), Meyer⁹) und Behring¹⁰) erbracht wurde, am eindringlichsten durch den Nachweis größerer Sauerstoffzehrung von Vogelerythrocyten während der Bestrahlung. Besondere Bedeutung gewinnen diese Tatsachen dadurch, daß auch auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen ähnliche Beziehungen zu Oxydationsvorgängen nachweisbar sind. Gehören doch mehrere in vitro ablaufende photochemische Effekte der Röntgenstrahlen zu den Oxydationsreaktionen (Jodoformzersetzung, Eder'sche Lösung, prinzipiell auch die photographische Platte)! Weiterhin wurde von Schwarz¹¹) der Beweis erbracht, daß der Blutzirkulation beraubte Haut eine wesentlich geringere Radiosensibilität zeigt als normale. Und von Schmidt¹²) wurde im Anschluß daran nachgewiesen, daß Steigerung des Blutzufflusses die Empfindlichkeit des Gewebes für Röntgenstrahlen steigert. Aber auch der an normalen sowie pathologischen Geweben so vielfach beobachtete innige Zusammenhang zwischen der Radiosensibilität der Zellen und ihrer Wachstumsschnelligkeit läßt es möglich erscheinen, daß dem mit dem Wachstum so eng verknüpften Atmungsvorgang eine wesentliche Bedeutung für das Zustandekommen der Strahlenempfindlichkeit zukommt. Wir werden aus all diesen Gründen also auch das Auftreten der Atmungsvorgänge im Verlauf der Keimung als eine der möglichen Ursachen für die Entstehung der Radiosensibilität in Erwägung ziehen müssen.

Eine Entscheidung der Frage, welches der eben aufgezählten Teilmomente des Keimungsvorgangs das Auftreten der Radiosensibilität auslöst, kann also nur auf experimentellem Wege getroffen werden, indem wir versuchen, den Keimungsvorgang so zu leiten, daß einer oder der andere Teilvorgang temporär unterdrückt wird und so eine Trennung der Vorgänge voneinander angestrebt wird. Eine solche Versuchsanordnung erscheint mir als der derzeit aussichtsreichste Weg zur Orientierung über die Bedingungen, an die der Ablauf der Strahlenreaktion geknüpft

ist. Von den 3 in Betracht kommenden Teilfaktoren der Keimung — der Quellung, der chemischen Differenzierung des Substrats und den Oxydationsvorgängen — sind letztere am leichtesten einer derartigen experimentellen Prüfung zugänglich. Denn die Pflanzenatmung stellt keinen konstanten, unter allen Bedingungen mit gleicher Energie fortlaufenden Prozeß dar, sondern die Atmungsgröße ist in hohem Maße von den äußeren Bedingungen abhängig, und da ist es von besonderer Bedeutung, daß wir unter den vielfachen experimentellen Beeinflussungen auch solche besitzen, welche die Atmungsenergie auf einen minimalen Wert herabdrücken. Solche Mittel sind: Extrem niedrige Temperaturen, sauerstofffreie Atmosphäre und gewisse Gifte (z. B. Cyanverbindungen). Die temporäre, weitgehende Atmungshemmung kommt bei diesen Versuchen auch noch am Keimling selbst zum Ausdruck durch einen temporären aber vollkommenen Stillstand der Zuwachsbewegung.

Solche Keimlinge repräsentieren dann zwar hinsichtlich ihrer Zusammensetzung einen Zustand vorgeschrittener chemischer Differenzierung, hinsichtlich ihres funktionellen Verhaltens (Stoffwechsel, Atmung, Wachstum) sind sie aber auf kurze Zeit wieder in den vorherigen Zustand latenten Lebens zurückversetzt, und sie scheinen mir daher geeignet, zur Entscheidung der Frage herangezogen zu werden, ob das Auftreten der Strahlenempfindlichkeit während der Keimung die Folge der chemischen Differenzierung des Substrats (inklusive der Quellung) ist, oder ob sie durch das Einsetzen der Atmung ausgelöst wird.

Ich stellte mir also die Aufgabe, bei Keimlingen strahlenempfindlicher Pflanzengattungen (Weizen), welche durch Einwirkung der genannten Mittel in Atmung und Stoffwechsel gehemmt waren, die Strahlenempfindlichkeit festzustellen und mit der Empfindlichkeit un behandelter Kontrollkeime zu vergleichen. War die Radiosensibilität nur durch die Atmung vermittelt, so mußte deren Unterdrückung auch auf das Verhalten der Keimlinge gegenüber der Strahleneinwirkung von Einfluß sein, war sie jedoch durch die chemische Differenzierung des Keimlings bedingt, so war zu erwarten, daß die erwähnten Versuchsmittel keinen Einfluß auf die Radiosensibilität der bereits chemisch differenzierten Keimlinge haben würden.

Von nicht zu unterschätzender Bedeutung ist dabei die

Tatsache, daß alle 3 in Aussicht genommenen experimentellen Hilfsmittel außer der Atmung auch die Zuwachsbewegung unterdrücken. Denn die menschliche Strahlenbiologie hat sehr ausgesprochene und durchgreifende Beziehungen zwischen der Strahlenempfindlichkeit der Zellen und ihrer Wachstumsgeschwindigkeit aufgedeckt. Meine Versuche werden also auch Gelegenheit geben, die Mechanik dieses Zusammenhangs zu beleuchten und zu entscheiden, ob die Zellen infolge des Wachstumsvorgangs empfindlich werden oder nur infolge der momentan gegebenen, mit dem Wachstumsvorgang verbundenen Zusammensetzung, und ob sie daher ihre Radiosensibilität bewahren, auch wenn dieser durch experimentelle Eingriffe lahmgelegt wird.

I. Versuchsmethodik.

Zunächst sollen einige allgemeine Angaben über die bei dieser und den nachfolgenden Untersuchungen verwandten Methodik Platz finden.

Ich verwandte bei der vorliegenden Untersuchung ausschließlich *Triticumkeimlinge**), da sich die Pflanze den geforderten Bedingungen (besonders der Temperatur) gut anpaßt und vielfach Gegenstand physiologischer Untersuchungen war, so daß über die Beeinflussung ihrer Atmung durch verschiedene Außenbedingungen genug Angaben vorliegen. Die Körner wurden 1–2 Stunden in Wasser von Zimmertemperatur belassen, dann in gläsernen ungebrauchten Entwicklungsschalen auf 6fache Lage reinsten frischen Filtrierpapiers ausgebreitet und mit einer Glasplatte nicht ganz dicht abgedeckt im Dunkeln bei Zimmertemperatur dem Keimungsprozeß überlassen. Von Zeit zu Zeit (besonders abends und früh) wurde dem Keimbett neue Mengen Wasser zugeführt. Im allgemeinen empfahl sich mäßig trockene Haltung desselben. Die Keimlinge wurden unter Verwendung eines Zirkels nach der Größe der Wurzellänge sortiert (wobei im Sommer auf Eintrocknung geachtet werden muß). Zu Vergleichen zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben wurden stets Exemplare gleicher Keimzeit, Wurzellänge und Korngröße verwendet.

Die Bestrahlung erfolgte, wenn nicht die Versuchsanordnung besondere Änderungen wünschenswert machte, auf reichlich feuchtem Filtrierpapier (in mehreren Lagen), welches auf Glasplatten ausgebreitet war.

Die Proben wurden möglichst nahe am Zentralstrahl ausgerichtet. Auf ihre Radiosensibilität zu vergleichende Proben wurden stets (den röntgentherapeutischen Vorschriften entsprechend) im zweiten Hauptsohnitt ausgelegt.

*) Die Überlassung des Materials verdanke ich dem freundlichen Entgegenkommen der Landesackerbauschule Krottendorf (besonders Herrn Fachlehrer Tutschka).

Die Entfernung der Antikathode von den Keimlingen betrug zwischen 15 und 20 cm, woraus sich eine Minimalentfernung der Glaswand von 5 cm vom Objekte ergab. Stets passierten die Strahlen zur Abhaltung der Wärmestrahlen ein steifgepreßtes Säckchen mit Kienruß, welches die Öffnung des Lambertzstativs vollkommen abschloß und so auch die Fluoreszenzstrahlen abhielt. Wie Versuche unter Kontrolle eines Thermometers ergaben, genügte diese Versuchsanordnung auch bei einer Entfernung von 15 cm von der Antikathode zur Abhaltung der Wärmestrahlen. Es versteht sich, daß auch dort, wo (z. B. bei Bestrahlung weit entwickelter Keime oder einer größeren Menge von Material) eine größere Fläche bestrahlt werden mußte, die Distanz so gewählt wurde, daß sie mindestens dem doppelten Durchmesser des bestrahlten Felds gleichkamen.

Als Stromquelle diente ein Siemens-Halakescher Hochspannungsgleichrichter großen Typs, wobei stets mit dem von Schönfeld¹³) angegebenen Phasenwähler gearbeitet wurde. Es wurde fast durchgehends mit den bei Tiefentherapie üblichen Bedingungen der Härte und Schaltung gearbeitet (Härte: 8 Walter, Schaltung: 2 Impulse, 6 Pausen). Als Röhren dienten Watt-Wasserkühlröhren mit Platinantikathode, 10 cm Radius und Distanzpalladiumregenerierung. Die Dosierung erfolgte zu meist mit Holzknecht-Sabouraud-Tabletten, welche in der Höhe der Keimlinge am Rande oder zwischen zwei Vergleichsproben lagen.

Die Topfung erfolgte in gesiebter guter Gartenerde, wobei wegen der Gleichförmigkeit der Bewässerung und Belichtung stets beide Proben einer Versuchsreihe in einem Topfe gepflanzt wurden (durch eine versenkte Glasplatte getrennt), wobei stets auch auf gleiche Tiefe geachtet wurde. Die Pflanzen wurden teils in den Institutsräumen, teils in einer nahe gelegenen Villa gehalten*).

Bei der Aufzucht bestrahlter Weizenpflanzen konnte ich die wiederholt gemachten Angaben [Schwarz, H. E. Schmidt, Wetterer¹⁴)] bestätigen, daß bestrahlte Exemplare nicht nur kleiner, sondern auch plumper, gedrungener sind, ihre Blätter eine rundliche Spitze haben und durch ausgesprochene Hyperchromie ausgezeichnet sind, die ihnen eine dunkelgrüne Farbe verleiht; sie sind steifer, haben einen eigentümlichen Glanz, der mitunter einer moirébandartig schillernden Oberfläche entspricht. Kommt es (besonders bei kleineren Dosen) zur Ausbildung weiterer Triebe, so unterscheiden sich diese wesentlich von den ersten 2 Blättern durch ihre schmale längliche Form, die diese wie nicht zur selben Pflanze gehörig erscheinen läßt.

Besondere Erwähnung verdient noch die Tatsache, daß die individuellen Verschiedenheiten bei den einzelnen Exemplaren

*) Die Ernte und Ausmessung der Pflanzen erfolgte meist nach 2 bis 3 Wochen, nur in zwei Versuchen probeweise nach längerer Zeit, während welcher die Proben stets in Evidenz gehalten waren.

der bestrahlten Proben oft wesentlich ausgeprägter waren als bei den unbestrahlten. Sie waren häufiger und die Exkursionen (allerdings nur bei kleineren Dosen unter 15%) waren zumeist größer, so daß es nicht mehr möglich erscheint, dieselben nur auf Rechnung verschiedener Wachstumsintensität zu setzen, und nicht vielmehr darin den Ausdruck gewisser Differenzen in der Empfindlichkeit der Einzelindividuen zu erblicken.

Diese, trotz sorgfältigster Auswahl der Exemplare nach Korngröße, Keimungszeit und Wurzellänge öfters zu beobachtende Erscheinung ausgesprochener individueller Verschiedenheiten bestrahlter Proben erschwert die Beurteilung quantitativer Vergleichsversuche einigermaßen und selbst bei der von mir stets befolgten Verwendung einer größeren Zahl von Keimlingen (7—15) können die daraus gewonnenen Durchschnittswerte für die vergleichende Beurteilung der Strahlenempfindlichkeit zweier verschieden behandelter Proben nur mit großer Vorsicht Verwertung finden und auf unsere Berücksichtigung überhaupt können nur jene Differenzen Anspruch machen, welche in wiederholten Versuchen einigermaßen regelmäßig wiederkehren und stets auch bedeutend genug sind.

II. Temperatureinflüsse.

Die Fähigkeit der Pflanzen, sich einem breiten Temperaturintervall anzupassen und in demselben die Außentemperatur anzunehmen, läßt uns in ihnen ein geeignetes Versuchsobjekt zur Ermittlung des Temperatureinflusses auf den Ablauf der Strahlenreaktion erblicken. Für die uns interessierende Frage nach den Beziehungen zwischen Atmung und Radiosensibilität gewinnt dies Bedeutung durch die weitere von Wolkoff und Mayer¹⁵⁾ sowie Bonnier und Mangin¹⁶⁾ ermittelte Tatsache, daß die Atmungsenergie bei wechselnder Temperatur nicht konstant bleibt, sondern im ganzen Intervall eine strenge Beziehung zwischen Atmungsgröße und Außentemperatur herrscht, die sich auch in quantitativer Hinsicht (bezüglich der Größe des Temperaturkoeffizienten) nicht von der für die meisten chemischen Reaktionen geltenden van t'Hoff'schen Beziehung (R.G.T.-Regel) unterscheidet. Für *Triticum* — meine Versuchspflanze — beträgt der Temperaturkoeffizient der Atmung nach Clausen¹⁷⁾

und Detmer¹⁸⁾ für ein Temperaturintervall von 10° 2,8. Das Wichtigste ist dabei, daß so die Möglichkeit gegeben ist, durch Aufsuchen der tiefsten noch zuträglichen Temperatur die Größe der Atmung beinahe bis zur Sistierung derselben herabzudrücken. So beträgt die Atmung für *Triticum* bei der noch zuträglichen Temperatur von 0° den 6. Teil des Wertes bei Zimmertemperatur.

Die auch das Wachstum stark hemmende Herstellung von Eistemperatur stellt also ein geeignetes und einfaches Mittel zur Prüfung des Mitspielens von Atmungs- und Wachstumsvorgängen beim Zustandekommen der Strahlenempfindlichkeit dar.

Zu den Versuchen verwendete ich ein zylindrisches, dünnwandiges Becherglas von 11 cm Länge und 4,5 cm Durchmesser, dessen unterer Teil mit einer 5 cm langen Bleiblechrolle ausgefüllt war, auf der ein flaches Porzellanschälchen lag, das die nicht zu bestrahlenden Kontrollpflanzen enthielt. Sie waren vor den von oben her einwirkenden Röntgenstrahlen durch eine 4 mm dicke, das Schälchen allseits überragende paraffinierte Bleiplatte geschützt, auf der sich ein zweites Schälchen mit der zu bestrahlenden Probe befand.

Die Bleiplatte war durch drei kleine Korkzwicke (die auf einem runden Filmstück montiert waren) gehindert, auf der unteren Sohle aufzuliegen und den Zugang zu verschließen. Das Becherglas war durch eine gut eingepaßte Korkplatte verschlossen, die seitlich eine schräg von außen nach innen gehende Öffnung zur Aufnahme eines kleinen Thermometers besaß. Das Glas stand, von einer dünnen umgebenden Bleirolle geschützt, in einem großen Blechtopf.

Versuch 52: Weizenkeimlinge von 11 mm Wurzellänge und 3tägiger Keimung.

Erst wurde das geschlossene Becherglas im Blechgefäß von Eisstücken umgeben, bis die Innentemperatur auf 6° gesunken war, dann erst die mit den (auf feuchtem Filtrierpapier ruhenden) Keimlingen versehenen Schälchen eingebracht und der Temperaturverlauf verfolgt. Mittlerweile wurde die im Lambertzstativ befindliche Röhre über dem Becherglas eingestellt und, sobald die Innentemperatur derselben 4° erreicht hatte, mit der Bestrahlung begonnen. Die Antikathode war von den Keimlingen etwa 17 cm entfernt. Es wurde 15 Minuten lang bei 2 Milliampère (8 Walter) bestrahlt. Temperatur am Ende der Bestrahlung 4°. Länge der Pflanzen nach 21 Tagen:

Bestrahlte Probe	17 (8,6%)
Unbestrahlte Probe	195
(Mittelwerte von je 8 Keimlingen.)	

Wie man sieht, vermochte die mit den Versuchsbedingungen gewiß verknüpfte hochgradige Einschränkung der Atemenergie und des Wachstums nicht, den Keimling strahlenunempfindlich

zu machen. Die Radiosensibilität ist also nicht unzer trennbar an diese beiden Funktionen gebunden, sondern es gelingt gewissermaßen, sie von ihnen zu trennen. Sie besteht bei Unterdrückung von Atmung und Wachstum weiter; ein Befund, der sehr dagegen spricht, daß dem Atmungsvorgang oder den an ihn angeschlossenen Stoffwechselfvorgängen eine kausale Beziehung zum Ablauf der Röntgenschädigungsreaktion resp. zum Zustandekommen der Strahlenempfindlichkeit zukommt.

Im Anschluß daran und gewissermaßen zur Kontrolle nahm ich Gelegenheit, die Untersuchung auch auf die obere Grenze der Existenzbedingungen der Keimlinge auszudehnen. Ich suchte zu diesem Zwecke das nicht weit von diesen gelegene Temperaturoptimum, bei dem das Wachstum den höchsten Wert hat, auf. Es liegt bei *Triticum* (Pfeffer 16 (II) S. 88) ungefähr bei 30°. Da nun für das ganze Intervall die van t'Hoff'sche Beziehung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur gilt, so zeigen die beiden Endpunkte dieses Intervalls ganz erhebliche Differenzen (die Atmung ist z. B. bei *Triticum* bei 30° 10mal so intensiv wie bei 0°, Dettmer, Clausen).

Vergleichsversuche, welche dieses Intervall umspannen, geben daher die Möglichkeit, durch Gegenüberstellung zweier Zustandsarten, die sich durch maximale Unterschiede in der Atmung auszeichnen, das Ergebnis meines Eisversuchs noch nachdrücklicher zu gestalten. Dieser Versuch, der also auf die Feststellung des Temperaturkoeffizienten der Radiosensibilität hinausläuft, ist in ähnlicher Weise bereits von Krönig und Friedrich¹⁹⁾ [anlässlich einer Kontrolle der Müller (Immenstadt)schen Sensibilisierungsmethode mittels Thermopenetration] an Kaulquappen unternommen.

Versuch 54: 2 $\frac{1}{2}$ tägiges *Triticum*. Kälteprobe 3 mm, Wärmeprobe 6 mm Wurzellänge.

Es wird in dem bei Versuch 52 benutzten Gefäß zuerst in genau derselben Weise eine Bestrahlung (Wurzellänge 3 mm) bei 4° durchgeführt. Sodann wird bei zwangsläufig (durch Glastubus) eingehaltener gleicher Distanz der Röhre, genau gleicher Stellung des Apparats und gleicher Röhrenhärte dieselbe Bestrahlungsdosis appliziert an einer neuen Probe (6 mm), während durch vorher außen eingefülltes Wasser von 40° die Innentemperatur von 30° auf 35° stieg. Dosierung mit am Rande des Korks außen aufgelegtes Holzkechtdosimeter. Beide Male 24 H. (8 Walter). Länge der Pflanzen 20 Tage danach:

Eisprobe (8 Exemplare):

Bestrahlt	38,7 mm (17%)
Unbestrahlt	222 mm

Wärmeprobe (11 Exemplare):

Bestrahlt	31 mm (14,7%)
Unbestrahlt	210 mm

Die Differenzen zwischen den biologischen Effekten der Bestrahlung beider Proben sind viel zu gering, um irgendwie verwertet werden zu können. Man wird also daraus entnehmen, daß der Röntgenreaktion ein Temperaturkoeffizient von sehr geringem Werte (ungefähr = 1) zukommt, ein Befund, der sich mit dem Ergebnis des Versuchs von Krönig und Friedrich deckt.

Der hier ermittelte Wert für den Temperaturkoeffizienten bestätigt uns aber nicht nur neuerdings die Unabhängigkeit der Radiosensibilität von Atmungs- und Wachstumsgröße, sondern er ist auch geeignet, uns gewisse Vorstellungen über die Reaktion selbst zu bilden. Dieser geringe Temperaturkoeffizient unterscheidet die Strahlenreaktion nicht nur von den Atmungsvorgängen, sondern von der großen Mehrzahl der bekannten Reaktionen überhaupt, welche fast durchgehends einen dem van t'Hoff'schen Gesetz entsprechenden Temperaturkoeffizienten von 2—3 pro 10° haben.

Nur eine Gruppe von Reaktionen macht hierin eine Ausnahme: Die photochemischen Vorgänge, und man betrachtet seit den Untersuchungen von Goldberg²⁰⁾, Eder²¹⁾ und Plotnikow) den niedrigen Temperaturkoeffizienten als Kennzeichen der Lichtreaktionen (s. a. Plotnikow, Photochemie. Halle 1910, S. 71 u. 115/16). Dabei erscheint es besonders wichtig, daß auch biologische Lichtreaktionen, in denen wir mit guten Gründen Paradigmen für den noch unbekanntem Ablauf der Strahlenschädigung erblicken dürfen, die Eosinlichtwirkung [H. Pfeiffer²²⁾] und die Eisen- oder Uran-Lichtwirkungen [Neuberg²⁴⁾] sich gleich verhalten. Durch ihren niedrigen Temperaturkoeffizienten charakterisiert sich die Röntgenreaktion also nicht nur als einen von Stoffwechselfvorgängen unabhängigen, selbständigen, chemischen Prozeß, sondern sie dokumentiert dadurch auch ihre Zugehörigkeit zu den Lichtreaktionen.

III. Cyanvergiftung.

Ein weiteres Mittel zur weitgehenden Beeinflussung der Atmungsvorgänge stellt die Cyanvergiftung dar. Zwar stützt sich diese Auffassung direkt nur auf Versuche Schroeders²⁵⁾ an *Aspergillus*, ihre Übertragung auf Phanerogamen ist somit nicht ohne weiters gerechtfertigt. Nun hat aber Schaer²⁶⁾ gezeigt, daß mit verdünnter Blausäurelösung befeuchtete Samen von *Lolium*, *Brassica* und *Trifolium* zwar quellen, aber nicht auskeimen, ihre Keimfähigkeit nach Entfernung des Giftes jedoch wiedererlangen, auch wenn letzteres mehrere Tage eingewirkt hatte. Ich konnte nun an *Triticum*keimlingen, die bereits in Entwicklung begriffen waren, durch 1⁰/₁₀₀ Cyankaliumlösung ebenfalls Wachstumshemmungen erzeugen. Ist es schon mit Rücksicht auf die innigen Beziehungen zwischen Atmung und Wachstum wahrscheinlich, daß auch in diesen Versuchen die Wachstumshemmung von einer Atmungshemmung begleitet gewesen sei, so wird dies um so plausibler, als die Schroederschen Beobachtungen an *Aspergillus* keinen vereinzelt Zufallsbefund darstellen. Die Beziehungen der Blausäure zu Oxydationsvorgängen umspannen vielmehr einen großen Teil der belebten Welt, ja sie beziehen sich auch auf die materiellen Vermittler von Atmungsvorgängen, die Oxydationsfermente und die Gärungsfermente, ja auch auf anorganische Sauerstoffüberträger. Dies verleiht auch der Atmungsstörung bei Cyanvergiftung einen besonders durchgreifenden Charakter; aber auch in quantitativer Hinsicht ist diese Atemstörung ausgezeichnet (Schroeder).

Ich zog daher auch mit Blausäure und Cyaniden vergiftete Keimlingen zu meinen Untersuchungen der Strahlenempfindlichkeit heran.

Die Versuche wurden derart angestellt, daß *Triticum*keimlinge gleicher Wurzellänge in zwei Partien geteilt wurden, deren jede (gleichzeitig) in je ein Gefäß mit Cyankaliumlösung gleicher Konzentration und Menge (bis zur eben vollkommenen Bedeckung mit der Lösung) versenkt wurden. Eine der beiden Proben wurde nach Ablauf einer bestimmten Zeit (meist ca. 1 Stunde) bestrahlt, die andere nicht. Beide Proben wurden gleich lange in der Giftlösung belassen und dann 20 mal mit je 200 ccm lauem Wasser gewaschen. Die Cyankaliumlösung wurde durch Auflösen 100 proz. Cysnkaliums (G. R. Fritz) stets frisch hergestellt und der Gehalt zu Beginn des Versuchs durch Titration nach Liebig (mit ²/₁₀-AgNO₃) ermittelt.

Von den zahlreichen, stets gleichsinnig verlaufenen Versuchen will ich nur 2 wiedergeben. Die nachfolgenden Vergleichsversuche mit unvorbehandelten und vorbehandelten Keimlingen bestätigen ohnehin die Radiosensibilität letzterer immer wieder aufs neue.

Versuch 8: Eintägige Keimung. Es werden zwei Proben verwendet: I. Wurzellänge 3 mm; II. 1 mm. 5 ccm Lösung = 1,55 AgNO₃. Bestrahlung beginnt 43 Minuten nach Beginn der Vergiftung. Gesamtdauer der Vergiftung 1 Stunde. Dosis: 34 H. (6 Walter). 15 cm Distanz. Länge der Pflanzen nach 21 Tagen:

I. Bestrahlt	13,6 mm (4,9%)
Unbestrahlt	273 mm
II. Bestrahlt	13,4 mm (4,3%)
Unbestrahlt	307 mm

Versuch 24: Zweitägiges Tritium. Wurzellänge 40 mm. 5 ccm der Lösung = 1,7 AgNO₃. Dosis: 30 H. aus 15 cm Distanz. Dauer der Giftwirkung 77 Minuten.

Länge der Pflanzen nach 16 Tagen:

Hauptprobe	77,8 mm (31%)
Kontrollprobe	245 mm

Es spricht sich also auch in diesen Versuchen eine Unabhängigkeit der Radiosensibilität von einer Unterdrückung der Wachstumstätigkeit (und wohl auch der Atmung) aus. Die beiden atmungshemmenden Mittel: Kälte und Cyanvergiftung, welche in meinen Versuchen ihre Wirksamkeit durch Lahmlegung der Zuwachstätigkeit erwiesen, vermochten nicht, dem einmal strahlenempfindlich gewordenen Keimling die Radiosensibilität zu nehmen. In beiden Versuchsanordnungen waren bereits auskeimende Samen auf ihre Strahlenempfindlichkeit geprüft worden, welche auf kurze Zeit teilweise in den Zustand latenten Lebens zurückversetzt worden waren. Diese Zurückversetzung betraf jedoch nur funktionelle Äußerungen des Keimungsvorgangs (Atmung und Wachstum). Auf die konstitutionellen Momente, die den Keimling vom ruhenden Samen unterscheiden (die veränderte chemische Zusammensetzung) konnten die angewendeten Versuchsmittel natürlich nicht Einfluß nehmen. Wenn wir nun sehen, daß sich derartige der Atmungstätigkeit beraubte Keimlinge den Röntgenstrahlen gegenüber trotzdem verhalten wie gleichentwickelte unvorbehandelte, so können wir die Ursache für das Strahlenempfindlichwerden der Samen nicht in den bei unseren Versuchen ausgeschalteten funktionellen Momenten

(Atmung usw.), sondern lediglich in der durch unsere Versuchsmittel nicht tangierten chemischen Differenzierung des ruhenden Samens zum wachsenden Keimling erblicken. Unterstützt wird diese Überlegung durch die Beobachtung, daß auch Temperatureinflüsse, welche geeignet scheinen, Atmung und Wachstum zu steigern, auf das Ausmaß der Strahlenempfindlichkeit ohne Einfluß sind.

Wir gelangen somit zu der Anschauung, daß für das Verhalten der Zellen gegen die schädigende Einwirkung der Röntgenstrahlen nur die Zusammensetzung der Zellen maßgebend sei, und nicht aber die Größe und Art der in ihnen momentan ablaufenden, den Lebensprozeß charakterisierenden Stoffumsetzungen und wir sind berechtigt, anzunehmen, daß der Vorgang der Strahlenschädigung ohne das Mitspielen der körpereigenen Verbrennungsvorgänge als reine photochemische Reaktion abläuft

Es erschien mir nun jedoch noch nötig, dem Einwande zu begegnen, daß die in meinen Versuchen nachgewiesene Strahlenempfindlichkeit vergifteter Keimlinge nur ein Bruchteil der vollen Empfindlichkeit gleichaltriger Exemplare sei. Ich führte daher entsprechende Vergleichsversuche durch.

Die Versuche wurden derart ausgeführt, daß von gleichaltrigen Keimlingen Exemplare gleicher Wurzellänge in flachen Schalen mit frisch hergestellten Cyankaliumlösungen resp. Blausäurelösung bekannter Konzentration (die stets unmittelbar vorher durch Titration nach Liebig ermittelt wurde) überschüttet wurden, so daß sie davon eben bedeckt waren. Kontrollproben der gleichen Keimzeit wurden gleichzeitig in Wasser versenkt. Nach $\frac{1}{2}$ —1 Stunde wurde je die Hälfte dieser Proben in ein kleines flaches, mit der entsprechenden Flüssigkeit gefülltes Porzellanschälchen übertragen, so daß die Keimlinge ebenfalls eben bedeckt waren. Beide Schalen wurden — im zweiten Hauptschnitt ausgerichtet — unter den Fokus der Röntgenröhre gebracht und mit Zwischenschaltung des Wärmefilters bestrahlt. Das Dosimeter lag in gleicher Höhe der Keimlinge zwischen den Schälchen. Die Waschung beider Cyanproben erfolgte unmittelbar nach Beendigung der Bestrahlung gleichzeitig und gleichmäßig, mit je 20 mal 200 ccm Wasser.

Ich lasse nun die Versuchsbeschreibungen folgen.

Versuch 12: Fünfter Keimungstag. Hauptprobe 12 mm, Kontrollprobe 19 mm Wurzellänge. 10 ccm der Lösung = $3,4 \text{ AgNO}_3 \cdot (\text{KCN})$.

Bestrahlung beginnt 60 Minuten nach Beginn der Vergiftung. Dauer der Giftwirkung 90 Minuten.

Dosis: 12 H (7 Walter) aus 15 cm Distanz.

Länge der Pflanzen nach 18 Tagen (Mittelwert von 7 Exemplaren):

Bestrahlte Cyanprobe	41,8 mm (22%)
Unbestrahlte Cyanprobe . . .	188 mm
Bestrahlte Wasserprobe . . .	125,7 mm (67%)
Unbestrahlte Wasserprobe . .	186 mm

Versuch 68: Zweiter Keimungstag. Wurzellänge der Cyanprobe 3–4 mm, der Kontrolle 2–1 mm. 10 ccm der Cyankaliumlösung = 1,3 ccm AgNO_3 .

Bestrahlung 65 Minuten nach Beginn der Vergiftung. Giftwirkungsdauer 85 Minuten.

Dosis: 11 H. (7 Walter) aus 20 cm Distanz.

Länge der Pflanzen nach 19 Tagen (Mittelwert von 13 resp. 15 Exemplaren):

Bestrahlte Cyanprobe	22,2 mm (11,8%)
Unbestrahlte Cyanprobe . . .	188 mm
Bestrahlte Wasserprobe . . .	152 mm (80,8%)
Unbestrahlte Wasserprobe . .	188 mm

Die Einzelwerte der Länge betragen in diesem Falle:

Für die bestrahlte Cyanprobe: 25; 16; 33; 18; 25; 23; 16; 22; 28; 25; 24; 16; 18.

Für die unbestrahlte Cyanprobe: 204; 220; 212; 165; 132; 180; 171; 195; 193; 206; 173; 205; 215.

Für die bestrahlte Kontrollprobe: 150; 145; 135; 152; 138; 160; 183; 181; 167; 184; 117; 140; 146; 140; 121.

Für die unbestrahlte Kontrollprobe: 194; 192; 204; 205; 160; 190; 180; 224; 182; 173; 220; 190; 170; 145.

Versuch 151: 45stündige Keimung. Wurzellänge der Giftprobe 1–2 mm, der Kontrolle 3–5 mm. Verwandt wurde frisch destillierte Blausäurelösung (5 ccm = 3,3 ccm AgNO_3). Beginn der Bestrahlung nach einer Stunde, Ende der Giftwirkung 2 Stunden nach Beginn der Vergiftung.

Bestrahlung 20 H. (7 Walter) aus 18 cm Distanz.

Länge der Pflanzen 53 Tage nach der Bestrahlung:

Bestrahlte Giftprobe	11,4 mm (4%)
Unbestrahlte Giftprobe . . .	265 mm
Bestrahlte Kontrollprobe . .	122 mm (52%)
Unbestrahlte Kontrollprobe .	234 mm

Versuch 55: Dreitägige Keimung. Wurzellänge der ersten Hauptprobe 4 mm, der zweiten Hauptprobe 6 mm, der Kontrollprobe 3 mm.

Zwei Verdünnungen von Cyankalium: I. 10 ccm = 2,6 ccm AgNO_3 ; II. 10 ccm = 1,3 ccm AgNO_3 .

Bestrahlung 1 Stunde nach Beginn der Vergiftung. Gesamtdauer der Giftwirkung 85 Minuten.

Dosis: 20 H. (8 Walter) aus 20 cm Distanz.

Länge der Pflanzen nach 20 Tagen:

Kontrollprobe (15 Exemplare):

Bestrahlt 127 mm (58%)
 Unbestrahlt 216 mm

Erste Hauptprobe (10 Exemplare):

Bestrahlt 20,7 mm (9,6%)
 Unbestrahlt 215 mm

Zweite Hauptprobe (5 Exemplare):

Bestrahlt 14 mm (6,8%)
 Unbestrahlt 203 mm

Versuch 82: Viertes Keimungstag (zweite Serie Keimlinge). Cyankaliumlösung: 10 ccm = 2,6 ccm AgNO₃.

Bestrahlung 1 Stunde nach Beginn der Vergiftung. Vergiftungsdauer 75 Minuten. Dosis: 9 H. (8 Walter) aus 15 cm Distanz.

Länge der Pflanzen nach 21 Tagen (Mittelwerte von 10 resp. 12 Exemplaren):

Bestrahlte Cyanprobe 21 mm (11,8%)
 Unbestrahlte Cyanprobe 185 mm
 Bestrahlte Wasserprobe 46 mm (23,4%)
 Unbestrahlte Wasserprobe 196 mm

Versuch 86: Dritter Keimungstag (zweite Serie). Hauptprobe Wurzellänge 6 mm, Kontrolle 4 mm. Cyankalium: 10 ccm = 2,4 ccm AgNO₃. Vergiftungsdauer 80 Minuten. Dosis: 15 H. (7 Walter) aus 18 cm Distanz.

Länge der Pflanzen nach 45 Tagen (Mittelwerte von 10 resp. 13 Exemplaren):

Bestrahlte Cyanprobe 29,1 mm (13%)
 Unbestrahlte Cyanprobe 215 mm
 Bestrahlte Wasserprobe 133 mm (54%)
 Unbestrahlte Wasserprobe 243 mm

Versuch 76: Viertägige Keimung. Hauptprobe Wurzellänge 25 mm, Kontrolle 35 mm.

Cyankalium: 10 ccm = 3,5 ccm AgNO₃.

Bestrahlung 30 Minuten nach Beginn der Vergiftung. Letztere dauert insgesamt 45 Minuten.

Dosis: 13 H. (7 Walter) aus 16 cm Distanz.

Länge der Pflanzen 14 Tage danach:

Hauptprobe (10 Exemplare):

Bestrahlt 91,1 mm (53%)
 Unbestrahlt 172 mm

Kontrollprobe (13 Exemplare):

Bestrahlt 106 mm (55%)
 Unbestrahlt 192 mm

Ein Versuch nun wurde derart angestellt, daß der Einfluß zeitlich verschiedener Applikation des Giftes verglichen wurde: Vergiftung vor der Bestrahlung mit Giftapplikation erst nach erfolgter Bestrahlung.

**Versuch 67: Dreitägige Keimung. 8 mm Wurzellänge. Cyan-
kalium: 10 com = 2,4 com AgNO₃. 7 Exemplare werden in Giftlösung
versenkt, 7 in Wasser, nach 60 Minuten beide gleichzeitig bestrahlt [15 H.
(7 Walter) aus 18 cm Distanz]. Die Cyanprobe wird 72 Minuten nach der
Versenkung gewaschen, die eben bestrahlte Wasserprobe hinterher auf
72 Minuten in Cyanlösung gleicher Konzentration übertragen.**

Nach 45 Tagen Länge der
vorher vergifteten Probe 24,4 mm
nachher vergifteten Probe 82 mm
(Die Länge der unbestrahlten Probe betrug 215 mm.)

Die Länge der vor der Bestrahlung vergifteten Probe betrug also
29% der Länge der Kontrollprobe.

Diese Versuchsreihe zeigt deutlich, daß von einem hemmenden
Einflusse der Giftlösung auch nicht die Rede sein kann: die Werte
der Cyanproben zeigen im Gegenteil durchgehends stärkere
Röntgenschädigung als die der Kontrollen. Diese Differenzen
sind nur in einem Falle unwesentlich (76), in allen anderen er-
heblich.

Es ist zwar anzunehmen, daß das Gift nicht auf alle Exemplare gleich
stark wirkt. Auf Rechnung dieser Verschiedenheit lassen sich diese Befunde
jedoch schon deshalb nicht setzen, weil die unbestrahlten Giftproben eine
Hemmungswirkung im Wachstum fast durchwegs vermissen lassen. Eine Be-
einflussung der Bestrahlungsergebnisse durch Wärmestrahlung könnte für die
mit großer Distanz (20 cm, 18) ausgeführten Versuche keinesfalls in Frage
kommen, ist mit Rücksicht auf die stete Verwendung des Kienrußsäckchens
auch sonst abzulehnen. Durch letzteres war auch das Fluoreszenzlicht der
Röhre ausgeschaltet. Auch die sonstigen Lichteinflüsse waren stets für beide
Proben gleichartige und quantitativ niemals erhebliche (nie Tageslicht,
stets nur diffuses Licht künstlicher Beleuchtung in Entwicklungszimmer
und im Röntgenlaboratorium). Daß schließlich in den fast durchgehends
gleichsinnig verlaufenen Versuchen nur Zufälligkeiten der individuellen
Verschiedenheiten mitgespielt haben sollten, wird mir nach ausgedehnten
Erfahrungen anlässlich anderen Fragestellungen gewidmeter Sensibilisierungs-
versuche unwahrscheinlich. Die relativ geringen Schwankungen in der
Größe der einzelnen Exemplare einer Probe, wie sie z. B. in dem in extenso
wiedergegebenen Versuch 68 zum Ausdrucke kommen, entziehen diesem
Einwand jede Berechtigung.

Man gewinnt somit den Eindruck, daß sich in den mitgeteilten
Befunden eine stärkere Röntgenempfindlichkeit der mit Cyan-
ionen vorbehandelten Keimlinge ausspricht, wobei, wie Vers. 67
zeigt, die Vorbehandlung (d. h. die Anwesenheit des Stoffes in
den Geweben während der Bestrahlung) wesentlich erscheint.
Besondere Bedeutung erhalten diese Befunde durch die Tatsache,

daß Belichtung mit aktinischem Lichte die Giftwirkung der Cyanverbindungen für Pflanzen steigert [Czapek²⁷]. Ob — in Analogie dazu — in meinen Ergebnissen tatsächlich der Ausdruck einer Sensibilisierung zu erblicken ist, wird erst auf Grund weiterer — im Gange befindlicher — Untersuchungen entschieden werden können. Der prinzipiellen Feststellung, daß der biologische Effekt einer bestimmten Bestrahlung, einer Beeinflussung durch kurzdauernde pharmakologische Einwirkungen zugänglich ist, würde auch eine erhebliche praktische Bedeutung zukommen, wenn auch die in Rede stehende Substanz hierbei zufolge ihrer hohen Giftigkeit nicht in Frage kommt. Ich behalte mir daher eine weitere Verfolgung dieser hier nur im Rahmen der ursprünglichen Fragestellung mitgeteilten Befunde unter Heranziehung andersartigen (auch tierischen) Versuchsmaterials, anderer Cyan-derivate und von Substanzen, welche in chemischer oder physiologischer Hinsicht der Blausäure verwandt sind (Additionsfähigkeit, Reduktionsfähigkeit, Lähmung der Oxydationsfermente) vor. Besonders maßgebend für die Bewertung der hier mitgeteilten Befunde wird das Verhalten röntgenunempfindlicher Objekte sein. Denn nur, wenn es gelingt, auch diese für Bestrahlung empfindlich zu machen (wie die Pflanzen für das aktinische Licht durch Blausäure empfindlich werden), wird es möglich sein, in meinen Befunden den Ausdruck einer sensibilisierenden Wirkung zu erblicken.

IV. Anoxybiose.

Die Ergebnisse der beiden vorstehenden Versuchsreihen haben eine weitgehende Unabhängigkeit der Intensität der biologischen Röntgenreaktion von der Atmungsgröße, also auch von der Lebhaftigkeit der Verbrennungsprozesse aufgedeckt. Damit ist jedoch die eingangs aufgerollte Frage nach den Beziehungen der biologischen Röntgenwirkung zum Sauerstoff noch keineswegs erledigt. Wenn Downes und Blunt eine Abhängigkeit des Effekts aktinischen Lichtes gegenüber Bakterien von der Sauerstoffspannung fanden, so muß dies nicht auf dem Wege über die Atmungsvorgänge gegangen sein, sondern es wäre denkbar, daß das Licht an Körperbestandteilen selbständige Vorgänge oxydativer Natur einleitet, welche mit den körpereigenen Verbrennungsprozessen nur den Konsum von Sauerstoff gemeinsam haben.

Ganz ähnlich wird man sich ja den gleichfalls oxydativen lichtkatalytischen Vorgang der Zerstörung des Amöbenleibs durch die Eosinlichtwirkung vorstellen müssen und die dabei zu beobachtende Auflösung bereits abgestorbener Individuen kann dieser Auffassung zur Stütze dienen.

Derartige Vorgänge wären dann natürlich nicht an die Wirksamkeit der Verbrennungskatalysatoren des Plasmas geknüpft — daher könnten sie auch bei deren Lahmlegung durch KCN weiter laufen — und sie müßten auch nicht an die sonstigen Bedingungen der im Plasma ablaufenden Oxydationen gebunden sein — daher könnten sie als Lichtreaktionen auch bei Eistemperatur ablaufen.

Das einzige, was solche Vorgänge noch als oxydative charakterisieren könnte, wäre der Verbrauch von Sauerstoff, resp. die daraus sich ergebende Abhängigkeit des Reaktionsablaufs von der Anwesenheit von Sauerstoff, resp. von seiner Partialspannung.

Daraus ergibt sich für uns, daß wir nur aus einer strengen Nachahmung der Versuche von Downes und Blunt einen unmittelbaren Aufschluß über die Frage nach dem oxydativen Charakter der biologischen Röntgenreaktion gewinnen können. Es schien also geboten, auch noch eine weitere Art von künstlichem Schlaf, in den wir Keimlinge auf begrenzte Zeit versetzen können — die Anoxybiose —, in den Kreis meiner Untersuchungen zu ziehen. Ich mußte also bereits im Wachsen begriffene Keimlinge in sauerstofffreie Atmosphäre bringen, was nach Untersuchungen von Godlewski²⁸⁾, Nabokich²⁹⁾ und Palladin³⁰⁾ auf gewisse Zeit ohne Gefährdung des Lebens durchführbar ist, da die Pflanze mittlerweile den Sauerstoff ihrer Kohlenhydrate zu Atmungszwecken verbraucht. Deshalb ist die Kohlensäurebildung dabei nur eingeschränkt (bei dem von mir verwandten *Triticum* nach Palladin auf etwa die Hälfte), das Wachstum meist ebenfalls. Bei meinen Versuchen konnte ich komplette Unterdrückung desselben konstatieren (s. Vers. 31).

Ich mußte nun vor allem feststellen, ob derart der Sauerstoffzufuhr beraubten und dadurch in ihrem Wachstum vollkommen gehemmten Pflanzen noch die Fähigkeit zukommt, auf Bestrahlung in charakteristischer Weise zu reagieren.

Die Versuche wurden so durchgeführt, daß Keimlinge gleichen Alters und Wurzellänge in sauerstofffreie Atmosphäre gebracht wurden und nur ein Teil derselben der Wirkung der Röntgenstrahlen ausgesetzt wurde

Als Mittel zur Herstellung sauerstofffreier Atmosphäre wählte ich nach dem bekannten Vorgange Buchners die Absorption durch alkalische Pyrogallösungen. Ich bediente mich einer für diesen Zweck abgeänderten Modifikation der Buchnerereprouvette. Dies stellte ein 23 cm langes, 2 cm weites zylindrisches Rohr aus dünnstem Thüringerglas dar, dessen eine Ende offen war, während das andere nach einer flachgekrümmten rechtwinkligen Biegung in eine kugelförmige Auftreibung von 3,5 mm Durchmesser blind endigte, die dem Apparat eine Ähnlichkeit mit einer Retorte verlieh. Zur Aufnahme der Keimlinge diente eine 8 cm lange, gewöhnlich geformte Eprouvette von 1,5 cm Durchmesser aus dünnstem Thüringerglas. Die Keimlinge wurden in dieser auf mehrfachen Lagen, mit ausgekochtem Wasser befeuchteten Filtrierpapiers (welches nicht bis zum Rand der Eprouvette reichte) nebeneinander ausgerichtet, sodann in die von einem Stativ vertikal gehaltene Retorte rasch die Pyrogalllösung (0,025 in 5 ccm) und darauf 5 ccm Kalilauge (12%) eingeführt (was bei Verwendung einer Pipette und einer diese umgebenden Rolle aus Filtrierpapier ohne Benetzung des Retortenhalses gelingt), die Retorte im Stativ horizontal gekippt, die die Keimlinge enthaltende Eprouvette (Spitze gegen den Retortenkopf gerichtet) eingeführt und die Retortenhalsmündung abgeschmolzen oder durch Gummistopfen verschlossen und der Verschuß unter Schrägstellung des Retortenhalses in eine kleine Quecksilber oder Öl enthaltende Vorlage versenkt. Die Bestrahlung erfolgte sodann zu den in den Versuchsprotokollen angegebenen Zeiten, indem die zu bestrahlende Partie der Keimlinge durch einen Lokalisator (Gundelach-Speculum) herausgeblendet wurde.

Bei Öffnung verriet sich die Wirksamkeit der Absorptionallösung stets durch Zischen.

Ich lasse nun die Versuchsergebnisse folgen.

Versuch 9: 48stündige Keimung, Wurzellänge 14 mm. Gummi-Ölverschuß. Beginn der Bestrahlung 1 Stunde nach Einschluß. Öffnung 85 Minuten nach Einschluß. Dosis: 70 Milliampèreminuten (7 Walter) aus 12 cm Distanz (was nach vorheriger Ausdosierung 25 H.-Oberflächendosis entspricht).

Länge der Pflanzen nach 3 Wochen (je 11 Exemplare):

Bestrahlt	68,5 mm (= 24%)
Unbestrahlt	278 mm

Versuch 11: Zweitägige Keimung. Wurzellänge 5 mm. Verschuß durch Abschmelzen. Bestrahlung 1 Stunde nach Einschluß. Dosis: 30 Milliampèreminuten (7 Walter).

Länge der Pflanzen 17 Tage danach:

Bestrahlte Probe	134 mm (= 57%)
Kontrollprobe	234 mm

Versuch 13: Zweiter Keimungstag. Wurzellänge 5 mm. Verschuß durch Abschmelzen. Bestrahlung 2 Stunden danach. Dosis: 66 Milliampèreminuten bei 8 Walter.

Länge der Pflanzen 23 Tage danach:

Bestrahlte Probe	19,4 mm (= 6,8%)
Kontrollprobe	282 mm

Versuch 31: Zweitägige Keimung. Wurzellänge 3 mm. Bestrahlung 21 Stunden nach Einschmelzung. Dosierung (direkt) mit außerhalb der Keimlinge auf der Eprouvette aufliegenden Holzknecht-Sabouraud-Plättchen 32 H. (8 Walter).

Wurzellänge bei Öffnung der Röhre unverändert 3 mm!

Länge der Pflanzen 3 Wochen danach:

Bestrahlte Probe	47 mm (= 17%)
Kontrolle	269 mm

Das Ergebnis dieser Versuche bringt zunächst eine neuerliche Bestätigung der Unabhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit von gewissen Stoffwechselfvorgängen. Die, wie Vers. 31 zeigt, vollkommene Lahmlegung des Wachstums hat die Radiosensibilität intakt gelassen. Ebensowenig war die Einschränkung der Atmung auf etwa die Hälfte wirksam.

Die Versuche zeigen aber außerdem, daß auch Abwesenheit von molekularem Sauerstoff — eine die meisten Oxydationsvorgänge sistierende Bedingung — nicht imstande ist, die Radiosensibilität zu unterdrücken.

Für den Ablauf der biologischen Strahlenwirkung ist also (bei Keimlingen) die Anwesenheit molekularen Sauerstoffs durchaus nicht unerlässlich. Wir können uns dies nur so vorstellen, daß die der Röntgenschädigung zugrunde liegende Reaktion entweder überhaupt kein oxydativer Vorgang ist, oder aber, daß sie die Fähigkeit besitzt, auf Kosten intramolekularen Sauerstoffs zu verlaufen, eine Vorstellung, die sich auf gewisse Analogien im Bereiche der Photochemie (Edersche Lösung) stützen könnte.

Es wäre nun noch von Wichtigkeit, zu prüfen, ob sich bei Vornahme der Bestrahlung bei Sauerstoffabwesenheit nicht doch wenigstens im quantitativen Ausmaße, der Schädigung Differenzen gegenüber der Norm ergeben. Ich möchte anschließend nur kurz darauf hinweisen, daß ich auch diesbezüglich bereits einige Experimente angestellt habe, bei denen hintereinander in einer und derselben Eprouvette*) einmal eine Probe bei Sauerstoffabwesenheit und einmal eine Probe bei Sauerstoffzutritt bestrahlt wurden. Da nun trotz vorsichtigster (besonders auf Röhrenkonstanz gerichteter) röntgentherapeutischer Technik keine bindende Garantie dafür gegeben ist, daß der abgelesenen Oberflächendose stets der gleiche Tiefeneffekt entsprach, so können diese Experimente keine zwingende Beweiskraft beanspruchen, sondern nur als vorläufiger Versuch zur Orientierung dienen. Es ist aber immerhin auffallend, daß sich bei allen 5 Versuchen eine recht deutliche Verminderung des Strahleneffekts bei den anoxybiontisch bestrahlten Proben zeigte. Es sind Untersuchungen im Gange, die

*) Von anderer Konstruktion als der S. 17 beschriebenen.

bezwecken, dieser Fragestellung mit zuverlässiger Methodik gerecht zu werden. Falls sich derart die eben skizzierten Befunde bestätigen sollten, so würde dadurch die biologische Röntgenreaktion in bemerkenswerte Parallele zu biologischen Reaktionen des aktinischen Lichts, sowie gewissen photokatalytischen Laboratoriumsreaktionen mit lebenswichtigen Zellbestandteilen (Eisen-Mangankatalyse, Eosinlichtwirkungen) gebracht werden, denen sie sich bereits jetzt durch ihren ungewöhnlichen Temperaturkoeffizienten eng anschließen.

Die hier in Angriff genommene nähere Untersuchung der beim Keimungsvorgang beteiligten Faktoren auf ihren Anteil am Zustandekommen der Strahlenempfindlichkeit hat somit bisher ergeben, daß dem Atmungs Vorgang als solchem keine direkte Rolle dabei zukommt, da er ohne Einbuße an der letzteren unterdrückt werden kann. Das gleiche gilt für den Wachstumsvorgang.

Die Ursache für das Auftreten der Strahlenempfindlichkeit während der Keimung kann also nicht im Einsetzen der Atmung gelegen sein, sondern nur in gleichzeitig damit einhergehenden konstitutionellen Änderungen, wobei vorerst noch unentschieden bleibt, ob die Quellung der sonst unveränderten Bestandteile des ruhenden Samens hierfür ausreicht, oder ob auch die tiefgehenden chemischen Umwälzungen, die den Keimungsvorgang in Gang setzen und begleiten, durch Ausbildung eines lichtempfindlichen Systems (besonders eines Katalysators), das im ruhenden Samen in unwirksamer Form vorgebildet ist, dazu beitragen. Die Prüfung dieser Frage ist Gegenstand einer vor dem Abschluß stehenden eigenen Untersuchung, welche, in analoger Weise wie die vorliegende, die von pflanzenphysiologischen Erfahrungen gegebenen Anhaltspunkte ausgenützt und im wesentlichen zugunsten der chemischen Differenzierung als unersetzlichsten Faktor beim Zustandekommen der Radiosensibilität entschieden hat.

Es wird wohl gestattet sein, diese Auffassung über den Zusammenhang zwischen der Radiosensibilität einerseits und Atmung und Wachstum andererseits zu verallgemeinern und auch in anderen Fällen, wo rasches Wachstum mit Sensibilität einhergeht, den Zusammenhang als durch die Zusammensetzung der Gewebe und nicht durch funktionelle Momente bedingt zu sehen.

Das Bestehen eines Zusammenhangs zwischen Wachstum und Strahlenempfindlichkeit selbst wird jedoch durch meine Versuche in keiner Weise in Frage gestellt.

Aber auch die eingangs ausgesprochene Erwartung, daß es durch die hier dargelegten Versuchsanordnungen gelingen werde, Beiträge zur Kenntnis der Wesenheit der biologischen Strahlen-

reaktion zu erhalten, wurde durch die Resultate dieser Untersuchung nicht getäuscht.

Zunächst haben sie ergeben, daß Anwesenheit molekularen Sauerstoffs keine unerläßliche Bedingung dafür darstellt, daß jedoch seine Menge auf den Effekt der Bestrahlung möglicherweise von Einfluß sein kann. Sodann hat sich gezeigt, daß die Reaktion zu ihrem Zustandekommen auch das Mitspielen von körpereigenen Verbrennungsvorgängen nicht benötigt, vielmehr einen von der Atmung ganz unabhängigen, selbständigen Vorgang darstellt, der sich durch seinen Temperaturkoeffizienten als den photochemischen Laboratoriumsreaktionen verwandt darstellt und vermutlich nur in einer rein photochemischen Veränderung eines wichtigen Zellbausteins besteht, die nicht anders verläuft wie etwa die Auflösung eines toten Amöbenleibs durch Eosinlichtwirkung.

Literatur.

- ¹⁾ Körnicke, Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **22**, 148. — ²⁾ Schwarz, Mitt. a. d. Wiener Röntgenlaboratorium **1**. — ³⁾ Pfeffer, Pflanzenphysiologie. 2. Aufl. Leipzig 1904. — ⁴⁾ Lewith, Zentralbl. f. Physiol. **4**, 382. — ⁵⁾ Neuberg, diese Zeitschr. **13**, 305; **17**, 270; **27**, 210; **29**, 279; **33**, 158. — ⁶⁾ Downes und Blunt, Proc. of the Roy. Soc. 1877, S. 488 u. 1878, S. 199. — ⁷⁾ Tappeiner-Jodlbauer, Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. Leipzig 1907. — ⁸⁾ Hertel, Zeitschr. f. allg. Physiol. **4**, **5**, **6**. — ⁹⁾ Meyer, Strahlentherapie I, H. 4. — ¹⁰⁾ Bering, ibid. III, S. 636. — ¹¹⁾ Schwarz, Münch. med. Wochenschr. 1909, Nr. 24. — ¹²⁾ Schmidt, H. E., Kompendium der Röntgentherapie. 3. Aufl. Berlin 1913. S. 101. — ¹³⁾ Schönfeld, Fortschr. a. d. Geb. d. Röntgenstr. **22**. — ¹⁴⁾ Wetterer, Handbuch der Röntgentherapie 1913/14. — ¹⁵⁾ Wolkow und Meyer, Landwirtschaft. Jahrb. **3**. — ¹⁶⁾ Bonnier und Mangin, Ann. scienc. nat. **17**, 266. — ¹⁷⁾ Clausen, Landwirtschaft. Jahrb. 1890, S. 897. — ¹⁸⁾ Detmer, Botan. Ber. **10** und Vergleichende Physiologie des Keimungsprozesses. Jena 1880. — ¹⁹⁾ Friedrich und Krönig, Die physikalischen und biologischen Grundlagen der Strahlentherapie 1918. — ²⁰⁾ Goldberg, Zeitschr. f. physikal. Chemie **41**, **9**; **45**, 512; **51**, 327. — ²¹⁾ Eder und Valenta, Beiträge zur Photochemie II. — ²²⁾ Plotnikow, Photochemie. Halle 1910. — ²³⁾ Pfeiffer, H., Wien. klin. Wochenschr. **18**, 221. — ²⁴⁾ Neuberg, Biochem. Zeitschr. **29**, 292. — ²⁵⁾ Schroeder, Jahrb. f. wissensch. Botanik **44**, 409. — ²⁶⁾ Schaer, Chem. Centralbl. 1885, S. 862. — ²⁷⁾ Czapek, Biochemie der Pflanzen. 2. Aufl. Jena 1913. Bd. I, S. 197. — ²⁸⁾ Godlewski und Polzeniusz, Bull. de l'acad. de sc. Cracow 1897. — ²⁹⁾ Nabokich, Ber. d. Botan. Ges. **21**. — ³⁰⁾ Palladin und Kostytschew, Zeitschr. f. physiol. Chemie **48**, 214.

Kolloidstudien über den Bau der roten Blutkörperchen und über Hämolyse. III.

Ultramikroskopische Untersuchungen an Lipoiden.

Von

Kenzo Hattori (Tokio).

(Aus dem Institut für Kolloidforschung zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 8. April 1921.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

Lecithin und Cholesterin, beide Lipoiden, haben sehr verschiedene Eigenschaften. Ersteres ist amorph, quellbar, ein chemisch labiler Körper, während das andere krystallinisch, unquellbar, chemisch ziemlich indifferent ist. Beide so ungleichartige Stoffe kommen in der Zelle meist gemeinsam vor und fungieren scheinbar als einheitliche Substanz. Insbesondere die Lipoidtheorie, welche die Aufnahme von Stoffen durch die Zelle auf Grund der Löslichkeit in den Lipoiden behandelt, unterscheidet nicht zwischen Lecithin und Cholesterin. Eine umfangreiche Literatur¹⁾ weist daraufhin, daß bei gewissen Hämolysen das Lecithin bzw. Cholesterin als die einzigen Angriffspunkte in der Zelle zu betrachten sind: z. B. Cholesterin für Saponin (nach Ransom), Lecithin für Kobragift (nach Kyes) u. a. Hiernach dürfen wir fragen: Wie bewirkt diese Reaktion die Zerstörung des ganzen Zellsystems? Nach den im „Institut für Kolloidforschung“ gemachten Erfahrungen²⁾ besteht eine hohe Wahr-

¹⁾ Ransom, Dtsch. med. Wochenschr. 1901, S. 194. — Kobert, Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanz. Stuttgart 1904. — Noguchi, University of Penna. Med. Bull. Nov. 1902. — Kyes, Berl. klin. Wochenschrift 1902, S. 886. — Kyes und Sachs, Ebenda 1903, S. 21. — Pascucci, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 6, 552. 1905. — R. Höber, Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe 1914, S. 409.

²⁾ Vgl. Bechhold, Bau der roten Blutkörperchen u. Hämolyse. Münchener med. Wochenschr. 1921, Nr. 5.

scheinlichkeit, daß diese Wirkung bedingt ist durch die Veränderung des zwischen den Komponenten des betreffenden Systems bestehenden physiko-chemischen Zusammenhangs.

Insbesondere für das Studium des Baues der Erythrocyten und der Hämolyse schien es uns daher wichtig, gewisse Eigenschaften der beiden Lipide getrennt und in Kombination zu studieren, besonders im Licht der Kolloidforschung. Kolloidstudien über Lipide finden sich nicht viele in der Literatur. Porges und Neubauer¹⁾ ermittelten das Verhalten der Lecithin- und Cholesterinsuspensionen gegenüber zahlreichen verschiedenen Reagentien in bezug auf deren Ausflockungsvermögen und von Loewe²⁾ wurden die Lipoidlösungen in verschiedenen Lösungsmitteln wie auch Lipoidverbindungen mit verschiedenen Substanzen (Farbstoffe, Hypnotica usw.) charakterisiert.

Die erste Frage ist, in welchem Zustand befinden sich die Lipide in der lebenden Zelle. Lecithin ist ein quellbares Lipoid, dessen Quellungsgrad, wie der anderer quellbarer hydrophiler Substanzen, je nach den physikalischen und chemischen Bedingungen veränderlich ist. Es ist von vornherein anzunehmen, daß Lecithin einen bestimmten Quellungsgrad in der lebenden Zelle besitzt. Obwohl dieser Quellungsgrad noch nie ermittelt wurde, ist es als wahrscheinlich zu betrachten, daß er nicht maximal ist, weil Lecithin in destilliertem Wasser viel stärker quillt als in physiologischer Kochsalzlösung, welche mit Blutkörperchen isotonisch ist. Will man also das Verhalten des Lecithins in der lebenden Zelle aufklären, so müssen solche Vorgänge beobachtet werden, welche sich am vitalen Quellungs- zustand abspielen.

Deshalb kann das Verhalten, welches Porges und Neubauer an Lecithinsuspensionen (maximaler Quellungs- zustand) ermittelt haben, nicht in Parallele gesetzt werden mit Lecithin *in vitam*. Beispielsweise quillt das in physiologischer Kochsalzlösung gequollene Lecithin weiter durch Verdünnung mit Wasser, während das mit Wasser gequollene Lecithin in Berührung mit derselben Salzkonzentration entquillt. An den Lecithinlösungen hingegen ruft Wasser bzw. physiologische Kochsalzlösung keine sichtbare Veränderung hervor. In vorliegender Arbeit wurde

¹⁾ Porges und Neubauer, diese Zeitschr. 7, 152. 1907.

²⁾ S. Loewe, diese Zeitschr. 42, 183 u. 207. 1912.

die unmittelbare Wirkung verschiedener Agentien auf Lipoidstudiert.

Verwendet wurde Lecithin und Cholesterin von Merck. Als Ultramikroskop standen Kardiod-Kondensator, Objektiv X und Komp. Okular 18 zur Verfügung. Beleuchtung: Elektrische Bogenlampe mit vorgeschalteter Kupfersulfatlösung.

Experimenteller Teil.

I. Lecithin.

Befeuchtet man ein Ausstrichpräparat von Lecithin unter dem Ultramikroskop und stellt auf den Rand des Präparates ein, so bemerkt man zahlreiche Auswüchse, die sich allmählich vergrößern: das Lecithin quillt. Ist die Wassermenge genügend, so zerteilt sich das gequollene Lecithin nach einiger Zeit von selbst in zahllose Mikrokügelchen, von denen die kleinsten lebhaft Brownsche Bewegung zeigen. Legt man ein Klümpchen Lecithin auf den Boden eines Reagenzglases, gießt etwas Wasser darauf und läßt es ruhig stehen, so quillt das Lecithin und in einigen Stunden wird die maximale Quellung erreicht. Dieses gequollene Lecithin bleibt, falls man Erschütterung vermeidet, in Form des gequollenen Klümpchens am Boden des Reagenzglases. Schüttelt man jedoch das Gläschen, so verteilt es sich im Wasser und es entsteht eine Lecithinemulsion, ähnlich der, welche im vorigen Versuch ultramikroskopisch beobachtet ist. Stellt man den gleichen Versuch mit physiologischer oder hypertotonischer Kochsalzlösung an, so ist der Verlauf ungefähr der gleiche, aber der Quellungsgrad ist je nach der Konzentration des Kochsalzes verschieden. Die Quellung ist um so geringer, je höher die Salzkonzentration. Bei höheren Kochsalzkonzentrationen (ca. von 3% ab) tritt die Dispersion des Lecithin nicht mehr auf, d. h. wenn auch durch äußere mechanische Kraft eine Verteilung bewirkt wird, so setzt sich das Lecithin doch wieder am Gefäßboden ab.

Diese Behandlung von wasserfreiem Lecithin mit Salzlösungen ist das Gegenstück zu der Behandlung von wässriger Lecithinsuspensionen mit Salzen. In z. B. 5%iger Kochsalzlösung kann man noch eine starke Quellung von Lecithin ultramikroskopisch erkennen, aber seine Emulsionsfähigkeit bleibt in dieser Salzkonzentration aus; es wird sogar davon ausgeflockt. Somit ist wohl anzunehmen, daß Lecithin die Emulsionsfähigkeit erst von einem gewissen Quellungsgrad ab erreicht und daß das ausgesalzene Lecithin mehr oder weniger gequollen ist.

Die Resultate von ultramikroskopischen Quellungsversuchen unter Zusatz einiger differenter Substanzen sind in folgender Tabelle wiedergegeben.

Ultramikroskopische Bilder der Lecithinquellung und des dispersen Zustands siehe in Abb. 1 und 2.

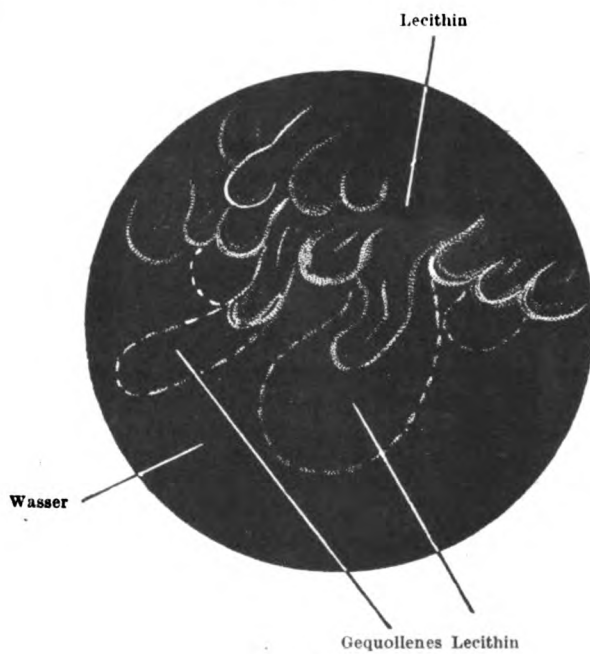


Abb. 1.

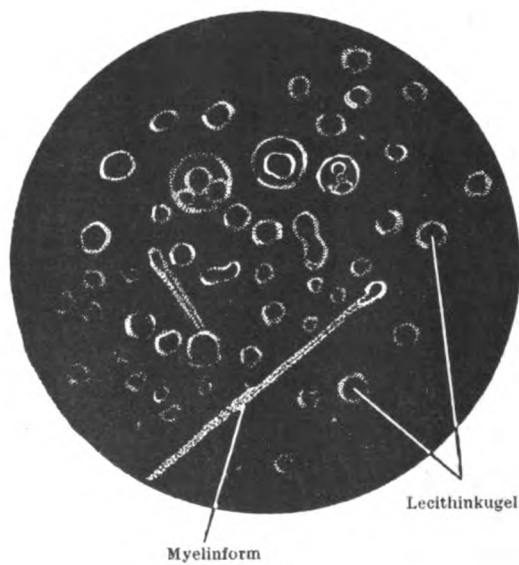


Abb. 2.

Tabelle I.

Quellungsmittel	Quellung
destilliertes H ₂ O	++
physiologische NaCl-Lösung	++
HgCl ₂ (1 : 400 physiologische NaCl-Lösung)	++
HgCl ₂ (1 : 400 Aq.)	++
HgCl ₂ (1 : 25 Aq.)	+
Aceton	-
Aceton (1 : 2 Aq.)	+
Saponin (1 : 100 Aq.)	+

++ stark + schwach

II. Cholesterin.

Läßt man einen Tropfen alkoholischer Cholesterinlösung (0,2%) auf einem Deckgläschen verdunsten und ultramikroskopiert die gebildeten Mikrokrystalle mit Wasser, Salz- und Saponinlösung usw. wie in dem vorigen Versuche, so beobachtet man keine Veränderung: Das Cholesterin ist gegen solche Agentien völlig indifferent.

III. Lecithin-Cholesterin-Gemisch.

1. Herstellung.

Wir haben versucht, ein optisch homogenes Gemisch aus beiden Bestandteilen durch Verdunstung seiner alkoholischen Lösung herzustellen. 1,5 Teile Lecithin und 1,0 Teil Cholesterin werden in 200 Teilen absolutem Alkohol gelöst; davon bringt man einen Tropfen auf ein Deckgläschen und läßt verdunsten. Um einen homogenen Rückstand zu erzielen, darf man den Tropfen nicht vollkommen eintrocknen lassen. Alkohol zieht Wasser aus der Luft, welches nach Verdunstung des Alkohols die Entmischung des Lecithin-Cholesteringemisches verursacht. Deshalb haben wir auf verschiedene Weise versucht, dies zu verhindern und sind zuletzt dazu gekommen, mit einem Stück Fließpapier den überschüssigen Alkohol von dem Rande des Deckglases wegzunehmen. Durch diese Methode kann man leicht homogene Präparate erzielen. Lecithin muß stets im Überschuß über Cholesterin sein (1,5 : 1,0)¹⁾. Bei dem Verhältnis von 1 : 1 begegnet man stets Schwierigkeiten.

Ein in dieser Weise hergestelltes, mit Lecithin-Cholesteringemisch bedecktes Deckgläschen erscheint unter dem Ultramikroskop dunkel und ist optisch homogen. Manchmal sieht man allerdings ultramikroskopisch kaum sichtbare, gleichmäßig verteilte, grauweiße Pünktchen (Abb. 3). Diese Pünktchen sind, wie später gezeigt wird, nichts anderes als Submikronen von Cholesterin. Sie bilden sich nach unserer Erfahrung, wenn man die alkoholische Lösung zu langsam verdunsten läßt. Mikrokrystalle sind es nicht, sondern kolloide Teilchen (siehe Abschnitt IV).

¹⁾ Die Mengenverhältnisse von Lecithin und Cholesterin in den roten Blutkörperchen verschiedener Säugetiere sind ungefähr 1 : 1 bis 7,5 : 1,0 (nach Abderhalden).

2. Lecithin-Cholesteringemisch in größerer Menge.

Wenn man die konzentrierte, alkoholische Lösung von Lecithin (1,5 Teile) und Cholesterin (1,0 Teil) bei Temperaturen unter 50°C unter stetigem Umrühren verdunsten läßt, so erhält man einen makroskopisch



Abb. 3.

homogenen Rückstand. Hierbei ist besonders darauf zu achten, daß lebhaft gerührt wird, sonst scheidet sich das Cholesterin im kristallinen Zustand aus. Der Rückstand soll makroskopisch homogen und halb durchsichtig sein, ultramikroskopisch bildet er allerdings meistens eine nur scheinbar homogene Masse.

3. Ultramikroskopische Prüfung des obigen Gemisches.

Das ultramikroskopische Bild des vorstehenden Gemisches zeigt keine optische Homogenität, sondern die Mikro-

heterogenität, welche von den in Lecithin gleichmäßig verteilten, feinen Cholesterinteilchen herrührt. Nach unserer Kenntnis hängt die Größe dieser Cholesterinteilchen, die außerordentlich fein sein können, oder relativ grob, von den Abdunstungsbedingungen ab. Allerdings sind diese Partikel nur



Abb. 4a.

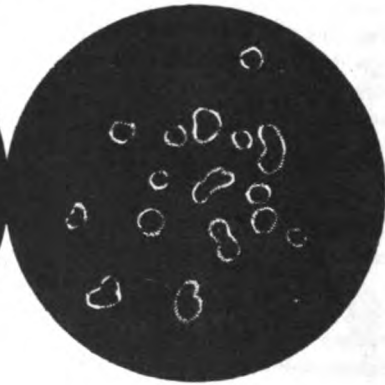


Abb. 4b.

in den Präparaten sichtbar, bei denen die in dem Gesichtsfeld befindliche Substanzmasse ziemlich groß ist (Abb. 4a), während diejenige von ungefähr Blutkörperchengröße keine Inhomogenität erkennen läßt (Abb. 4b). Der Grund dafür dürfte auf physiologisch-optische Erscheinungen zurückzuführen sein. Die Helligkeit der Teilchen wird durch gegenseitige Beleuchtungen verstärkt, daher hängt die Sichtbarkeit von ihrer Massen-

haftigkeit ab. Analogerweise ist es sehr schwer, im dunklen Nachthimmel einen einzigen schwach leuchtenden Stern zu finden, leicht ist hingegen, die Gruppe derselben zu bemerken; auch überstrahlt, bei kleinen Präparaten, der helleuchtende Rand die schwach leuchtenden Partikel im Innern.

Wie schon im vorigen Abschnitt erwähnt ist, besitzt das auf dem Deckgläschen hergestellte Gemisch zuweilen auch solche Partikelchen.

4. Cholesterin löst sich in Lecithin.

Man bringt auf einen Objektträger etwas Lecithin bzw. teilweise gequollenen Lecithin¹⁾ in dünner Schicht; ferner läßt man einen Tropfen

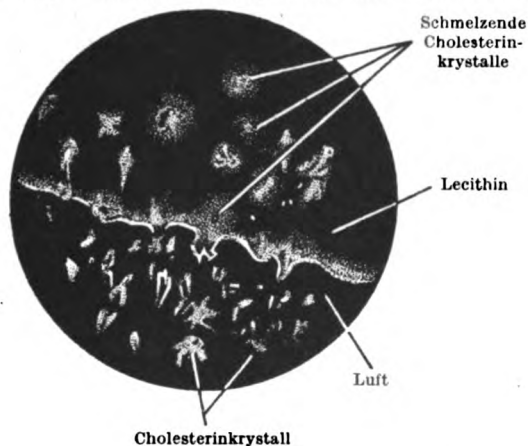


Abb. 5.

alkoholische Cholesterinlösung (0,2%) auf einem Deckglas verdunsten und auskristallisieren. Hierauf werden die beiden Gläser ohne Druck aufeinander gelegt und ultramikroskopiert. Die Cholesterinkryställchen beginnen hier und dort zu schmelzen wie Wachs durch Hitze und verschwinden schließlich nicht ganz, aber fast spurlos; kaum sichtbare Abdrücke lassen sie zurück. Diese scheinen aus zahllosen äußerst kleinen Pünktchen zu bestehen und nur sehr langsam zu dispergieren (Abb. 5).

Lecithin und Cholesterin bilden somit ein disperses System; Lecithin als Dispersionsmittel, Cholesterin als disperse Phase. Das disperse System ist das gleiche, ob es aus alkoholischer Lösung oder durch direkte Mischung entstanden ist.

IV. Das Lecithin-Cholesterin-Gemisch (Deckglas-Präparate)

(siehe Abschnitt III, 1).

1. Destilliertes Wasser.

Beobachtet man ultramikroskopisch ein Präparat²⁾ mit einem Tropfen Wasser, so bleibt das Gesichtsfeld zunächst dunkel, aber nach einigen

¹⁾ Um dies herzustellen werden ca. 2 Teile Lecithin mit ca. 1 Teil Wasser fest zusammengerieben. Für vorliegenden Zweck wählt man besser das gequollene Lecithin.

²⁾ Man vermeide jeden mechanischen Druck auf das Deckglas.

Minuten lösen sich am Rand schwach leuchtende gequollene Lecithinteilchen los, bald in Kugelform von verschiedener Größe, bald in Myelinform. Gleichzeitig bemerkt man auch, daß viele helleuchtende Cholesterinpartikel durcheinander mit Lecithinkügelchen lebhaft tanzend auftreten.

Tanzende Cholesterinpartikel in Lecithinkugel

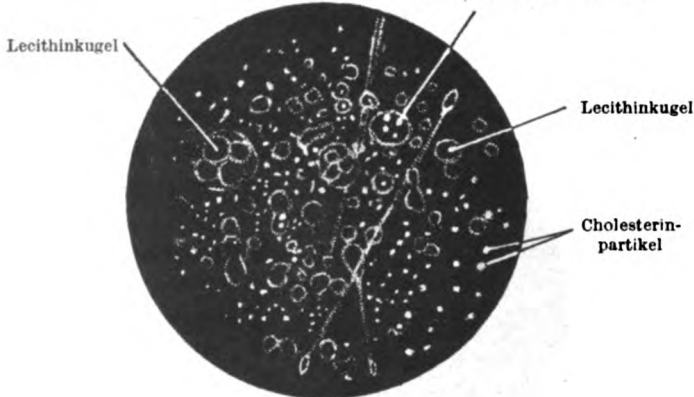


Abb. 6.

Außerdem beobachtet man oft, aber nicht immer, daß ein oder mehrere Cholesterinpartikel innerhalb der einzelnen Lecithinkügelchen verharren und lebhaft darin tanzen. Das Aussehen ist ungemein ähnlich dem bei der Hämolyse von Blutkörperchen durch Wasser und Sublimat (Abb. 6)¹⁾.

Diese Erscheinung ist nichts anderes als eine Entmischung von Lecithin und Cholesterin, bedingt durch die Quellung des Lecithin im Wasser.

2. Physiologische Kochsalzlösung (0,85 proz.).

Wird physiologische Kochsalzlösung an Stelle des destillierten Wassers in dem vorigen Versuch angewendet, so ist die Erscheinung ganz anders. Auch in diesem Falle treten die gequollenen Lecithinkügelchen auf; das einzelne Kügelchen ist stärker leuchtend, jedoch sind keine Cholesterin-

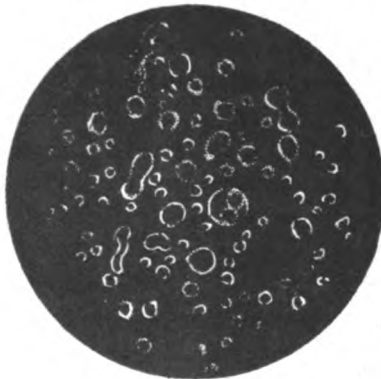


Abb. 7.

partikel sichtbar: mit anderen Worten, die Entmischung bleibt völlig aus (Abb. 7). Dies zeigt, daß das Lecithin-Cholesteringemisch von Wasser und Salzlösung verschieden beeinflußt wird. Durch die Einwirkung des Wassers zerlegt sich das Lecithin-Cholesterin-

¹⁾ Vgl. Bechhold und Kraus, diese Zeitschr. 109, 226. 1920.

gemisch in seine Komponenten, nicht aber durch physiologische Kochsalzlösung.

3. Um diese Beobachtung zu bestätigen, haben wir noch folgendes versucht. In zwei kleine Reagenzgläser bringt man etwas Lecithin-Cholesterin, hergestellt nach der in Abschnitt III, 2 beschriebenen Methode, setzt dazu reichlich Wasser resp. physiologische Kochsalzlösung und läßt einige Stunden ruhig stehen. Dann rührt man sorgfältig den Inhalt beider Reagenzgläser mit einem Glasstab um, bis man eine Emulsion erhalten hat. Werden nun die beiden Emulsionen ultramikroskopisch untersucht, so findet man das gleiche Ergebnis wie beim Deckglaspräparat: die wässrige Emulsion besteht aus drei Phasen (Wasser, Lecithinkugeln, Cholesterinpartikel), während die in physiologischer Kochsalzlösung nur zwei Phasen (Salzlösung, Lecithin-Cholesterinkügelchen) besitzt. Auch hier leuchtet die Lecithinkugel nur schwach und die Lecithin-Cholesterinkugel stärker. Die Erscheinung ist gleich der bei der Hämolyse, durch Wasser, hypotonische Kochsalzlösung oder Sublimat, wo in und um das Körperchen zahllose, hellleuchtende, tanzende Pünktchen auftreten (Bechhold und Kraus l. c.), die den erwähnten Cholesterinpartikeln ganz ähnlich sind (Abb. 6, 7).

Diese Ähnlichkeit drängt zu der Annahme, daß die Entmischung zur Hämolyse in enger Beziehung steht.

4. Mit Lipoiden imprägniertes Papier.

Einmal hat Pascucci¹⁾ künstliche Lipoidmembranen hergestellt und ihre Permeabilität gegenüber Haemolytica untersucht. In jener Arbeit wurde das Verhalten der Lipoidmembranen hauptsächlich makroskopisch geprüft. Unser Ziel war, das Lipoidgemisch in Membranform ultramikroskopisch zu untersuchen, um zu sehen, ob dieselben Vorgänge, wie an dem bloßen Gemisch durch Wasser bzw. Kochsalzlösung hervorgerufen werden.

Wir tränkten Reispapier mit jener alkoholischen Lösung von Lecithin und Cholesterin und ließen an der Luft trocknen. Ein Stückchen dieses imprägnierten Papiers wurde in ein Uhrglas gelegt und mit etwas Wasser oder Salzlösung überdeckt. Nach einiger Zeit wurde eine Probe Flüssigkeit herausgenommen und unter dem Ultramikroskop geprüft. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle II enthalten.

Man sieht, daß die Lipoide sich in physiologischer Kochsalzlösung weit langsamer von dem Papier loslösen als in reinem Wasser. Sekundär erfolgt dann im Wasser die Entmischung des Cholesterins vom Lecithin, die in physiologischer Kochsalzlösung ausbleibt.

V. Definition der Entmischung im engeren Sinne.

Wie schon oben erwähnt wurde, dürfte Cholesterin disperse Phase im Lecithin als Dispersionsmittel sein. Zugleich muß man wiederum betonen, daß dasselbe weder ein einfaches mechanisches Gemisch noch eine homogene feste Lösung ist. Wie ultramikroskopisch beobachtet, quillt zunächst das Gemisch durch die Einwirkung des Wassers bis die Konsistenz des gequollenen Lecithins so vermindert ist, daß die Cholesterinteilchen Brownsche

¹⁾ Pascucci, Beitr. z. chem. Pathol. u. Physiol. l. c.

Tabelle II.

Versuche mit imprägniertem Papier. 4 ccm des imprägnierten Reispapiers für jeden Versuch.

Lecithin 1 Teil : Cholesterin 1 Teil.

Versuchsnummer	Destilliertes Wasser			Physiol. NaCl-Lösung (0,86%)		
	Menge ccm	Wirkungsdauer	ultramikr. Bild	Menge ccm	Wirkungsdauer	ultramikr. Bild
1				1	30 Min.	Kügelchen —
2				1	30 Min.	Kügelchen —
3	0,2	30 Min.	Lecithin-Kugeln + + + Chol.-Partikeln + +	0,2	30 Min.	Kügelchen + Chol.-Partikeln —
4	0,2	1 Std.	Lecithin-Kugeln + + + Chol.-Partikeln + +	0,2	1 Std.	Kügelchen + + Chol.-Partikeln —
5	0,2	1½ Std.	Lecithin-Kugeln + + + Chol.-Partikeln + +	0,2	1½ Std.	Kügelchen + + + Chol.-Partikeln —
6	0,2	3 Std.	Lecithin-Kugeln + + + Chol.-Partikeln + +	0,2	3 Std.	Kügelchen + + + Chol.-Partikeln —
7	0,2	5 Std.	Lecithin-Kugeln + + + Chol.-Partikeln + +	0,2	5 Std.	Kügelchen + + + Chol.-Partikeln —

+ + + viel, + + wenig, + Spur, — 0. Blinde Versuche, die nur mit Papier und H₂O ausgeführt wurden, ließen nichts erkennen.

Beweglichkeit annehmen können. Solch ein Verschwinden des physikochemischen Kolloidzusammenhangs zwischen den beiden Substanzen nennen wir „Entmischung“.

Die Entmischung wird experimentell dadurch festgestellt, daß man unter dem Ultramikroskop bei Behandlung des Gemisches mit den in Betracht kommenden Lösungen die Cholesterinteilchen aufleuchten und in Brownsche Bewegungen übergehen sieht.

VI. Entmischung und Salzkonzentration.

Unsere Erfahrung lehrte uns, daß die Entmischung im wesentlichen vom Quellungsgrade des Lecithin herrührt und der Quellungsgrad von der Salzkonzentration abhängig ist. So haben wir mit Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration die Entmischung ultramikroskopisch ermittelt.

Tabelle III.

NaCl-Konz. %	Entmischung
0,3	+
0,4	+
0,5	+
0,6	?
0,7	—
0,8	—
5,0	—

Danach ist eine Entmischung nur in Konzentrationen unter 0,5% erkennbar. Bei 0,6% ist sie undeutlich.

VII. Entmischung durch verschiedene isosmotische Salzlösungen.

Die folgende Tabelle zeigt die Verhältnisse bei anderen Salzlösungen, die mit physiologischer Kochsalzlösung theoretisch isosmotisch sind. Ein Stück erbsengroßes Lecithin-Cholesterin wird in ein Reagensglas getan und demselben 5 ccm Salzlösung zugesetzt.

Tabelle IV.

Salzlösung (theoretisch isosmotisch mit 0,85 Proz. NaCl-Lösung)	Entmischung (nach 24 ^h beobachtet)
NaCl	—
Na ₂ CO ₃	—
Na ₂ SO ₄	—
NaNO ₃	+
KJ	±
Ringersche Lösung	—
HgCl ₂ (2,6 Proz.)	+
+ schwach	± Spur

Aus dieser Versuchsreihe kann man den Schluß ziehen, daß bei theoretischer Isotonie der verschiedenen Salzlösungen der Entmischungsvorgang verschieden ist. Mit anderen Worten, die Quellbarkeit von Lecithin hängt nicht nur von den Salzkonzentrationen, sondern auch von der Art der Ionen ab. Lyotrope Gesetzmäßigkeit herrscht offenbar auch hier.

VIII. Einfluß des Sublimats (in Gegenwart von NaCl) auf die Entmischung.

Besonders interessant ist die Einwirkung des Sublimats auf die roten Blutkörperchen¹⁾. Deshalb wurde auch die Wirkungsweise des Sublimats auf Lecithin-Cholesterin ermittelt.

Sublimatkonzentration 1 : 1000 heißt hier 1 Gewichtsteil in 1000 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Tabelle V.

HgCl ₂ -Konzentration	Entmischung
1 : 1000	—
1 : 2400	—
1 : 5000	—
1 : 10 000	—
1 : 50 000	—
1 : 100 000	—

} Ultramikroskopische Bilder
sind gleich den mit physiologischer NaCl-Lösung behandelten.

Hier ist kein besonderer Einfluß des Sublimats auf die Lipide erkennbar.

¹⁾ Vgl. Bechhold, Arbeiten aus dem Institut für experimentelle Therapie und dem Georg Speyer-Hause zu Frankfurt a. M. H. 11. 1920.

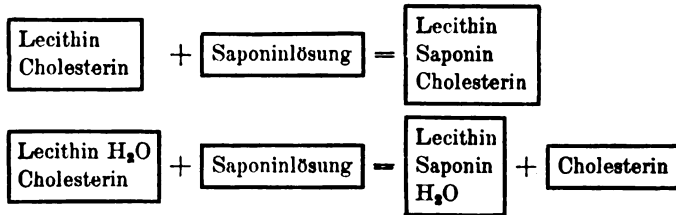
IX. Einwirkung von Saponin auf Lecithin-Cholesterin.

Die Einwirkung von Saponin auf Lecithin-Cholesterin wurde berücksichtigt, da Saponin ein hervorragendes Hämolyticum ist. Es wurde ein Tropfen der Lösung (1 Teil Saponin in 1000 Teilen physiologische NaCl-Lösung) auf ein Deckglaspräparat gebracht. Das entstehende ultramikroskopische Bild erscheint nur mäßig hell leuchtend und weist eigenartige, feine Mikrostruktur auf, die an die mit einer Lupe vergrößerte Schnittoberfläche des Gußeisens erinnert. Dieses Bild bleibt stundenlang unverändert, ohne daß Lecithin- oder Cholesterinpartikel frei werden. Wird ein Tropfen Wasser am Rand des Deckglases zugegeben, so kommen die schwach leuchtenden Lecithinkügelchen und mehrere größere helleuchtende Bruchstücke schwimmend hervor. Klopft man leicht an das Präparat, so wird die zuerst gesehene Mikrostruktur von dem Deckglas frei. Es macht den Eindruck, daß Lecithin-Cholesterin durch Saponin koaguliert und vorübergehend unquellbar geworden. Wenn dies der Fall ist, so fragt es sich, welcher Bestandteil, Lecithin oder Cholesterin, mit Saponin in Reaktion tritt. Darüber geben die nächsten Versuche Auskunft.

Ein Tropfen der alkoholischen Lecithinlösung (0,5 proz.) wird auf einem Deckglas verdunstet und dann ein Tropfen der Saponinlösung dazu gegeben. Dieses Präparat zeigt unter dem Ultramikroskop ein Bild, das dem obigen fast gleicht, nur weniger hell ist. Hingegen bleibt ein Mikropräparat mit Cholesterin stets unverändert mit Saponin. Somit ist es das Lecithin, welches mit Saponin in Reaktion trat. Allerdings, soweit Lecithin-Cholesterin ein Kolloidsystem ist, dürfte der disperse Zustand des Cholesterins von dem Saponin als sekundäre Reaktion beeinflußt werden: Das Zusammenreffen von Saponin und Lecithin (primäre Reaktion) kann als die Ursache der Cholesterinausflockung (sekundäre Reaktion) betrachtet werden.

Nun liegt die Sache ganz anders, wenn man die obigen Versuchsanordnungen in der Weise verändert, daß die Saponinlösung zu einem Präparat zugesetzt wird, welches vorher mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt war. In diesem Falle tritt die Entmischung auf, im Gegensatz zum ersten Versuch.

Die Lösung für diesen Widerspruch wird sich aus den Versuchen im nächsten Abschnitt ergeben. Hierbei ist auf folgendes aufmerksam zu machen. Bei dem ersten Versuch hat Saponin auf das ungequollene Lecithin-Cholesterin eingewirkt, während es bei dem letzten Versuch auf gequollenes Lecithin-Cholesterin eingewirkt hat; schematisch läßt sich der Vorgang (in physiologischer Kochsalzlösung) folgendermaßen darstellen:



X. Einfluß der Saponinkonzentration.

Tabelle VI.

(Am Deckglaspräparat.)

Saponin: physiol. NaCl-Lsg.	Ultramikroskop. Beobachtung
1 : 5000	Koagulation; Quellung schwach.
1 : 10 000	Cholesterinausflockung; etwas Quellung.
1 : 20 000	„ „ „
1 : 50 000	Lecithinkugel; tanzende Cholest.-Partikel.
1 : 100 000	Kügelchen; keine tanzende Partikel.

Daraus folgt, daß bei der Verdünnung 1 : 50 000 die Entmischung auftritt, was uns jenen antagonistischen Vorgang im vorigen Abschnitt aufklärt, weil alsdann die Saponinlösung durch Quellungswasser des Lecithin-Cholesterin allmählich verdünnt einwirkt und möglicherweise sich der Entmischungsverdünnung (1 : 50 000) nähert.

XI. Entmischung und Hämolyse.

Zur Aufdeckung der Beziehungen zwischen Entmischung und Hämolyse haben wir einige Versuche gemacht, bei welchen parallel mit Lecithin-Cholesterin der Vorgang an roten Blutkörperchen verglichen wurde (Tabelle VII—XI).

Tabelle VII. NaCl-Lösung.

NaCl %	Lecithin-Cholesterin		Hammel-Blutkörperchen	
	Entmischung	tanzende Chol.-Partikeln	Hämolyse	tanzende Chol.-Partikeln
0,3	+	+	+	+
0,4	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+
0,6	?	—	+	—
0,7	—	—	+	—
0,8	—	—	—	—

Das Auftreten der Cholesterinpartikel geht in beiden Fällen parallel.

Tabelle VIII. Isosmotische Salzlösungen.

Salzlösung (theoretisch isotonisch mit 0,85 Proz. NaCl-Lösung)	Entmischung nach 24 Std. beobachtet	Hämolyse	
		nach 80 Std. beobachtet	nach 50 Std. beobachtet
NaCl	—	—	—
Na ₂ CO ₃	—	—	+
Na ₂ SO ₄	—	—	—
NaNO ₃	+	—	+
KJ	+	+	+
Ringersche Lösung	—	—	—
HgCl ₂ 26%	+	+	+

Hierbei zeigt sich grobe Übereinstimmung.

Tabelle IX.
Chlorcalcium.

CaCl ₂ %	Lecithin-Cholesterin		Blutkörperchen	
	Entmischung nach 6 Std. beobachtet	tanzende Chol.-Partikeln	Hämolyse nach 24 Std. beobachtet	tanzende Chol.-Partikeln
0,033	+	+	+	+
0,066	+	+	+	+
0,110	—	Lecithin-Koagul.	+	—
0,330	—	..	+	—
0,660	—	..	+	—
1,100	?	..	—	—
3,300	?	..	—	—

Darin 1,100 ist mit 0,85% NaCl-Lösung theoretisch etwa isosmotisch.

Man sieht keine Übereinstimmung, jedoch ist zu bemerken, daß in beiden Fällen in derselben Zone Cholesterinpartikel sichtbar sind.

Tabelle X.
Säure und Alkali (in 0,85 proz. NaCl-Lösung).

	KOH		H ₂ SO ₄		HCl	
	Entmischung	Hämolyse	Ent- misch.	Hämolyse	Ent- misch.	Hämolyse
n/10	+ tanzende Chol.-Partikel	+ tanzende Chol.-Partikel	—	+ keine Chol.-Partikel	—	+ keine Chol.-Partikel
n/100	+ "	+ "	—	+ "	—	+ "
n/500	+ "	+ "	—	+ "	—	+ "
n/1000	— "	+ "	—	+ "	—	+ "
n/5000	— "	—	—	—	—	—

Bei Alkali gehen die Ergebnisse miteinander parallel, besonders sieht man schöne Übereinstimmung des Vorkommens der Cholesterinpartikel. Bei Säure besteht keine Parallelität, doch ist zu bemerken, daß keine Cholesterinpartikel dabei auftreten.

Tabelle XI.
Chloroform und Amylalkohol.

Lösungen sind mit 0,85 proz. NaCl-Lösung hergestellt worden.

	Chloroform		Amylalkohol	
	Entmischung	Hämolyse	Entmischung	Hämolyse
um 21° C gesättigte Lösung	—	+	+ tanzende Chol.-Partikel	+ tanzende Chol.-Partikel
um 1/2° C "	—	+	+ "	+ "
" 1/4° C "	—	±	+ "	+ "
" 1/6° C "	±	±	±	±
" 1/16° C "	—	±	—	±

Man sieht die Übereinstimmung bei Amylalkohol, nicht aber bei Chloroform. Das ultramikroskopische Bild von hämolysierten Blutkörperchen sieht so aus, wie das durch Wasser hämolysierte, aber ihre Gestalt ist bedeutend vergrößert, was zu den von Calugareanu¹⁾ gefundenen Tatsachen paßt.

Diskussion.

Aus den bisherigen Untersuchungen ergibt sich, daß

1. Das optisch homogene Lecithin-Cholesteringemisch wird durch verschiedene Agentien entmischt. Der Mechanismus der Entmischung ist verschieden. Wasser z. B. wirkt stark quellend auf Lecithin, so daß die disperse Cholesterinphase nicht mehr in ihrem physiko-chemischen Zustand erhalten bleibt. Mit anderen Worten, es gibt eine bestimmte Quellungsbreite des Lecithins, um Cholesterin im dispersen Zustand zu halten.

2. Bei der Behandlung mit physiologischer Kochsalzlösung wird das Quellungsvermögen des Lecithins so weit beschränkt, daß die Cholesterinteilchen sich nicht von Lecithin trennen. Die Salze spielen als Gestaltbeschränker für Biokolloide eine Rolle im Organismus.

3. Zwischen Entmischung und Hämolyse besteht keine vollkommene Übereinstimmung, aber es ergibt sich eine bemerkenswerte allgemeine Regel:

Agentien, die Lecithin-Cholesterin entmischen, hämolysieren rote Blutkörperchen (nicht umgekehrt).

4. Bei isosmotischen Salzlösungen (meist Neutralsalze) hängt der Entmischungsvorgang nicht nur von den Konzentrationen, sondern auch von der Art des Salzes ab (Tabelle VIII). Die allgemeine Regel der Lyotropie paßt vielleicht auch hierher.

5. Wir wissen, daß Saponin in fast allen Konzentrationen hämolysiert. Das gilt nicht für den Entmischungsvorgang (Tabelle VI). Allerdings haben wir in Abschnitt IX gesehen, daß, auf gequollenes Lecithin-Cholesterin, Saponinlösung entmischend wirkt. Da die Blutkörperchen gequollene Massen sind, so wäre es möglich, daß sie von Saponin fast unabhängig, von der Konzentration hämolysierbar sind.

Nun zur Frage der Resistenz des Blutkörperchens gegen Saponin. Lecithin besitzt die Eigenschaft, sich mit Saponin zu

¹⁾ Calugareanu, Die Wirkung des Chloroforms auf Lipoidsuspensionen. Diese Zeitschr. 23, 96. 1910.

verbinden, wodurch sekundär die darin befindliche Cholesterinkolloidphase beeinflußt und das Dispersionsvermögen des Lecithins für Cholesterin aufgehoben wird. Das ultramikroskopische Bild von Lecithin-Cholesterin mit Saponinlösung zeigt uns, daß Lecithin seine Quellbarkeit verloren hat und die Cholesterinpartikel darin zusammengeballt sind. Es erscheint als eine koagulierte Masse, ein Mosaik¹⁾, dessen Kittsubstanz durch Saponin gehärtetes Lecithin ist, in welches Cholesterinteilchen eingebettet sind. Wenn die Blutkörperchenmembran aus Lipoiden besteht, so folgt daraus, daß diese Membran um so widerstandsfähiger gegen Saponin sein wird, je mehr Cholesterin darin enthalten ist. Nach Pascucci²⁾ werden Cholesterinhäute von Saponin langsamer angegriffen als Lecithinhäute. Nach meinen Beobachtungen ist Cholesterin vollständig indifferent (Abschnitt II u. IX) gegen Saponin unter den betreffenden Bedingungen. Dennoch bilden sich Cholesterinhäute indirekt erst, nachdem die Saponinwirkung auf Lecithin ausgeübt worden ist. Diese Cholesterinhäutchenbildung gibt die Erklärung für die Schutzwirkung des Cholesterins, welche Kurt Meyer³⁾, Rywosch⁴⁾ und Port⁵⁾ gefunden haben.

Die Reaktion zwischen Lecithin und Saponin ist reversibel (Abschnitt IX). Deshalb quillt das mit Saponin behandelte Lecithin-Cholesterin bei Zusatz von Wasser bzw. physiologischer Kochsalzlösung, ohne das ausgeflockte Cholesterin wieder zu dispergieren. Daher ist die als Nebenreaktion aufgetretene Cholesterinausflockung irreversibel. Dies veranlaßt uns zu der Meinung, daß das einmal mit Saponin behandelte Lecithin-Cholesterin nicht mehr den ursprünglichen Zusammenhang wiedergewinnen kann, wenn auch keine isolierte Cholesterinpartikel darin erkennbar sind.

6. Entmischung im weitern Sinne.

Auch bei dem letzterwähnten Vorgang ist der Zusammenhang zwischen Kolloidkomponenten verschwunden. Dieser Vorgang sei vorläufig als „Entmischung im weiteren Sinne“ betrachtet,

¹⁾ Vgl. R. Höber, *Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe*. S. 413. 1914.

²⁾ Pascucci, l. c.

³⁾ Kurt Meyer, *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.* **11**, 357. 1908.

⁴⁾ Rywosch, *Arch. f. d. ges. Physiol.* **116**, 229. 1907.

⁵⁾ Port, *Dtsch. Arch. f. klin. Med.* **99**, 259. 1910.

um mit Rücksicht auf jene „im engeren Sinne“ zu einem allgemeinen Begriff zu gelangen.

Bei der Hämolyse durch Hypertonie z. B. in 3proz. NaCl-Lösung zeigt das ultramikroskopische Bild weder frei gewordene Lecithinkugeln noch Cholesterinpartikel, trotzdem Blutfarbstoff frei wird. In diesem Falle wirkt die Salzlösung auf die Blutkörperchen zuerst entquellend und wird der Urzusammenhang zerstört, worauf der Austritt des Hämoglobins folgt. Bei dieser Hämolyse erfolgt also Entmischung im weiteren Sinne, ungeachtet des Ausbleibens der Entmischung im engeren Sinne.

7. Aus Tabelle V ergibt sich, daß die beiden Lipide indifferent gegen Sublimat sind. Daher muß dessen hämolytische Wirkung an andere Bestandteile des Blutkörperchens anknüpfen, nämlich die Proteine oder den Blutfarbstoff. Sublimatlösung in höherer Konzentration wirkt auf Hämoglobin¹⁾ stark koagulierend. Jedoch ist bei niedrigen Konzentrationen, z. B. 1 : 4000 bis 1 : 200 000, die Hämoglobinflockung nicht erkennbar. Dennoch dürfte eine solche Lösung noch imstande sein, den Zusammenhang der Komponenten zu lösen, wodurch Austritt des Hämoglobins erfolgt. Hier erkennt man die Analogie zwischen den Konzentrationsbedingungen des Sublimats und des Saponins in bezug auf ihre hämolytischen Wirkungen, indem beide in höherer Konzentration koagulierend, in niedriger Konzentration hämolytisch (Tabelle VI) wirksam sind. Der Unterschied beruht nur darin, daß Saponin an Lecithin und Sublimat am Protein angreift.

In jedem Falle sind die Vorgänge schließlich nichts anderes als Entmischung der Kolloidkomponenten²⁾.

8. Einige Anwendungen der Entmischungstheorie.

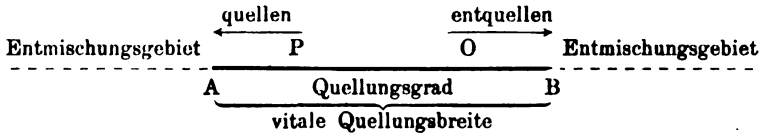
Wie schon in vorliegender Arbeit ausführlich erörtert worden ist, sind die Vorgänge der Hämolyse in allen Fällen auf die Entmischung der Kolloidkomponenten der Blutkörperchen zurückzuführen.

Hypertonie und Hypotonie, beide wirken hämolytisch, erstere durch Entquellung, letztere durch Quellung des Blutkörperchens: beide durch Entmischung der Komponenten. Wir

¹⁾ Bechhold und Kraus, l. c.

²⁾ Vgl. Bechhold, Münch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 5, S 127 bis 130.

müssen daher eine „vitale Quellungsbreite“ an dem Blutkörperchen annehmen: nur innerhalb derselben können die Komponenten ihren genuinen Zusammenhang behalten. Mit anderen Worten, es gibt eine obere und untere Grenze, wie in der Physik die Elastizitätsgrenze, bei deren Überschreitung der molekulare Zusammenhang verloren geht. Im Diagramm stellt sich das folgendermaßen dar:



A = Quellungsgränze, B = Entquellungsgränze.

Alle Blutkörperchenarten haben in normalem Zustand irgend einen bestimmten Quellungsgrad (spezifischer Quellungsgrad) innerhalb der vitalen Quellungsbreite.

Vorausgesetzt, eine Art Blutkörperchen besitzt z. B. 0-Quellungsgrad, auf welches ein Quellungsmittel (Hypotonie) eingewirkt hat, dann wird dieses Blutkörperchen schwerer entmischt oder hämolyisiert als mit dem Entquellungsmittel, weil 0-Grad der Entquellungsgränze B näher ist und am P-Grad liegt die Sache gerade umgekehrt. Je resistenter für Quellungsmittel ein Blutkörperchen ist, um so empfindlicher muß es für Entquellungsmittel sein und umgekehrt.

Rywoſch¹⁾ hat gefunden, daß zwischen Saponin-Hämolyse und Hämolyse durch Hypotonie ein Antagonismus besteht. Je resistenter eine Blutkörperchenart gegen Saponin ist, um so empfindlicher ist sie gegen Hypotonie und umgekehrt. Wir zeigten schon in Abschnitt IX, daß Saponin auf Lecithin entquellend wirkt, also der Hypotonie entgegenwirkt.

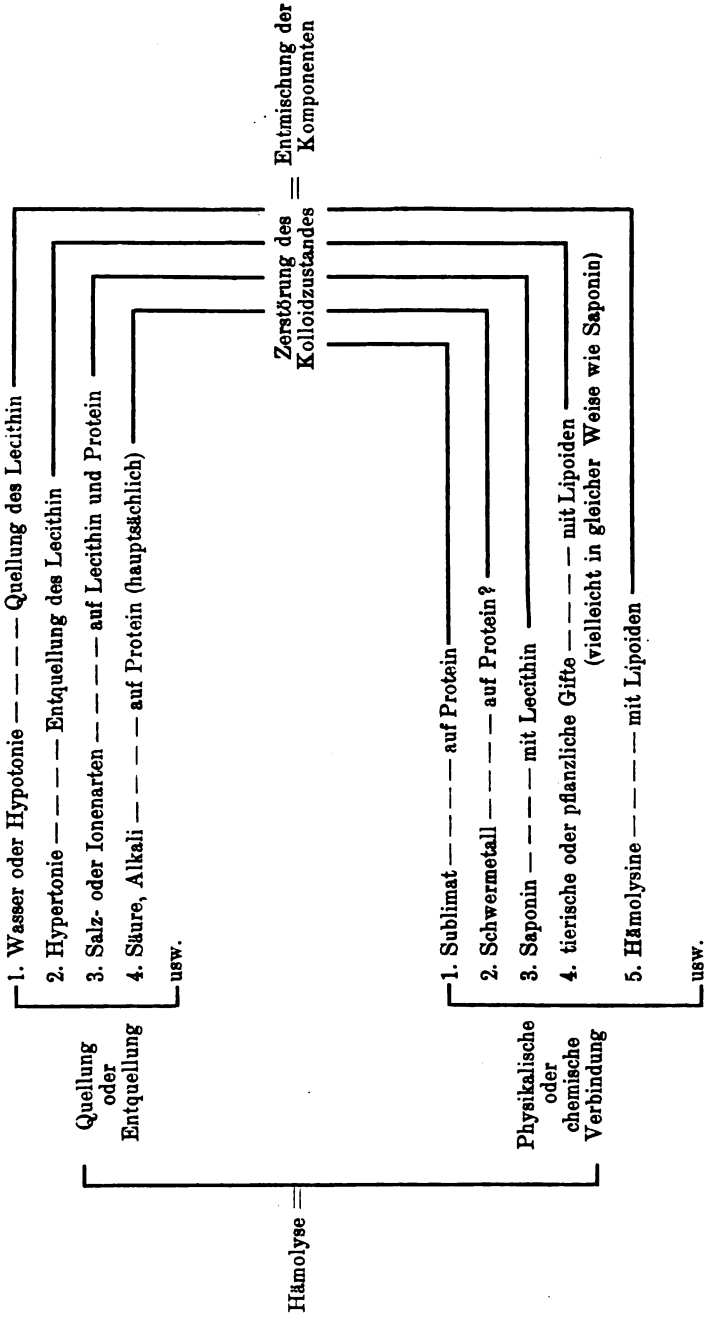
Die Schutzwirkung des Cholesterins gegen die Saponin-Hämolyse ist schon in Diskussion 5 erörtert.

9. Neuerdings haben I. R. Brinkman und E. van Dam²⁾ beobachtet, daß die Resistenz der Kaninchenerythrocyten gegen Hypotonie sich durch Waschen mit physiologisch äquilibrirter Salzlösung erhöht (nicht aber bei Menschenerythrocyten)

¹⁾ Rywoſch, l. c.

²⁾ I. R. Brinkman und E. van Dam, diese Zeitschr. 108, 35–51. 1920.

Zusammenfassung.



Diese interessante Tatsache dürfte sich durch die Entmischungstheorie erklären lassen:

Bringt man in eine Salzlösung etwas Lecithin-Cholesterin von verschiedenen Mischungsverhältnissen, so kann man ultramikroskopisch leicht erkennen, daß das Gemisch um so leichter und stärker quillt, je mehr das Lecithin gegenüber dem Cholesterin darin überwiegt. Das Cholesterin wirkt also quellungshemmend auf das Lecithin, und zwar je mehr Cholesterin darin ist.

Nun ist bekannt, daß Kaninchenerythrocyten zu den Blutkörperchenarten gehören, bei denen der Gehalt an Lecithin den des Cholesterins stark überwiegt: Lecithin 4,627⁰/₁₀₀, Cholesterin 0,72⁰/₁₀₀ (nach Abderhalden). Wäscht man solchen Erythrocyten mit physiologisch äquilibrierter Salzlösung, so geht ein Teil Lecithins weg und wird das Verhältnis L : C erniedrigt. So gewaschene Körperchen haben dann nicht mehr den ursprünglichen Quellungsgrad, sondern den mehr oder weniger verringerten. In der Tat konnten Brinkmann und van Dam in der Waschlösung Lecithin, aber fast kein Cholesterin nachweisen. Nach dem oben geschilderten wurde der ursprüngliche Quellungsgrad z. B. P des Kaninchenerythrocyten durch Waschung bis zum Quellungsgrad z. B. 0 verschoben: also gegen hypotonische Entmischung verstärkt.

Ein direkter Beweis für die Impermeabilität der Blutkörperchen des Menschen und des Kaninchens für Glucose.

Von

S. van Creveld und R. Brinkman.

(Aus dem Physiologischen Institut der Reichsuniversität zu Groningen.)

(Eingegangen am 13. April 1921.)

I. Einleitung.

Die Frage der Verteilung der Glucose zwischen Blutkörperchen und Plasma, die man in der Literatur in so vielen Arbeiten behandelt findet, ist durch Untersuchungen von rezenterem Datum wieder aktuell geworden. Am Ende des Jahres 1919 hat der eine von uns zusammen mit Fr. E. van Dam eine Arbeit veröffentlicht¹⁾, worin deutlich angezeigt wurde, daß die Durchlässigkeit der Blutkörperchen für Glucose mit dem Gerinnungsprozeß sehr eng verknüpft ist und daß man die Blutkörperchen des Frosches und des Menschen impermeabel für Glucose findet, wenn man nur den allerersten Anfang der Gerinnung zu verhindern weiß. Für die Froschkörperchen gelang es, die physiologische Impermeabilität durch direkte chemische Analyse nachzuweisen.

Für die Blutkörperchen des Menschen konnte damals ein solcher direkt chemischer Beweis noch nicht gegeben werden. Durch osmotische Versuche war das aber konstant der Fall, und es wurde die Meinung ausgesprochen, daß alle Autoren, die mit derselben Methode arbeitend, zu anderen Resultaten gekommen waren, Blut benutzt hatten, dessen Gerinnungsanfang nicht verhindert worden war.

Kurze Zeit nach dieser Veröffentlichung erschien in dieser Zeitschrift eine Arbeit von Falta und Richter-Quittner²⁾

¹⁾ R. Brinkman und Fr. E. van Dam, Arch. internat. de physiol. 15, 105. 1919.

²⁾ Diese Zeitschr. 100, 140. 1919.

über die Verteilung des Zuckers, der Chloride und der Reststickstoffkörper auf Plasma und Körperchen im strömenden Blute. Auch diese Autoren kamen zu dem Schluß, daß im strömenden Blute von Menschen sich der Zucker ausschließlich im Plasma befindet. Die von ihnen angewandte Methode war als eine direkt chemische zu betrachten, indem sie den Gehalt des Gesamtblutes und des Plasmas an Zucker bestimmten und aus diesen beiden Werten das Blutkörperchenvolumen berechneten für den Fall, daß aller Zucker sich im Plasma befände. Das so berechnete Blutkörperchenvolumen stimmte nun in einer großen Anzahl von Fällen mit dem mittels des Hämatokriten gefundenen überein.

Es wird den Lesern dieser Zeitschrift bekannt sein, wie die Resultate der österreichischen Untersucher bald von verschiedenen Seiten zugleich zurückgewiesen wurden von Autoren, die mit derselben Methode arbeitend, zu anderen Resultaten gekommen waren¹⁾. Das wunderte uns nicht, weil Falta und Richter-Quittner zur Gewinnung des Plasmas das Hirudin benutzt hatten. Das Hirudin würde im Gegenteil mit anderen gerinnungshemmenden Agentien (NaFl, Oxalat, Citrat und Kälte) die Blutkörperchen impermeabel für Glucose halten. Mit Hirudinblut arbeitend, hatten aber schon früher andere Autoren die Körperchen doch permeabel gefunden. Und in der schon zitierten Arbeit aus dem hiesigen Laboratorium war außerdem angezeigt worden, daß im Hirudinblut die Körperchen nur impermeabel gefunden werden, wenn die ersten Phasen der Gerinnung vorgebeugt sind²⁾.

Wenn es Falta und Richter-Quittner trotzdem gelungen ist, mit Hirudinblut die Impermeabilität in vielen Fällen zu finden, so meinen wir das nicht der Verwendung des Hirudins zuschreiben zu müssen, sondern der sofortigen Trennung von Plasma und Körperchen durch schnelles Zentrifugieren. Ob man, auf diese Weise arbeitend, die Körperchen tatsächlich konstant impermeabel für Glucose findet, darf aber nach den vielen nicht gelungenen Experimenten, die mit Hirudinblut gemacht wurden, bezweifelt werden.

Die große theoretische und praktische Bedeutung der vorliegenden Frage macht es aber notwendig, daß nur direkte

¹⁾ Siehe u. a. diese Zeitschr. 107, 246 u. 248; 112, 54. 1920.

²⁾ l. c. S. 113.

chemische Beweise als einwandfrei betrachtet werden können. Diese liegen auch nach unserer Meinung in den Versuchen von Falta und Richter-Quittner nicht vor. In unserem Gedankengang könnten solche direkte Beweise nur gegeben werden durch eine Untersuchung von Plasma, das frei von Körperchen direkt aus dem Gefäße genommen war, oder auch von Blut, das ohne Hinzufügung von einem der gerinnungshemmenden Agenzien erhalten und außerhalb des Körpers noch ganz flüssig geblieben war. Der Zuckergehalt des Plasmas sollte, falls die Körperchen impermeabel waren, ungefähr¹⁾ berechnet werden können aus dem totalen Blutzuckergehalt und dem Blutkörperchenvolumen.

Es ist uns gelungen, erst beim Kaninchen, dann beim Menschen Plasma auf beiderlei Weise zu erhalten und dann die Impermeabilität der Blutkörperchen für Glucose auch auf direkt chemische Weise anzuzeigen.

II. Bestimmung vom Zuckergehalt des Plasmas, das aus einer aus dem Körper isolierten Vene jugularis erhalten wurde, beim Kaninchen.

Für die direkte Gewinnung von Plasma aus einem Blutgefäß dachten wir beim Kaninchen anfangs bei weiblichen Tieren — insbesondere bei weiblichen trächtigen Tieren — die Eigenschaft der schnellen Senkungsgeschwindigkeit der Körperchen benutzen zu können²⁾. Wir haben einige Male bei einem Kaninchen, das auf einem Brett aufgebunden war, das Ohr vertikal ruhig gestellt und einen Teil einer Randvene ohne sichtbare Anastomosen abgeklemmt. Es ist uns aber nicht gelungen, auf diese Weise Sedimentierung zu bekommen, vielleicht weil doch noch kleine Anastomosen waren.

Eine andere Methode führte bei diesen Tieren aber bald zum Ziel. Arthus³⁾ hat gefunden, daß, wenn man Blut in einer aus dem Körper genommenen Vene bewahrt, die an beiden Enden ligiert worden ist, das Blut in dieser Vene flüssig bleibt und — was für unsere Frage auch von großer Bedeutung ist —

¹⁾ Wir sagen „ungefähr“, weil wir für den Moment annehmen wollen, daß die Körperchen wohl an der sog. Restreduktion Anteil nehmen. Mit der von uns verwendeten Bangschen Methode bestimmt, ist diese aber für das ganze Blut sehr gering (siehe R. Ege, diese Zeitschr. 107, 229. 1920).

²⁾ Fähræus, diese Zeitschr. 89, 355. 1918.

³⁾ Arthus, Arch. de physiol. 1891—1892.

auch keine Glykolyse zeigt. Diese Methode, ungerinnbares Plasma zu erhalten, wurde praktisch bisher allein an der Vena jugularis des Pferdes ausgeführt, und sie ist bekannt als die Methode der Jugularis. Wir haben sie 2 mal bei Kaninchen versucht, um reines Plasma zu erhalten. Auf folgende Weise wurde dabei gearbeitet. Die V. jugularis ext. wurde auf einer Seite über eine Länge von wenigstens 4 cm bloßgelegt, vom Nachbargewebe los präpariert und das größte Stück, das zwischen 2 einmündenden Venen zu sehen war, an beiden Enden doppelt ligiert. Dann wurde das Stück, das in beiden Fällen eine Länge von $\pm 2\frac{1}{2}$ cm hatte, aus dem Körper genommen und vertikal gehalten. Weil die Absetzung der Blutkörperchen zu lange dauern würde, wenn die Vene aufgehangen wurde, haben wir sie in einem kleinen Zentrifugeröhrchen, worin die Vene gerade bis an den Boden reichte, schnell zentrifugiert. Nach einigen Minuten war dann durch die Vene deutlich eine scharfe Trennung von dunkler Blutkörperchenmasse und ganz leichtgelbem, lichtdurchlässigem Plasma zu sehen. Das Gefäß wurde dann in der tiefsten Plasmaschicht abgeklemmt, das obere Stück sofort angestochen und das austropfende flüssige Plasma auf 2 Bangsche Papierchen aufgefangen. In beiden Versuchen erhielten wir genug Plasma um zuverlässige Doppelbestimmungen des Plasmazuckers zu machen. Bei demselben Kaninchen wurde ungefähr zur selben Zeit Blut aus einer Ohrvene genommen und das relative Volumen der Blutkörperchen bestimmt. Das Resultat der 2 Versuche war folgendes:

Versuch	a) Plasmazucker in %	b) totaler Blutzucker in %	c) Blutkörper- Volumen	d) Berechn. Plasmazucker aus b und c in %
I	0,266	0,194	27	0,2657
II	0,255	0,1935	27	0,265

Wir sind also mit einer fast überraschenden Genauigkeit mit der Jugularismethode zu dem Resultat gekommen, daß der Blutzucker beim Kaninchen sich fast ausschließlich im Plasma befindet. Zu demselben Resultat sind wir gekommen bei Benutzung der weiter in diesem Artikel zu besprechenden Paraffinmethode. — Notiert muß hier noch werden, daß beide Kaninchen, in leichter Äthernarkose operiert, eine deutliche Hyperglykämie zeigten. Diese Hyperglykämie war also vollständig auf eine Hyperglucoplasmie zurückzuführen.

III. Nachweis der Impermeabilität der Blutkörperchen des Menschen für Glucose mit der Paraffinmethode.

Um auch beim Menschen die Permeabilität der Blutkörperchen für Glucose durch direkte chemische Analyse zu untersuchen, haben wir anfangs auch die Gefäßmethode zur Gewinnung von Plasma benutzt. Auf Vorschlag von Prof. Hamburger wurde als menschliche Vene die Nabelstrangvene genommen. In der hiesigen obstetrischen Klinik wurden während einiger Wochen ganz frische Nabelstrangstücke zu diesem Zwecke verarbeitet, d. h. wir versuchten in der immer deutlich verfolgbaren Vena umbilicalis eine Trennung zwischen Plasma und Körperchen hervorzubringen. Die Vene selbst war nur schwer von ihrer Umgebung freizupräparieren. Trotz Zentrifugieren in kleinen Röhren oder vertikalem Aufhängen von abgebundenen Nabelstrangstücken ist es uns aber nur einige Male gelungen, die gewünschte Trennung zu bekommen. Die Ursache hiervon werden wohl die starken Torsionen der meisten Nabelstränge und das schnelle Zusammenschrumpfen der Lissen sein. Nur einmal haben wir bis heute in einem Nabelstrang mit abnorm wenig Torsionen abgetrenntes Plasma erhalten und seinen Zuckergehalt mit dem des totalen Nabelstrangblutes unter Berücksichtigung des relativen Volums der Blutkörperchen vergleichen können. Das Plasma zeigte dann einen bedeutenden Unterschied im Zuckergehalt mit dem ganzen Blut, und zwar war der Gehalt des Plasmas bedeutend höher.

Leichter zu isolieren und dann zu zentrifugieren zeigten sich einige dicke Venen, die regelmäßig an der fötalen Seite der Placentaroberfläche zu verfolgen sind. Ein Vorteil der Benutzung dieser Venen war gerade, daß das in ihnen enthaltene Blut auffallend lange Zeit flüssig blieb. Für die Lösung der Frage der Glucosepermeabilität beim Menschen haben wir diese Methode aber nach kurzer Anwendung verlassen, da wir mit einer einfacheren und ganz einwandfreien Methode zum Ziel gelangten. Gegen Experimente mit Nabelstrangblut könnte man ja auch einwenden, daß dieses Blut in vieler Hinsicht nicht mit normalem Menschenblut gleichzustellen ist, vielleicht auch insoweit es sich auf die Zuckerverteilung bezieht.

Die einfache Methode, die wir dann angewendet haben, war eine Paraffinmethode. Als Mittel, die Gerinnung des

Plasma zu hemmen, ohne daß man einen der bekannten Stoffe hinzufügt, kennt man schon lange das Auffangen in gut gereinigten und durch Paraffinieren absolut glatt gemachten Röhren. Indem man nun kleine, schmale, paraffinierte Röhren verwendet, kann das darin aufgefangene Blut durch schnelles Zentrifugieren getrennt werden in Körperchen und Plasma, ohne daß Gerinnung eintreten braucht. In größeren paraffinierten Röhren trat bei Zentrifugieren sehr oft Gerinnung auf. Die Weise der Plasmagewinnung für die Zuckerbestimmung war ganz einfach.

Aus der gut gereinigten Fingerbeere ließen wir durch einen tiefen Stich mit der Franckeschen Nadel einige Tropfen Blut in 2 kurz vorher paraffinierte Röhren fallen. Diese wurden dann schnell zentrifugiert während einer oder 2 Minuten und dann das Plasma mit einer paraffinierten Pipette abgesogen und auf Bangsche Papierchen gebracht. Zugleich wurde dann Blut aufgefangen für eine Gesamtblutzuckerbestimmung und eine Bestimmung des relativen Blutkörperchenvolums.

In einer Anzahl von diesen Versuchen, bei einigen gesunden Personen zu willkürlichen Zeitpunkten gemacht, wurden folgende Resultate erhalten.

Zucker im gesamten Blut in %	Zucker im Plasma in %	Volum der Blutkörperchen in %	Zucker im Plasma (berechnet) in %
0,117	0,178	38	0,188
0,103	0,161	39	0,169
0,110	0,165	38	0,180
0,135	0,223	43	0,237
0,137	0,192	38	0,221
0,111	0,188	41	0,190

Unserer Meinung nach wird durch diese Resultate der direkte chemische Beweis für die Impermeabilität der roten Blutzellen des gesunden Menschen gegeben.

Mit dieser Tatsache wird man bei Blutzuckerbestimmungen unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen in Zukunft rechnen müssen. Die sogenannten physiologischen Schwankungen des relativen Körperchenvolums (wie sie z. B. durch Wasseraufnahme und Schwitzen auftreten können) müssen einen Einfluß haben auf die totalen Blutzuckerkonzentrationen. Dasselbe wird auch für pathologische Fälle (Nephritis) zutreffen. Für die Beurteilung einer Hyper- oder Hypoglykämie ist es deshalb

notwendig, daß der Blutplasmazuckergehalt bestimmt wird. Das kann geschehen durch Verwendung der von uns angegebenen einfachen Paraffinmethode oder dadurch, daß immer neben dem totalen Blutzuckergehalt eine Bestimmung des relativen Volums der Körperchen gemacht wird.

Weiterhin ist es wichtig, daß bei der Bestimmung des Sekretionskoeffizienten der Glucose, wie das Ambard¹⁾ und seine Schüler machen, in der Formel nicht die Glykämie, sondern die Glucoplasmie eingeführt wird. Wir sind geneigt anzunehmen, daß das scheinbare Mißverhältnis, welches zwischen den Glucosekonzentrationen im Blute und im Harn besteht, auf die Nichtberücksichtigung der Glucoplasmie zurückzuführen ist, obwohl unserer Meinung nach auch die Fraktion des gebundenen Zuckers hier eine Rolle spielt.

Schließlich möchten wir noch zurückkommen auf die völlig gegenstreitigen Meinungen²⁾, die über die Zuckerpermeabilität der roten Blutkörperchen, speziell des Menschen, veröffentlicht wurden. Die Zahl der Tiere, für welche eine im strömenden Blute bestehende Glucosepermeabilität angenommen wird, wird kleiner, je genauer man untersucht. Das Kaninchenblutkörperchen und auch das Froschkörperchen wird jetzt auch allgemein als normalerweise impermeabel betrachtet. Daß diese Körperchen aber, wie Ege behauptet, immer zuckerfrei gefunden werden, ist sicher nicht richtig. Das hängt nur ab von der angewendeten Methode. Es geht doch auch nicht an, alle Resultate früherer Autoren, welche Zucker in dem Kaninchenkörperchen fanden, wenn sie mit defibriertem Blut oder Fluoridblut arbeiteten, als fehlerhaft zu bezeichnen.

Auch die Körperchen des Hundes sind jetzt impermeabel gefunden.

Nur für die Menschenblutkörperchen wird von Ege u. a. noch immer die Permeabilität aufrecht gehalten. Ege hat neben der osmotischen Versuchsanordnung den direkten chemischen Beweis gefordert, welchen wir jetzt oben gegeben haben.

Ege hat weiter in seiner letzten Arbeit³⁾ einige Versuche und Be-

¹⁾ L. Ambard, *Physiologie normale et pathologique des reins*. 2. Ausgabe. Paris 1920.

²⁾ Siehe u. a. Falta und Richter - Quittner, l. c. und diese Zeitschr. 114, 145. 1921. — Ege, diese Zeitschr. 107, 246; 111, 289. 1920; 114, 88. 1921. — Bönniger, diese Zeitschr. 103, 306. 1920. — Brinkman und Fr. v. Damm, diese Zeitschr. 105, 93, 108, 74. 1920. — Hagedorn, diese Zeitschr. 107, 248. 1920. — Feigl, diese Zeitschr. 112, 54. 1920. — Mary B. Wishart, *Journ. of Biolog. Chem.* 44, 563. 1920. — Tachau, *Zeitschr. f. klin. Med.* 79, 421. 1914. — Gradwohl und Blaivas, *Journ. Lab. and Clin. Med.* 2, Nr. 6. 1917.

³⁾ Diese Zeitschr. 114, 88. 1921.

rechnungen gemacht, auf die wir nicht näher eingehen können, weil für die Prinzipien der Berechnung wieder auf spätere Abhandlungen verwiesen wird. Nur das wollen wir sagen, daß eine reine Glucoselösung (die Ege in seinen Versuchen anwendet) ein so unphysiologisches, die Körperchenmembran schädigendes Medium darstellt, indem Ionenpermeabilität und später auch Hämolyse auftritt, daß die wirkliche Körperchenpermeabilität in diesem Medium nicht studiert werden kann. Daß die von Ege erwartete Quellung von Menschenkörperchen in reiner Glucoselösung fast ganz ausbleibt, wundert uns nicht, weil durch die entstehende Ionenpermeabilität die osmotischen Druckunterschiede viel kleiner werden.

Daß auch Tachau¹⁾, Mary B. Wishart¹⁾ u. a. die Blutkörperchen permeabel finden, beruht unseres Erachtens auf dem Gebrauch von defibriniertem Blut oder Fluorid- oder Oxalatblut, dessen Unzulässigkeit wir oben angezeigt haben.

Zusammenfassung.

Es wurden vergleichende Glucosebestimmungen im Vollblute und im Plasma von Kaninchenblut und Menschenblut gemacht. Wenn das Plasma ohne Eintritt der Gerinnung gewonnen war, nach der Jugularismethode beim Kaninchen oder nach der Paraffinmethode beim Menschen, zeigten sich die Körperchen immer glucosefrei.

Die abweichenden Resultate anderer Autoren wurden auf methodische Ursachen zurückgeführt.

¹⁾ l. c.

Versuche über Vorkommen und Wirkung der Saccharo- phosphatase im Pflanzenorganismus.

Von

Antonín Němec und František Duchoň.

(Aus der biochemischen Abteilung der Staatlichen Versuchsanstalt für
Pflanzenproduktion in Prag.)

(Eingegangen am 13. April 1921.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Im Phosphorstoffwechsel des pflanzlichen Organismus wurden bestimmte Enzyme nachgewiesen, welche besonders in der Mobilmachung der Reservestoffe des Samens und in der inneren Ernährung der Pflanzen wichtige Aufgaben erfüllen, indem sie den esterartig gebundenen Phosphor hochmolekularer Zellbestandteile in Form anorganischer Phosphorsäure abspalten. Diese Fermente — die Phosphatasen — entfalten ihre Wirkungen nicht nur auf die in der Natur wirklich vorkommenden Bestandteile der phosphorhaltigen Eiweißkörper, Lipoide und Nucleinsäuren, sondern sie können solche Umwandlungen auch an künstlich dargestellten Phosphorsäureestern vollbringen. So wurde gezeigt, daß synthetisches glycerinphosphorsaures Natron durch Enzyme der Hefen¹⁾ und ruhender Samen der höheren Pflanzen²⁾ kräftig zerlegt wird, obzwar seine chemische Konfiguration von der der natürlichen Spaltprodukte der Lipoiden verschieden ist. Bei den Nucleoproteine spaltenden Fermenten hat man³⁾ die Anteilnahme der Nucleotidasen von *Corticellus edodes* an Abspaltung der Phosphorsäure aus dem Natriumsalze der Nucleinsäure verfolgt. Aber auch die in der Natur bisher nicht beobachteten

¹⁾ C. Neuberg und L. Karczag, diese Zeitschr. **36**, 64. 1911.

²⁾ A. Němec, diese Zeitschr. **93**, 94. 1919; Bull. Soc. chim. France (4), **27**, 153. 1920.

³⁾ Kikkōji, Zeitschr. f. physiol. Chemie **51**, 201. 1907.

Kohlenhydratphosphorsäureester und Eiweißstoffe mit künstlich eingeführtem Phosphorsäurerest werden trotz ihrer körperfremden Natur enzymatisch gespalten.

C. Neuberg und H. Pollak¹⁾ haben durch künstliche Phosphorylierung der Saccharose das Natrium- und Calciumsalz der Rohrzuckerphosphorsäure bereitet, welche von E. Merck in Darmstadt unter dem Namen Hesperonal-Natrium und Hesperonal-Calcium in den Handel gebracht werden. J. Kerb²⁾ hat neuerdings nach der Neubergschen Methode das Calcium- und Bleisalz der Stärkephosphorsäure hergestellt und dasselbe Verfahren auch auf die zwei der Stärke nahestehenden Polysaccharide, auf das Inulin und Glykogen, mit Erfolg angewendet. In derselben Weise hatten früher C. Neuberg und W. Örtel³⁾ auf chemischem Wege auch Proteine, Albumosen und Peptone phosphoryliert. Durch die Neubergsche Methode wird die Anbringung der Phosphorsäure an solchen Stellen der zu phosphorylierenden Substanz bewirkt, daß durch Enzyme der lebenden Zellen die Phosphorsäure aus den phosphorylierten Objekten abgespalten wird. So haben C. Neuberg und K. Djenab⁴⁾ nachgewiesen, daß in untergärigen sowie obergärigen Hefen ein Enzym vorhanden ist, welches aus der Lösung saccharophosphorsaurer Salze Phosphate in reichlicher Menge abspaltet. Die saccharophosphorsaurer Salze werden von lebenden Hefen unter Abspalten von Phosphaten vergoren: bei Gegenwart von Zellgiften unterbleibt aber die Gärung und es tritt die reine Saccharophosphatasewirkung zutage. Unter diesen Umständen erfolgen zwei Enzymhydrolysen nebeneinander: die Wirkung der Phosphatase neben der enzymatischen Zerlegung der abgespaltenen Saccharose durch Invertase der Hefe. Die Phosphatasewirkung kann aber bei Anwendung reiner Enzympräparate von der hydrolytischen Spaltung der Kohlenhydrate abgetrennt werden. So vermochte Kerb (l. c.) das Calciumamylophosphat durch Takadiastase fermentativ zu hexosemonophosphorsauem Salz ohne Phosphatabspaltung abzubauen.

¹⁾ C. Neuberg und H. Pollak, diese Zeitschr. **23**, 515. 1910; **26**, 514. 1910. — Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **43**, 2060. 1910.

²⁾ J. Kerb, diese Zeitschr. **100**, 3. 1919.

³⁾ C. Neuberg und W. Örtel, diese Zeitschr. **60**, 491. 1914.

⁴⁾ C. Neuberg und K. Djenab, diese Zeitschr. **82**, 391. 1917.

In der vorliegenden Arbeit haben wir die Verbreitung der Saccharophosphatase in ruhenden Samen höherer Pflanzen und ihre Wirkungen unter gewissen Reaktionsbedingungen studiert. Zu unseren Versuchen wurde teils das Natrium-, teils das Calciumsalz der Neubergschen Rohrzuckerphosphorsäure verwendet.

Das Natriumsaccharophosphat $C_{12}H_{21}O_{10}OPO_2Na$ enthält theoretisch 15,24% P_2O_5 . Die Bestimmung mittelst der Neumannschen Verbrennungsmethode hat ergeben:

15,39% und 15,35%, im Mittel 15,37% P_2O_5 .

Das saccharosephosphorsaure Calcium $C_{12}H_{21}O_{10}OPO_2Ca$ enthält nach Berechnung 15,43% P_2O_5 . Bei der Analyse wurde in Übereinstimmung mit dem theoretischen Werte 15,46% P_2O_5 als Mittel zweier Analysen gefunden.

Versuche mit Natriumsaccharophosphat.

Diese Versuche wurden in folgender Weise angestellt:

10 g feingemahlener Samen wurden in Erlenmeyerkolben mit 100 ccm 5 proz. Natriumsaccharophosphatlösung und 5 ccm Toluol zusammengebracht. Nach 6tägigem Verbleiben im Brutschrank bei 38° C wurde der Versuch abgebrochen, der Kolbeninhalt am Wasserbade zwecks Beseitigung der Eiweißstoffe aufgekocht und nach Erkaltung filtriert. In 20 ccm des klaren Filtrates wurde die Phosphatabspaltung durch Fällung mit Magnesiummischung bestimmt. In weiteren 10 evtl. 20 ccm wurde gleichzeitig das Reduktionsvermögen mit Fehlingscher Lösung ermittelt, um die Invertasewirkung der Samen zu verfolgen.

Gleichzeitig wurden zwei Kontrollversuche ausgeführt:

1. 10 g Samenmehl in 100 ccm Wasser + 5 ccm Toluol zwecks Bestimmung der autolytisch abgespaltenen Phosphorsäure.
2. 11 ccm dest. Wasser (entspricht etwa dem Volumen der angewendeten Samenmehle) mit 100 ccm 5 proz. Natriumsaccharophosphatlösung und 5 ccm Toluol.

Versuch mit *Glycine hispida*.

Autolytisch abgespaltene Phosphorsäure aus 10 g. Samen: 150,5 mg P_2O_5 .

Aus 5% Lösung Natriumsaccharophosphat wurde durch 10 g Samenmehl abgespalten: 258,4 mg P_2O_5 .

Aus 5% Lösung Natriumsaccharophosphat nach vorheriger Erwärmung des Samenmehles in 100 ccm Flüssigkeit am Wasserbade auf 96° C während 20 Minuten: 1,2 mg P_2O_5 .

Die Enzymtätigkeit sowie die Abspaltung der Phosphorsäure aus den Reservestoffen bei Autolyse des Samens wird durch Erwärmung der Reaktionsflüssigkeit am Wasserbade auf 96° C vollständig vernichtet. Wird aber das Samenmehl vor dem Versuche längere Zeit im Trockenschrank einer höheren Temperatur ausgesetzt, so wird die Enzymtätigkeit nicht zerstört.

Das Samenmehl von *Glycine hispida*, *Lupinus luteus* und *Hordeum distichum* wurde vor dem Versuche im Trockenschrank 1 Stunde auf 110° C erhitzt, 5 g Samen mit 100 ccm 5proz. Natriumsaccharophosphatlösung und 5 ccm Toluol vermischt und 6 Tage bei 38° C im Brutschrank belassen. Die Versuchsergebnisse sind aus folgender Tabelle ersichtlich:

Tabelle I.

5 g Samen	Menge P ₂ O ₅ abgespalten			
	durch Autolyse	in der Saccharophosphatlösung	aus dem Saccharophosphat	
			in mg	in %
<i>Glycine hispida</i> . . .	102,7	283,9	181,2	23,57
<i>Lupinus luteus</i> . . .	54,5	172,6	118,1	15,36
<i>Hordeum distichum</i> . .	35,7	137,8	102,0	13,27

Die Saccharophosphatase wurde nach der früher angegebenen Methode in zahlreichen Samenorganismen nachgewiesen, wie aus folgender Übersicht zu ersehen ist:

Tabelle II.

Der Same	Menge P ₂ O ₅ in mg, abgespalten aus 10 g Samen nach 6 Tagen bei 88° C				Menge abgespalt. Saccharose in g (ber.)	Menge invertierter Saccharose	
	bei Autodigestion in wässer. Lösung	in 5proz. Lösung Na-Saccharophosphat	aus der Rohrzuckerphosphorsäure			in g	in %
			in mg	in %			
<i>Pinus silvestris</i> . . .	104,5	448,4	338,0	44,36	1,6271	0,2212	13,59
<i>Sinapis alba</i>	111,9	391,4	279,5	36,68	1,3454	0,1366	10,15
<i>Brassica napus</i> . . .	123,8	401,9	278,1	36,50	1,3388	0,1073	8,02
<i>Glycine hispida</i> . . .	150,5	408,9	258,4	33,92	1,2441	0,3821	30,71
<i>Polygon. fagopyrum</i>	74,0	325,3	251,3	32,94	1,2082	0,5593	46,29
<i>Papaver somniferum</i>	44,5	251,3	206,8	27,15	0,9958	0,0096	0,97
<i>Vicia faba</i>	109,0	286,1	177,1	23,24	0,8525	0,3729	49,56
<i>Zea mais</i>	79,1	249,1	170,0	22,32	0,8187	0,5120	62,73
<i>Panicum miliaceum</i> .	61,5	234,8	169,7	22,28	0,8173	0,5027	61,40
<i>Sorghum vulgare</i> . .	80,4	238,6	158,2	20,78	0,7622	0,3287	43,12
<i>Phaseolus vulgaris</i> .	84,2	239,8	155,6	20,42	0,7490	0,1597	21,23
<i>Hordeum distichum</i> .	54,9	195,8	140,9	18,49	0,6782	0,2621	38,51
<i>Lupinus luteus</i> . . .	86,8	209,2	122,4	16,16	0,5891	0,3921	66,56
<i>Pisum sativum</i>	45,3	162,7	117,4	15,41	0,5652	0,3738	66,13

Versuche mit Calciumsaccharophosphat.

Bei diesen Versuchen wurden als Enzymsubstrat Samenautolysate verwendet, welche folgenderweise hergestellt wurden: 5 g Samenmehl wurde in 100 ccm dest. Wasser unter Zusatz von 5 ccm Toluol 24 Stunden im Brutschrank bei 37° C der Autolyse überlassen. Sodann wurde filtriert und 20 ccm des klaren Filtrats mit 80 ccm 5proz. Lösung von Calciumsaccharophosphat vermischt, 5 ccm Toluol zugesetzt und nach 6tägigem Verbleiben im Thermostat bei 37° C der Versuch abgebrochen. Die Zersetzung des Calciumsaccharophosphats ist schon nach wenigen Tagen sichtbar: In der klaren Lösung scheidet sich, wie das auch Neuberger und Djénab (l. c.) beschreiben, ein dicker, gallertartiger Niederschlag, der in manchen Fällen (Sojabohne, Senf und Raps) sehr zähe ist. Dieser Niederschlag wurde auf Papierfilter gebracht und mit dest. Wasser gründlich ausgewaschen. Im Filtrate konnte kein lösliches saures phosphorsaures Salz nachgewiesen werden.

Der gallertartige Brei am Filter, welcher unlösliches Calciumphosphat einschließt, wurde in heißer verdünnter Salpetersäure (1 : 10) am Filter gelöst, im Filtrat die freigewordene Phosphorsäure als Ammoniummolybdat ausgeschieden und in Form von Magnesiumphosphat bestimmt.

Es wurden dieselben Kontrollversuche wie in der Versuchsreihe mit Natriumsaccharophosphat angestellt.

Aus 80 ccm 5proz. Lösung Calciumsaccharophosphat mit 20 ccm dest. Wasser und 5 ccm Toluol wurden nach 6 Tagen bei 37° C durchschnittlich 0,6 mg P_2O_5 abgespalten.

Die Versuchsergebnisse geben wir in folgender Tabelle wieder.

Aus den angeführten Versuchsergebnissen geht hervor, daß Saccharophosphatase in allen untersuchten Samen im reichlichen Maße nachweisbar ist. Ähnlich wie bei der enzymatischen Spaltung der Glycerophosphate wurde auch die tiefste Zersetzung der rohrzuckerphosphorsauren Natrium- und Calciumsalze am meisten bei den öl- resp. fettführenden Samen (Soja, Senf, Raps) festgestellt. Was die stärkehaltigen Gramineen betrifft, bei welchen nur eine ganz verschwindende Glycerophosphatasewirkung konstatiert werden konnte, so kann man beobachten, daß sie im Gegensatz eine bedeutende Zersetzungsfähigkeit zeigen, mindestens in demselben Umfange wie die eiweißführenden Leguminosensamen.

Tabelle III.

Der Same	Menge P ₂ O ₅ in mg, abgespalten durch 20 ccm Samenautolysat nach 6 Tagen bei 37° C			
	durch Autolyse unter Zusatz von 80 ccm 5proz. Calcium- nitrat	aus 4proz. Lö- sung Calcium- saccharophos- phat als wasser- unlös. Calcium- phosphat	aus dem Calcium- saccharophosphat	
			in mg	in %
<i>Glycine hispida</i>	7,2	63,4	56,2	9,08
<i>Sinapis alba</i>	2,2	48,4	46,2	7,46
<i>Brassica napus</i>	2,3	47,6	45,3	7,32
<i>Larix decidua</i>	6,1	51,2	45,1	7,29
<i>Onobrychis sativa</i>	2,7	40,6	37,9	6,12
<i>Sorghum vulgare</i>	1,8	30,6	28,8	4,65
<i>Zea mais</i>	2,6	30,8	28,2	4,55
<i>Avena sativa</i>	1,8	29,5	27,7	4,47
<i>Lupinus luteus</i>	2,0	25,6	23,6	3,81
<i>Triticum sativum</i>	2,9	19,5	16,6	2,68

Man kann natürlich nicht aus unseren Versuchsergebnissen nach dem Umfange der Saccharophosphatspaltung direkt auf die Menge des Enzyms in dem betreffenden Samen schließen; denn durch autolytische Vorgänge werden in dem Reaktionsmedium verschiedene, in einem Falle mehr, im anderen wieder weniger günstige Bedingungen für den enzymatischen Reaktionsverlauf hergestellt. Deshalb können wir sagen, daß der Verlauf der Saccharophosphatasewirkung in unseren Versuchen gewissermaßen durch die chemische Beschaffenheit der Baustoffe der Samenorganismen bestimmt wurde. Die ölreichen Kiefersamen zersetzten unter sonst denselben Versuchsbedingungen zweimal soviel Saccharophosphat wie die eiweißreiche Pferdebohne, stärkehaltige Hirsenfrüchte und Maiskörner. Aus den Kiefersamen werden bei der Autolyse durch Lipasen die fett- resp. ölführenden Reservestoffe des Samens gespalten, wodurch die Reaktion des Mediums im Sinne steigender Acidität verändert wird.

Um zu erfahren, inwieweit die enzymatische Spaltung der Saccharophosphate durch Veränderung der Reaktion des Mediums beeinflusst wird, haben wir orientierende Versuche mit Maissamen ausgeführt, welche wir in folgendem wiedergeben.

In 1,6proz. Natriumsaccharophosphat verschiedener Alkalitäts- und Aciditätsgrade wurde die Spaltung unter sonst gleichen Versuchsbedingungen (5 g Samen in 125 ccm Flüssigkeit, 5 ccm Toluol nach 6 Tagen im Brutschrank bei 38° C) nach der schon früher erwähnten Arbeitsweise verfolgt.

Außerdem wurden gleichzeitig zwei Versuchsreihen angesetzt:
 1. Zwecks Ermittlung der Wirkung der Reaktion auf den Verlauf der autolytischen Phosphorsäureabspaltung aus Reservestoffen des Samens, 2. zwecks Bestimmung der evtl. abgespaltenen Phosphorsäure aus 1,6proz. Lösung Natriumsaccharophosphat bei betreffender Alkalität bzw. Acidität.

Die zuletzt erwähnten Werte wurden bei der Berechnung der Versuchsergebnisse in Abzug gebracht.

Tabelle IV. Einfluß der Alkalität.

Normalität der Lösung (NaOH)	Menge P ₂ O ₅ abgespalten			aus dem Saccharophosphat	
	durch Autolyse in mg	aus 1,6proz. Lösung Natr.-saccharophosphat u. Samen in mg	aus 1,6proz. Lösung Natr.-saccharophosphat in mg	in mg	in %
0,010	0	0	0	0	0
0,006	3,1	7,8	0,7	4,0	1,30
0,004	5,6	15,8	0,5	9,7	3,15
0,002	9,8	30,2	0,8	19,6	6,38

Tabelle V. Einfluß der Acidität.

Normalität der Lösung (H ₂ SO ₄)	Menge P ₂ O ₅ abgespalten			aus dem Saccharophosphat	
	durch Autolyse von 5 g Samen in mg	aus 1,6proz. Lösung Natr.-saccharophosphat u. Samen in mg	aus 1,6proz. Lösung Natr.-saccharophosphat in mg	in mg	in %
0	15,2	50,1	—	34,9	11,35
0,002	18,8	111,0	0,4	91,8	29,98
0,004	32,3	—	—	—	—
0,006	18,8	141,6	(0,6)	122,2	39,75
0,010	11,6	162,1	0,7	149,8	48,70
0,020	6,7	181,6	0,8	174,1	56,63
0,030	6,0	192,7	0,9	185,3	60,44
0,032	(5,8)	188,2	(0,9)	181,5	59,04
0,034	(5,6)	177,9	(0,9)	171,4	55,75
0,036	(5,4)	168,0	(0,9)	161,7	52,60
0,038	(5,2)	61,7	(0,9)	55,6	18,09
0,040	5,1	40,1	0,9	34,1	11,08
0,053	4,9	21,0	1,2	14,9	4,84

Ann. Die in Klammern angeführten Zahlen wurden berechnet.

Aus den Versuchsergebnissen der Tabellen IV und V, welche auch graphisch dargestellt wurden, ist ersichtlich, daß die Saccharophosphatasewirkung bei wachsender Acidität erheblich gesteigert wird, während schon eine geringe Menge Alkali genügt, um ihre Wirksamkeit völlig zu verhindern. Die optimale Konzentration der Wasserstoffionen liegt etwa bei 0,03 n-Lösung, wobei durch

Maissamen 60% des zugesetzten Saccharophosphats zerlegt wurden. Es soll hervorgehoben werden, daß das Aciditäts-

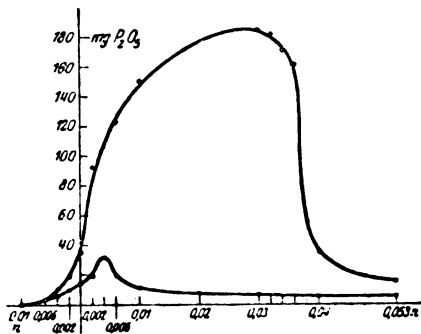


Abb. 1.

optimum für Saccharophosphatase mit jenem der bei der Autolyse des Samens wirkenden anderen Phosphatasen (0,004 n) nicht zusammenfällt.

Die Verbreitung der Saccharophosphatase erstreckt sich nicht bloß auf die ruhenden Samenorganismen. Wir konnten dieses

Enzym auch in den Blättern von *Solanum tuberosum* nachweisen:

2 g Blattpulver hat nach 5 Tagen bei 16° C aus 5proz. Lösung Natriumsaccharophosphat 26,05% P_2O_5 abgespalten:

Blattpulver + 100 ccm Wasser + 5 ccm Toluol 5,3 mg P_2O_5

Blattpulver + 100 ccm 5proz. Natriumsaccharophosphat + 5 ccm Toluol 205,5 „ „

Zusammenfassung.

In mehreren ruhenden Samenorganismen höherer Kulturpflanzen sowie in Blättern von *Solanum tuberosum* wurde ein Enzym nachgewiesen, das aus den künstlich dargestellten „körperfremden“ Saccharophosphaten Phosphorsäure in anorganischer Form abspaltet. Wässrige Samenextrakte können, obzwar in kleinerem Umfange, aus Calciumsaccharophosphat unlösliches Calciumphosphat in Freiheit setzen; lösliches saures phosphorsaures Calcium wird dabei nicht gebildet. Die stärkste Saccharophosphatasewirkung zeigen die fett- resp. ölführenden Samen, welche in 5proz. Lösung des Natriumsalzes bis 44% Saccharophosphat zerlegen (*Pinus silvestris*). Jedoch auch Samen mit stärkehaltigen Reservestoffen sowie die eiweißreichen Hülsenfrüchte entfalten eine bedeutende Fermentwirkung, indem sie unter den erwähnten Bedingungen 15–23% des Natriumsaccharophosphats spalten können. Schon eine geringe Menge Alkali verhindert die Enzymtätigkeit völlig, während durch schwache Acidität die Zersetzung erheblich gesteigert wird. Das Aciditätsoptimum für Saccharophosphatase (bei Mais 0,03 n) liegt bedeutend höher als jenes für die autolytischen Phosphatasen (0,004 n) des Samens.

Der Nachweis kleinster Milchzuckermengen im Harn durch Bildung von Formaldehyd.

Von
Kurt Herzberg.

(Aus der Chemischen Abteilung des Pathologischen Institutes der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 13. April 1921.)

Eine Mitteilung von Schlayer wurde zum Anlaß, eine Methode zum Nachweis kleinster Milchzuckermengen zu suchen. Wie bekannt, hat Schlayer den Milchzucker als Mittel angegeben, die Funktionstüchtigkeit der Nieren zu prüfen.

Es werden zu diesem Zweck 20 ccm einer 10 proz. sterilisierten Milchsuckerlösung intravenös injiziert. Eine gesunde Niere soll den Zucker innerhalb 5—6 Stunden ausgeschieden haben, während bei Schädigungen des Blutgefäßapparates der Niere eine Verzögerung der Ausscheidung (8 Stunden und darüber) eintritt. Der Nachweis des Zuckers, der wohl meist polarimetrisch geführt wird, stößt aber aus unten noch näher zu erörternden Gründen auf mancherlei Schwierigkeiten. Dabei wird schon von Schlayer hervorgehoben, daß die Dauer der Zuckerausscheidung für das klinische Urteil wichtiger ist als die schließliche Menge, mithin der qualitative Nachweis mehr interessiert als der quantitative.

Über den Wert dieser Funktionsprüfung der Niere sind die Ansichten geteilt. Vor allem ist über die Zeit, innerhalb welcher eine gesunde Niere den intravenös gegebenen Zucker spätestens ausgeschieden haben muß, eine Einigkeit noch nicht erzielt worden. Diese Unentschiedenheit, welche Dauer der Ausscheidung auf eine gesunde, welche auf eine kranke Niere schließen läßt, ist hauptsächlich bedingt durch die mangelnde Spezifität der Methoden. Man kann eben sehr kleine Zuckermengen (0,05%) nicht mit absoluter Sicherheit von den physiologischen Harnkörpern, die gleiche Reaktionen zeigen, abgrenzen. Und Proben von enormer Schärfe, wie die von Molisch (0,00001%), sind gerade wegen ihrer Intensität nicht zweifelsfrei verwendbar. Die letzt-

genannte fällt selbst in 300fach verdünntem, normalem Harn noch positiv aus!

Hier müßte sich eine Methode so ausarbeiten lassen, daß auf Zucker verdächtige Harn eine Verdünnung erfahren, bei der normaler Harn zweifellos immer eine negative Reaktion ergibt. Molisch schreibt hierfür 1 : 400 vor. Da die normale Harnzuckermenge mit 0,02—0,03% in maximo angenommen wird, wäre bei einem pathologischen Zuckergehalt von 0,02% und 400facher Verdünnung wieder ein positiver Ausfall zu erwarten. Ausgedehnte Versuchsreihen, die ich anstellte, waren jedoch ohne entscheidenden Erfolg. Einerseits ließen auch die wässrigen Lösungen einen ganz schwachen Ring erkennen, der etwa dem bei einer Harnverdünnung von 1 : 300 entsprach (festes α -Naphthol, salpetrigsäurefreie Schwefelsäure). Andererseits gaben milchzuckerhaltige Harn bei 400facher Verdünnung — die unbedingt erforderlich ist — erst bei einer Konzentration von 0,2% im ursprünglichen Harn einen deutlichen, von dem in wässriger Lösung gut unterscheidbaren Ring.

Über die Schärfe der sonst gebräuchlichen Reaktionen seien kurz ein paar Daten aus der Literatur angeführt. Der Nachweis von 0,05% wird im Harn kaum erreicht. Für Traubenzucker gelten nach Jolles im Harn folgende Werte: Sicherer Nachweis mit Nylanders Reagens im unbehandelten Harn erst von 0,3% an; in wässriger Lösung erhält man noch bei 0,01% eine Bräunung.

Mit der Trommerschen Probe können einerseits im Harn bis zu 0,24% Zucker vorgetäuscht (Jolles), andererseits im Wasser noch so geringe Mengen wie 0,0025% nachgewiesen werden (Müller und Hagen, zit. nach Lippmann). Mittels Fehling'scher Lösung erreicht man nach denselben Autoren sogar Werte von 0,00083%. Milchzuckerhaltige Flüssigkeiten geben, abgesehen von der Rubnerschen Probe, weniger scharfe Werte als traubenzuckerhaltige, da die reduzierende Wirkung des Milchsuckers geringer ist als die der Glucose. Mit der Rubnerschen Probe weist man in wässriger Lösung noch 0,1% Milchzucker deutlich nach, im milchzuckerhaltigen Harn vom selben Prozentgehalt erhält man ein negatives Resultat.

Die Polarisation erleidet sowohl bei glucose- als auch bei lactosehaltigen Harnen, die nicht ausgefällt sind, Beeinträchtigungen, z. T. durch physiologische Stoffe, z. T. durch Arzneimittel.

So stoßen wir also beim Zuckernachweis im nicht vorbehandelten Harn (und anderen tierischen Flüssigkeiten) auf Schwierigkeiten, wenn der Prozentgehalt unter 0,2 herabgeht (1 : 500). Die Schuld tragen die die Reaktion fördernden oder hemmenden

Substanzen (rechts- und linksdrehende, reduzierende Körper). Zu ihrer Beseitigung sind verschiedene Methoden empfohlen worden, von denen am häufigsten und wirksamsten das normale Bleiacetat und das Mercuriacetat (mit nachfolgender Entquecksilberung) angewandt werden, das letzte evtl. noch in Verbindung mit Phosphorwolframsäure. Meine Untersuchungen, die den qualitativen Nachweis möglichst kleiner Milchzuckermengen im Harn erstrebten, gingen einmal von der Blei- resp. Mercuriacetatmethode aus, das andere Mal wurde versucht, die Isolierung des Zuckers durch Bildung des Lactosazons zu erreichen. Zum Nachweis des Zuckers sollte dann bei allen 3 Methoden ein Verfahren angewendet werden, das erstmalig von Hehner bei der Bestimmung von Formaldehyd beschrieben, später von Salkowski auch für den Nachweis von Traubenzucker verwendet wurde. Die Methode beruht darauf, daß bei Vorhandensein formaldehydbildender Substanzen diese durch Oxydation in Formaldehyd übergeführt werden. Mit dieser Aldehydlösung läßt sich eine Reaktion ausführen, „die mit zu den schönsten und schärfsten in der ganzen physiologischen Chemie gehört“. (Salkowski.) Der Nachweis gestaltet sich folgendermaßen: 2–5 ccm der Lösung der auf Formaldehydbildung zu untersuchenden Substanz (FAS.), in unserem Falle also eine sehr verdünnte Zuckerlösung, werden mit 1–2 ccm folgender Oxydationsmischung (nach Salkowski) versetzt: 40 ccm 1proz. KMnO_4 -Lösung, 100 ccm Aqua dest., 60 ccm verd. H_2SO_4 (20 ccm konzentrierte in 100 ccm Aqua dest.). Erwärmung bis Braunfärbung der vorher lilafarbenen Flüssigkeit eintritt. Abscheidung von MnO_2 . Entfärbt sich die Lösung dabei, so muß vorsichtig noch etwas — 10 Tropfen — Oxydationsgemisch zugefügt werden, bis der Niederschlag bleibt. Nach 5 Minuten Zusatz von 2 (evtl. mehr) Tropfen gesättigter Oxalsäurelösung, durch die Entfärbung auftritt. Weiterhin Zusatz einer Messerspitze Pepton (Witte), Lösung durch Umschütteln evtl. Erwärmen, dann 1 Tropfen FeCl_3 . Zu dieser Lösung setzt man nun noch konzentrierte HCl (1,19 D) in einer Menge hinzu, die der Hälfte der bisher erhaltenen Flüssigkeit entspricht. Erhitzt man jetzt zum Sieden, so tritt schon bei sehr geringen Quantitäten von FAS. eine intensiv dunkelblaue Färbung auf, bei geringerer Konzentration wird die Farbe lila, verliert aber niemals die blaue Kom-

ponente. Färbungen, die statt blau einen rotbraunen Ton haben, sind als zweifelhaft zu werten. Sie traten gelegentlich der Untersuchung einiger Harnes auf, schlugen dann aber sehr bald in eine schmutzig-fahle Farbe um, während die blaue bis blauviolette Tönung bei Formaldehydgehalt tagelang unverändert blieb. Zuweilen war es erkennbar, daß ein zu großer FeCl_3 -Zusatz die schmutzige Verfärbung bewirkt hatte. Um sich die typische Reaktion einzuprägen, oxydiert man am einfachsten 2 ccm eines Normalharnes. Hier erfolgt eine sehr intensive Färbung. Oder wer die verschiedenen Abstufungen bei steigender Verdünnung erkennen will, stellt sich mit Formalin 10 Reagensglasproben in einer Konzentration von 1 : 100 000 bis 1 : 1 000 000 her. 1 : 900 000 ist bei Anwendung von 5 ccm noch positiv, 1 : 1 000 000 wird negativ. Diese „Testobjekte“ scheinen unbegrenzt haltbar.

Die außerordentliche Schärfe dieser Reaktion schien geeignet, sie auch für den Zuckernachweis zu verwenden. Salkowski hat so Traubenzucker in Wasser gelöst bis 0,02%, im Harn bis 0,2% sicher nachweisen können. Für Milchzucker fand ich in wässriger Lösung das gleiche Ergebnis. Zu beachten ist dabei, daß man bei sehr geringen Konzentrationen mit der Oxydation äußerst vorsichtig sein muß. Bei 5 ccm Flüssigkeit darf man dann höchstens 2 ccm Oxydationsmischung¹⁾ hinzusetzen, andernfalls wird sie negativ. Auch der Zusatz von FeCl_3 , das wahrscheinlich vor allem als Katalysator wirkt, muß genau erfolgen. Seine oxydierende Wirkung scheint weniger wesentlich zu sein (bei Anwendung von Kaliumpersulfat negatives Ergebnis), doch ist dies schwer zu entscheiden, da schon außerordentlich geringe Mengenunterschiede von entscheidendem Einfluß sein können. Bei Verdünnungen über 1 : 1000 darf nicht mehr als 1 Tropfen hinzugefügt werden, sonst erhält man nach dem Salzsäurezusatz + Erhitzen eine schmutzig-fahle (graugrüne) Färbung (s. o.). Für die Salzsäure und das Pepton sind genaue Quantitäten nicht erforderlich. Pepton etwa eine Messerspitze voll, Salzsäure wie oben.

Nachdem so die Möglichkeit festgestellt war, auch mit Milchzucker die Hehnersche Reaktion auszuführen, wurden die Versuche mit Harn angestellt. Hier galt es eben die Schwierigkeit

¹⁾ Die Reaktion gelingt auch schon mit 10 Tropfen.

zu überwinden, die FAS. des normalen Harns, die eine außerordentlich intensive Reaktion geben, zu beseitigen (s. a. Sal-kowski, Zeitschr. f. phys. Chemie 93). Ich benutzte zuerst das Bleiessig-Ammoniakverfahren nach Brücke.

I.

Eine Milchzuckerlösung 1 : 1000 wurde mit Normalharn verdünnt auf Konzentrationen von 1 : 2000 bis 1 : 5000. Zu 10 ccm Milchzuckerharn im Reagensglas wurden dann 2 Messerspitzen Bleiacetat gegeben, durchgeschüttelt, in ein zweites Reagensglas filtriert (am besten Filter von 9–11 cm Durchmesser, Schleicher & Schüll Nr. 590), einmal nachgewaschen. Das Filtrat ammoniakalisch gemacht, noch eine Messerspitze Bleiacetat zugefügt, nach einer halben Stunde filtriert, der Rückstand einigemal mit ammoniakhaltigem Wasser gewaschen, dann in 5 ccm heißer 30 proz. Essigsäure gelöst. Von den Lösungen wurden je 5 ccm zur Probe genommen.

Für alle Versuchsreihen wurden Kontrollharn (d. h. zuckerfreie) angesetzt. In keinem Falle gelang es nun, für diese Normalharn negative Reaktion zu erzielen. Immer war eine mehr oder weniger starke Rotfärbung nach dem Erhitzen mit Salzsäure aufgetreten. Einigermaßen sicher stachen gegen diese Farbe erst Harn von einer Milchzuckerkonzentration von 1 : 200 bis 1 : 400 ab, weil hier die blaue Farbe vorherrschte. Bei geringerer Konzentration (1 : 500 bis 1 : 1000) war eine Entscheidung nicht mehr möglich¹⁾. Zwar wird, wer die Probe erst im normalen un-behandelten, dann im mit Bleiacetat versetzten normalen Harn anstellt, einen erheblichen Unterschied sehen. Trotz der Ent-fernung des größten Teils der FAS. durch Bleiacetat hört aber bei einem Zuckergehalt von 1 : 400 die Entscheidungsmöglichkeit, ob milchzuckerhaltiger Harn vorliegt oder nicht, auf. An diesem Resultat konnten auch neue Versuchsbedingungen nichts ändern. So nahm ich z. B. statt 5 ccm der essigsäuren Lösung nur 2, dann entbleite ich durch H_2S , weil bei späterem Zusatz des Oxy-dationsgemisches der reichliche Niederschlag von Bleisulfat schwer

¹⁾ Welcher physiologische Harnkörper mit dem Bleiacetat-Ammoniak-niederschlag auf dem Filter geblieben war und die Reaktion verursachte, ist fraglich. Colls nimmt an, daß Kreatinin, an das wohl zuerst gedacht werden muß, durch Bleiacetat gefällt werde, Albanese widerspricht dem.

erkennen ließ, wann genügend Gemisch hinzugesetzt war. Aber auch damit und mit 5 maligem Waschen des Niederschlages kam ich zu keinem anderen Resultat. Das Brückesche Verfahren ergab also keine Möglichkeit, normalen Harn so zu reinigen, daß er mit dem Reaktionsgemisch behandelt negative Reaktion gegeben hätte, d. h. farblos oder grüngelb geblieben wäre.

II.

Ich versuchte die zweite Methode. Der Gedanke ging dahin, den Milchzucker als Lactosazon zu binden, die übrigen FAS. zu beseitigen und dann das Osazon zu zersetzen, um den Milchzucker wieder zur Reaktion frei zu haben. Hier war also außer der Aufgabe, die FAS. zu beseitigen, noch diese zu erledigen, wie das Lactosazon in seine beiden Komponenten gespalten werden konnte. Denn die COH-Gruppe (dort binden sich Zucker und Hydrazin aneinander) mußte natürlich wieder frei werden, sollte eine Reaktion möglich sein. Als Vorproben wurden 40 ccm Milchzuckerlösung 1 : 500 mit 0,5 g salzsaurem Phenylhydrazin und 1 g Natriumacetat versetzt, eine Stunde auf dem Wasserbad erhitzt. Am nächsten Tage wurde der Niederschlag (typisches Lactosazon) in kochendem Wasser gelöst, 2 ccm zur Reaktion verwandt, die stark positiv ausfiel. Damit war die Möglichkeit der Spaltung des Osazons durch das Oxydationsgemisch bewiesen. (Bemerkt sei, daß das Filtrat auch positive Reaktion ergab. Es war also nicht aller Milchzucker als Osazon ausgeschieden. Das stimmt mit quantitativen Versuchen überein.) Es fragte sich nun, wie sich normaler Harn verhält. Normaler Harn wurde, wie oben für die Zuckerlösung angegeben, mit Phenylhydrazin und Natriumacetat versetzt; nach 12 Stunden dicke Trübung. Filtrieren durch Schleicher-Schüll Nr. 590. Nun war es möglich, daß in dem Filtrerrückstand FAS. vorhanden waren, die durch eine Osazone nicht angreifende Waschmethode entfernt werden mußten. Ich wusch zuerst 2 mal mit verdünnter H_2SO_4 (hellgelbe Lösung), die, oxydiert, beidemale ganz schwache Reaktion gab. Hinterher auf dasselbe Filter 10 ccm Äthylalkohol, der natürlich auf Reaktionslosigkeit, wie überhaupt alle sonst noch verwendeten Stoffe wie Pepton, Essigsäure usw. geprüft war. Die klare, dunkelbraun gefärbte Flüssigkeit wurde im Wasserbad auf etwa 0,5 ccm

eingedampft, bis kein Geruch nach Alkohol mehr vorhanden war, mit 2 ccm Wasser verdünnt, oxydiert: starke Blaufärbung.

Ein nochmaliger Auszug des Filtrerrückstandes mit Alkohol ergab keine Reaktion. Verwendete ich für die ersten beiden Waschungen (je etwa 10 ccm) statt H_2SO_4 kaltes Wasser, so erhielt ich in dem ersten Waschwasser eine sehr starke, in dem zweiten eine ganz schwache Reaktion, und eine darauffolgende Behandlung des Filters mit Alkohol oder heißem Wasser ließ keinen positiven Ausfall mehr erkennen. Damit war der Weg zur Isolierung des Lactosazons gegeben.

Der zuckerhaltige Harn mußte mit einer noch näher zu bestimmenden Menge Phenylhydrazin versetzt, im Wasserbad erhitzt werden. Der Rückstand 2 mal mit kaltem Wasser gewaschen, dann in heißem Wasser (Lactosazone lösen sich in kaltem Wasser sehr schwer, in kochendem leicht) gelöst werden. Erst durch diese Behandlung war ein einwandfreies Resultat zu erwarten.

Versuch: Es wurden 38 ccm Harn (1012) mit 2 ccm Lactoselösung 1 : 100 versetzt = 1 : 2000. Nach der Phenylhydrazinbehandlung wurde der Rückstand beim ersten Versuch mit 2 mal 5 ccm kaltem, dann mit der gleichen Menge kochendem Wasser gewaschen. Beim zweiten Versuch wurde statt des kochenden Wassers kalter Alkohol genommen. Die Vermutung ging dahin, daß zum mindesten die erste Fraktion des Heißwasser- resp. Alkoholfiltrates positive Reaktion ergeben würde, bei negativer oder fast negativer Reaktion des zweiten kalten Waschwassers. Das trat nun nicht ein, sondern bei sämtlichen Harnen war das Ergebnis folgendermaßen:

Erstes Reagensglas (kaltes Waschwasser) . . .	stark positiv
Zweites Reagensglas (kaltes Waschwasser) . .	schwach positiv
Drittes Reagensglas (heißes Waschwasser bzw.	
Alkohol).	negativ
Viertes Reagensglas (desgl.)	negativ

Der negative Ausfall der 3. und 4. Probe konnte bedingt sein:

1. Durch zu geringe Zuckerkonzentration. Bei den Vorversuchen in wässriger Lösung (ohne Phenylhydrazin) wurde zwar bei 1 : 5000 Milchzucker noch deutlich nachgewiesen; die später mit Phenylhydrazin im wässrigen Medium ausgeführten

Versuche hatten aber ergeben, daß ein gewisser Teil des Zuckers nicht als Osazon ausgeschieden wurde, und dadurch für diese Reaktion verloren ging.

2. Durch mangelhafte Krystallbildung (zu viel resp. zu wenig Hydrazin).

3. Zu große Porenweite des Filters.

4. Ungenügende Lösung der Krystalle in heißem Wasser.

Zu Punkt 3 ist noch zu bemerken, daß das Filtrat fast stets sehr trübe war. Auch durch doppelte Filter ließ sich kein klareres Filtrat gewinnen. Zur Reaktion wurden immer nur 2 ccm genommen. Die ersten Zusätze der Oxydationsmischung wurden sofort entfärbt, so daß meist 5 ccm und mehr bis zum Bestehenbleiben eines MnO_2 -Niederschlages erforderlich waren. Die hierdurch bedingte Verdünnung konnte natürlich an dem negativen Ausfall beteiligt sein. (Der braune Niederschlag, der sich nach dem Waschen mit heißem Wasser noch auf dem Filter befand, bestand wohl zum größten Teil aus verharztem Phenylhydrazin. Er löste sich sofort in Alkohol, gab keine Reaktion.)

Am wahrscheinlichsten war nach dem unzweifelhaft positiven Ausfall der Probe in den Vorversuchen mit typischen Lactosazonykrystallen, daß bei den obigen Reaktionen die Krystallbildung infolge zu geringer Milchezuckerkonzentration mangelhaft ausgefallen war. Allerdings liegt eine weitere Möglichkeit des Versagens bei sehr kleinen Zuckermengen nach Neuberg noch darin, daß zuviel Hydrazin angewendet wird. Im Überschuß von Phenylhydrazin lösen sich die Osazone. Um nun festzustellen, welche Milchezuckerkonzentration mit Phenylhydrazin eine noch eben makroskopisch erkennbare Krystallbildung zeigte, wurden Konzentrationen von 1 : 500 bis 1 : 1250 (je 40 ccm) mit je 5 Tropfen Hydrazin und 6 Tropfen Eisessig versetzt.

1 : 500 1 : 750 1 : 1000 1 : 1250

Krystallbildung: deutlich gering gelber Bodensatz nicht erkennbar

Da die Methodik möglichst den Bedürfnissen der Klinik angepaßt werden sollte, das Erhitzen auf Wasserbädern in Bechergläsern aber sehr viel Platz erfordert und immer nur eine beschränkte Anzahl Proben zuläßt, wurde nach einem Reagensglasverfahren gearbeitet. Hier können in einem Wasserbad 30 Proben und mehr gleichzeitig angesetzt werden. So wurden zahlreiche Ver-

suchsreihen darüber angestellt, mit welchem Verhältnis von salzsaurem Phenylhydrazin zu Natriumacetat bei Zuckerkonzentrationen von 1 : 100 bis 1 : 500 die schönste Krystallbildung zu erzielen war. Die besten Ergebnisse hatte ich bei Anwendung von 2 Gewichtsteilen salzs. Phenylhydrazin und 4 Gewichtsteiler. Na-Acetat (nach anderen 2 : 3). An Gramm Mengen nahm ich nach alter Vorschrift die 20fache Menge des vermuteten Zuckers an Phenylhydrazin. Also Lösung 1 : 500 10 ccm = 0,02 g Zucker = 0,4 g salzsaures Phenylhydrazin (das ich in der Folge stets statt des leicht verharzenden reinen Phenylhydrazins verwendete). Die Erhitzung geschieht hier etwas anders als bei den früheren Versuchen. Man setzt die Reagensgläser in ein Wasserbad, läßt 20 Minuten kochen und dann im Bad langsam abkühlen. Nach 12–24 Stunden hatte ich bei 1 : 500 bis 1 : 750 immer schöne Krystallbildung. Zuweilen hatten sie nicht die typische runde Form (s. C. Neuberg, Der Harn), sondern waren stachlig.

Wurde die Vorsicht, langsam erkalten zu lassen, außer acht gelassen, so erhielt ich nur amorphe Niederschläge, bei langsamen Abkühlen hingegen immer schöne Krystalle (bis 1 : 750 makroskopisch), die eine deutlich positive Reaktion gaben.

In gleicher Weise gewonnene und behandelte Normalharnniederschläge ergaben in meinen Versuchen niemals eine positive Reaktion.

Gelegentlich erhielt ich bis zu einer Konzentration von 1 : 900 mit milchzuckerhaltigen Harnen einen positiven Ausfall. Doch scheint bei einer solchen Verdünnung die Bildung der Krystalle im Harn von verschiedenen, schwer beeinflussbaren Momenten abzuhängen. Als sichere Grenze möchte ich daher 1 : 500 = 0,2% annehmen. Dieser Wert stimmt (s. o.) also ungefähr mit den als für Milchzucker beweisend geltenden Zahlen überein, die man nach dem Brückeschen Verfahren findet. Die Osazonmethode ist aber sicherer, da das Brückesche Verfahren immer einen schwach positiven Ausfall zeigt, gegen den die Milchzuckerreaktionen erst abgeschätzt werden müssen. Die Ausführung der Probe ist nicht ganz einfach. Einerseits muß man sich erst mit den Farben vertraut machen, andererseits können die Zusätze des Oxydationsgemisches unter Umständen verfehlt (überschritten) werden, wodurch eine Oxydierung der evtl. vor-

handenen FAS. zu Ameisensäure, $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ erfolgen und damit eine negative Reaktion bedingt werden kann. Zusammengefaßt wird die Reaktion also folgendermaßen ausgeführt:

Zu 10 ccm evtl. geklärtem und entweißtem Harn werden 0,2 g essigsaures Phenylhydrazin und 0,4 g Natriumacetat hinzugegeben, 20 Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt, langsam abgekühlt, bis zum nächsten Tage stehengelassen. Filtrieren durch ein kleines Filter, Auswaschen des Rückstandes mit 2 mal 10 ccm kaltem Wasser, lösen des Niederschlages in möglichst wenig (5, höchstens 10 ccm) kochendem Wasser; 2–5 ccm des Filtrates werden mit soviel Oxydationsgemisch versetzt, daß nach dem Erhitzen ein Niederschlag von MnO_2 bestehen bleibt, nach 5 Minuten mit 3 Tropfen gesättigter Oxalsäurelösung entfärbt. Dann eine Messerspitze Pepton, erwärmen, 1 Tropfen 3proz. FeCl_3 -Lösung, die Hälfte des bisher gewonnenen Volumens an konz. Salzsäure zusetzen. Eine halbe Minute sieden lassen.

III.

An dritter Stelle versuchte ich, ob zur Entfernung der FAS. auch ein von Neuberg, allerdings für andere Zwecke, nämlich für polarimetrische und reduktionsanalytische Prüfungen von Zuckerlösungen, angegebenes Verfahren brauchbar sei, die Fällung mit Mercuriacetat und später mit Mercuriacetat und Phosphorwolframsäure. Hierdurch werden Eiweißkörper, Aminosäuren eingeschlossen, Purinbasen und Nucleinsäuren ausgefällt, so daß zum mindesten für die Polarisation das günstigste bisher zum Zuckernachweis erreichte Verfahren damit erzielt wurde. Zur Erlangung eines Urteils für die Brauchbarkeit bei dem Oxydationsverfahren waren folgende Versuchsbedingungen zu erproben.

Zunächst erwies sich ein Zusatz von 2 g Mercuriacetat (gepulvert und mit dem Harn verrieben) bei Anwendung von 10 ccm Harn als ungenügend. Ich konnte noch etwa 60 Tropfen konz. Mercuriacetatlösung zugeben, bis keine Fällung mehr eintrat. Die Entquecksilberung gelang stets mit einem Male durch Anwendung von 3 g Zinkstaub und 1 Tropfen HCl und einer Spur Kupfersulfat.

Nach dem Zusatz von Oxalsäure (s. o.) trat ein weißer Niederschlag auf. Seine Entfernung durch Filtrieren ließ eine evtl. positive Reaktion viel intensiver erscheinen als wenn er im Gemisch blieb.

War die Entquecksilberung ungenügend gewesen, so trat gleichfalls ein weißer Niederschlag auf, der sich zwar auch in HCl löste, eine positiv zu erwartende Reaktion aber negativ werden ließ. (In wässriger Lösung mit 2 ccm Milchzuckerlösung 1 : 100 erprobt.) Nach diesen Feststellungen konnte die Methode auf den Harn angewendet werden.

5 ccm Normalharn werden mit 5 ccm Wasser verdünnt. Dazu etwa 4 ccm ges. Mercuriacetatlösung; nach 15 Minuten filtriert. Das Filtrat entquecksilbert, dann wie üblich weiter verfahren. Bei späteren Versuchen wurde nach dem Zugeben von Mercuriacetat eine weitere Fällung (nach Neuberg) mit Phosphorwolframsäure eingeschoben. Der Zusatz darf nur tropfenweise geschehen (25 proz. Lösung), weil die ausfallenden Körper sich im Überschuß der Säure zu einer das Filter passierenden Suspension auflösen. Ich kam mit 2—3 Tropfen aus.

Das Resultat: Es gelang im normalen Harn weder durch die Mercuriacetatfällung noch durch die Kombination mit Phosphorwolframsäure eine völlige Entfernung der mit KMnO_4 Formaldehyd liefernden Substanz; immer war die Endfarbe lila bis lilarot, oft sogar recht intensiv. Infolge dieses „positiven“ Ausfalls der Reaktion im normalen Harn ist die Mercuriacetatfällung bei Anwendung dieser Oxydationsmethode für den Nachweis kleiner Milchzuckermengen nicht brauchbar.

Das Ergebnis der an milchzuckerhaltigen Harnen angestellten Untersuchungen ist demnach dieses, daß bei Anwendung der Formaldehydreaktion ein einwandfreies Resultat nur mit der Bildung des Lactosazons erzielt wird. Die Methode ist jedoch bloß bei Konzentrationen bis zu 0,2% herab anwendbar, bei stärkeren Verdünnungen versagt sie. Da aber für eine Funktionsprüfung der Niere, erhebt sie Anspruch auf Genauigkeit, Zuckerausscheidungen von 0,1% mit erfaßt werden müssen, so wird die beschriebene Probe für dieses Gebiet nicht empfohlen werden dürfen. Die Erwägungen, die zur Isolierung des Zuckers von den übrigen reduzierenden Harnsubstanzen führten, verlieren also

durch die in sehr verdünnten Lösungen ungenügende Lactosazonbildung an praktischem Wert¹⁾.

Literatur.

Schlayer und Takayasu, Untersuchungen über die Funktion kranker Nieren. Arch. f. klin. Med. 98, 17 ff. — Strauss, Die Nephritiden. 1916. — Jacksch, Zeitschr. f. analyt. Chemie 24, 478. — Molisch, Monatsb. f. Chemie 7, 198. — Neuberg, Der Harn. Bd. I, S. 324, 325 ff. — Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chemie 93. — Salkowski, Arbeiten a. d. Pathol. Inst. 1906. — Tollens, Handbuch der Kohlenhydrate 1914. — v. Lippmann, Chemie der Zuckerarten.

¹⁾ Bei Vorhandensein von $\frac{1}{10}$ – $\frac{1}{20}$ % Traubenzucker im Harn hat Salkowski durch mikroskopischen Nachweis das Glucosazon mittels besonderer Methodik auch bei Harnen von hohem spezifischen Gewicht darstellen können. Hingegen verhielten sich Milchzucker und Maltose von der gleichen Konzentration negativ. (Arbeiten a. d. Pathol. Inst. 1906.)

Zur Visco- und Stalagmetrie des Harns.

Von
Ernst Joël.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit zu Berlin.)

(Eingegangen am 13. April 1921.)

Die hier mitgeteilten Untersuchungen knüpfen unmittelbar an die Studien von C. Posner über Viscosität und Oberflächenspannung menschlicher Harnen an^{1) 2)}. Diese gehen wieder auf die grundlegenden Arbeiten von Traube und Blumenthal^{3) 4)} zurück. Inzwischen sind aus dem Frankfurter Institut für Kolloidchemie weitere Veröffentlichungen durch Bechhold und Schemensky^{5) 6) 7)} erfolgt.

Es lassen sich drei wesentlich verschiedene Absichten und entsprechende Versuchsanordnungen unterscheiden: Traube und seine Mitarbeiter interessierte die Oberflächenspannung der Körperflüssigkeiten vornehmlich zur Klärung der Fragen der Sekretion und Resorption, die er durch den Oberflächendruck reguliert sah. Als Oberflächendruck definiert er die Differenz der Oberflächenspannungen zweier durch eine Membran getrennter Flüssigkeiten; die Oberflächenspannungen seien wiederum abhängig von der Kohäsionskraft der Innenteilchen. Dieser Oberflächendruck bestimme Richtung und Geschwindigkeit der Osmose.

Während also Traube aus der Oberflächenspannung des Harns und des Blutes Rückschlüsse auf die Bedingungen der Nierenfunktion ziehen will, nimmt Bechhold und Schemensky den Harn als fertiges Produkt, dessen „stalagmetrischer Quotient“ über den Gehalt an gewissen Stoffen, „Stalagmonen“*) Aufschluß geben soll. Dieser Fragestellung entsprechend reguliert er am Urin die Einflüsse, die den Wert der Oberflächenspannung ihrerseits modifizieren können, nämlich seine aktuelle Reaktion und das spezifische Gewicht (das übrigens zwar die Tropfengröße verändert, aber eigentlich nicht die Oberflächenspannung und dessen Einfluß durch Berechnung auszuschalten genügen würde). Indem er den so normierten Harn durch Tierkohleausschüttelung von capillaraktiven Stoffen möglichst befreit, gelangt er zu verschiedenen Verhältniszahlen, die er für

*) Statt dieser Bezeichnung dürfte sich vielleicht die von L. Michaelis⁸⁾ gewählte: „bathotonen Stoffe“ empfehlen, die keine Bestimmungsmethode der Oberflächenspannung präjudiziert.

klinisch-diagnostische Gruppierungen zu verwerten sucht. Bei der bathotonen Wirkung gerade der Kolloide und Semikolloide rücken diese Arbeiten in die Nähe jener in Deutschland von Hofmeister und Lichtwitz inaugurierten Forschungen, welche durch Dialyse und Goldzahlbestimmungen Gehalt und Verteilungsart eben dieser Kolloide feststellen wollen.

C. Posners Fragestellung ist weder auf Erfassung der bei der Harnbereitung auftretenden Energieformen noch auf bestimmte physikalisch erschließbare Substanzen gerichtet. Er sucht vielmehr durch Feststellung der Oberflächenspannung und der inneren Reibung Faktoren kennen zu lernen, die neben Blut- und Sekretionsdruck, cellulären Veränderungen der Harnwege, Reaktion und Konzentration einen Einblick in die Bereitung des Harns, vor allem aber sein weiteres Schicksal, besonders im capillären Nierensystem, gewinnen lassen. Die allgemeinste Absicht derartiger Studien, besonders in Verknüpfung mit anderen physikalisch-chemischen Methoden, wie Ultramikroskopie und Goldzahlbestimmungen, wäre demnach die Erforschung jener verwickelten, meist der Oberflächendynamik angehörigen Vorgänge, die dem Harn trotz seines Charakters als Exkrets weitgehend zukommen und die besonders für die Pathologie der Gerinnsel-, Sediment- und Konkrementbildung neben den cellulären Einflüssen der Entzündung als physikalische, humorale Faktoren Beachtung verdienen.

Im besonderen gilt es, in der Oberflächenspannung als Ausdruck für die relative Tropfengröße der in den Tubuli differenzierten Harntröpfchen auch die Größe der Gesamtoberfläche der capillaraktiven Kolloidteilchen abzuschätzen und sich mit ihrer Zunahme eine voraussichtliche Zunahme von Adsorptions- und Fällungserscheinungen vorzustellen. Immerhin muß aber ein relatives Minimum der Größe des Kolloidteilchens, d. h. eine verhältnismäßig weitgehende Dispersität gewährleistet sein, wenn sie ihre Schutzwirkung auf übersättigte Kristalloide ausüben sollen; es muß also, wenn ein klarer stabiler Harn produziert werden soll, wie so häufig in der Kolloidchemie ein Optimum, hier also das der Oberflächenspannung erfüllt sein.

Tritt im kolloidalen Milieu die Zeit als Faktor ganz besonders hervor, so spielt in diesem Zusammenhang, wo es sich ja um eine beständig fließende Materie handelt, die Viscosität die Rolle eines zeitlichen Faktors für die eben skizzierte Vorgänge. Bei dem meist reziproken Verhalten von Oberflächenspannung und Viscosität tritt dieses Moment sehr deutlich in Erscheinung.

Es liegen bisher nur wenige Viscositätsmessungen an Harnen vor; außer den erwähnten von Posner sei auf Daten von Botazzi⁹⁾ hingewiesen. Der Wert für die relative Viscosität schwankt normalerweise zwischen 1,0 und 1,08, pathologischerweise bis etwa 1,15. Über den Einfluß der Kolloide, besonders auch des Eiweißes und der Konzentration sind entweder gar keine oder verschiedene, zum Teil entgegengesetzte Ansichten geäußert worden. — Mehr Arbeiten liegen über die Oberflächenspannung (γ) des Harnes vor. Außer den oben genannten seien erwähnt die von Frenkel und Cluzet. γ betrug im Durchschnitt 80—95% der Oberflächenspannung des Wassers. Auf den bathotonen Einfluß von Galle, Blut und Eiweiß

wurde mehrfach hingewiesen. Das spezifische Gewicht der Harns (wie auch anderer Körperflüssigkeiten) ist nicht immer berücksichtigt worden und zum Teil wurden aus Differenzen, die sich zwanglos aus Vergleichen der verschiedenen spezifischen Tropfenschwere erklären würden, weitgehende, verfrühte Schlüsse gezogen.

Absicht vorliegender Arbeit war es, an einem größeren Material von einigen hundert Harnen Gesunder und Kranker vergleichende Untersuchungen zu machen, die die älteren Untersuchungen bestätigen und besonders in den Fragen des Einflusses von spez. Gewicht und krankhaften Beimengungen ergänzen sollten.

Es wurde ein Visco-Stagonometer nach J. Traube ohne weitere Modifikation benutzt. Als relative Viscosität (ρ) wurde der Quotient der in Sekunden angegebenen Durchlaufzeiten der Untersuchungsflüssigkeit und gleichtemperierten destillierten Wassers, als relative Oberflächenspannung (γ) der auf Wasser bezogene Prozentanteil der Tropfengröße bezeichnet. Das spezifische Gewicht ist in allen Resultaten berücksichtigt.

Viscosimetrische Untersuchungen.

Wie alle Körperflüssigkeiten hat auch der Harn eine höhere Viscosität als die reinen Wassers. $\rho = 1,0-1,05$. Sie ist z. T. von der Konzentration abhängig, aber nicht ihr proportional. So hatte bei meinen Untersuchungen von Harnen Gesunder der mit dem höchsten spez. Gewicht 1036 $\rho = 1,03$. Derartige ziemlich weitgehende Schwankungen mögen lediglich durch verschieden wirkende Salze verursacht werden. Zur Demonstration der relativen Unabhängigkeit der Viscosität von der Dichte wurden einige Harns durch Zusatz von Aq. dest. auf ein bestimmtes spez. Gewicht gebracht und mit solchen verglichen, die dieses an sich besaßen:

Krankheit	Ursprüngliches spez. Gewicht	ρ	ρ nach Verdünnung auf spez. Gew. 1010
1. Tonsillitis	1032	1,024	1,017
2. Nephrosklerose	1022	1,035	1,028
3. Nephrose	1012	1,097	1,083
4. Granularatrophie . . .	1010	1,020	1,020
5. Neurasthenie	1010	1,031	1,031

D. h. es hat nach der Verdünnung zwar eine geringe Annäherung an die Viscosität der weniger konzentrierten Harns statt-

gefunden, doch bleibt bemerkenswert: 1. daß sich die Viscositätswerte der 3 ersten Harne nach der Verdünnung untereinander genau so verhalten wie vorher und 2. daß gerade der spezifisch leichteste (Nr. 3) die höchste Viscosität hat, was auf die Rolle der Kolloide hinweist.

Einen großen Einfluß äußern natürlich im Harn suspendierte Formbestandteile: Zellen, Zylinder und anorganische Niederschläge.

Nr.	Krankheit	Spez. Gewicht in g	Relative Viscosität	
			Vor dem Filtrieren in g	Nach dem Filtrieren in g
1	Menstruationsharn . . .	1026	1,92	1,32
2	Schwere Pyelocystitis .	1023	1,76	1,07
3	Leichtere Pyelocystitis .	1018	1,07	1,01
4	Glomerulonephritis . . .	1030	1,64	1,05
5	Nephrose	1011	1,84	1,23

D. h. mit der Fortnahme vieler Formbestandteile kommt es zu erheblich leichterem Fließlichkeit. Bei Nr. 1 und Nr. 5 ist die Viscositätsabnahme geringer, sehr wahrscheinlich wegen des größeren Schleim- bzw. Eiweißgehalts dieser Harne.

Von C. Posner wurde darauf hingewiesen, daß derartige Viscositätsdifferenzen zwischen nichtfiltriertem und filtriertem Harn auch dann noch bemerkbar sein können, wenn die gewöhnliche mikroskopische Betrachtung des Sediments nur geringen Aufschluß über Formbestandteile gibt. Erst das Dunkelfeld hat gelehrt, daß trotzdem überaus zarte Zylindroide (Präzylinder) in so großer Menge vorhanden sein können, daß sie den Viscositätsunterschied zwischen Filtrat und Nichtfiltrat bedingen.

Nach den bereits gegebenen Hinweisen sollte man für Albuminurien generell eine höhere Viscosität annehmen. Bei Bestimmungen an einem Fall von Nephrose ergab sich:

Krankheitstag	Albumen des Filtrats nach Ebbach in ‰	Spez. Gewicht in g	Rel. Viscosität
5.	12 ¹ / ₂	1010	1,05
8.	9	1012	1,01
15.	2 ¹ / ₂	1008	1,01
18.	3 ¹ / ₂	1010	1,04
23.	4	1020	1,08

An weiteren Fällen:

Nr.	Krankheit	Albumen nach Eßbach ‰	Spez. Gewicht in g	Rel. Vis- cosität
1	Lungenphthise u. Nephrose	7	1025	1,08
2	Nephrose	7	1016	1,06
3	Glomerulonephritis	6	1020	1,06
4	Hämatooligurie	?	1032	1,16
5	Sekundäre Schrumpfniere	1/2	1009	1,02
6	Nephrosklerose	Spur	1022	1,03

Im Falle der Nephrose machen sich eher die Konzentrationswerte als die Eiweißquoten geltend, besonders bei Vergleichung des ersten mit dem letzten Ergebnis. Bei den anderen Albuminurien liegen die Viscositätswerte etwas höher, bewegen sich aber auch noch nahe an der normalen Breite.

Hingegen kommt der Einfluß der Kolloide bei einer anderen Körperflüssigkeit ganz anders zur Geltung:

Nr.	Krankheit	Flüssigkeit	Albumen nach Eßbach in ‰	Spez. Gewicht	Rel. Viscosität
1	Nephrose	Harn	8	1013	1,05
2	„	Ascitesflüssigkeit	14	1010	1,29

Es ist also, was auch für die Deutung der Oberflächenspannungswerte in Betracht zu ziehen ist, der verschiedene Lösungszustand des Harn- bzw. Asciteseiweißes auf die innere Reibung von Einfluß. Alle Bedingungen, die die Eiweißlösung dem Charakter eines Suspensoids annähern, werden ihm auch die ihm ursprünglich eigene hohe Viscosität (und niedrige Oberflächenspannung) nehmen. Findet Flockung statt, so steht das Eiweiß unter den gleichen Bedingungen wie die vorhin erwähnten Sedimente, wird also beim Filtrat nicht mehr berücksichtigt. Die Annahme von Lichtwitz¹⁰⁾, daß der Lösungszustand des Eiweißes bei der Sekretion vergrößert wird, zu der ihn Goldzahl-Untersuchungen führten, findet also viscosimetrisch eine neue Bestätigung. Gleichzeitig wird die Unzulässigkeit, aus der relativen Viscosität auf die Anwesenheit von Kolloiden quantitative Schlüsse zu ziehen, deutlich illustriert.

Zum Studium des Einflusses der Kolloide, der Konzentration und der Temperatur wurde Harn eines Gesunden mit einer 1 proz. wässrigen Gelatinelösung versetzt und die Durchlaufzeiten im Ostwaldschen Viscosimeter bestimmt. (Die Zahlen wären zweifel-

los bei direkter Lösung der Gelatine im Harn noch instruktiver geworden.)

Harn ccm	Iproz. Gelatinelösung ccm	Spez. Gew. bei 20°	Durchlaufzeiten in Sekunden				
			34°	36°	38°	40°	42°
0	10	1003	85	80	76 $\frac{1}{8}$	73	70
3	7	1010	79	76	73 $\frac{1}{8}$	71	69
5	5	1015	77	74	72	69 $\frac{1}{8}$	66 $\frac{1}{8}$
7	3	1022	73	69 $\frac{1}{8}$	67	63 $\frac{1}{8}$	61 $\frac{1}{8}$
10	0	1028	69	66 $\frac{1}{8}$	63 $\frac{1}{8}$	62	60

Eiweißhaltige Harne zeigen nach Erhitzen auf etwa 50° und folgender Abkühlung Zunahme der Viscosität, so z. B. von 1,05 auf 1,08 und von 1,04 auf 1,06. — Eiweißfreie Harne und solche, die beim Erwärmen kein Sediment fallen lassen, zeigten nach Kochen keine Änderung der inneren Reibung.

Zur Frage der Beziehungen zwischen Vermehrung der gelösten Substanzen und der Viscosität wurden Zuckerharne herangezogen, da in gewissen Grenzen mit Erhöhung des Zuckergehaltes auch Erhöhung der Viscosität zu erwarten war. Hier einige Beispiele von Glykosurien:

Zuckergehalt in %	Spez. Gewicht	Relative Viscosität	Bemerkungen
—	1011	1,01	
0,4	1015	1,00	
1,0	1023	1,04	
1,2	1018	1,08	Acidose
3,2	1024	1,04	
3,2	1035	1,19	
3,6	1019	1,08	
4,0	1027	1,14	Albumen +
4,4	1035	1,16	Albumen +

Auch fortlaufende Bestimmungen an einem Fall von Diabetes ließen lediglich eine ungefähre Parallelität zwischen innerer Reibung und Zuckergehalt erkennen. T a n a k a¹¹⁾ fand, daß Harn bei Phloridzindiabetes in jedem Fall viscoser als Normalharn sei. Die Differenz zwischen den beiden Viscositätswerten verhielt sich nicht proportional der Zuckermenge. Er nahm daher an, daß außer Zucker und Salzen zeitweise noch kolloidale Substanzen im Harn gewesen sein müssen, die auf die Viscosität einen großen Einfluß haben, auf das spezifische Gewicht aber nicht. Für die Fälle von echtem Diabetes ist an kolloidal ausgeschiedene Kohlenhydrate zu denken.

Für eine wässrige Traubenzuckerlösung gestalten sich die Werte:

Traubenzuckerlösung in %	Spez. Gewicht	Relative Viscosität
1	1002	1,01
10	1034	1,23
und bei einem mit Traubenzucker versetzten Harn		
5	1035	1,15
10	1043	1,27

Von einer großen Anzahl von Krankheitsfällen sei hier nur eine kleine willkürliche Auswahl wiedergegeben, da sich die Ergebnisse in uncharakteristischer Weise wiederholen. Es wurden stets die Morgenharne (und zwar filtriert) untersucht.

Nr.	Krankheit	Spez. Gewicht	Relative Viscosität
1	Endocarditis lenta	1027	1,05
2	Atherosklerose	1016	1,03
3	Abdominaler Tumor	1025	1,05
4	Pleuritis tuberculosa	1012	1,03
5	Arthritis deformans	1020	1,05
6	Phthisis pulmonum	1022	1,00
7	Mitralinsuffizienz	1018	1,03
8	Enteritis	1029	1,04
9	Neurasthenie	1010	1,02
10	Morbus Basedowii	1026	1,07
11	Oedema fugax	1024	1,09
12	Typhus abdominalis	1028	1,07
13	Sepsis	1014	1,03
14	Carcinomatosis peritonaei	1027	1,06
15	Pleuritis acuta	1017	1,07

Wie zu erwarten, sind die Werte nicht von der Norm abweichend; auch lassen sie keine deutliche Beziehung zur Dichte erkennen.

Stalagmometrische Untersuchungen.

Beim Harn als einem Gemisch mehrerer wässriger kristalloider und kolloider Lösungen, wird sich die Entspannung der Oberfläche auf dem Wege der mechanischen Adsorption vollziehen können und zwar so, daß in dem Wettstreit zwischen positiver und negativer Adsorption die fast stets wirksameren capillaraktiven Körper eine Spannungserniedrigung eintreten lassen.

Zur Ermittlung der Stoffe, die die Oberflächenspannung normaler Harns auf einen auf Wasser bezogenen Wert von durchschnittlich 75–90% erniedrigen, war es instruktiv, einen „künstlichen synthetischen Harn“ herzustellen, um stalagmometrisch die Einflüsse abzuschätzen, die die harnfähigen Substanzen auf die Oberflächenspannung ausüben.

Die hergestellte Lösung hatte folgende Zusammensetzung: NaCl = 10 g, MgSO₄ = 2 g, K₂HPO₄ = 3,1 g, Harnstoff = 10 g, CaCl₂ = 0,4 g, FeCl₃ = 0,001 g, HCl (25 proz.) = 10 Tropfen, Hippursäure = 0,5 g, harnsaurer Natron = 0,5 g, Kreatinin = 1,0 g. Die einzelnen, z. T. in der Hitze gelösten Substanzen wurden in obiger Reihenfolge zugesetzt, das ganze auf 1500 ccm aufgefüllt. Die Lösung zeigte ganz leichte Opalescenz, reagierte gegen Lackmus schwach sauer, hatte ein spez. Gewicht von 1011. Die relative Viscosität betrug 1,005, das Tropfengewicht war fast genau gleich dem des Wassers. Diesem „Harn“ fehlten also völlig die capillaraktiven Substanzen. Durch Zusatz gewisser Substanzen konnten Veränderungen erzielt werden.

Nr.	Zugefügte Substanz	Konzentration derselben %	Relative Viscosität	γ
1	Originallösung .	—	1,005	100
2	Blutserum . . .	0,75	1,066	84,17
3	Traubenzucker .	5	1,146	97,12
4	„	10	1,270	96,42
5	Aceton	0,5	1,009	96,68
6	„	1	1,013	93,52
7	„	2	1,018	90,64
8	Galle	0,5	1,003	69,78
9	„	1	1,004	64,74
10	„	2	1,004	64,03

Während sich also Traubenzucker und Aceton*) wenig wirksam erwiesen, äußerten Serum und Galle einen deutlich erniedrigenden Einfluß.

Unter den pathologischen Harnen, die bezüglich ihrer Oberflächenspannung am meisten auffallen, sind besonders durch die Arbeiten von Lyon - Caen die ikterischen bekannt¹²⁾. Für Galle selbst als Körpersaft von geringster Spannung ergeben sich hier folgende Werte:

*) Aceton wurde deshalb gewählt, weil Harns von Diabetikern, die Ketonkörper ausschieden, niedrige Oberflächenspannung aufwiesen.

Blasengalle von Leichen:

Nr.	Krankheit	Alter	Spez. Gewicht	Rel. Viscosität	?	Aussehen
1	Lungen-Phthise	69 Jahre	1019	1,84	62,12	hellbraun
2	Myodegeneratio cordis	19 "	1033	2,59	60,43	tief dunkelgrün
3	Erysipel	71 "	1024	1,77	59,70	dunkelbraungrün

In der Galle sind es die gallensauren Salze, die in hohem Maße adsorbierbar sind. Farbstoffe, Pseudomucin und Cholesterin gelten als oberflächeninaktiv. Es erwies sich aufs neue, daß der Urin Ikterischer trotz seines absolut geringen Gehalts an Gallensäuren eine sehr niedrige Oberflächenspannung hatte, etwa 10–20% von der gewöhnlicher Harns abweichend.

Folgende Tabelle zeigt den Einfluß der Gallenkonzentration im Urin. Zu 10 ccm gewöhnlichen Harns werden steigende Mengen Blasengalle zugesetzt.

Urin in ccm	Gallen- zusatz in ccm	Tropfengröße in Teilstrichen des Stagonometers (Wasser: 186)	Durchlaufzeit in Sekunden
10	0,0	100	109
10	0,1	87	109
10	0,2	80	109,5
10	0,3	76	110
10	0,4	73	111
10	0,5	71	112,5
10	0,6	70	114
10	0,7	69	116
10	0,8	68	118
10	0,9	68	123
10	1,0	68	125

Also relativ größere Wirksamkeit bei kleineren Konzentrationen; auch zeigt die entsprechende Kurve bei den höheren Konzentrationen asymptotischen Verlauf, bietet also das Bild einer Adsorptionskurve. Der Einfluß der gleichen Galle auf destilliertes Wasser war ein weit geringerer:

Aqua dest. + Galle in ccm	in ccm	Tropfen- größe	Durchlaufzeit in Sekunden
5	0,0	139	109
5	0,05	118	109,5
5	0,1	110	110
5	0,15	104	111
5	0,2	100	111

Hier entspräche erst der etwa 1 proz. Gallenzusatz einem Werte von 80%. Die Deutung dieser Werte liegt in der von Traube und Girard entdeckten, besonders bei den Glykocholaten auffälligen indirekt erniedrigenden Wirkung der Mineralsalze. Es wurde hier dem Einfluß des Kochsalzes nachgegangen.

Gehalt der Kochsalzlösung in %	γ
0,5	99,77
2,0	100,05
4,0	100,58

D. h. die Oberflächenspannung des Wassers wurde erhöht. Es wurden gelöst je 1 ccm Galle in 100 ccm NaCl-Lösung von verschiedenem Gehalt:

Gehalt der Kochsalzlösung in %	γ
0,5	67,63
2,0	65,46
4,0	63,30

Es wurden gelöst je 10 ccm Galle in 100 ccm Aq. dest. und gewöhnlichem Harn ($\gamma = 84,9$):

Aqua destillata . . .	γ 63,30
Harn	81,87

Der spannungsenkende Einfluß des Kochsalzes bei Anwesenheit von gallensauren Salzen trotz seiner an sich erhöhenden Wirkung ist in beiden Versuchen deutlich.

Bei Beobachtung einer Reihe von Ikterusfällen ergab sich:

Nr.	Krankheit	γ
1	Icterus catarrhalis	68,5
2	" "	67,1
3	" "	67,8
4	" "	69,0
5	" "	65,5
6	" "	68,4
7	Cholangitis subacuta	68,7
8	Akute gelbe Leberatrophie	67,6
9	Cholelithiasis I	66,9
10	derselbe	71,2
11	Cholelithiasis II	72,66
12	Hepatitis luetica	66,2
13	Carcinom des Ductus choledochus	64,23

Wie zu erwarten war, zeigten sich in den ätiologisch verschiedenen Fällen keine charakteristischen Abweichungen. Untersuchungen über Beziehungen zwischen Oberflächenspannung und dem Gehalt an Gallenfarbstoffen sind noch nicht abgeschlossen.

Hier einige Daten über die Sera ikterischer Patienten:

Nr.	Krankheit	γ
1	Icterus catarrhalis	70,6
2	" "	78,4
3	Cholangitis	76,4
4	Icterus catarrhalis	70,5

D. h.: Ikterische Sera zeigen eine Erniedrigung um etwa 10–15% gegenüber Werte der Norm, die zwischen 80 und 85% liegen.

Durch wiederholte Messungen können in derartigen Fällen Kurven der Spannungswerte erhalten werden, die mit zunehmender Heilung einen deutlichen Aufstieg von γ erkennen lassen: Icterus catarrhalis.

Krankheits-tag	Spez. Gewicht in g	γ	Rel. Viscosität
3.	1039	66,9	1,07
4.	1120	69,3	1,02
7.	1010	74,9	1,00
10.	1021	73,8	1,05
12	1018	77,2	1,00

Ähnliche Größenordnung zeigen wässrige Lösungen von Hämoglobin (Merck).

Gehalt der Hämoglobin-lösung in %	γ	Rel. Viscosität
0,5	67,39	1,01
1,0	65,14	1,06
2,0	63,69	1,15
3,0	62,78	—
4,0	61,08	—
5,0	61,04	—

Bei den hier untersuchten blutigen Harnen handelte es sich meist um solche, bei denen nur ein Teil des Blutfarbstoffs frei geworden war. Bei Hämoglobinurie beobachtete C. Posner einen Harn vom spez. Gewicht 1021, mit relativer Viscosität

von 1,44 und $\gamma = 64\%$ *). Bei Hämaturien waren geringere Werte zu beobachten:

Nr.	Krankheit	γ
1	Glomerulonephritis I . .	72,99
2	Glomerulonephritis II . .	74,58
3	Traumatische Nierenreizung	75,32

Besonderer Erwähnung bedürfen noch jene Harnе, die ein Sediment von harnsaurem Natron aufwiesen. Durch Erwärmen gehen die Urate in Lösung, um nach gewisser Zeit wieder auszufallen. Stalagmometriert man das Filtrat derartiger Harnе und gleichzeitig die auf Versuchstemperatur gebrachte Lösung, so ergeben sich folgende Unterschiede:

Krankheit	γ -Filtrat	γ -Lösung	Urat-Sediment
Sepsis 1. Tag	74,10	68,34	. + + +
" 2. " **)	82,01	80,54	+ +
Dyspepsie . . .	71,86	63,31	+ + +
Ca peritonai . .	71,94	68 41	+ +

Folglich eine Abnahme der Oberflächenspannung nach Auflösung des Sedimentes. Da harnsaures Natron als solches auf die Oberflächenspannung keine Wirkung ausübt, so ist anzunehmen, daß ein Teil der Kolloide sich bei der ersten Untersuchung in reversibler Fällung befand, die durch Erwärmen wieder aufgehoben wird. Die Schutzkraft der Kolloide tritt wieder ein und die Dispersitätszunahme tritt auch stalagmometrisch in Erscheinung. Es sei auf entsprechende mit der Goldzahlmethode gewonnene Untersuchungsergebnisse von Lichtwitz¹³⁾ hingewiesen, der für stabile Uratharnе nach Kochen beträchtliche Erhöhung der Schutzwirkung des Harns für Golsol feststellte.

Bemerkenswert ist der Ausfall der Reaktion, der spannungserhöhende Einfluß der Alkalinität. Ein normaler Harn vom spez. Gewicht 1026 wurde künstlich angesäuert bzw. alkalisiert.

Zu 10 ccm Urin wurde zugesetzt $\frac{n}{10}$ -HCl

ccm	γ
3,5	78,10
1,9	84,32
1,0	91,97

*) Persönliche Mitteilungen.

***) Am 3. Tage, an dem nur sehr wenig Urate ausgefallen waren, ergab sich keine Differenz zwischen Filtrat und Lösung.

Zu 10 ccm wurden zugesetzt $\frac{n}{10}$ -NaOH:

ccm	γ
1,0	93,43
1,9	93,48
3,1	93,50
4,3	97,08

Entsprechende Resultate ergab der Versuch einer Alkalisierung des Harns in vivo:

	γ
Harn nativ	69,39
Nach Zusatz von 4 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH	75,42
Nach Einnahme von 9 g NaHCO ₃ , 3 Std. später . .	78,41

D. h. der Versuch fällt wie der obige aus, wobei die hier an sich geringeren Werte von γ mit der Betrachtung nichts zu tun haben.

Ähnlich gestaltete sich auch der Versuch, durch Alkalisierung des Harns im Körper Schwankungen des γ -Wertes zeitlich zu verfolgen.

Als Indikator ist Phenolphthalein benutzt:

Zeit	Harnmenge in ccm	Spez. Gewicht	Zur Neutralisierung verbrauchte $\frac{n}{10}$ -NaOH auf 10 ccm Harn ccm	Rel. Viscosität	γ
9 ^h 40'	40	1025	3,3	1,059	74,82
10 ^h	Einnahme von 5 g NaHCO ₃ in 1 Liter Wasser				
10 ^h 10'	22	1023	2,8	1,059	78,41
10 ^h 40'	250	1003	0,5	1,009	95,61
11 ^h 10'	350	1002	0,2	1,004	97,84
11 ^h 40'	78	1012	0,4	1,013	91,36
12 ^h 10'	34	1016	0,6	1,023	83,89
12 ^h 40'	46	1018	0,8	1,023	83,45
1 ^h 10'	37	1018	1,2	1,009	82,73
1 ^h 40'	30	1020	1,6	1,013	83,45
2 ^h 10'	23	1022	1,7	1,032	82,80

Der Versuch lehrt, daß zwar der geringste Viscositäts- und Oberflächenspannungswert mit dem geringsten Säuregrad zusammenfällt, daß aber beide Werte von dem zu dieser Zeit geringsten spez. Gewicht abzuhängen scheinen.

Es seien vor der Zusammenfassung noch einige allgemeine Anmerkungen zur Kritik der Methode gemacht. Zunächst sei daran erinnert, daß die zwar feinen Capillaren unserer Experimente noch um ein Vielfaches das Kaliber der Harnkanälchen übertreffen und daß diese einen ganz anderen nach der Körperlage dauernd wechselnden Verlauf haben, so daß die einfache

Hydrostatik der Apparatur mit den komplizierten Verhältnissen des Körpers nicht konkurrieren kann. Doch bleibt bei der Absicht relativer Messungen der in der inneren Reibung gegebene wichtige Faktor des Abflusses noch deutlich erkennbar.

Eine andere Einschränkung sei für die Stalagmometrie angeführt.

Was wir experimentell messen, ist immer die Spannung des betr. Flüssigkeitstropfens gegen Luft, also die Grenzflächenspannung flüssig-gasförmig. Bei der Abwesenheit von Gas in den Nierenkanälchen bleibt außer der Spannung zwischen der Flüssigkeit und den Kanälchenwandungen nur die Spannung zwischen dem Lösungsmittel und den in ihm befindlichen Bestandteilen übrig, mögen diese nun grob dispers oder kolloidal verteilt, fest oder flüssig sein. Ist, um nur von einem Dispersoid zu sprechen, a das Lösungsmittel, b der gelöste Stoff, l die Luft und sind diese Bezeichnungen noch insofern zu modifizieren, als a durch die Lösung von b in ihm seinen Charakter in a' ändert und desgleichen b in b' , dann gilt nach einem von Anton¹⁴⁾ abgeleiteten Gesetz die Beziehung:

$$\frac{a'}{l} = \frac{b'}{l} + \frac{a'}{b'}$$

worin $\frac{a'}{l}$ im Versuch gemessen wird, während das eigentlich Interessierende $\frac{a'}{b'}$ ist. Wird also bei vergleichenden Versuchen $\frac{a'}{l}$ niedriger gefunden, so kann jedes der rechtsstehenden Glieder oder beide kleiner geworden sein, ob in demselben Verhältnis bleibt dabei fraglich. Insofern sind bei der Schwierigkeit, direkte Grenzflächenspannungsmessungen vorzunehmen, nur qualitative Schätzungen über das tatsächlich in der Flüssigkeit Vorgehende erlaubt, die übrigens durch das Studium der Mischbarkeiten zweier Flüssigkeiten unterstützt werden, insofern als bei wachsender Grenzflächenspannung zwischen ihnen ihre Löslichkeit abnehmen muß.

Zusammenfassung.

In Bestätigung älterer Arbeiten wird die relative Viscosität normaler Harnen zwischen 1,0 und 1,05 gefunden. Sie geht der Konzentration des Harnes und bei Glykosurien dem Zuckergehalt nicht streng parallel. Stark viscositätserhöhend wirken Formbestandteile.

Für den im allgemeinen viscositätserhöhenden Einfluß des pathologischen Harneiweißes ist sein Lösungszustand von Bedeutung.

In allen Harnen mit größerem Kolloidgehalt sind die Kolloide für die Viscosität wirksamer als das spezifische Gewicht.

Für eine Anzahl von Krankheiten fanden sich keine charakteristischen Viscositätswerte.

Ein künstlicher, kolloidfreier Harn hat die gleiche Oberflächenspannung wie reines Wasser.

Zusätze von Traubenzucker und Aceton erniedrigen die Spannung wenig, Serum und Galle beträchtlich.

Es werden Daten für die Oberflächenspannung von Galle mitgeteilt und der verschieden bathotone Einfluß von Galle auf Kochsalzlösungen, Harn und destilliertes Wasser gezeigt.

Die Oberflächenspannung von ikterischem Harn und Serum bestätigt sich als deutlich erniedrigt. Ätiologisch bedingte Unterschiede ergeben sich nicht. Es läßt sich in Fällen von Ikterus der allmähliche Anstieg des γ -Wertes verfolgen.

Es werden Spannungswerte von wässrigen Hämoglobinslösungen mitgeteilt, sowie Werte bei Hämaturien und in einem Fall von Hämoglobinurie (C. Posner).

Es wird auf die Erniedrigung der Oberflächenspannung nach Erwärmung relativ stabiler Urat-Harne hingewiesen.

Die Bedeutung der Reaktion für γ wird mit einigen Beispielen belegt.

Literatur.

- ¹⁾ Berl. klin. Wochenschr. 1915, Nr. 43. — ²⁾ Berl. klin. Wochenschr. 1916, Nr. 32. — ³⁾ Arch. f. d. ges. Physiol. 105, 559. 1904. — ⁴⁾ Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 2, 117. 1905. — ⁵⁾ Biochem. Zeitschr. 105, H. 4—6. 1920. — ⁶⁾ Münch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 31. — ⁷⁾ Münch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 27. — ⁸⁾ Dynamik der Oberflächen. Dresden 1909. — ⁹⁾ In Neuberg, Der Harn. Berlin 1911. Bd. II, S. 1664. — ¹⁰⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie 72, 215. 1911. — ¹¹⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 59, H. 1. 1908. — ¹²⁾ Journ. de Physiol. 1910, Nr. 12. — ¹³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie 64, 149. 1910. — ¹⁴⁾ Journ. de Chem. et Physiol. 5. 1907. Zitiert bei Freundlich, Capillarchemie. Leipzig 1909.

Die räumliche Trennung von Glykogen und Diastase in der Leberzelle.

Von

E. J. Lesser.

(Aus dem Laboratorium der Städtischen Krankenanstalten in Mannheim.)

(Eingegangen am 14. April 1921.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Die Messung der Glykogenhydrolyse nach mechanischer Zerkleinerung der Leber kann die Frage, ob in der Leberzelle eine räumliche Trennung zwischen Glykogen und Diastase besteht, nicht entscheiden [J. Bang, Kerner und Lesser¹⁾]. Durch die Untersuchung des Mechanismus der Adrenalinwirkung an der herausgeschnittenen Leber des Winterfrosches nach dem Verfahren von Fröhlich und Pollack gelang es dann, eine räumliche Trennung von Diastase und Glykogen in der Leberzelle nachzuweisen²⁾. Ich habe indessen noch nach weiteren Methoden gesucht, diesen Nachweis auf möglichst einfache und einwandfreie Weise zu führen. Es ist früher gezeigt worden, daß die Glykogenhydrolyse im unbefruchteten Ovarialei des Frosches sehr stark steigt, wenn die Eier in hypotonische Lösungen gebracht werden. Nunmehr wurde untersucht, wie sich die Zuckerabgabe der Froschleber gestaltet, wenn man diese nach dem Verfahren von Fröhlich und Pollack durchströmt, die Ringerlösung aber anisotonisch macht.

Es wurde früher bereits darauf hingewiesen³⁾, daß die Durchströmung der Froschleber mit großen Mengen Ringerlösung, wie sie Fröhlich und Pollack vorgenommen haben, nicht zweckmäßig ist. Bei diesen neuen Versuchen habe ich daher pro Stunde nur etwa 50 ccm Salzlösung durch

¹⁾ Diese Zeitschr. **102**, 284. 1920.

²⁾ Diese Zeitschr. **102**, 304. 1920.

³⁾ Diese Zeitschr. **102**, 294. 1920.

die Leber laufen lassen. Um Anoxybiose zu vermeiden, wurde die Salzlösung vor dem Versuch mit Sauerstoff gesättigt und blieb während des Versuches unter konstantem Sauerstoffdruck. Hierzu diente eine einfache Vorrichtung (siehe Abb. 1): ein vorgeschaltetes Sauerstoffreservoir, durch das dauernd Bombensauerstoff strömte. Der Druck im Sauerstoffbehälter wurde durch ein Überlaufventil konstant gehalten. Die Ausströmungsgeschwindigkeit der Ringerlösung aus der tubulierten Flasche wird durch verschieden hohes Einstellen des Wasserspiegels am Überlaufventil reguliert. Als Sperrflüssigkeit im Sauerstoffbehälter dient 10proz. Kalilauge. Wird der Hahn am Überlaufventil geschlossen und der Gummistopfen der tubulierten Flasche nur lose aufgesetzt, so geht der Sauerstoffstrom durch die Ringerlösung und diese kann so leicht mit Sauerstoff gesättigt werden. Im übrigen wurden die Versuche und die Analyse der Durchströmungsflüssigkeit auf Zucker in derselben Weise durchgeführt wie früher.

Die Ergebnisse einer Reihe derartiger Bestimmungen zeigen die Tabellen I und II. Die Gesamtzuckermenge (Tabelle II),

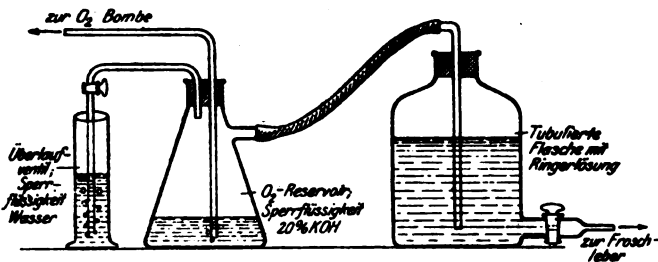


Abb. 1.

welche bei Zimmertemperatur in den ersten 4 Stunden nach Tötung des Tieres aus der Leber herausgewaschen wird, beträgt für 100 g Leber in den Monaten August bis Februar zwischen 300 und 500 mg. Der zeitliche Verlauf der Zuckerbildung, die „Zuckerkurve“, zeigt in der ersten Stunde ihr Maximum, in der 2., manchmal der 3. Stunde ihr Minimum und steigt in der 3. oder 4. Stunde meist zu einem 2. Maximum wieder an. Die Größe der Zuckerbildung in den verschiedenen Monaten, für 100 g Leber und 4 Stunden berechnet, ist in der Kurve 1 dargestellt. In dieser Kurve sind außerdem auch die früher in den verschiedenen Monaten für die diastatische Wirksamkeit der Leber erhaltenen Werte eingezeichnet (vgl. meinen Aufsatz in den Ergebnissen f. inn. Med. u. Kinderheilk. 16, 290. 1919). Die diastatische Wirksamkeit ist die Glykogenabnahme in der herausgeschnittenen Leber in 4 Stunden pro 100 g Leber bei 22°. Die Glykogenwerte sind in der Kurve in Traubenzucker umgerechnet

Tabelle I.

Datum	Geschlecht und Gewicht g	Lebergewicht g	Traubenzucker pro 100 g Leber in der Durchströmungsstunde				Leber in Proz. des Körpergew.	Bemerkungen	Trockensubstanz d. Leber
			1. mg	2. mg	3. mg	4. mg			
15. XII. 19	♀ ?	7,2	120	110	88	112	—	Ringerlösg.	—
19. XII. 19	♀ 98	5,5	122	—	109	160	5,61	"	—
2. I. 20	♀ 59	2,8	143	121	180	207	4,75	"	—
7. I. 20	♀ 47	2,33	167	116	—	—	4,95	"	—
9. I. 20	♀ 55	3,07	190	97	111	153	5,60	"	—
3. II. 20	♀ 45	1,8	200	140	128	233	4,0	"	—
16. II. 20	♂ 41	2,34	211	73	130	100	5,7	"	—
19. II. 20	♀ 71	3,66	85	71	80	115	5,1	frischgef. Tier	—
23. II. 20	♀ 49	2,94	186	150	135	165	6,0	Ringerlösg.	—
2. III. 20	♂ 43	2,37	245	177	306	430	5,5	"	—
6. III. 20	♂ 33	1,92	—	137	195	284	5,8	"	—
16. III. 20	♀ 55	3,03	231	158	221	270	5,5	"	—
20. III. 20	♀ 43	1,96	170	138	193	260	4,3	"	—
30. III. 20	♀ 47	1,50	270	192	154	300	3,2	"	—
10. IV. 20	♂ 36	1,87	255	164	311	361	5,2	"	—
5. VI. 20	♀ 54,5	0,96	320	210	280	270	1,76	"	—
24. VIII. 20	♀ 71	3,76	110	55	47	66	5,3	0,7% NaCl	26,36
7. X. 20	♀ 50	1,25	197	134	124	—	3,05	0,7% NaCl	25,9
13. X. 20	♀ 68	4,55	125	95	110	85	6,5	0,7% NaCl	26,3
22. XII. 20	♀ 82	4,75	215	111	105	124	5,8	0,6% NaCl	30,24
23. XII. 20	♀ 81	4,60	170	103	—	—	5,8	0,6% NaCl	—

Tabelle II.

Durchschnittswerte der einzelnen Monate.

Monat	Traubenzucker pro 100 g Leber in der				Gesamtwert	Zahl der Einzelwerte
	1. Std. mg	2. Std. mg	3. Std. mg	4. Std. mg		
August	110	55	47	66	288	1
Oktober	161	115	117	85	478	2
Dezember	157	108	101	132	496	4
Januar	133	111	97	120	461	3
Februar	168	109	118	153	548	4
März	229	203	267	386	1085	5
April	255	164	311	361	1071	1
Juni	320	210	280	270	1060	1

worden. Man sieht, daß die Kurven im großen und ganzen ähnlich verlaufen. Der Glykogenverlust ist mit Ausnahme der Monate Dezember bis Februar größer als die Zuckerbildung. Die Glykogenversuche sind aber bei einer Temperatur, die 5° höher liegt als die der Durchströmungsversuche, durchgeführt worden. Das spitze Maximum, welches die Glykogenkurve im März zeigt, fehlt in der Zuckerkurve. Sonst aber stimmen beide Kurven

miteinander überein. Die hohen Werte liegen in den Monaten März bis Juni, die niedrigen in den Monaten August bis Februar.

Läßt man in den Monaten August bis Januar stark hypertonische Ringerlösung durch die Leber laufen ($\Delta - 1,2^\circ$), so steigt die in 4 Stunden von 100 g Leber abgegebene Zuckermenge sehr erheblich (Tabelle III und IV). Im Januar geben die Lebern, welche mit hypertonischer Ringer- oder Kochsalzlösung (enthaltend etwa 1,8% Kochsalz, Δ etwa $-1,2^\circ$) durchströmt werden, rund 5 mal soviel Zucker ab als die Lebern, welche mit isotonischer Salzlösung (Ringerlösung oder 0,7% Kochsalz, Δ etwa $-0,42^\circ$) durchströmt waren. Im August geben die hypertonischen Lebern 4 mal mehr Zucker ab, im Oktober 2,4 mal mehr,

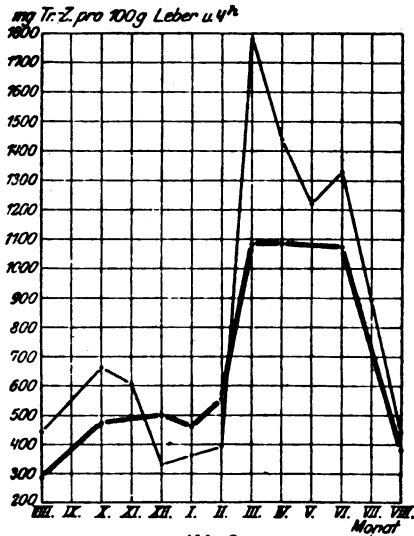


Abb. 2.
 — Zuckerwerte bei Durchspülung.
 - - - Diastatische Wirksamkeit.

Tabelle III.
 Durchspülung mit hypertonischen Lösungen.

Datum	Geschlecht und Gewicht	Lebergewicht	Traubenzucker pro 100 g Leber in der				Leber in Proz. des Körpergew.	Durchströmungsflüssigkeit	Δ	Gehalt der Leber an Trockensubstanz in Proz.
			1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.				
	g	g	mg	mg	mg	mg				
3. I. 20	♀ 59	2,48	340	700	800	522	4,5	Ringerlösung mit etwa 2% NaCl	-1,34	—
5. I. 20	♀ 54	2,12	332	834	865	695	3,92	Ringerlösung + 5% NaSO ₄	-1,15	—
7. I. 20	♀ 47	1,80	—	—	455	580	3,92	Ringerlösung + 5% NaSO ₄	-1,15	—
23. VIII. 20	♀ 65	2,24	270	410	—	355	3,45	1,8% NaCl	-1,15	28,91
25. VIII. 20	♀ 48	2,32	194	292	361	375	4,83	1,8% NaCl	—	29,88
8. X. 20	♀ 45	1,25	265	302	302	—	2,76	2% NaCl	—	—
11. X. 20	♀ 55	2,74	332	212	305	305	4,95	1,8% NaCl	—	29,03
20. XII. 20	♀ 70	2,91	455	530	550	620	4,16	1,9% NaCl	-1,24	32,6
23. XII. 20	♀ 81	3,93	—	—	235	465	4,72	etwa 1,8% NaCl	-1,24	35,3
27. XII. 19	♀ 64	2,55	172	—	702	720	3,98	Ringerlösung mit 1,8% NaCl	-1,12	—

Tabelle IV.
Durchschnittswerte der einzelnen Monate.
Durchströmung mit hypertonischen Lösungen.

Monat	Traubenzucker pro 100 g Leber in der				Gesamt- menge	Durchströmungs- flüssigkeit	Zahl der Be- stim- mung
	1. Std. mg	2. Std. mg	3. Std. mg	4. Std. mg			
Dezember .	172	—	702	720	1994	Ringer mit 1,8 proz. NaCl	1
Januar . .	336	767	833	608	2544	dasselbe	2
April . . .	283	267	290	297	1107	dasselbe	1
Juni	440	440	280	146	1306	dasselbe	1
August . . .	232	351	361	365	1309	NaCl Δ — 1,15	2
Oktober . .	284	257	304	305	1150	NaCl 1,9%	2
Dezember .	455	530	550	620	2155	NaCl Δ — 1,24	1

Tabelle V.

Monat	100 g Leber geben Trauben- zucker in mg ab in 4 ^h nach Durchpflügung mit	
	hypertonischer Salzlösung	isotonischer Salzlösung
August	1309	238
Oktober	1150	478
Dezember	2070	498
Januar	2544	461
April	1107	1091
Juni	1306	1080

im Dezember 4 mal soviel (Tabelle V). Im Durchschnitt aller Versuche beträgt die Zuckerabgabe von 100 g Leber bei Durchströmung mit isotonischer Salzlösung in den Monaten August bis Januar 429 mg Traubenzucker, bei Durchströmung mit hypertonischer Salzlösung 1751 mg, das ist eine Vermehrung auf etwa das 4fache. Außerdem ändert sich der Verlauf der Zuckerkurve. Das Maximum der Zuckerbildung liegt in der 3. oder 4. Stunde, das Minimum der Zuckerbildung in der 1. Im allgemeinen findet sich von der 1. bis zur 3. Stunde ein allmähliches Anwachsen der Zuckerabgabe. Die Durchschnittswerte aller Versuche mit isotonischer und hypertonischer Lösung in den Monaten August bis Januar sind in der Tabelle VI und der Kurve 2 verzeichnet.

Völlig anders ist der Befund, welcher in 2 Versuchen im April und Juni erhalten wurde. Die von 100 g Leber in 4 Stunden abgegebene Zuckermenge ist bei Durchströmung mit hyper-

Tabelle VI.

100 gr Leber geben ab Traubens. in der				Gesamtmenge	Bemerkungen
1. Std. mg	2. Std. mg	3. Std. mg	4. Std. mg		
140	98	91	101	429	Mittel aus 10 Versuchen, durchströmt mit isotonischer Lösung Mittel aus 8 Versuchen, durchströmt mit hyperton. Lösung
296	381	550	524	1757	

tonischer Ringerlösung die gleiche wie bei Durchströmung mit isotonischer (Versuch vom April). Im Juni findet sich eine den Fehlergrenzen naheliegende Steigerung um 20%. Ebenso fehlen im April und Juni im zeitlichen Verlauf der Zuckerabgabe charakteristische Abweichungen (Tabelle IV und V). Bei Durchströmung mit hypertotonischer Ringerlösung findet sich keineswegs ein Minimum in der 1. und allmähliches Anwachsen zum Maximum in der 3. und 4. Stunde, wie dies in den Herbst- und Winterversuchen der Fall war. Vermehrung der Zuckerproduktion bei Durchspülung der Leber mit hypertotonischer Salzlösung ist also nur in der Zeit der geringen diastatischen Wirksamkeit der Leber nachweisbar. In der Zeit der hohen diastatischen Wirksamkeit nicht. Umgekehrt verhält sich die herausgeschnittene Leber bei Beeinflussung durch Anoxybiose. Hier findet sich nämlich eine Erhöhung der diastatischen Wirksamkeit durch Anoxybiose nur in den Frühjahr- und Sommermonaten, während sie in den Wintermonaten fehlt.

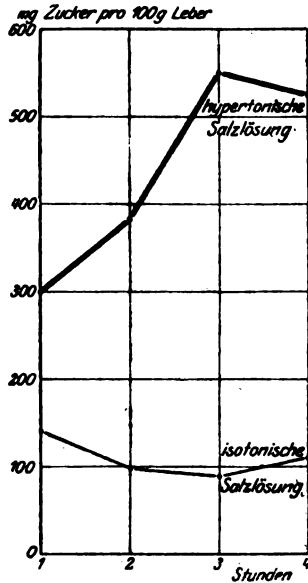


Abb. 8.

Außer der Zuckerproduktion ändert sich bei der Durchströmung mit hypertotonischer Salzlösung auch der Wassergehalt der Froschleber. Die Leberzelle verhält sich so, als wäre sie von einer Membran umgeben, welche Wasser durchläßt, Salze aber nicht. Infolgedessen geht bei der Durchströmung der Froschleber mit hypertotonischer Ringerlösung ein Wasserstrom aus den Zellen

in die Lebergefäße, und das Lebergewicht sinkt. In den Monaten August bis Januar beträgt das Lebergewicht im Durchschnitt aller Versuche bei Durchströmung mit isotonischer Salzlösung 5,26% des Gesamtkörpergewichts. Bei Durchströmung mit hypertotonischer Salzlösung beträgt das Lebergewicht im Mittel nur 4,13% in den gleichen Monaten. Die Leber hat also bei Durchspülung mit hypertotonischer Salzlösung 21,5% ihres Anfangsgewichtes verloren. Da diese Zahl für die Vergleichung der hypertotonischen Lebern mit den normalen von Wichtigkeit ist, wurde sie auch bei einem Versuche direkt ermittelt. Am 7. I. 1920 wurde eine Leber zunächst 2 Stunden mit isotonischer Ringerlösung durchspült, dann rasch außen mit Fließpapier getrocknet und mit den Kanülen zusammen gewogen. Nunmehr wurde sie 2 Stunden mit hypertotonischer Ringerlösung durchspült und wieder mit den Kanülen gewogen. Endlich wurden die Kanülen für sich gewogen und aus den Differenzen die Lebergewichte berechnet. Nach 2stündlicher Durchspülung mit isotonischer Ringerlösung wog die Leber 2,33 g. Nach Durchspülung mit hypertotonischer Ringerlösung 1,80 g. Mithin hatte ein Gewichtsverlust von 0,53 g oder 22,8% stattgefunden. Endlich wurde in einer Reihe von Versuchen am Schlusse des Versuchs der Prozentgehalt an Trockensubstanz der Leber ermittelt. Es ergab sich, daß im Mittel aus je 6 Versuchen die Leber nach Durchspülung mit hypertotonischer Ringerlösung 30,54% Trockensubstanz hatte. Nach Durchspülung mit isotonischer Lösung 26,78%. Demnach ist 1 g Trockensubstanz der Leber nach Durchspülung mit hypertotonischer Ringerlösung mit 3,273 g Wasser verbunden, nach Durchströmung mit isotonischer Ringerlösung mit 3,735 g Wasser. Auf 1 g Trockensubstanz berechnet verliert also die Leber 0,462 g Wasser. Da im Mittel in 100 g Leber 26,78 g Trockensubstanz enthalten sind, verlieren also 100 g isotonische Lebern 12,3 g Wasser. Bei 4stündiger Durchströmung mit hypertotonischer Salzlösung verliert also die Leber 12—22% ihres Anfangsgewichtes durch Wasserabgabe. Bei den im Winter 1919/20 ausgeführten Versuchen habe ich bei der Berechnung der von 100 g Leber gebildeten Traubenzuckermenge bei den hypertotonischen Lebern das direkt ermittelte Lebergewicht um 20% erhöht, um das Gewicht auf den Wasserverlust zu korrigieren. Bei den späteren Versuchen wurde bei den isotonischen und bei den hypertotonischen

Lebern der Prozentgehalt an Trockensubstanz am Schlusse des Versuches ermittelt und danach das Gewicht der Hypertonieleber vor der Wasserabgabe berechnet (unter der Annahme, daß der Trockensubstanzgehalt der Hypertonielebern vor der Wasserabgabe der gleiche war wie der der Isotonielebern). Um aber völlig sicher zu gehen, habe ich noch 2 Versuche angestellt, in denen die Zuckerbildung ein und derselben Leber erst bei 2 stündiger isotonischer und dann bei 2stündiger hypertotonischer Durchspülung untersucht wurde. Diese Versuche zeigen gleichzeitig, daß die Blutdiastase für das Zustandekommen der Hypertoniewirkung keine Rolle spielt. Die beiden Versuche wurden angestellt am 7. I. 1920 und am 27. XII. 1920. Die Zuckerkurven sind in Kurve 4 wiedergegeben. Kurve 4 zeigt, wie sofort nach Einwirkung der hypertotonischen Salzlösung die Zuckerausgabe in die Höhe geht. Sie erinnert völlig an die früher bei Einwirkung von Adrenalin auf die herausgeschnittene Froschleber erhaltenen Kurven.

Wenn nun weiter gefragt wird, wodurch die hypertotonische Lösung zuckertreibend wirkt, kann die Antwort nur lauten: weil sie der Leber Wasser entzieht. Andere Möglichkeiten

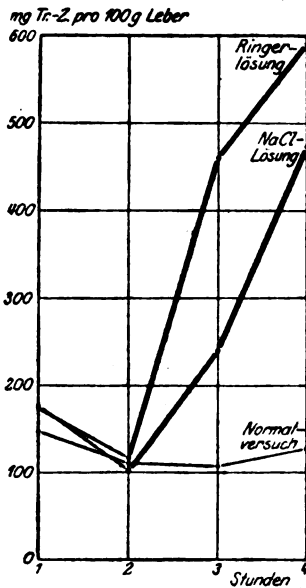


Abb. 4.

können experimentell zurückgewiesen werden. Man könnte zunächst daran denken, daß nicht der erhöhte osmotische Druck, sondern die Vermehrung des Chlorions in der Durchströmungsflüssigkeit die Zuckerausgabe befördere. Ist doch die Chlordiastase die wirksamste aller Diastasesalzverbindungen, aber die Versuche vom 5. und 7. I. 1920, bei denen die Ringerlösung nicht durch Hinzufügung von Chlornatrium, sondern von Natriumsulfat hypertotonisch gemacht war, ergeben das gleiche Resultat wie die übrigen Versuche. Weiter könnte eingewendet werden, daß die Konzentration der Calcium- und Kaliumionen in der hypertotonischen Ringerlösung verändert wäre, zum mindesten das Verhältnis der Kalium- und Calciumionen zu den Natriumionen. Ich habe daher

im August bis Dezember 1920 eine Reihe von Durchströmungsversuchen mit reiner Chlornatriumlösung angestellt. Diese Versuche zeigen, daß es für die Zuckerabgabe der Leber gleichgültig ist, ob man sie mit Chlornatrium- oder mit Ringerlösung durchströmt. In beiden Fällen sind die Werte bei isotonischer Durchströmung von gleicher Größenordnung und in beiden Fällen findet durch hypertonische Durchströmung Erhöhung der Zuckerbildung auf ähnliche Beträge statt (vgl. z. B. Kurve 3, Versuch vom 7. I. 1920 mit Ringerlösung und 23. XII. 1920 mit Kochsalzlösung). Da in diesen Versuchen in der Durchströmungsflüssigkeit überhaupt nur eine Kationenart enthalten war, kann nichts anderes als der erhöhte osmotische Druck der Durchströmungsflüssigkeit die Ursache der vermehrten Zuckerausgabe und damit der vermehrten Glykogenhydrolyse sein.

Bei der Zuckerbildung der Leber handelt es sich um eine Glykogenhydrolyse, welche durch ein Ferment beschleunigt wird. Nach den Arbeiten des letzten Jahrzehntes ist daher eine Untersuchung auf diesem Gebiete nicht vollständig, wenn nicht nachgewiesen wird, daß beim Zustandekommen der untersuchten Fermentbeeinflussung keine Verschiebung der aktuellen Reaktion im Spiele ist. Bisher ist die Veränderung der Reaktion bei Durchströmung der Kaltblüterleber in ihrem Einfluß auf den Glykogenschwund nur von Elias¹⁾ untersucht worden; freilich in vollkommen falscher Weise. Er hat Schildkrötenlebern mit Mischungen von Ringerlösung, Traubenzucker und Salzsäure durchströmt, deren H^+ etwa 10^{-3} war. Diese außerordentlich saure Lösung hat natürlich die Zellwände verändert und Glykogen ist als solches aus der Leberzelle ausgetreten. Gleichzeitig hat diese weit vom Optimum der Diastase ($H^+ = 10^{-7}$) liegende saure Reaktion die Diastase stark gehemmt, so daß der Prozeß, den Elias untersuchen wollte, die Hydrolyse des Glykogens durch die Diastase der Leber, wahrscheinlich kaum mehr stattgefunden hat. Ich habe natürlich mit sehr viel geringeren Abweichungen vom Neutralpunkt gearbeitet ($H^+ = 3,6 \cdot 10^{-8}$ bis $2,2 \cdot 10^{-6}$). Durchströmt wurde mit einer 0,6proz. Kochsalzlösung, welche in 400 ccm 40 ccm einer etwa $\frac{n}{10}$ Natriumacetatlösung enthielt. Zu dieser wurde im Versuch vom 29. XI. 5 ccm $\frac{n}{100}$ -Natronlauge, in den Versuchen vom 2. XII. an steigende Mengen von $\frac{n}{10}$ -Essig-

¹⁾ Diese Zeitschr. 48, 133.

säure zugesetzt. Die Wasserstoffionenkonzentration wurde, nachdem die Lösung in der tubulierten Flasche mit Sauerstoff gesättigt war, mittels Gaskette nach Michaelis direkt vor Beginn der Durchströmung vorgenommen, der osmotische Druck wurde in allen Versuchen direkt ermittelt. Eine Übersicht über die Versuche geben die Tabellen VII und VIII. Man ersieht, daß

Tabelle VII.

Datum	pH	H ⁺	Δ in °	Trocken- substanz %	Pufferart	Gesamt- zucker
29. XI. 20	7,44	$3,6 \cdot 10^{-8}$	-0,44	29,8	Acetat	536
30. XI. 20	7,18	$6,6 \cdot 10^{-8}$	-0,44	30,97	„	510
2. XII. 20	7,08	$8,3 \cdot 10^{-8}$	-0,45	31,0	„	546
3. XII. 20	6,92	$1,2 \cdot 10^{-7}$	-0,44	27,45	„	710
8. XII. 20	6,45	$3,5 \cdot 10^{-7}$	-0,45	25,2	„	946
5. I. 21	5,66	$2,2 \cdot 10^{-6}$	-0,45	24,8	„	699

berechn. für 80%
Trockensubstanz

eine Änderung in der Reaktion der Durchströmungsflüssigkeit zwischen $H^+ = 3,6 \cdot 10^{-8}$ und $8,3 \cdot 10^{-8}$ ohne Einfluß auf die Zuckerkurve und den Gesamtzucker während der ersten 4 Stunden bleibt. Wächst H^+ weiter auf $1,2 \cdot 10^{-7}$, so findet sich, bei unverändertem Verlauf der Zuckerkurve, ein Steigen des Gesamtzuckers um etwa 35%. Bei $H^+ = 3,5 \cdot 10^{-7}$ findet sich bei unveränderter

Tabelle VIII.

Datum	Geschlecht u. Gewicht des Tieres g	pH	Traubenzucker pro 100 g Leber in der			
			1. Std. mg	2. Std. mg	3. Std. mg	4. Std. mg
29. XI. 20	♀ 55	7,44	265	91	91	89
30. XI. 20	♀ 52	7,18	164	90	86	170
2. XII. 20	♀ 58	7,08	226	131	100	89
3. XII. 20	♀ 63	6,92	212	148	175	175
8. XII. 20	♀ 58	6,45	236	174	236	300
5. I. 20	♀ 95	5,66	266	141	162	130

Zuckerkurve ein Steigen des Gesamtzuckerwertes um 85%. Während bei noch stärkerer Säuerung $H^+ = 2,2 \cdot 10^{-6}$ der Gesamtzuckerwert wieder auf die gleiche Höhe sinkt wie bei $H^+ = 1,2 \cdot 10^{-7}$. Die Förderung der Zuckerbildung durch Änderung der Reaktion der Durchströmungsflüssigkeit ist also erheblich kleiner, als wir sie durch Änderung des osmotischen Druckes der Durchströmungsflüssigkeit erzielen können. Dabei ändert sich ferner der Verlauf der Zuckerkurve nicht. Vermutlich haben wir hier in der Zelle

die gleiche Beeinflussung der Diastase durch die Reaktion wie *in vitro*, deren eigentliche Natur auch *in vitro* noch nicht völlig geklärt ist¹⁾. Von großem Interesse ist dabei die Tatsache, daß gleichzeitig mit der Vermehrung der diastatischen Wirksamkeit durch erhöhte saure Reaktion eine verstärkte Wasseraufnahme der Leber einhergeht, obwohl der osmotische Druck der Durchströmungsflüssigkeit der gleiche geblieben war. Bei $H^+ = 1,2 \cdot 10^{-7}$ geht die Trockensubstanz von etwa 30,5% auf 27,45% herunter. Es hat also eine beträchtliche Wasseraufnahme stattgefunden, die mit wachsendem Gehalt an Wasserstoffionen in der Durchströmungsflüssigkeit noch weiter steigt. Vielleicht ist es möglich, auf dies Verhalten der Leber eine Methode zur Ermittlung der Wasserstoffionenkonzentration der Gewebe zu gründen. Die bisherigen Bestimmungen von Michaelis²⁾ ergaben für die Leber von warmblütigen Tieren einen Wert, der zwischen p_H 6,5 und 7,0 liegt. Bei der Froschleber würde dieser Wert zwischen p_H 6,92 und 7,08 liegen, denn der Vorgang bei Durchströmung mit isotonischer Kochsalzpufferlösung ist wohl dieser. Die Leber erzeugt im Stoffwechsel Kohlensäure, ihre Acidität wächst, wenn sie den Säureüberschuß nicht abgeben kann. Ist in der Durchströmungsflüssigkeit p_H größer als 7,08, so kann der Säureüberschuß völlig abgegeben werden. Bei einer p_H von 6,92 ist dies nicht mehr völlig möglich, die Acidität des Lebergewebes wächst. Hierdurch wird die wasserbindende Kraft der Gewebe vergrößert. Ähnliche Versuche sollen auch am Muskel ausgeführt werden.

Um nun zu sehen, ob auch bei festgelegter Wasserstoffionenkonzentration durch Erhöhung des osmotischen Druckes der Durchströmungsflüssigkeit die Zuckerabgabe gesteigert wird, wurde ein Versuch am 7. und 9. IX. 1920 angestellt (Tabelle IX).

Die H^+ wurde so gewählt, daß sie die Zuckerbildung der Leber bereits erhöhte (etwa um 90%). Als Puffer diente Sörensensches Phosphatgemisch, von dem 100 ccm das eine Mal zu 300 ccm 0,7 proz. Kochsalzlösung, das andere Mal zu 300 ccm 1,8 proz. Kochsalzlösung zugesetzt wurden. Die hypertonische Lösung entfaltet auch in diesem Fall ihre die Glykogenhydrolyse steigernde Wirkung. Der Gesamtzuckerwert steigt auf über das Doppelte,

¹⁾ Siehe Amandus Hahn und Mitarbeiter, Zeitschr. f. Biol. 71, 287 ff.

²⁾ Vgl. das ausgezeichnete Buch von L. Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration, S. 106. Julius Springer 1914.

Tabelle IX.

Datum	Geschlecht und Gewicht g	Lebergewicht g	Traubenzucker pro 100 g Leber in der				Lösung	Trockensubstanz der Leber %	P _H	Bemerkungen
			1. Std. mg	2. Std. mg	3. Std. mg	4. Std. mg				
7.IX.20	♀ 64	2,23	282	375	550	640	1,8% NaCl	40,06	6,86	Reaktion festgelegt mit 86renenschem Phosphatgemisch Zuckerwerte, berechnet für 86% Trockensubstanz
9.IX.20	♀ 67	2,98	208	200	230	230	0,7% NaCl	36,03	6,81	

die Zuckerkurve zeigt das charakteristische Minimum in der ersten Stunde und steigt dauernd an. Es kann mithin auch die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß die zuckertreibende Wirkung der hypertonischen Lösung durch Veränderung der Gewebsreaktion zustande kommt.

Mit hypotonischen Lösungen habe ich bisher eine Beeinflussung der Zuckerabgabe der Leber nicht erhalten können, wie z. B. aus folgendem Versuch hervorgeht mit Durchströmung mit 0,2 proz. NaCl-Lösung.

Tabelle X.

Datum	Geschlecht und Gewicht g	Lebergewicht g	Δ	Traubenzucker pro 100 g Leber in der				Gesamt-Zucker g	Bemerkungen
				1. Std. mg	2. Std. mg	3. Std. mg	4. Std. mg		
27.XII.20	♀ 100	6,53	-0,17	126	54	74	114	368	Trockensubstanz der Leber 25,85% Zucker berechnet für Leber mit 80% Trockensubstanz

Das Ergebnis der mitgeteilten Versuche ist mithin, daß eine starke Wasserentziehung auf die Leber im Sinne einer verstärkten Hydrolyse des Glykogens wirkt. Es handelt sich dabei um eine einfache physikalische Einwirkung, deren Ergebnis Entquellung von Zellkolloiden ist. Dadurch werden Veränderungen in dem, was Hofmeister die chemische Organisation der Zelle nennt, gesetzt. Die räumliche Trennung zwischen Diastase und Glykogen wird geändert. Es ist möglich, daß der Diffusionsweg zwischen beiden durch die Entquellung verkürzt wird. Es ist möglich, daß infolge Verkleinerung von Oberflächen adsorbierte Diastase frei wird. Von Wichtigkeit scheinen diese Versuche für die Entstehung der Aderlaßhyperglykämie zu sein. Die Folge des Aderlasses ist ein Wassereinstrom ins Blut. Die Aderlaßhyperglykämie

kommt nur zustande bei ausreichendem Glykogengehalt in der Leber [Loevi¹⁾]. Sie wird nicht beeinflusst durch Durchschneidung der Splanchnici und Exstirpation der Nebenniere (Nishi). Welche Gewebe bei dem Wassereinstrom ins Blut nach dem Aderlaß in erster Linie in Frage kommen, ist unbekannt. Würde es die Leber sein, so wäre eine völlige Parallele zu meinen Versuchen vorhanden, bei denen die Wasserentziehung durch osmotische Beeinflussung bewirkt wurde. Loevi hat die unklare Vorstellung von einer Ausschwemmung von Zucker aus der Leber herangezogen: Nicht um eine Ausschwemmung von Zucker handelt es sich, sondern um eine Erhöhung der diastatischen Wirksamkeit, um eine Änderung der räumlichen Trennung der Diastase und des Glykogens in der Zelle, welche abhängig gefunden wurde von dem Quellungszustand der Zellkolloide.

¹⁾ Dtsch. Arch. f. klin. Med. 120, 131.

Vergleichende Untersuchungen über die Glucosekonzentration in dem arteriellen Blut und in dem venösen Blut aus den Muskeln.

Von
V. Henriques und R. Ege.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 15. April 1921.)

Neben der summarischen Untersuchung des Stoffwechsels des gesamten Organismus ist eine Untersuchung über den Stoffverbrauch der einzelnen Organe von großer Bedeutung. Wenn trotzdem — abgesehen von Bestimmungen des respiratorischen Stoffwechsels der Organe — nur vereinzelte Untersuchungen über den Organstoffwechsel angestellt worden sind, liegt die Erklärung dieser Tatsache in der mit solchen Untersuchungen verbundenen Schwierigkeit, die zuvörderst analytischer Natur ist.

Von Versuchen einer solchen Bestimmung sind vor allem Chauveau und Kauffmanns klassische Untersuchungen über den Stoffverbrauch in einem einzelnen Muskel anzuführen¹⁾.

Wir glauben jedoch, daß es berechtigt sein wird, diese Untersuchungen, was den Zuckerverbrauch betrifft, aufs neue in Angriff zu nehmen, u. a. weil man jetzt imstande ist, die Zuckeranaysen mit größerer Genauigkeit als früher auszuführen. Es ergab sich denn auch als Hauptresultat unserer Untersuchungen, daß die Verhältnisse weit komplizierter sind, als nach den Untersuchungen von Chauveau und Kauffmann zu erwarten war.

Die erste Bedingung einer erfolgreichen Untersuchung über den Zuckerverbrauch der Muskeln des lebenden Organismus unter normalen Zirkulationsverhältnissen ist davon abhängig, ob man über eine sehr genaue und sichere Zuckerbestimmungsmethode verfügt. Diese Forderung ergibt sich leicht aus der folgenden einfachen Erwägung.

Setzt man den täglichen Kohlenhydratverbrauch eines Menschen zu 500 g und das Minutenvolum des Herzens zu 5 l an,

¹⁾ Compt. rend. de l'Acad. des Sc. 104 u. 105. 1887.

wird eine einfache Berechnung dartun, daß der durchschnittliche Unterschied zwischen der Zuckerkonzentration des arteriellen und des venösen Blutes — bevor dies wieder durch die Kohlenhydratdepots strömt — nur 0,007% betragen wird. Diese Berechnung zeigt zuvörderst, daß die Untersuchung nicht durchzuführen ist, es sei denn, daß man sich auch auf die dritte Dezimalstelle der Blutzuckerbestimmungen mit einiger Sicherheit verlassen kann.

Nun hat man an Bangs Mikrozuckertitration — in der rechten Weise angewandt — ein Verfahren, bei dem der mittlere Fehler der einzelnen Bestimmung um 1,5% des Wertes liegt¹⁾; werden mehrere Bestimmungen unternommen, wird der mittlere Fehler des durchschnittlichen Resultates natürlich kleiner sein, und da das Verfahren zudem eine Mikromethode ist, lassen sich sehr wohl bei jeder Bestimmung eine Reihe von Analysen anstellen. Bei den hier zu besprechenden Versuchen wurden bei jeder einzelnen Bestimmung 4 oder 6 Analysen angestellt; der mittlere Fehler des Durchschnittes wird daher bis auf die Hälfte oder etwas weiter abnehmen. Die Abweichungen zwischen der Zuckerkonzentration des arteriellen und des venösen Blutes von über 1—1,5% des Wertes, d. h. (bei normalem Blutzuckerspiegel) von etwa 0,001 müssen daher reell sein, wenn nicht andere Fehler als die von den Blutzuckeranalysen selbst herrührenden vorlägen. Von anderen Fehlern, die namentlich früher eine gewisse Rolle spielten, ist eine unvollständige Entfernung der Proteinstoffe zu nennen, welchen Fehler man jetzt mittels des glänzenden Fällungsmittels, das Michaelis und Rona in Anwendung gebracht haben, leicht vermeidet: nämlich kolloidales Eisen in Verbindung mit einem passenden Elektrolyten. Schließlich muß man natürlicherweise sicher sein, daß man wirklich auf Zucker analysiert; eben in Anbetracht des vorliegenden Problems muß die Frage von der Größe und Bedeutung der Restreduktion entschieden sein. Denkt man sich z. B., daß, gleichzeitig mit dem Glucoseverbrauch der Muskeln im Blute, Kreatin oder Kreatinin gebildet oder befreit wird, das ins Blut übergeht, könnten die beiden Vorgänge möglicherweise einander aufheben, wenigstens teilweise, sobald man als Zuckerbestimmungsmethode eine Reduktionstitration anwendet. Dieser berechtigt erscheinende Einwand hat indessen keine praktische Bedeutung, wenigstens bei

¹⁾ Siehe u. a. R. Ege, diese Zeitschr. 87. 1918.

dem von uns befolgten Verfahren. Die Restreduktion bei dieser Methode ist nämlich recht gering und, was von größerer Bedeutung ist, von derselben Größenordnung in dem arteriellen wie in dem venösen Blut¹⁾.

Bevor wir zur Beschreibung unserer Versuche übergehen, müssen wir eine Bemerkung einschalten. Eine sehr wesentliche Bedingung dafür, daß die gewonnenen Analysenresultate zu den natürlichen Verhältnissen in irgendwelcher Relation stehen, ist es, daß der Kreislauf normal vonstatten geht; z. B. wird eine mehr oder minder ausgeprägte Stase bewirken, daß die voraus-sichtlichen Unterschiede zwischen der Zuckerkonzentration des arteriellen und des venösen Blutes in sehr hohem Grade gesteigert werden. Es wurde daher bei den Versuchen ein besonderes Gewicht darauf gelegt, daß die Blutentnahme in einer solchen Weise erfolgte, daß von keiner nennenswerten Stase die Rede sein konnte.

Zuerst werden wir als eine Art von Beweis sowohl für die Genauigkeit der Analysen als für die Richtigkeit der Probenentnahme eine Reihe von Versuchen anführen, bei denen ein Zuckerverbrauch sowie eine Zuckerablagerung als ausgeschlossen zu betrachten ist; es zeigte sich denn auch, daß in solchen Fällen, was die Zuckerkonzentration betrifft, kein Unterschied zwischen den beiden Sorten von Blutproben besteht. Dies könnte z. B. durch gleichzeitige Proben aus dem arteriellen System dargetan worden sein; solche fanden nicht statt, es wurden aber gleichzeitig Proben aus dem rechten Herzen und der A. carotis entnommen²⁾.

Rechtes Herz	A. carotis
0,184	0,187
0,125	0,128
0,190	0,190
0,178	0,179

Der Unterschied ist hier nur ganz gering und liegt innerhalb der Versuchsfehlergrenze. Ganz entsprechende Versuche wurden hier angestellt, indem durch die Vena jugularis ein Katheter in die V. cava superior hinabgeführt wurde; wenn die Blutprobe daraus hinausgesaugt wird, wird man sehr nahezu eine durchschnittliche Mischung des venösen Blutes erhalten; der Zuckerprozentatz hier kann daher nicht nennenswert vom Zuckerprozentatz in dem arteriellen Blut abweichen.

¹⁾ R. Ege, diese Zeitschr. 107. 1920.

²⁾ R. Ege, diese Zeitschr. 87. 1918.

	Vena cava superior	A. carotis
I.	0,157	0,157
II. (bei Hyperglykämie)	0,216	0,217

Diese Versuche zeigen, daß es berechtigt sein muß, zu behaupten, daß ein Unterschied der Zuckerkonzentration zwischen Arterie und Vene, der 1–1,5% des Wertes übertrifft, als reell zu betrachten ist.

Die wesentlichste Komplikation bei Versuchen über das vorliegende Thema ist es indessen, daß in den Muskeln nicht nur ein Zuckerverbrauch, sondern auch eine Zuckerablagerung stattfindet. Man kann daher keineswegs aus dem Unterschied zwischen dem Blutzuckerprozentatz der Arterie und Vene auf einen etwaigen Zuckerverbrauch und dessen Größe schließen. Es kann einerseits gleichzeitig eine Zuckerablagerung (in Form von Glykogen) stattgefunden haben; in dem Falle wird der Unterschied zwischen der Zuckerkonzentration der beiden Blutproben größer sein als der von der Zuckerverbrennung herrührende. Andererseits kann man sich denken, daß die Muskeln wesentlich von den in ihnen vorhandenen Kohlenhydratreserven leben; in dem Falle braucht kein Unterschied zwischen den beiden Blutproben vorzuliegen; und schließlich kann man sich denken — und wie die folgenden Versuche zeigen werden, ist dies nicht nur ein Gedankenexperiment, sondern eine Realität —, daß in den Muskeln eine größere Menge Kohlenhydrat mobilisiert wird, als diese selbst verbrauchen, so daß in dem venösen Blut, das aus den Muskeln strömt, sogar mehr Zucker vorhanden sein kann als in dem arteriellen Blute.

Letzteres Verhältnis ist u. a. von Lépine und Boulud¹⁾ beobachtet worden, welche Verfasser eine solche Steigerung der Zuckerkonzentration bei der Passage durch die Muskeln nur durch die Annahme erklären zu können meineh, daß in dem Blute ein nicht reduzierendes komplexes Kohlenhydrat (sucre virtuel) vorkommt, und daß dieses bei der Strömung durch die Muskeln in reduzierenden Zucker umgewandelt wird. Diese Erklärung trifft jedoch nicht zu, u. a. aus dem Grunde, daß Lépinés „sucre virtuel“ nicht existiert²⁾.

Damit die Untersuchung unter so einfachen Verhältnissen

¹⁾ Compt. rend. 137, 686. 1903.

²⁾ R. Ege, diese Zeitschr. 87. 1918.

wie möglich stattfinden könnte, wurden zuerst Versuche mit Tieren angestellt (Hunden und Ziegen), von denen nicht angenommen werden konnte, daß in ihren Muskeln nennenswerte Glykogenmengen vorhanden waren. Um den Glykogengehalt der Muskeln zu entfernen, mußten die Versuchstiere einige Tage hungern, außerdem erhielten sie die letzten 2 Tage vor dem Versuche Phlorizin oder mußten in der Treitmühle arbeiten.

	Arterie	Vene	Differenz (Arterie ÷ Vene)
Ruhe	0,090	0,090	0,000
Ruhe ¹⁾	0,112	0,100	0,012
Arbeit	0,126	0,116	0,010
„	0,137	0,126	0,011
Tetanus	0,143	0,150	÷ 0,007
Ruhe	0,083	0,083	0,000
„	0,083	0,078	0,005
Arbeit	0,085	0,083	0,002
„	0,095	0,092	0,003
Ruhe	0,122	0,114	0,008
„	0,121	0,121	0,000
Arbeit	0,137	0,133	0,004
Ruhe	0,138	0,141	÷ 0,003
Arbeit	0,149	0,143	0,006
„	0,148	0,143	0,005
Ruhe	0,120	0,111	0,009
Ruhe	0,167	0,160	0,007
„	0,167	0,163	0,000
Arbeit	0,161	0,159	0,002
„	0,158	0,152	0,006
Tetanus	0,157	0,141	0,016
Ruhe	0,106	0,106	0,000
„	0,100	0,100	0,000
Arbeit	0,104	0,103	0,001
„	0,111	0,108	0,003
„	0,111	0,110	0,001
Tetanus	0,118	0,116	0,002
„	0,119	0,115	0,004
Arbeit	0,103	0,103	0,000
„	0,116	0,108	0,008
Tetanus	0,115	0,115	0,000
„	0,122	0,122	0,000

Die durchschnittliche Differenz und mittlerer Fehler
derselben 0,0037 ± 0,00084

¹⁾ Die durch die Klammern zusammengefaßten Bestimmungen gehören zu denselben Versuchen.

Die Tabelle läßt sich auch in 3 Gruppen teilen:

	Durchschnittliche Differenz
Ruheversuche	0,004 \pm 0,001
Rhythmische Kontraktionen . .	0,004 \pm 0,001
Tetanus	0,003 \pm 0,003

Die Versuche wurden sämtlich an Hunden ausgeführt, das Blut wurde der A. carotis und V. cava inferior entnommen, indem in der Regel ein Katheter durch die V. cruralis geführt wurde, so daß dessen Mündung direkt an der Stelle lag, wo die beiden Venen von den Unterextremitäten sich begegnen; das durch den Katheter ausgesaugte Blut stammt zum wesentlichsten aus dem entgegengesetzten Bein; der Blutstrom dadurch ist unbehindert und frei.

In bei weitem der größten Anzahl (22 Fällen) von insgesamt 32 vergleichenden Bestimmungen fand sich mehr Zucker in den Arterien als in den Venen, in 8 Fällen lag kein Unterschied vor, und schließlich war in 2 Fällen der Zuckerprozentatz höher in der Vene als in der Arterie.

Im Durchschnitt von sämtlichen Versuchen war der Venenzuckerprozentatz um 0,004% niedriger als der Arterienzuckerprozentatz, der mittlere Fehler dieses Durchschnitts beträgt 0,0008. Wir müssen daher annehmen, daß den Muskeln mit dem Blute fortwährend Glucose zugeführt wird, trotzdem in dem Körper, weder in der Leber noch in den Muskeln selbst, sicherlich keine nennenswerten Zuckerdepots vorhanden waren, und daß der zugeführte Blutzucker in nicht geringem Maße verbraucht wird. Wie groß der Zuckerverbrauch war, läßt sich nicht sagen; dazu haben die Versuchsfehler einen zu großen Einfluß auf die Berechnung, und es wurde auch keine Bestimmung der gleichzeitig durch die Muskeln strömenden Menge von Blut ausgeführt. Dagegen ist es möglich, wenigstens eine Vorstellung von der Größe des Verbrauches zu gewinnen, wenn man den Schwund der Zuckerkonzentration vergleicht, der sich bei der Passage durch die Muskeln nachweisen ließ, und den Schwund, der sich beim Menschen in dem Falle berechnen ließ, daß rund zwei Drittel des gesamten Energieumsatzes von Kohlenhydraten herrührten; da dieser Schwund doppelt so groß sein würde wie der hier gefundene,

läßt sich ganz grobhin schließen, daß in den obengenannten Versuchen durchschnittlich ein Verbrennen von Kohlenhydraten stattgefunden haben muß, das einem Drittel des gesamten Energieumsatzes entspricht. Da keine Kohlenhydrate hinzugeführt worden sind und kaum nennenswerte Kohlenhydratdepots vorhanden gewesen sein können, muß die in die Muskeln hinausgeführte und dort verbrannte Zuckermenge aus anderen Stoffen gebildet werden, und diese Umwandlung muß in recht großen Mengen vonstatten gehen.

Wenn man sodann zu den Versuchen übergeht, bei denen keine Inanitionsperiode (kombiniert mit Phlorizineingabe oder mit Muskularbeit) vorherging, wo daher annehmbar bedeutend größere Kohlenhydratreserven vorlagen, könnte man erwarten, einen größeren Unterschied zwischen der Arterien- und Venenzuckerkonzentration anzutreffen. Diese Vermutung trifft aber nicht zu, es läßt sich nur sagen, daß die Resultate schwanken, indem man nun häufiger als früher eine Steigerung der Zuckerkonzentration bei der Strömung des Blutes durch die Muskeln antrifft, statt eines Schwundes.

Als Beispiel eines solchen Versuches und als Typus der Versuche im allgemeinen wollen wir folgenden Versuch anführen:

Hund, 11 kg, keine Inanition. Kanüle in die Carotis, Katheter in die V. femoralis dextra. Der Katheter wird so hoch hinaufgeführt, daß er eben an der Stelle liegt, wo diese Vene mit der entsprechenden des linken Hinterbeins zusammenstößt; das durch dieses Bein strömende Blut wird daher nicht im geringsten in seinem freien Lauf gehemmt; bei der Blutprobeentnahme wird man im wesentlichen dies Blut hinaussaugen. Während der Operation Äther.

1. Probe unmittelbar nach der Operation, 5 ccm Blut werden gleichzeitig der Vene und der Arterie entnommen, von beiden Blutsorten wird 2 mal 1 ccm abpipetiert. Es wird mit Kaliumchlorid (und 1 ccm kolloidalem Eisen bis auf 50 ccm) verdünnt, es wird filtriert und dem Filtrate werden 10 ccm (0,2 ccm Blut) zur Analyse entnommen.

Die Analysen ergaben folgende Resultate:

Arterie	Vene	Differenz (Arterie + Vene)
0,168	0,157	
0,169	0,158	
0,170	0,158	
0,171	0,159	
<u>0,170%</u> Glucose	<u>0,158%</u> Glucose	<u>0,012</u>

Dann wurde von 1^h 50' bis 2^h 15' Muskularbeit vorgenommen, indem 2 nadelförmige Elektroden in die Muskulatur des Hinterbeines eingeführt wurden und Irritation durch Metronom 15 mal pro Minute, Belastung der Hinterbeine 3 kg, Hebehöhe 10–20 ccm (wir erhalten dadurch jedoch kein Maß der tatsächlich ausgeführten Arbeit, indem diese sicherlich vorzugsweise in einer Überwindung der Kontraktion der Antagonisten bestand). In der Arbeitsperiode (1^h 58') wurde die 2. Probe entnommen:

Arterie	Vene	Differenz
0,224	0,212	0,012

Ruhe 2^h 15' bis 2^h 20'.

Arbeitszeit 2^h 20' bis 2^h 32', darunter wird die 3. Probe entnommen.

Arterie	Vene	Differenz
0,258	0,255	0,003

Wir finden auch hier einen bedeutenden Zuckerverbrauch, sowohl während der Arbeit als während der Ruhe, am geringsten ist der Zuckerschwind bei dem letzten Arbeitsversuch.

Daß die Restreduktion des Blutes auch während der Arbeit gering und in der Arterie und der Vene so nahezu identisch ist, daß sie für die Bestimmungen keine entscheidende Rolle spielt, daß aber diese tatsächlich einen Maßstab für die gärungsfähigen Kohlenhydrate (Glucose) des Blutes abgeben, wurde bei diesem Versuch durch direkte Restreduktionsbestimmungen in Vergärungsversuchen von 44 und 48 Stunden festgestellt. Das Resultat dieser Bestimmungen ergibt sich aus der folgenden Tabelle:

	Gesamtreduktion	Restreduktion nach 24stünd. Vergären	Restreduktion nach 48stünd. Vergären
A ₁	0,170		0,0048
V ₁	0,158		0,0050
A ₂	0,224	0,0048	0,0048
V ₂	0,212	0,0058	0,0058
A ₃	0,258	0,0048	0,0046
V ₃	0,255	0,0066	0,0058

Während der Arbeit scheint die Restreduktion in der Vene unbedeutend höher (0,001%) zu sein als in der Arterie, was jedoch nicht die Analysenresultate in wesentlichem Grade zu beeinflussen vermag.

Der Zuckerschwind (der Unterschied zwischen dem Arterien- und Venenzuckerprozentsatz) ist in dem einen Arbeitsversuch derselbe wie in dem Ruheversuch, in dem anderen wesentlich kleiner, als was man erwarten könnte, denn wenn auch die Volumen-

strömungsgeschwindigkeit des Blutes durch das Bein während der Arbeit beschleunigt wird, ist die durch den arbeitenden Muskel strömende Blutmenge nicht in demselben Grade vermehrt worden, wie der Stoffwechsel des Muskels sich gesteigert hat, was schon aus einem einfachen Vergleich zwischen dem bei Ruhe und bei Arbeit gewonnenen venösen Blut hervorgeht; letzteres Blut war wesentlich ärmer an Oxyhämoglobin.

Die Erklärung des kleineren oder unveränderten Zuckerschwundes muß anderswo gesucht werden und liegt sicherlich darin, daß die Muskeln während der Arbeit an dem Kohlenhydratdepot zehren, das sie annehmbar besitzen.

Daß sich in dem Tiere wirklich Kohlenhydratdepote finden, ist aus dem in dem Versuche vorkommenden hohen und fortwährend zunehmenden Blutzuckerprozentatz ersichtlich, welcher zeigt, daß eine größere Mobilisierung von Kohlenhydrat stattfindet, als der Organismus gebraucht.

Daß sich, wenn das Tier in einem guten Ernährungszustand ist, in den Muskeln Kohlenhydratdepots finden, aus denen — wenigstens unter den Bedingungen, unter denen die Versuche angestellt wurden — Glucose in dem Maße mobilisiert wird, daß sich sogar mehr Glucose in der Vene findet als in der Arterie (und zwar trotz des unzweifelhaft gleichzeitig stattfindenden Zuckerverbrauches), zeigt folgender Versuch mit einer Ziege.

Carotiskanüle, Bauchhöhle bei Äthernarkose geöffnet, Katheter in die V. spermatica, die Katheteröffnung liegt direkt bei deren Mündung in die V. cava. Die Operation in 2^h beendet.

	Zeit	Arterie	Vene	Differenz (Arterie ÷ Vene)
Ruheversuch . . .	2 ^h 15'	0,191	0,194	÷ 0,003
„ . . .	2 ^h 45'	0,158	0,162	÷ 0,004
Tetanus	3 ^h 00'	0,171	0,170	0,001

Nur bei dem Arbeitsversuch übertraf der Zuckerverbrauch die Zuckermobilisierung.

Die große Bedeutung der Muskeln als Kohlenhydratdepots geht am besten aus einigen Versuchen hervor, bei denen durch Injektion von Glucose in das Venensystem des Tieres eine kräftige Hyperglykämie hervorgerufen wurde, die der alimentären Hyperglykämie durchaus entspricht. Unter solchen Verhältnissen zeigte sich durch einen Vergleich zwischen der Arterien- und Venen-

zuckerkonzentration, daß während der Passage des Blutes durch die Muskeln eine sehr bedeutende Ablagerung von Zucker stattgefunden haben mußte.

Versuch. Hund, 7 kg. Äther, Kanüle in die A. carotis, Katheter in die V. cruralis. Operation 2^h 00' beendet.

	Arterie	Vene	Differenz
Ruheperiode 2 ^h 10'	0,170	0,160	0,010
Arbeit begonnen 2 ^h 30', Probe 2 zu Ende der kurzen Arbeitsperiode 2 ^h 35' ent- nommen	0,157	0,140	0,017

Injektion von 35 ccm 5 proz. Glucoselösung in die V. jugularis 2^h 53' bis 2^h 55'.

Probe 3 2^h 56' (1 Min. nach Beendigung der Injektion).

Nach der Injektion	Arterie	Vene	Differenz
3 ^h 00' Injektion von 15 ccm 5 proz. Glucoselösung	0,214	0,169	0,045
3 ^h 00' bis 3 ^h 03' Arbeitsperiode, Probe- entnahme (4) ganz zu Ende derselben	0,210	0,219	÷ 0,009
3 ^h 16' bis 3 ^h 18' Arbeitsperiode, Probe- entnahme ganz zu Ende derselben. .	0,182	0,180	0,002

Man wird hier zuvörderst die Probe direkt nach der ersten Injektion beachten; wir wissen teils durch Berechnung, teils durch die früheren Versuche, daß die Glucosemenge, die bei der Passage des Blutes durch die Muskeln verschwinden kann — wenn die Glucose ausschließlich in den Muskeln verbrennen soll — nur einen Zuckerschwund von 0,005—0,010% veranlassen kann. Wenn der Zuckerschwund nach der Injektion 0,045 beträgt (also 5—10 mal so groß ist), läßt sich dies nur aus einer Deponierung von Glucose in den Muskeln (wahrscheinlich in Form von Glykogen) erklären. Wir wissen nämlich, daß die Einführung von Glucose die Glucoseverbrennung im Organismus nicht nennenswert vergrößert.

Die Zuckerdepots in den Muskeln können dadurch so angefüllt werden, daß es uns nicht wundern kann, daß in der folgenden Arbeitsperiode kein Schwund von Glucose stattfindet, indem das Blut durch die Muskeln strömt, vielmehr aber eine Mobilisierung der Kohlenhydratdepote, die den Verbrauch übertrifft, so daß sich jetzt mehr Glucose in der Vene findet als in der Arterie. Hier ist sicherlich zu beachten, daß dank der Irritation, die angewendet werden muß, damit die Muskeln arbeiten sollen, eine Neigung vorliegt, durch eine vermehrte Zuckermobilisierung eine Hyperglykämie hervorzurufen.

Versuch. Hund, 19,8 kg.			
6tägige Inanition			
	Arterie	Vene	Differenz
Ruhe	0,120	0,111	0,009
1 Min. nach Injektion von 20 ccm 20 proz. Glucoselösung im Laufe von 7 Min. .	0,198	0,168	0,030
Versuch. Hund, 28,3 kg, sehr fett und wohlgenährt.			
Ruhe	0,114	0,115	+ 0,001
„	0,106	0,110	+ 0,004
Arbeit	0,110	0,117	+ 0,007
„	0,106	0,115	+ 0,009
Injektion von 75 ccm 20 proz. Glucoselösung 2 Min. — Probeentnahme 1 Min. nach Aufhören der Injektion	0,486	0,446	0,040
Arbeitsperiode. Probeentnahme während der Arbeit 6 Min. nach der Injektion	0,356	0,319	0,037
Ruhe (29 Min. später)	0,195	0,185	0,010
Arbeit	0,166	0,156	0,009
Tetanus	0,148	0,135	0,007

Durch die Bank liefern diese Versuche einen direkten Beweis dafür, daß im Falle von alimentärer Hyperglykämie, wo das kohlenhydratablagernde Vermögen der Leber es nicht vermag, den Zuckerprozentsatz des Blutes auf dem normalen Niveau festzuhalten, eine sehr schnelle und kräftige Ablagerung von Glucose in den Muskeln stattfinden kann.

Nur ließe sich vielleicht einwenden, daß eine Abänderung des Verhältnisses zwischen Blutkörperchen und Plasma während der Passage des Blutes durch die Muskeln eine Änderung des Zuckerprozentsatzes des Blutes sollte hervorrufen können; denkt man sich, daß die Menge des Plasmas bei der Passage durch die Muskeln vermindert wird, so müßte der Zuckerprozentsatz abnehmen, da ja bekannt ist, daß die im Blute des Hundes vorhandene Zuckermenge, namentlich im Falle einer Hyperglykämie, sozusagen ausschließlich in den Blutkörperchen vorliegt¹⁾; oder man könnte sich denken — was vielleicht wahrscheinlicher ist — daß aus den Geweben eine glucosefreie oder glucosearme Flüssigkeit in das Blut eingedrungen ist; dies wird ja gleichfalls in einer Verminderung der Glucosekonzentration während der Passage des Blutes durch die Muskeln resultieren, welcher Schwund in dem Falle durchaus nichts mit einer Zuckerablagerung zu tun hätte. Dieser

¹⁾ R. Ege, diese Zeitschr. 111. 1920.

Einwand ist als angebracht zu betrachten, da es sich in den meisten Fällen um eine Injektion einer hypertonen Lösung handelte.

Es hat sich indessen gezeigt, daß der Einwand keine praktische Bedeutung hat, indem es nicht gelungen ist, eine Verschiebung zwischen dem Blutkörperchen- und dem Plasmavolumen nachzuweisen, auch nicht nach einer Injektion einer hypertonen Glucoselösung, wie aus dem untenstehenden Versuch ersichtlich.

Kaninchen, 2,8 kg, Urethan. Injektion von 30 ccm 20 proz. Glucose in die V. jugularis; 3 Min. später wurden 2 absolut gleichzeitige Proben aus der A. carotis und durch einen Katheter, der durch die andere V. jugularis in die V. cava superior hinabgeführt war, entnommen.

Blutkörperchenvolumen (0,08 ccm Blut in 2 ccm $\frac{1}{2}$ Mol NaCl. Arterie 32,2, 2 Min. nach einer neuen Injektion 24,6, 10 Min. später 27,1 Vol.-%; Vene 31,9, 2 Min. nach einer neuen Injektion 24,5, 10 Min. später 27,1 Vol.-%.

Schließlich soll noch ein letzter Versuch angeführt werden, in welchem die Arbeit unter natürlicheren Verhältnissen stattfand als bei den obenstehenden Versuchen. Die Arbeit bestand in diesem Versuche aus einem Lauf auf einem wagerecht rollenden Trottoir (etwa 10 km pro Stunde).

Der Zweck des Versuches war, zu untersuchen, ob die Mobilisierung der Kohlenhydratdepots des Muskels, welche stattfinden kann, wenn diese wohlversehen sind (z. B. unmittelbar nachdem in einer Hyperglykämieperiode eine Ablagerung stattgefunden hat), und die zu einer Steigerung des Zuckerprozentatzes in der Vene im Verhältnis zu dem in der Arterie führen kann, im wesentlichen als ein normaler Fall aufzufassen ist, oder ob sie mit derjenigen Neigung zur Glucosemobilisierung in Verbindung stehen kann, die eine mehr oder minder unvermeidbare Folge einer Irritation des Versuchstieres darstellt (Schmerz- oder psychische Hyperglykämie).

Versuch. Hund, 15 kg, Kanüle in die V. jugularis, A. carotis, Katheter in die V. femoralis.

	Arterie	Vene	Differenz
Ruhe	0,081	0,083	0,002
Arbeit (Lauf auf dem rollenden Trottoir), Probeentnahme während des Laufes	0,097	0,092	0,005
Zuckerinjektion 80 ccm 20 proz. Glucose, danach Ruheperiode	0,470	0,356	0,114
Arbeitsperiode	0,205	0,203	0,002
Ruheperiode	0,130	0,148	÷ 0,018
Arbeit	0,124	0,146	÷ 0,022
Ruhe	0,113	0,119	÷ 0,006

Wir treffen hier sowohl die kräftige Ablagerung, die in diesem Falle merkwürdig groß erscheint, als die bedeutende Glucosemobilisierung aus den Muskeln, wenn der Zuckerprozentatz des Blutes sich wieder seiner normalen Größe nähert, eine Glucosemobilisierung, die so bedeutend ist, daß der Venenzuckerprozentatz den Arterienzuckerprozentatz ganz beträchtlich übertreffen kann; diese überschüssige Glucosemobilisierung treffen wir sowohl bei Ruhe als bei Arbeit.

Zusammenfassung.

1. Infolge der großen Strömungsgeschwindigkeit des Blutes ist nicht zu erwarten, daß zwischen dem Arterien- und Venenzuckerprozentatz ein besonders großer Unterschied obwaltet.

2. Man besitzt an dem Zuckerschwund während der Passage des Blutes durch einen Muskel weder einen relativen noch einen absoluten Maßstab für den Zuckerverbrauch in den Muskeln. Die Muskeln enthalten nämlich selbst ein Kohlenhydratdepot; man kann daher unter gewissen Verhältnissen beobachten, daß während der Passage durch die Muskeln kein Schwund des Glucoseprozentatzes des Blutes stattfindet, indem anzunehmen ist, daß die Muskeln ausschließlich vom Kohlenhydratdepot verbrennen. Andererseits kann, wenn der Glucoseprozentatz hoch ist (bei einer alimentären Hyperglykämie), ein so kräftiger Schwund von Glucose während der Passage des Blutes durch die Muskeln stattfinden, daß der Schwund sich nur aus einer sehr merkbaren Ablagerung erklären läßt. Das reiche Kohlenhydratdepot, das der Muskel demzufolge enthält, gibt sich, wenn die Glucosekonzentration im Blute wieder gegen ihre normale Stufe hin abnimmt, in einer so kräftigen Mobilisierung von Glucose zu erkennen, daß die Glucosekonzentration in der Vene die der Arterien übertrifft.

3. Auch wenn im Körper keine Kohlenhydratreserven vorhanden sind, verbrennen fortwährend große Mengen von Glucose in den Muskeln; die verbrauchte Glucose wird (aus anderen Stoffen) außerhalb des Muskels gebildet.

Physikalische Chemie der Zellatmung¹⁾.

Von
Otto Warburg.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 18. April 1921.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die vorliegende Abhandlung zerfällt in folgende Abschnitte:

- I. Versuche an Zellen (S. 135).
- II. Versuche an dem Kohlemodell (S. 140).
- III. Ergebnisse (S. 152).
- IV. Experimentelles zu II. (S. 154).

Fragestellung.

Eiweiß ist bei Körpertemperatur gegenüber Sauerstoff von Atmosphärendruck beständig. Wässrige Eiweißlösungen können bei Luftzutritt jahrelang unverändert aufbewahrt werden, wenn man für Fernhaltung lebender Keime Sorge trägt. Thermodynamisch betrachtet, haben wir hier „falsche Gleichgewichte“ vor uns; es bedarf keiner Zufuhr von Arbeit, um Eiweiß mit Sauerstoff in Reaktion zu bringen, sondern, wie man sich ausdrückt, der Beseitigung von Reaktionswiderständen.

Auch in der lebenden, mit Sauerstoff durchtränkten Zelle ist die Hauptmasse der Zellsubstanz mit Sauerstoff in falschem Gleichgewicht, d. h. gegenüber Sauerstoff ebenso beständig wie im Reagenzglas. Wäre dem nicht so, würde die organische Welt nicht existieren. Nur an einzelnen Stellen werden, nach Maßgabe des Energiebedarfs der Zelle, jene Reaktionswiderstände verkleinert; hier, an den Verbrennungsorten, wird der Kohlenstoff des Eiweißmoleküls zu Kohlensäure, sein Wasserstoff zu Wasser, sein Schwefel zu Schwefelsäure oxydiert. Dies ist der Vorgang, den wir als Sauerstoffatmung bezeichnen, und die Frage, die wir

¹⁾ Auszugsweise veröffentlicht in „Festschrift der Kaiser-Wilhelm-Gesellschaft“ Berlin, Julius Springer, 1921.

stellen, lautet: Welcher Mittel bedient sich die Zelle, um an den Verbrennungsorten die trägen organischen Verbindungen mit Sauerstoff in Reaktion zu bringen?

I. Versuche an Zellen.

Die Verbrennungsorte¹⁾.

Bringt man rote Vogelblutzellen in eine Kältemischung von -80° , so zerreißen beim Gefrieren die feinen die Strukturteile umhüllenden Membranen und man erhält beim Auftauen eine Flüssigkeit, in der die festen Zellbestandteile frei schweben. Der Versuch läßt sich so anordnen, daß die Atmung nach dem Auftauen für einige Stunden unverändert bleibt.

Zentrifugiert man nach dem Auftauen, so erhält man 2 Schichten: eine obere, klare, von den festen Zellbestandteilen befreite, und eine tiefere, trübe, die festen Zellbestandteile enthaltende. Mißt man in den so getrennten Schichten die Atmung, so findet sich, daß nur die tiefere Schicht atmet. Die gesamte Atmung ist an die festen Zellbestandteile gebunden.

In allen Fällen, in denen bisher eine Zerstörung der Zelle ohne gleichzeitige Vernichtung der Atmung gelang, beobachtet man ähnliches. So ist die Atmung des unbefruchteten Seeigels, die Atmung der Leberzellen höherer Tiere größtenteils an feste Partikel gebunden, die man als intracelluläre Granula bezeichnet. Je kleiner die festen Partikel, um so schwerer ist ihre Entfernung aus dem flüssigen Zellinhalt. Die festen Partikel der roten Blutzellen, die als große „Schatten“ zusammenhängen, lassen sich leicht durch Zentrifugieren herausschleudern. Die festen Partikel der Leberzellen können nach dem gleichen Verfahren nicht vollständig abgetrennt werden; auch nach langem Zentrifugieren sind hier die überstehenden Flüssigkeiten nicht frei von Atmung und selbst die Filtration durch engmaschige Kieselgurkerzen liefert noch atmende Filtrate. Die Atmung in derartigen Filtraten, die frei von gröberen Partikeln sind, entspricht der Gärung in Buchners Hefepreßsaft. Wie die Wirkung im Hefepreßsaft, so mag man die Wirkung in den Leberzellenfiltraten als „enzymatisch“ bezeichnen. Doch muß man bedenken, daß mit dieser Ausdrucksweise für die Lösung unserer Frage nichts gewonnen ist.

¹⁾ O. Warburg, Zeitschr. f. physiol. Chemie **70**, 413. 1911; Arch. f. d. ges. Physiol. **154**, 599. 1913; **158**, 189. 1914.

Wirkung der Narkotica auf die Atmung¹⁾.

Es gibt eine große Anzahl zellfremder Stoffe, mittels deren sich die Atmung ohne Schädigung der Zelle hemmen läßt. Entfernen wir einen derartigen Stoff nach nicht allzu langer Einwirkung wieder aus der Zelle, so steigt die Atmung auf ihre normale Höhe.

Wir wollen uns im folgenden nur mit solchen Stoffen beschäftigen, die schnell in lebende Zellen eindringen, und scheidet damit die komplizierende Frage aus, wieweit eine beobachtete Wirkung mit der Eintrittsgeschwindigkeit in die Zelle zusammenhängt. Lösen wir einen unserer Stoffe bis zur Konzentration c in der die Zelle umspülenden Flüssigkeit, so befinden sich alle Phasen des Zellinnern mit c im Verteilungsgleichgewicht.

Vergleichen wir die Konzentrationen verschiedener Stoffe, die die Atmung um den gleichen Betrag hemmen, so finden wir in einigen Fällen gleiche Wirkungen bei gleichen Konzentrationen. Beispielsweise wird die Atmung roter Vogelblutzellen durch eine $\frac{2}{100}$ -Lösung von Acetaldehyd, Propylaldehyd, Butyraldehyd oder Valeraldehyd um etwa 50% gehemmt. Wir schließen daraus, daß die Wirkung dieser Stoffe durch ihre im chemischen Sinn reaktionsfähige Gruppe, die Aldehydgruppe, bestimmt wird.

Andere zellfremde Stoffe — die Narkotica — wirken auf die Atmung nicht durch ihre im chemischen Sinn reaktionsfähigen Gruppen. Vergleicht man die Wirkung verschiedener Alkohole, Urethane, Ketone, Nitrile, so findet man innerhalb einer Körperklasse nicht gleiche Wirkungen bei gleichen Konzentrationen, sondern die Wirkungsstärken der Alkohole unter sich, der Urethane unter sich, liegen um das Hundert- bis Tausendfache auseinander (Tabelle I).

Setzt man dieselben Stoffe zu einem gärenden Hefepreßsaft, so wird die Vergärung des Zuckers bei höheren Konzentrationen, jedoch in der gleichen Reihenfolge gehemmt wie die Zellatmung. Hier beobachtet man mit der Wirkung eine Veränderung des Preßsaftes²⁾, indem immer dann, wenn eine Hemmung erfolgt,

¹⁾ O. Warburg, Zeitschr. f. physiol. Chemie **69**, 452. 1910; Ergebnisse der Physiologie **14**, 253. 1914.

²⁾ O. Warburg und Wiesel, Arch. f. d. ges. Physiol. **144**, 465. 1912; O. Meyerhof, Arch. f. d. ges. Physiol. **157**, 251. 1914; **157**, 307. 1914; H. Freundlich und Rons, diese Zeitschr. **81**, 87. 1917; O. Meyerhof, diese Zeitschr. **86**, 325. 1918.

Tabelle I.

Substanz	Atmungshemmung um 50% durch Mole pro Liter	Substanz	Atmungshemmung um 50% durch Mole pro Liter
Methylalkohol	5,0	Azeton	0,9
Äthylalkohol	1,6	Methylpropylketon	0,17
Propylalkohol	0,8	Methylphenylketon	0,014
Butylalkohol	0,15	Azetonitril	0,85
Amylalkohol	0,045	Propionitril	0,36
Methylurethan	13	Valeronitril	0,06
Äthylurethan	0,33	Dimethylharnstoff	1,4
Propylurethan	0,13	Diäthylharnstoff	0,52
Butylurethan	0,043	Phenylharnstoff	0,018
Phenylurethan	0,003	Vanillin	0,02
Methylal	0,6	Thymol	0,0007
Azetal	0,14		

die Kolloide ausflocken. Die Wirkung ist also eine capillar-chemische, Flockung bedeutet Grenzflächenveränderung der Kolloide.

Nach derselben Richtung weist eine Übereinstimmung, die J. Traube¹⁾ bei Betrachtung unserer Tabelle I auffiel. Die wässrigen Lösungen der dort aufgeführten Stoffe zeigen durchweg gegenüber Luft eine niedrigere Oberflächenspannung als reines Wasser, und zwar ist diese Erniedrigung für gleich wirksame Lösungen vielfach gleichgroß.

Indessen gilt der Satz, daß „isocapillare“ Lösungen gleichwirksam sind, nur dann, wenn man die Lösungen sehr ähnlicher Stoffe vergleicht, wie beispielsweise die Reihe der homologen aliphatischen Alkohole, jedoch nicht angenähert, wenn man die Lösungen verschiedenartiger Stoffe vergleicht. Zum Beleg seien einige Messungen wiedergegeben (Tabelle II u. III), in denen

Tabelle II. Alkoholreihe.

Substanz	Atmungshemmung um 50% durch Mole pro Liter (e)	$\frac{\sigma_W - \sigma_L}{\sigma_W} \cdot 100$
Methylalkohol	5,0	31
Äthylalkohol	1,6	28
Propylalkohol	0,8	35
Butylalkohol	0,15	28
Amylalkohol	0,045	28

¹⁾ J. Traube, Arch. f. d. ges. Physiol. **153**, 276. 1913.

Tabelle III. Mischreihe.

Substanz	Atmungshemmung um 50% durch Mole pro Liter (c)	$\frac{\sigma_W - \sigma_L}{\sigma_W} \cdot 100$
Diäthylharnstoff (symm.) . .	0,52	18,8
Amylalkohol (Gärungs-) . .	0,045	28,0
Methylphenylketon	0,014	7,7
Phenylurethan	0,003	4,5
Thymol	0,0007	8,3

wir für gleichwirksame Konzentrationen verschiedener Stoffe die Capillarkonstanten ermittelt haben. σ_W in den Tabellen bedeutet die Capillarkonstante des reinen Wassers, σ_L die Capillarkonstante der Lösung bei der Konzentration c des Narkoticums. c hemmt in allen Fällen die Zellatmung um 50%.

Wie man sieht, findet man für die Mischreihe sehr verschiedene Capillardepressionen. Andererseits ist die Konstanz in der Alkoholreihe auffallend; sie wird von J. Traube¹⁾ folgendermaßen erklärt: Ein Stoff dringt um so schneller in die Zelle ein, je stärker er die Oberflächenspannung der umspülenden Lösung erniedrigt. Er wirkt um so stärker, je schneller er eindringt. Isocapillare Lösungen verschiedener Narkotica wirken gleich, weil aus ihnen in der Zelleinheit gleiche Mengen Narkoticum in die Zelle eindringen.

Diese Theorie ist nicht haltbar. Insbesondere übersieht Traube, daß die Wirkungsstärken unserer Stoffe im Verteilungsgleichgewicht gemessen sind, daß also Verschiedenheiten der Wirkungsstärken nicht durch Verschiedenheiten der Eintrittsgeschwindigkeiten erklärt werden können.

Wir werden später auf den Zusammenhang zwischen Grenzflächenspannung und Wirkungsstärke zurückkommen.

Adsorption der Narkotica in lebenden Zellen²⁾.

Fügen wir zu roten Vogelblutzellen, die in einer Kochsalzlösung aufgeschwemmt sind, Thymol und messen im Gleichgewicht die Verteilung des Thymols zwischen der lebenden Zelle und der umspülenden Salzlösung, so finden wir, ziemlich unabhängig von

¹⁾ Arch. f. d. ges. Physiol. l. c.

²⁾ O. Warburg und Usui, Zeitschr. f. physiol. Chemie 81, 175. 1912; Dorner, Sitzungsber. d. Heidelb. Akad. 1914, S. 2; Ergebnisse der Physiologie 14, 253. 1914.

der Konzentration, einen Verteilungskoeffizienten von 7, d. h. 1 Volumen Zellen enthält im Gleichgewicht ca. 7mal soviel Thymol als 1 Volumen der umspülenden Salzlösung. Bei gleicher Versuchsanordnung erhalten wir kleinere Verteilungskoeffizienten für die übrigen Stoffe der Tabelle III. Die Reihe, geordnet nach der Größe der Verteilungskoeffizienten, lautet: Diäthylharnstoff < Amylalkohol < Methylphenylketon < Phenylurethan < Thymol; die Folge entspricht ohne Ausnahme der der Wirkungsstärken. Je stärker die Wirkung, um so größer ist also, bei gleicher Außenkonzentration, die Anreicherung in der Zelle.

Indem man das Bindungsvermögen der flüssigen und der festen Zellbestandteile getrennt bestimmt, kann man zeigen, daß die Anreicherung vorwiegend durch die festen Zellbestandteile erfolgt. Auf gleiche Gewichtsmengen umgerechnet, binden die festen Zellbestandteile etwa 10mal soviel Thymol als die flüssigen.

Die Bindung ist als Adsorption aufzufassen. Isoliert man die festen Zellbestandteile und kocht sie mit Alkohol und Äther aus — um Körper, die als Lösungsmittel wirken könnten, zu entfernen —, so bleibt das Bindungsvermögen gegenüber Thymol unverändert. Die festen Strukturteile adsorbieren also chemisch indifferente Stoffe in ähnlicher Weise wie Kohle. 2 Zahlenbeispiele seien angeführt:

Substanz	Konzentration in der Lösung Mole pro Liter	Adsorbierte Menge Millimole pro Gramm
n-Oktylalkohol . . .	$2,2 \cdot 10^{-3}$	0,06
Thymol	$1,5 \cdot 10^{-3}$	0,09

Bezogen auf gleiche Gewichtsmengen Adsorbens, ist das Adsorptionsvermögen der festen Zellbestandteile kleiner als das hochwertiger Kohlen; doch besagt dieser Vergleich nicht viel, da in beiden Fällen die Größen der wirksamen Oberflächen nicht bekannt sind.

Eisen als Sauerstoffüberträger in der Zelle¹⁾.

Nach dem Vorhergehenden hemmt ein Narkoticum die Zellatmung in um so kleinerer Konzentration, je stärker es von den festen Zellbestandteilen adsorbiert wird. Die Wirkungsstärken wachsen nach Maßgabe der Adsorptionskonstanten.

¹⁾ O. Warburg, Zeitschr. f. physiol. Chemie **92**, 231. 1914.

Blausäure hemmt die Atmung der meisten Zellen bei Konzentrationen von etwa $\frac{1}{10000}$ Mol pro Liter und ist damit, hinsichtlich der Beeinflussung der Atmung, der wirksamste Stoff, den wir kennen. Doch ergibt die Messung der Adsorption eine sehr kleine Konstante, etwa von der Größe des zehntausendmal unwirksameren Acetons. Die Wirkungsweise der Blausäure ist also eine andere als die der Narkotica¹⁾ und es liegt nahe, hier an eine Umsetzung mit einem in kleiner Menge vorhandenen, für die Atmung wichtigen Zellbestandteil zu denken. In der Tat haben Versuche am Seeigeelei diese Auffassung sehr wahrscheinlich gemacht.

Das Seeigeelei enthält eine kleine Menge Eisen, etwa 0,03 mg pro Gramm Trockensubstanz. Die Form, in der das Eisen vorliegt, ist nicht näher bekannt; ist es organisch gebunden, so ist die Bindung eine sehr lockere, da bei Zusatz von Eisenion-reagenzien sofort die bekannten Reaktionen auftreten. — Gibt man Stoffe zu der Zellsubstanz, deren Oxydation im Reagensglas durch Eisensalz beschleunigt wird, so beobachtet man unter gewissen Bedingungen die nach dem Eisengehalt zu erwartenden Oxydationsbeschleunigungen. — Verdoppelt man den natürlichen Eisengehalt der Zellsubstanz, so steigt die Atmung auf etwa den doppelten Betrag. Andere Schwermetalle, z. B. Kupfer und Mangan, sind ohne Wirkung, ebenso Eisenzusätze, die im Vergleich zum natürlichen Eisengehalt der Zelle klein sind.

Bekanntlich besitzt Blausäure eine besondere Verwandtschaft zu Schwermetallen und es liegt nahe, ihre Wirkung auf die Atmung mit dieser Verwandtschaft in Beziehung zu bringen. Der Eisengehalt einer Zelle und die zur Atmungshemmung nötige Blausäuremenge sollten dann, der Größenordnung nach, übereinstimmen. In der Tat genügen einige hundertstel Milligramme Blausäure pro Gramm Zellsubstanz, um die Atmung des Seeigeeleis völlig zu hemmen, das heißt, die dem Eisengehalt entsprechende Menge.

II. Modellversuche.

Reaktionsgeschwindigkeit an Oberflächen.

Nach einer Entdeckung von Dulong und Thénard²⁾ haben feste Körper die Eigenschaft, Gasreaktionen zu beschleunigen. So erhöhen Quarz, Bernstein, Porzellan, Kohle und viele andere

¹⁾ O. Warburg, Zeitschr. f. physiol. Chemie **76**, 331. 1911.

²⁾ Ann. de Chim. et de Phys. **24**, 380. 1823.

Körper die Geschwindigkeit, mit der sich Wasserstoff und Sauerstoff vereinigen. Bald nach Dulong und Thénard beschäftigte sich Faraday¹⁾ eingehend mit dem Phänomen und sprach die Vermutung aus, daß die Gase an der Oberfläche der festen Körper verdichtet und im wesentlichen infolge dieser Verdichtung reaktionsfähiger würden²⁾.

Seit Faradays Zeiten ist eine große Anzahl ähnlicher Reaktionen beobachtet und näher untersucht worden, und es ist bekannt, welche Rolle die Beschleunigung von Gasreaktionen durch feste Körper in der Technik spielt. Viel seltener sind Fälle gefunden, in denen die Adsorption aus Lösungen Reaktionsbeschleunigungen bedingt; infolge der Konkurrenz mit dem Lösungsmittel werden offenbar gelöste Stoffe aus Lösungen bei weitem nicht so stark adsorbiert, wie Gase aus Gasräumen. Doch haben naturgemäß nur Adsorptionen aus wässrigen Lösungen und durch sie bedingte Reaktionsbeschleunigungen biologisches Interesse.

Gibt man zu einer wässrigen Kohlesuspension organische Stoffe, die adsorbiert werden, und schüttelt bei Zimmertemperatur mit Luft, so kann mittels empfindlicher Methoden in vielen Fällen eine Oxydation der organischen Substanz nachgewiesen werden. Doch sind die Geschwindigkeiten im allgemeinen so klein, daß im Laufe einiger Tage nur wenige Prozente der adsorbierten Substanz oxydiert werden. Hierzu stimmt es, daß im allgemeinen die Messung der Adsorptionsgleichgewichte durch chemische Veränderung der adsorbierten Stoffe nicht gestört wurde.

Doch trifft dies nicht immer zu; wir kennen Fälle, in denen die Oxydation einiger Prozente der adsorbierten Substanz nicht Tage sondern Minuten dauert. Von diesen Fällen wollen wir 2 näher besprechen, die Verbrennung der Oxalsäure und die Verbrennung der Aminosäuren.

¹⁾ Experimental Researches VI. Reihe. 1834. Uebersetzt in Ostwalds Klassiker. Nr. 37.

²⁾ Die Ähnlichkeit des Phänomens mit gewissen Fermentwirkungen wurde schon frühzeitig so von Berzelius, von Schönbein, erkannt. Insbesondere sei hier auf die bekannten Untersuchungen Bredigs und seiner Schule über „Anorganische Fermente“ hingewiesen (Zeitschr. f. physik. Chemie **31**, 258 (1898); **37**, 323 und 448 (1901); **66**, 162 (1909); **70**, 34 (1909); **72**, 641 (1910); **81**, 385 (1912).

Verbrennung der Oxalsäure an Blutkohle.

Schüttelt man eine wässrige Oxalsäurelösung mit Blutkohle, so folgt auf eine erste schnelle Konzentrationsabnahme der Oxalsäure eine zweite langsamere¹⁾. Durch diese Beobachtung Freundlich's angeregt, haben wir das Verhalten der an Kohle adsorbierten Oxalsäure gegenüber Sauerstoff untersucht und gefunden²⁾, daß sie bei Zimmertemperatur und dem Sauerstoffdruck der Luft schnell zu Kohlensäure und Wasser verbrennt.

Diese Oberflächenoxydation wird durch Narkotica in ähnlicher Weise gehemmt, wie die Zellatmung; gleiche Hemmung tritt nicht ein bei gleicher Konzentration in der Lösung, sondern die Wirkungsstärken steigen nach Maßgabe der Adsorptionskonstanten (Tabelle IV). Hier ist der Zusammenhang ohne weiteres einleuchtend, maßgebend ist die Konzentration der hemmenden Stoffe am Orte der Wirkung.

Tabelle IV.

Oxalsäure-Kohle.			Rote Blutzellen.		
Substanz	Gewichtsprozent in der Lösung	Prozentische Oxydationshemmung	Substanz	Gewichtsprozent in der Lösung	Prozentische Oxydationshemmung
Methylurethan	0,05	0	Methylurethan	10	ca. 60
	0,5	34			
	5,0	46			
	10,0	60			
Äthylurethan	0,5	42	Äthylurethan	1,25	14
	5,0	65		2,5	22
	10,0	76		5,0	88
Propylurethan	0,05	41	Propylurethan	1,0	44
	0,5	72		2,0	94
	5,0	92			
Phenylurethan	0,005	34	Phenylurethan	0,025	33
	0,05	90		0,05	55
				0,1	90

Die Gegenüberstellung der Wirkung der Urethane auf Zellatmung und Modellatmung in Tabelle IV zeigt, wie gut sich das Modell zur Nachahmung der Atmungshemmungen eignet. Was dagegen den verbrennenden Stoff selbst betrifft, so handelt es sich hier offenbar nicht um eine Reaktionsbeschleunigung von der Größenordnung, wie wir sie in der Atmung beobachten; denn

¹⁾ H. Freundlich, *Capillarchemie* S. 163ff. Leipzig 1911.

²⁾ O. Warburg, *Arch. f. d. ges. Physiol.* **155**, 547. 1914.

Oxalsäure ist auch in wässriger Lösung relativ unbeständig. Interessanter ist in dieser Hinsicht unser zweiter Fall, das Aminosäuremodell.

Verbrennung der Aminosäuren an Blutkohle¹⁾.

Gibt man zu einer wässrigen Cystinlösung Kohle und schüttelt bei Zimmertemperatur mit Luft, so verschwindet die Aminosäure unter Sauerstoffaufnahme, während gleichzeitig Kohlensäure, Ammoniak und Schwefelsäure als Endprodukte auftreten, das heißt, die Endprodukte der Eiweißverbrennung in lebenden Zellen. Ähnlich verbrennen andere Aminosäuren, beispielsweise Leucin und Tyrosin. Beachtenswert ist hierbei, daß der Stickstoff der Aminosäuren nicht, wie bei der Verbrennung in der Berthelotschen Bombe, mitoxydiert, sondern, wie von der lebenden Zelle, als Ammoniak abgespalten wird.

Mit Hinblick auf unser Thema wollen wir fragen, wie groß die Wirksamkeit der Kohle als Oxydationskatalysator ist im Vergleich zur Wirksamkeit lebenden Gewebes. Vergleichen wir mit einem besonders stark atmenden Gewebe, der Warmblüterleber, so findet sich, daß 1 g Kohle, im Gleichgewicht mit einer $\frac{1}{500}$ -Cystinlösung, in einer bestimmten Zeit ebensoviel Sauerstoff verbraucht, wie die gleiche Gewichtsmenge lebenden Gewebes. Hier handelt es sich also erstens um Geschwindigkeiten und zweitens um Beschleunigungen, wie wir sie in der Zellatmung beobachten. Denn bekanntlich gehören die Aminosäuren zu den beständigsten Körpern der organischen Chemie und reagieren selbst im Lauf von Jahren nicht merklich mit Luftsauerstoff. Andererseits übertreffen sie in der lebenden Zelle alle anderen Stoffe an Unbeständigkeit.

Auch diese Oberflächenoxydation²⁾ wird durch Narkotica in ähnlicher Weise gehemmt wie die Zellatmung. Gibt man zu gleichen Mengen Kohle und Aminosäurelösung soviel verschiedener Narkotica, daß die Oxydationsgeschwindigkeit immer um denselben Betrag sinkt und mißt in diesem Zustand gleicher Hemmung die Narkoticumkonzentrationen c in der Lösung, so findet man (Tabelle V), daß sich die c -Werte für chemisch ähnliche Narkotica um das Hundert- bis Tausendfache unterscheiden.

¹⁾ O. Warburg u. Negelein, diese Zeitschr. **113**, 257. 1921.

²⁾ Experimenteller Teil dieser Abhandlung.

Tabelle V.
Hemmung der Cystinoxydation.

Substanz	c
Dimethylharnstoff (asym.)	0,03
Diäthylharnstoff (sym.)	0,002
Phenylharnstoff	0,0002
Acetamid	0,2
Valeramid	0,003
Aceton	0,07
Methylphenylketon	< 0,0004
Äthylalkohol	0,32
Amylalkohol	0,0015
Acetonitril	0,2
Valeronitril	0,0021

Wirkung der Narkotica¹⁾.

Bei konstantem Sauerstoffdruck ist die Geschwindigkeit, mit der eine Aminosäure an der Kohleoberfläche oxydiert wird, ihrer in jedem Augenblick adsorbierten Menge proportional. Entfernen wir also bei einer gegebenen Anordnung die Hälfte der Aminosäure von der Kohle, so sinkt die Oxydationsgeschwindigkeit auf die Hälfte.

Adsorptionsmessungen zeigen, daß aus einem Gemisch von Aminosäure und Narkoticum weniger Aminosäure adsorbiert wird, als aus einer reinen Aminosäurelösung. Lassen wir Cystin zunächst aus einer reinen Aminosäurelösung adsorbieren und fügen nunmehr ein Narkoticum hinzu, so verdrängt²⁾ das Narkoticum die Aminosäure von der Kohleoberfläche.

Narkoticumkonzentrationen, die nicht merklich verdrängen, bewirken keine merkliche Hemmung der Oxydation. Bestimmt man für verschiedene Narkotica einerseits den Grad der Adsorptionsverdrängung, andererseits den Grad der Oxydationshemmung, so findet man eine sehr weitgehende Übereinstimmung beider Größen. Es ist daraus zu schließen, daß die Verdrängung

¹⁾ Experimenteller Teil dieser Abhandlung.

²⁾ Die Erscheinung der Adsorptionsverdrängung in wässrigen Lösungen wurde zuerst beobachtet von Freundlich und Masius für das Stoffpaar Oxalsäure-Bernsteinsäure (Masius, Diss. Leipzig 1908) und von Michaelis und Rona für das Stoffpaar Aceton-Essigsäure (diese Zeitschr. 15, 196. 1908). Vgl. auch Freundlich und Masius, Gedenkbuch für van Bemmelen S. 88. 1910.

der einzige Grund der Oxydationshemmung ist, indem der nichtverdrängte Rest der Aminosäure, unbeeinflusst durch die Gegenwart des Narkoticums, verbrennt.

Mit der Verdrängung der Aminosäure kommt ihre Oxydation, wie ohne weiteres anschaulich ist, zum Stillstand. Das gleiche gilt für die Sauerstoffaufnahme nur dann, wenn der verdrängende Stoff nicht seinerseits an der Kohleoberfläche oxydiert wird. Da die meisten Narkotica auch im Zustande der Adsorption gegenüber Sauerstoff relativ beständig sind, so bedingt die Verdrängung einer Aminosäure in der Regel auch einen Stillstand der Sauerstoffaufnahme.

Theorie der Narkoticawirkung.

Gibt man zu gleichen Mengen Kohle und Aminosäurelösung soviel verschiedener Narkotica, daß immer dieselbe Menge Aminosäure verdrängt wird und mißt im Zustande gleicher Verdrängung einerseits die Narkoticumkonzentrationen c in der Lösung, andererseits die von der Gewichtseinheit Kohle adsorbierten Narkoticummengen x , so findet man die Unterschiede der x -Werte, im Vergleich zu den Unterschieden der c -Werte, relativ klein¹⁾. Beispielsweise hat 1 g Kohle, wenn 0,03 Millimole Cystin verdrängt sind, 0,6—1,5 Millimole der verschiedenen Narkotica adsorbiert, bei um das Tausendfache verschiedenen Narkoticumkonzentrationen in der Lösung (Tabelle VI, Spalte 2 u. 3).

Tabelle VI.

Spalte 1	Spalte 2	Spalte 3	Spalte 4
Substanz	c (Mole pro Liter Lösung)	x (Millimole pro Gramm Kohle)	$x \cdot (V_m)^{\frac{1}{2}}$
Dimethylharnstoff (asym.) . . .	0,03	1,1	9,0
Diäthylharnstoff (sym.) . . .	0,002	0,68	6,9
Phenylharnstoff	0,0002	0,76	8,7
Acetamid	0,17	1,2	7,3
Valeramid	0,003	0,62	6,9
Aceton	0,073	1,33	8,3
Methylphenylketon	< 0,0004	0,73	8,0
Amylalkohol	0,0015	0,87	7,9
Acetonitril	0,2	1,5	7,7

¹⁾ Experimenteller Teil dieser Abhandlung.

Wir machen nunmehr die folgenden, in jeder Hinsicht einfachsten Annahmen: Der verdrängende Stoff soll die Kohleoberfläche in einer einzigen Lage von Molekülen besetzen, die so bewirkte Verkleinerung der freien Oberfläche die alleinige Ursache der Verdrängung sein. Dann ist die Wirkung unabhängig von der chemischen Natur des adsorbierten Narkotics und bestimmt durch die Zahl x der adsorbierten Moleküle einerseits, der von jedem Molekül beanspruchten Fläche F andererseits. Die Bedingung für gleiche Wirkung lautet also

$$x \cdot F = K,$$

x , die Zahl der adsorbierten Moleküle, kann gemessen werden. F , die von einem Molekül beanspruchte Fläche, ist gleich der Wand des Würfels, den das kugelförmig gedachte Molekül erfüllt. Bezeichnen wir mit V_m das aus den Refraktionsäquivalenten berechnete Molekularvolumen¹⁾, so ist F proportional $(V_m)^{\frac{1}{3}}$ oder die Bedingung für gleiche Wirkung

$$x \cdot (V_m)^{\frac{1}{3}} = K. \quad (1)$$

Die vierte Spalte der Tabelle VI zeigt, daß diese Bedingung mit großer Annäherung erfüllt ist.

Nach Freundlich²⁾ besteht zwischen der adsorbierten Menge x eines Stoffes und seiner Konzentration c in der Lösung die Beziehung

$$x = k c^{\frac{1}{n}}, \quad (2)$$

worin k und n Konstanten bedeuten. Setzen wir den Wert für x aus (2) in (1) ein, so ergibt sich die Beziehung

$$k c^{\frac{1}{n}} \cdot (V_m)^{\frac{1}{3}} = K. \quad (3)$$

Aus dieser Gleichung kann die Wirkungsstärke c für ein beliebiges Narkoticum berechnet werden, wenn K , die Adsorptionskonstanten und die Molekularvolumina gegeben sind.

¹⁾ Ist n der Brechungsexponent einer Substanz, so ist nach der Theorie von Lorenz-Lorentz $\frac{n^2-1}{n^2+2}$ der Bruchteil des von den (kugelförmig gedachten) Molekülen tatsächlich eingenommenen Raums. $\frac{n^2-1}{n^2+2} \cdot \frac{\text{Molekulargewicht}}{\text{spez. Gewicht}}$, die „Molekularrefraktion“, ist das Volumen V_m , das die Moleküle eines Grammoleküls tatsächlich erfüllen.

²⁾ H. Freundlich, Zeitschr. f. physikal. Chemie 57, 385. 1907.

Bemerkungen zu dem vorhergehenden Abschnitt.

1. Bedeckt die Aminosäure nur einen kleinen Bruchteil der Kohleoberfläche, so können in Gleichung (3) die für reine wässrige Narkoticalösungen gefundenen Adsorptionskonstanten k und n eingesetzt werden. Doch ist dies unzulässig, wenn die Aminosäure einen erheblichen Bruchteil der Kohleoberfläche bedeckt.

2. Die Frage, wie Grenzflächenspannung und Wirkungsstärke zusammenhängen, ergibt sich aus folgender Überlegung: Wir schreiben nach Freundlich¹⁾

$$x = - \frac{c}{RT} \frac{d\sigma}{dc}. \quad (4)$$

Hier bedeutet x die Zahl der pro Oberflächeneinheit adsorbierten Moleküle c die Konzentration in der Lösung, σ die Grenzflächenspannung der Lösung bei der Konzentration c .

Ist ferner σ_w die Grenzflächenspannung reinen Wassers gegen das Adsorbens, so gilt für die Erniedrigung

$$\sigma_w - \sigma = k c^{\frac{1}{n}} \quad (5)$$

und nach (4) und (5)

$$x = \frac{1}{nRT} k c^{\frac{1}{n}} \quad (6)$$

Betrachten wir isocapillare Lösungen zweier Narkotica I und II, d. h. Lösungen, für die

$$\sigma_w - \sigma_I = \sigma_w - \sigma_{II}. \quad (7)$$

so ergibt sich

$$\frac{x_I}{x_{II}} = \frac{n_{II}}{n_I}. \quad (8)$$

Sollen diese isocapillaren Lösungen gleich wirken, so muß sein

$$n_I (V_m^{II})^{\frac{1}{3}} = n_{II} (V_m^I)^{\frac{1}{3}}. \quad (9)$$

Isocapillare Lösungen werden also nur ausnahmsweise gleich wirken, angenähert dann, wenn man ähnliche Stoffe von nicht allzu verschiedenem Molekularvolumen vergleicht, wie benachbarte Glieder einer homologen Reihe.

3. Während in unserem Fall die Grenzflächenspannung nur insofern von Bedeutung ist, als sie mit der Adsorption zusammenhängt, mag in anderen Fällen die Beziehung eine direktere sein, beispielsweise im Fall der Cytolyse durch Narkotica. Unsere Theorie der Narkoticiawirkung bezieht sich lediglich auf die Beeinflussung chemischer Reaktionen in Zellen, sie zu verallgemeinern, liegt kein Grund vor.

4. Von Narkotica, die an der Kohle mit merklicher Geschwindigkeit verbrennen, seien besonders Thymol und Chloroform genannt. Mit diesen Stoffen kann Cystin zwar verdrängt, die Sauerstoffaufnahme jedoch nicht vermindert werden.

¹⁾ H. Freundlich, Capillarchemie, S. 75 ff. Leipzig 1909.

Wirkung der Blausäure¹⁾.

Auch durch Blausäure können wir adsorbierte Stoffe von der Kohleoberfläche verdrängen. Da jedoch Molekularvolumen und Adsorptionskonstante der Blausäure relativ klein sind, ist zur Erzielung eines bestimmten Verdrängungsgrades eine höhere Konzentration von Blausäure erforderlich als von irgendeinem unserer Narkotica. Um beispielsweise 0,03 Millimole Cystin von 1 g Kohle zu verdrängen, muß die Blausäurekonzentration in der Lösung etwa 1 Mol pro Liter betragen, gegenüber 0,17 Molen unserer schwächsten Narkotica, Acetamid und Acetonitril. Unterhalb einer Blausäurekonzentration von $\frac{1}{10}$ Molen pro Liter ist keine Verdrängung mehr nachweisbar, unterhalb dieser Konzentration also sollte eine Hemmung der Cystinoxydation nicht beobachtet werden, wenn Blausäure die Sauerstoffaufnahme aus demselben Grunde hemmt, wie die Narkotica.

Doch tritt eine Hemmung der Cystinoxydation schon bei einer Blausäurekonzentration von etwa 10^{-4} Molen pro Liter auf, die Hemmung ist fast vollständig bei einer Blausäurekonzentration von 10^{-3} Molen pro Liter.

Mißt man die adsorbierten Blausäuremengen einerseits, wenn die Oxydationshemmung 60% beträgt, andererseits, wenn der Verdrängungsgrad 60% beträgt, so ergibt sich folgendes:

Tabelle VI.

Blausäurekonzentration in der Lösung Mole/Liter	Pro Gramm Kohle adsorbiert		Verdrängungsgrad %	Oxydationshemmung %
	Cystin Millimole	Blausäure Millimole		
—	0,05	—	—	—
4 · 10	0,05	0,01	—	60
1	0,02	3	60	vollständig

Bringen wir 3 Millimole Blausäure an die Kohle, so ist ein erheblicher Bruchteil der Oberfläche mit Blausäure bedeckt, ein Teil des Cystins infolgedessen verdrängt. Bringen wir 0,01 Millimole Blausäure an die Kohle, so ist ein verschwindend kleiner Bruchteil der Kohle mit Blausäure bedeckt, infolgedessen praktisch kein Cystin verdrängt; gleichwohl ist die Oxydation des Cystins erheblich verlangsamt.

¹⁾ Experimenteller Teil dieser Abhandlung.

Die Adsorption an sich genügt also nicht, um Cystin gegenüber Sauerstoff reaktionsfähig zu machen, sondern es ist hier noch ein zweiter Faktor im Spiel, dessen Betätigung durch Blausäure ausgeschaltet wird. Die Annahme liegt nahe, daß es sich um einen Stoff handelt, der in kleinen, den wirksamen Blausäuremengen entsprechenden Mengen in der Blutkohle vorkommt.

Schwermetallgehalt der Blutkohle¹⁾.

Glüht man Mercksche Blutkohle an der Luft, so bleibt eine gelblichrosa gefärbte Asche zurück, die Eisen und Kupfer enthält. Die Mengen an beiden Schwermetallen wurden für unser Versuchspräparat bestimmt und zu etwa 5 Milliontel Molen Fe und 3 Milliontel Molen Cu pro Gramm Kohle gefunden. Eine Hemmung der Cystinoxydation trat auf (vgl. den vorhergehenden Abschnitt), wenn pro Gramm Kohle 10 Milliontel Mole Blausäure gebunden waren, also der Größenordnung nach eine den genannten Schwermetallen entsprechende Menge.

Adsorption und Sauerstoffübertragung durch Benzoesäurekohle.

Nach Glaessner und Suida²⁾ ist die Mercksche Blutkohle ein kompliziertes Gemisch verschiedener Stoffe, indem beispielsweise bei der Analyse folgende Werte erhalten wurden:

	C	H	N	O (S)	Asche
%	70	1,7	7,2	14,7	6,4

Stellt man Kohle aus chemisch reinen kristallierten Stoffen dar³⁾ — besonders geeignet ist Benzoesäure — so erhält man erheblich einfacher zusammengesetzte Präparate. Beispielsweise ergab die Analyse einer aus Benzoesäure gewonnenen Kohle:

	C	H	N	O	Asche
%	96	0,6	—	3,4	nicht wägbare

Das Präparat enthielt 0,27 Milliontel Mole Fe, also etwa 20 mal so wenig wie Blutkohle. Es gelang uns nicht, eine völlig eisenfreie Kohle darzustellen.

¹⁾ Pflügers Archiv 155, 558 (1914) und experimenteller Teil dieser Abhandlung.

²⁾ Annalen d. Chemie u. Pharmazie 357, 95. 1907.

³⁾ Experimenteller Teil dieser Abhandlung.

Das Adsorptionsvermögen der Benzoesäurekohle¹⁾ entspricht gegenüber vielen Stoffen dem der Blutkohle. Aceton und Bernsteinsäure werden etwas stärker, Amylalkohol und Cystin etwas schwächer adsorbiert als von Blutkohle. Dagegen wird Methylenblau von der Benzoesäurekohle in relativ verschwindendem Maße absorbiert.

An Benzoesäurekohle adsorbiertes Cystin wird etwa 3 mal so langsam oxydiert als an Blutkohle adsorbiertes Cystin. Tränkt man jedoch die Benzoesäurekohle mit Metallsalzen und glüht, so überträgt sie bei unverändertem Adsorptionsvermögen Sauerstoff mit größerer Geschwindigkeit auf adsorbiertes Cystin. Am wirksamsten erwies sich in dieser Hinsicht Eisensalz, indem nach Behandlung der Kohle mit diesem Metall die Geschwindigkeit der Cystinoxidation auf das 2–3fache stieg²⁾.

Doch stehen die Oxydationsgeschwindigkeiten keineswegs im Verhältnis der Eisenmengen. Spielt also das Metall bei der Oxydation eine Rolle, so kommt es nicht nur auf seine Menge an, sondern auch auf die Form, in der es vorliegt.

Gibt man zu einer wässrigen Kohlesuspension Schwermetallsalze, so werden die Metallionen fast vollständig aus der Lösung herausgenommen. Doch gelingt es nie, auf diese Weise die sauerstoffübertragende Fähigkeit eines Kohlepräparats zu steigern; entweder man findet keine Beeinflussung der Sauerstoffaufnahme oder eine Hemmung. An Kohle adsorbiertes Metallion vermag also nicht als Sauerstoffüberträger zu wirken, sondern — damit das Metall diese Eigenschaft erlangt — muß es durch Glühen mit Kohle zunächst in einen besonderen Zustand übergeführt werden.

Theorie der Blausäurewirkung.

Wir stellen uns die Kohleoberfläche als ein Mosaik schwermetallhaltiger und schwermetallfreier Bezirke vor, in dem die metallfreien Bezirke bei weitem überwiegen. In welcher Form

¹⁾ Experimenteller Teil dieser Abhandlung.

²⁾ Nach einer Beobachtung von L. Wöhler (*Zeitschr. f. angew. Chemie* **31**, 192. 1918) gibt es Holzkohlen, die mit flüssigem Sauerstoff explodieren. Stark adsorbierende Kohlen, die diese Eigenschaft nicht zeigten, konnten explosiv gemacht werden, wenn ihr Eisengehalt durch Tränkung mit Eisensalz auf über 3% erhöht wurde.

das Metall hier vorliegt, bleibt unbestimmt. Sowohl die metallhaltigen als auch die metallfreien Bezirke adsorbieren gelöste Stoffe aus wässrigen Lösungen. Narkotica, Aminosäuren und viele andere Stoffe werden von beiden Bezirken in gleichem Maße gebunden, Blausäure — dank ihrer Affinität zu Schwermetallen — vorwiegend von den metallhaltigen Bezirken. Schwerverbrennliche Stoffe, wie Aminosäuren, verbrennen nur an den metallhaltigen Bezirken, während sie an den metallfreien Bezirken gegenüber Sauerstoff beständig sind.

Bringen wir an eine cystinbeladene Kohle Blausäure, so wird das Cystin von den metallhaltigen Bezirken verdrängt und damit seine Oxydation gehemmt. Um diesen Zustand herbeizuführen, genügt sehr wenig Blausäure, weil die metallhaltigen Bezirke nur einen sehr kleinen Bruchteil der Gesamtoberfläche ausmachen. Aus dem gleichen Grunde führt die Verdrängung von den metallhaltigen Bezirken zu keiner merklichen Abnahme der adsorbierten Cystinmenge. Bei steigender Blausäurekonzentration werden auch metallfreie Bezirke der Oberfläche mit Blausäure bedeckt; erst wenn der mit Blausäure bedeckte Bruchteil der Oberfläche gegenüber der Gesamtoberfläche in Betracht kommt, nimmt die adsorbierte Cystinmenge merklich ab und es erscheint nunmehr ein Teil des vorher adsorbierten Cystins in der Lösung.

Nach dieser Theorie beruht die besondere Wirkung der Blausäure auf einer elektiven Verdrängung des Cystins von den Oxydationsorten, im Gegensatz zur Wirkung der Narkotica, die das Cystin von allen Bezirken der Oberfläche in gleichem Maße verdrängen.

Bemerkungen zu den vorhergehenden Abschnitten.

1. Wässrige Lösungen von Aminosäuren werden durch Zusatz von Eisensalz gegenüber Luftsauerstoff nicht reaktionsfähig. Eisensalz in Lösung beschleunigt im allgemeinen nur die Oxydation an sich unbeständiger Stoffe, wie der Thiophenole, der Dioxymaleinsäure.

Nach dem vorhergehenden wird Eisensalz durch Adsorption an Kohle nicht geeigneter zur Sauerstoffübertragung, sondern gewinnt seine besonderen Eigenschaften erst dann, wenn es selbst ein Bestandteil des Adsorbens geworden ist. In welcher Form es sich hier betätigt, ist eine wichtige, jedoch noch ungeklärte Frage.

2. Entstände an der Kohle aus Blausäure und Eisen eine feste chemische Verbindung, etwa Ferrocyankalium, so würde Blausäure auf zweierlei Art von Kohle gebunden, nämlich als Ferrocyankalium und durch Adsorption.

In diesem Fall müßten bei niedrigen Blausäurekonzentrationen Abweichungen von dem Adsorptionsgesetz auftreten, die jedoch nicht beobachtet werden¹⁾. Wir fassen deshalb die Bindung der Blausäure an alle, auch an die schwermetallhaltigen Bezirke der Kohleoberfläche, als Adsorption auf.

Auch in lebenden Zellen dürften schwerlich feste Verbindungen vom Typus des Ferrocyankaliums entstehen, da sich die Blausäure schnell und vollständig aus Zellen auswaschen läßt, da ferner bei der sauren Reaktion vieler Zellen die Bedingungen zur Bildung von Ferrocyankalium nicht gegeben sind.

3. Im allgemeinen tritt eine Hemmung der Zellatmung bei Blausäurekonzentrationen von $\frac{1}{10000}$ Molen pro Liter auf, so in Bakterien, tierischen Eiern, Spermatozoen, Blutzellen, Leberzellen, Ganglienzellen. Doch kennen wir einen Organismus — die Grünalge *Chlorella vulgaris* —, dessen Atmung erst durch eine $\frac{2}{10}$ -Blausäurelösung merklich gehemmt wird. Möglicherweise ist hier die Verwandtschaft zwischen Blausäure und Eisen nicht größer, als die Verwandtschaft zwischen dem verbrennenden Stoff und Eisen, so daß in der Konkurrenz um die Oxydationsorte Blausäure erst bei hohen Konzentrationen im Vorteil ist.

4. Nach einer Beobachtung von Mathews und Walker (*Journ. of Biol. Chem.* 6, 29. 1909) wird die Oxydation von Cystein zu Cystin in wässriger Lösung durch kleine Mengen Cyanid gehemmt; sie wird, wie seit Baumann bekannt ist, durch Eisensalz erheblich beschleunigt.

Bei der Darstellung des Cysteins (Reduktion von Cystin mit Zinn und Salzsäure) ist eine Verunreinigung mit Eisen schwer zu vermeiden; es ist uns nicht gelungen, eisenfreie Cysteinpräparate zu gewinnen. Wir nehmen deshalb zunächst an, daß auch in diesem Fall die Blausäurewirkung auf der Bindung des Eisens oder eines anderen Schwermetalls beruht.

III. Ergebnisse.

Wir stellen schließlich die wesentlichsten Ergebnisse der Zellversuche und der Modellversuche zusammen:

Zellversuche:

1. Die Atmung ist an die festen Zellbestandteile gebunden.
2. Wie Kohle adsorbieren die festen Zellbestandteile gelöste Stoffe aus wässrigen Lösungen.
3. Narkotica beeinflussen die Atmung durch physikalische Zustandsänderung der Oberflächen.
4. Die Atmung ist eine Eisenkatalyse.
5. Blausäure hemmt die Atmung, indem sie das Eisen in eine zur Sauerstoffübertragung unfähige Form überführt.

¹⁾ Experimenteller Teil dieser Abhandlung.

Modellversuche:

1. Brennstoffe der Zelle, Aminosäuren, werden durch Adsorption an Blutkohle in gleichem Maße gegenüber Sauerstoff unbeständig, wie in lebenden Zellen, und verbrennen an der Kohleoberfläche zu denselben Endprodukten wie in lebenden Zellen.

2. Die Verbrennung der Aminosäuren an Kohle wird durch Narkotica in gleicher Weise wie die Zellatmung beeinflusst, durch physikalische Zustandsänderung der Oberflächen.

Diese Zustandsänderung besteht in einer Bedeckung und dadurch bedingten Verkleinerung der wirksamen Oberflächen.

3. Blausäure hemmt die Verbrennung an Kohle durch Bindung eines in kleiner Menge vorhandenen Bestandteils, wahrscheinlich des Eisens der Blutkohle.

Theorie der Zellatmung.

Es sind 2 Mittel, deren sich die Zelle bedient, um die Reaktionswiderstände an den Verbrennungsorten zu verkleinern: der Adsorption und der Schwermetalle.

Die Zellatmung ist ein capillarchemischer Vorgang, der an den eisenhaltigen Oberflächen der festen Zellbestandteile abläuft. Durch Adsorption an diesen Oberflächen werden die trägen organischen Verbindungen aus dem gleichen Grunde gegenüber Sauerstoff reaktionsfähig, wie die Aminosäuren an der Oberfläche der Blutkohle. Die Zellatmung ist damit zwar nicht physikalisch erklärt, jedoch zurückgeführt auf Phänomene der unbelebten Welt.

Narkotica hemmen die Zellatmung, indem sie — selbst an den Oberflächen nicht oxydabel — die Oberflächen bedecken und dadurch die Brennstoffe verdrängen. Gleiche Wirkung durch verschiedene Narkotica tritt immer dann ein, wenn der gleiche Bruchteil der wirksamen Oberflächen mit Narkoticum bedeckt ist. Auch für die Zellatmung gilt die Bedingung gleicher Wirkung:

Zahl der adsorbierten Moleküle \times der von einem Molekül beanspruchten Fläche = K ,

eine Beziehung, aus der die Wirkungsstärken für beliebige Narkotica berechnet werden können, wenn K , die Adsorptionskonstanten und die Molekularvolumina gegeben sind.

Bemerkung zu vorstehender Theorie.

Verbrennt eine Aminosäure an der Kohleoberfläche, so geht die gesamte freie Energie der Verbrennung verloren. Verbrennt eine Aminosäure an den Oberflächen der lebenden Zelle, so erscheint die freie Energie der Verbrennung zum Teil als Arbeit, beispielsweise als mechanische Arbeit. In bezug auf den Energieumsatz unterscheidet sich also das Kohlemodell von seinem Vorbild.

Doch ist anzunehmen, daß die Auffassung der Atmung als Oberflächenreaktion den Weg zeigen wird, auf dem die Energieumwandlung in der lebenden Zelle erfolgt. Bringt man einen Quecksilbertropfen in Chromsäurelösung¹⁾, so ist die Oxydation bei geeigneter Versuchsanordnung mit einer lobhaften Bewegung des Metalls verbunden; hier wird die freie Energie der Oxydation zum Teil als mechanische Arbeit gewonnen, indem die Kräfte der Oberflächenspannung Arbeit leisten. Vermutlich verwandelt die lebende Zelle auf ähnliche Weise chemische Energie der Atmung in Arbeit.

IV. Experimenteller Teil.

Versuche an dem Atmungsmodell Kohle-Aminosäure von dem Verfasser und E. Negelein).

1. Adsorptionsverdrängung und Oxydationshemmung durch Narkotica.

Als Adsorbens wurde Mercksche Blutkohle verwendet, für alle Versuche dasselbe Präparat, von dem eine größere Menge beschafft worden war; als Aminosäure aus Haaren hergestelltes Cystin, dessen spezifische Drehung — für die D-Linie in Normal-salzsäure — -216° betrug.

Zu je 100 ccm einer 0,036 proz. Cystinlösung wurden 2 g Kohle und wechselnde Mengen verschiedener Narkotica gegeben. In einem Teil der so hergestellten Kohlesuspensionen wurde die Oxydationsgeschwindigkeit der Aminosäure gemessen, der Rest diente zur Adsorptionsmessung.

Messung der Adsorption. Die Cystinlösungen wurden durch Kochen von 36 mg feingepulverter Aminosäure mit 100 ccm Wasser bereitet, in einem Thermostaten auf 40° abgekühlt, bei der gleichen Temperatur einige Minuten mit Kohle geschüttelt und dann filtriert. Nach Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumen 11fach n-Salzsäure wurde α_D für eine 2 dm lange Schicht (Fehler $0,005^\circ$) ge-

¹⁾ Paalzw, Poggendorffs Ann. 104, 418 (1858); Bernstein, Arch. f. d. ges. Physiol. 80, 628 (1900).

messen und der Prozentgehalt P der geprüften Lösung nach der Formel

$$P = \frac{\alpha_D \cdot 100}{[\alpha]_D \cdot 2} 1,1$$

berechnet.

Aus dem Prozentgehalt P_0 vor Zugabe der Kohle und dem Prozentgehalt P_1 in dem Kohlefiltrat ergaben sich die pro Gramm Kohle absorbierten Millimole Cystin:

$$x = \frac{(P_0 - P_1) 1000}{2 \cdot 240},$$

worin 240 das Molekulargewicht des Cystins bedeutet. Mit x im Gleichgewicht standen:

$$C = \frac{10 P_1}{240} \text{ Mole Cystin pro Liter Lösung.}$$

Zur Messung der Oxydationsgeschwindigkeit wurden 10 ccm Kohlesuspension in ein Schüttelgefäß pipettiert, mit Sauerstoff von 96 Vol.-% gesättigt und bei 40° die an Barcroft-schen Manometern auftretenden Druckänderungen in oft beschriebener Weise beobachtet. Der Einsatz des Schüttelgefäßes enthielt zur Adsorption der Kohlensäure 1 ccm 5proz. Kalilauge, das Gesamtvolumen der eingefüllten Flüssigkeit betrug also 11 ccm. Der Gasraum bis zum Meniscus der Sperrflüssigkeit war 19 ccm. Aus den gegebenen Bedingungen berechnet sich die Gefäßkonstante¹⁾ zu 1,7; 1 mm Druckabnahme zeigte einen Sauerstoffverbrauch von 1,7 cmm an.

10 ccm der Kohlesuspension enthielten 200 mg Kohle, 3,6 mg Cystin und wechselnde Mengen Narkoticum. In den narkoticum-freien Suspensionen waren nach 30 Minuten etwa 200 cmm, nach 6 Stunden, wenn die Oxydation beendet war, etwa 1200 cmm Sauerstoff verbraucht. Vernachlässigte man den Cystinverbrauch in der Anfangsperiode von 30 Minuten, so konnte die nach 30 Minuten beobachtete Sauerstoffaufnahme als Maß der Oxydationsgeschwindigkeit bei konstanter Cystinmenge betrachtet werden.

Das Ergebnis je eines Versuchs mit Aceton, Dimethylharnstoff und Amylalkohol ist in Tabelle VI zusammengestellt. Unter Spalte 1 sind die Gesamtmengen an Narkoticum angegeben, die 100 ccm der Kohlesuspension zugesetzt wurden. Nach den in Spalte 2 wiedergegebenen Drehungsmessungen drängen die

¹⁾ O. Warburg und E. Negelein, diese Zeitschr. 113, 257 (1921).

Tabelle VI.

Verdrängung und Oxydationshemmung durch Narcotica.

Versuch	Spalte 1			Spalte 2		Spalte 3	Spalte 4	
	System			Adsorption des Cystins		10 cem der Kohlesuspension verbraucht in 80 Min. Sauerstoff cem	Verdrängungsgrad in %	Hemmung der Sauerstoffaufnahme in %
	0,036proz. Cystinlösung	Kohle	Narkotikum	Drehung der Lösungen (Kohlefiltrate) im 2-dm-Bohr	Pro Gramm Kohle adsorbierte Cystinmenge Millimole			
	cem	g	g					
1	100	—	—	-0,145°	—	—	58	65
	100	2	—	-0,055°	0,05	205		
	100	2	0,58 g Aceton	-0,105°	0,021	72		
2	100	—	—	-0,140°	—	—	55	66
	100	2	—	-0,050°	0,049	221		
	100	2	0,45 g Dimethylharnstoff (asym.)	-0,100°	0,022	75		
3	100	—	—	-0,140°	—	—	60	66
	100	2	—	-0,044°	0,052	245		
	100	2	0,17 g n. Amylalkohol	-0,100°	0,021	82		

zugesetzten Narcotica mehr als die Hälfte des adsorbierten Cystins in die Lösung zurück, nach Spalte 3 hemmen sie die Sauerstoffaufnahme um mehr als die Hälfte. In der letzten Spalte sind Verdrängungsgrad und Oxydationshemmung einander gegenübergestellt. Die Zahlen zeigen, daß beide Werte nahe übereinstimmen, doch ist die Oxydationshemmung etwas größer als der Verdrängungsgrad. Dieser Unterschied wurde regelmäßig gefunden und beruht nicht auf Versuchsfehlern. Zur Erklärung nehmen wir an, daß die Narcotica nicht nur die Aminosäure, sondern — wenn auch in geringerem Maße — den adsorbierten Sauerstoff von der Kohleoberfläche verdrängen.

2. Adsorption der Narcotica.

Bringen wir in 100 cem einer 0,036proz. Cystinlösung 2 g Kohle und bestimmen die Verteilung des Cystins, ehe merkliche Mengen oxydiert sind, so finden wir nach den Drehungswinkeln der Tabelle VI:

Konzentration in der Lösung (Mole/Liter)	Adsorbierte Menge (Millimole/Gramm)
0,54 · 10 ⁻³	0,05.

Fügen wir so viel Narkoticum hinzu, daß die Oxydationsgeschwindigkeit um etwa 66% sinkt, so ist nach den Drehungswinkeln der Tabelle VI die Verteilung des Cystins:

Konzentration in der Lösung (Mole/Liter)	Adsorbierte Menge (Millimole/Gramm)
$1,1 \cdot 10^{-2}$	0,021.

Von 1 g Kohle sind mithin 0,029 Millimole Cystin verdrängt.

Um diesen Verdrängungsgrad zu erzielen, müssen die in Tabelle VII verzeichneten Mengen verschiedener Narkotica zugesetzt werden. Geprüft wurden insbesondere 4 homologe Reihen, Amide, Ketone, Nitrile und Harnstoffe. Je ein Glied hoher und

Tabelle VII.
Oxydationshemmung durch Narkotica.

Narkoticum	100 ccm einer 0,066 proz. Cystinlösung + 2 g Kohle		10 ccm der Kohlesuspension verbrauchen in 80 Min. Sauerstoff	Hemmung der Sauerstoff- aufnahme in %
	mg	Millimole	ccm	
Acetamid	—	—	195	62
	1140	19,4	70	
Valeramid (iso)	—	—	213	65
	156	1,54	73	
Aceton	—	—	205	65
	580	10	72	
Methylphenylketon	—	—	205	65
	174	1,45	71	
Acetonitril	—	—	207	65
	820	20	71	
Valeronitril	—	—	217	65
	149	1,8	75	
Dimethylharnstoff (asym.)	—	—	221	66
	450	5,12	75	
Diäthylharnstoff (sym.)	—	—	221	64
	180	1,56	80	
Phenylharnstoff	—	—	202	65
	208	1,53	70	

niedriger Adsorptionskonstante ist in der Tabelle nebeneinander gestellt. Man sieht, daß von dem Glied niedriger Adsorptionskonstante immer eine erheblich größere Menge zugesetzt werden muß, als von dem Glied hoher Adsorptionskonstante.

Da kleine Cystinmengen die Adsorption der Narkotica nicht beeinflussen, wurde die Verteilung der Narkotica in cystinfreien

Kohlesuspensionen gemessen und zwar: für die Amide und Harnstoffe durch Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl, für Aceton jodometrisch nach Messinger, für Acetonitril kryoskopisch, für Methylphenylketon und Valeronitril durch Wägung der von einem Traubeschen Stalagmometer abfallenden Tropfen. Die adsorbierten Mengen — auf die es vor allem ankam — konnten so (vgl. Tabelle VIII) auf 5–10% genau bestimmt werden; die Konzentrationen in der Lösung im allgemeinen mit derselben Genauigkeit, für Valeronitril auf etwa 20%, während sich für Methylphenylketon nur eine obere Grenze der Konzentration ergab.

Was die Molekularrefraktionen anbetrifft (Tabelle VIII), so wurden sie aus den von Eisenlohr¹⁾ und Brühl für die D-Linie angegebenen Refraktionsäquivalenten berechnet unter Benutzung folgender Werte:

für Kohlenstoff	2,4
„ Wasserstoff	1,1
„ Carbonylsauerstoff	2,2
„ prim. aliph. Amidstickstoff	2,3
„ sek. aliph. Amidstickstoff	2,5
„ tertiären aliph. Amidstickstoff	2,8
„ sek. Amidstickstoff mit einem Phenylrest	3,6
„ aliph. Nitrilstickstoff	3,1
„ doppelte Bindung	1,7

3. Adsorptionsverdrängung und Oxydationshemmung durch Blausäure.

Verdrängung des Cystins. Blausäure, deren Gehalt titrimetrisch bestimmt war, wurde zu cystinhaltigen Kohlesuspensionen zugesetzt; nach kurzem Schütteln wurde filtriert und die adsorbierte Cystinmenge polarimetrisch ermittelt. Hierbei waren die Mengenverhältnisse an Cystinlösung, Wasser und Kohle etwa dieselben, wie bei den Narkoticaversuchen, nämlich 100 ccm Wasser, 34 mg Cystin und 200 mg Kohle.

In Tabelle IX ist eine Versuchsreihe mit wechselnden Blausäuremengen zusammengestellt. Ein Zusatz von 254 mg = 9,4 Millimolen Blausäure bewirkt eine eben meßbare Verdrängung, ein Zusatz von 2540 mg = 94 Millimolen Blausäure bewirkt eine Adsorptionsverdrängung von etwa 50%. Blausäure ist also weniger wirksam als unser schwächstes Narkoticum, Acetamid.

¹⁾ Vgl. Eisenlohr in Landolt-Börnstein; Berlin 1912, S. 1039 u. 1040.

Tabelle IX.
Adsorptionsverdrängung durch Blausäure.

0,004 Proz. Cystin- lösung ccm	System		Drehung der Cystinlösung und der Kohle- filtrate im 2-dm-Bohr α _D	Verteilung des Cystins		Ver- drän- ungs- grad %
	Kohle g	Blausäure		z Prog Kohle- adsorbierte Millimole- Cystin	C Mole Cystin pro Liter- lösung	
100	—	—	-0,135°	—	—	—
100	2	—	-0,045°	0,0475	0,48 · 10 ⁻³	—
100	2	2540 mg = 94 Millimole	-0,087°	0,0255	0,93 · 10 ⁻³	46
100	2	1270 mg = 47 Millimole	-0,065°	0,0370	0,69 · 10 ⁻³	22
100	2	635 mg = 23,5 Millimole	-0,058°	0,0408	0,62 · 10 ⁻³	14
100	2	254 mg = 9,4 Millimole	-0,048°	0,0463	0,51 · 10 ⁻³	3

Oxydationshemmung durch Blausäure. Gibt man zu derselben Mischung von Wasser, Cystin und Kohle 1,5 mg = 0,055 Millimole Blausäure, so wird die Oxydationsgeschwindigkeit des Cystins für die ersten 30 Minuten um etwa 60% gehemmt; im Laufe der Zeit nimmt die Hemmung ab, weil Blausäure selbst

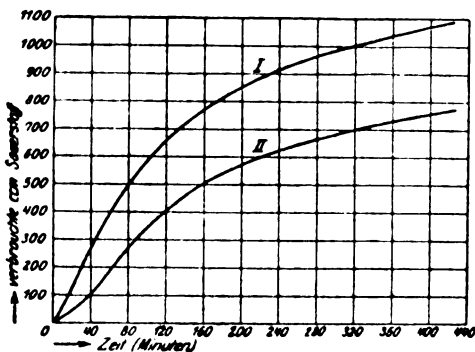


Abb. 1.

an der Kohleoberfläche oxydiert wird. Der Verlauf eines derartigen Versuchs ist in Tabelle X zahlenmäßig, in Abb. 1 graphisch wiedergegeben. Die Gesamtkonzentration an Blausäure war hierbei $0,55 \cdot 10^{-3}$ pro Liter Kohlesuspension und bewirkte eine Oxydationshemmung

von 60%, während nach dem Vorhergehenden die 2000fache Gesamtkonzentration an Blausäure zur Erzielung eines Verdrängungsgrades von 50% nötig ist. Blausäure hemmt also die Cystinoxidation nicht durch Verdrängung.

4. Die Adsorption der Blausäure.

wurde durch Titration der Kohlefiltrate mit Silbernitrat bestimmt, und zwar für konzentriertere Lösungen mit $\frac{n}{10}$ -AgNO₃ nach

Tabelle X.

Oxydationshemmung durch Blausäure.

I. 100 ccm Wasser, 2 g Kohle, 36 mg = 0,15 Millimole Cystin.

II. 100 ccm Wasser, 2 g Kohle, 1,5 mg = 0,055 Millimole Blausäure.

III. 100 ccm Wasser, 2 g Kohle, 36 mg = 0,15 Millimole Cystin, 1,5 mg = 0,055 Millimole Blausäure.

40° Sauerstoffdruck 700 mm Hg.

Zeit Minuten	10 ccm I. Cystin allein	10 ccm II. Blausäure allein	10 ccm III. Cystin- Blausäure	Cystinoxydation nach Abzug der Selbstoxydation der Blausäure
	(a) Ver- braucher Sauerstoff cmm	(b) Ver- braucher Sauerstoff cmm	(c) Ver- braucher Sauerstoff cmm	c-b
10	53	5	23	18
20	125	12	54	42
30	200	16	87	71
49	332	21	162	141
70	448	26	256	230
90	540	32	344	312
110	628	46	432	377
150	750	54	541	487
190	836	61	620	559
230	900	65	678	613
280	967	72	738	666
330	1012	75	783	708
395	1066	81	835	754
∞	1170			

Tabelle XI.

Adsorption der Blausäure.

Versuch	System			Titrationen	Verteilung	
	Wasser + HCN ccm	HCN Milli- mole	Kohle g		C Mole pro Liter- Lösung	s Pro Gramm Kohle ad- sorbierte Millimole
1	100	93	—	5 ccm = 23,3 $\frac{2}{10}$ -AgNO ₃	880 · 10 ⁻³	2,6
			2	5 " = 22,0 $\frac{2}{10}$ -AgNO ₃		
2	100	10	—	20 " = 10,0 $\frac{2}{10}$ -AgNO ₃	89 · 10 ⁻³	0,55
			2	20 " = 8,9 $\frac{2}{10}$ -AgNO ₃		
3	100	0,86	—	100 " = 4,3 $\frac{2}{10}$ -AgNO ₃	7 · 10 ⁻³	0,08
			2	100 " = 3,5 $\frac{2}{100}$ -AgNO ₃		
4	100	0,058	—	100 " = 2,9 $\frac{2}{100}$ -AgNO ₃	0,38 · 10 ⁻³	0,01
			2	100 " = 1,9 $\frac{2}{100}$ -AgNO ₃		

Liebig, für verdünnte Lösungen mit $\frac{n}{100}$ -AgNO₃ nach Deniges¹⁾. Nach der letzteren Methode ist der Umschlag hinreichend scharf, wenn man vor Beginn der Titration zu 100 ccm Blausäurelösung 2 ccm 33proz. Jodkalilösung und 2 ccm 25proz. Ammoniakflüssigkeit zusetzt. Um Verluste durch Verdunsten der Blausäure zu vermeiden, wurden die konzentrierteren Lösungen auf bedeckten Trichtern filtriert.

Das Resultat einer Versuchsreihe ist in Tabelle XI wiedergegeben. Wie man sieht, wird Blausäure, im Vergleich zu den narkotischen Substanzen, nur schwach adsorbiert, etwa so wie die Anfangsglieder unserer homologen Reihen (vgl. Tabelle VIII).

5. Vergleich von Blutkohle und Benzoesäurekohle.

Herstellung der Benzoesäurekohle. 40 g Benzoesäure wurden mit 12 g Kaliumcarbonat gemischt und in einem Porzellantiegel langsam verkohlt. Dann wurde bei bedecktem Tiegel 15 Minuten vor dem Gebläse auf Rotglut erhitzt, nach dem Erkalten fein gepulvert, 2 mal mit eisenfreier Salzsäure heiß extrahiert, mit heißem Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion gewaschen, getrocknet und schließlich 1 Minute im offenen Porzellantiegel geglüht. Ausbeute 3 g.

Um die Waschlösungen möglichst eisenfrei zu halten, geschah die Extraktion in Porzellangefäßen, die Trennung von den Extraktionsflüssigkeiten nicht durch Filtrieren, sondern durch Dekantieren. Die geringen Eisenmengen, die sich trotz dieser Vorsichtsmaßregeln stets in den Präparaten fanden, stammen aus dem Kaliumcarbonat.

Bei der Elementaranalyse wurde erhalten: Aus 0,276 g Kohle kein Stickstoff; aus 0,1589 g Kohle 0,0082 g Wasser und 0,5565 g Kohlensäure. Daraus berechnet sich die Zusammensetzung: 96% C, 0,6% H und 3,4% O.

Zur Bestimmung des Eisens wurden 0,5–1 g Kohle im Porzellantiegel bis zum Verschwinden der Kohle geglüht, mit eisenfreier Salzsäure und einem Körnchen Kaliumchlorat zur Trockne verdampft und mit Salzsäure und Wasser auf 10 ccm gebracht. 1 ccm dieser Lösung²⁾ wurde mit 1 ccm 10proz. Kalium-

¹⁾ Classen, Theorie und Praxis der Maßanalyse, S. 655. Leipzig 1912.

²⁾ Methode von Lachs und Friedenthal, diese Zeitschr. 33, 130. 1911.

rhodanidlösung, 1 ccm 6fach n-Salzsäure und 1 ccm Äther vermischt und die im Äther auftretende Rotfärbung mit einer Serie von Färbungen verglichen, die mittels einer Eisenchloridlösung von bekanntem Gehalt in sonst gleicher Weise erzeugt worden waren. In 1 ccm der Aschenlösung wurden hierbei einige $\frac{1}{1000}$ bis $\frac{1}{100}$ Milligramme Eisen gefunden. Ein blinder Versuch, in dem die gleichen Mengen an Wasser, Salzsäure und Kaliumchlorat im Porzellantiegel eingedampft und dann auf 5 ccm aufgefüllt waren, ergab pro Kubikzentimeter weniger als $\frac{1}{10000}$ mg Eisen.

Die für unsere Blutkohle und 2 Benzoesäurekohlen erhaltenen Werte sind folgende:

	mg Fe	Milliontel Mole Fe
1 g Blutkohle enthält	0,26	4,6
1 „ Benzoesäurekohle enthält	0,01	0,18
1 „ Benzoesäurekohle enthält	0,015	0,27

Zur Bestimmung des Kupfers wurden 10 g Blutkohle im Porzellantiegel verascht, 2 mal mit 10proz. heißer Salzsäure extrahiert und das Filtrat heiß mit Schwefelwasserstoff gesättigt. Der schwarze Niederschlag wurde auf der Zentrifuge mit H_2S -haltiger Salzsäure gewaschen, das Sediment mit einigen Tropfen Salpetersäure eingedampft, in verdünnter Salpetersäure aufgenommen, filtriert und auf 5 ccm aufgefüllt. Die Flüssigkeit färbte sich mit überschüssigem Ammoniak blau und gab mit Ferrocyankalium einen braunen Niederschlag. Zur Bestimmung wurden 0,2 ccm der Flüssigkeit auf 10 ccm aufgefüllt und 0,1 ccm einer 1proz. Ferrocyankaliumlösung zugefügt. Die hierbei auftretende Braunfärbung wurde mit einer Serie von Färbungen verglichen, die mittels einer Kupfersulfatlösung von bekanntem Gehalt in sonst gleicher Weise erzeugt worden waren. Es wurden so in einem Gramm Blutkohle 1,68 mg = 2,65 Milliontel Mole Cu gefunden.

Adsorptionsvermögen der beiden Kohlen. Je 1 g bei 120° getrockneter Kohle wurde mit 100 ccm Lösung einige Minuten geschüttelt und der Gehalt der verschiedenen Stoffe in der Lösung vor und nach dem Schütteln mittels folgender Methoden bestimmt: Aceton jodometrisch nach Messinger, Bernsteinsäure acidimetrisch, Amylalkohol durch Wägung des von einem Traubeschen Stalagmometer abfallenden Tropfens, Cystin polarimetrisch. Die Resultate sind in Tabelle XII zu-

Tabelle XII.
Adsorptionsvermögen von Blutkohle und Benzoesäurekohle.
Je 1 g Kohle + 100 ccm Lösung.

Substanz	Kohlepräparat	Messungen		Verteilung berechnet	
		vor dem Schütteln mit Kohle	nach dem Schütteln mit Kohle	\bar{x} pro Gramm Kohle adsorbierte Millimole	C Mole pro Liter Lösung
Aceton	Blutkohle	10 ccm = 6 ccm $\frac{1}{10^6}$ -Jod	10 ccm = 3,3 $\frac{1}{10^6}$ -Jod	0,45	$0,55 \cdot 10^{-3}$
	Benzoesäurekohle	10 ccm = 6 ccm $\frac{1}{10^6}$ -Jod	10 ccm = 1,6 $\frac{1}{10^6}$ -Jod	0,73	$0,27 \cdot 10^{-2}$
	Blutkohle	10 ccm = 2,1 ccm $\frac{1}{10^6}$ -NaOH	10 ccm = 0,5 ccm $\frac{1}{10^6}$ -NaOH	0,8	$2,5 \cdot 10^{-3}$
	Benzoesäurekohle	10 ccm = 2,1 ccm $\frac{1}{10^6}$ -NaOH	10 ccm = 0,4 ccm $\frac{1}{10^6}$ -NaOH	0,85	$2,0 \cdot 10^{-3}$
n-Amylalkohol	Blutkohle	Tropfengewicht reines Wasser: 128,7 mg	Tropfengewicht 95,3 mg**)	3,9	$3,6 \cdot 10^{-2}$
	Benzoesäurekohle	Tropfengewicht Lösung 81 mg*)	Tropfengewicht reines Wasser: 128,7 mg	3,1	$4,4 \cdot 10^{-2}$
Cystin	Blutkohle	Tropfengewicht Lösung 81 mg*)	α_D im 2-Dez-Rohr — 0,142°	0,071	$0,79 \cdot 10^{-3}$
	Benzoesäurekohle	α_D im 2-Dez-Rohr — 0,142°	α_D im 2-Dez-Rohr — 0,098°	0,046	$1,04 \cdot 10^{-3}$

*) 0,66 g Amylalkohol: 100 ccm.

**) Entsprechend 0,32 g Amylalkohol: 100 ccm.

***) " 0,39 g " " 100 ccm.

O. Warburg:

sammengestellt. Wie man sieht, wird Aceton von der Benzoesäurekohle, Cystin von der Blutkohle besser adsorbiert, während das Adsorptionsvermögen beider Kohlen gegenüber Bernsteinsäure und Amylalkohol etwa das gleiche ist.

Ganz anders fällt der Vergleich gegenüber Methylenblaulösungen aus. Schüttelt man 0,5 g Blutkohle mit 100 ccm einer 0,15 proz. Methylenblaulösung, so ist nach 20 Minuten fast der gesamte Farbstoff adsorbiert. Wiederholt man den Versuch mit Benzoesäurekohle, so findet man nach der gleichen Zeit fast den gesamten Farbstoff in Lösung. Das Adsorptionsvermögen der Blutkohle gegenüber Methylenblau ist von einer anderen Größenordnung, als das der Benzoesäurekohle.

Sauerstoffübertragung durch beide Kohlen. Während in Wasser suspendierte Mercksche Blutkohle keinen Sauerstoff aufnimmt, verbrauchen Benzoesäurekohlen unter den gleichen Bedingungen stets Sauerstoff. Diese „Selbstoxydation“ wurde bei jedem Cystinversuch mitbestimmt und von dem für Cystin

Tabelle XIII.

Sauerstoffübertragung durch Blutkohle und Benzoesäurekohle.

Versuch	Kohlepräparat	System				10 ccm der Kohlesuspension verbrauchen in 30 Min. Sauerstoff cmm	In 30 Min. auf Cystin übertragener Sauerstoff cmm	Eisengehalt pro g Kohle Milliontel Mole
		Wasser ccm	Cystin mg	Kohle g	Metallsalz mit 1 g Kohle geglüht			
1	Blutkohle	100	36	1	—	140	140	4,6
2	Benzoesäurekohle	100	—	1	—	30		
		100	36	1	—	70	40	0,2
3	Benzoesäurekohle	100	—	1	$20 \cdot 10^{-6}$ Mole FeCl_3	51		
Eisen		100	36	1	$20 \cdot 10^{-6}$ Mole FeCl_3	155	104	20
4	Benzoesäurekohle	100	—	1	$20 \cdot 10^{-6}$ Mole MnCl_2	66		
Man-		100	36	1	$20 \cdot 10^{-6}$ Mole MnCl_2	161	95	
gan	Benzoesäurekohle	100	—	1	$20 \cdot 10^{-6}$ Mole CeCl_3	56		
5	Benzoesäurekohle	100	—	1	$20 \cdot 10^{-6}$ Mole CeCl_3	184	78	
Cer		100	36	1	$20 \cdot 10^{-6}$ Mole CeCl_3	184		

erhaltenen Wert in Abzug gebracht. Aus Versuch 1 und 2 der Tabelle XIII geht hervor, daß auch Benzoesäurekohle Sauerstoff auf Cystin überträgt, jedoch erheblich langsamer als Blutkohle.

Tränkt man die Benzoesäurekohle mit Metallsalzen und erhitzt eine Minute im offenen Porzellantiegel zur Rotglut, so erhält man Präparate, die zwar nicht merklich stärker adsorbieren, jedoch das adsorbierte Cystin mit größerer Geschwindigkeit oxydieren (Versuche 2, 3 und 4 der Tabelle XIII). Von vielen Metallsalzen, die geprüft wurden, erwies sich am wirksamsten Eisen, während Kupfer in keinem Fall einen Einfluß auf die Sauerstoffübertragung ausübte. In der letzten Spalte der Tabelle XIII sind die Eisengehalte der verschiedenen Kohlen verzeichnet. Ein Vergleich mit den Oxydationsgeschwindigkeiten (vorletzte Spalte) lehrt, daß diese durchaus nicht im Verhältnis der Eisenmengen stehen.

Tabelle XIV.

Einfluß adsorbierter Metallsalze auf die Cystinoxidation.

0,086proz. Cystinlösung ccm	System		10 ccm Kohlesuspension verbrauchen in 80 Min. Sauerstoff cmm
	Blutkohle g	Metallsalz der Kohlesuspension zugesetzt	
100	1	—	132
100	1	$40 \cdot 10^{-6}$ Mole $MnCl_2$	117
100	1	$40 \cdot 10^{-6}$ Mole $FeCl_3$	89
100	1	$40 \cdot 10^{-6}$ Mole $CuCl_2$	42

Tabelle XIV gibt eine Versuchreihe wieder, in der sich an der Kohleoberfläche neben Cystin verschiedene, aus wässriger Lösung adsorbierte Metallsalze befanden. Wie man sieht, hat das adsorbierte Metallsalz durchweg einen hemmenden Einfluß auf die Sauerstoffaufnahme.

Die wasserlöslichen Farbstoffe der Schizophyceen.

(Mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher
Wissenschaft, Kunst und Literatur in Böhmen).

Von

Karl Boreseh.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der deutschen Universität Prag.)

(Eingegangen am 16. April 1921.)

Mit 34 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Kylin (I, II) wies für eine größere Zahl von Rhodophyceen nach, daß sie neben dem Phykoerythrin auch einen blauen Farbstoff, das Phykocyan, enthalten, welches sogar in einzelnen Formen ganz an die Stelle des den Florideen gewöhnlich zugesprochenen roten Farbstoffes treten kann. Gewissermaßen ein Gegenstück hierzu bildet die vorliegende Arbeit, in welcher gezeigt werden soll, daß es außer den nur Phykocyan enthaltenden Schizophyceen nicht wenige Arten dieser Algenklasse gibt, welche außer dem blauen Phykocyan einen roten Farbstoff führen, welcher zufolge seiner Eigenschaften gleichfalls als Phykoerythrin bezeichnet werden muß, und daß es auch hier an Vertretern des anderen Extrems, an ausgesprochenen „Phykoerythralgen“ nicht fehlt. Diese Untersuchung ging aus dem Bedürfnis hervor, mir für das Studium des Gaidukovschen Phänomens der komplementären, chromatischen Adaptation, an welcher ja gerade die wasserlöslichen Schizophycepigmente hauptsächlich beteiligt sind, gesicherte Grundlagen zu schaffen. Die Beobachtungen über die Farbstoffe des *Phormidium Retzii* (Ag.) Gom. var. *nigro-violacea* Wille, deren Studium den Ausgangspunkt für die vorliegende Untersuchung bildete, sind bereits a. a. O. (III) veröffentlicht worden.

Die ziemlich reiche, sich vielfach widersprechende Literatur über die wasserlöslichen Schizophyceenfarbstoffe soll, zumal sich eine geschlossene Darstellung derselben bei Czapek und Kylin (I, III) findet, erst später an den zugehörigen Orten und nur insoweit als nötig, abgehandelt werden. Viele zum Teil weit zurückliegende Angaben erfahren durch die vorliegende Arbeit eine Bestätigung, Erklärung oder Berichtigung. Besonders sei hier hervorgehoben, daß gerade die ersten Forscher, welche sich mit diesen Farbstoffen befaßten, wie Kützing und Askenasy, die ganzen in Betracht kommenden Verhältnisse für die Schizophyceen sowohl wie für die Rhodophyceen in ihren wesentlichen Zügen richtig erkannt haben. In der Folge aber scheinen diese ersten richtigen Feststellungen durch andere in den Vordergrund des Interesses tretende Gesichtspunkte verdrängt, immer mehr in Vergessenheit geraten oder nicht weiter beachtet worden zu sein, immer häufiger wird das Phykoocyan als der für die Cyanophyceen, das Phykoerythrin als der für die Rhodophyceen charakteristische Farbstoff angesehen.

Die untersuchten Arten.

Zur Identifizierung der wasserlöslichen Farbstoffe der Schizophyceen bediente ich mich fast ausschließlich der überaus charakteristischen optischen Eigenschaften derselben, vor allem der genauen Ausmessung ihrer Absorptionsspektren.

Für solche Untersuchungen ist natürlich die Artreinheit des Algenmaterials von größter Wichtigkeit, eine Forderung, welche an den in der Natur gewachsenen Schizophyceen nur selten erfüllt ist. Ja selbst die richtige Bestimmung ihrer Lagerfarbe in der Natur stößt infolge der Beimischung anders gefärbter Organismen, wie Grünalgen und Diatomeen, auf Schwierigkeiten. Die Einheitlichkeit eines wässrigen Auszuges würde zwar durch Beimengung solcher Algen, welche keine in Wasser löslichen Farbstoffe besitzen, nicht gestört werden, wohl aber sind den aus der Natur eingebrachten Schizophyceen fast stets andere Arten dieser Algenfamilie in mehr oder minder reichlicher Zahl beigemischt, so daß sich gegen die Verwendung solcher vom natürlichen Standort eingebrachter Schizophyceen zum Studium der wasserlöslichen Pigmente schwere Bedenken ergeben, zumal es fast unmöglich ist, das ganze für eine solche Untersuchung verwendete Material auf seine Speziesreinheit zu prüfen. Es wurde daher sehr viel Mühe auf die Herstellung artreiner Schizophyceenkulturen verwendet, also solcher, welche außer der betreffenden Art sonst keine anderen gefärbten Organismen enthalten. Nur in wenigen Fällen verwendete ich auch von Exkursionen eingebrachtes Schizo-

phyceenmaterial, aber nur dann, wenn es sich bei der mikroskopischen Untersuchung als genügend rein ergab; überdies ist die Herkunft des Materials im folgenden stets angegeben.

Speziesreinkulturen der Schizophyceen wurden durch Übertragung kleiner Lagerstücke auf Agarplatten (gewässertes Agar-agar mit dem üblichen Salzzusatz) erzielt, auf denen meist eine rasche Ausbreitung der übertragenen Fäden erfolgt, welche dann unter mikroskopischer Kontrolle einzeln oder in geringer Zahl, jedenfalls aber artrein, auf neue Platten überimpft wurden. Gegebenenfalls wurde dieser Vorgang wiederholt. Die speziesreinen Schizophyceen wurden dann in Erlenmeyerkölbchen überimpft, welche 50 ccm folgender, recht brauchbarer Nährlösung enthielten: 1 g KNO_3 , 0,2 g K_2HPO_4 , 0,05 g MgSO_4 , 0,05 g CaCl_2 , 0,001 g FeSO_4 in 1 Liter dest. Wassers. An einem Westfenster stehend, vor den schädigenden Wirkungen direkter Sonne geschützt, bildeten sie in einigen Wochen Rasen, deren Größe für die Farbstoffuntersuchung genügte. Solche Kölbchenkulturen enthielten außer der betreffenden Schizophyceenart in den meisten Fällen nur noch Bakterien, welche aber der schleimigen Oberfläche dieser Algen fest anhaftend, nicht entfernt werden konnten, manchmal auch andere ungefärbte Organismen, wie Amöben, Flagellaten und Fadenpilze, deren Gegenwart aber für die Farbstoffuntersuchung belanglos ist.

Die meisten der zur Untersuchung herangezogenen Algen stammen aus Prag und seiner nächsten Umgebung, ein Teil auch aus Hirschberg i. B., wo mir Kollege Privatdozent Dr. V. Langhans zu diesem Zwecke einen Arbeitsplatz an der biologischen Station in dankenswerter Weise zur Verfügung stellte.

Die bekanntlich nicht leichte Diagnose der meisten hier angeführten Schizophyceen verdanke ich der Güte Prof. Dr. N. Willes, welcher viel Zeit und Mühe darauf verwendete. Die heutige Systematik der Schizophyceen legt nur wenig Gewicht auf die Farbe der Spaltalgen. So kommt es, daß einzelne meiner Schizophyceen mit dem gleichen Namen belegt wurden, welche von mir auf Grund z. T. jahrelanger Beobachtung in Kultur als differente Arten oder vielleicht Rassen infolge ihrer abweichenden Färbung angesehen wurden. Ich kann mich nicht des Eindrucks erwehren, daß die heute zur systematischen Einteilung der Spaltalgen herangezogenen Artcharaktere eine noch allzuweite Fassung des Artbegriffes bedingen, und daß es durch Berücksichtigung der Farbe wenigstens bei einzelnen heute als Arten angesehenen Schizophyceen gelingen könnte, dieselben noch weiter aufzuspalten. Auch Prof. Wille hält es, wie ich einer brieflichen Mitteilung desselben verdanke, nicht für unmöglich, daß in Zukunft

aus der für das System der Spaltalgen heute noch wenig verwendbaren Farbe ein gutes Artmerkmal gemacht werden könnte. Ich möchte daher im folgenden dort, wo ich auf Grund langer Beobachtung die begründete Vermutung hege, daß zumindest verschiedene Rassen heute giltiger Arten vorliegen, dies dadurch zum Ausdruck bringen, daß ich an den Speziesnamen einen von mir gewählten, die Farbe andeutenden Varietätsnamen anschließe; nur bei *Phormidium Retzii* (Ag.) Gom. var. *nigro-violacea* stammt die neue Varietätsbezeichnung von Wille.

Folgende Arten wurden auf ihre wasserlöslichen Farbstoffe untersucht:

- Lyngbya aerugineo-caerulea* (Kg.) Gom.
- Phormidium luridum* (Kg.) Gom. var. *violacea*,
- Phormidium luridum* (Kg.) Gom. var. *fusca*,
- Phormidium laminosum* Gom. var. *aeruginea*,
- Phormidium laminosum* Gom. var. *olivaceo-fusca*,
- Phormidium Corium* Gom.,
- Phormidium Retzii* (Ag.) Gom. var. *aeruginea*,
- Phormidium Retzii* (Ag.) Gom. var. *nigro-violacea* Wille,
- Phormidium favosum* (Bory) Gom.,
- Phormidium subfuscum* Kg.,
- Phormidium autumnale* (Ag.) Schmidt var. *aeruginea*,
- Phormidium autumnale* (Ag.) Schmidt var. *olivacea*,
- Oscillatoria limosa* Ag.,
- Oscillatoria tenuis* Ag.,
- Oscillatoria amoena* (Kg.) Gom.,
- Oscillatoria formosa* Bory,
- Oscillatoria Okeni* Ag.,
- Nostoc spec.*,
- Anabaena spec.*,
- Microchaete tenera* Thur. (?),
- Microchaete calotrichoides* Hansg. (?),
- Porphyridium cruentum* Naeg.

Methodisches.

Die zur Untersuchung gelangenden Schizophyceen wurden nach Abpressen des Wassers zwischen Filtrierpapier im Thermostaten bei 40 bis 50° C getrocknet, sodann mit Quarzsand feinst zerrieben und mit möglichst wenig Wasser durch mindestens 12 Stunden unter Toluolzusatz extrahiert. In einigen Fällen wurde vorher auch das Trockengewicht bestimmt und meistens pro 0,1 g Trockensubstanz 10 ccm Wasser zur Extraktion verwendet. Der Farbstoff geht rasch in Lösung. Das Extrakt wurde sodann in der Regel 1 mal filtriert und hierauf sein Absorptionsspektrum untersucht. Manchmal wurde auch die Farbstofflösung zwecks Reinigung mit

Ammoniumsulfat umgefällt, doch erwies sich diese Manipulation bei den aus Kulturen stammenden Algen für die Untersuchung des Absorptionsvermögens der Extrakte als überflüssig.

Für die erste rasche Orientierung wurde das Zeiss'sche Vergleichsspektroskop verwendet. Für eine exakte Beschreibung der Absorptionsverhältnisse reicht aber dieses, sonst sehr handliche Instrument nicht aus, weil es der sehr schwankenden, rein subjektiven Beurteilung der Absorptionsbänder den weitesten Spielraum läßt, und auch durch Verwendung verschiedener Lichtquellen Täuschungen hervorgerufen werden können. Auch die Darstellung der Absorptionsspektren auf photographischem Wege ist nicht fehlerfrei.

Zur genauen Ermittlung des Absorptionsvermögens der wässrigen Algenauszüge diente daher die Messung der relativen Extinktionskoeffizienten mit Hilfe eines König-Martens'schen Spektralphotometers der Firma Schmidt & Haensch. Die zu untersuchende Farbstofflösung, von welcher nur wenige Kubikzentimeter erforderlich sind, gelangt in den parallelwandigen, mit einem Schulz'schen Glaskörper versehenen Absorptionstrog. Der Extinktionskoeffizient ist

$$\epsilon = \frac{1}{d} \log \frac{i_0}{i},$$

wo d die Schichtdicke, i die Intensität des durchgegangenen, i_0 die des eintretenden Lichtes ist: Weil hier $d = 1$ ist, scheidet d aus. Das Verhältnis $\frac{i_0}{i}$ zweier polarisierter Lichtstrahlen, ist bei diesem Instrument gegeben durch den Ausdruck $\frac{1}{\operatorname{tg}^2 \varphi}$. Der Winkel φ ist das arithmetische Mittel aus den bei einer ganzen Umdrehung des Analysators gemachten 4 Winkelablesungen, bei denen die beiden Hälften des Gesichtsfeldes gleich hell erscheinen. Somit ergibt sich:

$$\epsilon = \log \frac{1}{\operatorname{tg}^2 \varphi} = -2 \log \operatorname{tg} \varphi.$$

Durch Drehung des Beobachtungsrohres des Instrumentes um eine horizontale Achse mittels einer entlang einer Skala drehbaren Mikrometerschraube können die einzelnen Spektralbezirke im Gesichtsfeld eingestellt werden. In den im Anhang in Tabellenform wiedergegebenen Messungen stehen in der ersten Kolonne die den Teilstrichen der Skala entsprechenden mittleren Wellenlängen. Die hierzu erforderliche Eichung der Skala des Instrumentes verdanke ich meinem Kollegen, Priv.-Dozenten Dr. R. Fürth welcher für folgende Skalenteile die zugehörige Wellenlänge aus der Beobachtung von Spektrallinien ermittelt hat.

Skalenteil	87	86	85	84	83	82	81	80	29	28	27	26	25
Wellenlänge in $\mu\mu$	655	622	598,5	589	548	580	514,5	501	489	478	466	458,5	449,5

Die übrigen Werte sind interpoliert. Die in Klammer gesetzten Werte der Wellenlängenbezirke am roten Ende des Spektrums sind extrapoliert und haben daher geringe Genauigkeit. Die eingetragenen Wellenlängen stellen den mittleren Wert des jeweils eingestellten Spektralbezirkes dar;

seine Breite betrug für die D-Linie 0,1 Teilstrich der Skala. Gemessen wurde mit möglichst engem Bilateral- und Okularspalt im Dunkelzimmer. Als Lichtquelle diente eine Bogenlampe, deren seitlich austretendes Licht durch Schirme vom Auge des Beobachters abgehalten wurde. Für die Einstellung auf gleiche Helligkeit der beiden Gesichtsfeldhälften ist gemäß den Eigenschaften des menschlichen Auges das grüngelbe Gesichtsfeld am geeignetsten, das blaue und violette am ungünstigsten (Weigert). Mit zunehmender Übung erreichte ich schließlich eine Genauigkeit von 5 Min. im Grüngelb. Die Messung der Extinktion der Schizophyceenfarbstoffe im äußersten Rot und im Blau-Violett jenseits der Frauenhoferschen Linie F durften entfallen, weil sie als Minima der Absorption nichts Besonderes bieten. Die Zahl der gemessenen Punkte mußte mit Rücksicht auf die vielen Untersuchungen etwas eingeschränkt werden, doch wurde dafür ihre Lage so gewählt, daß die wichtigen Stellen des Spektrums mit möglichst engen Intervallen durchgemessen wurden. Aus demselben Grunde mußte auch darauf verzichtet werden, die Genauigkeit der Extinktionskoeffizienten durch Wiederholung der Messung zu erhöhen. Bei großer Verdünnung der Farbstoffauszüge leidet gleichfalls die Genauigkeit der Einstellung auf gleiche Helligkeit. Aus den 4 Winkelablesungen bei einer ganzen Umdrehung des Analysators, bei welchen sich gleiche Helligkeit der beiden Hälften des Gesichtsfeldes ergibt ($\varphi_1, \varphi_2, \varphi_3, \varphi_4$) wird der in der nächsten und vorletzten Kolonne der Tabellen stehende Wert φ nach folgender Formel berechnet:

$$\varphi = 90^\circ + \frac{(\varphi_1 + \varphi_3) - (\varphi_2 + \varphi_4)}{4}$$

In der letzten Kolonne sind die Werte für $s = -\log_{10} \varphi$, die relativen Extinktionskoeffizienten verzeichnet. Diese letzten Werte stellen die Ordinaten in den abgebildeten Kurven dar, welche jedoch nur hinsichtlich ihrer die Wellenlängenskala¹⁾ repräsentierenden Abscissen im gleichen Maßstab ausgeführt sind; als Ordinaten wurden nur bei mittelgroßen s -Werten dieselben unverändert eingetragen, bei sehr hohen s -Werten wurden der Raumersparnis halber die halben, bei niedrigen s -Werten die doppelten Werte als Ordinaten aufgetragen. Dies ist auch bei den einzelnen Kurven durch den Vermerk (1), ($\frac{1}{2}$) oder (2) ersichtlich gemacht.

Spektrophotometrische Messungen gestatten, sofern es sich um ein und denselben Farbstoff handelt, auch einen Rückschluß auf die Konzentration der Farbstofflösung. Denn nach dem Satze von Beer ist der Extinktionskoeffizient proportional der Konzentration. Besonders empfiehlt es sich für diesen Zweck, in das für die Kurvendarstellung bestimmte Koordinatensystem als Ordinaten nicht die Extinktion, sondern den Logarithmus ihres Zahlenwertes einzutragen. Die Gestalt dieser „typischen Farbkurven“ (Weigert) ist von der Konzentration des Farbstoffes unabhängig; die den verschiedenen Konzentrationen entsprechenden Kurven

¹⁾ Der Wellenlängenskala liegt ein Prismenspektrum zugrunde, um den Vergleich mit den im gleichen Maßstab gezeichneten Kurven anderer Autoren zu erleichtern.

weisen nur eine Parallelverschiebung längs der Ordinate auf. Doch gelang diese Art „graphischer Colorimetrie“ nicht mit meinen Kurven, weil besonders ihre Enden keine strenge Proportionalität zur Konzentration besitzen, sei es, daß die Messung an Orten sehr geringer Extinktion schon ungenau ist oder durch die Temperaturerhöhung der absorbierenden Flüssigkeit beeinflußt wird, sei es, daß unbekannte, etwa in der Natur der Lösungen gegebene Ursachen mit hineinspielen.

Phykocyan und Phykoerythrin in Schizophyceen.

Die Namen Phykocyan und Phykoerythrin gehen bis auf Kützing (I) zurück. Er unterschied das blaue Phykocyan, dessen lebhaft rote Fluorescenz schon Nees im Jahre 1835 an dem „Saprocyanin“ faulender Oscillarien aufgefallen war, von dem roten Phykoerythrin, dessen orangefarbene Fluorescenz schon Stokes beschrieb. Diese also nornehmlich in der Färbung begründete Unterscheidung der beiden Farbstoffe, deren nahe chemische Verwandtschaft schon den ältesten Autoren aufgefallen war, verlor durch die Auffindung von roten und violetten Farbstoffen in Schizophyceen durch Cohn (I, II) Askenasy, Kraus und Millardet und vornehmlich Molisch (III) an Prägnanz. Diese neuen Farbstoffe wurden zufolge des sich immer mehr einbürgernden Sprachgebrauches dem Phykocyan zugeschlagen und als Phykocyanmodifikationen beschrieben. Kylin (I), dem wir die neueste ausführliche Beschreibung der wasserlöslichen Algenfarbstoffe, der „Phykochromoproteide“ verdanken, gesteht, daß bei dem heutigen Stand der Forschung eine sichere Unterscheidung der Phykocyane und Phykoerythrine nicht möglich sei. Immerhin hebt auch er als Unterscheidungsmerkmal die Farbe und Fluorescenz hervor: Die Phykocyane sind blau mit mehrweniger carminroter Fluorescenz, die Phykoerythrine rot mit orangegelber Fluorescenz. Für die Phykocyane hält er es für möglich, daß das zwischen den Fraunhoferschen Linien C und D auftretende Absorptionsband sich künftig als allen Phykocyanen gemeinsam herausstellen wird, während das Hauptabsorptionsmaximum der bisher beschriebenen Phykoerythrine zwischen D und E liegt. Soweit ich nun auf Grund meiner Untersuchungen aussagen kann, trifft diese von Kylin geäußerte Vermutung einer Unterscheidungsmöglichkeit des Phykocyan und Phykoerythrins auf Grund ihrer Farbe, ihrer Fluorescenz und ihrer Absorptionsbänder tatsächlich zu.

Für *Phormidium Retzii* (Ag.) Gom. var. *nigro-violacea* Wille konnte ich (III) zeigen, daß diese Alge 2 wasserlösliche Pigmente besitzt. Das wässrige aus derselben hergestellte Extrakt hat eine mehrweniger violette Farbe, eine rotbraune Fluorescenz und weist im Spektrum 2 Absorptionsmaxima, eines im Rot zwischen C und D, das andere im Grün zwischen D und E auf. Die Intensität der beiden Streifen ändert sich nun in ihrem gegenseitigen Verhältnis bei wiederholter Extraktion und wiederholtem Filtrieren, eine Tatsache, welche schon allein für den Mischcharakter des Extraktes spricht, und durch Capillaranalyse gelang es schließlich, die beiden Farbstoffe voneinander zu trennen. In einem in das Farbstoffgemisch eingetauchten Filtrierpapierstreifen wandert der blaue Farbstoff dem roten voran, gibt sich also als der stärker negativ aufgeladene zu erkennen. Demgemäß wird der rote Farbstoff bei wiederholtem Filtrieren vom Filter stärker zurückgehalten als der blaue. Auf diesem Wege erhielt ich schließlich ein rein blaues, wenn auch stark verdünntes Filtrat mit carminroter Fluorescenz und nur einem Absorptionsband zwischen C und D, und es muß daher dieser blaue Farbstoff als Phykocyan bezeichnet werden. Der rote vom Filter adsorbierte Farbstoff wurde gelöst und ergab eine rote, orange fluoreszierende Lösung, welche gleichfalls nur ein einziges, aber zwischen D und E gelegenes Absorptionsmaximum besitzt, und ist wegen dieser Eigenschaften als Phykoerythrin zu benennen; seine Eigenschaften werden später (S. 192 ff.) besprochen werden. Die violette Eigenfarbe und die rotbraune Fluorescenz des ursprünglichen Extraktes erklärt sich leicht als Mischfarbe dieser beiden Farbstoffe, wie Mischungsversuche bewiesen.

Meine hier mitgeteilten, auf eine größere Zahl von Schizophyceen sich erstreckenden Untersuchungen zeigen nun, daß es unter diesen Algen nicht wenige Formen gibt, deren wässrige Auszüge, photometriert, eine ganz ähnliche, zweigipfelige Absorptionskurve wie das eben erwähnte *Phormidium* lieferten. Nur ist das Verhältnis der beiden maximalen Extinktionen (der Ordinaten der Gipfel) zueinander bei den unterschiedlichen Arten ein sehr verschiedenes. Auch gelang die Trennung der beiden Komponenten durch Capillarisation fast überall dort, wo sie versucht wurde; sie gelingt um so besser, je farbstoffreicher der Auszug ist; doch standen mir nicht immer genügend konzentrierte Lösungen der Farbstoffe zur Verfügung. Die Lage der beiden Maxima im Spektrum ist aber so prägnant und nur so geringen Schwankungen unterworfen, daß dieser Umstand im Verein mit den als Mischfarben bei *Phormidium Retzii* var. *nigro-violacea* erkannten Nüancen der Eigen- und Fluorescenzfarbe der wässrigen Auszüge einen Zweifel an der Zusammensetzung der Extrakte aus den beiden allerdings je nach der Art in verschiedenen Mengen vorkommenden Phykochromoproteiden, dem

blauen Phykocyan und dem roten Phykoerythrin nicht aufkommen läßt. Wie man nun durch Mischung einer reinen Phykocyan- und Phykoerythrinlösung eine hinsichtlich ihrer Farbe und Fluorescenz zwischen diesen beiden Farbstoffen vermittelnde Mischungsreihe erhält, so kann man auch auf dem Papier eine solche „Mischung“ durch Addition der Ordinaten der Phykocyan- und Phykoerythrinkurve durchführen, wie später (S. 198) gezeigt werden wird. Man erhält so eine Mischungskurve, welche hinsichtlich der Lage ihrer charakteristischen Punkte völlig mit den zweigipfeligen Absorptionskurven der aus Schizophyceen erhaltenen Lösungen übereinstimmt, — ein weiterer Beweis für die zusammengesetzte Natur dieser Kurven. — Der Gehalt an

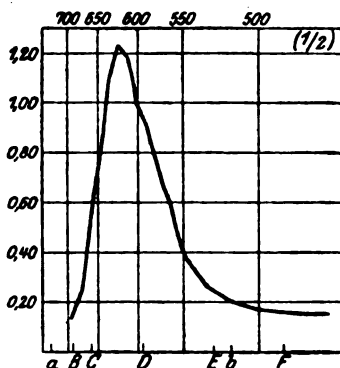


Abb. 1.

Phykoerythrin gibt sich auch nicht selten in der Farbe des Lagers und der Zellen zu erkennen, worauf noch später zurückzukommen sein wird.

Bei einer anderen Gruppe von Cyanophyceen — es handelt sich hier durchweg um Formen, denen eine lebhaft blaugrüne (spangrüne) Lagerfarbe eigen ist — fand sich nur Phykocyan.

Eine dritte Gruppe endlich lieferte rote, fast oder vielleicht gänzlich nur aus Phykoerythrin bestehende Extrakte. Bei diesen Arten gibt sich der hohe Phykoerythringehalt meist ganz besonders in der Lagerfärbung zu erkennen.

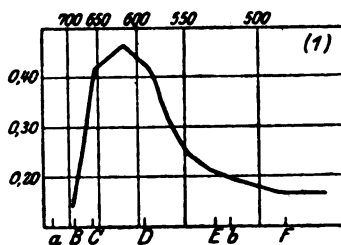


Abb. 2.

I. Die nur Phykocyan enthaltenden Schizophyceen.

Phormidium laminosum Gom. var. *aeruginea*.

Hierzu Abb. 1, 2, 3 und Tabellen I, II, III im Anhang.

Aus Moldauwasseraquarien isoliert. Speziesreinkulturen. Lagerfarbe: Dunkelblaugrün (spangrün). Trockengewicht und Volumen des für die Extraktion verwendeten Wassers: Bei 1 nicht bestimmt; bei 2: 0,032 g und 3,2 ccm Wasser; bei 3: 0,016 g und 1,6 ccm Wasser. Extrakte 1 mal

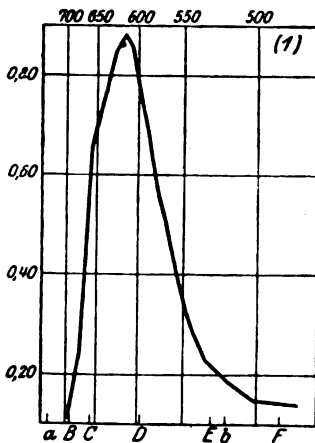


Abb. 3.

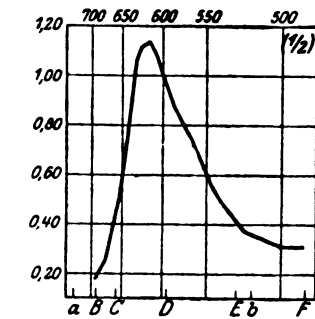


Abb. 4.

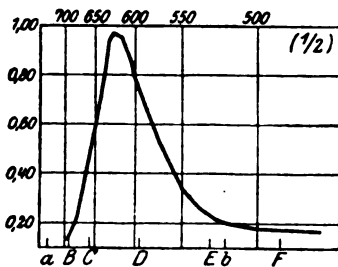


Abb. 5.

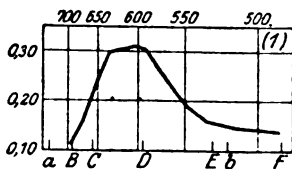


Abb. 6.

filtriert. Farbe des Filtrates: Intensiv blau. Bei 2: Grünlicher Stich. Fluorescenz: Carminrot. Farbe der Ammoniumsulfatfällung: Blau.

Phormidium Corium Gom.

Hierzu Abb. 4 und Tabelle IV.

Von Steinen am Techöpelteich in Hirschberg i. B. Fäden einer anderen Art (Phormidium oder Oscillatoria) beigemischt. Nicht reingezüchtet. Lagerfarbe: Blaugrün. Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Intensiv blau. Fluorescenz: Carminrot. Farbe der Ammoniumsulfatfällung: Blau.

Phormidium autumnale (Ag.) Schmidt var. aeruginosa.

Hierzu Abb. 5 und Tabelle V.

Aus einer Erdpfütze in der Umgebung von Hirschberg i. B. Sehr reines Material, nicht reingezüchtet. Lagerfarbe: Lebhaft grün, fast chlorophyllgrün. Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Intensiv blau. Fluorescenz: Carminrot. Farbe der Ammoniumsulfatfällung: Blau.

Oscillatoria tenuis Ag.

Hierzu Abb. 6 und Tabelle VI.

Aus Tümpeln bei Theresiendorf in Mähren. Sehr reines Material, nicht reingezüchtet. Lagerfarbe: Blaugrün (spangrün). Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Grünlichblau. Fluorescenz: Carminrot. Ammoniumsulfatfällung: Blau.

Oscillatoria formosa Bory.

Vom Abfluß eines Düngerhaufens in der Umgebung von Hirschberg i. B. Reines Material, nicht reingezüchtet. Lagerfarbe: Dunkelblaugrün. Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe

des Filtrates: Blau. Fluorescenz: Carminrot. Ammoniumsulfatfällung: Blau. Absorptionskurve weist wie die bisherigen nur 1 Maximum bei λ 615 auf.

Anabaena spec.

Infolge Fehlens von Dauerzellen nicht näher bestimmbar. Bildete auf der Oberfläche eines Moldauwasseraquariums eine Wasserblüte von blaugrüner Farbe. Reines Material. Kulturversuche mißlingen. Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Dunkelblau. Fluorescenz: Carminrot. Ammoniumsulfatfällung: Blau. Absorptionskurve: 1 Maximum bei λ 630.

Überblickt man die 8 hier mitgeteilten Messungen, so findet man, daß das einzige im Rot zwischen C und D gelegene Maximum der Absorption in 4 Fällen auf λ 615, in 2 Fällen auf λ 625 und in je einem Fall auf λ 630 und λ 608 fällt. Doch erscheinen mir diese Unterschiede so geringfügig, daß ich nicht daraus auf eine Verschiedenheit der hier untersuchten Phykocyanine schließen möchte, zumal solche Schwankungen bei ein und derselben Alge (*Phormidium laminosum*) vorkamen. Zum Teil wenigstens mögen sich die Verschiebungen des Absorptionsmaximums gegen das langwellige Ende des Spektrums durch das Dispersionsvermögen zufällig beigemengter Trübungen erklären, zum Teil, wie bei *Oscillatoria tenuis*, wo die geringen Unterschiede der maximalen Extinktion von den vorangehenden ϵ -Werten schon in den Fehlerbereich der Messung fallen, beruhen sie auf Ungenauigkeit der Messung. In allen Kurven ist der Anstieg zu diesem Maximum steiler als der Abfall von demselben. Die untere Breite aller Kurven ist trotz verschiedener Konzentration der Lösungen sehr gleichmäßig, während sich bekanntlich die Absorptionsbänder bei subjektiver Betrachtung in einem Spektroskop mit abnehmender Schichtdicke auffallend zu verschmälern scheinen.

In der Literatur finde ich nur eine Absorptionskurve, welche den hier mitgeteilten Kurvenbildern völlig entspricht, und das ist die des „blaugrünen Phykocyan“ *Kylins* (II), welches er aus *Batrachospermum Gallaei* erhielt und außerdem in *Lemanea fluviatilis* und *Calothrix spec.* nachwies. Das Maximum desselben liegt bei λ 624—618, fällt also zwischen die von mir gefundenen Extinktionsmaxima bei λ 625 und λ 615. Auch der sonstige Kurvenverlauf läßt auf die Identität dieser Farbstoffe schließen.

Das gleiche Phykocyan dürften schon *Askenasy* und *Rosanoff* in Händen gehabt haben. Ersterer erhielt es aus *Oscillatoria antliaria* (?),

letzterer aus *Limnochlide flos aquae*. Im Spektrum der Farbstoffe dieser Algen ist im wesentlichen nur ein breiter Absorptionsstreifen im Rot zwischen C und D zu sehen, mit scharfer Begrenzung am linken Ende, während er nach rechts zu allmählich verblaßt. Das gleichfalls aus spangrünen Schizophyceen von Molisch (III) isolierte „blaue Phykokyan“ wies im Zeisschen Vergleichsspektroskop 2 Bänder auf, I: λ 635–605 und II: λ 580–560, Band I stärker als II. Band I entspricht völlig dem Phykokyanband, Band II dürfte sich auf eine Beimengung von Phykoerythrinhaltigen Schizophyceen zurückführen, oder besaßen die von diesem Forscher untersuchten Formen tatsächlich etwas Phykoerythrin, denn die Lage des Bandes II stimmt sehr gut mit der des Phykoerythrinbandes überein, welches bei der Grüngelbempfindlichkeit des Auges vielleicht stärker als in Wirklichkeit in Erscheinung trat; viel Phykoerythrin aber kann nicht zugegen gewesen sein, weil die Fluoreszenzfarbe dieser Lösungen als dunkelcarminrot angegeben wird. Kohl will eine Zusammensetzung des zwischen λ 640–610 sichtbaren Phykokyanbandes beobachtet haben, doch ist seine Beobachtung infolge Verwendung des Vergleichsspektroskops subjektiver Beurteilung unterworfen gewesen und daher unsicher. In neuerer Zeit wurde das Phykokyan der *Oscillatoria prolifica*, überflüssigerweise mit dem neuen Namen „Algocyanin“ benannt, von Turner in einer mir leider nicht zugänglichen Arbeit spektroskopisch untersucht.

II. Die Phykokyan und Phykoerythrin führenden Schizophyceen.

Phormidium Retzii (Ag.) Gom. var. *aeruginea*.

Von der Wand eines eingeschnittenen Baches in der Umgebung von Hirschberg i. B. Sehr reines Material, nicht in Kultur genommen. Lagerfarbe: Blaugrün. Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Blau. Fluoreszenz: Carminrot. Farbe der Ammoniumsulfatfällung: Blau. Absorptionakurve zeigt ein deutliches Phykokyanmaximum bei λ 615, im absteigenden Ast bei λ 559, also dort, wo das Phykoerythrinmaximum zu erwarten wäre, eine leichte Erhebung ohne Ausbildung eines deutlichen Minimums. Der Phykoerythringehalt dieser Alge ist jedoch fraglich, weil es sich um keine Reinkultur handelt und daher eine,

wenn auch geringfügige Beimischung einer anderen, phykoerythrinführenden Art nicht ausgeschlossen ist.

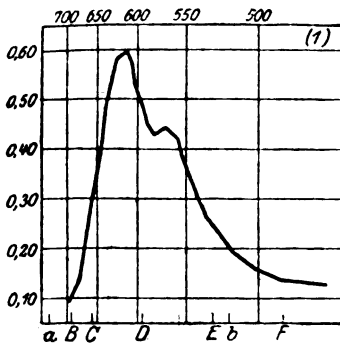


Abb. 7.

Oscillatoria Okeni Ag.

Hierzu Abb. 7 und Tabelle VII.

Aus dem Gemeindeteich in Hirschberg i. B. Material mit sehr vereinzelt Fäden einer anderen Osc. untermischt, nicht in Kultur genommen. Lagerfarbe: Blaugrün. Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Dunkelblau. Fluoreszenz:

Carminrot (bräunlicher Stich). Farbe der Ammoniumsulfatfällung: Cyanblau. Capillarisation: Im Filtrierpapier wandert ein rein blauer Saum voran, darunter ist eine mehr indigoblaue Färbung zu bemerken. Absorptionskurve: Das deutlich ausgesprochene Phykoerythrinmaximum bei λ 569 scheint mir, obwohl das Material nicht völlig rein war, für das Vorkommen von Phykoerythrin in dieser Alge zu sprechen. Verhältnis der beiden Maxima 1,34.

Oscillatoria limosa Ag.

Hierzu Abb. 8 und Tabelle VIII.

Aus dem Bolzen bei Böhm. Leipa. Vollkommen reines Material. Kulturversuche mißlingen. Lagerfarbe: Schwärzlich olivgrün. Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Blau. Fluorescenz: Carminrot. Farbe der Ammoniumsulfatfällung: Blau. Absorptionskurve: Das Phykoerythrinmaximum ist nur durch eine leichte Erhebung des absteigenden Astes bei λ 569 angedeutet. (Siehe auch S. 183.)

Andere aus der Prager Umgebung eingebrachte Proben der *Osc. limosa* besaßen aber eine schwärzlichbraune Lagerfarbe und lieferten rot- bis blauviolette Extrakte mit venetianischer bis fast orangeroter Fluorescenz. Die Absorptionskurven derselben wurden nicht ermittelt, ihr hoher Phykoerythringehalt gab sich aber schon im Vergleichsspektroskop zu erkennen. Neben dem Phykocyanband zwischen λ 620–600 trat ein zweites, noch stärkeres Band zwischen λ 570–550 entsprechend der Lage des Phykoerythrinmaximums auf.

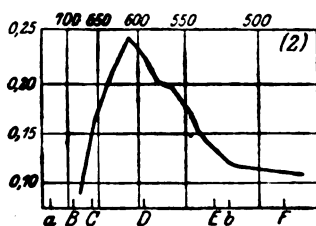


Abb. 8.

Phormidium favosum (Bory) Gom.

Hierzu Abb. 9 und Tabelle IX.

Von einem wasserüberrieselten Felsen der Prager Umgebung. Speziesreinkultur. Lagerfarbe: Schwärzlich olivgrün (fast blaugrün). Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Filtrat: Intensiv blau (indigo). Fluorescenz: Braunrot. Verhältnis der beiden Maxima: 1,07.

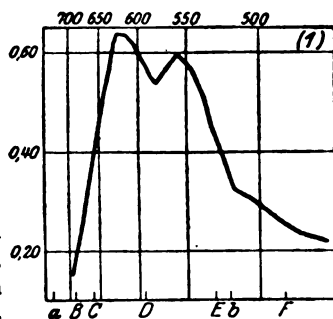


Abb. 9.

Oscillatoria amoena (Kg.) Gom.

Hierzu Abb. 10 und Tabelle X.

Von einem feuchten Felsen der Prager Umgebung. Speziesreinkultur. Lagerfarbe: Schwärzlich olivgrün, fast blaugrün. Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Filtrat: Cyanblau. Fluorescenz: Venetianischrot. Verhältnis der beiden Maxima: 0,92.

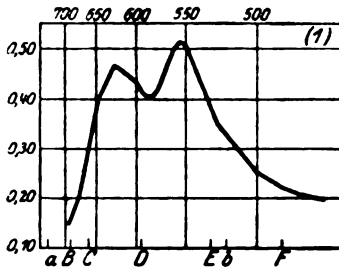


Abb. 10.

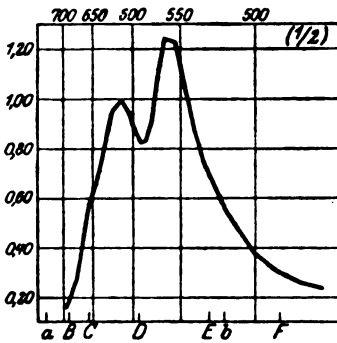


Abb. 11.

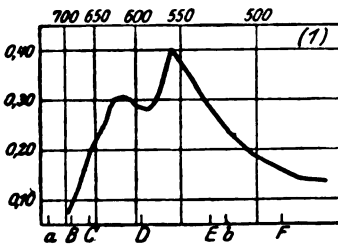


Abb. 12.

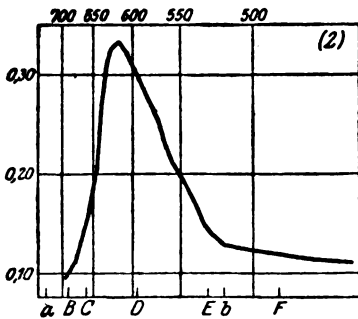


Abb. 13.

Phormidium Retzii (Ag.)
Gom. var. *nigro-violacea*
Wille n. v.

Hierzu Abb. 11 und Tabelle XI.
Von einem Blumentopf der Prager
Gewächshäuser isoliert. Speziesreinkul-
tur. Lagerfarbe: Schwärzlich olivgrün,
stellenweise violett. Trockengewicht
und Volumen des für die Extraktion
verwendeten Wassers: 0,137 g und
13,7 ccm Wasser. Extrakt 1 mal fil-
triert, nicht umgefällt. Filtrat: Inten-
siv blauviolett. Fluorescenz: Braunrot.
Farbe der Ammoniumsulfatfällung:
Blauviolett. Capillarisation: Sonderung
in eine rein blaue, obere und eine rote,
untere Zone. Verhältnis der beiden
Maxima: 0,80.

Lyngbya aerugineo-caerulea
(Kg.) Gom.

Hierzu Abb. 12, 13 und Tabel-
len XII, XIII.

Von einem wasserüberrieselten
Felsen bei Pürglitz in Böhmen. Spezies-
reinkultur. Lagerfarbe: Schwärzlich
olivgrün.

12: Extrakt 1 mal filtriert, nicht
umgefällt. Farbe des Filtrates: Hell
indigoblau. Fluorescenz: Venetianisch-
rot. Farbe der Ammoniumsulfatfällung:
Blauviolett. Verhältnis der beiden
Maxima: 0,76.

13: Extrakt 4 mal umgefällt, 10 mal
filtriert. Farbe des letzten Filtrates:
Blau. Fluorescenz: Carminrot. Absorp-
tionskurve ist die des reinen Phyko-
cyans, das Phykoerythrin wurde vom
Filter zurückgehalten.

Microchaete calotrichoides
Hansg. (?)

Hierzu Abb. 14 und Tabelle XIV.
Aus einem Moldauwasseraquarium
isoliert. Speziesreinkultur. Lagerfarbe:
Schwärzlich olivgrün. Extrakt 1 mal

filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Intensiv blau (Veilchenfarbe). Fluorescenz: Venetianischrot. Farbe der Ammoniumsulfatfällung: Violett. Verhältnis der beiden Maxima: 0,66.

Phormidium subfuscum Kg.

A. Von einem feuchten Stein aus der Umgebung von Brünn isoliert. Hierzu Abb. 15 und Tabelle XV. Speziesreinkultur. Lagerfarbe: Schwärzlich olivgrün. Trockengewicht und Volumen des für die Extraktion verwendeten Wassers: 0,039 g und 3,9 ccm Wasser. Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Intensiv cyanblau. Fluorescenz: Rotbraun (Farbe von gebrannter Sienna). Farbe der Ammoniumsulfatfällung: Violett. Verhältnis der beiden Maxima: 0,44.

B. Aus einem feuchten Straßengraben bei Prag. Hierzu Abb. 16, 17 und Tabellen XVI, XVII. Speziesreinkultur. Lagerfarbe Bei 16 olivbraun, stellenweise mit violetter Schimmel. Bei 17 olivgrün. Trockengewicht und Volumen des für die Extraktion verwendeten Wassers: Bei 16:

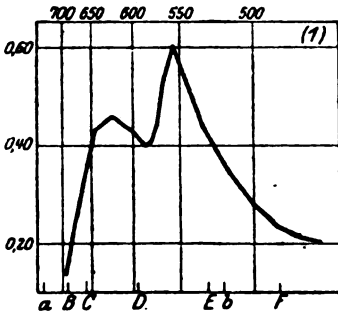


Abb. 16.

0,036 g und 3,6 ccm Wasser; bei 17: 0,047 g und 4,6 ccm Wasser. Extrakte 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Bei 16 blaviolett, bei 17 indigoblau. Fluorescenz: Bei 16 venetianischrot, bei 17 bräunlichrot. Farbe der Ammoniumsulfatfällung: Bei 16 blaviolett, bei 17 cyanblau. Capillarisation: Im Filtrierpapier oben eine rein blaue, unten eine rote Zone. Verhältnis der beiden Maxima: Bei 16 0,76, bei 17 0,99.

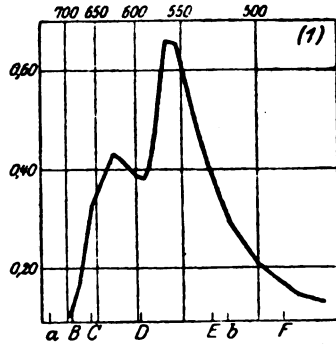


Abb. 14.

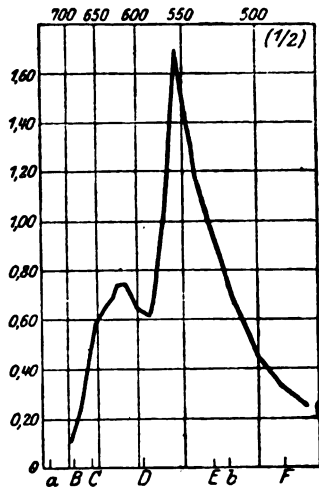


Abb. 15.

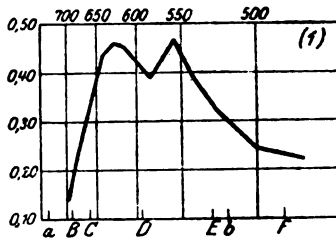


Abb. 17.

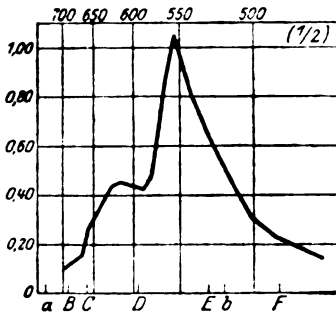


Abb. 18.

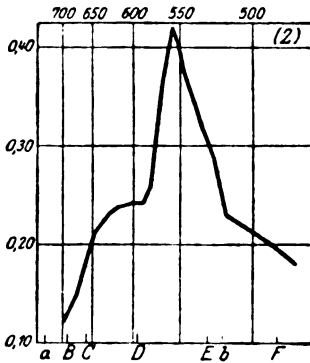


Abb. 19.

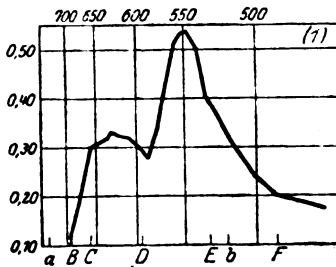


Abb. 20.

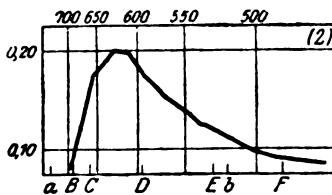


Abb. 21.

Phormidium laminosum Gom. var. olivaceo-fusca.

Hierzu Abb. 18 und Tabelle XVIII.

Speziereinkultur. Lagerfarbe: Olivgrün bis olivbraun. Trockengewicht und Volumen des für die Extraktion verwendeten Wassers: 0,120 g und 5 cc Wasser. Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Violett. Fluoreszenz: Rotbraun (gebr. Siena) mit orangegelbem Stich. Farbe der Ammoniumsulfatfällung: Violett. Verhältnis der beiden Maxima: 0,43.

Phormidium autumnale (Ag.) Schmidt var. olivacea.

A. Aus stehendem Bachwasser der Prager Umgebung isoliert. Hierzu Abb. 19 und Tabelle XIX. Speziereinkultur. Lagerfarbe: Schwärzlich olivgrün. Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Violett. Fluoreszenz: Rotbraun (gebr. Siena). Absorptionskurve: Das Phykokyanmaximum ist an der Ausbauchung des ansteigenden Kurvenastes in der Gegend von λ 615 deutlich zu erkennen, ist aber durch kein Minimum vom Phykoerythrinmaximum geschieden.

B. Von Blumentöpfen des Prager Gewächshauses isoliert. Hierzu Abb. 20, 21 und Tabellen XX, XXI. Speziereinkultur. Lagerfarbe: Schwärzlich olivgrün.

20: Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Blauviolett. Fluoreszenz: Venetianischrot. Capillarisation: Im Filtrierpapier wanderte eine schmale blaue Zone voran, gefolgt von einer breiten roten. Verhältnis der beiden Maxima: 0,63.

21: Extrakt wiederholt filtriert, nicht umgefällt. Farbe des letzten Filtrates: Blau. Fluoreszenz: Carminrot. Absorptionskurve zeigt nur mehr das Phykokyanmaximum, das Phykoerythrin wurde vom Filter zurückgehalten.

Die Absorptionskurven der Wasserauszüge aller in dieser Gruppe vereinigten Algen weisen 2 Maxima auf, das in Rot gelegene Phykocyan- und das im Grün auftretende Phykoerythrinmaximum. Beide sind meistens durch ein deutliches Minimum der Extinktion voneinander geschieden. Nur bei *Oscillatoria limosa* (Abb. 8) und bei *Phormidium autumnale* var. *olivacea* A. (Abb. 19) fehlt ein ausgesprochenes Minimum, so daß das Maximum des in geringerer Konzentration anwesenden Farbstoffes, im ersteren Fall des Phykoerythrins, im letzteren Fall des Phykocyan, nur durch eine Unstetigkeit der Kurve ausgedrückt wird. Bei hoher Konzentration erscheinen die beiden Absorptionsstreifen im Zeisschen Vergleichsspektroskop dem Auge in einen einzigen Streifen verschmolzen, was aber gegen das Gesetz der Konstanz der Spektren verstoßen würde (Weigert) und, wie die Absorptionskurven der hochkonzentrierten Farbstofflösungen zeigen, auch in Wirklichkeit nicht zutrifft, sondern nur dem subjektiven Eindruck entspricht. Die Lage der beiden Maxima im Spektrum ist nur geringen Schwankungen unterworfen. Das Phykocyanmaximum liegt in der Mehrzahl der Fälle bei λ 625, in einigen bei λ 615, also ebenso wie das Phykocyanmaximum der in der ersten Gruppe enthaltenen Schizophyceen. Durch wiederholte Filtration wurde das Phykocyan bei *Lynghya aerugineo-caerulea* (Abb. 13) und *Phormidium autumnale* var. *olivacea* (Abb. 21) vom Phykoerythrin dank der ungleichen Adsorbierbarkeit der beiden Farbstoffe abgetrennt. Auch bei diesen Kurven liegt das Maximum bei λ 615 bzw. λ 625. Ich möchte daher auch hier aus den gleichen S. 177 erwähnten Gründen in diesen geringfügigen Verschiebungen der maximalen Extinktion keinen Hinweis auf eine evtl. Verschiedenheit dieser Phykocyanine erblicken. Das gleiche trifft für das Phykoerythrin zu, dessen Maximum in der Mehrzahl der Fälle bei λ 559 beobachtet wurde. Das zwischen den beiden Maximis sich ergebende Minimum liegt bei den 12 in Betracht kommenden Kurven 4 mal bei λ 581, 5 mal bei λ 587 und 3 mal bei λ 594.

Die Höhe (Ordinatenlänge) dieser Maxima ist je nach der Spezies verschieden, weil eben das Mengenverhältnis der beiden Farbstoffe mit der Art sich ändert. Bald überwiegt das Phykocyan, bald das Phykoerythrin oder halten sich beide die Wage. Die Anordnung der Kurven wurde im allgemeinen mit fallendem

Verhältnis der beiden Extinktionsmaxima (Phykocyan : Phykoerythrin) getroffen. Aber auch innerhalb ein und derselben Art variiert mehr minder das Mengenverhältnis der beiden Farbstoffe. Bei *Phormidium Retzii* var. *nigro-violacea* fand ich zwar bei 2 Proben derselben Herkunft dieses Verhältnis zu 0,78 (Kurve nicht abgebildet) und 0,80 (Abb. 11), also annähernd gleich; die Lagerfarbe war demgemäß in beiden Fällen dieselbe. Bei *Phormidium subfuscum* (Abb. 16, 17) hingegen ergab die Analyse eines olivbraunen Rasens 0,76, die eines olivgrünen 0,99, und bei einem von einer anderen Lokalität stammenden *Ph. subfuscum* (Abb. 15) sogar nur 0,44 als Quotienten der maximalen Extinktionen. Diese Quotienten entsprechen nicht dem genauen Verhältnis der beiden Farbstoffe in der Pflanze, denn schon beim Extrahieren wird von dem mit Quarzsand verriebenen Organpulver und beim nachfolgenden Filtrieren des Extraktes vom Filtrierpapier stets etwas mehr Phykoerythrin als Phykocyan zurückgehalten, so daß die hier angeführten Quotienten etwas größer als in Wirklichkeit sind, und außerdem ist, weil die Kurven der beiden Farbstoffe sich teilweise decken, an jedem der beiden Maxima auch der andere Farbstoff, wenn auch in geringerem Maße, beteiligt. Weil diese beiden Momente aber für alle Kurven zutreffen, so stellen die Quotienten immerhin einen kurzen Ausdruck für das Mengenverhältnis der Pigmente in erster Annäherung dar.

Läßt man die extrahierten Farbstoffgemische von indigo-blauer, violetter oder rotvioletter Färbung im Dunkeln stehen, so nehmen sie, oft trotz Toluolzusatz, nach einiger Zeit eine mehrweniger rosarote Färbung an, die Fluoreszenzfarbe ist fast orangefarben geworden; im Spektroskop ist der Phykocyanstreifen fast oder ganz verschwunden, nur das Band im Grün ist deutlich geblieben. Offenbar unterliegt in diesen Fällen das Phykocyan einer rascheren Zersetzung als das Phykoerythrin, so daß es zu diesem Farbenumschlag kommt.

Meine vielfachen Bemühungen, das extrahierte Farbstoffgemisch zum Krystallisieren zu bringen, von welchem ich mir ein getrenntes Auskrystallisieren der beiden Farbstoffe erhoffte, schlugen trotz des durch wiederholte Umfällung mit Ammoniumsulfat erzielten hohen Grades der Reinheit, bei Nachahmung der von K y l i n verwendeten Methode der fraktionierten Ausfällung, bei

Variierung der Reaktion des Farbstoffgemisches usw. durchweg fehl. Im besten Falle erhielt ich Farbstoffballen, aber keine Krystalle.

Bei Durchsicht der Literatur zeigt sich nun, daß viele Autoren dieses aus verschiedenen Schizophyceen isolierte Farbstoffgemisch in Händen hatten, aber nur wenige es als solches erkannten. Fr. G. Kützing schreibt 1853 in seiner philosophischen Botanik: „Das Phykoerythrin ist statt des Phykocyans in einigen Oscillarien z. B. *O. rubescens*, *Mougeotii* enthalten und da, wo es mit diesem zugleich auftritt, bildet es den *Color amethysteus* und *chalybeus*, der bei vielen Arten mit dem *C. aerugineus* wechselt.“ Diese vollständig richtige Ansicht verwischt sich schon bei Cohn (I) durch Einführung des Begriffes der Phykocyanmodifikationen: „Die purpurroten oder violetten Phykochromalgen enthalten Phykochrom, welches aus Chlorophyll und einer roten oder violetten, sonst aber von der blauen anscheinend nicht wesentlich verschiedenen Modifikation des Phykocyans zusammengesetzt, sich leicht in die spangrüne Nuance umwandelt.“ Das aus Florideen austretende Phykoerythrin „verhält sich dem Phykocyan so analog, daß insbesondere die purpurne Modifikation des Phykocyans sich von Phykoerythrin nicht sicher unterscheiden läßt. Die nahe Verwandtschaft des Phykocyan und Phykoerythrin . . . findet eine Stütze in dem Vorkommen des Phykochrom bei mehreren Florideen, deren nächste Verwandte Rhodophyll enthalten.“ Aus *Spirulina versicolor* gewann Cohn (II) ein Phykocyan, welches in dicker Schicht einen intensiv schwarzen Streifen vom Rot bis nahe an E zeigte, welcher in dünner Schicht in einen Streifen im Rot und einen im Grün gespalten war. Ganz besonders ist die treffliche Untersuchung der das Chlorophyll begleitenden Farbstoffe durch Askenasy (1867) hervorzuheben. Aus *Peltigera canina* erhielt er eine violettrote oder weinrote Flüssigkeit mit sehr kräftiger braungelber Fluorescenz, welche 2 ziemlich plötzlich beginnende Absorptionsstreifen erkennen ließ, den einen im Rot zwischen der Li- und Na-Linie, den anderen intensiveren an der Grenze von Gelb und Grün. „Die Fluorescenz zerfällt bei der Betrachtung durch ein Prisma in ein rotes und in ein gelbes Bündel, letzteres ist das intensivere. Die rote Fluorescenz beginnt im Rot und scheint sich dann weiter durch das Spektrum zu erstrecken, wiewohl nur schwach, während die gelbe Fluorescenz erst in der Nähe des zweiten Absorptionsstreifens beginnt und sich von da ebenfalls durch das ganze Spektrum erstreckt. Auch hier entsprechen den Maxima der Absorption Maxima der Fluorescenz. Es wird dies erklären, woher es rührt, daß, wenn ein rotes Glas, welches wesentlich nur Rot, Orange und wenig Gelb durchläßt, vor die Linse gehalten wird, der von der Linse in der Farbstofflösung erzeugte Lichtkegel ziemlich rein rot erscheint, während ein grünes Glas, welches die roten Strahlen nahezu ausschließt, vor die Linse gehalten, ein rein gelbes Bündel erzeugte.“ Der Farbstoff von *Collema plicatile* (?) lieferte eine blaue Lösung mit granatroter Fluorescenz und ziemlich dasselbe Absorptionsspektrum. „Nur das Intensitätsverhältnis der beiden Absorptionsstreifen ist gerade das umgekehrte, indem der Absorptionsstreifen im Rot bei der Collemafarbstofflösung der intensivere, der im Gelb beginnende der schwä-

chere ist . . . Eine aufmerksame Betrachtung der optischen Eigenschaften des gelösten Farbstoffes von *Collema* und *Peltigera* bringt mich zu der Vermutung, daß beides nur Gemische von 2 Farbstoffen in verschiedenen Mengenverhältnissen sind. Der eine dieser Farbstoffe, dem der Absorptionsstreifen im Rot und die rote Fluorescenz zukommt, ist in *Peltigera* in geringerer, in *Collema* in größerer Menge enthalten als ein zweiter, dem die im Gelb beginnende Absorption und die gelbe Fluorescenz zukommt. Die Absorption dieses letzteren würde, wenn man ihn rein darstellen könnte, wie auch die Fluorescenz einige Ähnlichkeit mit der des Phykoerythrins haben. Der erstere dieser hypothetischen Farbstoffe aber, oder wenigstens einer, der ihm vollständig entspricht, kommt nun in der Tat im Pflanzenreich vor, und es ist mir gelungen, ihn aus einer *Oscillarinee* (*Oscillaria antliaria*?) in größerer Menge darzustellen . . . Die erwähnte *Oscillarinee* . . . gibt eine Flüssigkeit, die in dünnen Schichten meergrün, in dickeren schön himmelblau gefärbt ist und eine überaus energische rote Fluorescenz zeigt. Das Absorptionsspektrum hat nur einen sehr intensiven Absorptionsstreifen. Die Stelle im Spektrum, wohin das Maximum und der Beginn der Absorption fällt, stimmt vollkommen mit dem Absorptionsstreifen überein, den die 2 vorher beschriebenen Farbstofflösungen im Rot zeigen . . . Aus einer braunen *Oscillarie* habe ich einen Farbstoff bisher nur in geringer Menge dargestellt, der dem eben besprochenen sehr ähnlich war. Es scheint aber auch in einigen *Oscillarineen* ein Farbstoff vorzukommen, der sich mehr dem Collemafarbstoff anschließt.“ Überraschen muß der Scharfblick, mit welchem schon dieser Forscher die Begleitpigmente des Chlorophylls in frei und in Flechten lebenden Schizophyceen erkannt hat. Kraus und Millardet hingegen sprechen von dem in verschiedenen blauen und roten Nuancen auftretenden Phykocyan. Reinke (I) bildet das Absorptionsspektrum eines blauen, rot fluoreszierenden Auszuges aus einer *Oscillaria* ab; es besitzt nach ihm 4 Bänder, von denen aber das erste zwischen λ 635 bis 594 dem Phykocyan, das zweite, λ 580–550, dem Phykoerythrin zuzusprechen wäre. Die aus einer dunklen *Oscillatoria* erhaltene rotviolette (purple) Lösung, welche Phykocyan genannt wurde, stellt nach Sorby eine Mischung aus 2 Farbstoffen, einem rotvioletten (purple) mit dem Absorptionsmaximum bei λ 621 und einem blaßroten (pink) Farbstoff mit dem Maximum bei λ 567 dar. Durch vorsichtiges Erwärmen einer zwecks Verhinderung der raschen Fäulnis mit Lumpzucker kalt gesättigten Phykocyanlösung aus dieser Alge auf 75°C soll der blaßrote Farbstoff in eine unlösliche Substanz umgewandelt werden und sich abfiltrieren lassen, so daß das Filtrat nur das „purple phycocyan“ enthält, welches, wenn die Umwandlung eine vollständige war, nur das Absorptionsband im Rot bei λ 621 aufweist, während das zweite Band am gelben Ende des Grün verschwunden ist. Ich zweifle nicht daran, daß Sorby gleichfalls das Phykocyan-Phykoerythringemisch vorlag; auch ist es nicht unwahrscheinlich, daß die Koagulationstemperaturen der beiden Farbstoffe etwas verschieden sind, so daß eine, wenn auch vielleicht nur teilweise Trennung derselben durch vorsichtiges Erhitzen bewerkstelligt werden kann. Hinsichtlich der Aufspaltung der Florideenfarbstoffe, in welchen Sorby nicht weniger als

6 Teilpigmente annahm, schoßer allerdings über das Ziel (s. S. 197). Nebelung gibt für ein aus einem Phormidium hergestelltes Phykocyan von himmelblauer Farbe und rosenroter Fluorescenz gleichfalls 2 Absorptionsstreifen an, einen zwischen λ 625—610, den anderen zwischen λ 570—560 und denkt an eine Verwandtschaft mit dem von Cohn aus *Spirulina* isolierten Farbstoff. Nádson extrahierte aus einem angeblich reinen *Oscillarien*material ein blaues Phykocyan mit carminroter Fluorescenz, welches im Spektrum 2 Bänder aufwies, eines zwischen B und D, das zweite zwischen D und E. Höchstwahrscheinlich lagen beiden zuletzt genannten Autoren Farbstoffgemische vor. Gaidukov (I) verweist auf die Ähnlichkeit des violetten Farbstoffes der *Oscillatoria sancta* mit dem gewisser Rotalgen, welche aber nach Kylin (I, II) neben Phykoerythrin Phykocyan führen. Derselbe Autor (III) untersuchte mit dem Mikrospektralphotometer Engelmanns u. a. auch die blaugrünen Zellen der *Oscillatoria aerugineo-caerulea* Kg., synonym mit der von mir untersuchten *Lyngbya aerugineo-caerulea* (Abb. 12) und will 2 Phykocyanbänder (λ 625 und 610) und ein Phykoerythrinband bei λ 575 gefunden haben. Violette Krystalle, welche er aus *Oscillatoria sancta* erhielt, ließen im wesentlichen 2 Helligkeitsminima bei λ 625 und 575 erkennen. Molisch (III) beschrieb außer dem blauen, bereits erwähnten Phykocyan noch eine blauviolette und violette Phykocyanmodifikation. Die letztere, aus *Scytonema Hofmanni* Ag. gewonnen, gab eine anilviolette Lösung mit venetianischroter Fluorescenz; auf Grund der Beobachtung ihres Absorptionsspektrums im Zeisschen Vergleichsspektroskop werden 4 Absorptionsstreifen angegeben, darunter stimmt Band II zufolge seiner Lage zwischen λ 630—600 gut mit dem Phykocyanband überein, die Bänder III λ 675—565 und IV λ 555—540, welche bei größerer Schichtdicke ganz verschmelzen können, entsprächen dem Phykoerythrin, so daß ich die Vermutung habe, daß die violette Phykocyanmodifikation nichts anderes als ein Phykocyan-Phykoerythringemisch darstellt, in welchem das Phykoerythrin überwiegt. Darin bestärkt mich auch die für viel Phykoerythrin führende Algen charakteristische bräunlichschwarze oder schwärzlichgrüne Lagerfarbe dieser Alge, vor allem aber die von Molisch mitgeteilte Beobachtung, daß *Scytonema*auszüge nach längerem Stehen ihre ursprünglich violette Farbe nach Rosa oder Fleischrot verändern und zugleich eine dem Orangegelb sich nähernde Fluorescenz aufweisen — also dieselbe Erscheinung, welche ich an vielen meiner Phykocyan-Phykoerythringemische beobachten konnte. Noch sicherer erscheint mir als ein solches Farbstoffgemisch das von Molisch als blauviolette Modifikation beschriebene Phykocyan aus *Oscillatoria limosa* Ag., welches in Lösung blauviolett gefärbt ist und eine carminrote Fluorescenz besitzt, im Spektrum 3 Bänder aufweist, neben einem schmalen Band λ 655—650 2 breite dunkle Bänder λ 635—600 und λ 575—530. Ich habe das Absorptionsspektrum wässriger Extrakte aus derselben Alge von verschiedenen Standorten im Vergleichsspektroskop untersucht und stets nur 2 Maxima gefunden, deren Lage sehr gut mit den breiten von Molisch beobachteten Streifen übereinstimmt. Die Farbe der von mir gewonnenen Extrakte war blau- bis rotviolett, ihre Fluorescenz venetianischrot bis fast orangefarben. Die spektrophotometrierte

Probe (Abb. 8) lieferte eine blaue, carminrot fluoreszierende Lösung, wie dies auch Molisch angibt. Das Phykoerythrinmaximum ist in dieser Kurve aber infolge der Vorherrschaft des Phykocyan nur in Form einer Unstetigkeit der Kurve im absteigenden Ast angedeutet. Der Phykoerythringehalt der *Oscillatoria limosa* schwankt also beträchtlich. Auch Molisch, dem wir den Nachweis der Krystallisierbarkeit anderer wasserlöslicher Algenfarbstoffe verdanken, glückte es nicht, diese beiden „Phykocyanmodifikationen“ zum richtigen Auskrystallisieren zu bringen. Molisch untersuchte auch den Farbstoff von *Peltigera canina*, welchem wir schon bei Askenasy begegnet sind. Sein Spektrum erinnert an das von *Scytonema*; wenn man von der schwachen Endabsorption im Rot abieht, weist der *Peltigera*auszug nur 2 Absorptionsstreifen auf, deren Lage abermals so gut mit dem Phykocyan- und Phykoerythrinmaximum übereinstimmt, wie man es besser bei Benützung eines Spektroskops nicht erwarten kann. Kylin (II) beschreibt eine neue, aus einem nicht näher bestimmten *Phormidium* hergestellte Phykocyanmodifikation, welche er „blaues Phykocyan“ benannte und der von Molisch unter dem gleichen Namen beschriebenen Modifikation sehr ähnlich fand. Ihre Lösung fluoresciert carminrot. Die von Kylin konstruierte Kurve hat eine große Ähnlichkeit mit einigen von mir hier wiedergegebenen Kurven. Das erste Maximum gibt Kylin für λ 618–607, das Minimum für λ 589–585, das zweite Maximum für λ 577–573 an. Die Übereinstimmung mit meinen Kurven ist eine sehr gute, nur das seinem zweiten Maximum entsprechende Phykoerythrinmaximum meiner Kurven beobachtete ich in der Regel etwas weiter rechts. Doch könnten solche Verschiebungen wenigstens zum Teil durch Summierung der teilweise ineinander greifenden Absorptionen des Phykocyan und Phykoerythrin erklärt werden, wie es die Beispiele einer solchen S. 198 durchgeführten Kurvenaddition der beiden Farbstoffe zeigen. Krystalle erhielt Kylin von dieser Modifikation, die ich für ein Farbstoffgemisch halte, gleichfalls nicht. Aus *Ceramium rubrum* stellte Kylin (I) allerdings ein krystallisierbares Phykocyan dar, welches er als „blauviolette Phykocyan“ bezeichnet. Es besitzt gleichfalls eine carminrote Fluoreszenz und weist auch 2 Absorptionsmaxima auf, das eine bei λ 618–613, das zweite bei λ 553–549, dazwischen ein Minimum bei λ 577–573, ist also gleichfalls sehr ähnlich den aus einzelnen Schizophyceen von mir dargestellten Farbstoffauszügen; doch will ich in die Einheitlichkeit desselben keine Zweifel setzen, wenn auch das Auftreten von Krystallen bei der durch die nahe Verwandtschaft der beiden Phykochromoproteide gegebenen Möglichkeit der Bildung von Mischkrystallen keinen strikten Beweis für die chemische Individualität dieses Farbstoffes vorstellt. Auch in *Dumontia filiformis* und wahrscheinlich auch in *Porphyra hiemalis* fand Kylin (II) dieses blauviolette Phykocyan. Das zweite Maximum desselben fällt bei letzterer Alge infolge einer wahrscheinlichen Verunreinigung mit Phykoerythrin, wie Kylin vermutet, in den Spektralbezirk λ 561–553, also zwischen die beiden zweiten Maxima des blauen (λ 577–573) und des blauvioletten (λ 553–549) Phykocyan Kylin's. Auf die in *Phormidium foveolarum* von mir (I) aufgefundenen wasserlöslichen Farbstoffe werde ich demnächst

in einer ausführlicheren Publikation zu sprechen kommen. Endlich sei noch an die interessante jüngst von Molisch (IV) im Wiener Prater beobachtete blutrote Wasserblüte erinnert, hervorgerufen durch *Oscillatoria subescens* D. C., welche schon von Kützing (II) wegen ihres hohen Phykoerythringehaltes erwähnt wird. Daß sich auch diese Alge in die Gruppe der Phykocyan und Phykoerythrin führenden Schizophyceen einreihen lassen dürfte, geht aus der Bemerkung von Molisch hervor, daß der Farbstoff dieser Alge weder mit dem blauen noch mit dem violetten Phykocyan übereinstimme, jedoch dem letzteren näherstehe.

III. Die neben Phykoerythrin nur wenig oder kein Phykocyan führenden Schizophyceen.

Nostoc spec.

Hierzu Abb. 22 und Tabelle XXII.

Aus einem feuchten Straßengraben bei Hirschberg i. B. Lagerfarbe: Dunkelolivgrün. Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Hellrosa. Fluorescenz: Orange. Absorptionskurve: Die Zanke bei λ 625 spricht für das Vorhandensein einer wenn auch geringen Menge Phykocyan. Verhältnis der beiden Maxima 0,53.

Phormidium luridum (K.g.)
Gom. var. fusca.

Hierzu Abb. 23 und Tabelle XXIII.

Aus dem Lager der *Microchaete calotrichoides* (?) isoliert. Speziesreinkultur. Lagerfarbe: Hellsepiabraun. Die Fäden erscheinen im Mikroskop fast farblos. Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Rotviolett. Fluorescenz: Orange. Farbe der Ammoniumsulfatfällung: Rotviolett. Verhältnis der beiden Maxima: 0,26.

Microchaete tenera Thur. (?)

Hierzu Abb. 24a, 24b und Tabellen XXIVa, XXIVb.

Aus Moldauwasser isoliert. Speziesreinkultur. Lagerfarbe: Olivgrün. Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Intensiv rosa. Fluorescenz: Orangegelb. Farbe der Ammoniumsulfatfällung: Blaustichig rot. Absorptionskurven: 24a zeigt ein niedriges, aber deutlich ausgeprägtes Phykocyanmaximum. 24b. Die von λ 601 an in engen Intervallen ausgeführte Messung läßt in dem von

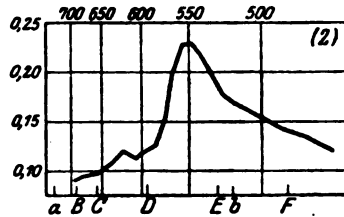


Abb. 22.

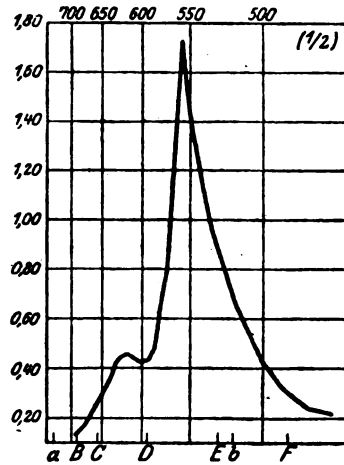


Abb. 23.

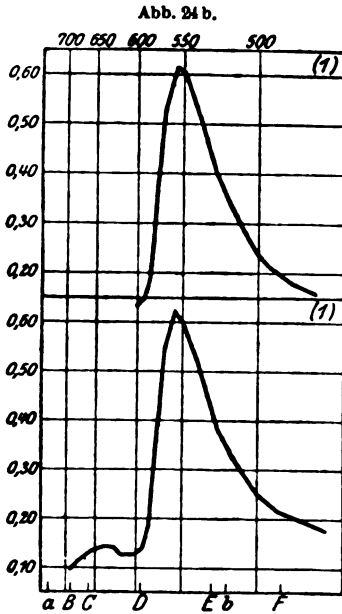


Abb. 24 a.

1 559 absteigenden Ast kein weiteres Maximum erkennen. Verhältnis der beiden Maxima: 0,23.

Phormidium luridum (Kg.)

Gom. var. violacea.

Hierzu Abb. 25, 26 und Tabellen XXV, XXVI.

Aus Moldauwasser isoliert. Speziesreinkultur. Lagerfarbe anfänglich meist braunrot oder braunviolett, in älteren Kulturen sepiabraun.

25: Lagerfarbe: Hellsepiabraun, stellenweise violett. Trockengewicht und Volumen des für die Extraktion verwendeten Wassers: 0,060 g und 6 ccm Wasser. Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Rotviolett. Fluoreszenz: Bräunlichorange. Farbe der Ammoniumsulfatfällung: Rotviolett. Absorptionskurve weist nur eine Andeutung des Phykocyanmaximums auf.

26: Lagerfarbe: Hellsepiafarben. Trockengewicht und Volumen des für die Extraktion verwendeten Wassers: 0,035 g und 3,5 ccm Wasser. Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Intensiv rosa. Fluoreszenz: Orange gelb. Farbe der Ammoniumsulfatfällung: Blaustichig rot. Absorptionskurve: Das Phykocyanmaximum ist gänzlich verschwunden. Kurve weist nur 1 Maximum, das des Phykoerythrins, auf.

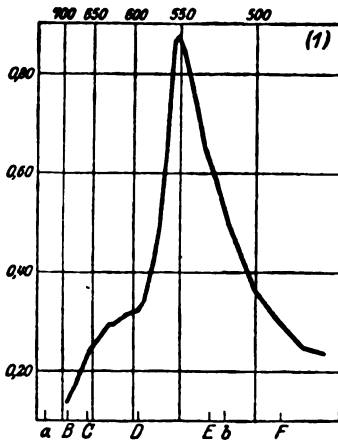


Abb. 25.

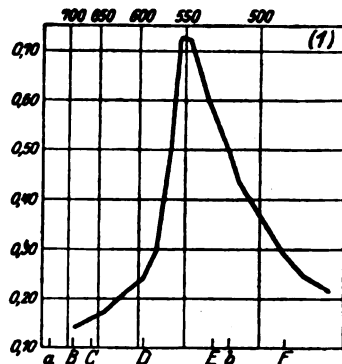


Abb. 26.

Porphyridium cruentum.

Hierzu Abb. 27a, 27b und Tabellen XXVIIa, XXVIIb.

Von einem feuchten Stein isoliert. Speziesreinkultur (Agarausgüßplatten). Lagerfarbe: In der Natur blutrot, in Kultur erscheinen die Kolonien im durchfallenden Licht phykoerythrinfarben. Extrakt 1 mal filtriert, nicht umgefällt. Farbe des Filtrates: Rosa. Fluorescenz: Orangegelb. Farbe der Ammoniumsulfatfällung: Blaustichig rot. Absorptionskurven: 27a: Die geringfügige Unstetigkeit der Kurve bei λ 630—615 deutet vielleicht auf Spuren von Phykocyan auch bei dieser Alge. 27b: Der mit engen Intervallen durchmessene von λ 548 absteigende Ast weist keine weiteren Maxima mehr auf.

Die Abgrenzung dieser Gruppe von Schizophyceen gegen die vorangehende ist wegen des stetig sich verringernden Phykocyan gehaltes willkürlich. Ich habe sie aber dennoch aufgestellt, weil sie jene Algen zu umfassen hätte, in welchen das Phykocyan gänzlich durch Phykoerythrin vertreten wird. Gerade aber eine solche Feststellung ist auf Grund der Absorptionskurven der wässrigen Extrakte unsicher. Der den Phykocyan gehalt kennzeichnende Gipfel wird mit abnehmendem Mengenverhältnis dieses Farbstoffes zum Phykoerythrin immer kleiner und erscheint

schließlich nur mehr als eine geringfügige Unstetigkeit der Kurve, welche bereits in den Fehlerbereich der Messung fällt, so daß es dann unmöglich ist, aus der Gestalt der Extinktionskurve auf das spurenweise Vorkommen oder gänzliche Fehlen des Phykocyans zu schließen. Das trifft z. B. auch für die blutrot gefärbte Luftalge *Porphyridium cruentum* (Abb. 27a) zu, welche nach den cytologischen Befunden Staehelins den Schizophyceen einzuordnen

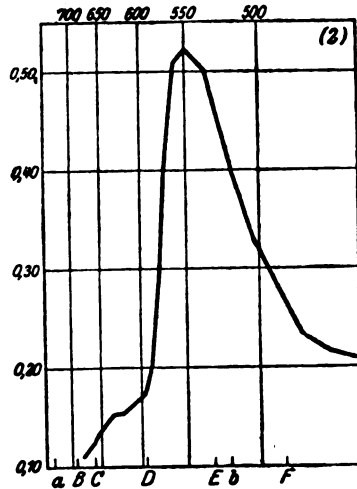


Abb. 27a.

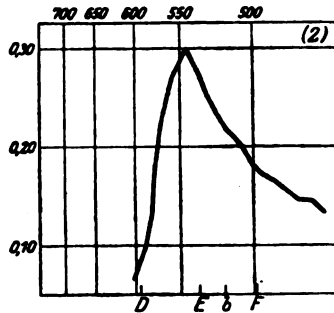


Abb. 27b.

ist, eine Anschauung, welche, wie mir scheint, durch die hier sichergestellte Identität ihres roten Farbstoffes mit dem Phykoerythrin der übrigen Schizophyceen bekräftigt wird.

Das in Schizophyceen aufgefundenene Phykoerythrin, seine Verschiedenheit vom Florideenrot.

Am reinsten erscheint mir die Absorptionskurve dieses Phykoerythrins in der für *Phormidium luridum* var. *violacea* ermittelten Kurve (Abb. 26). Sie weist nur ein Maximum auf, welches bei λ 552 liegt, von welchem Wert die Phykoerythrinmaxima der übrigen Kurven nicht wesentlich abweichen. Geringfügige Verschiebungen derselben wurden auch an verschiedenen Extrakten ein und derselben Alge gefunden, so daß ich ihnen keine zur Aufstellung verschiedener Modifikationen berechtigende Bedeutung beimessen kann. Aber auch im Zeisschen Vergleichsspektroskop ist für einen unvoreingenommenen Beobachter nur dieses eine starke Band im Grün zu sehen. Und darin liegt der wesentliche Unterschied zwischen diesem Phykoerythrin und dem Florideenrot, welches nach den wiederholten Messungen verschiedener Autoren [Stokes, Askenasy, Rosanoff, Pringsheim, Reinke (II), Schütt, Molisch (III), Kylin (I)] im wesentlichen 3 Absorptionsmaxima besitzt. Sie liegen nach den wohl genauesten Messungen Kyilins (I, II) folgend: I λ 569—565, II λ 541—537, III λ 498—492. Besonders dieses letztere Band ist durch seine Lage im Blau in der Gegend der Fraunhoferschen Linie F und seiner verhältnismäßig großen Intensität für das Phykoerythrin der Rhodophyceen charakteristisch. Das Maximum des von mir in Schizophyceen aufgefundenen Phykoerythrins deckt sich somit mit keinem der 3 Bänder des Rhodophyceenphykoerythrins, es fällt vielmehr ungefähr in die Mitte zwischen die Bänder I und II. Die Feststellung etwaiger anderer Maxima ist mir an meinen aus verschiedenen Schizophyceen dargestellten Phykoerythrin niemals gelungen, obwohl ich die größte Sorgfalt auf das Suchen nach eventuell vorhandenen Nebenmaximis verwendet habe. Ich habe wiederholt den in Betracht kommenden Spektralbereich mit möglichst engen Intervallen durchmessen (Abb. u. Tabelle 24b, 26, 27b) und stets nur eine von dem etwas links von λ 550 liegenden Maximum stetig abfallende Kurve erhalten, und besonders auffallend ist an diesem Phykoerythrin

die bereits sehr geringe Extinktion in der Gegend von F. Dies bedingt auch den zweiten augenfälligen Unterschied gegenüber dem Phykoerythrin der Rotalgen: Die Absorptionskurve des Schizophyceenphykoerythrins (Abb. 26) hat in etwa halber Höhe ungefähr nur die halbe Breitenausdehnung der Florideenrotkurve [Kylin (I)].

Um mich dieser sehr auffälligen Verschiedenheiten im Absorptionsvermögen dieser beiden Farbstoffe zu vergewissern, untersuchte ich auch das Florideenphykoerythrin. Dank des Entgegenkommens der biologischen Anstalt auf Helgoland stand mir zu diesem Behufe getrocknetes Material von *Porphyra spec.* zur Verfügung. Diese schon von Kylin (II) untersuchte Alge besitzt nach ihm neben Phykoerythrin auch Phykocyan und zwar die blauviolette Modifikation desselben.

Das Material lieferte nach 5tägigem Stehen mit Toluolwasser ein ziemlich intensiv rotviolett gefärbtes Extrakt, welches sehr lebhaft braunorange fluorescierte, also in ähnlicher Farbe wie die Phykocyan-Phykoerythringemische verschiedener Spaltalgen. Das Extrakt wurde abgehebert und mit Ammoniumsulfat gefällt. Die Fällung wurde abfiltriert, was mehrere Stunden in Anspruch nahm; mit Wasser aufgenommen löste sie sich nicht vollständig, immerhin ging aber noch ein großer Teil mit rotvioletter Farbe und bräunlichorangefarbener Fluorescenz in Lösung. Neben Phykoerythrin war auch Phykocyan nachweisbar; denn im Vergleichsspektroskop trat bei 20 mm Schichtdicke neben der sehr dunklen bei ca. λ 575 beginnenden Phykoerythrinabsorption mit dem für das Florideenrot charakteristischen Streifen bei F an der Grenze von Grün und Blau, noch ein hellerer Streifen im Rot zwischen λ 620—600, eben das Phykocyanband, auf.

Auch die capillaranalytische Untersuchung dieses einmal umgefällten Extraktes erwies den zusammengesetzten Charakter desselben: Im eingetauchten Filtrierpapierstreifen wanderte eine rote Zone, das Phykoerythrin, voran, dahinter folgte eine blaue, das Phykocyan — also gerade umgekehrt wie bei den aus Schizophyceen gewonnenen Farbstoffgemischen (*Oscillatoria Okeni*, *Phormidium Retzii* var. *nigro-violacea*, *Ph. subfuscum*, *Ph. autumnale* var. *olivacea*). Daraus könnte man also schließen, daß bei *Porphyra* und vielleicht auch bei anderen Florideen, umgekehrt wie bei den Schizophyceen, das Phykoerythrin die größere elektronegative Aufladung als das Phykocyan derselben besitzt. Dementsprechend war das Verhalten dieser rotvioletten Lösung bei dem nun folgenden Filtrieren. Das Filtrat war bläulichrot gefärbt und fluorescierte lebhaft in ausgesprochen orangegelber Farbe, verhielt sich also in dieser Beziehung fast wie eine reine Phykoerythrinlösung, während sich das Filter von dem zurückgehaltenen Phykocyan violett anfärbte. Nichtsdestoweniger zeigte noch das rote Filtrat im Vergleichsspektroskop bei 20 mm Schichtdicke einen, wenn auch sehr schwachen Phykocyanstreifen zwischen λ 625—600 im Rot; die Phyko-

erythrinabsorption begann sehr plötzlich bei λ 575 mit einem sehr starken Band, welches weiterhin im Grün allmählich an Intensität verlor, und ließ dann noch zwischen λ 505–480 das für das Florideenrot besonders charakteristische Band erkennen. Der Filtrerrückstand lieferte, mit wenig Wasser aufgenommen, nach dem Abzentrifugieren eine rotviolette, braunorange fluoreszierende Lösung, welche im Spektroskop das kombinierte Phykokyan-Phykoerythrinspektrum aufwies; es wurde also vom Filter auch Phykoerythrin in nicht geringer Menge zurückgehalten. Das rote Filtrat wurde abermals durch Zusatz von festem Ammoniumsulfat gefällt, die Fällung lieferte nach dem Filtrieren gelöst eine rosarote, orange fluoreszierende Lösung, welche noch einige Male filtriert und schließlich spektrophotometriert wurde.

Ich erhielt die nebenstehende Absorptionskurve (Abb. 28, hierzu Tabelle XXVIII) des 2mal mit Ammoniumsulfat umgefällten und einige

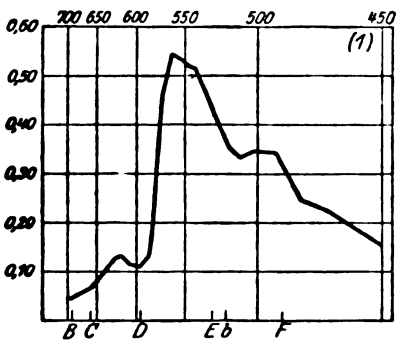


Abb. 28.

Mal filtrierten Porphyraextraktes. Das kleine Maximum zwischen C und D verrät noch den geringen Phykokyangehalt, das Hauptmaximum des Phykoerythrins bei λ 561 liegt nur wenig rechts von dem von Kylin bei λ 569 bis 565 beobachteten. Das zweite Maximum des Florideenrots, welches Kylin bei λ 541–537 feststellte, kommt bei meiner Kurve wegen der geringen Konzentration höchstens in Form einer leichten Unstetigkeit derselben zum Ausdruck, dafür er-

scheint das dritte Maximum des Phykoerythrins der Rhodophyceen bei λ 498–492 auch bei meiner Kurve bei λ 501–489 deutlich ausgeprägt.

Mit dem ursprünglichen aus Porphyra direkt erhaltenen, rotvioletten und braunorange fluoreszierenden Extrakt, welches also Phykokyan und Phykoerythrin enthält, wiederholte ich den S. 185 erwähnten Versuch Askenasys, durch vorgehaltene farbige Gläser die Fluoreszenzfarbe der beiden Farbstoffe getrennt zu beobachten. Als Lichtquelle diente eine Bogenlampe. Hinter einem vorgehaltenen Rubinglas leuchtet dieses nur durch Abzentrifugieren (nicht Filtrieren) geklärte Extrakt in intensivem, carminrotem Lichte auf, während in einer reinen Phykoerythrinlösung der Lichtkegel kaum zu sehen ist, weil in dieser Lösung die roten Strahlen eben keine nennenswerte Absorption erleiden und daher auch keine Fluoreszenz hervorrufen können. Das durch ein grünes Kupfer-Chromglas gegangene Licht erzeugt in beiden Lösungen nur die orangegelbe Fluoreszenz des Phykoerythrins, weil die grünen Lichtstrahlen das Phykokyan in viel geringerem Maße entsprechend der geringeren Absorption zur Aussendung des roten Lichtes zu erregen vermögen.

S. 186 wurde der Vermutung Ausdruck gegeben, daß die Befunde von Sorby, nach welchen die Koagulationstemperaturen des Phykokyans und

Phykoerythrins verschieden zu sein scheinen, zur Hoffnung berechtigen, daß man auf diesem Wege durch entsprechendes Erwärmen eines Gemisches dieser Farbstoffe eine der beiden Komponenten wenigstens annähernd rein gewinnen könnte. Diese Vermutung wird durch nachfolgenden Versuch mit dem Extrakt aus *Porphyra* bestätigt. Wird der rotviolette, braunorange fluoreszierende Auszug, welcher durch Abzentrifugieren geklärt wurde, vorsichtig erwärmt, so verändert sich seine Farbe beim Temperaturanstieg über 50° C allmählich, sie wird immer deutlicher rot und die Fluoreszenz geht verloren, jedoch nur scheinbar infolge der entstehenden Trübung; denn das Filtrat dieses erwärmten Extraktes ist rein rot und fluoresciert lebhaft orange. Offenbar wird die Phykocyan Komponente, deren violettes Koagulum auf dem Filter zurückbleibt, bei niedrigerer Temperatur als das Phykoerythrin ausgeflockt, so daß es auf diese Weise gelingt, den letzteren Farbstoff rein darzustellen.

Das so gewonnene Phykoerythrin lieferte nebenstehende Absorptionskurve (Abb. 29, hierzu Tabelle XXIX). Das Phykocyanmaximum ist verschwunden, die Kurve zeigt die Absorption des reinen Phykoerythrins. Auch hier ist infolge der geringen Konzentration das Minimum zwischen den 2 ersten Maximis des Phykoerythrins nicht ausgebildet, die kleine Zacke bei λ 548 dürfte ein Messungsfehler sein; das dritte Maximum bei F ist aber sehr deutlich. Des Vergleiches halber ist daneben die Absorptionskurve des Schizophyceenphykoerythrins (gestrichelt) dargestellt.

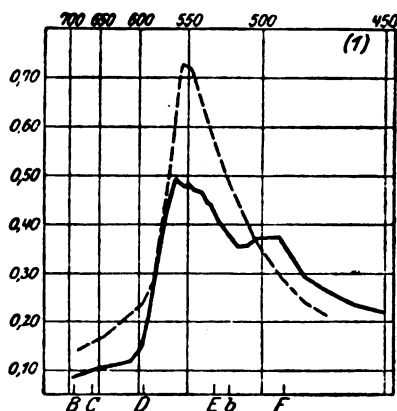


Abb. 29.

Das Phykoerythrin der Rhodophyceen unterscheidet sich also sehr wesentlich durch die Absorption von dem der Schizophyceen. Aber auch in der Färbung der Lösungen dieser beiden Farbstoffe glaube ich einen Unterschied beobachtet zu haben. Während das Phykoerythrin aus Schizophyceen auch in seiner reinsten Form, wie bei *Phormidium luridum* (Abb. 26) oder *Porphyridium cruentum* (Abb. 27 a) rosarote Lösungen und bläulich rotgefärbte Ammoniumsulfatfällungen gibt, ist die Lösung des reinen Florideenphykoerythrins eher als fleischrot zu bezeichnen. Diese etwa vorhandenen Färbungsunterschiede stünden mit dem Absorptionsvermögen der beiden Farbstoffe im Einklang, das Florideenrot verschluckt die blauen Strahlen stärker. Vielleicht aber ist dabei eine wenn auch spuren-

hafte Beimengung von Phykocyan beim Spaltalgenrot im Spiele. In der Fluoreszenzfarbe fiel mir kein Unterschied auf. Die markanten Unterschiede in der Absorption aber lassen es berechtigigt erscheinen, die neue bisher nur aus Schizophyceen dargestellte Phykoerythrinmodifikation von dem Florideenrot abzutrennen und als „Schizophyceenphykoerythrin“ zu bezeichnen.

Im Gegensatz zu den nicht wenigen in der Literatur beschriebenen Phykocyanmodifikationen sind, wenn man von den veralteten Angaben Schütts über α -, β -, γ -Phykoerythrin, wo es sich um chemisch veränderte Stoffe handelt, absieht, eigentlich nur 2 in Rhodophyteen aufgefundene Phykoerythrinmodifikationen von Kylin beschrieben worden, welche sich spektroskopisch jedoch nicht unterscheiden, sondern lediglich durch das Vorhandensein bzw. Fehlen der orangefarbenen Fluoreszenz.

Der Farbstoff des hier gleichfalls zu den Schizophyceen gestellten *Porphyridium oruentum* ist wiederholt untersucht worden. Nees gelang nicht die Extraktion des Farbstoffes aus „*Palmella oruenta*“, Rosanoff erklärte das wasserlösliche Pigment dieser Alge für identisch mit dem Phykoerythrin der Florideen mit den 3 Absorptionsbanden. Sorby schreibt ihr viel „pink phycoerythrin“, dessen Maximum bei λ 569 liegt, und daneben wenigstens eine Spur von „red phycoerythrin“ mit dem Maximum bei λ 497 zu. Die unmöglichen Angaben Phipsons brauchen hier nicht kommentiert zu werden. Von den 4 Absorptionstreifen, welche Nebelung für diesen Farbstoff anführt, sind die ersten 2 die wichtigsten: λ 575–562 und λ 550–540. Es dürfte ihm eine Spaltung des Phykoerythrinbandes vorgetäuscht worden sein. Gaidukov (II) hält den *Porphyridium*farbstoff auf Grund spektroskopischer Untersuchung mit dem Phykoerythrin sehr nahe verwandt und Molisch (III) erklärt ihn gleichfalls für Phykoerythrin, auf die große Ähnlichkeit seines Spektrums mit dem des aus *Ceramium* hergestellten Phykoerythrins hinweisend. Nach meinen Untersuchungen deckt sich der *Porphyridium*farbstoff hinsichtlich seiner Absorptionsverhältnisse völlig mit dem Schizophyceenphykoerythrin, wie ich es z. B. aus *Phormidium luridum* (Abb. 26) erhalten habe, und besitzt also nur ein Absorptionsmaximum nahe λ 550. Wenn nun andere Autoren mehr Bänder abgebildet haben, so mag dies vielleicht daran liegen, daß ihre Farbstofflösungen nicht genügend rein waren oder daß die Absorption im Spektrum nur subjektiv beurteilt wurde. Meine Farbstofflösungen waren zuverlässig rein, denn ich kultivierte das *Porphyridium oruentum* auf Agaraußplatten, auf welchen es, wenn auch nicht rasch, doch zu Kolonien heranwächst, welche einen Durchmesser von 1 cm und darüber erlangen. Die Färbung solcher Kolonien ist im durchfallenden Lichte pfirsichrot oder phykoerythrinrot, also etwas abweichend von der im auf fallenden Lichte blutrot erscheinenden Färbung, welche diese Alge in der Natur aufweist.

Für identisch mit dem Florideenphykoerythrin hält Kylin (III), welcher selbst bei Schizophyceen kein Phykoerythrin beobachtete, den von Bocat untersuchten roten Farbstoff der von Sauvageau beschriebenen „Myxophycées roses“ (*Oscillatoria Cortiana* rouge). Doch bedürfen diese Befunde Bocats nach den Ergebnissen meiner Untersuchungen der Farbstoffe rotgefärbter Schizophyceen dringend einer Nachprüfung. Auch aus den von Gaidukov (I) für *Oscillatoria sanota* und *O. caldarium* abgebildeten Absorptionskurven glaubt Kylin (III) entnehmen zu können, daß diese Algen das durch 3 Bänder gekennzeichnete Phykoerythrin besitzen.

In jüngster Zeit hat endlich Teodoresco (I, II), welcher den oben erwähnten Vermutungen Kylins beipflichtet, seine auf die Auffindung von Phykoerythrin bei Schizophyceen gerichteten Untersuchungen mitgeteilt. Nach mannigfachen vergeblichen Versuchen erhielt er endlich aus einem von der Norm abweichend gefärbten, im Bukarester botanischen Garten aufgefundenen *Nostoc commune* ein rotes, orange fluoreszierendes Extrakt, dessen Absorptionsspektrum er photographierte. Die veröffentlichten Photogramme sind leider sehr undeutlich reproduziert, es sollen aber 3 Absorptionstreifen zu beobachten sein (I λ 566, II λ 535, III λ 496), deren Intensität in derselben Reihenfolge abnimmt. Er hält daher diesen Farbstoff mit dem Florideenrot für identisch. Aus einer anderen *Nostoc*-probe erhielt er aber ein violettes Extrakt, welches nur 2 Bänder aufwies: I bei λ 616 und II bei λ 565. Beide Bänder waren fast von gleicher Intensität. Das zweite Band bei λ 565 erklärt er als das des Phykoerythrins, welches nur dann die 3 Bänder getrennt zeigen soll, solange die Lösung genügend rein ist. Wenn aber das Extrakt zuviel Verunreinigungen enthalte, so ergebe sich im Spektroskop nur ein einziges bei λ 566 ziemlich plötzlich einsetzendes und gegen das violette Ende an Stärke allmählich abnehmendes Band. Ich glaube aber gerade aus dieser von ihm mitgeteilten Beobachtung entnehmen zu können, daß das von ihm aus *Nostoc* gewonnene Phykoerythrin mit meinem Spaltalgenrot identisch ist, zumal ich dasselbe aus dem von mir untersuchten, nicht näher bestimmten *Nostoc* (Abb. 23) gleichfalls gewonnen habe, bei welchem Phykocyan auch nur in Spuren vorkommt. Die Spektrumphotographie ist eben mit Fehlern behaftet (Weigert). In den violetten und blauen Extrakten aus *Nostoc* gelang es aber Teodoresco das Phykoerythrin vom Phykocyan durch Capillarisation im Filtrierpapier zonenweise zu trennen, es genügten ihm aber die so erhaltenen Mengen für eine spektroskopische Untersuchung nicht. Doch konnte ich zeigen, daß man auf dem Wege der Capillarisation, welche ich ohne Kenntnis der Befunde Teodorescos angewendet habe, für spektrophotometrische Messungen genügende Farbstoffmengen erhalten kann. Wenn ich auch in all den von mir untersuchten Schizophyceenarten neben Phykocyan nur die neue Phykoerythrinmodifikation aufgefunden habe, so soll damit die Möglichkeit der Auffindung von typischem Florideenrot in anderen Arten nicht rundweg in Abrede gestellt werden. Die bisherigen Angaben darüber erscheinen mir zweifelhaft. In Übereinstimmung mit meinen Befunden aber stehen all die vielen, verstreuten Angaben früherer Beobachter, welche

in den wässrigen Auszügen aus verschiedenen Schizophyceen neben dem Phykocyanband im wesentlichen nur noch einen einzigen, eben dem hier beschriebenen Phykoerythrin zugehörigen Streifen gesehen haben¹⁾.

Übereinstimmung von errechneten und gemessenen Absorptionskurven.

Die Schizophyceen der I. Gruppe liefern reines Phykocyan, die der III. Gruppe reines oder fast reines Phykoerythrin. Addiert

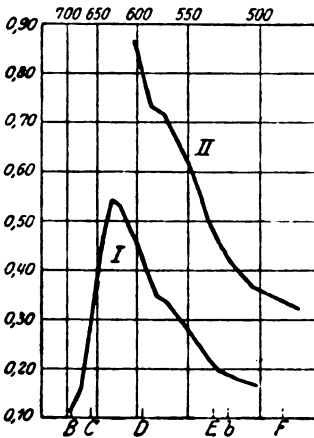


Abb. 80.

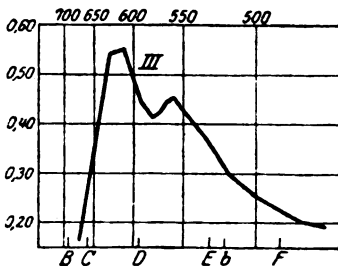


Abb. 81.

man nun die zu ein und derselben Wellenlänge gehörigen relativen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = -\log \text{tg } \varphi$, wie sie in den Tabellen des Anhangs verzeichnet sind) je einer Art aus der I. und III. Gruppe, so erhält man „Mischungskurven“, welche alle Eigentümlichkeiten der Absorptionskurven der in der II. Gruppe vereinigten und neben Phykocyan auch Phykoerythrin führenden Schizophyceen aufweisen, wodurch der kombinierte Charakter dieser Kurven aufs beste veranschaulicht wird. Es folgen einige Beispiele solcher Kurvenaddition. Sie sind so gewählt, daß mit der gleichen Menge Phykocyan steigende Phykoerythrinmengen „gemischt“ wurden. Besonders verwiesen sei auf die durch die Summierung der Extinktionskoeffizienten bedingte Verschiebung des Phykoerythrinmaximums gegen das rote Ende des Spektrums. Be-

treffs der den hier abgebildeten Kurven I–VI (Abb. 30–34) zugrunde liegenden Zahlen sei auf die entsprechenden Tabellen des Anhangs verwiesen.

¹⁾ Brieflich teilt mir Prof. Dr. N. Wille eine von ihm gemachte, jedoch nicht publizierte Beobachtung mit, welche gleichfalls hierher gehört: 1888 fand er in 3 Faden Meerestiefe ein auf *Laminaria saccharina* epiphytisch lebendes Phormidium, welches ganz florideenrot war und Phykoerythrin enthielt.

Kurve I: Summierung der Absorptionskurven von *Phormidium autumnale* var. *aeruginea* (Abb. 5) und *Nostoc* spec. (Abb. 22). Hierzu Tabelle XXXa. Das Phykoerythrinmaximum ist fast gänzlich verschwunden, der Phykoerythringehalt macht sich nur mehr als eine bereits bei λ 575 beginnende Unstetigkeit des absteigenden Astes der Kurve bemerkbar. Hinge-

wiesen sei auf die Ähnlichkeit dieser Kurve mit der von *Oscillatoria limosa* (Abb. 8), wo die Unstetigkeit schon bei λ 581 einsetzt. Kurve II: Summierung der Absorptionskurven von *Phormidium autumnale* var. *aeruginea* (Abb. 5) und *Porphyridium cruentum* (Abb. 27b); hierzu Tabelle XXX b. Trotz der höheren Phykoerythrinbeimischung kommt es noch nicht zur Ausbildung eines zweiten Maximums. Die Kurve wird bei λ 581 unstetig, also an derselben Stelle wie die der *Oscillatoria limosa* (Abb. 8).

Kurve III: Summierung der Absorptionskurven von *Phormidium autumnale* var. *aeruginea* (Abb. 5) und *Porphyridium cruentum* (Abb. 27a); hierzu Tabelle XXXI. Das zu erwartende Phykoerythrinmaximum ist hier bereits ausgebildet und erscheint gleichfalls nach links von λ 548 nach λ 559 verschoben. Man beachte die Ähnlichkeit dieser kombinierten Kurve mit der etwa für *Oscillatoria Okeni* angegebenen (Abb. 7).

Kurve IV: Summierung der Absorptionskurven von *Phormidium autumnale* var. *aeruginea* (Abb. 5) und *Phormidium luridum* (Abb. 25); hierzu Tabelle XXXII. Obwohl der maximalen Absorption nach das Phykocyan das Phykoerythrin überwiegt, so ist doch in der kombinierten Kurve der Phykoerythringipfel etwas höher als der Phykocyanipfel. Das Phykoerythrinmaximum erleidet auch hier durch die Summierung eine Verschiebung nach links von λ 554 nach λ 559. Die Ähnlichkeit mit der Kurve von *Oscillatoria amoena* (Abb. 10) ist augenfällig.

Kurve V: Summierung der Absorptionskurven von *Phormidium autumnale* var. *aeruginea* (Abb. 5) und *Ph. luridum* var. *fusca* (Abb. 23); hierzu Tabelle XXXIII. Während die Maxima ihre Lage behaupten,

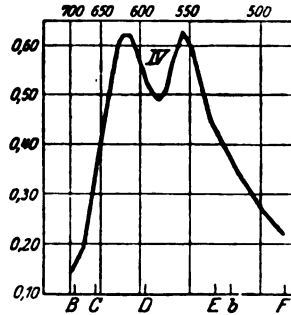


Abb. 82.

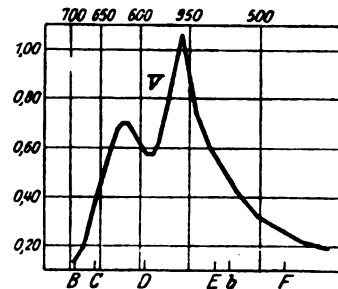


Abb. 83.

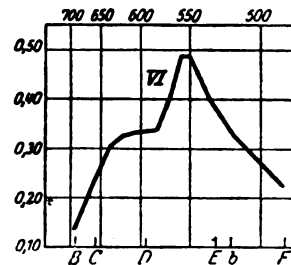


Abb. 84.

verschiebt sich das Minimum der *Ph. luridum* var. *fusca*-Kurve (Abb. 23) von λ 601 nach λ 587. Die Kurve ähnelt sehr den Absorptionskurven von *Phormidium subfuscum* (Abb. 16, 17). Bei allen diesen Kurven ist der Phykocyanipfel mehr stumpf, der Phykoerythringipfel spitz geformt.

Kurve VI: Summierung der Absorptionskurven von *Phormidium laminosum* var. *aeruginea* (Abb. 2) und *Phormidium luridum* var. *violacea* (Abb. 26); hierzu Tabelle XXXIV. Das Phykocyanmaximum ist nur mehr durch eine Unstetigkeit des aufsteigenden Kurvenastes wie bei *Phormidium autumnale* var. *olivacea* (Abb. 19) angedeutet. Der Phykoerythringipfel zeigt auch hier die Verschiebung nach links von λ 548 nach λ 559.

Beziehungen der natürlichen Färbung der Schizophyceen zu den in ihnen vorkommenden wasserlöslichen Farbstoffen.

Den Überblick über das bereits Gesagte und die noch zu besprechenden Beziehungen zwischen der natürlichen Färbung der verschiedenen untersuchten Schizophyceenarten zu der Art und dem Gehalt der wasserlöslichen Pigmente soll folgende Tabelle erleichtern.

Auch in dieser Tabelle sind die Schizophyceen nach steigendem Phykoerythringehalt angeordnet. Man erkennt ohne weiteres, daß sich die Farbe des Extraktes und der Fluorescenz immer ausgesprochener der des reinen Phykoerythrins nähert, je mehr es von diesem Farbstoff enthält. All die verschiedenen Nuancen der Fluorescenz und der im durchfallenden Lichte betrachteten Auszüge sind nichts anderes als die Mischfarben der Phykocyan-Phykoerythringemische. Wo jedoch der blaue Farbstoff den roten an Menge weit übertrifft, gibt jener die Farbe und Fluorescenz des Farbstoffgemisches an. Ein blaues, carminrot fluoreszierendes Extrakt kann daher sehr wohl auch etwas Phykoerythrin enthalten, das muß in jedem Falle erst die nähere Untersuchung ergeben. Demgemäß bilden auch die Färbungen der Ammoniumsulfatfällungen eine kontinuierliche Reihe vom Blau des Phykocyan bis zum Rot des Phykoerythrins.

Auch die Lagerfarbe und demnach auch die im Mikroskop wahrnehmbare Färbung der Zellen zeigt deutliche Beziehungen zum Phykoerythringehalte.

Die nur Phykocyan führenden Schizophyceen besitzen die schön blaugrüne oder spangrüne Lagerfarbe, welche ihnen den Namen Blualgen eingebracht hat. Schon Kützing (I) erklärt die spangrüne Färbung solcher Algen, wie auch einzelner Rhodophyceen aus dem Vorhandensein des blauen Phykocyan. Beimengung von Phykoerythrin führt zur Entstehung

Nr. der Abbildung u. Tabelle	Spezies *)	Farbe des Lagers	Farbe des Extraktes im durchfallenden Licht	Farbe der Fluoreszenz	Farbe der Ammoniumsulfidfällung	Lage des		Verhältnis der maximalen Extinktionskoeffizienten
						Phykocyan maximums	Phycoerythrin maximums	
1	Phormidium laminosum Gom. var. aeruginosa *	dunkelblaugrün (spangrün)	intensiv blau blau mit grünl. Stich	carminrot	blau	bei 2	625	1,94
2							615	
3							615	
4	Phormidium Corium Gom.	blaugrün	"	"	"			
5	Phormidium autumnale (Ag.) Schmidt var. aeruginosa	fast chlorophyllgrün	"	"	"			
6	Oscillatoria tenuis Ag.	blaugrün (spangrün)	grünlichblau	"	"		608	
—	Oscillatoria formosa Bory	dunkelblaugrün	blau	"	"		615	
—	Anabaena spec.	blaugrün	dunkelblau	"	"		680	
—	Phormidium Retzii (Ag.) Gom. var. aeruginosa	"	blau	"	"		615	
7	Oscillatoria Okeni Ag.	"	dunkelblau	carminrot (bräunl. Stich)	cyanblau		615 581	569
8	Oscillatoria limosa Ag.	schwärzlich-olivgrün	blau	carminrot	blau		615	559
9	Phormidium favosum (Bory) Gom. *	schwärzlich-olivgrün, fast blaugrün	intensiv blau (indigo)	braunrot			625 581	1,07
10	Oscillatoria amoena (Kg.) Gom. *	"	cyanblau	venezianisch-rot			625 587	0,92
11	Phormidium Retzii (Ag.) Gom. var. nigro-violacea Wille *	schwärzlich-olivgrün, stellenweise violett	intensiv blauviolett	braunrot	blauviolett		615 594	0,80
12	Lyngbya aeruginosa-caerulea (Kg.) Gom. *	schwärzlich olivgrün	hellindigoblan	venezianisch-rot	"		615 587	0,76
14	Microchaete calotrichoides Haug. (?) *	"	intensiv velichenblau	"	violett		625 594	0,66
16	Phormidium subfuscum Kg. *	olivbraun, stellenweise violett olivgrün	blauviolett	rotbraun	blauviolett	bei 2	625 587	0,44
15							625 587	
16							625 587	
17	Phormidium laminosum Gom. var. olivacea-fusca	olivgrün bis olivbraun	indigoblan	bräunlichrot	cyanblau		625 581	0,99
18							615 594	
19	Phormidium autumnale (Ag.) Schmidt var. olivacea *	schwärzlich-olivgrün	blauviolett	venezianisch-rot	"		625 587	0,83
20							625 587	
22	Nostoc spec.	dunkelolivgrün	hellrosa	orange	rotviolett		625 559	0,83?
23	Phormidium luridum (Kg.) Gom. var. fusca *	hellsepiabraun	rotviolett	"			615 601	0,26
24 a	Microchaete tenera Thur. (?) *	olivgrün	intensiv rosa	orange	blauschichtig rot		625 608	0,28
25	Phormidium luridum (Ng.) Gom. var. violacea *	braunviolett	rotviolett	bräunlichorange	rotviolett		554	
26	Porphyridium cruentum Naeg. *	hellsepiabraun	intensiv rosa	orange	blauschichtig rot		552	548
27 a							blutrot	

*) Das dem Speziesnamen nachgesetzte Sternchen bedeutet: Speziesreinkultur. Die übrigen Arten wurden nicht in Kultur genommen.

olivgrüner Lagerfärbungen, und diese nähern sich mit Zunahme der roten Komponente immer mehr einem ausgesprochen braunen Farbenton. Aber nicht immer gibt sich die Phykoerythringegenwart in der Lagerfärbung kund, ein lehrreiches Beispiel gibt *Microchaete tenera* (?) (24a), bei welcher trotz sehr großen Phykoerythrinreichtums nur eine olivgrüne Lagerfärbung zustande kommt. Und auch dem olivgrünen *Nostoc* (Abb. 22) würde man äußerlich seinen hohen Phykoerythringehalt nicht ansehen. Schizophyceen endlich, welche fast nur noch Phykoerythrin führen, können violette und rote Färbungen aufweisen, so *Phormidium luridum* (Abb. 26) und *Porphyridium oruentum* (Abb. 27). Kützing (II) erklärte ganz richtig den „color amethysteus“ durch Gegenwart oder Vorherrschaft des Phykoerythrins. Später aber wurden diese Verhältnisse nicht immer zutreffend erkannt. Besonders Kohl will all die mannigfaltigen natürlichen Färbungen der Spaltalgen nur aus dem wechselnden Mengenverhältnis der 3 von ihm in diesen Algen nachgewiesenen Farbstoffe, Chlorophyll, Phykocyan und Carotin erklären und entwirft zu diesem Behufe ein Schema, wie die verschiedenen Hauptnuancen in der Färbung dieser Algen zustande kommen; in manchen Arten soll das Carotin so überwiegen und das Chlorophyll so zurücktreten, daß rosenrote Algenfärbungen entstehen. Wenn auch nicht in Abrede gestellt wird, daß vielen Schizophyceen ein hoher Carotingehalt eigen ist, der dann auch für die Gesamtfärbung mitbestimmend werden könnte, so wird nunmehr für das Auftreten von rosenroten, purpurnen, violetten, braunvioletten und braunen Tönen das Phykoerythrin verantwortlich zu machen sein, wie es Kytlin (III) auf Grund der Angaben von Bocat und Gaidukov schon vermutet hat. Von anderen Seiten aber ist die Kohlsche Vorstellung kritiklos übernommen worden.

Ein interessantes Verhalten in dieser Beziehung zeigt *Phormidium luridum* var. *violacea* (Abb. 25, 26). Junge Kulturen dieser Alge sind rot- oder braunviolett gefärbt, mit zunehmendem Alter stellt sich eine mehr braune Färbung ein. Das Wasserextrakt der braungewordenen Alge aber besteht aus reinem Phykoerythrin. An der Farbenwandlung nach Braun müssen daher die anderen Pigmente (vielleicht eine Chlorophyllzunahme?) schuld sein.

Wie ich a. a. O. (II) beschrieb, nimmt das olivbraune *Phormidium Retzii* var. *nigro-violacea* bei in der Nährlösung entstehendem Eisenmangel einen violetten, braunroten und schließlich gelbbraunen Farbenton an. Bei dieser Eisenchlorose verschwindet allmählich das Chlorophyll und der dieser Alge eigentümliche rotviolette Farbstoff, der gleichfalls ein Phykocyan-Phykoerythringemisch repräsentiert (Abb. 11). Je weiter diese Farbenwandlung fortschreitet, desto blässer wird der wässrige Auszug. Das aus violett gewordenen Rasen hergestellte Extrakt zeigt außer dem Absorptionsstreifen im Grün noch ein deutliches Band im Rot, welches den aus braunrot gewordenen Kulturen hergestellten Auszügen schon abgeht. Früher führte ich das Verschwinden dieses Phykocyanbandes auf die abnehmende Konzentration des Gesamtfarbstoffes zurück, jetzt möchte ich aber eine Erklärung hierfür darin suchen, daß das Phykocyan rascher als das Phykoerythrin verloren geht, so daß aus der violetten Lagerfärbung

eine braunrote entsteht. Dies wäre eine Parallele zu der schon erwähnten Beobachtung, daß solche Farbstoffgemische beim Stehen nach längerer Zeit infolge der rascheren Zerstörung des Phykocyan gleichfalls rot werden.

Es ist eine bekannte Tatsache, daß manche Schizophyceenarten bald grün oder besser blaugrün, bald mehr olivgrün oder bräunlich angetroffen werden, obwohl es sich um dieselbe Spezies handelt. In vielen Fällen wird daran das schwankende Phykocyan-Phykoerythrinmengenverhältnis schuld sein. Der „color amethysteus“ und „chalybeus“, der bei vielen Arten mit dem „color aerugineus“ wechselt, wird nach Kützing (II) durch die Beimischung von Phykoerythrin bedingt. Nach meinen Erfahrungen kann in der Tat das Mengenverhältnis $\frac{\text{Phykocyan}}{\text{Phykoerythrin}}$ bei ein und derselben Art veränderlich sein. In welchem Maße aber und aus welchen Ursachen das Verhältnis der beiden Farbstoffe in einer Spezies schwankt, werden künftige Untersuchungen zu zeigen haben.

Den in der I. Gruppe zusammengefaßten Schizophyceen geht das Vermögen zur Ausbildung von Phykoerythrin ab: denn trotz langer Beobachtung der Kulturen solcher Algen ändert sich ihre typische blaugrüne oder spangrüne Lagerfarbe in keiner Weise. Ob die Fähigkeit der in der II. und III. Gruppe behandelten Spaltalgen zur Ausbildung des Phykoerythrins gänzlich unterdrückt werden kann, ist nicht unmöglich, erscheint mir aber zweifelhaft. Denn eine ausgesprochen blaugrüne Rasenfärbung kommt schon dann zustande, wenn das Phykocyan gleichzeitig vorhandenes Phykoerythrin an Menge übertrifft.

Manchmal kann man bei ein und derselben Art neben den vorherrschend bräunlich gefärbten Fäden auch rein blaugrüne beobachten. Eine derartige Doppelfärbung gibt z. B. Sauvageau (I) für *Lynghya sordida* an (rosenrote und flaschengrüne Fäden), und auch Gaidukov (I) berichtet ähnlich von *Oscillatoria sancta*. Besonders kraß waren solche Unterschiede in der Färbung der Fäden bei der hier (Abb. 8) untersuchten Probe der *Oscillatoria limosa* zu sehen, wo neben bräunlich gefärbten Fäden lebhaft blaugrüne in großer Zahl angetroffen wurden. Ich zweifle nicht daran, daß die Färbungsdifferenzen durch verschieden starke Beimischung des Phykoerythrins hervorgerufen sind. Den Übergang zwischen diesen beiden Extremen der Färbung vermittelnde

Fäden waren nicht auffindbar, und die Zellen eines Fadens waren entweder durchweg braun oder sämtlich grün gefärbt, in der Zellenfärbung waren also auch keine Übergänge konstatierbar. Dieselbe Erfahrung machte Sauvageau (I) an gewissen Lyngbyen.

Dennoch kommt der Fall, daß ein und derselbe Faden verschieden gefärbt ist, bei Schizophyceen gleichfalls vor. So ist bei Naegeli-Schwendener zu lesen:

„Bei den Algenfäden aus der Gruppe der Scytonemeen (*Scytonema Heerianum* Näg. u. a.) erscheint die Scheitelzelle und die nächstliegenden Gliederzellen, also die Region, in welcher Neubildung von Phykochrom stattfinden muß, stets rötlich bis ziegelrot; dieser Ton geht dann allmählich in Blaugrün über und wird in den ältesten Zellen bräunlich oder braunorange. Bei den Flechten mit blaugrünen Gonidien ist diese Farbe in den jüngsten Teilen des Thallus in der Regel am schönsten entwickelt und geht in tiefer liegenden Schichten des Thallus oder in Thallusschuppen, die von anderen bedeckt sind, in Schmutziggelb bis Braunorange über.“

Es scheint mir in der Tat nicht unwahrscheinlich, daß bei einer Spezies vorkommende Schwankungen im Phykoerythringehalt eine Funktion des Alters der betreffenden Zellen sein könnten. Einschlägige Angaben finden sich auch bei Gaidukov (I). Interessant wäre es ferner, der Frage nachzugehen, ob diese so distinkten Färbungsunterschiede, wie ich sie bei *Oscillatoria limosa* beobachtet habe, gewissermaßen als Rasseneigentümlichkeiten angesehen werden könnten. So hielten sich nach Sauvageau (I) gewisse, aus mehreren Metern Seetiefe eingebrachte Schizophyceen verschiedener Färbung wie getrennte Rassen durch mehrere Monate. Leider schlugen meine Versuche, diese dickfädige *Oscillatoria* in Kultur zu nehmen, fehl, so daß sich nichts über die Entstehung oder den Ausgleich der differenten Fadenfärbungen aussagen läßt.

Vielleicht wird auch die Systematik der Schizophyceen aus diesen Feststellungen einigen Nutzen ziehen können. Wie eingangs erwähnt wurde, legen die heutigen Systematiker der Farbe dieser Algen nicht die Bedeutung eines brauchbaren Artmerkmals bei. Auf die Schwierigkeiten der Erkennung der wahren Lagerfärbung in der Natur ist gleichfalls schon hingewiesen worden; die Anlage von Speziesreinkulturen erscheint in dieser Hinsicht von besonderer Bedeutung. Freilich reicht das hier vorgelegte Tatsachenmaterial noch nicht aus, um dartun zu können, ob und bis zu welchem Grade etwa der Quotient $\frac{\text{Phykocyan}}{\text{Phykoerythin}}$ maximum als Speziesmerkmal gewertet werden könnte. Jedenfalls aber ist schon der leicht zu führende Nachweis von Phykoerythrin in einer Spaltalge für Bestimmungszwecke nicht belang-

los. Denn den typisch spangrünen Formen der I. Gruppe fehlt es, soviel ich heute sehe, immer, in einzelnen noch blaugrün gefärbten Vertretern der II. Gruppe kann es in geringer Menge noch vorhanden sein, so daß aus der blaugrünen Lagerfarbe allein noch nicht auf die Abwesenheit desselben geschlossen werden darf. In all den übrigen von Blaugrün abweichend nuancierten Arten aber konnte es überall nachgewiesen werden.

Phykoerythrinführende Schizophyceen sind anscheinend sehr verbreitet (siehe Tabelle S. 201). Mit Rücksicht auf das häufige Vorkommen dieses roten Farbstoffes wird es sich vielleicht auch empfehlen, in Hinkunft nicht mehr die Namen Blaualgen und Cyanophyceen zu gebrauchen, weil das blaue Phykocyan für diese Algen nicht charakteristischer als das rote Phykoerythrin und daher auch die blaugrüne Färbung kein durchgreifendes Merkmal dieser Algengruppe ist. So ist heute ja auch ihre alte Bezeichnung „Phycobromaceae“ aus dem Gebrauch gezogen.

Literatur.

- Askenasy, E., Beiträge zur Kenntnis des Chlorophylls und einiger dasselbe begleitenden Farbstoffe. *Botan. Ztg.* **25**, 225. 1867. — Boosé, L., Sur le pigment de l'Oscillatoria Cortiana rouge. *Compt. rend. de la soc. de biol.* **64**, 101. 1908. — Boresch, K., I. Über die Einwirkung farbigen Lichtes auf die Färbung von Cyanophyceen. *Ber. d. Deutsch. bot. Ges.* **37**, 25. 1919; II. Ein Fall von Eisenchlorose bei Cyanophyceen. *Zeitschr. f. Bot.* **13**. 1921; III. Phykoerythrin in Cyanophyceen. *Ber. d. Deutsch. bot. Ges.* **39**. 1921. — Cohn, F., I. Über Oscillarien und Florideen. *Botan. Ztg.* **25**, 38. 1867; II. Beiträge zur Physiologie der Phycobromaceen und Florideen. *Arch. f. mikr. Anat.* **3**, 19. 1867. — Czapek, Fr., Biochemie der Pflanzen I, S. 598. 1913. — Gaidukov, N., I. Über den Einfluß farbigen Lichtes auf die Färbung des Oscillarien. *Scripta horti Petropol.* **23**. 1903; II. Zur Morphologie und Physiologie der Alge Porphyridium cruentum. *Arbeiten d. St. Petersburger naturf. Ges.* **30**, 152. 1899; III. Zur Farbenanalyse der Algen. *Ber. d. Deutsch. bot. Ges.* **22**, 23. 1904. — Hanson, E. K., Observations on phycoerythrin. *The new phytologist* **8**, 337. 1909. — Kohl, F. G., Über die Organisation und Physiologie der Cyanophyceenzelle. *Jena 1903*, S. 73ff. — Kraus, G. und Millardet, A., Étude sur la matière colorante des Phycobromacées et des Diatomées. *Mém. de la soc. des scienc. nat. de Strasbourg* **6**. 1868. — Kützing, Fr. T., I. *Phycologia generalis* 1843, S. 20ff.; II. Grundzüge der philosophischen Botanik I, S. 165. 1851; III. *Arch. f. Pharm.* **41**, 38. — Kylin, H., I. Über Phykoerythrin und Phykocyan bei *Ceramium rubrum*. *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **69**, 169. 1910; II. Über die roten und blauen Farbstoffe der Allgem. *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **76**, 396. 1912; III. Über die Farbe der Florideen und Cyanophyceen. *Svensk bot. tidskr.* **6**, 531. 1912. — Molisch, H., I. Das Phykocyan, ein krystallisierbarer Eiweißkörper. *Botan. Ztg.* **53**. 1895; II. Die Krystallisation und der Nachweis des Xanthophylls (Carotins) im Blatt. *Ber. d. Deutsch. bot. Ges.* **14**,

20. 1896; III. Untersuchungen über das Phykocyan. Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wiss., Math.-nat. Kl. 115. 1906; IV. Über eine rote Wasserblüte im Wiener Prater. Österr. bot. Zeitschr. 1918, S. 357. — Nadson, G., Über das Phykocyan der Oscillarien und seine Beziehung zu anderen Pflanzenstoffen. Scripta bot. IV. St. Petersburg 1893. — Naegeli-Schwendener, Das Mikroskop. Leipzig 1867, S. 497. — Nebelung, H., Spektroskopische Untersuchungen der Farbstoffe einiger Süßwasseralgen. Botan. Ztg. 36, 368. 1878. — Nees v. Esenbeck, Über einen blauroten Farbstoff, der sich bei der Zersetzung von Oscillarien bildet. Annalen d. Chemie u. Pharmazie 17, 75. 1836. — Phipson, Sur la matière colorante du *Palmella cruenta*. Compt. rend. 1879, S. 316. — Pringsheim, N., Über natürliche Chlorophyllmodifikationen und die Farbstoffe der Florideen. Monatsber. d. Berl. Akad. d. Wiss. 1875. — Reinke, J., I. Beitrag zur Kenntnis des Phykoxanthins. Jahrb. f. wissenschaft. Botanik 10, 399. 1876; II. Photometrische Untersuchungen über die Absorption des Lichtes in den Assimilationsorganen. Botan. Ztg. 44, 161. 1886. — Sauvageau, C., I. Sur des Myxophycées roses et sur un procédé d'étude de la Phycocyanine. Compt. rend. de la soc. de biol. 1, 95. 1908; II. A propos d'Oscillariées rouges observées dans un aquarium du laboratoire de Banyuls-sur-Mer. Compt. rend. de la soc. de biol. 1, 97. 1908; III. Sur la coloration des Floridées. Compt. rend. de la soc. de biol. 1, 103. 1908. — Schütt, Fr. I. Über das Phykoerythrin. Ber. d. Deutsch. bot. Ges. 6, 1888; II. Weitere Beiträge zur Kenntnis des Phykoerythrins. Ber. d. Deutsch. bot. Ges. 6, 305. 1888. — Sorby, H. C., On the characteristic colouring matters of the red groups of Algae. The Journ. of the proceed. of the Linn. soc. Bot. 15, 34. — Staehelin, M., Zur Cytologie und Systematik von *Porphyridium cruentum* (Naegeli). Ber. d. Deutsch. bot. Ges. 34, 893. 1916. — Stokes, G. G., Über die Veränderung der Brechbarkeit des Lichts. Poggend. Annalen d. Phys. u. Chemie. Erg.-Bd. 4. 1854. — Teodoresco, E. C., Sur la présence d'une phycoérythrine dans le *Nostoc commune*. Compt. rend. de l'Acad. des Sc. 163, 62; Rev. gen. de Bot. 32, 145. 1920. — Turner, B. B., Die chemische Zusammensetzung der *Oscillaria prolifica*. Journ. Amer. Chem. Soc. 38, 1402. 1916. — Weigert, Fr., Über Absorptionsspektren und über eine einfache Methode zu ihrer quantitativen Bestimmung. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 1916, S. 1496.

Anhang.

Tabelle I.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	36° 14'	0,135
(674)	29° 35'	0,246
655	13° 12'	0,630
647	7° 59'	0,853
639	4° 45'	1,080
630	3° 51'	1,172
625	3° 20'	1,235
615	3° 45'	1,183
608	4° 41'	1,087
601	5° 47'	0,994
594	7°	0,911
587	8° 31'	0,825
581	10° 2'	0,752
575	11° 54'	0,676
569	14° 10'	0,598
559	18° 42'	0,470
548	23° 4'	0,371
539	26° 6'	0,310
530	28° 45'	0,261
522	30° 46'	0,225
515	32° 1'	0,204
501	33° 54'	0,173
489	34° 20'	0,166
478	35° 11'	0,152
468	35° 11'	0,152

Tabelle III.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	38° 10'	0,105
(674)	29° 22'	0,250
655	12° 22'	0,659
639	9° 49'	0,762
630	8° 40'	0,817
625	7° 59'	0,853
615	7° 25'	0,885
608	7° 50'	0,861
601	8° 41'	0,816
594	10° 2'	0,752
587	11° 24'	0,695
581	13° 31'	0,619
575	15° 25'	0,559
569	17° 14'	0,508
559	21° 1'	0,415
548	24° 34'	0,340
539	27° 59'	0,275
530	30° 26'	0,231
515	33° 11'	0,184
501	35° 24'	0,148
489	35° 40'	0,144
478	35° 56'	0,140

Tabelle V.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	36° 46'	0,127
(674)	31° 5'	0,220
655	16° 11'	0,537
647	11° 46'	0,681
639	8° 30'	0,826
630	6° 41'	0,931
625	6° 12'	0,964
615	6° 30'	0,943
608	7° 34'	0,877
601	8° 59'	0,801
594	10° 49'	0,719
587	12° 22'	0,659
581	14° 5'	0,601
575	16° 5'	0,540
569	17° 49'	0,493
559	21° 49'	0,398
554	23° 24'	0,365
548	25°	0,331
539	27° 4'	0,292
530	29° 25'	0,249
522	31° 2'	0,221
515	32° 12'	0,201
501	33° 19'	0,182
478	33° 44'	0,175

Tabelle IV.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	33° 29'	0,179
(674)	29° 49'	0,242
655	17° 34'	0,500
647	11° 9'	0,705
639	6° 47'	0,925
630	4° 50'	1,073
625	4° 20'	1,120
615	4° 10'	1,138
608	4° 50'	1,073
601	5° 41'	1,002
594	6° 41'	0,931
587	7° 39'	0,872
581	8° 32'	0,824
575	9° 10'	0,792
569	10°	0,754
559	12° 22'	0,659
554	13° 42'	0,613
548	15° 26'	0,559
548	15° 26'	0,559
539	18° 14'	0,482
530	20° 35'	0,425
522	22° 54'	0,374
515	24° 6'	0,349
501	26° 11'	0,308
489	26° 9'	0,309

Tabelle II.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	36° 6'	0,137
(674)	29° 57'	0,239
639	20° 15'	0,433
630	19° 41'	0,446
625	19° 20'	0,455
615	19°	0,463
608	19° 35'	0,449
601	20°	0,439
594	20° 34'	0,426
587	21° 36'	0,402
581	22° 37'	0,380
575	24° 11'	0,348
569	25° 32'	0,321
559	27° 46'	0,279
548	29° 32'	0,247
530	31° 37'	0,211
515	32° 36'	0,194
489	34° 11'	0,168

Tabelle VI.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	37° 40'	0,112
(674)	35° 11'	0,152
647	28° 29'	0,266
639	27° 6'	0,291
630	26° 36'	0,300
625	26° 24'	0,304
615	26° 20'	0,305
608	26° 5'	0,310
601	26° 17'	0,306
594	26° 27'	0,303
587	27° 11'	0,289
581	28° 9'	0,272
569	29° 59'	0,239
559	31° 39'	0,210
548	32° 56'	0,189
530	34° 51'	0,157
515	35° 32'	0,146
489	36° 5'	0,137

Tabelle VII.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	38° 55'	0,093
(674)	35° 56'	0,140
655	25° 39'	0,319
647	21° 47'	0,398
639	18° 15'	0,482
630	15° 42'	0,551
625	14° 46'	0,579
615	14° 15'	0,595
608	15° 5'	0,569
601	16° 26'	0,530
494	18° 2'	0,487
587	19° 49'	0,443
581	20° 21'	0,431
575	20° 9'	0,435
569	19° 46'	0,444
559	20° 42'	0,423
554	22° 19'	0,387
548	23° 40'	0,358
539	26° 21'	0,305
530	28° 37'	0,263
522	30° 34'	0,229
515	32° 29'	0,196
501	34° 36'	0,161
489	36° 21'	0,138
478	36° 21'	0,133
468	36° 42'	0,128

Tabelle IX.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	35° 25'	0,148
(674)	28° 51'	0,259
647	17° 47'	0,494
639	15° 40'	0,552
630	13° 40'	0,614
625	12° 59'	0,637
615	13° 7'	0,633
608	13° 42'	0,603
601	14° 20'	0,593
594	14° 59'	0,572
587	15° 59'	0,543
581	16° 17'	0,534
575	15° 45'	0,550
569	15° 9'	0,567
559	14° 20'	0,593
554	14° 42'	0,581
548	15° 15'	0,564
539	17° 7'	0,512
530	19° 45'	0,445
522	22° 2'	0,393
515	25° 37'	0,319
508	26° 5'	0,310
489	28° 55'	0,258
478	30° 14'	0,234
468	31° 10'	0,218

Tabelle XI.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	35° 6'	0,153
(674)	28° 14'	0,270
655	15° 5'	0,569
647	12° 47'	0,644
639	10° 1'	0,753
630	7° 29'	0,882
625	6° 25'	0,949
615	5° 46'	0,996
608	6° 29'	0,944
601	7° 27'	0,884
594	8° 35'	0,821
587	8° 32'	0,824
581	7° 1'	0,910
575	4° 49'	1,074
569	3° 17'	1,241
559	3° 24'	1,226
554	4° 7'	1,143
548	5° 7'	1,048
539	7° 46'	0,865
530	10° 22'	0,738
522	12° 50'	0,642
515	16° 19'	0,534
501	22° 20'	0,386
489	26° 20'	0,305
478	28° 52'	0,259
468	30° 5'	0,237

Tabelle X.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	35° 37'	0,145
(674)	31° 59'	0,204
647	21° 36'	0,402
639	20° 27'	0,428
630	19° 35'	0,449
625	18° 46'	0,469
615	19° 4'	0,461
608	19° 34'	0,449
601	19° 54'	0,441
594	21° 11'	0,412
587	21° 32'	0,404
581	21° 25'	0,406
575	20° 57'	0,417
569	19° 34'	0,449
559	17° 29'	0,502
554	17° 6'	0,512
548	17° 26'	0,503
539	19° 15'	0,457
530	21° 22'	0,408
522	23° 59'	0,352
515	25° 45'	0,317
501	29° 2'	0,256
489	30° 49'	0,224
478	31° 44'	0,209
468	32° 19'	0,199

Tabelle VIII.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	39° 7'	0,090
(674)	37° 30'	0,115
655	32° 47'	0,191
639	30° 15'	0,234
625	28° 49'	0,260
615	27° 56'	0,276
601	28° 37'	0,263
594	29° 14'	0,252
587	29° 45'	0,243
581	30° 24'	0,232
569	30° 29'	0,227
559	31° 20'	0,216
548	32° 6'	0,203
539	33° 22'	0,181
530	34° 1'	0,171
522	34° 57'	0,116
515	35° 32'	0,146
489	35° 42'	0,144
478	35° 52'	0,141

Tabelle XII.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	39° 34'	0,083
(674)	36° 16'	0,134
639	28° 37'	0,263
630	26° 52'	0,295
625	26° 1'	0,311
615	25° 50'	0,315
608	26° 4'	0,311
601	26° 36'	0,300
594	27°	0,293
587	27° 6'	0,291
581	26° 40'	0,299
575	25° 11'	0,328
569	22° 52'	0,375
559	21° 4'	0,414
554	21° 54'	0,396
548	22° 50'	0,376
539	24° 1'	0,351
530	26° 21'	0,305
522	27° 50'	0,277
515	29° 37'	0,245
501	32° 1'	0,204
489	33° 46'	0,175
478	35° 12'	0,152
468	35° 31'	0,146

Tabelle XIII.

λ	φ	$-\log \text{tg } \varphi$
(693)	38° 52'	0,094
(674)	37° 42'	0,112
655	34° 52'	0,157
647	31° 37'	0,211
639	28° 22'	0,268
630	26° 7'	0,310
625	25° 17'	0,326
615	24° 54'	0,333
608	25° 22'	0,324
601	26° 11'	0,308
587	27° 32'	0,283
581	28° 19'	0,269
575	29° 10'	0,253
569	30° 2'	0,238
559	31° 35'	0,211
548	32° 57'	0,188
539	34° 6'	0,169
530	35° 27'	0,148
522	36° 2'	0,138
515	36° 41'	0,128
501	36° 52'	0,125
489	27° 22'	0,117
478	37° 30'	0,115
459	37° 47'	0,111

Tabelle XV.

λ	φ	$-\log \text{tg } \varphi$
(693)	38° 1'	0,107
(674)	29° 41'	0,244
655	14° 52'	0,576
647	13° 34'	0,617
639	12° 11'	0,666
630	11° 36'	0,688
625	10° 14'	0,743
615	10° 16'	0,742
608	11° 26'	0,694
601	12° 5'	0,642
594	13° 24'	0,623
587	13° 45'	0,611
581	11° 42'	0,684
575	7° 34'	0,877
569	3° 51'	1,172
559	1° 9'	1,697
554	1° 37'	1,549
548	2° 11'	1,419
539	3° 52'	1,170
530	5° 50'	0,991
522	8° 19'	0,835
515	11° 49'	0,679
510	19° 19'	0,455

Tabelle XVII.

λ	φ	$-\log \text{tg } \varphi$
(693)	35° 56'	0,140
(674)	30° 17'	0,234
655	21° 40'	0,401
639	19° 57'	0,440
630	19° 17'	0,456
625	18° 56'	0,463
615	19° 10'	0,459
608	19° 40'	0,447
594	21° 7'	0,413
581	21° 59'	0,394
575	21° 6'	0,414
559	18° 44'	0,470
554	19° 32'	0,450
539	22° 21'	0,386
522	25° 24'	0,323
501	29° 22'	0,250
478	30° 35'	0,228

Tabelle XVIII.

λ	φ	$-\log \text{tg } \varphi$
(693)	37° 51'	0,110
(674)	35° 55'	0,156
655	28° 21'	0,268
639	23° 4'	0,371
625	19° 54'	0,441
615	19° 36'	0,448
608	19° 45'	0,445
594	20° 29'	0,428
587	20° 16'	0,433
581	18° 14'	0,482
569	8° 27'	0,828
559	5° 12'	1,041
554	5° 55'	0,984
548	6° 44'	0,928
539	9° 25'	0,780
530	11° 56'	0,675
522	15° 5'	0,569
515	18° 34'	0,474
501	25° 32'	0,321
489	30° 7'	0,237
478	32° 37'	0,194
468	33° 37'	0,177

Tabelle XIV.

λ	φ	$-\log \text{tg } \varphi$
(693)	38° 26'	0,100
(674)	34° 11'	0,168
655	24° 47'	0,336
647	22° 51'	0,375
639	21° 52'	0,397
630	20° 31'	0,427
625	20° 14'	0,433
615	20° 49'	0,420
608	21° 40'	0,401
601	22° 20'	0,386
594	22° 30'	0,383
587	21° 34'	0,403
581	18° 35'	0,473
575	14° 37'	0,584
569	12° 20'	0,660
559	12° 26'	0,657
554	13° 47'	0,610
548	15° 91'	0,562
539	18° 31'	0,475
530	20° 52'	0,419
522	24°	0,351
515	26° 59'	0,293
501	31° 2'	0,221
489	33° 25'	0,181
478	35° 32'	1,046
468	36° 5'	0,138

Tabelle XVI.

λ	φ	$-\log \text{tg } \varphi$
(693)	35° 56'	0,140
(674)	29° 24'	0,249
647	20° 6'	0,437
639	19° 57'	0,440
630	19° 31'	0,450
625	19° 6'	0,461
615	19° 29'	0,451
608	20° 2'	0,438
601	20° 11'	0,435
594	21° 9'	0,412
587	21° 45'	0,399
581	21° 24'	0,407
575	19° 42'	0,446
569	16° 11'	0,537
559	14°	0,603
554	14° 45'	0,580
548	15° 57'	0,544
539	17° 46'	0,492
530	19° 45'	0,445
522	21° 49'	0,398
515	23° 52'	0,354
501	27° 35'	0,282
489	30° 1'	0,238
478	31° 7'	0,219
468	31° 46'	0,208

XIII.
 0,08
 0,14
 0,26
 0,36
 0,51
 0,66
 0,81
 0,96
 1,11
 1,26
 1,41
 1,56
 1,71
 1,86
 2,01
 2,16
 2,31
 2,46
 2,61
 2,76
 2,91
 3,06
 3,21
 3,36
 3,51
 3,66
 3,81
 3,96
 4,11
 4,26
 4,41
 4,56
 4,71
 4,86
 5,01
 5,16
 5,31
 5,46
 5,61
 5,76
 5,91
 6,06
 6,21
 6,36
 6,51
 6,66
 6,81
 6,96
 7,11
 7,26
 7,41
 7,56
 7,71
 7,86
 8,01
 8,16
 8,31
 8,46
 8,61
 8,76
 8,91
 9,06
 9,21
 9,36
 9,51
 9,66
 9,81
 9,96
 10,11
 10,26
 10,41
 10,56
 10,71
 10,86
 11,01
 11,16
 11,31
 11,46
 11,61
 11,76
 11,91
 12,06
 12,21
 12,36
 12,51
 12,66
 12,81
 12,96
 13,11
 13,26
 13,41
 13,56
 13,71
 13,86
 14,01
 14,16
 14,31
 14,46
 14,61
 14,76
 14,91
 15,06
 15,21
 15,36
 15,51
 15,66
 15,81
 15,96
 16,11
 16,26
 16,41
 16,56
 16,71
 16,86
 17,01
 17,16
 17,31
 17,46
 17,61
 17,76
 17,91
 18,06
 18,21
 18,36
 18,51
 18,66
 18,81
 18,96
 19,11
 19,26
 19,41
 19,56
 19,71
 19,86
 20,01
 20,16
 20,31
 20,46
 20,61
 20,76
 20,91
 21,06
 21,21
 21,36
 21,51
 21,66
 21,81
 21,96
 22,11
 22,26
 22,41
 22,56
 22,71
 22,86
 23,01
 23,16
 23,31
 23,46
 23,61
 23,76
 23,91
 24,06
 24,21
 24,36
 24,51
 24,66
 24,81
 24,96
 25,11
 25,26
 25,41
 25,56
 25,71
 25,86
 26,01
 26,16
 26,31
 26,46
 26,61
 26,76
 26,91
 27,06
 27,21
 27,36
 27,51
 27,66
 27,81
 27,96
 28,11
 28,26
 28,41
 28,56
 28,71
 28,86
 29,01
 29,16
 29,31
 29,46
 29,61
 29,76
 29,91
 30,06
 30,21
 30,36
 30,51
 30,66
 30,81
 30,96
 31,11
 31,26
 31,41
 31,56
 31,71
 31,86
 32,01
 32,16
 32,31
 32,46
 32,61
 32,76
 32,91
 33,06
 33,21
 33,36
 33,51
 33,66
 33,81
 33,96
 34,11
 34,26
 34,41
 34,56
 34,71
 34,86
 35,01
 35,16
 35,31
 35,46
 35,61
 35,76
 35,91
 36,06
 36,21
 36,36
 36,51
 36,66
 36,81
 36,96
 37,11
 37,26
 37,41
 37,56
 37,71
 37,86
 38,01
 38,16
 38,31
 38,46
 38,61
 38,76
 38,91
 39,06
 39,21
 39,36
 39,51
 39,66
 39,81
 39,96
 40,11
 40,26
 40,41
 40,56
 40,71
 40,86
 41,01
 41,16
 41,31
 41,46
 41,61
 41,76
 41,91
 42,06
 42,21
 42,36
 42,51
 42,66
 42,81
 42,96
 43,11
 43,26
 43,41
 43,56
 43,71
 43,86
 44,01
 44,16
 44,31
 44,46
 44,61
 44,76
 44,91
 45,06
 45,21
 45,36
 45,51
 45,66
 45,81
 45,96
 46,11
 46,26
 46,41
 46,56
 46,71
 46,86
 47,01
 47,16
 47,31
 47,46
 47,61
 47,76
 47,91
 48,06
 48,21
 48,36
 48,51
 48,66
 48,81
 48,96
 49,11
 49,26
 49,41
 49,56
 49,71
 49,86
 50,01
 50,16
 50,31
 50,46
 50,61
 50,76
 50,91
 51,06
 51,21
 51,36
 51,51
 51,66
 51,81
 51,96
 52,11
 52,26
 52,41
 52,56
 52,71
 52,86
 53,01
 53,16
 53,31
 53,46
 53,61
 53,76
 53,91
 54,06
 54,21
 54,36
 54,51
 54,66
 54,81
 54,96
 55,11
 55,26
 55,41
 55,56
 55,71
 55,86
 56,01
 56,16
 56,31
 56,46
 56,61
 56,76
 56,91
 57,06
 57,21
 57,36
 57,51
 57,66
 57,81
 57,96
 58,11
 58,26
 58,41
 58,56
 58,71
 58,86
 59,01
 59,16
 59,31
 59,46
 59,61
 59,76
 59,91
 60,06
 60,21
 60,36
 60,51
 60,66
 60,81
 60,96
 61,11
 61,26
 61,41
 61,56
 61,71
 61,86
 62,01
 62,16
 62,31
 62,46
 62,61
 62,76
 62,91
 63,06
 63,21
 63,36
 63,51
 63,66
 63,81
 63,96
 64,11
 64,26
 64,41
 64,56
 64,71
 64,86
 65,01
 65,16
 65,31
 65,46
 65,61
 65,76
 65,91
 66,06
 66,21
 66,36
 66,51
 66,66
 66,81
 66,96
 67,11
 67,26
 67,41
 67,56
 67,71
 67,86
 68,01
 68,16
 68,31
 68,46
 68,61
 68,76
 68,91
 69,06
 69,21
 69,36
 69,51
 69,66
 69,81
 69,96
 70,11
 70,26
 70,41
 70,56
 70,71
 70,86
 71,01
 71,16
 71,31
 71,46
 71,61
 71,76
 71,91
 72,06
 72,21
 72,36
 72,51
 72,66
 72,81
 72,96
 73,11
 73,26
 73,41
 73,56
 73,71
 73,86
 74,01
 74,16
 74,31
 74,46
 74,61
 74,76
 74,91
 75,06
 75,21
 75,36
 75,51
 75,66
 75,81
 75,96
 76,11
 76,26
 76,41
 76,56
 76,71
 76,86
 77,01
 77,16
 77,31
 77,46
 77,61
 77,76
 77,91
 78,06
 78,21
 78,36
 78,51
 78,66
 78,81
 78,96
 79,11
 79,26
 79,41
 79,56
 79,71
 79,86
 80,01
 80,16
 80,31
 80,46
 80,61
 80,76
 80,91
 81,06
 81,21
 81,36
 81,51
 81,66
 81,81
 81,96
 82,11
 82,26
 82,41
 82,56
 82,71
 82,86
 83,01
 83,16
 83,31
 83,46
 83,61
 83,76
 83,91
 84,06
 84,21
 84,36
 84,51
 84,66
 84,81
 84,96
 85,11
 85,26
 85,41
 85,56
 85,71
 85,86
 86,01
 86,16
 86,31
 86,46
 86,61
 86,76
 86,91
 87,06
 87,21
 87,36
 87,51
 87,66
 87,81
 87,96
 88,11
 88,26
 88,41
 88,56
 88,71
 88,86
 89,01
 89,16
 89,31
 89,46
 89,61
 89,76
 89,91
 90,06
 90,21
 90,36
 90,51
 90,66
 90,81
 90,96
 91,11
 91,26
 91,41
 91,56
 91,71
 91,86
 92,01
 92,16
 92,31
 92,46
 92,61
 92,76
 92,91
 93,06
 93,21
 93,36
 93,51
 93,66
 93,81
 93,96
 94,11
 94,26
 94,41
 94,56
 94,71
 94,86
 95,01
 95,16
 95,31
 95,46
 95,61
 95,76
 95,91
 96,06
 96,21
 96,36
 96,51
 96,66
 96,81
 96,96
 97,11
 97,26
 97,41
 97,56
 97,71
 97,86
 98,01
 98,16
 98,31
 98,46
 98,61
 98,76
 98,91
 99,06
 99,21
 99,36
 99,51
 99,66
 99,8

Tabelle XIX.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	37° 4'	0,122
(674)	35° 30'	0,147
647	31° 30'	0,213
630	30° 45'	0,226
625	30° 25'	0,231
615	30° 5'	0,237
608	29° 52'	0,241
601	29° 45'	0,243
587	29° 45'	0,243
581	28° 55'	0,258
575	26° 27'	0,303
569	23° 42'	0,358
559	20° 45'	0,422
554	21° 20'	0,408
548	22° 36'	0,381
539	24° 31'	0,341
530	25° 57'	0,313
522	27° 19'	0,287
516	30° 32'	0,229
501	31° 22'	0,215
489	32° 27'	0,197
478	33° 25'	0,181

Tabelle XX.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	37° 37'	0,113
(674)	32° 35'	0,194
655	26° 30'	0,302
639	25° 54'	0,314
630	25° 22'	0,324
625	24° 52'	0,334
615	25° 20'	0,235
608	25° 29'	0,322
601	26° 12'	0,308
594	26° 44'	0,298
587	27° 49'	0,278
575	24° 40'	0,338
569	21° 31'	0,404
559	17° 5'	0,512
554	16° 29'	0,529
548	16° 19'	0,534
539	17° 40'	0,497
530	21° 34'	0,403
522	23° 19'	0,366
515	25° 50'	0,315
501	29° 47'	0,242
489	32° 20'	0,199
478	33°	0,187
468	33° 52'	0,173

Tabelle XXI.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	39° 37'	0,082
(674)	37° 10'	0,120
655	33° 45'	0,175
647	33° 17'	0,183
630	32° 39'	0,193
625	32° 15'	0,200
615	32° 19'	0,199
608	32° 20'	0,199
601	33° 1'	0,187
594	33° 39'	0,177
587	34° 5'	0,170
581	34° 15'	0,167
575	34° 34'	0,162
569	35° 5'	0,153
559	35° 35'	0,145
554	35° 54'	0,140
548	36° 6'	0,137
539	36° 50'	0,125
530	36° 51'	0,125
522	37° 21'	0,117
515	37° 35'	0,114
501	38° 35'	0,098
489	38° 49'	0,094
478	38° 57'	0,092
468	39° 11'	0,089

Tabelle XXII.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	39° 1'	0,091
(674)	38° 42'	0,096
655	38° 35'	0,098
639	37° 50'	0,110
625	37° 7'	0,121
615	37° 20'	0,118
608	37° 32'	0,115
601	37° 21'	0,117
587	36° 47'	0,126
581	36° 2'	0,138
575	34° 52'	0,157
569	32° 50'	0,190
559	30° 41'	0,227
548	30° 39'	0,227
538	31° 20'	0,216
530	32° 34'	0,195
522	33° 41'	0,176
515	34° 9'	0,169
501	34° 59'	0,155

Tabelle XXIII.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	36° 29'	0,131
(674)	33° 46'	0,175
655	27° 40'	0,280
639	22° 44'	0,378
630	20° 39'	0,424
625	19° 49'	0,443
615	19° 21'	0,454
608	20° 5'	0,437
601	20° 37'	0,425
594	20° 24'	0,430
587	18° 19'	0,480
581	12° 45'	0,645
575	7° 17'	0,893
569	3° 29'	1,216
559	1° 6'	1,717
554	1° 40'	1,536
548	2° 19'	1,393
539	4° 6'	1,145
530	6° 7'	0,970
522	8° 44'	0,814
515	12° 19'	0,661
501	20° 6'	0,437
489	25° 51'	0,315
478	29° 52'	0,241
468	33° 25'	0,214

Tabelle XXIVa.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	38° 44'	0,096
(674)	37° 25'	0,116
655	36° 21'	0,133
639	35° 51'	0,141
630	35° 51'	0,141
625	35° 50'	0,141
615	36° 44'	0,127
608	36° 44'	0,127
601	36° 39'	0,128
594	35° 39'	0,144
587	33° 9'	0,185
581	27° 53'	0,276
575	21° 31'	0,404
569	15° 56'	0,544
559	13° 19'	0,626
554	13° 50'	0,609
548	14° 54'	0,575
539	17° 1'	0,514
530	19° 22'	0,454
522	22° 24'	0,385
515	24° 47'	0,336
501	28° 57'	0,257
489	31° 10'	0,218
478	32° 11'	0,201
468	33° 12'	0,184

Tabelle XXIVb.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
601	36° 26'	0,132
594	35° 35'	0,145
587	33° 17'	0,183
581	28° 10'	0,271
575	21° 55'	0,395
569	16° 30'	0,528
559	13° 30'	0,629
554	13° 54'	0,606
548	14° 55'	0,574
539	17° 5'	0,512
530	19° 27'	0,452
522	22° 15'	0,388
515	24° 57'	0,332
508	27° 27'	0,284
501	29° 45'	0,243
595	31° 17'	0,216
489	32° 16'	0,200
484	33° 31'	0,179
478	33° 55'	0,172
473	34° 46'	0,159

Tabelle XXV.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	36° 11'	0,136
(674)	33° 44'	0,175
655	29° 52'	0,241
639	28°	0,274
630	26° 55'	0,294
625	26° 54'	0,295
615	26° 6'	0,310
608	25° 46'	0,316
601	25° 37'	0,319
594	25° 26'	0,323
587	24° 25'	0,343
581	22° 11'	0,390
575	18° 15'	0,482
569	12° 52'	0,641
559	7° 45'	0,866
554	7° 32'	0,879
548	8° 4'	0,849
539	9° 51'	0,760
530	12° 29'	0,655
522	14° 44'	0,580
515	17° 30'	0,501
501	23° 24'	0,364
489	26° 35'	0,301
478	29° 26'	0,249
468	30° 7'	0,237

Tabelle XXVI.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	35° 50'	0,141
655	34° 40'	0,160
639	33° 45'	0,175
625	32° 32'	0,195
608	31° 26'	0,214
594	29° 50'	0,241
581	26° 42'	0,298
569	17° 31'	0,501
559	11° 15'	0,701
557	10° 50'	0,718
552	10° 32'	0,731
548	10° 36'	0,728
544	10° 41'	0,724
541	11° 19'	0,699
537	12° 19'	0,661
534	13° 1'	0,636
530	14° 11'	0,597
527	15° 9'	0,567
524	16° 2'	0,542
521	16° 50'	0,519
518	17° 37'	0,498
515	18° 51'	0,467
511	20° 5'	0,437
508	21° 9'	0,412
501	23° 44'	0,357
489	27° 6'	0,291
487	29° 41'	0,244
468	31° 17'	0,216

Tabelle XXVIIa.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(674)	37° 47'	0,110
655	37° 19'	0,128
647	36° 22'	0,133
630	35°	0,155
615	35° 5'	0,153
601	34° 25'	0,164
594	33° 56'	0,172
587	32° 22'	0,198
581	30° 21'	0,232
575	26° 35'	0,301
569	21° 42'	0,400
559	17° 5'	0,512
554	16° 57'	0,516
548	16° 31'	0,528
530	17° 26'	0,503
515	21° 37'	0,402
501	25° 2'	0,331
489	27° 47'	0,278
478	30° 15'	0,234
468	31° 5'	0,220
459	31° 36'	0,211

Tabelle XXVIIb.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
601	40° 36'	0,067
594	39° 34'	0,083
587	38° 17'	0,103
581	36° 21'	0,133
575	33° 11'	0,184
569	30° 55'	0,223
559	28° 5'	0,273
554	27° 34'	0,282
548	26° 40'	0,299
539	27° 56'	0,276
530	29° 1'	0,256
522	30° 9'	0,236
515	31° 12'	0,218
508	32° 1'	0,204
501	33° 17'	0,183
595	33° 47'	0,175
489	34° 14'	1,167
484	34° 54'	0,156
478	35° 27'	0,148
473	35° 22'	0,149
468	36° 11'	0,136

Tabelle XXVIII.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	42° 15'	0,042
655	40° 35'	0,067
639	38° 47'	0,095
625	37° 1'	0,123
615	36° 34'	0,130
608	37° 36'	0,113
594	38° 1'	0,107
587	36° 40'	0,128
581	33° 12'	0,184
569	19° 4'	0,461
561	15° 52'	0,546
557	16° 2'	0,542
552	16° 21'	0,533
548	16° 45'	0,521
544	16° 51'	0,519
541	17° 5'	0,512
537	17° 29'	0,502
534	18° 14'	0,482
530	18° 44'	0,470
527	19° 24'	0,453
524	20° 29'	0,428
521	21° 40'	0,401
515	24° 2'	0,351
508	24° 49'	0,335
501	24° 15'	0,346
489	24° 25'	0,343
478	29° 32'	0,247
468	30° 34'	0,229

Tabelle XXIX.

λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$	λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$	λ	φ	$-\log \operatorname{tg} \varphi$
(693)	39° 24'	0,085	552	18° 26'	0,477	515	28° 21'	0,365
655	38° 9'	0,100	548	18° 15'	0,482	511	23° 56'	0,353
625	37° 45'	0,111	544	18° 40'	0,471	508	23° 55'	0,353
615	37° 31'	0,115	541	18° 47'	0,468	501	23° 1'	0,372
608	37° 21'	0,117	537	18° 56'	0,465	489	22° 45'	0,377
594	36° 16'	0,134	534	19° 44'	0,445	478	26° 57'	0,294
587	35° 32'	0,146	531	19° 56'	0,441	468	28° 41'	0,262
581	31° 55'	0,206	527	20° 31'	0,427	459	30° 15'	0,234
569	20° 10'	0,435	524	21° 22'	0,408	450	30° 56'	0,222
561	17° 51'	0,492	521	21° 55'	0,395			
557	18° 5'	0,486	518	22° 41'	0,379			

Tabelle XXXa.

λ	ε -Werte Tabelle 5	ε -Werte Tabelle 22	$\varepsilon_a + \varepsilon_{22}$ 2
(693)	0,1266	0,0914	0,1090
(674)	0,2197	0,0963	0,1580
655	0,5373	0,0981	0,3177
639	0,8255	0,1098	0,4677
625	0,9640	0,1212	0,5426
615	0,9433	0,1176	0,5305
608	0,8767	0,1145	0,4956
601	0,8011	0,1174	0,4593
587	0,6591	0,1263	0,3927
581	0,6006	0,1382	0,3694
575	0,5401	0,1569	0,3485
569	0,4930	0,1903	0,3417
559	0,3976	0,2267	0,3122
548	0,3313	0,2273	0,2773
538	0,2916	0,2155	0,2536
530	0,2488	0,1947	0,2218
522	0,2207	0,1762	0,1985
515	0,2008	0,1686	0,1847
501	0,1822	0,1550	0,1686

Tabelle XXXI.

λ	ε -Werte Tabelle 5	ε -Werte Tabelle 27a	$\varepsilon_a + \varepsilon_{27a}$ 2
(674)	0,2197	0,1106	0,1652
655	0,5373	0,1279	0,3326
647	0,6813	0,1329	0,4071
630	0,9312	0,1548	0,5430
615	0,9433	0,1534	0,5484
601	0,8011	0,1642	0,4827
594	0,7188	0,1721	0,4455
587	0,6591	0,1981	0,4286
581	0,6006	0,2325	0,4166
575	0,5401	0,3007	0,4204
569	0,4930	0,4002	0,4466
559	0,3976	0,5124	0,4550
554	0,3648	0,5160	0,4404
548	0,3313	0,5279	0,4296
530	0,2488	0,5030	0,3759
515	0,2008	0,4020	0,3014
501	0,1822	0,3307	0,2565
478	0,1754	0,2342	0,2048
468	0,1713	0,2198	0,1956

Tabelle XXXb.

λ	ε -Werte Tabelle 5	ε -Werte Tabelle 27b	$\varepsilon_a + \varepsilon_{27b}$
601	0,8011	0,0670	0,8681
594	0,7188	0,0827	0,8015
587	0,6591	0,1028	0,7619
581	0,6006	0,1332	0,7338
575	0,5401	0,1844	0,7245
569	0,4930	0,2227	0,7157
559	0,3976	0,2728	0,6704
554	0,3648	0,2823	0,6471
548	0,3313	0,2991	0,6304
539	0,2916	0,2756	0,5672
530	0,2488	0,2560	0,5048
522	0,2207	0,2359	0,4566
515	0,2008	0,2178	0,4186
501	0,1828	0,1822	0,3650
478	0,1754	0,1475	0,3229

Tabelle XXXII.

λ	ε -Werte Tabelle 5	ε -Werte Tabelle 25	$\varepsilon_a + \varepsilon_{25}$ 2
(693)	0,1266	0,1358	0,1312
(674)	0,2197	0,1754	0,1976
655	0,5373	0,2409	0,3891
639	0,8255	0,2743	0,5499
630	0,9312	0,2944	0,6128
625	0,9640	0,2947	0,6294
615	0,9433	0,3099	0,6266
608	0,8767	0,3163	0,5965
601	0,8011	0,3192	0,5602
594	0,7188	0,3228	0,5208
587	0,6591	0,3430	0,5011
581	0,6006	0,3896	0,4951
575	0,5401	0,4818	0,5110
569	0,4930	0,6413	0,5672
559	0,3976	0,8662	0,6319

Tabelle XXXII (Fortsetz.).

λ	ϵ -Werte Tabelle 5	ϵ -Werte Tabelle 25	$\frac{\epsilon_1 + \epsilon_{25}}{2}$
554	0,3648	0,8786	0,6217
548	0,3313	0,8486	0,5900
539	0,2916	0,7604	0,5260
530	0,2488	0,6548	0,4518
522	0,2207	0,5801	0,4004
515	0,2008	0,5013	0,3511
501	0,1822	0,3638	0,2730
478	0,1754	0,2485	0,2120
468	0,1713	0,2365	0,2039

Tabelle XXXIII (Fortsetz.).

λ	ϵ -Werte Tabelle 5	ϵ -Werte Tabelle 28	$\frac{\epsilon_1 + \epsilon_{28}}{2}$
559	0,3976	1,7167	1,0572
554	0,3648	1,5362	0,9505
548	0,3313	1,3930	0,8622
539	0,2916	1,1446	0,7181
530	0,2488	0,9700	0,6094
522	0,2207	0,8136	0,5172
515	0,2008	0,6609	0,4309
501	0,1822	0,4366	0,3094
478	0,1754	0,2409	0,2082
468	0,1713	0,2141	0,1927

Tabelle XXXIII.

λ	ϵ -Werte Tabelle 5	ϵ -Werte Tabelle 28	$\frac{\epsilon_1 + \epsilon_{28}}{2}$
(693)	0,1266	0,1311	0,1289
(674)	0,2197	0,1748	0,1973
655	0,5373	0,2805	0,4089
639	0,8255	0,3778	0,6017
630	0,9312	0,4238	0,6775
625	0,9640	0,4433	0,7037
615	0,9433	0,4545	0,6989
608	0,8787	0,4370	0,6569
601	0,8011	0,4246	0,6129
594	0,7188	0,4296	0,5742
587	0,6591	0,4801	0,5696
581	0,6006	0,6454	0,6230
575	0,5401	0,8934	0,7168
569	0,4930	1,2156	0,8543

Tabelle XXXIV.

λ	ϵ -Werte Tabelle 2	ϵ -Werte Tabelle 28	$\frac{\epsilon_1 + \epsilon_{28}}{2}$
(693)	0,1372	0,1413	0,1393
639	0,4331	0,1751	0,3041
625	0,4549	0,1953	0,3251
608	0,4489	0,2138	0,3314
594	0,4257	0,2415	0,3336
581	0,3803	0,2985	0,3394
596	0,3209	0,5008	0,4109
559	0,2786	0,7013	0,4900
548	0,2468	0,7278	0,4873
530	0,2107	0,5973	0,4040
515	0,1941	0,4687	0,3304
489	0,1680	0,2910	0,2295

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.

Eine größere Zahl von Schizophyceen, welche meistens in Speziesreinkultur gezüchtet wurden, wurde auf ihre wasserlöslichen Farbstoffe durch spektrophotometrische Messung der Absorption ihrer wässrigen Extrakte untersucht. Ein Teil dieser Schizophyceen enthält nur einen blauen Farbstoff, das von K y l i n als blaugüne Modifikation bezeichnete Phykocyan. Andere Phykocyanmodifikationen wurden in den hier untersuchten Arten nicht aufgefunden. Viele Schizophyceenspezies enthalten neben diesem Phykocyan in verschiedener Menge noch einen roten Farbstoff mit orangegelber Fluoreszenz und nur einem Absorptionsmaximum im Grün zwischen den Fraunhoferschen Linien D und E, welcher deshalb und, weil vom Florideenrot verschieden, als „Schizophyceenphykoerythrin“ bezeichnet wurde. Durch

Capillaranalyse gelingt die Abtrennung dieses Farbstoffes vom Phykocyan. In einigen Schizophyceen tritt die neue Phykoerythrinmodifikation fast oder vielleicht ganz ausschließlich auf, so auch in *Porphyridium cruentum*. Das in Rhodophyceen vorkommende Phykoerythrin wurde in den hier untersuchten Schizophyceen nirgends angetroffen. Die wasserlöslichen Farbstoffe dieser Algen bestimmen in erster Linie die Färbung ihres Lagers. (Siehe Tabelle S. 201.)

Studien über die Urease.

Von
Sture Lövgren.

(Aus dem Biochemischen Institut der Universität Stockholm.)

Mit 22 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 19. April 1921.)

Inhaltsverzeichnis.

- Kap. I. Einleitung (S. 216).
- Kap. II. Geschichtliches (S. 216).
- Kap. III. Eigenschaften der Urease (S. 221).
 - 1. Verbreitung (S. 221).
 - 2. Bereitung der Enzymlösung (S. 222).
 - 3. Prüfung der Aktivität (S. 228).
 - 4. Selektivität (S. 235).
 - 5. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit (S. 236).
 - 6. Einfluß der Enzymkonzentration (S. 242).
 - 7. Einfluß der Harnstoffkonzentration (S. 243).
 - 8. Verlauf der Reaktion (S. 246).
 - 9. Temperaturkoeffizient und Temperaturoptimum (S. 248).
 - 10. Temperaturtoleranz (S. 250).
 - 11. Einfluß der Verdünnung (S. 251).
 - 12. Einfluß der Bellchtung (S. 252).
 - 13. Löslichkeit (S. 252).
 - 14. Beschleunigende Stoffe (S. 253).
 - 15. Hemmende Stoffe (S. 254).
 - 16. Vorbehandlungen (S. 255).
 - 17. Toxische Wirkungen (S. 257).
 - 18. Anwendungen (S. 257).
- Kap. IV. Co-Enzym (S. 258).
- Kap. V. Prüfung von Van Slykes Gleichung (S. 263).
- Kap. VI. Zur Bestimmung der Zeitgleichung (S. 269).
- Kap. VIII. p_{H} -Optimum der Urease als Funktion der Substratkonzentration (S. 278).
- Kap. VIII. Neue Formel für die Anfangsgeschwindigkeiten bei resp. p_{H} -Optimum (S. 283).

Kapitel I.

Einleitung.

1. Urease nennt man nach dem Vorschlage Miquels¹⁸¹⁾ (S. 83) das Enzym, unter dessen Mitwirkung Harnstoff in Lösung rasch die Elemente des Wassers aufnimmt und in Ammoniumcarbonat übergeht:



Dies Enzym findet sich überall: in der Luft, in den Wässern und im Erdboden — teils an Bakterien gebunden, teils frei in Pflanzenteilen. Der größte Teil des von Menschen und Tieren aufgenommenen Stickstoffs wird von dem Organismus als Harnstoff abgeschieden. Ein erwachsener Mensch produziert davon etwa 30 g täglich. Durch die obenerwähnte Reaktion wird der Stickstoff und Kohlenstoff des abgeschiedenen Harnstoffs in eine für die Pflanzen leicht assimilierbare Form übergeführt, zumal mehrere harnstoffspaltende Bakterien auch nitrifizierende Enzyme enthalten (Viehoever¹⁸⁴⁾ S. 272). Auf diese Weise ist per Kreislauf des Stickstoffs in der Natur gesichert.

Anm. Ein Teil des assimilierten Stickstoffs wird als Harnsäure ausgeschieden (besonders bei den Vögeln und den Schlangen), aber diese unterliegt einer bakteriellen Spaltung in Harnstoff und Kohlendioxyd (Miquel¹⁸¹⁾, S. 84). Im Harn der Pflanzenfresser findet sich neben Harnstoff auch Hippursäure. Diese wird durch Bakterien in Benzoesäure und Glykokoll gespalten [Van Tieghem¹⁸²⁾].

Kapitel II.

Geschichtliches über Bakterienurease.

2. Daß der Harn beim Stehen trübe wird und ein Gas mit stechendem Geruch entwickelt, ist eine der am frühesten und am allgemeinsten beobachteten chemischen Tatsachen. Bezeichnend ist, daß die beiden ersten als selbständige chemische Individuen gekennzeichneten Gase gerade NH_3 bei der Harn gärung und CO_2 bei der Zuckergärung waren. Die Entdeckung beider verdanken wir van Helmont (1577—1644). Er isolierte aus gärendem Mist eine besondere „Luftart“, die er Gas pingue, d. h. brennbares Gas, nannte und wahrscheinlich nichts anderes als unreines Ammoniak war. Kohlendioxyd erhielt er auf mancherlei Weisen und führte darauf den Namen „Gas silvestre“ ein. Damit waren also die beiden Bestandteile des Harn gärungsproduktes bekannt. Später wurde van Helmonts „Gas pingue“ als „Gas ammoniacale“ bezeichnet. Dieser Name scheint von Sal ammoniacum hergeleitet zu sein, wobei man sich jedoch zu einer

Verwechslung von Sal ammoniacum (Steinsalz aus Ägypten, insbesondere aus der Oase „Ammon“) mit Sal armeniacum oder armoniacum (Salmiak aus Armenien) schuldig machte.

Zur Erklärung der Harnstoffspaltung und ähnlicher Gärungsprozesse wurde schon zu van Helmonts Zeit das Wort „Fermentation“ herangezogen: *Odor (urinae) vero est fermenti putrifactivi*: der Geruch (des Harns) beruht auf einem fäulnisregenden Ferment (Van Helmont⁵²) Boerhave (1732) ging einen Schritt weiter. Der Harn, sagt er⁵³, wird bei der Fäulnis in Ammoniak verwandelt (*urina enim putrescit ex se in alcalinum salem, marinus sal hunc domat, ligat, in ammoniacum vertit*). Aber erst nachdem Rouelle cadet 1773 im Harn den Harnstoff entdeckt hatte und dessen Eigenschaften durch Cruishank, Fourcroy und Vauquelin, Prout, Prout, Wöhler, Dumas und Natanson näher untersucht worden waren, konnte ein Einblick in den Mechanismus und die Ursache der Ammoniakbildung bei der Harngärung, gewonnen werden.

8. Fourcroy und Vauquelin zeigten (1799—1800) in einer berühmten „Mémoire“, daß der Hauptanteil der festen Substanzen im Harn aus einem besonderen „Harnstoff“ besteht⁵⁴ (S. 68), auf welchen sie den Namen „Urée“ einführten^{52, 53} (S. 69 u. 91). Beim Kochen der Wasserlösung des neuen Harnstoffs⁵³ (S. 96) sowie bei dessen spontaner Zersetzung in schlecht verschlossener Flasche⁵⁴ (S. 101) durch die Fermentation, „excitée par la présence du corps gélatineux“⁵⁵ (S. 61) bilde sich hauptsächlich Ammoniumcarbonat. Diese beiden Vorgänge erinnern sehr aneinander⁵³ (S. 100). Prout meldete zu derselben Zeit, daß er seit 6 Jahren „un flacon plein d'urine, bien fermé avec un bouchon de cristal“ aufbewahrt habe, ohne eine Veränderung im Geruch oder Aussehen konstatieren zu können¹⁵⁶ (S. 261), während im Sommer in 15 Tagen „l'urine exposée à l'air libre“ Ammoniak entwickle. Er schloß daraus: *L'atmosphère concourt réellement, par le moyen de l'azote, à la formation de l'ammoniaque*. Der Wasserstoff komme aus einigen Substanzen des Harns, „susceptibles de putréfaction. Le mucilage paroît être le plus propre à fournir cet élément à l'ammoniaque“¹⁵⁶ (S. 262). Nachdem aber Prout (1818) als der erste (Berzelius vielleicht ausgenommen) den Harnstoff in reinem Zustand dargestellt hatte und dessen prozentuelle Zusammensetzung mit stauenswerter Exaktheit ermittelt hatte¹⁵⁷ (S. 354), bahnte sich bald die Auffassung Weg, daß beim Zerfall des Harnstoffs in kohlen-saures Ammoniak ein Zutritt von Wasser anzunehmen wäre [Vauquelin¹⁵³]. Einen Schritt weiter auf dem Wege zur Klarlegung der Struktur des Harnstoffs nahm Dumas 1830, indem er auf Prouts, Wöhlers und eigene Analysen gestützt sagte, Harnstoff stehe zum Ammoniumcarbonat in demselben Verhältnisse wie Oxamid zum Ammoniumoxalat. Bei der Gärung „prend un atome d'urée ($Az_4H_8C_4O_2$) les éléments de deux atomes d'eau. L'urée peut être: $C_4O_2 + \frac{H_4Az_4}{H_4Az_2}$ “.

Doch dauerte es noch 25 Jahre, bevor die Struktur des Harnstoffs als Carbamid völlig klargelegt wurde. Dies geschah im Jahre 1856 durch Natanson (*Ann. chim. phys.* 3 sér. 48, 287. 1856), der den Harnstoff aus trockenem Phosgenas $COCl_2$ und Ammoniak erhielt.

4. Bezüglich der Ursache der Harngärung dürfte in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts die gewöhnliche Ansicht gewesen sein, daß das Ferment ein albumoider toter Körper sei, der sich bei der fauligen Zersetzung des Harnschleims bilde und entweder durch Kontakt (Berzelius, Mitscherlich) oder durch übergeführte Molekularbewegung (Liebig, Dumas) den Harnstoff zum Zerfall bringe. Pasteur brachte eine völlige Umwälzung der Anschauungen (1860 und später).

Der grundlegende Versuch Pasteurs war bekanntlich folgender¹⁴⁸⁾ (S. 850).

Frischer Harn wurde in einem Glasballon 2–3 Minuten gekocht und nach Abkühlen, wobei die eintretende Luft ein langes glühendes Platinrohr zu passieren hatte, der Hals des Ballons zugeschmolzen. Nach 4–6 Wochen war noch keine Gärung eingetreten und blieb auch weiterhin aus, wenn erhitzter Luftstaub eingeführt worden war. Wurde aber nicht erhitzter Luftstaub eingeführt, so zersetzte sich der Harnstoff rasch unter Bildung von Ammoniak und Entwicklung von Mikroorganismen.

Damit war der Beweis geliefert, daß die ammoniakalische Gärung des Harns die Wirkung eines in der Luft befindlichen und aus derselben in den Harn gelangenden Fermentes ist. Aber Pasteur ging einen Schritt weiter. „Le ferment“, sagt er¹⁴⁹⁾ (S. 853), „n'est pas une substance morte... c'est un être, dont le germe vient de l'air.“ Das Harnferment sei damit ein organisiertes.

5. Im Jahre 1862 beschreibt Pasteur als Erreger der Harngärung ein kugeliges Lebewesen, das er „torule ammoniacale“ nennt¹⁴⁹⁾ (S. 51), später von Cohn *Micrococcus ureae* genannt¹⁵⁰⁾ (S. 158). Van Tieghem (1864) kam ebenfalls zu dem Ergebnis, daß vorwiegend Kokken zur Harnstoffspaltung befähigt seien^{151, 152)}. Miquel berichtete indessen im Jahre 1879 über die Entdeckung und Isolierung eines stäbchenförmigen Fermentes, das Harnstoff ebenso energisch zerlegte wie *Micrococcus ureae*. Er schlägt den Namen *Bacillus ureae* vor. Während *Micrococcus ureae* und dessen Sporen bei einer Temperatur von 54–55° in 2 Stunden völlig abgetötet werden¹⁵³⁾ (S. 392), so vertragen die Sporen von *Bacillus ureae* mehrere Stunden eine Temperatur von 95–96°. Auf diese Weise kann eine Kultur von den Mikrokokken befreit werden¹⁵⁷⁾ (S. 126). Weiter beobachtete von Jaksch (1881) bei seinen Untersuchungen über den besten Nährboden für *Micrococcus ureae*, daß die Morphologie der Pilze mehrere Stadien durchläuft: In den ersten 24 Stunden nach der Impfung kommen nur Stäbchen vor; nach 48 Stunden werden die Stäbchen kürzer und reihen sich rosenkranzartig aneinander; nach 14 Tagen sind keine Stäbchen mehr zu sehen, sondern ausschließlich Mikrokokken¹⁵⁴⁾ (S. 418). Einige Jahre später (1885) isolierten Leube und Gräser durch Reinzucht sowohl aus dem Luftstaub wie aus gärendem Harn 4 verschiedene harnstoffspaltende Mikroorganismen. Von diesen waren 3 stäbchenförmig; den wirksamsten nannten sie *Bacterium ureae*. Der vierte war kugelförmig und sehr wirkungsfähig. Dieser wurde *Micrococcus ureae* genannt. — Damit war der direkte Beweis geliefert, daß in der Luft Keime harnstoffspaltender Pilze sich finden¹⁵⁵⁾.

In den folgenden 30 Jahren wurden immer neue harnstoffspaltende Bakterien entdeckt und beschrieben. Auch wurde Harnspaltungsvermögen bei vielen Schimmelpilzen und bei Bakterien (z. B. *Proteus*), die durch ihre Wirksamkeit in anderen Richtungen schon gut bekannt waren, nachgewiesen. Hierbei in erster Linie tätig war Miquel, der sich vom Jahre 1878 an bis zum Jahre 1898 eingehend mit den Erregern des Harnstoffabbaues beschäftigte. Weiter zu nennen sind: Cambier 1893, Brodmeier 1895, Flügge 1896, Burchard 1899, Beijerinck 1901, Tissier und Martelly 1902, Löhnis 1905, Söhngen 1909, Christensen 1910, Rochaix und Dufourt 1910, Burri 1912 und Viehöver 1913 (siehe Literaturverzeichn.).

6. Miquel, der zur Unterscheidung der Spezies in erster Linie die Menge Harnstoff berücksichtigte, die von den betreffenden Bakterien in einer gewissen Zeit gespalten wurde, hat wesentlich auf Grund ihres verschiedenen Harnstoffspaltungsvermögens gegen 60 Arten sporenbildende und nichtsporenbildende, stäbchen- und kokkenförmige harnstoffspaltende Bakterien aufgestellt. Er benutzt folgende Einteilung¹³²⁾ (S. 72):

- I. Schizomyceten
 1. Urokokken (überleben 60–70° nicht; kugelig; kommen einzeln vor);
 2. Urosarcinae (überleben 60–70° nicht; kugelig; zu Paketen vereinigt);
 3. Urobacillen (bilden Endosporen, die feuchte Hitze von 90–95° mehrere Stunden vertragen; stäbchenförmig; sehr energisch).

II. Evmyceten (Schimmelpilze).

In jeder Gruppe unterscheidet er dann je nach der Größe ihres Harnstoffspaltungsvermögens eine Menge Arten, z. B. 30 verschiedene Arten unter den Urokokken.

Gegen den von Miquel angewandten Einteilungsgrund stellt (1913) Viehöver die schwerwiegende Bemerkung dar, daß die enzymatische Leistungsfähigkeit einer Bakterienkultur in hohem Grade von ihrer Vorgeschichte und Wachstumsbedingungen abhängig ist. Durch eine gründliche, botanische Untersuchung der bisher bekannten und ihm zugänglichen Arten harnstoffspaltender Bakterien in bezug auf Form, Größe, Beweglichkeit, Sporenbildung, Optimum und Maximum der Temperatur, Sauerstoffbedürfnis, Wachstum auf verschiedenen Nährböden, Giftkonzentration für Wachstum und Gärung, Gehalt an Enzymen usw. kommt Viehöver dann zu dem Resultat, daß von den Urobacillen eine Reihe in allen wesentlichen Merkmalen mit seiner Hauptart (*Bacillus probatus*) identisch sind. Auch von den übrigen stäbchenförmigen Bakterien und von den Urokokken seien mehrere untereinander nahe verwandt. Immerhin ist doch auch nach Viehöver die Anzahl wohlverschiedener Urobakterienarten ziemlich groß¹³⁴⁾ (S. 341–350).

In den letzten Jahren hat sich indessen eine neue Auffassung bezüglich der Klassifikation der harnstoffzersetzenden Bakterien geltend gemacht. Erstens hat sich nämlich gezeigt, daß eine gewisse Fähigkeit zur Harnstoffspaltung den meisten bekannten Bakterien zukommt [Tissier und Mar-

telly 1902¹²²), Kruse 1910¹²³), Horowitz 1916⁷⁸)] und zweitens hat sich bei Jacobys interessanten Versuchen über Fermentbildung herausgestellt, daß Urobakterienkulturen und auch *Proteus* auf gewissem harnstoffhaltigen Nährboden gut wachsen und gedeihen, ohne ein harnstoffspaltendes Ferment zu bilden, während ein solches sogleich gebildet wird, wenn Eiweißleucin und eine Aminosäure zum Nährboden zugefügt werden [1917⁸⁸, ⁹¹]). Es kommt denn vor, als ob die Zusammensetzung des Nährbodens mehr bedeutet als die Art der Bakterie und die von Düggele schon 1915 ausgesprochene Ansicht scheint nunmehr gut begründet, daß nämlich die Fähigkeit zur Harnstoffspaltung kein speziendiagnostisches Merkmal ist und daß die sogenannten Urobakterien also keinen scharf umgrenzten Gattungsbegriff darstellen, sondern — nach morphologischen Gesichtspunkten geordnet — in das System der übrigen Schizomyceten einzureihen sind⁸⁶) (S. 307).

7. Bezüglich der Beschaffenheit und Löslichkeitsverhältnisse des tätigen Ferments entbrannte bei der Harn gärung derselbe Streit wie bei der Zuckergärung mit dem Unterschied, daß der Kampf in unserem Gebiete geringeres Aufsehen erweckte und früher zugunsten der modernen Auffassung entschieden wurde. Pasteurs Ansicht, daß das Ferment nicht ein albumoider toter Körper sei, sondern ein kleines Lebewesen, durch dessen Lebenstätigkeit Harnstoff zerspalten wurde, beherrschte siegreich die Gedanken während vieler Jahre. In eine neue Lage tritt die Frage, als Musculus 1876 aus dem Harn von Blasenkatarrhkranken durch Fällung mit starkem Alkohol einen Niederschlag erhielt, der nach dem Trocknen keine Spur von Pilzen aufwies, aber doch Harnstoff heftig zersetzte¹²⁴), ¹²⁵). Die Beobachtung Musculus' wurde sogleich von Pasteur und Joubert bestätigt. Sie mußten folglich zugeben, daß es ein lösliches Ferment gibt, das imstande ist, Harnstoff in Am-Carbonat zu transformieren, aber ursprünglich sei jedoch das lösliche Ferment Musculus' von dem kleinen organisierten Harnstoff-Ferment produziert¹²⁶). Durch Musculus' Versuch schien es also bewiesen, daß das Produkt der Mikroorganismen isoliert werden kann und allein für sich als lösliches „umgeformtes“ Ferment zu wirken imstande ist. Dies bestreitet einige Jahre später Leube (1885) auf Grund folgenden Versuchs: Eine reingezüchtete Pilzart durfte Harnstoff vergären und wurde dann mittelst eines Tonzylinders abfiltriert; das Filtrat, das also das lösliche Ferment enthalten sollte, erwies sich jedoch völlig wirkungslos. Daraus schließt Leube: Insofern es sich um das Bakterienferment handelt — was ja bei Musculus' Versuch nicht der Fall war, obgleich es Pasteur behauptete — gelingt es nicht, ein umgeformtes Ferment von den die Harnstoffzerlegung bewirkenden Pilzen zu trennen¹²⁷) (S. 570). Zu demselben Resultat wie Leube kam in demselben Jahre Lea bezüglich lebender Pilze. Wurden aber die Pilze durch Alkohol abgetötet, so fand er, daß ihr Ferment frei und durch Wasser ausziehbar wurde¹²⁸) (S. 138).

Im Jahre 1893 behauptete Miquel, es sei ihm gelungen, mittelst Filtration durch Chamberlandkerzen das Enzym — wie man zu dieser Zeit die löslichen Fermente zu benennen anfing — von den Bakterien zu trennen. Gleichzeitig führte er für sein Enzym den Namen „Urase“ ein, später zu

dem besser klingenden „Urease“ abgeändert¹³⁰) (Ann. de Mikroph. 5, 371. 1893). Beijerinck (1901) konnte die Befunde Miquels nicht bestätigen und meinte, Miquel sei durch schadhafte Chamberlandkerzen, welche allmählich die Bakterien selbst bei der Filtration durchtreten ließen, getäuscht worden. Auf diesem Wege sei das Enzym von den Bakterien nicht abtrennbar¹⁴) (S. 56). Auch Leas Befunde über die Löslichkeit des Enzyms nach Abtöten der Pilze konnte er nicht bestätigen. „Die Urease“, sagt er, „ist ein unlösliches Enzym, welches sowohl an dem lebenden wie an dem toten Bakterienkörper fest gebunden ist“¹⁴) (S. 57). Daß die Bakterien ein Enzym (Urease) enthalten, sei jedoch unverkennbar, denn werden diese durch Chloroformdampf abgetötet, so spalte der Rückstand Harnstoff beinahe ebenso gut wie die ursprüngliche Kultur. Durch Fällung der Kulturen mit Alkohol erhält man ein Trockenpräparat, das auch nach Jahresfrist Ureumlösungen spaltet¹⁴) (S. 55). Nach Beijerinck soll also die Urease ein typisches Endoenzym sein. Diese Ansicht wird gestützt von Shibata (1903), der aufwies, daß das harnstoffspaltende Enzym von *Aspergillus niger* nicht in die Kulturflüssigkeit ausgeschieden wird¹⁶⁶), Moll (1902) erhielt in Bakterienkulturen durch Alkohol einen Niederschlag, der chlorfrei gewaschen werden konnte und dann ebenso wirksam war wie vor dem Waschen¹³³) (S. 345). Jacoby hat neuerlich (1911) angegeben, daß sein auf Tonteller getrocknetes Urobakterienpulver an sich gut wirksam sei, ohne daß das Enzym dabei in Lösung gehe, selbst nicht, wenn das Pulver mit Quarz zerrieben wird⁸⁹) (S. 356).

Ich glaube nichts Besseres tun zu können, als diesen Paragraph durch folgende Worte von Shibata abzuschließen; „Die Abspaltung des Harnstoffs durch das Pilzenzym findet also intracellulär statt, was bei der bekannten Durchlässigkeit der Plasmahaut für Harnstoff ohne weiteres verständlich ist.“

8. Bis zu Ende der ersten Dekade des 20. Jahrhunderts sind die Forscher in unserem Gebiete, wie wir gesehen haben, hauptsächlich mit der Isolierung und genauen Beschreibung der harnstoffspaltenden Bakterien beschäftigt gewesen. Nachdem aber Takeuchi im Jahre 1909 die überraschende Entdeckung gemacht hatte, daß die Bohnen von *Soja hispida* reichliche Mengen Urease enthalten, die einfach mit Wasser ausgezogen werden können, so wandte sich das Interesse entschieden auf die chemische Seite der enzymatischen Harnstoffspaltung. Am meisten wurde dabei die leicht herstellbare Sojaurease benutzt. Nur vereinzelte Forscher wie Jacoby beschäftigten sich fernerhin mit der Bakterienurease.

Kapitel III.

Eigenschaften der Urease.

1. Verbreitung.

9. Außer in Bakterien und Schimmelpilzen, z. B. *Aspergillus niger* [Shibata 1902¹⁶⁶), siehe weiter Dox 1909³⁴) und Kossowicz 1912¹⁰³)] ist die Gegenwart eines harnstoffspaltenden Enzyms in folgenden Pflanzen nachgewiesen:

In den Bohnen von *Soja hispida* [Takeuchi 1909¹⁷⁸]: größtenteils in dem Kern [Groll 1916⁸²], in allen Arten ungefähr zum gleichen Betrage [Annet 1914¹], von dem Alter der Bohnen unabhängig [Wester 1920³⁰⁴];

in der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*), in den Samen von Hafer, Reis, Buchweizen und Melone [Takeuchi 1909¹⁷⁸];

in Weizenkeimen und blauen Lupinen, etioliert [Kiesel 1911⁸⁹] (S. 190);

in den Samen der meisten Papilionaceae, vor allem *Robinia pseudacacia* [Zemplen 1912²¹¹];

in den Samen von *Robinia pseudacacia*, blauer Lupine, *Strophantus* und Sesam [Wakulenko 1913¹⁸⁶];

in *Ricinus* (Castor)-Bohnen [Falk 1913⁴⁹];

in den Samen von blauen, gelben und weißen Lupinen [Muenck 1914¹⁸⁵];

in einigen indischen Samen, vor allem in den Samen von *Canavalia ensiformis* [Annet 1914¹];

in verschiedenen Kleearten, Kiefer, Mohrrübe, Hanf, Bittermandel [Fosse 1914⁶¹];

in der Jackbohne (*Canavalia*) 15 mal soviel wie in der Sojabohne [Mateer und Marshall 1916¹²³];

in den Samen der Getreidearten: Hafer, Roggen, Weizen und Gerste [Némec 1918¹];

in vielen holländischen Samen, aber wenig [Wester 1919^{303, 304}]

Zu nennen ist weiter, daß Rovere eine Urease in der (blutfreien) Thymusdrüse junger Kälber gefunden hat¹⁶⁴. Ihr Vorkommen in der Leber ist fraglich.

Zum Schluß will ich bemerken, daß in manchen der erwähnten Fälle trotz einer sehr langen Versuchsdauer (oft von mehreren Tagen) die Spaltung des zugesetzten Harnstoffs so gering ausgefallen ist, daß eine Infektion durch die überall verbreiteten Urobakterien nicht ausgeschlossen ist, zumal die Versuchsmethodik oft ungenügend und eine bakteriologische Nachuntersuchung [außer bei den Sojabohnen durch Graaff und Zande 1916⁶⁹] niemals vorgenommen ist. So sind unzweifelhaft die Ergebnisse von Leuper und Tonnet [1914¹¹⁴] zu deuten, wenn sie angeben, daß der Alkoholniederschlag aus normalem Harn „Spuren“ eines uricolytischen Enzyms enthalte.

2. Bereitung der Enzymlösung.

10. Trotzdem Urease in den Samen vieler anderer Pflanzen aufgefunden worden ist, so hat doch die Sojabohne als leicht zugängliche Quelle für die Enzymgewinnung ihren Platz bewahrt. Nur ausnahmsweise sind die Samen von *Robinia pseudacacia* und in den letzten Jahren die Jackbohne (*Canavalia ensiformis* = Schwertbohne) zur Verwendung gekommen. Die häufiger angewandten Bereitungsmethoden sind die folgenden:

I. Die feingemahlene (trockene) Bohne wird einfach mit Wasser ausgelaugt (Takeuchi) in der Gewichtsproportion 1:5 (Van Slyke, Groll, Lövgren), 1:10 (Carnot und Gerard), 1:100 (Grigaut und Guérin, Némec) usw., während ein paar Stunden (Van Slyke, Lövgren) oder längerer Zeit (24 Stunden — Groll). Danach wird der feste Rückstand durch Filtrieren (am besten durch Faltenfilter) oder Zentrifugieren abgetrennt.

Ich habe mich überzeugt, daß längeres Auslaugen und stetiges Umrühren unnötig ist. 2stündiges Auslaugen mit jeweiligem Umschwenken der Mischung gibt eine ebenso kräftige und besser filtrierbare Lösung wie 24stündiges Auslaugen unter rascher Umrührung mit Motor, wie folgender von mir ausgeführter Versuch zeigt:

Versuch 1: Einfluß der Auslaugezeit.

Tabelle I.

Auslaugen Stunden	Enzym ccm	$\frac{1}{100}$ -Harn- stoff ccm	Harnstoff- konzentration Mol pro Liter	Reaktions- zeit Minuten	NH, gefunden mg	NH, Maximum mg
2	5	5	0,5	20	15,4	170
5	5	5	0,5	20	15,4	170
24	5	5	0,5	20	16,1	170

Enzymmaterial: 200 g Sojabohnen in 1000 ccm Leitungswasser.

Temperatur: 17° C. — NH₃ (wie immer) nach Folin bestimmt (s. § 13).

Nach meiner Erfahrung geht während der ersten Stunde der Hauptteil des Enzyms in Lösung; während der zweiten nimmt die gelöste Enzymmenge ein wenig zu, um dann bei fortgesetztem Auslaugen kaum weiter zu steigen. Mehr als die Auslaugezeit bedeutet hierbei die Zerkleinerung des Ausgangsmaterials.

Die auf oben beschriebene Weise hergestellte Enzymlösung muß frisch benutzt werden, denn sie ist wenig haltbar. Sie ist sauer ($p_H = 6,5$) und enthält u. a. beträchtliche Mengen Eiweißstoffe, die bald durch den Säuregrad der Lösung (Armstrong und Horton²) S. 113. 1912) auszufallen anfangen und dabei die Enzympartikel mit sich reißen (siehe Versuch 2). Schon nach einigen Tagen bildet sich ein schleimiger Niederschlag, der sich bei weiterem Stehen immer mehr vergrößert, womit eine stetige Abnahme in der Aktivität parallel läuft.

Die Geschichte einer solchen Enzymlösung habe ich einmal näher studiert. Die Enzymlösung wurde aus 200 g Sojabohnenmehl + 1000 ccm Wasser mit stetiger Umrührung während 3 Stunden bereitet. Nach Stehen über Nacht waren die unlöslichen Körper auf den Boden gesunken. Die überstehende Flüssigkeit wurde durch einen Heber vorsichtig abgossen.

Sie war dunkelbraun gefärbt, aber im durchfallenden Licht ziemlich klar. Sie wurde mit ein wenig Toluol versetzt und im Eisschrank aufbewahrt. Am zweiten Tage war sie noch klar. Am dritten war sie hellgelb geworden und ein reichlicher gelber Bodensatz hatte sich abgesetzt. An diesem und einigen folgenden Tagen wurden aus der tüchtig geschüttelten Flüssigkeit 2 ccm-Portionen ausgenommen und filtriert. Das Filtrat + Waschwasser und der gewaschene Rückstand wurden teils für sich und teils zusammengebracht auf ihre Wirksamkeit geprüft.

Versuch 2: Die Geschichte einer Enzymlösung.

Tabelle II.

Enzym	H ₂ O (ccm)	M/1- Phosphat ccm	M/1- Harnstoff ccm	Alter d. Enzymlös. in Tagen						
				1	3	4	5	6	11	
Filtrat von 2 ccm der Enzymlösung	5	2	1	—	6	3,1	1,3	0,4	0,2	mg NH ₃
Niederschlag von 2 ccm d. Enzymlös.	5	2	1	—	—	3,9	2,7	0,6	0,3	mg NH ₃
2 ccm der unfiltrierten Enzymlösung	5	2	1	12,8	—	11,9	8,3	—	0,7	mg NH ₃

Totalvolumen: 10 ccm, — Harnstoffkonzentration: 0,1 Mol pro Liter.
 — Temperatur: 17°. — Phosphatlösung: 165 ccm $\frac{M}{1}$ -Na₂HPO₄ + 35 ccm $\frac{M}{1}$ -KH₂PO₄; $p_H = 7,13$, nach dem Zusatz des Enzyms etwa 7. — Reaktionszeit: 30 Minuten.

Die Ziffern zeigen deutlich:

1. Daß der Wirkungsgrad der Enzymlösung nach dem Entstehen des Niederschlages bald nachläßt [Armstrong und Horton²⁾, 1912, (S. 113)];

2. daß der Niederschlag den größten Teil der Enzymmenge adsorbiert;

3. daß die Wirkung von Filtrat + Niederschlag stets größer ist als die Summe der Wirkungen von Filtrat und Niederschlag, jedes für sich genommen. Zu diesem Punkt komme ich später zurück (§ 50 und ff.).

Um die Enzymlösungen haltbar zu machen, hat man einen Zusatz von folgenden Stoffen vorgeschlagen:

A. K₂HPO₄ bis 5% der Trockensubstanz [Van Slyke¹⁸⁹⁾, 1914, S. 213]. Die Lösung soll sich dabei mehrere Wochen halten, wahrscheinlich dadurch, daß K₂HPO₄ die Acidität der Enzymlösung aufhebt.

Anm.: Barendrecht [1920⁹⁾] (S. 6) extrahiert x g Sojabohnenmehl direkt mit 10proz. Phosphatmischung bei 27°, setzt x g Kieselgur zu und filtriert. Um eine Enzymlösung von geeigneter Aktivität und p_H zu erhalten, mischt er y ccm von dem Filtrat mit z ccm einer Phosphatlösung, so abgepaßt, daß die schließliche Phosphatkonzentration 9,6% wird und p_H den erwünschten Wert bekommt. Von dieser letzten Mischung nimmt er

stets 10 ccm und vermischt mit 2 ccm Harnstofflösung. Phosphatkonzentration folglich 8%.

B. Glycerin im Volumenverhältnisse 1:1 [Jansen 1915⁴⁴], Groll, Euler und Brandting, Wester]. Die Lösung behält dabei Monate hindurch ihre Wirkungsfähigkeit. Groll [1917⁴³, ⁴⁴] und gelegentlich Wester [1919^{40b}] glauben gefunden zu haben, daß bei Aufbewahrung der Enzymlösung bei höherer Temperatur die Aktivität periodischen Schwankungen unterworfen ist, und wollen dies Sachverhältnis auf die Kolloidnatur des Enzyms und periodische Dispersitätsänderungen desselben zurückführen. Groll hat in diesem Zusammenhang versucht, bei kolloidem Platin und Gold ähnliche Schwankungen aufzuweisen, aber mit wenig Erfolg. — Euler und Brandting [1919⁴⁰], die eine Nachprüfung der Groll'schen Versuche vornahmen und dabei keine Periodizität in der Aktivität der Ureaselösung konstatieren konnten, bemerken hierzu, daß das Zahlenmaterial Groll's allzu dürftig ist und daß überhaupt die von ihm gefundenen Schwankungen in der Aktivität durch eine Schwankung in der Thermostatentemperatur von 0,6° möglicherweise zu erklären sind.

Zusatz von Glycerin bringt einige bedeutende Nachteile mit sich:

- a) Wird die Enzymlösung auf die Hälfte verdünnt,
- b) verdeckt vielleicht das Glycerin den Einfluß anderer zugesetzter Stoffe,
- c) wirkt das Glycerin auf die Enzymreaktion hemmend.

Enthält die Reaktionsmasse 25% Glycerin, so wird die Enzymwirkung auf die Hälfte herabgedrückt [Wester 1920^{40a}] (S. 178 u. 174). Bei Canavaliaurease beeinträchtigt nur 10 Proz. Glycerin die Enzymwirkung deutlich (l. c. S. 174).

Meiner Meinung nach ist es besser, stets frisch bereitete Enzymlösungen anzuwenden [vgl. Van Slyke und Cullen¹⁸⁸], (S. 213)], anstatt zu versuchen, durch etwaige Zusätze die Haltbarkeit der Lösungen zu erhöhen, was ja in der Länge doch nicht gelingt. Die Beschwerde, jedesmal eine frische Enzymlösung herzustellen, ist außerdem sehr gering.

II. Armstrongs Methode [1912⁴] S. 113]: Das Bohnenmehl wird zuerst durch Extraktion mit Petroleumäther während 45 Minuten je 6 mal nacheinander entfettet. Das gewaschene Mehl wird auf Glasplatten verbreitet und darf über Nacht trocknen. Am nächsten Morgen wird es mit dem 5fachen Gewicht Wasser vermischt nebst ein wenig Toluol. Nach 24 Stunden wird filtriert.

Vorteile: Reinere Enzymlösungen.

Nachteile: Das Verfahren ist mühselig und teuer.

Anwendung: Von Armstrong mit Schülern, Marg. Falk, Falk und Segiura, Jacoby mit Schülern.

III. Marshalls Methode [1913¹⁸⁹) S. 285,¹⁹²) S. 351]:
1 Teil Bohnenmehl wird mit 10 Teilen Wasser während einer Stunde bei Zimmertemperatur ausgelaugt. Dann wird $\frac{1}{10}$ Vol. $\frac{n}{10}$ -HCl zugesetzt und 5—15 Minuten bei 35° auf dem Wasserbade erhitzt, wobei reichliche Mengen Proteinstoffe fallen. Danach Filtration.

Vorteile: Reinere Enzymlösung, leichtere Filtration, klarere Filtrate.
Anwendung: Von Marshall, Fiske, Wester²⁰²).

Van Slyke warnt vor dieser Methode: „The use of acid in clearing the solution, would result in a considerable loss of activity“ [1914¹⁸⁸) (S. 212)]. Nach Marshalls Versuchsziffern zu urteilen, ist indessen diese Einwendung bei seiner Arbeitsweise nicht stichhaltig.

Die Soja-Wassermischung filtriert im Anfang stets trübe. Um sie besser filtrierbar zu machen, habe ich einen Zusatz von Kaolin versucht. Dabei stellte sich indessen heraus, daß die Aktivität der Enzymlösung (pro Kubikzentimeter berechnet) abgeschwächt wurde:

Versuch 3: Kaolinbehandlung I.

Methode: Sojabohnenmehl + Wasser (1 : 5) während 24 Stunden. Die überstehende trübe Lösung dekantiert und mit $\frac{1}{10}$ ihres Gewichtes gereinigtem Kaolin $\frac{1}{2}$ Stunde durchgeschüttelt und auf der Nutsche filtriert. Filtrat opalescent.

Tabelle III.

	Enzym ccm	$\frac{M}{10}$ -Harnstoff ccm	Harnstoff- konzentration Mol pro Liter	Reaktions- zeit Minuten	NH ₃ gefunden mg	NH ₃ - Maximum mg	Harnst. zersetzt %
Nichtm. Kao- lin behandelt	1	5	0,8	30	5,96	170	3,5
	1	5	0,8	30	6,11	170	3,6
Mit Kaolin behandelt	1	5	0,8	30	4,80	170	2,8
	1	5	0,8	30	4,72	170	2,8
	1	5	0,8	30	4,70	170	2,8

Versuch 4: Kaolinbehandlung II.

Methode: Wie oben.

Tabelle IV.

	Enzym ccm	$\frac{M}{10}$ -Harnstoff ccm	Harnstoff- konzentration Mol pro Liter	Reaktions- zeit Minuten	NH ₃ gefunden mg	NH ₃ - Maximum mg	Harnst. zersetzt %
Nichtm. Kao- lin behandelt	1	5	0,8	30	3,81	170	2,3
	1	5	0,8	30	3,83	170	2,3
Mit Kaolin behandelt	1	5	0,8	30	3,23	170	1,9
	1	5	0,8	30	3,21	170	1,9

Temperatur: 17 .

Später habe ich gefunden, daß man klare, nur leicht opake Filtrate bekommen kann, wenn man von geringeren Mengen Sojabohnen und Wasser z. B. 20 auf 100 ausgeht, und das anfangs trübe Filtrat ein paar Male durch dasselbe Faltenfiltrum passieren läßt.

Eine Kombination der Methoden I B. und III ist:

IV. Westers Methode [1920²⁰⁶] (S. 165): „25 g Sojabohnen + 200 g 50 proz. Glycerin werden nach 48stündiger Maceration mit 25 ccm $\frac{n}{22}$ -N-Salzsäure gemischt, mit 50 proz. Glycerin aufgefüllt bis 250 ccm, auf 35° erwärmt und filtriert.“

Vorteile: Reinere Enzymlösungen, teils durch die Anwendung von Glycerin bei der Extraktion, teils durch den Zusatz der Säure und die Erwärmung, wobei Proteinstoffe fallen. Leichtere Filtration.

Nachteile: a) Einführung in die Lösung von einem fremden Stoffe (Glycerin), der an sich die Enzymwirkung hemmt.

b) Es ist nicht ausgeschlossen, daß die starke Glycerinkonzentration nicht nur die Löslichkeit der Proteinstoffe, sondern auch die Löslichkeit der Urease vermindert. Dies gilt nach Wester²⁰⁶) (S. 172) nicht für Soja-urease, ist aber in hohem Grade der Fall bei Canavaliaurease²⁰⁶) (S. 174), was ein Widerspruch zu sein scheint.

V. Feste Enzympräparate können auf mancherlei Weise bereitet werden.

1. Starker Alkohol bewirkt in der Enzymlösung einen reichlichen Niederschlag, der getrocknet werden kann, ohne sein Harnstoffspaltungsvermögen zu verlieren [Lea 1885¹⁰⁹] (S. 138), Takeuchi 1909, Hahn und Saphra 1914, Jacoby und Sugga 1915]. Nach Jacoby und Sugga [1915²¹¹] wird die Urease durch die Alkoholbehandlung unlöslich.

2. Van Slyke gießt die frische Enzymlösung in das 10fache Volumen Aceton. Der Niederschlag wird im Vakuum getrocknet und trocken zerrieben. Das Pulver ist unbegrenzt haltbar. Die aktive Substanz löst sich sofort in Wasser. Der geringfügige flockige Rückstand ist von keiner Bedeutung. Ein völlig lösliches Präparat wird durch nochmalige Acetonfällung der filtrierten Lösung erhalten [1913¹⁸⁶] S. 1220, ¹⁸⁶) S. 212]. Diese Methode ist auch von Onodera und von Rona mit Schülern angewendet.

3. Van Slyke gibt auch eine andere Darstellungsweise an [1914¹⁸⁸] (S. 212)]: Das Wasserextrakt wird einfach bei Zimmertemperatur über H_2SO_4 in einem Vakuum von weniger als 1 mm konzentriert. Die Entwässerung geht sehr schnell und der Rückstand wird so trocken, daß er sich leicht pulverisieren läßt. — Dieselbe Methode schlagen Jacoby und Sugga vor [1915²¹¹].

4. Aus Bakterien hat Jacoby [1917²⁰⁹] (S. 355) ein Ureasetrockenpräparat auf folgende Weise dargestellt: Agar-Massenkulturen von Urobakterien werden auf Tonteller ausgestrichen, am nächsten Tage wird das trockene Pulver pulverisiert. Das Enzym geht nicht in Lösung, aber das Pulver an sich ist gut (aber schwankend!) wirksam.

Der Vorteil, der mit der Anwendung fester Enzympräparate verbunden ist, liegt angeblich darin, daß man aus demselben Pulver Monate hindurch Enzymlösungen, die eine bestimmte Zusammensetzung haben und untereinander vergleichbar sind, herstellen kann. Das kann wahr sein — bisweilen —, aber nicht immer. Jacobys an demselben Tage aus demselben Fermentpulver bereitete Enzymlösungen zeigen einen deutlichen Wechsel in Aktivität [siehe ⁶⁹]. Sein Schüler Neumann gibt an, daß während seiner Untersuchung die Aktivität des Fermentpulvers zwischen den Ziffern 6,4 und 11,8 schwankt¹⁴⁴) (S. 135).

Ich will zuletzt nur zufügen, daß die Sojabohnen an sich als ein gutes und haltbares Trockenpräparat anzusehen sind. In bezug auf den Gehalt an fremden Stoffen sind die Trockenpräparatlösungen dem ersten Wasserauszug aus Sojabohnen wenig überlegen, wozu kommt, daß Fällung mit Alkohol, aber besonders mit Aceton die Aktivität in hohem Maße beeinträchtigt [Pin Yin Yi, 1920¹⁵²) (S. 185)]. Bisweilen versagen die Acetonpräparate völlig [Partos, 1920¹⁴⁷) (S. 297)]. Es ist also fraglich, ob die auf oben angegebene Weisen bereiteten Enzym-Trockenpräparate der Extrakosten und Mühe, die ihre Darstellung erfordert, wert sind.

VI. Jacoby benutzt bisweilen eine interessante Arbeitsweise [1916⁶³]. Er läßt Fibrinflocken während 24 Stunden in der Enzymlösung im Eisschrank liegen. Dabei werden die Enzympartikel an den Fasern unlöslich fixiert. Die Flocken werden gewaschen und kommen dann als Ureasepräparat zur Verwendung. Je konzentrierter die Enzymlösung war, um so kräftigere Ureasewirkungen entfalten die Fibrinflocken.

Dies Verfahren bietet den Vorteil, daß man das Enzym mit fremden Substanzen vorbehandeln kann, ohne diese in die Probenflüssigkeit mitzuschleppen zu brauchen. Man legt einfach die Enzym-Fibrinflocken in eine Lösung des betreffenden Stoffes, filtriert sie nach einer bestimmten Zeit ab, wäscht mit Wasser und läßt sie auf eine Harnstofflösung einwirken. Dabei liegt jedoch eine Schwierigkeit darin, zu jedem Versuch gleichgroße Fibrinflocken auszumessen. Parallelproben unterscheiden sich denn auch bei Jacoby sehr [bis auf 25%⁶³) (S. 94)]. Überhaupt ist die Methode noch nicht einwandfrei ausgearbeitet. Besonders die Wasserunlöslichkeit der an den Fibrinfasern fixierten Urease ist nicht ganz sichergestellt, noch minder ihre Haltbarkeit.

3. Prüfung der Aktivität.

A. Qualitative Prüfung.

11. Die Enzymlösung oder ein Brei der zu untersuchenden Pflanzenteile wird mit einer Harnstofflösung + ein paar Tropfen Phenolphthalein vermischt. Liegt Urease vor, rötet sich die

Lösung bald infolge der Alkalinität des gebildeten Ammoniumcarbonats. So kann man zu einer Auffassung über das Vorhandensein und auch einigermaßen über die Menge des Enzyms gelangen. Dies Verfahren hat Takeuchi, Armstrong, Kiesel, Annet und ich selbst (als Vorprüfung) benutzt.

Bei Anwendung größerer Mengen Harnstoff und längerer Zeit entweicht sogar NH_3 aus der Lösung und kann durch ein aufgehängtes rotes Lackmuspapier nachgewiesen werden [Leube¹¹³] (S. 549)].

Auch Nessler's Reagens empfiehlt sich zur Feststellung einer Ammoniakbildung [Leube¹¹³] (S. 554)].

B. Quantitative Prüfung.

12. Einige Kubikzentimeter der Enzymlösung werden zu einer Harnstofflösung von bekanntem Gehalt gesetzt. Nach bestimmter Zeit bricht man die Reaktion durch Säure oder Alkali ab und ermittelt den Endzustand durch quantitative Analyse:

1. des übriggebliebenen Harnstoffs

- a) nach Liebig durch Titration mit $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ und Soda als Indicator [Brodmeier, 1895²¹] (S. 382), ohne den Einfluß des gebildeten NH_3 zu berücksichtigen],
- b) nach Mörner-Sjöquist [Burchard, 1899²²] (S. 270) und Moll, 1902¹³³] (S. 345)],
- c) nach Fosse mit Xanthidrol [Fosse, 1914⁵¹].

2. des gebildeten Ammoniumcarbonat

- a) als CO_2 [Jacquemart, 1843⁹⁶] — Apparat von Partos, 1920¹⁴⁷] (S. 293)];
- b) als NH_3 , was das gewöhnlichste Verfahren ist.

Methoden zur Bestimmung des gebildeten NH_3 .

I. Direkte Methoden.

1. Die Alkalität der Probe wird durch Titration mit einer Normalsäure direkt bestimmt [Musculus, 1874¹³⁷] (S. 134)].

Diese Methode ist wegen ihrer Einfachheit sehr beliebt gewesen und ist u. a. von Miquel (stets), Beijerinck, Löhnis, Marshall [1913¹³⁰], Söhngen, Hahn^{67, 68}), Geilinger und in den letzten Jahren auch von Groll [1917⁶⁵], Wester (1919 u. 1920) und Pin Yin Yi (1920) angewendet.

Wegen der unten zu besprechenden großen Fehlerquellen ist diese Methode kaum als quantitativ anzusehen. Die mit derselben ausgeführten Arbeiten haben daher nur einen orientierenden Wert.

2. Die Probe wird nach Ende der bestimmten Zeit mit überschüssiger Säure vermischt und diese mit Alkali zurücktitriert, eventuell nach Wegschaffen des CO_2 durch Kochen [Armstrong und Horton, 1912²] (S. 114), Marshall 1914¹²²] oder durch 1stündiges Hindurchleiten von Luft [Armstrong, Benjamin und Horton, 1913²] (S. 328)].

Diese beiden Methoden sind freilich sehr einfach und rasch, aber mit großen Mängeln behaftet:

a) Verluste von NH_3 sind nicht ausgeschlossen, auch wenn die Reaktion in einem geschlossenen Kolben stattfindet, der ja jedenfalls beim Eingießen der Säure geöffnet werden muß [siehe Van Slyke, Zacharias und Cullen 1914¹²³] (S. 1220)].

b) Das Ammoniumcarbonat setzt sich von selbst in Bi- und Sesquicarbonat und Ammoniumcarbaminat teilweise um [siehe Beijerinck 1901¹⁴] (S. 39)].

c) Alle Stoffe der Reaktionslösung sind in der zu titrierenden Flüssigkeit vorhanden. Sie bewirken bei dem Indicator einen (zuerst von Sörensen erwähnten) Eiweiß- und Salzfehler (siehe Michaelis, Wasserstoffkonzentration 1914, S. 176) und der Umschlag wird wegen des Puffercharakters der Enzymlösung, den Marshall selbst als der erste beobachtet hat [1914¹²²] (S. 357)], weder richtig noch scharf. Man klagt auch oft darüber, daß der Neutralisationspunkt bei der Titration sich manohmal schwer bestimmen läßt [siehe z. B. Wester 1920¹²⁴] (S. 167)]. Dieser Übelstand wird vielleicht durch die von Hahn vorgeschlagene jodometrische Titration zum Teil beseitigt [1915⁶⁶] (S. 138)].

3. Der Ammoniakgehalt der Probe wird — nach Fällung der Proteinstoffe mittelst Essigsäure — durch direkte Nesslerisation bestimmt [Folin⁶⁹]; Grigaut und Guérin, 1919⁶¹].

II. Indirekte Methoden.

1. Hitzedestillation [siehe Boussingault, 1850²⁰]; Wüster, 1889²¹⁰]; Nencki und Zaleski^{142, 143}] mit oder ohne Vakuum. NH_3 wird dabei durch eine schwache Base [MgO, Kiesel, 1911⁶⁹] — $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Zemplen, 1912²¹¹] freigemacht und in eine Vorlage von überschüssiger Säure überdestilliert.

2. Destillation mit Wasserdampf [Armstrong und Horton, 1912²] (S. 115)]. NH_3 wird ohne Zusatz von einer Base nur mittelst eines Dampfstroms während 15—20 Minuten in die Säurevorlage übergeführt. Dies Verfahren ist von Armstrong mit Schülern, von Marg. Falk, von Jacoby mit Schülern, von Neumann und von Némec angewendet.

Zu diesen beiden Methoden mag bemerkt werden, daß bei höherer Temperatur der Harnstoff selbst durch die schwächsten Basen (sogar von

Wasser) angegriffen wird. Beträchtliche Mengen Harnstoff können dabei zersetzt werden. Eine sichere Korrektur dafür anzubringen ist schwer, wie Némec [1918¹⁴¹] und Pin Yin Yi [1920¹⁵²] (S. 178) hervorgehoben haben.

3. Nach Schlösing [1851⁶⁷]. Die Probe wird mit einer schwachen Base versetzt und nebst einer Säurevorlage unter eine Glasglocke gesetzt. NH_3 destilliert von selbst in einigen Tagen je nach der Temperatur und der

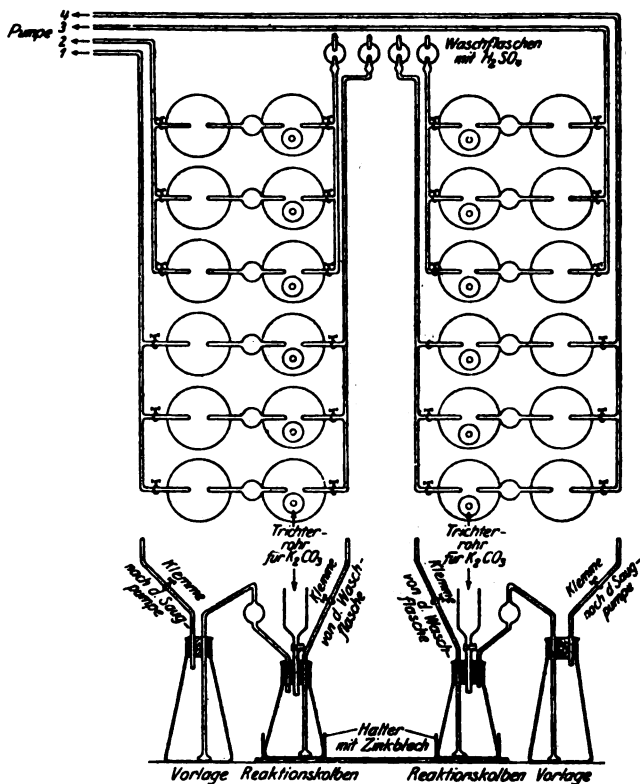


Abb. 1.

Größe des Apparates mehr oder weniger quantitativ in die Säurevorlage über. Diese Methode ist nur von Shibata angewendet [1903¹⁶⁶] und dürfte als veraltet angesehen werden.

4. Nach Folin [1903⁴⁸], Das Ammoniak wird durch Alkali-carbonat freigemacht und durch einen mittelst H_2SO_4 ammoniakfrei gewaschenen Luftstrom in die Säurevorlage übergeführt.

13. Weil die Folin'sche Methode zur Ammoniakbestimmung eine der schärfsten Methoden der analytischen Chemie darstellt

und den übrigen oben erwähnten Bestimmungsweisen weit überlegen ist, gebe ich hier eine nähere Beschreibung der Apparatur in der Form, wie ich sie angewandt habe (Abb. 1).

Der Reaktionskolben steht während des ganzen Versuches an der einen Seite mit einer Waschflasche mit H_2SO_4 und an der anderen mit der Säurevorlage luftdicht verbunden. Ein schwacher Luftstrom wird dabei stetig mittelst einer gewöhnlichen Wasserstrahlluftpumpe durch die Apparate hindurchgezogen. Die Einleitungsrohre sind in ihrem untersten Teil zu einer kleinen Kugel ausgeblasen, worin mit einer glühenden Platinnadel 7 gleichgroße kleine Löcher gemacht sind. Durch den Gummistöpsel des Reaktionskolbens geht ein mit Hahn versehenes Trichterrohr, in welchem 40 ccm einer gesättigten Pottaschelösung gegossen sind. Zu der bestimmten Zeit wird der Hahn geöffnet und nachdem die Pottaschelösung in die Reaktionsmasse geflossen ist, rasch wieder zugekehrt. Die K_2CO_3 -Lösung bricht die Reaktion momentan ab. Nach einer Viertelstunde wird der Luftstrom zu seiner vollen Stärke angelassen. Die Zeit der nötigen Durchlüftung beruht auf Temperatur, Menge des Ammoniaks, Stärke der Base und Stärke des Luftstroms.

Nach Ablauf der nötigen Zeit wird der Luftstrom vorsichtig abgebrochen, die Säurevorlage freigemacht, das Einleitungsrohr mit destilliertem Wasser abgespült und aufgenommen und der Überschuß an Säure in der Vorlage durch $\frac{n}{10}$ -NaOH und Methylorange möglichst schnell zurücktitriert. Der Umschlag ist auf 0,01 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH scharf zu sehen, d. h. auf 0,02 mg NH_3 . — Eine zweite Säurevorlage ist, wie Folin bemerkt, unnötig.

In der ursprünglichen Folin'schen Methode habe ich, wie ersichtlich, die kleine Abänderung vorgenommen, daß ich während des ganzen Versuchs die Apparatur verschlossen halte, was durch die Einführung des Trichterrohrs und Anwendung von Carbonatlösung anstatt fester Substanz ermöglicht wird. Folin selbst und nach ihm Van Slyke und Marshall öffnen den Stöpsel des Reaktionskolbens für einen Augenblick und werfen ein paar Gramm festen Alkalicarbonats ein. Abgesehen davon, daß dabei die Reaktion vielleicht nicht sofort in allen Teilen der Lösung abgebrochen wird, so können dadurch Ammoniakverluste entstehen. Wenigstens findet Bahlmann nach dieser Methode bei Analysen an reinen Harnstofflösungen, die durch Sojaurease zer-

setzt werden, stets zu wenig Harnstoff (durchschnittlich 4% zu wenig) [1920⁶] (S. 477) Tabelle I].

14. Um mir eine Auffassung über die nötige Zeit der Durchlüftung und über die Schärfe der Methode zu verschaffen, habe ich folgende Versuche gemacht:

Versuch 5: Prüfung der Folinschen Methode bei Zimmertemperatur.

Tabelle V.

Probe	Saugen Stunden	NH ₃ freigesetzt durch 40 ccm Lösung, enthaltend	Total- volu- men ccm	mg NH ₃	
				ge- fund	aus- geliefert
20 ccm NH ₄ Cl	1	4 g K ₂ CO ₃	60	8,1	22,06
20 ccm NH ₄ Cl	2	4 g K ₂ CO ₃	60	14,9	22,06
20 ccm NH ₄ Cl	3	4 g K ₂ CO ₃	60	18,9	22,06
20 ccm NH ₄ Cl	4	4 g K ₂ CO ₃	60	21,5	22,06
20 ccm NH ₄ Cl	4	20 g K ₂ CO ₃	60	21,6	22,06
20 ccm NH ₄ Cl	17	20 g K ₂ CO ₃	60	22,09	22,06
20 ccm NH ₄ Cl	17	20 g K ₂ CO ₃	60	22,07	22,06
20 ccm NH ₄ Cl + 20 ccm $\frac{1}{1}$ -Urea	17	32 g K ₂ CO ₃	80	22,11	22,06
— 20 ccm $\frac{1}{1}$ -Urea	17	20 g K ₂ CO ₃	60	0,04	—
20 ccm NH ₄ Cl	2	5 g NaOH	60	10,6	22,06
20 ccm NH ₄ Cl	4	5 g NaOH	60	18,6	22,06
— 20 ccm $\frac{1}{1}$ -Urea	4	6,7 g NaOH	80	0,26	—

Versuch 6: Prüfung der Folinschen Methode bei 60° C.

Tabelle VI.

Probe	Saugen Stunden	NH ₃ freigesetzt durch 40 ccm Lösung, enthaltend	Total- volumen ccm	mg NH ₃	
				gefunden	aus- geliefert
20 ccm NH ₄ Cl	1	4 g K ₂ CO ₃	60	21,5	22,06
20 ccm NH ₄ Cl	2	4 g K ₂ CO ₃	60	22,04	22,06
20 ccm NH ₄ Cl	4	4 g K ₂ CO ₃	60	22,04	22,06

Die Methode ist also völlig quantitativ, wenn Alkalicarbonat angewendet wird. Durch eine Anzahl Versuche habe ich mich überzeugt, daß NaOH zur Freimachung des Ammoniaks weniger geeignet ist als Alkalicarbonat und daß eine zweite Säurevorlage durchaus unnötig ist. Die Funktion des Alkalicarbonats scheint eine doppelte zu sein. Es macht nicht nur durch seine Alkalität das Ammoniak frei, sondern vermindert durch seine Gegenwart in größerer Menge auch die Löslichkeit des Ammoniaks (Aussalzen). Es scheint demnach berechtigt, einen Teil des Alkalicarbonats

durch NaCl zu ersetzen. Das Übertreiben des Ammoniaks geht freilich bei höherer Temperatur schneller vor sich, aber die Anwendung von Temperaturen über 40° C ist wegen der leichten Zersetzlichkeit des Harnstoffs bei höherer Temperatur nicht zu empfehlen. Auch bei Zimmertemperatur zersetzt sich der Harnstoff, wenn er in größerer Konzentration vorliegt, selbst durch Alkalicarbonat zu einem meßbaren Betrage, wofür natürlich eine Korrektion anzubringen ist.

Die Differenzen zwischen Parallelproben sind auf Fehler bei dem Abmessen der Probe (durch Pipette) und auf den unvermeidlichen Titrationsfehler zurückzuführen. Sie brauchen bei reinen Ammoniumsalslösungen nicht 0,05 mg NH₃ auf 25 mg, d. h. 0,2% überschreiten. Bei ordentlichen Versuchen, wobei kleine Differenzen in dem Abmessen der Enzymquantität und der Reaktionszeit eine große Rolle spielen, kann man keine so gute Übereinstimmung zwischen Parallelproben erwarten.

Versuch 7: Parallelproben.

Tabelle VII.

Enzym ccm	N/10-Harnstoff ccm	Reaktionszeit Minuten	0,1266 n NaOH ccm	Rest NaOH ccm	NH ₃ mg	NH ₃ Maximum mg
1	5	30	12,17	2,30	4,91	170
1	5	30	12,20	2,27	4,85	170
1	5	30	12,18	2,29	4,89	170
1	5	30	12,18	2,29	4,89	170
1	—	0	14,47	—	—	—
—	5	0	14,48	—	—	170
1	5	0	14,46	—	—	170
—	—	—	14,47	—	—	—
—	—	—	14,48	—	—	—

Totalvolumen: 6 ccm. — Temperatur: 17° C. — NH₃ durch 40 ccm gesättigte Pottaschelösung freigemacht. — Hier stimmen die Parallelproben innerhalb 1,2%.

Weil also der Titrationsfehler nur einen Bruchteil des gesamten Fehlers ausmacht, so habe ich keinen Anlaß gefunden, bei meinen Versuchen zur Anwendung schwächerer Säure- und Alkalilösungen oder zu jodometrischer Titration überzugehen. Bei der Bestimmung des Harnstoffgehaltes in Harn- oder Blutproben durch die Urease ist indessen dies vielleicht zu empfehlen [Fiske 1915⁴⁶) — Bahlmann 1920⁶)].

Bezüglich der jodometrischen Titrierung siehe Albert, diese Zeitschr. 92, 397. 1918.

Obgleich Folin schon im Jahre 1903 seine Methode veröffentlichte, blieb sie von den Ureaseforschern lange unbeachtet. Erst im Jahre 1913 wurde sie von verschiedenen Seiten aufgenommen (Viehoever, Marshall, Van Slyke).

4. Selektivität des Enzyms.

15. Die Aktivität der Urease scheint ausschließlich gegen den Harnstoff gerichtet zu sein. Alle Versuche mit anderen aminohaltigen Substanzen sind — mit einer Ausnahme — negativ ausgefallen. Die wichtigsten der untersuchten Stoffe sind:

1. Alanin, Allantoin, Arginin, Benzamid, Glykokoll, Guanin, Hippursäure, Histidin, Kreatinin, Leucin, Tyrosin, Harnsäure und Biuret [mit Sojaurease — Takeuchi, 1909¹⁷⁸].

2. Harnstoffderivate: Mono- und Bimethyl- und -äthylharnstoff nebst Modifikationen [mit Sojaurease — Armstrong und Horton, 1912⁸].

3. Casein, Pepton und Aminosäuren [mit Sojaurease — Van Slyke, 1913¹⁸⁴].

4. Methyl- und Thioharnstoff, Acetamid [mit Bakterienurease — Jacoby, 1916⁸²].

Alle diese Untersuchungen sind indessen nur qualitativer Natur gewesen. Neuerdings hat tatsächlich Pin Yin Yi [1920¹⁵²] (S. 189)] gefunden, daß Robiniasamenpulver aus den asymmetrischen Alkylderivaten des Harnstoffs (aus den symmetrischen aber nicht) einen Stoff abspaltet, der mit PtCl_4 einen Niederschlag bildet und nach dem Gehalt des Niederschlages an Platin zu urteilen das betreffende Alkylamin darstellt. Ob es sich hier um ein neues Enzym handelt, ist fraglich.

16. Der Prozeß: Harnstoff \rightarrow Ammoniumcarbonat ist nach unseren heutigen Kenntnissen nicht umkehrbar. Weder durch Erhitzung einer reinen Ammoniumcarbonatlösung 2 Tage bei 99° [Fawsitt, 1902⁴⁶] (S. 605)] noch durch Einwirkung von Bakterienurease [Alkoholniederschlag — Jacoby, 1916⁸²] (S. 96)] oder Sojaurease [Kiesel, 1911⁸⁹] (S. 177)] hat man eine Verminderung der Ammoniumcarbonatmenge konstatieren können. Eine solche Verminderung, der angewandten Sojamenge proportional, behauptet freilich Barendrecht [1920⁹] S. 73—76)] gefunden zu haben, aber sie ging bei seinen Versuchen im besten Falle zu 10 pro 2486, d. h. 0,004% auf. Nachdem

Mattaar (Recueil travaux de chim. des Pays-Bas 39 (4. Serie 1), S. 495—98. 1920) die diesbezüglichen Versuche Barendrechts wiederholt hat, ohne durch Xanthidrol die geringste Spur einer Harnstoffbildung finden zu können, hat auch Barendrecht seine ursprüngliche Auffassung, daß er mit (geschwächter) Sojaurease eine Synthese des Harnstoffs aus Ammoniumcarbonat durchgeführt habe, dahin modifiziert, daß er wenigstens das erste Stadium einer solchen Synthese durch das Verschwinden von Ammoniumcarbonat aufgewiesen habe (l. c. S. 603—5).

5. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit.

17. Im Jahre 1909 veröffentlichte Sørensen seine epochemachende Abhandlung: Sur la mesure et l'importance de la concentration des ions hydrique dans les reactions enzymatiques (C. r. des Travaux du Laboratoire de Carlsberg 8, 1. Livraison 1909; siehe auch diese Zeitschr. 21, 131 und 22, 352. 1909). Er schuf darin die colorimetrische und die elektrometrische Methode zur Messung der Wasserstoffionenkonzentration und tat bei dem Invertin, dem Pepsin und der Katalase dar, daß die Wirkung dieser Fermente bei einer gewissen Wasserstoffzahl der Lösung ein Optimum hat.

Obgleich die Gedanken des dänischen Forschers das größte Aufsehen erweckten und u. a. von Michaelis und seinen Schülern während der folgenden Jahre in einer Reihe glänzender Arbeiten erweitert und auch theoretisch ausgebildet wurden, so dauerte es ziemlich lange, bis sie von den mit der Urease arbeitenden Forschern berücksichtigt wurden.

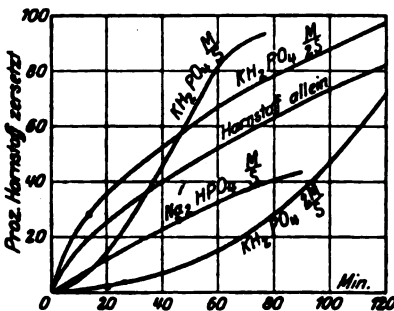


Abb. 2.

Erst im Jahre 1913 scheinen sie Armstrong, dem wir eine Reihe „Enzymstudien“ u. a. über die Urease verdanken, bekannt zu sein. Gegen Sørensens Meßmethoden und von ihm vorgeschlagene Angabe der Wasserstoffionenkonzentration durch den negativen Logarithmus (p_H) verhält er sich abweisend [1913⁴] (S. 576).

Er macht einige Versuche über die Ureasewirkung in Gegenwart von primärem und sekundärem

Kaliumphosphat in verschiedenen Konzentrationen, wie es scheint, ohne deren Einwirkung auf die Reaktionsgeschwindigkeit zu verstehen (l. c. S. 579). (Abb. 2.)

18. Einen Schritt weiter vorwärts kam Marshall [1914¹²²]. Er untersuchte die Aktivität der Urease in Lösungen, die mit HCl oder NaOH in wechselnden Mengen versetzt waren. Optimalwirkung fand er bei dem Neutralpunkt.

In demselben Jahre (1913) wurden Sörensens Methoden von van Slyke aufgenommen und in zielbewußter Weise auf die Urease angewendet — und ich will hinzufügen: mit dem allergrößten Erfolg. Durch die vortrefflichen Arbeiten von Van Slyke und seinen Schülern ist die Chemie der Urease auf eine höhere Ebene gebracht worden.

Wie überaus groß die Empfindlichkeit der Urease gegen die Wasserstoffkonzentration der Lösung ist, zeigt folgender Versuch von Van Slyke und Zacharias [1914¹²⁷].

Table VI, S. 191. (Abb. 3.)

p_H	5,3	5,7	6,1	6,97	7,38	7,50	8,04	8,80	9,24	9,36
mg NH_3 . .	1,86	2,43	4,07	6,50	6,36	6,14	5,18	3,46	2,39	2,13

Enzym: 1 ccm (0,02 g Acetonpräparat).
 — 2 proz. Urea: 10 ccm (200 mg). — $\frac{1}{5}$ -Phosphatmischung: 10 ccm.
 — Totalvolumen: 21 ccm.
 — Temperatur: 20° C.
 — Reaktionszeit: 30 Minuten. — NH_3 nach Folin bestimmt. — p_H colorimetrisch nach der Reaktion bestimmt.

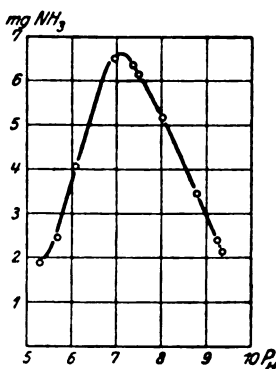


Abb. 3.

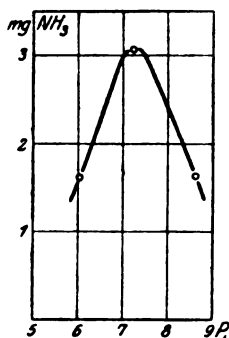


Abb. 4.

Durch einen eigenen Versuch über-

zeugte ich mich von der Richtigkeit dieser Tatsache.

Versuch 8: Reaktionsgeschwindigkeit und p_H .

Tabelle VIII. (Abb. 4.)

Enzym ccm	H_2O ccm	$\frac{1}{5}$ - Na_2HPO_4 ccm	$\frac{1}{5}$ - KH_2PO_4 ccm	$\frac{1}{5}$ -Harnstoff ccm	p_H nach			Reaktionszeit Minuten	NH_3 mg
					0 Min.	60 Min.	Mittel		
1	6	0,5	1,5	1	6,02	6,06	6,04	60	1,62
1	6	1,7	0,3	1	7,12	7,38	7,25	60	3,07
1	6	2	0	1	8,52	8,80	8,66	60	1,64
1	8	—	—	1	6,0	8,90	—	60	2,2

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 16°. — p_H elektrometrisch bestimmt. Enzym: Kaolinbehandelt, saurer als gewöhnlich. — $\frac{1}{5}$ - Na_2HPO_4 von $p_H = 9,16$. — $\frac{1}{5}$ - KH_2PO_4 von $p_H = 4,2$.

19. Diese Empfindlichkeit gegen die Wasserstoffionenkonzentration ist im Lichte der während der Reaktion rasch steigenden Alkalität zu sehen. Die letzte Tatsache ist schon längst bekannt, aber erst von Van Slyke und Zacharias quantitativ untersucht [1914¹⁸⁷], Table I u. II, (S. 184 u. 185)]. Ich habe in Versuch 9 das Ansteigen von p_H bei Reaktion ohne Puffer elektrometrisch verfolgt und in Versuch 10 die mit derselben Enzymlösung entwickelten NH_3 -Mengen gleichzeitig bestimmt.

Versuch 9.

Versuch 10.

Tabelle IX.

Zeit	p_H
Vor dem Zusatz von Enzym	8,5
unmittelbar nach	6,5
1 Min. nach	6,7
2 " "	6,88
4 " "	7,12
5 " "	7,24
6 " "	7,36
8 " "	7,66
10 " "	7,83
12 " "	7,98
14 " "	8,12
16 " "	8,28
18 " "	8,35
20 " "	8,44
25 " "	8,50
35 " "	8,64
40 " "	8,71
50 " "	8,75
60 " "	8,78

Tabelle X.

Zeit Min.	NH_3 mg
3	0,34
6	0,49
12	0,73
15	0,83
30	1,28
45	1,73
60	2,00

$\frac{M}{1}$ -Harnstoff: 1 ccm,
 max. NH_3 = 34 mg. —
 H_2O : 8 ccm. — Enzym:
 1 ccm (Soja: Wasser
 = 1 : 10). — Totalvolumen:
 10 ccm. — Temperatur:
 17° C.

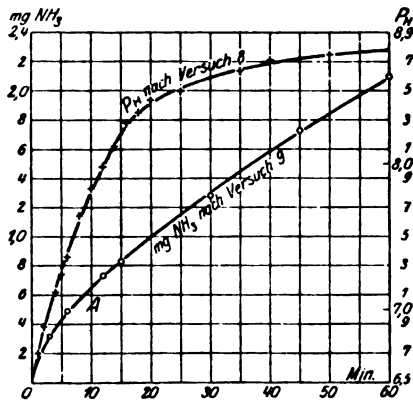


Abb. 5.

Die Werte sind in Abb. 5 graphisch dargestellt. Daraus berechnet sich die untenstehende Tabelle über den Zusammenhang zwischen der Steigerung von p_{H} und der gebildeten Ammoniakmenge.

Tabelle Xa. (Abb. 6.)

NH ₃ , mg	p_{H}	NH ₃ , mg	p_{H}	NH ₃ , mg	p_{H}	NH ₃ , mg	p_{H}
0	6,5	0,5	7,44	1,0	8,41	1,5	8,66
0,1	6,6	0,6	7,66	1,1	8,48	1,6	8,69
0,2	6,8	0,7	7,90	1,2	8,54	1,7	8,72
0,3	7,0	0,8	8,14	1,3	8,59	1,8	8,74
0,4	7,2	0,9	8,31	1,4	8,63	1,9	8,76

Schon nach der Zersetzung einer ganz minimalen Menge Harnstoff (etwa 0,6 mg) ist p_{H} über den Neutralpunkt verschoben.

Von da an wird die Reaktionsgeschwindigkeit rasch kleiner (siehe in Abb. 5 die Beugung der Kurve bei A). Nach der Spaltung von ca. 3 mg Harnstoff ist p_{H} schon gegen 9 und steigt dann nur ganz langsam (bis 9,34) — wegen des Puffercharakters des sich immer anhäufenden Ammoniumcarbonats. Es macht sich also dann der p_{H} -Effekt nur schwach merkbar. Die Reaktionsgeschwindigkeit zeigt jetzt ein Verhalten, das nur von dem konstanten p_{H} , der Substrat- und Enzymkonzentration und der Menge der Reaktionsprodukte abhängig ist.

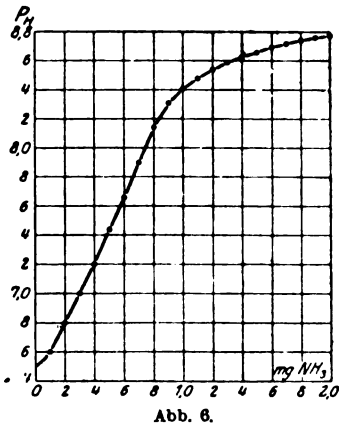


Abb. 6.

20. Arbeitet man ohne Puffer, so verdeckt also im Anfang der p_{H} -Effekt völlig den Einfluß des Substrats. Will man ein wahres Bild über den Zusammenhang zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Substrat während einer gewissen Zeit erhalten, so ist es unbedingt notwendig, den p_{H} -Effekt auszuschalten. Dies kann auf dreierlei Weise geschehen.

1. Man läßt bei willkürlicher Harnstoffkonzentration die Reaktion selbständig bis zum Ende ablaufen aber berücksichtigt nicht den allerersten Teil der Reaktion, wo p_{H} noch nicht konstant ist, und auch nicht den allerletzten, wo kleine Versuchsfehler einen übermäßigen Einfluß ausüben.

So einfach und natürlich wie diese Methode jetzt vorkommt, so ist sie doch nie angewendet, obgleich Versuche, auf die sie bezogen werden könnten, massenhaft vorliegen. In einem folgenden Paragraphen werde ich zeigen, wie hübsch sich derartige Versuche in dieser Weise berechnen lassen.

Auch den ersten Teil der Reaktion könnte man dadurch verwertbar machen, daß man durch Zusatz einer geringen Menge Ammoniumcarbonat, Alkalicarbonat oder K_2HPO_4 usw. schon von vornherein p_H auf 9,34 einstellt.

2. Man sorgt durch einen Puffer dafür, daß sich p_H während der Reaktion konstant hält.

Dies ist aber schwer — in einem Grade, den die meisten nicht ahnen. Bei der Phosphatkonzentration $M/10$ (ca. 3%) steigt p_H für nur 2,5 mg zersetzten Harnstoff ca. 0,2 Einheiten.

Versuch 11: Steigerung von p_H bei $M/10$ -Phosphat.

Tabelle XI.

Zeit	p_H	NH ₃ mg	Harnstoff zersetzt mg
Vor dem Zusatz von Enzym	7,13	—	—
unmittelbar nach	7,05	—	—
nach 15 Min.	7,10	0,47	0,83
„ 30 „	7,15	0,78	1,38
„ 45 „	7,19	1,02	1,80
„ 60 „	7,24	1,28	2,26

$M/2$ -Phosphatmischung: 2 ccm. — $M/1$ -Harnstoff: 1 ccm (max. NH₃ = 34 mg). — Wasser: 6 ccm. — Enzym: 1 ccm. — Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17° C.

Bei der stärksten angewandten Phosphatkonzentration $M/2$ (ca. 15–16%) steigt p_H für 2,5 mg gespaltenen Harnstoff freilich nur einige Hundertstel, aber für 70 mg steigt sie mehr als eine ganze Einheit (siehe Versuche 30, 32 u. 34).

Es ist also unmöglich, durch einen Puffer den Einfluß der steigenden Hydroxylienkonzentration völlig auszuschalten, außer wenn man größere Spaltungen als 10 mg Harnstoff pro 10 ccm ($M/6$ pro Liter) vermeidet und doch die kräftige Phosphatkonzentration $M/2$ anwendet. p_H steigt dabei nur um ein Zehntel. Diesen Weg hat Van Slyke eingeschlagen. Seine Nachfolger dagegen benutzen, wenn sie überhaupt Puffer anwenden, allzu schwache Pufferkonzentrationen [Rona und György 1920¹⁶²], z. B. $M/7$ - bis $M/10$ -Phosphat) und lassen die Harnstoffspaltung zu weit gehen.

Ich habe dies mit solcher Schärfe ausgesprochen, weil die in den letzten Jahren veröffentlichten Arbeiten (Bahrendrechts ausgenommen) erheblich an Wert dadurch verloren haben, daß sie ausgeführt sind ohne volle Würdigung der Empfindlichkeit der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die allerkleinsten Veränderungen in der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung und ohne Berücksichtigung der auch bei den stärksten Phosphatkonzentrationen ungenügenden Pufferwirkungen der Phosphatgemische

Zu der Anwendung von Phosphatgemischen als Puffer ist zu bemerken, daß die eingeführten Ionen (am meisten die Anionen) an sich einen hemmenden Einfluß ausüben, wie aus folgenden Zahlen von Van Slyke und Zacharias [1914¹⁸⁷] (S. 193) hervorgeht:

Bei $\frac{M}{11}$ -Phosphat	ist die Reaktionsgeschwindigkeit	0,70
„ $\frac{M}{16}$	„ „ „	0,68
„ $\frac{M}{11}$	„ „ „	0,61
„ $\frac{M}{2}$	„ „ „	0,48

Die Zahlen liegen ein wenig unregelmäßig. Mehr schlagende Ergebnisse werden später mitgeteilt werden.

3. Während meiner Versuche hat sich herausgestellt, daß die Empfindlichkeit der Reaktionsgeschwindigkeit gegen Veränderungen in p_H bei der Harnstoffkonzentration 0,2 Mol (d. h. 120 mg Harnstoff pro 10 ccm) ein Minimum hat.

Beim Arbeiten mit 0,2 Mol Harnstofflösungen und $\frac{M}{2}$ -Phosphat als Puffer kann man wahrscheinlich die Reaktion bis 60% des vorhandenen Harnstoffs (d. h. 70 mg) gespalten sind, verfolgen, ohne daß die Wanderung von p_H (um etwa 1 Einheit) den Verlauf wesentlich beeinflusst.

Auch ein Strom von Kohlendioxyd ist bisweilen als Puffer zur Verwendung gekommen [Armstrong mit Schülern, 1912²) und 1913³]. — Yamasaki, Science Reports of the Tôhoku imperial University, 1. Serie 9. 1920). p_H scheint sich dabei ziemlich konstant bei dem Neutralpunkt zu halten.

Barendrecht hat kürzlich Ammoniumbicarbonat + strömendes CO_2 als Puffer verwendet [1920⁹] (S. 35 u. ff.).

Die Überlegenheit der Phosphatgemische als Puffer liegt in dem Umstand, daß man durch sie p_H auf die optimale Lage einstellen kann.

6. Einfluß der Enzymkonzentration.

21. Der erste quantitative Versuch in dieser Hinsicht stammt von Viehoveer [1913¹⁹⁴] (S. 210): Er impfte jedesmal 10 Mill. Sporen von verschiedenen Urobakterienstämmen in 20 ccm sterile Bouillon, mit 1% Pepton und 2% Harnstoff versetzt; nach 20–50 Stunden Stehen bei 28° wurde die Vermehrungsgröße und die Spaltungsgröße (nach Folin) bestimmt. Er fand zwischen diesen Größen eine gute Proportionalität. Dies deutet darauf, daß das Spaltungsvermögen der Enzymmenge proportional sei. Das es tatsächlich auch so ist, wurde im Jahre 1913 unabhängig voneinander durch Marshall¹²²) und Van Slyke¹⁸⁶) gezeigt. Beide wußten geschickt den damals unberechenbaren Einfluß der Reaktionsprodukte, der p_H -Steigerung und der unbekannteren Reaktionsweise (mono-, bimolekular usw.?) zu eliminieren. Anstatt die ganze Reaktion bei verschiedenen Enzymkonzentrationen zu verfolgen — wie es Armstrong gemacht hatte²) (S. 116 u. ³) S. 335) — ließen sie (beide) verschiedene Enzymmengen auf dieselbe Menge Harnstoff einwirken während Zeiten, die den betreffenden Enzymkonzentrationen umgekehrt proportional waren.

Marshall bestimmte NH_3 durch direkte Titration. Er fand (S. 353):

Table I.

Enzymkonzentration ccm	Time Min.	10 ccm 1 per cent Urea (Max. NH_3 = 56,7 mg)	10 ccm 0,5 per cent Urea (Max. NH_3 = 28,8 mg)
		NH_3 mg	NH_3 mg
5	16	30,2	26,3
4	22	30,1	26,4
3	26,6	29,8	26,7
2	40	29,4	26,6
1	80	29,0	26,3

Totalvolumen: 15 ccm. — Temperatur: 35° C. — Enzym: Nach seiner Methode bereitet.

Van Slyke und Cullen bestimmten NH_3 nach Folin. Sie fanden (S. 165):

Table XI.

0,5 per cent Urease ccm	Time hours	NH_3 mg
16	1/3	6,32
8	1/3	6,29
4	1/3	6,09
2	1	6,22
1	2	6,09

Harnstoff: 8 ccm 5proz. (400 mg). — Temperatur: 20° C. — Totalvolumen: Dasselbe in allen Versuchen.

In allen Reihen ist $\frac{NH_3}{E \cdot t}$ innerhalb der Versuchsfehler konstant. Die Reaktionsgeschwindigkeit $\frac{NH_3}{t}$ ist also der Enzymmenge proportional. Siehe auch meine Versuche 32 und 34.

Der Einfluß der Enzymkonzentration ist später auch von Labberté [1915¹⁰⁶] und Wester^{201, 202, 203}) untersucht worden.

7. Einfluß der Harnstoffkonzentration.

22. Aus Marshalls Versuch geht auch hervor, daß die Reaktionsgeschwindigkeit in einigem Maße von der Harnstoffkonzentration abhängig ist. Diese Tatsache hat man lange außer acht gelassen. Erst Armstrong und Horton untersuchten sie näher [1912²] (S. 116)].

Table III.

Zeit	M/10-Urea solution		M Urea solution		5 M Urea solution	
	NH ₃ mg	$k = \frac{10^4}{t} \log \frac{a}{a-x}$	NH ₃ mg	$k = \frac{10^4}{t} \log \frac{a}{a-x}$	NH ₃ mg	$k = \frac{10^4}{t} \log \frac{a}{a-x}$
5	8,5	0	7,1	0	4,4	
10	13,3	75	—	—	6,8	
15	17,6	73	16,0	12	8,8	0
30	28,7	72	26,4	11	12,9	0,71
45	38,1	75	35,4	10	—	—
60	46,1	79	43,8	9	20,2	0,66
75	53,1	86	—	—	—	—
50	59,9	—	—	—	26,6	0,62
120	66,5	—	—	—	32,5	0,59
180	—	—	105,1	9	43,2	0,55
300	—	—	145,1	8	61,9	0,50
420	—	—	184,3	8	78,5	0,46
Max.NH ₃	67,2		335,8		1668,8	

Harnstoff: 5 ccm. — Enzym: 5 ccm. — Totalvolumen: 10 ccm. — NH₃ durch indirekte Titration bestimmt. — Temperatur: 25° C. — k von mir berechnet.

Sie fanden also die Geschwindigkeit am größten bei M/10-Harnstoff, ein wenig kleiner bei M/1 und nur halb so groß bei 5 M Harnstoff.

23. Ungefähr dasselbe Bild zeigen die Versuche von Armstrong, Benjamin und Horton [1913²] (S. 335)], wobei die Proben während der ganzen Reaktion mit CO₂ gesättigt gehalten wurden:

Table C.

Zeit Minuten	8 M/5-Urea		6 M/5-Urea		7 M/1-Urea		9 2 M Urea		5 M Urea	
	NH ₃ mg	k	NH ₃ mg	k	NH ₃ mg	k	NH ₃ mg	k	NH ₃ mg	k
5	10,9	151	8,3	44	8,8	23	9,9	—	9,0	0
10	19,0	143	13,8	37	15,5	20	16,5	0	13,6	2,4
15	25,8	138	20,2	37	21,6	19	20,9	5,4	—	—
20	34,7	155	25,5	35	28,4	18	25,2	5,5	25,8	2,9
30	46,8	183	36,9	35	37,9	17	36,6	6,6	37,7	3,0
40	59,3	—	47,9	38	50,2	17	46,9	6,7	—	—
60	68,0	—	69,2	38	73,1	18	67,2	6,8	65,5	2,7
50	—	—	92,0	38	97,6	16	101,7	7,4	90,3	2,5
120	—	—	112,9	38	120,0	17	130,4	7,3	—	—
150	—	—	135,7	46	—	—	—	—	—	—
180	—	—	157,8	—	168,6	16	178	7,1	170,5	2,5
240	—	—	169,0	—	212,3	18	224,4	7,1	—	—
300	—	—	—	—	248,1	19	266,4	7,1	—	—
360	—	—	—	—	279,5	21	308,2	7,2	—	—
420	—	—	—	—	307,9	24	—	—	—	—
450	—	—	—	—	318,6	27	—	—	—	—
480	—	—	—	—	328,6	—	371,8	7,1	—	—
600	—	—	—	—	—	—	423,6	7,0	—	—
1440	—	—	—	—	—	—	591,6	6,6	—	—
Max.	68	—	170	—	340	—	680	—	1700	—

$$k = \frac{10^4}{t} \log \frac{a}{a-x} \text{ von mir berechnet.}$$

24. Daß die Geschwindigkeit bei Reaktion ohne Puffer von der Harnstoffkonzentration ziemlich unabhängig ist, haben Van Slyke und Cullen mehr schlagend gezeigt [1914¹⁸⁰] (S. 144):

Table II.

Zeit Minuten	Serie 1		Serie 2	
	1 ccm Enzym + 5 ccm 1proz. Urea		1 ccm Enzym + 5 ccm 5proz. Urea	
	NH ₃ mg	k	NH ₃ mg	k
20	8,81	81	8,84	—
40	14,04	75	13,60	0
60	18,05	75	18,08	7,8
80	21,86	81	22,34	7,1
100	25,60	—	25,84	7,3
120	27,06	—	29,60	7,3
140	27,74	—	32,64	7,0
160	28,25	—	35,97	7,0
Max.	28,33	—	141,67	—

k von mir berechnet.

25. Ich habe diesen Versuch wiederholt und völlig bestätigt gefunden.

Versuch 12: Einfluß der Harnstoffkonzentration.

Tabelle XII.

Zeit Minuten	Serie 1		Serie 2	
	5 ccm Enzym + 5 ccm M _{1/2} -Urea		5 ccm Enzym + 5 ccm M _{1/1} -Urea	
	NH ₃ mg	k	NH ₃ mg	k
30	12,62	67	(12,62)	0
60	20,05	64	20,73	7,6
90	26,30	71	27,24	7,0
120	31,23	—	33,64	7,0
130	32,53	—	—	—
140	32,94	—	—	—
150	33,18	—	—	—
180	33,32	—	—	—
240	—	—	63,43	7,9
Max.	34,06	—	170,30	—

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 16° C.

26. Auch Wester hat in dieser Hinsicht einige Versuche gemacht [1920²⁰⁰] (S. 167)].

Zeit Minuten	16.		17.		18.		19.		20.	
	NH ₃ mg	k	NH ₃ mg	k	NH ₃ mg	k	NH ₃ mg	k	NH ₃ mg	k
60	8,3	25,2	8,7	26,5	8,7	0	7,6	0	8,3	0
120	14,3	25,4	13,1	22,4	13,1	7,0	14,1	6,3	14,4	4,3
180	—	—	17,2	22,4	17,2	7,1	—	—	—	—
240	21,4	25,5	20,9	24,2	21,4	7,4	22,3	5,6	22,8	3,6
1320	—	—	—	—	—	—	—	—	85,0	4,5
Max.	28,3	—	28,3	—	56,6	—	85	—	113,3	—

Methode: 5 ccm Enzym (10 proz. Glycerinextrakt) + resp. 50, 50, 00, 150 und 200 ccm 2 proz. Harnstofflösung, mit Wasser bis 250 ccm aufgefüllt. Jedemal 25 ccm ausgenommen und titriert. — Reaktionstemperatur: 30° C. — k von mir berechnet.

27. Alle diese Versuche geben den Eindruck, daß die Harnstoffkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit gar nicht beeinflusse, außer wenn sie größer als 2 Mol oder kleiner als 0,015 Mol sei. Dies gilt indessen nur bei Versuchen ohne Puffer. Denn hält man in allen Reihen p_H bei demselben Punkt, so wird die Reaktionsgeschwindigkeit in hohem Grade von der Harnstoffkonzentration abhängig, wie aus folgendem Versuch von Van Slyke und Cullen hervorgeht [1914¹⁸⁶], S. 146]:

Table III.

Harnstoff- konzentration %	$\frac{1}{100} \cdot \text{NH}_3$		$0,4843 c =$ $\frac{d}{dEt-x} \cdot \log \frac{a}{a-x}$	d	0,4843 c neu be- rechnet	Harnstoff- konzentration Mol pro Liter	NH ₃		$k =$ $\frac{10^4}{t} \log \frac{a}{a-x}$	$a \cdot t$
	Maxim. ccm	gefund. ccm					Maxim. mg	gefund mg		
0,0375	12,5	5,8	0,055		0,056	0,00625	2,13	0,99	45	1,4
0,075	25	10,4	58		59	0,0125	4,26	1,77	39	2,5
0,15	50	15,5	53		54	0,025	8,52	2,64	27	3,4
0,3	100	21,2	52		55	0,05	17,03	3,60	17,3	4,3
0,6	200	24,8	51		48	0,1	34,06	4,22	9,6	4,8
1,2	400	27,0	52		39	0,2	68,12	4,59	5,1	5,1
2,4	800	28,5	52		33	0,4	136,24	4,85	2,6	5,2
4,8	1600	31,0		5,17		0,8	272,48	5,27	1,8	7,2
9,6	3200	31,0		5,17		1,6	544,96	5,27	0,7	5,6

Reaktionsmasse: Enzym: 1 ccm (1proz. Lösung von acetongefällter Urease). — Phosphat: 5 ccm einer Mischung von 2 vol. $\frac{1}{100}$ -K₂HPO₄ + 1 vol. $\frac{1}{100}$ -KH₂PO₄. — Konzentration = $\frac{1}{100}$. — Harnstoff: 4 ccm von Lösungen wechselnder Konzentration. — Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 20° C. — Reaktionszeit: 60 Minuten. — p_H : Leider nicht angegeben, wahrscheinlich 6,80–6,90.

Mit diesem wichtigen Versuch sind wir auch an die Zeitgleichung der Ureasewirkung herangetreten. Dies Problem wird zunächst behandelt.

28. Aus manchen Gesichtspunkten ist es wünschenswert, daß die Harnstoffkonzentration genau angegeben wird. Leider wird sie meistens durch den vieldeutigen Begriff „Prozent“ ausgedrückt. Einige meinen damit: Anzahl g auf 100 ccm Lösungsmittel [z. B. van Slyke und Cullen¹⁸⁸⁾ (S. 212)] — andere: Anzahl g pro 100 ccm Lösung [z. B. Barendrecht⁹⁾ (S. 56)] — während das Richtige ist: Anzahl Gramm pro 100 g Lösung. Diese Vieldeutigkeit verursacht eine gewisse Unsicherheit. Am besten und völlig einwandfrei ist, die Harnstoffkonzentration in Molekularnormalität M (d. h. Anzahl Mol pro Liter Lösung bei angegebener Temperatur) auszudrücken.

8. Verlauf der Reaktion.

29. Trotzdem Harnstoff seit Prout (1818) und Urease-lösungen seit Musculus (1876) darstellbar gewesen sind, ist doch die Zeitgleichung der enzymatischen Spaltung des Harnstoffs noch nicht aufgeklärt. Die Ursache liegt hauptsächlich in der überaus großen Empfindlichkeit der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Wasserstoffkonzentration der Lösung und in der Steigerung von p_H während der Reaktion sowohl ohne als auch mit

Gegenwart eines Puffers, wodurch der Einfluß der Substratkonzentration und der Reaktionsprodukte mehr oder weniger verdeckt wird. Kein Wunder also, daß die Versuche ohne Puffer sämtliche negativ ausgefallen sind.

Bei Moll [1902¹²³] (S. 347)] habe ich den ersten Ansatz, die Reaktion zu verfolgen, gefunden:

Zeit in Tagen	1	2	3	4
Harnstoff zersetzt in %	51,4	62,2	74,4	86,2

30. Dasselbe Bild eines ziemlich „linearen“ Verlaufs zeigen alle Versuche, die Armstrong und seine Mitarbeiter über die Reaktion mit oder ohne Zusatz fremder Stoffe (vor allem CO_2) gemacht haben: „The values of the ratio $\frac{dx/dt}{a-x}$ in no way correspond tho those to be expected in the case of a change proceeding at unimolecular rate“²⁴) (S. 337).

31. So stand die Sache als Van Slyke und Cullen seinen obig (§ 27) erwähnten Versuch machten. Sie knüpften daran folgende Erläuterungen:

Der Verlauf besteht aus 2 Reaktionen:

1. Enzym und Harnstoff verbinden sich: $E + U = EU$.

2. Die Verbindung zerfällt: $EU = E + \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_3$.

Von dieser Annahme ausgehend kommen Van Slyke und Cullen [1914¹²⁴] (S. 146 u. ff.) zu der Differentialgleichung:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{c \cdot d \cdot (a-x)}{d + c \cdot (a-x)}$$

Die Integration gibt:

$$t = \frac{1}{E} \left(\frac{1}{c} \log \frac{a}{a-x} + \frac{x}{d} \right)$$

Hier bedeutet: a die Anfangskonzentration des Harnstoffs,
 x die zur Zeit t umgesetzte Menge Harnstoff,
 c die Geschwindigkeitskonstante der 1. Reaktion,
 d die Geschwindigkeitskonstante der 2. Reaktion.

Bei hoher Harnstoffkonzentration kann der Ausdruck $\frac{1}{c} \log \frac{a}{a-x}$ vernachlässigt werden. Für diesen Fall hat man:

$$t = \frac{x}{Ed}; \quad d = \frac{x}{E \cdot t}$$

So ist d in Table III (S. 26) bestimmt.

Zur Berechnung von c schreibt man:

$$c = \frac{d}{dEt - x} \log \frac{a}{a-x} \quad \text{oder} \quad 0.4343 c = \frac{d}{dEt - x} {}^{10}\log \frac{a}{a-x}$$

Bei der Anwendung dieser Formel auf die Ergebnisse in Table III setzen Van Slyke und Cullen willkürlich ihre Enzymkonzentration zu $E = 0,1$ und erhalten aus den 2 letzten Reihen:

$$d = \frac{31,0}{0,1 \cdot 60} = 5,17.$$

c aus den anderen Reihen bestimmt erweist sich nach ihren Berechnungen als eine genuine Konstante, während die Werte an der monomolekularen Konstante $k = \frac{10^4}{t} \log \frac{a}{a-x}$ zeigen, daß diese Gleichung nicht zutrifft.

32. In seinen folgenden Versuchen zeigten Van Slyke und Cullen, daß ihre Formel:

$$t = \frac{1}{E} \left(\frac{1}{c} \log \frac{a}{a-x} + \frac{x}{d} \right)$$

gilt, nicht nur für die Anfangsgeschwindigkeiten bei konstanter Enzymmenge wie in Table III, sondern für den ganzen Reaktionsverlauf vom Anfang bis zu der vollständigen Spaltung des Substrats und auch bei wechselnder Enzymkonzentration:

Table VII. ¹⁸⁶ (S. 153)

E	$a = 6,81 \text{ mg NH}_3$ $0,4343 \cdot c$			$a = 340,6 \text{ mg NH}_3$ d
	Maximum	Minimum	Mittel	Mittel
0,03	0,056	0,050	0,052	4,13
0,10	0,058	0,051	0,053	5,17
0,10	0,058	0,050	0,054	5,17
0,30	0,060	0,054	0,057	5,12

Die Werte von c in dieser Tabelle zeigen ja eine schöne Übereinstimmung. Ich will hier nur bemerken, daß die Ergebnisse nur eine einzige und zwar ziemlich kleine Anfangskonzentration ($a = 6,81 \text{ mg NH}_3$) betreffen. Versuche mit anderen Harnstoffkonzentrationen werden im experimentellen Teil dieser Arbeit mitgeteilt. (Kap. IV–VI.)

33. Van Slyke und Cullen haben weiter Arbeiten anderer Forscher über Lactase und Invertase, Diastase und Peptase in ihrer Weise durchrechnet und die Aufmerksamkeit darauf gerichtet, daß die Ergebnisse sich ihrer Formel gut anschließen.

Die theoretischen Betrachtungen Van Slyskes haben von vielen Seiten Widerstand erfahren [z. B. Falk 1917⁴⁴] und Hedin, Grundzüge der physiologischen Chemie, 1915]. Es mag indessen hervorgehoben werden, daß Henri (Lois générales de l'action des diastases, Paris 1903), Barendrecht⁷, ⁸, ⁹) und Michaelis (diese Zeitschr. 49, 333. 1913) alle auf verschiedenen Wegen zu ähnlichen Formeln für Enzymwirkungen gekommen sind.

9. Temperaturkoeffizient und Temperaturoptimum.

34. Van Slyke und Cullen haben auch den Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit untersucht [1914¹⁸⁶] (S. 174)].

Tabelle XIX.

Enzymlösung	Temperatur	NH ₃ mg	Aktivität A	Temperatur koeffizient pro 10°
Frisch (1 Teil Sojabohnenmehl + 5 Teile Wasser)	0	1,54	0,16	> 2,80
	10	3,64	0,45	> 2
	20	6,09	0,90	—
	20	1,44	0,16	> 1,81
Derselbe Extrakt, fünfmal ver- dünnt	30	2,52	0,29	> 1,90
	40	4,15	0,55	> 1,95
	50	6,80	1,07	> 1,09
	60	7,24	1,16	—

Reaktionsmasse: Enzym: 1 ccm. — 5 proz. Harnstoff: 5 ccm (250 mg, M = 0,7). — Max. NH₃ = 141,67 mg. — Totalvolumen: 6 ccm. — Reaktionszeit: 15 Minuten.

A ist nach einer von ihnen aufgestellten Formel:

$$A = \frac{1}{t} \left(x - 462 \log \frac{231 + x}{231} \right),$$

die den Zusammenhang zwischen Enzymaktivität A, Zeit t und der nach der Zeit t entwickelten Ammoniakmenge (in ccm ¹/₁-NH₃ pro Liter) bei Abwesenheit eines etwaigen Puffers ausdrücken soll.

Die letzte Kolumne zeigt das Verhältnis $\frac{A_{t_2}}{A_{t_1}}$. Die Werte genügen zwischen 0° und 50° der Formel:

$$\log A_{t_2} = \log A_{t_1} + 0,029 (t_2 - t_1)$$

Als Mittelwert an der Temperaturkoeffizient für 0–50° geben sie 1,91 an und als Temperaturoptimum 55°.

Ich führe zuletzt einen Versuch von Wester an [1916²⁰²] (S. 429)].

Zeit Minuten	Harnstoff gespalten bei							
	18°		80°		50°		100°	
	%	k	%	k	%	k	%	
30	24,8	0	35,4	0	47,6	95	24	
60	35,4	23	53,6	49	76,8	109	24	
120	49,9	20	78	54	98,7	—	24	
180	64,5	22	98,7	—	98,7	—	—	
300	73,3	—	98,7	—	—	—	—	
480	98,5	—	—	—	—	—	—	

Methode: 10 ccm Enzym (nach Marshall) + 20 ccm 2proz. (?) Harnstofflösung + Wasser bis 250 ccm. 25 ccm ausgenommen und titriert.

— Max. NH₃ = 22,7 mg (?). $k = \frac{10^4}{t} \log \frac{a}{a-x}$ ist von mir berechnet.

10. Temperaturtoleranz.

35. Van Slyke und Cullen [1914¹²⁴] (S. 175) erhitzen eine frische, 5 mal verdünnte Enzymlösung 30 Minuten bei 3 verschiedenen Temperaturen und ließen dann 1 ccm Enzym während 15 Minuten auf 5 ccm 5 proz. Harnstofflösung von derselben Temperatur einwirken. In Kontrollproben wurde das Enzym so schnell wie möglich auf die betreffende Temperatur gebracht und unmittelbar zu der Harnstofflösung gesetzt.

Temperatur °C	Zeit der Erhitzung Minuten	NH ₃ mg	NH ₃ in der Kontrolle mg
60	30	8,28	8,21
70	30	5,35	6,99
80	30	0,29	6,39

Die Urease in Wasserlösung wird demnach durch 30 Minuten Erhitzung bei 60° nicht beeinflusst, verliert $\frac{1}{4}$ ihrer Aktivität bei 70° und wird bei 80° beinahe völlig zerstört.

Vergleiche Moll [1902¹²³] (S. 346) und Jacoby und Sugga [1915⁶¹].

36. Selbst habe ich den Einfluß 1stündiger Erhitzung untersucht.

Versuch 13: 1stündige Erhitzung.

4 Kolben mit 1 ccm frischer Enzymlösung + 2 ccm $\frac{1}{2}$ -Phosphatmischung ($p_H = 7$) + 6 ccm H₂O wurden im Wasserbade 60 Minuten bei verschiedenen Temperaturen gehalten, nach Ende dieser Zeit durch eine Kältemischung rasch bis 17° abgekühlt und mit 1 ccm $\frac{1}{1}$ -Harnstofflösung versetzt. Nach 60 Minuten Reaktion bei 17° wurde das Ammoniak nach Folin bestimmt. In allen Kolben entstand während der Erhitzung ein Niederschlag.

Tabelle XIII.

Temperatur °C	Zeit der Erhitzung Minuten	Reaktionszeit Minuten	NH ₃ mg	Max. NH ₃ mg	<i>k</i>	$\frac{1}{2}$ Mittel
50,4	60	60	12,42	34,06	32,8	} 32
50,4	60	60	12,17	34,06	32,0	
62	60	60	11,66	34,06	30,3	} 30
70	60	60	7,36	34,06	17,6	
70	60	60	7,39	34,06	17,7	} 18
80	60	60	0,19	34,06	0,4	
80	60	60	0,17	34,06	0,4	} —
nicht erhitzt	60	60	12,64	34,06	33,5	
nicht erhitzt	60	60	12,85	34,06	34,3	} 34

Die Tötungstemperatur — d. h. die Temperatur, bei welcher das Enzym in wässriger Lösung ohne Substrat, bei optimalem

p_H nach 60 Minuten langer Erhitzung auf die Hälfte seiner Aktivität sinkt — ist also für die Urease etwa 70° .

Jedoch mag zugegeben werden, daß dieser Versuch vielleicht nicht bei dem p_H -Optimum und mit allzu schwacher Phosphatkonzentration (nur $M/10$) ausgeführt ist.

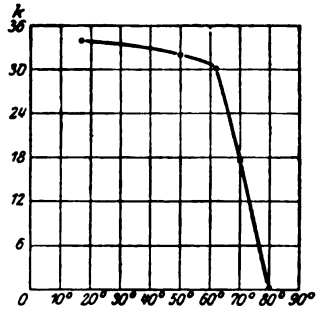


Abb. 7.

11. Einfluß der Verdünnung.

37. Marshall hat als der erste die Aufmerksamkeit darauf gerichtet, daß bei Verdünnung (ohne Vorhandensein von Puffer) die Aktivität zunimmt, um bei weiterer Verdünnung wieder zu sinken [1914¹²³].

Table III u. IV.

	5 ccm 2proz. Harnstoff + 2 ccm Enzym + x ccm H ₂ O			
	30 Min. bei 35°		60 Min. bei 35°	
	ccm	ccm	ccm	ccm
Totalvolumen	7	87	7	87
mg NH ₃	18,1	26,0	31,7	46,3

38. Bevor ich Marshalls Abhandlung gelesen hatte, machte ich selbst gelegentlich dieselbe Erfahrung, die ich dann durch folgenden Versuch ein wenig näher untersuchte:

Versuch 14: Wirkung der Verdünnung.

Tabelle XIV.

1 ccm $M/10$ -Harnst. + 1 ccm Enzym + x ccm H₂O; 60 Min. bei 17°

Totalvolumen ccm	NH ₃ mg	Max. NH ₃ mg
2	8,0	34,1
8	10,6	34,1
16	12,1	34,1
32	13,2	34,1
48	14,8	34,1
64	16,1	34,1
56	16,6	34,1
128	15,7	34,1

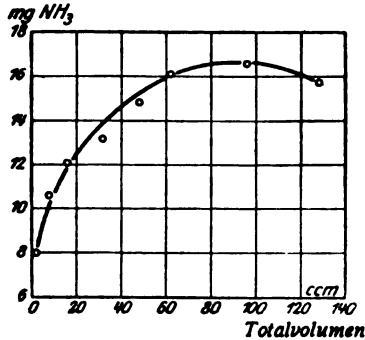


Abb. 8.

Ich überzeugte mich auch, daß ein Konstanthalten der Harnstoffkonzentration während der Verdünnung die Ziffern nur wenig beeinflusste.

39. Auch einige Versuche von Wester [1916²⁰²] (S. 429) bestätigen diese Ergebnisse. Es ist daher wohl auf ihre ungenügende Methodik (Dampfstromdestillation) zurückzuführen, daß Jacoby und Umeda das Gegenteil gefunden haben [1914⁸⁰]

Tabelle II.

	20 ccm 2proz. Harnstoff + 10 ccm Enzym + x ccm H ₂ O; 19 Std. bei 37°		
Totalvolumen ccm	32	40	50
ccm $\frac{1}{1}$ -NH ₃ . .	0,85; 0,98	0,48; 0,45	0,44; 0,42

Die Erklärung der gesteigerten Aktivität liegt wohl in der durch die Verdünnung gehemmten p_H -Steigerung, wodurch die Reaktion langsamer durch das Gebiet des optimalen p_H passiert. In Gegenwart von Puffer dürften sich die Ergebnisse anders gestalten. Solche Versuche sind indessen nicht ausgeführt.

12. Einfluß der Belichtung.

40. Es liegen nur spärliche Versuche vor. Wester fand [1916²⁰²] (S. 429), daß 10 Stunden Verweilen im direkten Sonnenlicht die Ureaselösungen nicht schädigen, während 50 Stunden es in hohem Grade tun.

Onodera konstatierte [1915¹⁴⁵] Exp. 27)], daß die Aktivität einer frischen Ureaselösung unter dem Einfluß des diffusen Tageslichtes stetig abnahm, jedoch nur annäherungsweise nach dem monomolekularen Gesetz. Weil ein solches Abnehmen in der Aktivität auch im Dunkeln eintritt (siehe Versuch 2, § 10), so handelt es sich hier wohl mehr um einen freiwilligen Zerfall der Enzympartikel als um einen Einfluß der Belichtung.

13. Löslichkeit.

41. In Wasser ist — wie vorher angegeben — die Urease der Pflanzensamen sehr leicht löslich. In 90proz. Alkohol ist das Enzym unlöslich [Bayliss, 1915¹⁰] spaltet doch in solcher Lösung Harnstoff einigermaßen.

In diesem Zusammenhang kann ich einen Versuch anführen, den ich eigentlich machte um zu sehen, ob nicht durch Alkohol

ein eventuelles CO-Enzym entfernt und isoliert werden könne, wie dies z. B. bei der Hefezymase der Fall ist.

Versuch 15: Löslichkeit in abs. Alkohol.

Bereitung von:

AF: 20 g Sojabohnenmehl + 150 ccm 96proz. Alkohol 20 Stunden gerührt. Rückstand (*AR*) abfiltriert. Filtrat = *AF*.

ARW: Rückstand *AR* + 150 ccm H₂O 22 Stunden gerührt. Wasserextrakt (*ARW*) abfiltriert.

E: 20 g Sojabohnenmehl + 150 ccm H₂O 40 Stunden gerührt. Filtrat = *E* (frische Enzymlösung).

Tabelle XV.

Enzym	$\frac{M}{l}$ - Phosphat ccm	H ₂ O ccm	$\frac{M}{l}$ - Harnstoff ccm	Zeit Min.	NH ₃ mg	Maximum NH ₃ mg
0,5 ccm <i>AF</i>	2	6,5	1	120	0,28	34,06
0,5 „ <i>ARW</i>	2	6,5	1	120	6,98	34,06
0,5 „ <i>AF</i> + 0,5 ccm <i>ARW</i>	2	6	1	120	6,62	34,06
0,5 „ <i>E</i>	2	6,5	1	120	10,46	34,06
0,5 „ <i>E</i> + 0,5 ccm <i>AF</i> .	2	6	1	120	10,07	34,06

Das Enzym ist also in Alkohol unlöslich und das Alkohol-extrakt enthält kein Co-Enzym. Alkoholbehandlung ist schädlich.

14. Beschleunigende Stoffe.

42. Beim Zusatz fremder Stoffe hat man in vielen Fällen gefunden, daß die Reaktion beschleunigt wird.

Dies gilt für: CO₂, HCN, Glykokoll, NH₄Cl [Armstrong usw.²²³], eine Reihe Aminosäuren wie Alanin, Asparagin, Leucin, Tyrosin, Wittepepton, Casein, Glycyltryptophan und Glutaminsäure, wenn neutralisiert [nur bei Sojaurease, nicht bei Robinia- oder Bakterienurease — Jacoby usw.^{80, 82}], weiter für Phosphatgemische [Van Slyke usw.¹⁸⁷] und Serum [Marg. Falk⁶¹ — Jacoby usw.^{80, 82, 84} — Neumann¹⁴⁴ — Onodera¹⁴⁵ (S. 544)].

Alle diese Stoffe sind schwache Säuren oder amphotere Elektrolyte. Ihr beschleunigender Einfluß ist wie beim Phosphat auf ihre Hemmung der p_H -Steigerung zurückzuführen, wie Róna und György hervorheben [1920¹⁶²]. Dies wird, was Serum betrifft, mit großer Schärfe von Jacoby bestritten (diese Zeitschr. 114, 152. 1921). Die Versuche von Róna und György mit $\frac{M}{l}$ -Phosphat als Puffer zeigen jedoch, daß eine Beschleunigung durch Serum erst nach langer Versuchszeit und zwar ziemlich schwach eintritt, durch Glykokoll, Alanin, Tyrosin und Leucin überhaupt nicht. Um den Streit endgültig abzumachen, ist es nötig, bei Serum noch stärkere Pufferkonzentration als $\frac{M}{l}$ anzuwenden.

15. Hemmende Stoffe.

43. Hier liegen die Verhältnisse mehr verwickelt und unübersichtlich vor. Die Hemmung kann auf einer reinen Giftwirkung der eingeführten Ionen oder auf dem p_H -Effekt der eingeführten H bzw. OH'-Ionen oder auf diesen beiden Ursachen zusammen beruhen. In größerer Konzentration sind außerdem alle Stoffe nachteilig. Hemmend wirken also:

A. Alle Basen, wie NaOH, NH_3 , Na_2CO_3 , $(NH_4)_2CO_3$ (im Anfang), K_2HPO_4 .

B. Starke Mineralsäuren wie HCl, H_2SO_4 , H_3BO_3 , Carboxysäuren in größerer Konzentration, wie Essig-, Butter-, Glutamin- und Salicylsäure; weiter Phenol, Dichlordiäthylsulfid (ohne Puffer) usw.

Anm.: Daß schwache Säuren wie Phenol, Resorcin, Gutajacol und KH_2PO_4 in kleineren Konzentrationen ($M/25$) die Reaktion erst hemmen und dann beschleunigen, ist durch ihren p_H -Effekt ohne weiteres einleuchtend.

C. Aldehyde (am meisten Formaldehyd) und Aldehydcyanhydrine (nicht Acetaldehydcyanhydrin), Arsenverbindungen, Chinol, Monomethylchinol, Chinin, $CuSO_4$, Chloroform, Dichlordiäthylsulfid (auch mit Puffer), $FeSO_4$, H_2S , hippursaures Natron, KCN, NaF, Neutralsalze (besonders die Kationen), Phosphationen, Saligenin, Senföl, Sulfon, Tetrachlordiäthylsulfid usw.

D. Alkohole in größerer Konzentration (um so stärker, je mehr C-Atome Saponin, Glycerin, Harnstoff ($> 2 M$)).

44. Eine Sonderstellung nehmen $HgCl_2$, $Hg(CN)_2$ und NiO ein. Sie inaktivieren schon in geringen Mengen die Urease völlig, aber das Enzym kann durch geeignete Stoffe reaktiviert werden, bei $HgCl_2$ und NiO durch KCN oder Glykokoll, bei $Hg(CN)_2$ nur durch KCN. Jacoby erklärt dies durch die Annahme, daß die Metallionen zuerst mit den Enzymmolekeln eine komplexe Verbindung eingehen, die dann durch KCN oder Glykokoll ihres metallischen Teils beraubt wird.

Ohne Einfluß sind geringere Mengen folgender Stoffe: Alkohole, Atoxyl, arsenige Säure, Eiweiß, Glucose, Glycerin, KCN, Lävulose, NaF, Na-Salicylat, Methylsalicylat, Neutralsalze, Pepsin, Papayotin, Saccharose, Toluol, Thiodiglykol, Thiodiglykolacetat, Trypsin usw.

Literatur.

Armstrong usw.^{2, 3}. — Auel und Collin⁴. — Bayliss¹¹. — Groll⁶⁶. — Jacoby usw.^{80, 81, 82, 83, 89}. — Labberté¹⁰⁰. — Marshall¹²². — Miquel¹²³. — Moll¹²⁴. — Onodera¹⁴⁵. — Pin Yin Yi¹⁵². — Róna usw.^{162, 163}. — Takeuchi¹⁷⁰. — Van Slyke usw.¹⁸⁷. — Wester^{202, 204, 207}.

16. Vorbehandlungen.

45. Die Ergebnisse verschiedener Vorbehandlungen sind, kurz zusammengestellt:

Mit	Konzentration	Vorbehandlungszeit	Aktivität	Autor
A. NH ₃	M/25	1 Tag	15/25	Armstrong ²⁾
	M/25	2 "	13/25	
	M/25	4 "	9/21	
NaOH	M/50	1,5 Std.	0	Onodera ¹⁴⁵⁾
	M/100	1,5 "	9/23	
	M/500	1,5 "	21/23	
	M/1000	1,5 "	24/24	
	1,5 M/1000	18 "	wenig abgeschwächt	
B. HCl	M/25	1 Tag	0	Armstrong ²⁾
	M/100	18 Std.	0	Marshall ¹²³⁾
	M/500	3 Tage	21/24	Armstrong ²⁾
	M/500	60 "	3/10	
	M/500	17 Std.	0	Onodera ¹⁴⁵⁾
	M/1000	10 Min.	0,6/24	
	1,5 M/1000	2 "	0	Marshall ¹²³⁾
	M/2000	1 Std.	0,5/24	Onodera ¹⁴⁵⁾
	M/3000	1 "	23/24	
	M/4000	1 "	24/24	
H ₂ SO ₄	n/10	15 Min.	0	Onodera ¹⁴⁵⁾
	n/50	15 "	0	
	n/500	15 "	0,9/24	
	n/500	30 "	0	
	n/1000	17 Std.	0	
	n/2000	1 "	0	
	n/2500	17 "	24/24	
	n/3000	1 "	24/24	
	n/4000	1 "	24/24	
	Essigsäure	n/500	17 Std.	
n/500		30 Min.	6/24	
n/500		60 "	5/24	
n/500		90 "	3/24	
n/1000		10 "	24/24	
n/1000		60 "	15/24	
Buttersäure	n/500	17 Std.	0	Onodera ¹⁴⁵⁾
	n/1000	10 Min.	23,5/23,6	
	n/1000	60 "	11/24	
Oxalsäure	n/500	17 Std.	0	Onodera ¹⁴⁵⁾
	n/1000	10 Min.	0,5/24	
	n/2000	60 "	21/24	
	n/4000	60 "	21/24	
Ameisensäure	n/500	17 Std.	0	Onodera ¹⁴⁵⁾
	n/1000	10 Min.	2,3/24	
	n/2000	60 "	4/24	
	n/3000	60 "	24/24	
	n/4000	60 "	24/24	

Mit	Konzentration	Vorbehandlungsszeit	Aktivität	Autor
H_2PO_4	$M/500$	17 Std.	0	Onodera ¹⁴⁵⁾
	$M/1000$	10 Min.	$23.5/34$	
	$M/1000$	60 "	$5/34$	
Trichloressigsäure	$M/1000$	10 Min.	$0.5/34$	Onodera ¹⁴⁵⁾
	$M/2000$	60 "	$0.4/34$	
	$M/3000$	60 "	$21/34$	
	$M/4000$	60 "	$23.5/34$	
Benzoesäure	$M/1000$	60 Min.	$1/34$	Onodera ¹⁴⁵⁾
	$M/2000$	60 "	$1.9/34$	
Salicylsäure	$M/1000$	60 "	$0.7/34$	Onodera ¹⁴⁵⁾
	$M/2000$	60 "	$1.3/34$	
HNO_3	$M/2000$	60 Min.	$0.4/34$	Onodera ¹⁴⁵⁾
	$M/3000$	60 "	$23.5/34$	
	$M/4000$	60 "	$23.5/34$	
C. NaCl	$M/10$	20 Std.	$20/33$	Onodera ¹⁴⁵⁾
CaCl ₂	$M/10$	20 "	$22/33$	Onodera ¹⁴⁵⁾
BaCl ₂	$M/10$	20 "	$23/33$	Onodera ¹⁴⁵⁾
D. Alkohol	90%	22 Std.	wenig geschwächt	Marshall ¹²⁸⁾
	96%	20 "	$7/10$	Lövgren, diese Arbeit § 41
E. Paraldehyd	$M/3.3$	5 Std.	0	Onodera ¹⁴⁵⁾
Thiodiglykol	3 Tr. in 10 ccm	20 "	keine Hemmung	Róna & Petow ¹⁴³⁾
Dichloräthylsulfid	1 Tr. in 10 ccm	2 "	keine Hemmung	Róna & Petow ¹⁴³⁾
F. Blutserum	—	15 Min.	$1/2$	Jacoby ⁸²⁾
G. Flüssiger Luft	—	100 Std.	kleine Hemmung	Hipburn-Bassoni ⁷⁹⁾

46. Was die Säuren betrifft, so ordnet sie Onodera nach fallendem Inaktivierungsvermögen in folgender Reihe: Oxal- > Trichloressig- > Salz-, Salpeter- > Schwefel- > Salicyl- > Ameisen- > Benzoe- > Phosphor- > Butter- > Essigsäure.

Diese Ordnung stimmt mit dem Dissoziationsgrad, außer für Oxal- und Trichloressigsäure (evtl. Buttersäure), welche mehr inaktivieren als ihrem Dissoziationsgrad entspricht. Ihre Anionen sind also für die Urease giftig.

Nach der Oberflächenspannung geordnet werden sie: H_2SO_4 > HCl > HNO_3 > Ameisen- > Essig- > Trichloressig- > Buttersäure.

Die hemmende Einwirkung von Säuren auf die Urease ist nach Onodera eine Funktion des Dissoziationsgrades (direkt) und der Oberflächenspannung (umgekehrt).

17. Toxische Wirkungen.

47. In den lebenden Organismus subcutan oder intravenös eingeführt übt die Ureaselösung starke toxische Wirkungen aus, die sich durch Gewichtsabnahme, Durchfall, Temperaturerhöhung und bisweilen Tod kennzeichnen. Daß es sich hier um eine Wirkung des Enzyms handelt, geht aus der Tatsache hervor, daß eine auf 90° erhitze Ureaselösung keine toxischen Wirkungen hervorbringt. Bezüglich weiterer Einzelheiten siehe Moll 1902¹³³), Marg. Falk 1914⁴¹) und Carnot und Gerard 1919²⁶), 27).

18. Anwendungen.

48. Es liegt auf der Hand, wie ungemein leicht und sicher sich Harnstoff mittels der Urease bestimmen läßt. Erstens greift dies Enzym keinen anderen Stoff als Harnstoff an; zweitens ist die Umsetzung absolut vollständig und vollzieht sich in einem sehr kurzen Zeitraume; drittens läßt sich das entwickelte NH₃ nunmehr überaus scharf bestimmen.

Diese Anwendung der Urease wurde schon von Musculus 1876¹³⁹) (S. 219) und später von Miquel [1890¹⁴⁰)] angegeben, aber fand keine Beachtung, bevor sie 1913 von Marshall aufs neue empfohlen wurde. Marshall benutzte dabei die Sojaurease und direkte Titration [1913¹⁴⁰)]. Geselschap prüfte die Methode und fand sie sehr gut auch in Gegenwart von Zucker und Eiweiß [1913¹⁴⁷)]. Kurz danach verbesserte Marshall seine Methode durch Einführung des Durchlüftungsprinzips, wodurch sie auch für Harnstoff im Blut und anderen Körperflüssigkeiten anwendbar wurde [1914¹⁴¹)]. Plimmer und Skelton fanden es unnötig, Enzymlösungen zu bereiten. Mit Sojabohnenmehl als solches und Anwendung des Durchlüftungsprinzips erhielten sie ausgezeichnete Analysenresultate [1914¹⁴²)]. Hahn und Saphra verbesserten ihrer Meinung nach Marshalls erste Methode durch Heranziehen eines festen Enzympräparats (Alkoholfällung) anstatt der wenig haltbaren Enzymlösung Marshalls [1914⁶⁷)]. Van Slyke, Zacharias und Cullen dagegen meinten, daß Acetonfällung und Anwendung des Durchlüftungsprinzips besser sei, denn mit Hahns Methode entstehen unzweifelhaft NH₃-Verluste [1914¹⁴⁶)].

Eisenberger kam zu derselben Auffassung: Die Resultate bei direkter Titration seien nicht gut, dagegen sei die Methode von Van Slyke sehr genau und verläßlich [1914³⁸)]. Hahn muß dann zugeben, daß Fällung durch Alkohol nachteilig sei. Er teilt mit, es sei besser, ein (von ihm patentiertes?) käufliches, festes Enzympräparat anzuwenden. Durchlüftung sei eine unnötige Komplikation. Auf neue Analyseergebnisse gestützt verneint er, daß bei seiner Methode NH₃-Verluste entstehen. Bei Harnstoffbestimmung in Blutproben indessen müsse — wegen des da unscharfen Umschlages (!) bei direkter Titration mit Methylorange — die Methode

dahin abgeändert werden, daß man einen Überschuß an Säure zufüge und den Säurerest jodometrisch bestimme [1915⁶⁶]. Fiske verfeinerte Marshall-Van Slykes Methode durch sorgfältiges Vermeiden einiger NH_3 -Verluste, wodurch die Fehlergrenze auf 0,1–0,2% der vorhandenen Harnstoffmenge herabgedrückt wurde [1915⁶⁶]. Horwáth und Kadletz prüften Hahns Methode an Urin und Harnstofflösungen — mit sehr unbefriedigendem Resultat, das sie (wie Van Slyke) auf NH_3 -Verluste zurückführten. Um diese zu vermeiden, hängten sie in den verschlossenen Reaktionskolben eine kleine extra HCl-Vorlage ein. Tatsächlich fanden sie stets einen Teil der Säure in der Vorlage neutralisiert [1916⁷⁹]. Hahn erklärt ihr Mißlingen durch ihre Verwendung allzu alter Harnstofflösungen und schlechten Enzympräparate. Ihre neu eingeführte Säurevorlage sei durchaus unnötig [1919⁶⁹]. Bahlmann benutzt bei Mikrobestimmung von Harnstoff im Blut Durchlüftung und jodometrische Titration [1920⁶]. Folin, der sich während vieler Jahre mit der Methodik der Harnstoffbestimmung in Körperflüssigkeiten beschäftigt hat, nesslerisiert das Ammoniak direkt im Reaktionskolben ohne Fällung der Eiweißstoffe [1919⁶⁹]. Grigaut und Guérin haben diese Folinische Methode neulich verbessert [1919⁶¹].

49. Eine andere Anwendung der Urease besteht in der Darstellung von Ammoniumsulfat aus Harn. Der von Menschen und Tieren produzierte Harnstoff repräsentiert ungeheure Mengen N und C, die jetzt ohne Nutzen für uns Menschen wegfließen dürfen („wir heizen den Himmel und speisen den Ozean“). Vermittels der Urease kann man wenigstens die N-Mengen des Harns uns nutzbar machen.

Takeuchi [1911⁷⁹] teilt mit, daß in Yokohama eine kleine Fabrik existiere, die den Harn aus den Häusern täglich hole und ihn mittels der Sojaurease in Ammoniumsulfat überführe. Der Verdienst soll 200 M. pro Tag betragen. — Zemplen [1912¹¹²] findet, daß sich die Robinia-urease zu demselben Zwecke verwenden lasse. Aus 1 cbm Harn könne man 35 kg Ammoniumsulfat und 1,5 kg P_2O_5 bekommen.

Kapitel IV.

Co-Enzym.

50. Onodera machte folgenden Versuch: Er dialysierte eine Ureaselösung. Nach 5-tägiger Dialyse erwies sie sich wirkungslos, aber durch Zusatz von 0,5 cem frischer Enzymlösung bekam er eine Wirkung, die diejenige der zugesetzten Menge frischer Enzymlösung weit übertraf. Er schließt, daß durch die Dialyse ein Co-Enzym verschwinde.

Im folgenden bedeutet:

E frische Enzymlösung, *di* innere Flüssigkeit nach der Dialyse, *diN* Niederschlag davon, *diF* Filtrat, *dy* äußere Flüssigkeit nach der Dialyse, *dyN* Niederschlag davon, *dyF* Filtrat.

Eine Ziffer als Exponent bedeutet Erhitzung zu der angegebenen Temperatur während einer Stunde.

Onoderas Versuche können da abgekürzt in folgender Weise wiedergegeben werden:

Exp. III.		das Co-Enzym und nicht das Enzym kochbeständig gefunden.	
<i>E</i>	26,7		
<i>di</i>	0,2	Exp. XX.	
<i>dy</i>	0	<i>di</i>	0,44
<i>di</i> + <i>dy</i>	0,4	<i>di</i> + 1 ccm <i>E</i>	7,77
		1 ccm <i>E</i>	0,10
Exp. IV.		$d_{1 \text{ Std.}}^{80^\circ}$	0,11
<i>di</i> + <i>dy</i>	0,1	$d_{1 \text{ Std.}}^{80^\circ}$ + 1 ccm <i>E</i>	4,40
<i>di</i> + <i>dy</i> + 1 ccm <i>E</i>	13,1	$d_{10}^{100^\circ}$	0,03
1 ccm <i>E</i>	1,0	$d_{10}^{100^\circ}$ + <i>E</i>	2,86
Exp. V.		Exp. XXI.	
<i>diF</i>	1,62	0,5 ccm <i>E</i> frisch	0,19
<i>diN</i>	1,50	5 ccm <i>E</i> nach 15 Tagen	
<i>diF</i> + <i>diN</i>	5,22	Stehen bei 36,5°	8,79
<i>diF</i> + 2 ccm <i>E</i>	27,29	5 ccm <i>E</i> nach 15 Tage	
<i>diN</i> + 2 ccm <i>E</i>	14,79	Stehen bei 36,5° + 0,1 <i>E</i>	
2 ccm <i>E</i>	3,4	(frisch)	18,48
		Das Co-Enzym wird beim	
Exp. XVIII.		Stehen zerstört.	
$E_{1 \text{ Std.}}^{80^\circ}$	0,1	Exp. XXII.	
$E_{1 \text{ Std.}}^{80^\circ}$ + 1 ccm <i>E</i>	19,74	2 ccm <i>E</i> (frisch)	2,89
1 ccm <i>E</i>	0,71	2 ccm <i>E</i> (frisch) + 1 ccm	
Durch 1stündige Erhitzung		Ochsenserum	29,19
bei 80° wird das Co-		1 ccm Ochsenserum	0
Enzym zerstört (!).		<i>di</i>	0,44
Exp. XIX.		<i>di</i> + 1 ccm Ochsenserum .	2,06
$E_0^{100^\circ}$ (zum Kochen erhitzt) 0		5 ccm $E_{1 \text{ Std.}}^{80^\circ}$	0
$E_0^{100^\circ}$ + 1 ccm <i>E</i>	18,58	5 ccm $E_{1 \text{ Std.}}^{80^\circ}$ + Ochsenser. .	0,09
1 ccm <i>E</i>	0,73	5 ccm $E_{1 \text{ Std.}}^{80^\circ}$ + 1 ccm <i>E</i> .	17,14
Kochen zerstört das Co-Enzym,		Ochsenserum enthält keine Urease,	
nicht das Enzym. Dies Ergebnis		aber einen Accelator (Auxo-	
ist sehr merkwürdig; denn		urease). Alle diese Versuche	
in allen anderen Fällen, wo ein		sind ohne Puffer und ohne	
Co-Enzym existiert, hat man		Messung von p_H ausgeführt.	

Arm.: In allen Versuchen ist das Totalvolumen 50 ccm; die Harnstoffkonzentration 0,15% (max. NH_3 = 42,5 mg); Enzym acetongefällt; Reak-

tionszeit 16–20 Stunden bei Zimmertemperatur; NH_3 nach Folin bestimmt; Zeit der Dialyse: 4–5 Tage.

51. Onoderas Behauptung, daß das Enzym kochbeständig sei, erschien mir so merkwürdig, daß ich Anlaß fand, folgenden Versuch zu machen:

Versuch 16: 1wöchige Dialyse und Erhitzung.

Tabelle XVI.

Enzym	$\text{M}/_2$ -Phosphat ccm	H_2O ccm	5 M Harnstoff ccm	NH_3 mg
di	2	25	1	7,8
dy	2	19	1	6,8
di^{80°	2	25	1	0,1
dy^{80°	2	19	1	0,1
$di + dy$	2	17	1	22,2
$di + dy^{80^\circ}$	2	17	1	17,2
$di^{80^\circ} + dy$	2	17	1	7,3

Totalvolumen: 30 ccm. — Temperatur: 16° . — Reaktionszeit: 10 Stdn.
— Außenwasser 3 mal gewechselt (bei dy). — di in fließendem Wasser im Dunkeln dialysiert.

Zusammenstellung: $di = 7,8$	$di = 7,8$	$di^{80^\circ} = 0,1$
$dy = 6,8$	$dy^{80^\circ} = 0,1$	$dy = 6,8$
<u>14,6</u>	<u>7,9</u>	<u>6,9</u>
$di + dy = 22,2$	$di + dy^{80^\circ} = 17,2$	$di^{80^\circ} + dy = 7,3$
Diff. = 7,6	9,3	0,4

Daß die Wirkung von $di + dy$ zusammen bedeutend größer ist als die Summe deren separater Wirkungen, kann dadurch erklärt werden, daß durch die Dialyse eine teilweise Scheidung von Enzym und „Co-Enzym“ stattgefunden hat. Nimmt man nun an — was berechtigt erscheint —, daß das Enzym schlechter dialysierbar ist als das „Co-Enzym“ und daß das Enzym kochbeständig sei, so sollte

di : Enzym + wenig Co-Enzym — di^{80° : nur Enzym

dy : Co-Enzym + wenig Enzym — dy^{80° : nur wenig Enzym

enthalten. Demnach sollte die Wirkung von $dy + di^{80^\circ}$ größer sein als die Wirkung von $di + dy^{80^\circ}$ — aber das Gegenteil findet tatsächlich statt. Nimmt man dagegen an, daß das „Co-Enzym“, aber nicht das Enzym hitzebeständig ist, so enthalten:

di : Enzym + wenig Co-Enzym — di^{80° : nur Co-Enzym (wenig)

dy : Co-Enzym + wenig Enzym — dy^{80° : nur Co-Enzym.

Die Wirkung von $di + dy^{80^\circ}$ muß dann weit größer ausfallen als die Wirkung von $dy + di^{80^\circ}$, was mit den Ergebnissen des Versuchs übereinstimmt.

Man muß also das Enzym als thermolabil und das „Co-Enzym“ als thermostabil auffassen.

Es ist zu empfehlen, die Dialyse im Dunkeln vorzunehmen, denn bei längerem Dialysieren in Tageslicht wird das Enzym zerstört.

52. Durch die obigen Versuche ist jedoch die Existenz eines Co-Enzyms nicht sichergestellt, denn es ist nicht ausgeschlossen, daß das „Co-Enzym“ zum Teil in einem p_H -Effekt und zum Teil in einer Salzwirkung bestehe. Entfernung der Elektrolyte schwächt nämlich die Wirksamkeit der Enzyme erheblich (siehe Starkenstein, diese Zeitschr. 74, 210. 1910).

53. Um einen eventuellen p_H -Effekt zu eliminieren, machte ich die folgenden Versuche mit der Phosphatkonzentration $M/2$ bei $p_H = 6,86$. In jeder Probe kamen 5 ccm einer Phosphatmischung von 600 ccm $M/1$ - Na_2HPO_4 + 250 ccm NaH_2PO_4 .

Zuerst wollte ich mich überzeugen, ob Van Slykes Gleichung $t = \frac{1}{E} \left(\frac{1}{c} \log \frac{a}{x-a} + \frac{x}{d} \right)$ auch für dialysiertes Enzym gültig sei.

Versuch 17: Dialysiertes Enzym.

Tabelle XVII.

Dialysiertes Enzym ccm	$M/1$ -Phosphat ccm	H_2O ccm	Harnstoff	Harnstoffkonzentration Mol pro Liter	Zeit Min.	NH_3 mg	Max. NH_3 mg	k	$a \cdot k$	$c \cdot E \cdot 10^4$
2	5	1	2 ccm $M/16$	0,0125	80	2,32	4,26	43	3	51
2	5	2	1 ccm $M/4$	0,025	80	3,97	8,52	34	4	47
2	5	1	2 ccm $M/4$	0,05	80	6,45	17,03	26	6	46
2	5	2	1 ccm $M/1$	0,1	80	8,97	34,06	17	8	43
2	5	1	2 ccm $M/1$	0,2	80	11,10	68,12	10	10	41
2	5	2	1 ccm 4 M	0,4	80	12,77	136,24	5,3	11	44
2	5	1	2 ccm 4 M	0,8	80	13,64	272,48	2,8	11	46
										$a \cdot E$
2	5	2	1 ccm 8 M	1,6	80	14,55	545	1,5	11,5	0,182

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17°. — Enzym: 10 Tage in fließendem Wasser im Dunkeln dialysiert. Niederschlag mitgenommen. — Dialysierschlauch: Aus Kollodium.

$c \cdot E$ nach van Slykes Formel berechnet zeigt gute Konstanz, aber nicht $k = \frac{10^4}{t} \log \frac{a}{a-x}$. Ich beobachtete indessen sogleich, daß in den höheren Reihen k bei verdoppelter Harnstoffkonzentration etwa um die Hälfte herabsank; $a \cdot k$ zeigt in den 4 letzten Reihen eine ganz geringe Steigerung.

54. Mein nächster Versuch bezweckte, genauer festzustellen, welchen Einfluß eine zugesetzte Menge „Co-Enzym“ — durch Iständige Erhitzung einer frischen Enzymlösung bei 80° erhalten — ausüben würde, wenn durch die starke Pufferkonzentration $M/2$ eine Verschiebung in p_H ausgeschlossen wäre.

Versuch 18: Dialysiertes Enzym + „Co-Enzym“.

Tabelle XVIII.

A.

d_i	E^{80}	$M/1$ - Phos- phat	H_2O	Harnstoff	Harnstoff- konzentration	Zeit	NH_3	Max. NH_3	k	$a \cdot k$	$c \cdot E \cdot 10^4$
ccm	ccm	ccm	ccm		Mol pro Liter	Min.	mg	mg			
1	—	5	2	2 ccm $M/16$	0,0125	100	0,58	4,26	6,4	0,4	8,2
1	—	5	2	2 ccm $M/4$	0,05	100	1,18	17,03	3,1	0,8	5,7
1	—	5	2	2 ccm $M/1$	0,2	100	2,05	68,12	1,3	1,3	6,2
1	—	5	2	2 ccm 4 M	0,8	100	2,52	272,5	0,4	1,6	11,6
											$\sigma \cdot E$
1	—	5	2	2 ccm 8 M	1,6	100	2,61	545	0,21	1,7	0,026
											1,5

B.

1	2	5	—	2 ccm $M/16$	0,0125	100	0,76	4,26	8,5	0,5	11,3
1	2	5	—	2 ccm $M/4$	0,5	100	1,50	17,03	4	1,0	7,8
1	2	5	—	2 ccm $M/1$	0,2	100	2,50	68,12	1,6	1,6	8,9
1	2	5	—	2 ccm 4 M	0,8	100	2,90	272,5	0,5	1,9	8,9
											$\sigma \cdot E$
1	2	5	—	2 ccm 8 M	1,6	100	3,06	545	0,25	2,0	0,031
											1,8

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17°. — Phosphat $M/1$ von $p_H = 6,86$. — d_i : Frische Enzymlösung, 16 Tage in fließendem Wasser im Dunkeln dialysiert. — E^{80} : Frische Enzymlösung, 60 Minuten bei 80° gehalten.

Hier zeigt c keine gute Konstanz, dagegen steigt $a \cdot k$ innerhalb der früheren Grenzen nur schwach.

Zu meiner Überraschung fand ich weiter, daß die Wirkung in B derjenigen in A so wenig überlegen war, daß von einer Co-Enzymwirkung in B keine Rede sein kann.

55. Ich erhärtete diese Schlüsse durch einen Versuch, worin ich den Reaktionsverlauf mit und ohne Zusatz einer erhitzten Enzymlösung näher verfolgte:

Versuch 19: Frisches Enzym + erhitztes Enzym.

Tabelle XIX.

A.

Enzym frisch ccm	E ⁵⁰ ccm	M/1- Phos- phat ccm	H ₂ O ccm	Harnstoff	Harnstoff- konzentra- tion Mol pro Liter	Zeit Min.	NH ₃ mg	Max. NH ₃ mg	t	akt	c.E.-10
1	—	5	3	1 ccm M/1	0,1	15	4,77	34,06	44	22	21
1	—	5	3	1 „ M/1	0,1	30	9,20	34,06	46	23	20
1	—	5	3	1 „ M/1	0,1	45	13,26	34,06	48	24	23
Mittel:										23	21

B.

1	2	5	1	1 ccm M/1	0,1	15	4,75	34,06	44	22	16
1	2	5	1	1 „ M/1	0,1	30	8,88	34,06	44	22	13
1	2	5	1	1 „ M/1	0,1	45	13,13	34,06	47	23	14
Mittel:										22	14

C.

1	—	5	2	2 ccm 8 M	1,6	15	6,25	545	3,3	27	d.E 0,417
1	—	5	2	2 „ 8 M	1,6	30	12,23	545	3,3	26	0,406
1	—	5	2	2 „ 8 M	1,6	45	17,50	545	3,2	26	0,390
Mittel:										26	0,404

D.

1	2	5	—	2 ccm 8 M	1,6	15	6,81	545	3,7	29	d.E 0,454
1	2	5	—	2 „ 8 M	1,6	30	13,08	545	3,5	28	0,436
1	2	5	—	2 „ 8 M	1,6	45	18,25	545	3,5	28	0,428
Mittel:										28	0,439

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17°. — Phosphat M/1 von $p_H = 6,86$.

56. Nach diesen Versuchen neige ich sehr dazu, Onoderas Co-Enzym sowie seinen Accelerator im Ochsen Serum hauptsächlich als einen p_H -Effekt anzusehen. Es ist meine Absicht, die Untersuchungen hierüber fortzusetzen, und ich brach sie zur Zeit nur deshalb ab, weil ein Problem von größerer Tragweite mein Interesse erweckte, nämlich die Gültigkeit von Van Slykes Formel.

Kapitel V.

Prüfung von Van Slykes Gleichung für den Reaktionsverlauf.

57. Bei Anwendung von Van Slykes Formel

$$t = \frac{1}{E} \left(\frac{1}{c} \log \frac{a}{a-x} + \frac{x}{a} \right)$$

auf meine Versuchsergebnisse erhielt ich nur in einem einzigen Fall eine gute Konstanz an c (Versuch 17, § 53). Oft gingen die Werte an c weit auseinander, bisweilen wurden sie ganz barock.

Ich fand es daher nötig, eine Nachprüfung derjenigen Versuche, aus denen Van Slyke seine Formel hergeleitet hatte, vorzunehmen.

Bevor ich aber dies tat, wollte ich mich davon überzeugen, daß ich die Folinische Methode für Ammoniakbestimmung genügend beherrschte. Zu diesem Zweck überlieferte mir der Herr Amanuens Erik Löwenhamm am Analytischen Laboratorium der Hochschule zu Stockholm gütigst 3 Salmiaklösungen von gegebener aber mir völlig unbekannter Konzentration. Die Analyse ergab:

Versuch 20: Prüfung der Methode.

Tabelle XX.

Probe	0,1811 n NaOH	Rest	mg NH ₃	
			gefunden	ausgeliefert
Salmiaklösung 1	19,27	0,33	0,7	0,7
„ 2	10,34	9,26	20,7	20,8
„ 3	2,05	17,55 ^a	39,2	39,1
Wasser + K ₂ CO ₃	19,60	—	—	—
Wasser + K ₂ CO ₃	19,60	—	—	—
Wasser + K ₂ CO ₃	19,60	—	—	—

Absorptionsflüssigkeit: 20 ccm H₂SO₄. — NH₃ durch 40 ccm gesättigter Pottaschelösung freigemacht und durch einen Luftstrom in die Vorlage hinübergetrieben. — Schäumen wurde wie immer durch eine Schicht Paraffinöl vermieden.

58. Ich stellte dann die Ammoniakmengen fest, die aus den im folgenden angewandten Harnstoff- und Enzymmengen durch die gesättigte Pottaschelösung während der 17stündigen Durchlüftung entwickelt werden.

Versuch 21: Korrekturen.

Tabelle XXI.

Harnstoff	M/1 ₁₆ -Phosphat ccm	H ₂ O ccm	Gesättigte Pottaschelösung ccm	Enzym ccm	0,1811 n NaOH ccm	Rest ccm
—	—	—	40	—	9,80	—
—	—	—	40	—	9,81	—
1 ccm M/16	5	3	40	1	9,80	—
2 „ M/16	5	2	40	1	9,81	—
4 „ M/16	5	—	40	1	9,80	—
2 „ M/8	5	2	40	1	9,81	—
4 „ M/4	5	—	40	1	9,80	—
2 „ M/2	5	2	40	1	9,79	0,01
4 „ M/1	5	—	40	1	9,79	0,01
1 „ 8 M	5	3	40	1	9,65	0,15
2 „ 8 „	5	2	40	1	9,50	0,30
4 „ 8 „	5	—	40	1	9,22	0,58

Absorptionsflüssigkeit: 10 ccm H_2SO_4 . — 17 Stunden Saugen bei Zimmertemperatur. — Schäumen durch eine Schicht Paraffinöl vermieden.

59. Bei der Nachprüfung von Van Slyke und Cullens grundlegendem Versuch, dessen Ergebnisse in § 27 dargestellt sind, begegnete mir die Schwierigkeit, daß sie den p_H der Reaktionslösung nicht angegeben hatten. Anderswo¹⁸⁷⁾ (S. 189) fand ich indessen die Angabe, daß eine Mischung von 70 ccm $\frac{1}{2}$ - Na_2HPO_4 + 30 ccm $\frac{1}{2}$ - KH_2PO_4 ihren $p_H = 6,97$ hatte, und schloß daraus, daß die von Van Slyke und Cullen im obigen Versuche angewandten Mischung von 2 Vol. $\frac{1}{2}$ - K_2HPO_4 + 1 Vol. $\frac{1}{2}$ - KH_2PO_4 einen p_H zwischen 6,80 und 6,90 haben muß. Ich habe daher bei der Nachprüfung eine Phosphatmischung von $p_H = 6,86$ benutzt. Übrigens ist die Nachprüfung genau nach den Angaben in Van Slyke und Cullens Experiment 3 angestellt — mit der Ausnahme, daß anstatt acetongefällten Enzyms stets frisch bereitete Enzymlösungen angewendet sind. Die von mir dargestellten Acetonpräparate erwiesen sich nämlich allzu schwach wirksam.

Versuch 22: Nachprüfung von Van Slykes Formel I.

Tabelle XXII.

Enzym	$\frac{1}{2}$ -Phosphat ccm	H_2O ccm	Harnstoff	Harnstoffkonzentration Mol pro Liter	NH_3 mg	Maximum NH_3 mg	k	$a \cdot k$	c	p_H
1	5	3	1 ccm $\frac{1}{16}$	0,00625	1,79	2,13	398	12	46	6,90
1	5	2	2 „ $\frac{1}{16}$	0,0125	3,62	4,26	412	28	55	6,93
1	5	—	4 „ $\frac{1}{16}$	0,025	6,50	8,52	313	39	57	6,99
1	5	2	2 „ $\frac{1}{4}$	0,05	8,91	17,03	161	41	42	7,04
1	5	—	4 „ $\frac{1}{4}$	0,1	10,94	34,06	84	41	35	7,08
1	5	2	2 „ $\frac{1}{1}$	0,2	12,05	68,12	42	42	26	7,11
1	5	—	4 „ $\frac{1}{1}$	0,4	13,13	136,24	22	44	26	7,13
1	5	3	1 „ 8 M	0,8	13,93	272,48	11,4	46	39	7,15
1	5	2	2 „ 8 „	1,6	14,35	545	5,8	46	0,718	7,16
1	5	—	4 „ 8 „	3,2	12,81	1090	2,6	41		7,13

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 16°. — Reaktionszeit: 20 Min.

$k = \frac{10^4}{t} \log \frac{a}{a-x}$. — $c = \frac{dE \cdot 10^3}{dEt - x} \log \frac{a}{a-x}$. — p_H aus Tabelle XXXVI a berechnet.

Weil der Versuch keine genügende Konstanz an c aufwies, wiederholte ich ihn in genau derselben Weise.

Versuch 23: Nachprüfung II.

Tabelle XXIII.

Enzym	M ₁ -Phosphat ccm	H ₂ O ccm	Harnstoff	Harnstoffkonzentration Mol pro Liter	NH ₃ mg	Maximum NH ₃ mg	k	a · k	c	p _H
1	5	3	1 ccm M ₁ /16	0,00625	1,74	2,13	344	11	44	6,89
1	5	2	2 „ M ₁ /16	0,0125	3,19	4,26	300	19	43	6,92
1	5	—	4 „ M ₁ /16	0,025	5,29	8,52	211	26	42	6,97
1	5	2	2 „ M ₁ /4	0,05	7,14	17,03	118	30	35	7,0
1	5	—	4 „ M ₁ /4	0,1	8,28	34,06	61	30	27	7,03
1	5	2	2 „ M ₁ /1	0,2	9,15	68,12	31	31	24	7,04
1	5	—	4 „ M ₁ /1	0,4	9,73	136,24	16	32	18	7,05
1	5	3	1 „ 8 M	0,8	10,63	272,48	8,6	34	} 0,533	7,07
1	5	2	2 „ 8 „	1,6	10,69	545	4,3	34		7,07
1	5	—	4 „ 8 „	3,2	10,07	1090	2,0	32		7,06

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 16°. — Reaktionszeit 20 Min.
Enzym: Frisch (40 : 200; 1 Stunde). — p_H aus Tabelle XXXVIa berechnet.

Wie früher zeigt c Konstanz nur bei den 3 schwächsten Harnstoffkonzentrationen; bei allen übrigen fällt *ak* in dasselbe Gebiet und weist nur ein ganz schwaches Steigen auf.

Weil indessen zwischen dem Originalversuch und diesen Nachprüfungen ein vielleicht wesentlicher Unterschied darin bestand, daß hier die entwickelten Ammoniakmengen etwa doppelt so groß wie dort waren, so wiederholte ich noch einmal die Prüfung mit einer 6fach verdünnten Enzymlösung und Zufügung der Harnstoffkonzentrationen 1 und 2.

Versuch 24: Nachprüfung III.

Tabelle XXIV.

Enzym ccm	M ₁ -Phosphat ccm	H ₂ O ccm	Harnstoff	Harnstoffkonzentration Mol pro Liter	NH ₃ mg	Maximum NH ₃ mg	k	a · k	c · 10	p _H
1	5	3,5	0,5 ccm M ₁ /16	0,003125	0,78	1,06	96	9	107	6,88
1	5	3	1 „ M ₁ /8	0,00625	1,36	2,13	74	14	92	6,89
1	5	2	2 „ M ₁ /16	0,0125	2,34	4,26	58	22	87	6,91
1	5	—	4 „ M ₁ /16	0,025	3,50	8,52	38	29	77	6,93
1	5	2	2 „ M ₁ /4	0,05	4,51	17,03	22	34	61	6,95
1	5	—	4 „ M ₁ /4	0,1	5,36	34,06	12	37	53	6,97
1	5	2	2 „ M ₁ /1	0,2	5,87	68,12	6,5	39	41	6,98
1	5	—	4 „ M ₁ /1	0,4	6,36	136,24	3,5	41	38	6,99
1	5	3	1 „ 8 M	0,8	6,67	272,48	1,8	43	38	6,99
1	5	2	2 „ 8 M	1,6	7,05	545	0,94	45	} 0,117	7,0
1	5	1	3 „ 8 M	2,4	6,96	817,5	0,62	44		7,0
1	5	—	4 „ 8 M	3,2	6,52	1090	0,44	41		6,99

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17,5°. — Reaktionszeit: 60 Min.
 Enzym: Frisch (40 : 200; 1 Stunde), auf das 6fache Volumen verdünnt.
 p_H aus Tabelle XXXVI a berechnet.

Hier zeigt c keine Andeutung einer Konstanz, ak dagegen das gewöhnliche Bild.

Da ich indessen kaum glauben konnte, daß sich ein exakter Forscher wie Van Slyke so völlig geirrt habe, wie diese meine Versuche andeuten, so machte ich noch 2 Nachprüfungen, wobei ich die Reaktionszeiten so wählte, daß die entwickelten Ammoniakmengen in allen Reihen ungefähr gleich wurden. Hierdurch wurde der Effekt der sonst ungleichen p_H -Steigerung vermieden.

In der ersten dieser 2 letzten Nachprüfungen setzte ich bei den wichtigsten Harnstoffkonzentrationen der Sicherheit wegen Parallelproben an.

Versuch 25: Nachprüfung IV. Ammoniakmenge konstant.

Tabelle XXV.

Enzym	$M/1$ Phosphat	H_2O	Harnstoff	Harnstoffkonzentration	Reaktionszeit	NH_3	Max. NH_3	k	ak	ak Mittel	c Mittel	p_H
ccm	ccm	ccm		Mol pro Liter	Min.	mg	mg					
1	5	—	4 ccm $M/16$	0,025	20	6,18	8,52	281	35	35	49	6,98
1	5	—	4 „ $M/16$		20	6,18		281	35			
1	5	2	2 „ $M/4$	0,05	14	6,38	17,03	146	36,4	36	39	6,99
1	5	2	2 „ $M/4$		14	6,29		143	35,8			
1	5	—	4 „ $M/4$	0,1	12	6,36	34,06	75	37	37	29	6,99
1	5	2	2 „ $M/1$	0,2	11,5	6,74	68,12	39	39	39	22	6,99
1	5	2	2 „ $M/1$		11	6,38		39	39			
1	5	—	4 „ $M/1$	0,4	10,5	6,67	136,24	21	41	41	18	6,99
1	5	3	1 „ 8 M	0,8	10	6,72	272,48	11	43	43	19	6,99
1	5	2	2 „ 8 M	1,6	10	7,05	545	5,7	45	46	0,716	7,0
1	5	2	2 „ 8 M		10	7,28		5,9	47			
1	5	1	3 „ 8 M		10	7,03		817,5	3,7			

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17,5°. — Reaktionszeit: Wechselnd. — Enzym: Frisch (20 : 100; 2 Stunden). — p_H aus Tab. XXXVI a berechnet.

ak ist hier noch besser konstant als früher, c fällt wie gewöhnlich stark.

In der letzten Nachprüfung, die zugleich einen Übergang zu den folgenden mehr positiven Versuchen bildet, nahm ich für jede Harnstoffkonzentration 2 Reaktionszeiten.

Versuch 26: Nachprüfung V. Ammoniakmenge konstant. 2 Reaktionszeiten.

Tabelle XXVI.

A.

Enzym ccm	M ₁ - Phos- phat ccm	H ₂ O ccm	Harnstoff	Harnstoff- konzentra- tion Mol pro Liter	Reak- tions- zeit Min.	NH ₃ mg	Max. NH ₃ mg	k	ak	c	p _H
1	5	—	4 ccm $\frac{M}{16}$	0,025	20	6,58	8,52	321	40	46	6,99
1	5	2	2 „ $\frac{M}{4}$	0,05	13,5	6,56	17,03	158	40	44	6,99
1	5	—	4 „ $\frac{M}{4}$	0,1	11,5	6,56	34,06	80	40	33	6,99
1	5	2	2 „ $\frac{M}{1}$	0,2	10,5	6,76	68,12	43	43	30	6,99
1	5	—	4 „ $\frac{M}{1}$	0,4	9,5	6,58	136,24	22,6	45	29	6,99
1	5	2	2 „ 8 M	1,6	8	6,03	545	6,05	48	$\frac{d \cdot E}{0,754}$	6,98

B.

1	5	—	4 ccm $\frac{M}{16}$	0,025	40	8,41	8,52	—	—	—	—
1	5	2	2 „ $\frac{M}{4}$	0,05	27	11,16	17,03	171	43	38	7,06
1	5	—	4 „ $\frac{M}{4}$	0,1	23	11,79	34,06	80	40	25	7,11
1	5	2	2 „ $\frac{M}{1}$	0,2	21	13,08	68,12	43	43	25	7,13
1	5	—	4 „ $\frac{M}{1}$	0,4	19	12,99	136,24	23	46	25	7,13
1	5	2	2 „ 8 M	1,6	16	12,06	545	6,07	49	$\frac{d \cdot E}{0,754}$	7,11

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 18°. — Reaktionszeit: Wechsellnd. — Enzym: Frisch (20 : 100; 2 Stunden). — p_H aus Tab. XXXVIa berechnet.

c erweist sich immerhin als eine schlechte Konstante. ak zeigt das gewöhnliche Bild einer schwachen Steigerung. Man merke hier als neues Moment die gute Übereinstimmung zwischen den 2 zu derselben Harnstoffkonzentration gehörigen ak-Werten.

Meine Versuche 22–26 zeigen unzweideutig:

1. Daß Van Slykes Formel $t = \frac{1}{E} \left(\frac{1}{c} \log \frac{a}{a-x} + \frac{x}{d} \right)$ für die Wirkung der Sojaurease nicht zutrifft, wenigstens für frische Enzymlösungen und bei dem von Van Slyke angegebenen p_H -Optimum ($p_H = 7$).

Später habe ich Van Slykes grundlegenden Versuch selbst durchgerechnet und dabei gefunden, daß die Werte für c in Table III von Van Slyke und Cullen fehlerhaft kalkuliert sind. Die richtigen Werte sind in der 6. Kolumne von Table (§ 27) mitgeteilt. c fällt auch hier tatsächlich stark und zeigt also dasselbe Verhalten wie in meinen Versuchen. Nach alledem ist Van Slykes Formel von der Diskussion abzuführen.

2. Daß die gewöhnliche monomolekulare Formel $k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ auch nicht zutrifft, aber

3. daß die Beziehung $k_1 = \frac{a}{t} \log \frac{a}{a-x}$ möglicherweise ein wahrer Ausdruck für die Ureasewirkung ist. *ak* d. h. $\frac{a}{t} \log \frac{a}{a-x}$ (S. 108) hatte sich nämlich bei diesen Versuchen für Harnstoffkonzentrationen von $\frac{m}{c}$ bis 2,4 M als eine ziemlich gute Konstante erwiesen.

Daß *ak* bei den niedrigsten Harnstoffkonzentrationen zu kleine Werte lieferte, war ich geneigt, auf Mangel an Substrat zurückzuführen. Die schwache aber ganz regelmäßige und immer auftretende Steigerung von *ak* bei erhöhter Harnstoffkonzentration war mir noch ganz rätselhaft.

60. Gilt indessen die Formel $k_1 = \frac{a}{t} \log \frac{a}{a-x}$ für verschiedene Substratkonzentrationen, so muß die Reaktion innerhalb jeder Konzentration monomolekular verlaufen. Um diesen Schluß zu prüfen, führte ich die Versuche 27–29 aus, worin ich bei den Harnstoffkonzentrationen 0,00625–0,2 M die Reaktion, bis 60 bis 80% der gegebenen Substratmenge zersetzt worden war, verfolgte. Hoffte ich aber — in Erinnerung an die Versuche 19 u. 26 — in allen Reihen eine gute Konstanz an *ak* zu bekommen, so sollte ich getäuscht werden.

Kapitel VI.

Zur Bestimmung der Zeitgleichung.

Versuch 27: Zur Bestimmung der Zeitgleichung I. Mittlere Konzentrationen.

Tabelle XXVII.

E₁.

Enzym ccm	M/1- Phos- phat ccm	H ₂ O ccm	Harnstoff	Harnstoff- konzentration Mol pro Liter	Reak- tions- zeit Min.	NH ₃ mg	Max. NH ₃ mg	k	ak	c	pH
1	5	—	4 ccm $\frac{m}{4}$	0,1	15	7,21	34,06	69	34	28	7,0
1	5	—	4 „ $\frac{m}{4}$	0,1	30	13,95	34,06	76	38	31	7,15
1	5	—	4 „ $\frac{m}{4}$	0,1	45	20,38	34,06	88	44	38	7,28
1	5	—	4 „ $\frac{m}{4}$	0,1	60	26,47	34,06	109	54	49	7,41
Mittel: 42,5										37	

F₁.

1	5	2	2 ccm $\frac{m}{1}$	0,2	15	8,06	68,12	37	37	23	7,02
1	5	2	2 „ $\frac{m}{1}$	0,2	30	15,53	68,12	37	37	24	7,18
1	5	2	2 „ $\frac{m}{1}$	0,2	45	22,21	68,12	38	38	24	7,31
1	5	2	2 „ $\frac{m}{1}$	0,2	60	28,57	68,12	39	39	25	7,47
Mittel: 38										24	

Tabelle XXVII (Fortsetzung).

G₁.

Enzym ccm	M/ ₁ Phosphat ccm	H ₂ O ccm	Harnstoff	Harnstoff- konzentration Mol pro Liter	Reak- tions- zeit Min.	NH ₃ mg	Max. NH ₃ mg	t	akt	c	pH
1	5	2	2 ccm 8 M	1,6	15	9,60	545	5,2	41	0,640	7,05
1	5	2	2 „ 8 M	1,6	30	18,42	545	5,0	40	0,614	7,24
1	5	2	2 „ 8 M	1,6	45	26,43	545	4,8	38	0,587	7,41
1	5	2	2 „ 8 M	1,6	60	33,95	545	4,6	37	0,566	7,64

Mittel: 39

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17°. — Enzym: Frisch.

$c = \frac{dE \cdot 10^3}{dEt - x} \cdot \log \frac{a}{a-x}$. Bei der Berechnung von c ist dE für die entsprechende Reaktionszeit in G_1 benutzt, was eigentlich verkehrt ist, denn Van Slykes Formel fordert ein konstantes dE . Nimmt man in allen Berechnungen $dE = 0,640$, steigt c in E_1 von 28 bis 35 und fällt in F_1 von 23 bis 15.

 p_H aus Tabelle XXXVIa berechnet.

Versuch 28: Zur Bestimmung der Zeitgleichung II. Niedrigere Konzentrationen.

Tabelle XXVIII.

A.

Enzym ccm	M/ ₁ Phosphat ccm	H ₂ O ccm	Harnstoff	Harnstoff- konzentration Mol pro Liter	Reak- tions- zeit Min.	NH ₃ mg	Max. NH ₃ mg	t	akt	c	pH
1	5	3	1 ccm $\frac{M}{16}$	0,00625	8	1,00	2,13	344	11	46	6,88
1	5	3	1 „ $\frac{M}{16}$	0,00625	16	1,56	2,13	358	11	57	6,89
1	5	3	1 „ $\frac{M}{16}$	0,00625	24	1,90	2,13	403	13	60	6,90

Mittel: 12

54

Reduziert: 15

68

B.

1	5	2	2 ccm $\frac{M}{16}$	0,0125	12	2,19	4,26	261	16	41	6,90
1	5	2	2 „ $\frac{M}{16}$	0,0125	16	2,70	4,26	273	17	41	6,91
1	5	2	2 „ $\frac{M}{16}$	0,0125	24	3,33	4,26	275	17	38	6,93

Mittel: 17

40

Reduziert: 21

50

C.

1	5	—	4 ccm $\frac{M}{16}$	0,025	12	3,21	8,52	171	21	36	6,92
1	5	—	4 „ $\frac{M}{16}$	0,025	24	5,74	8,52	203	25	38	6,97
1	5	—	4 „ $\frac{M}{16}$	0,025	32	7,03	8,52	231	29	42	7,0

Mittel: 25

39

Reduziert: 31

49

G₂.

1	5	2	2 ccm 8 M	1,6	12	6,38	545	4,27	34	0,532	6,99
1	5	2	2 „ 8 M	1,6	24	12,01	545	4,03	32	0,500	7,11
1	5	2	2 „ 8 M	1,6	36	18,01	545	4,06	32	0,500	7,23

Mittel: 33

0,511

Reduziert: 41

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 16,5°. — Enzym: Frisch (20 : 100; 1 Stunde) von 12 bis 15 ccm verdünnt. — p_H aus Tabelle XXXVI a berechnet.

Versuch 29: Zur Bestimmung der Zeitgleichung III. Mittlere Konzentrationen.

Tabelle XXIX.

D.

Enzym ccm	M/ ₂ - Phos- phat ccm	H ₂ O ccm	Harnstoff	Harnstoff- konzentration Mol pro Liter	Reak- tions- zeit Min.	NH ₃ mg	Max. NH ₃ mg	k	ak	e	p_H
1	5	2	2 ccm M/4	0,05	15	5,89	17,03	123	31	42	6,98
1	5	2	2 „ M/4	0,05	30	11,03	17,03	151	38	45	7,08
1	5	2	2 „ M/4	0,05	40	14,22	17,03	163	41	45	7,15
Mittel: 37										44	
E ₂₉											
1	5	—	4 ccm M/4	0,1	20	8,84	34,06	65	33	32	7,02
1	5	—	4 „ M/4	0,1	40	16,72	34,06	73	37	30	7,20
1	5	—	4 „ M/4	0,1	60	24,77	34,06	94	47	37	7,38
Mittel: 39										33	
F ₂₉											
1	5	2	2 ccm M/1	0,2	40	18,46	68,12	34	34	20	7,24
1	5	2	2 „ M/1	0,2	80	32,81	68,12	36	36	14	7,63
1	5	2	2 „ M/1	0,2	120	41,53	68,12	34	34	9	8,10
Mittel: 35										14	
G ₂₉											
1	5	2	2 ccm 8 M	1,6	15	8,86	545	4,8	38	0,590	7,04
1	5	2	2 „ 8 M	1,6	60	31,20	545	4,3	34	0,520	7,54
1	5	2	2 „ 8 M	1,6	120	48,51	545	3,4	(27)	—	8,50
Mittel: 36										0,555	

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17°. — Enzym: Frisch (40 : 200; 1 Stunde Rührung mit Motor). — p_H aus den Kurven in Abb. 12 berechnet.

Bei den niedrigen Harnstoffkonzentrationen steigt ak , bei der höchsten fällt er. Nur bei 0,2 M Harnstoff zeigt ak eine gute Konstanz. Ehe ich diese Beobachtungen verwertete, wollte ich mich überzeugen, daß die Konstanz von ak bei 0,2 M Harnstoff nicht nur ein Zufall war. Außerdem fand ich es nötig, den Zusammenhang zwischen der entwickelten Ammoniakmenge und der p_H -Steigerung bei der hier angewandten Phosphatkonzentration M/2 auszufinden.

Versuch 30: Zur Bestimmung der Zeitgleichung IV. Harnstoffkonzentration 0,2 M.

Tabelle XXX.

Enzym ccm	M/1- Phos- phat ccm	H ₂ O ccm	Harnstoff	Harnstoff- konzentration Mol pro Liter	Reak- tions- zeit Min.	NH ₃ mg	Maximum NH ₃ mg	s ±	p _H
1	5	2	—	—	—	—	—	—	6,84
1	5	2	2 ccm M/1	0,2	10	5,51	68,12	37	6,97
1	5	2	2 „ M/1	0,2	60	28,88	68,12	40	7,48
1	5	2	2 „ M/1	0,2	100	41,11	68,12	40	8,0

Mittel: 39

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17°. — Enzym: Frisch (30 : 150; 3 Stunden). — p_H aus Tabelle XXXVIa und Abb. 12 berechnet.

Versuch 31: p_H-Bestimmungen zu Versuch 30.

Tabelle XXXI.

Reaktionszeit in Min.	0	5	10	15	—	45	50	55
p _H	6,84	6,91	6,91	7,03	—	7,33	7,36	7,40

Totalvolumen: 10 ccm. — Reaktionsmasse und Enzym dieselben wie in Versuch 30. — Temperatur: 17°. — Nach 55 Minuten wurde der Wasserstoffgasstrom (von einem Kippesapparat) so unregelmäßig, daß weitere p_H-Bestimmungen vereitelt wurden. In allen folgenden Versuchen ist das Wasserstoffgas einer Bombe entnommen. — Die Werte in Tabelle XXXI sind mitgenommen, weil sie Tabelle XXXIII an wichtigen Punkten ausgezeichneterweise ergänzen.

Versuch 32: Zur Bestimmung der Zeitgleichung V. Harnstoffkonzentration 0,2 M.

Tabelle XXXII. (Abb. 9.)

Enzym ccm	M/1- Phos- phat ccm	N ₂ O ccm	Harnstoff	Harnstoff- konzentration Mol pro Liter	Reak- tions- zeit Min.	NH ₃ mg	Maximum NH ₃ mg	s ±	p _H
1	5	2	—	—	0	—	—	—	6,86
1	5	2	2 ccm M/1	0,2	20	10,54	68,12	37	7,07
1	5	2	2 „ M/1	0,2	60	28,50	68,12	39	7,46
1	5	2	2 „ M/1	0,2	100	40,60	68,12	39	7,92

Mittel: 39

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17°. — Enzym: Frisch (30 : 150; 1½ Stunde).

Versuch 33: p_H-Bestimmungen zu Versuch 32.

Tabelle XXXIII. (Abb. 9.)

Reaktionszeit in Min.	0	6	15	20	25	30	35	40	45
p _H	6,86	6,92	7,02	7,07	7,13	7,17	7,23	7,27	7,34
Reaktionszeit in Min.	55	60	65	70	80	85	90	95	100
p _H	7,41	7,46	7,52	7,56	7,69	7,76	7,82	7,85	7,92

Totalvolumen: 10 ccm. — Reaktionsmasse und Enzym dieselben wie in Versuch 30. — Temperatur: 17°.

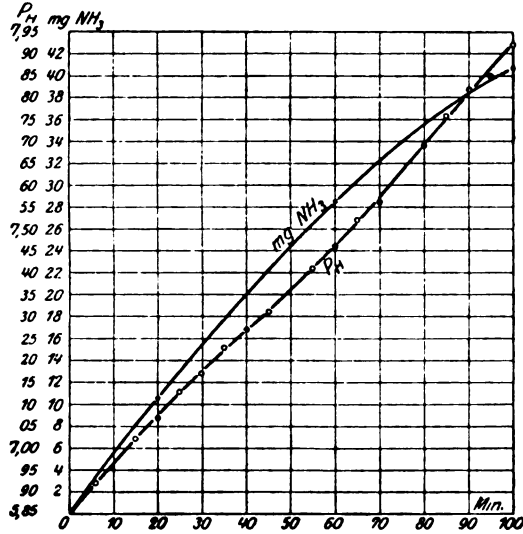


Abb. 9.

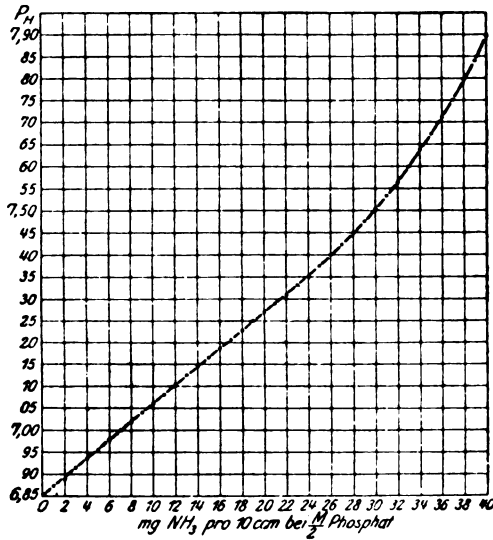


Abb. 10.

Versuch 34: Zur Bestimmung der Zeitgleichung V. Harnstoffkonzentration 0,2 M. 3fache Enzymmenge.

Tabelle XXXIV. (Abb. 11.)

Enzym ccm	M/1- Phos- phat ccm	H ₂ O ccm	Harnstoff	Harnstoff- konzentration Mol pro Liter	Reak- tions- zeit Min.	NH ₃ mg	Maximum NH ₃ mg	sk	p _H
3	5	—	—	—	—	—	—	—	6,64
3	5	—	2 ccm M/1	0,2	12	19,06	68,12	119	7,03
3	5	—	2 „ M/1	0,2	22,2	30,33	68,12	115	7,30
3	5	—	2 „ M/1	0,2	36	39,60	68,12	105	7,78

Mittel: 113

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17°. — Enzym: Frisch
(30 : 150; 2 Stunden). — Phosphatmischung: Neu bereitet (500 ccm
M/1-Na₂HPO₄ + 250 ccm M/1-NaH₂PO₄.)

Versuch 35: p_H-Bestimmungen zu Versuch 34.

Tabelle XXXV. (Abb. 11.)

Reaktionszeit in Min.	0	5	10	12	15	17,8	20	23,5	25	30
p _H	6,64	6,78	6,95	7,02	7,11	7,18	7,25	7,32	7,39	7,56
Reaktionszeit in Min.	38	40	45	50	53	55	60	65	70	∞
p _H	7,80	7,87	8,02	8,15	8,20	8,24	8,31	8,38	8,43	8,65

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17°. — Reaktionsmasse und
Enzym dieselben wie in Versuch 34.

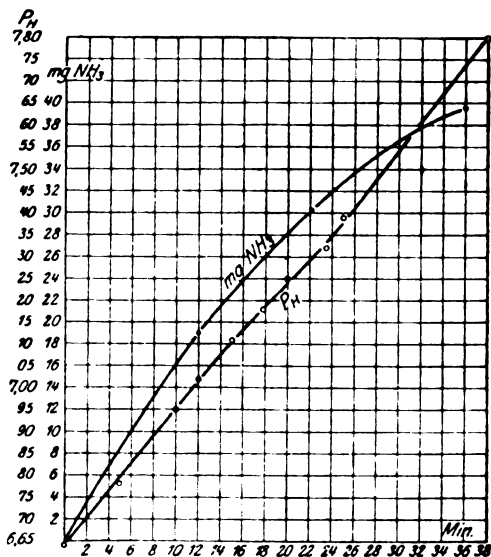


Abb. 11.

Die Anfangswerte auf p_H in den Versuchen 30 und 34 differieren
0,22 Einheiten. Durch Interpolation aus der Kurve in Abb. 11 und Addition
von 0,22 erhalten wir folgende Werte an p_H im Vergleich mit denjenigen
aus Versuch 30 (Abb. 10).

Tabelle XXXVIa. (Abb. 10.)

NH ₃ mg	p _H		NH ₃ mg	p _H		NH ₃ mg	p _H		NH ₃ mg	p _H	
	Vers. 80	Vers. 84		Vers. 80	Vers. 84		Vers. 80	Vers. 84		Vers. 80	Vers. 84
0	6,86	6,86	10	7,06	7,05	20	7,27	7,26	30	7,51	7,51
1	6,88	6,88	11	7,08	7,07	21	7,29	7,29	31	7,54	7,54
2	6,90	6,90	12	7,11	7,09	22	7,31	7,31	32	7,57	7,57
3	6,92	6,92	13	7,13	7,11	23	7,33	7,33	33	7,60	7,61
4	6,94	6,94	14	7,15	7,13	24	7,35	7,36	34	7,64	7,64
5	6,96	6,96	15	7,17	7,15	25	7,38	7,38	35	7,68	7,69
6	6,98	6,97	16	7,19	7,17	26	7,40	7,41	36	7,72	7,74
7	7,00	6,99	17	7,21	7,19	27	7,43	7,44	37	7,76	7,78
8	7,02	7,01	18	7,23	7,22	28	7,45	7,46	38	7,80	7,84
9	7,04	7,03	19	7,25	7,24	29	7,48	7,48	39	7,84	7,90

Die Übereinstimmung ist sehr gut.

61. Diese Tabelle zeigt, daß p_H (von 6,6 bis 7,2) für 1 mg NH₃ um 0,02 wächst. Für höhere p_H ist die Steigerung größer und ist aus den Kurven in Abb. 12 erhältlich, die nach den Bestimmungen in Versuch 36 gezeichnet sind.

Versuch 36: p_H-Steigerung für 1–6 mg NH₃ bei $\frac{1}{2}$ -Phosphat.

Tabelle XXXVIb.

Enzym ccm	M/ ₂ - Phosphat ccm	H ₂ O ccm	Harnstoff 1 1 mg NH ₃ pro ccm ccm	Harnstoff 2 2 mg NH ₃ pro ccm ccm	Reaktions- zeit	p _H			Totales NH ₃ mg
						vor	nach	Diff.	
1	5	3	1	—	105 Min.	7,53	7,57	0,04	1
1	5	1	3	—	120 „	7,53	7,67	0,14	3
1	5	—	4	—	120 „	7,53	7,72	0,19	4
1	5	1	1	2	95 „	7,53	7,77	0,24	5
1	5	—	2	2	120 „	7,53	7,82	0,29	6
1	5	3	1	—	50 „	7,61	7,65	0,04	1
1	5	3	1	—	20 „	7,70	7,76	0,06	1
1	5	3	1	—	45 „	7,74	7,81	0,07	1
1	5	2	2	—	40 „	7,74	7,89	0,15	2
1	5	1	3	—	65 „	7,74	7,98	0,24	3
1	5	2	—	2	85 „	7,74	8,05	0,31	4
1	5	3	1	—	13 „	7,83	7,91	0,08	1
1	5	2	1	1	75 „	7,83	8,12	0,29	3
1	5	2	—	2	105 „	7,83	8,19	0,36	4
1	5	1	1	2	165 „	7,83	8,27	0,44	5
1	5	1	—	3	24 Std.	7,83	8,32	0,49	6
1	5	3	1	—	30 Min.	8,00	8,12	0,12	1
1	5	1	1	2	510 „	8,00	8,48	0,48	5
1	5	—	2	2	540 „	8,00	8,56	0,56	6
1	5	3	1	—	10 „	8,32	8,43	0,11	1
1	5	2	2	—	30 „	8,32	8,55	0,23	2
1	5	1	3	—	60 „	8,32	8,68	0,36	3
1	5	1	1	2	120 „	8,32	8,83	0,51	5
1	5	—	2	2	240 „	8,32	8,91	0,59	6

Tabelle XXXVIb (Fortsetzung).

Enzym ccm	M/1- Phosphat ccm	H ₂ O ccm	Harnstoff 1 1 mg NH ₃ pro ccm ccm	Harnstoff 2 2 mg NH ₃ pro ccm ccm	Reaktions- zeit	p _H			Totales NH ₃ mg
						vor	nach	Dif.	
1	5	3	1	—	30	8,51	8,63	0,12	1
1	5	2	2	—	100	8,51	8,76	0,25	2
1	5	1	3	—	120	8,51	8,89	0,38	3
1	5	1	1	2	570	8,51	9,05	0,54	5
1	5	—	2	2	660	8,51	9,08	0,57	6
1	5	3	1	—	15	8,82	8,96	0,14	1
1	5	3	1	—	20	8,82	8,96	0,14	1
1	5	3	1	—	120	8,82	8,97	0,15	1
1	5	3	—	1	24 Std.	8,82	9,05	0,23	2
1	5	2	1	1	24,5	8,82	9,14	0,32	3
1	5	2	—	2	25	8,82	9,20	0,38	4
1	5	1	—	3	24	8,82	9,32	0,50	6

Enzym: Frisch (10 : 50; 1 Stunde). — p_H wurde in jeder Reihe von Zeit zu Zeit bestimmt, bis sich ein konstantes Potential einstellte. Die Elektrode wurde vor jeder Bestimmung neu platinirt.

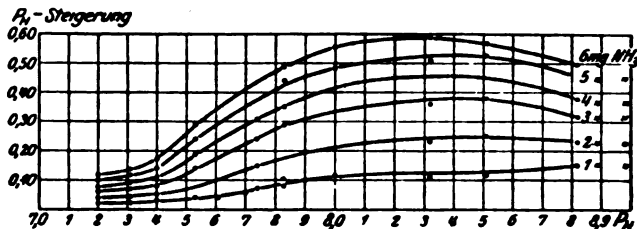


Abb. 12.

62. Der Übersichtlichkeit wegen stelle ich die Ergebnisse der Versuche 27—34 in einer Tabelle zusammen:

Harnstoff- konzentration	a k	a k	p _H Steigerung	a k Mittel	c Mittel
0,00625	11; 11; 13;	steigt	6,86—6,90	reduziert 15	68
0,0125	16; 17; 17;	„	6,86—6,93	21	50
0,025	21; 25; 29;	„	6,86—7,0	31	49
0,05	31; 38; 41;	„	6,86—7,15	37	44
0,1	34; 38; 44; 54;	„	6,86—7,41	43	37
0,1	33; 37; 47;	„	6,86—7,38	39	33
0,2	37; 37; 38; 39;	konstant	6,86—7,47	38	24
0,2	34; 36; 34;	„	6,86—8,10	35	14
0,2	37; 40; 40;	„	6,86—8,0	39	—
0,2	37; 39; 39;	„	6,86—7,92	39	—
0,2	119; 115; 105;	„	6,64—7,78	38	—
1,6	41; 40; 38; 37;	sinkt	6,86—7,64	39	—
1,6	34; 32; 32;	„	6,86—7,23	41	—
1,6	38; 34; 27;	„	6,86—8,50	36	—

Die Tabelle gibt Anlaß zu mehreren Beobachtungen und Schlüssen:

1. Von der Harnstoffkonzentration 0,05 M bis 1,6 M (Verhältnis 1 : 32) zeigen die Mittelwerte an ak gute Übereinstimmung, an c dagegen nicht.

2. Bei 1,6 M Harnstoff sinkt ak stets.

3. Bei 0,2 M Harnstoff zeigt ak eine vorzügliche Konstanz, und ist der Enzymmenge proportional.

4. Bei den niedrigeren Harnstoffkonzentrationen steigt ak . Dies bedeutet, daß die Reaktionskurve zwischen der logarith-

mischen Funktion $t = \frac{a}{k} \log \frac{a}{a-x}$ und einer geraden Linie

$t = p \cdot x$ fällt. Sie könnte daher durch eine Formel von dem

allgemeinen Typus $t = \frac{1}{n} \left(\frac{a'}{k} \log \frac{a}{a-x} + p \cdot a' \cdot x \right)$ ausgedrückt

werden. Van Slyke und, wie ich später gefunden habe, auch

Barendrecht, die obige Beobachtung gemacht haben ohne den

Einfluß der p_H -Steigerung zu berücksichtigen, haben diesen Weg eingeschlagen. So dankbar es mir schien, auf diese Weise eine

neue Formel für die Ureasewirkung aufzustellen — je mehr

Konstanten eine Formel einschließt, um so leichter ist es ja, mit

der Beobachtung Übereinstimmung zu erzielen — so verzichtete

ich doch darauf. Ich glaubte nämlich, zwischen der Steigerung

von ak und derjenigen von p_H eine gewisse Parallelität zu erkennen.

Ich nehme mir die Freiheit, aus meinem Arbeitsjournal folgende

Erörterungen anzuführen: „In meinen früheren Versuchen fand ich bei

niedriger Harnstoffkonzentration eine stark steigende Konstante; bei

mittlerer Konzentration zeigte ak gute Konstanz; bei der höchstmöglichen

Harnstoffkonzentration konnte ich eine fallende Tendenz bemerken. In

allen Fällen steigt p_H mit der Reaktionszeit. Es liegt also nahe daran zu

glauben, daß bei niedriger Konzentration die Reaktion weit stärker von

p_H beeinflußt wird als bei den höheren und weiter, daß nur bei diesen die

Reaktion bei optimalem p_H stattgefunden hatte, d. h. daß die niedrigen

Harnstoffkonzentrationen ein anderes und zwar mehr alkalisches p_H -Opti-

mum haben als die höheren Konzentrationen.“

63. Daß ak bei niedriger Harnstoffkonzentration zu kleine Werte

aufweist, könnte also auf einem ungünstigen p_H beruhen. Damit

gäbe es einen Grund zu der Hoffnung, daß bei optimalem p_H die

Konstante ak auch bei den niedrigsten Harnstoffkonzentrationen

auf dieselbe Höhe steigen würde, wie die Konstanten der übrigen

Harnstoffkonzentrationen.

In Versuch 38 habe ich diese Gedanken einer Prüfung unterworfen. Zuerst mußte ich jedoch die Mischungsverhältnisse der Phosphatlösungen, die zu erwünschtem p_H leiten sollten, feststellen.

Versuch 37: Phosphatgemische.

Tabelle XXXVII.

ccm $M_{1/10}$ - K_2HPO_4	ccm $M_{1/10}$ - KH_2PO_4																									
50	0	1	2	3	4	5	6	7	9	12	16	22	25	0	1	2	3	4	5	6	7	9	12	16	22	25
$p_H =$	9,37	8,73	8,28	8,10	7,94	7,81	7,73	7,64	7,54	7,34	7,15	6,94	6,86	9,37	8,73	8,28	8,10	7,94	7,81	7,73	7,64	7,54	7,34	7,15	6,94	6,86

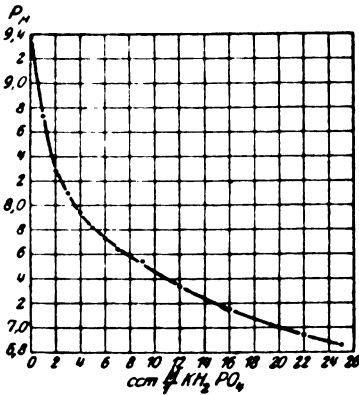


Abb. 18.

Kapitel VII.

p_H -Optimum der Urease als Funktion der Substratkonzentration.

Ich gehe jetzt zu meinen, wie ich ansehe, wichtigsten Versuch über. Bei den 3 charakteristischen Harnstoffkonzentrationen 0,025, 0,2 und 1,6 M (Verhältnis 1 : 8 : 64) variierte ich zweckmäßig p_H und wählte dabei

die Reaktionszeit so kurz, daß eine größere p_H -Steigerung vermieden wurde.

Versuch 38: p_H -Optimum bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen,

Tabelle XXXVIII.

Enzym ccm	$M_{1/10}$ -Phosphat ccm	H_2O ccm	Harnstoff	Harnstoffkonzentration Mol pro Liter	Reaktionszeit Min.	NH_3 mg	Max. NH_3 mg	t	sk	c	p_H		
											vor	nach	Mittel
1	5	—	4 ccm $M_{1/10}$	0,025	10	2,70	8,52	166	20,8	34	6,94	6,98	6,96
1	5	—	4 „ $M_{1/10}$	0,025	10	3,86	8,52	262	32,8	82	7,15	7,23	7,19
1	5	—	4 „ $M_{1/10}$	0,025	10	4,24	8,52	299	37,4	131	7,34	7,44	7,39
1	5	—	4 „ $M_{1/10}$	0,025	10	4,35	8,52	310	38,8	186	7,54	7,75	7,64
1	5	2	2 „ $M_{1/10}$	0,2	10	4,93	68,12	32,7	32,7	46	6,94	7,04	6,99
1	5	2	2 „ $M_{1/10}$	0,2	10	5,36	68,12	35,6	35,6	61	7,15	7,26	7,20
1	5	2	2 „ $M_{1/10}$	0,2	10	5,31	68,12	35,3	35,3	97	7,34	7,48	7,41
1	5	2	2 „ $M_{1/10}$	0,2	10	5,25	68,12	34,9	34,9	—	7,54	7,80	7,67
										d. E.			
1	5	2	2 „ 8 M	1,6	10	5,31	545	4,26	34,1	0,531	6,94	7,04	6,99
1	5	2	2 „ 8 M	1,6	10	5,69	545	4,56	36,5	0,569	7,15	7,26	7,20
1	5	2	2 „ 8 M	1,6	10	5,51	545	4,42	35,4	0,551	7,34	7,48	7,41
1	5	2	2 „ 8 M	1,6	10	5,22	545	4,19	33,5	0,522	7,54	7,80	7,67

Totalvolumen: 10 ccm.
 — Temperatur: 17°. — Enzym: Frisch (30 : 150, 2 Stunden). — p_H vor: observiert.
 — p_H nach: aus Tabelle XXXVI berechnet.

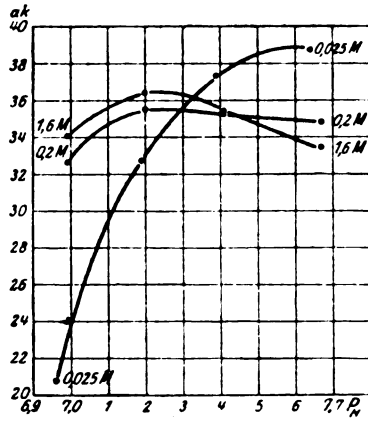


Abb. 14.

Der Versuch erledigte völlig meine Erwartungen. Man sieht:

1. Daß ak bei der kleinsten und der größten Harnstoffkonzentration stärker von p_H abhängig ist als bei der mittleren;
2. daß verschiedene Harnstoffkonzentrationen verschiedene p_H -Optima haben;
3. daß bei resp. p_H -Optimum ak in allen 3 Reihen zu derselben Höhe steigt (36—39).

64. Mit diesem Versuch war ein Weg in ein ganz neues Gebiet geöffnet. Es galt dann zunächst, die Lage der p_H -Optima bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen genau festzustellen.

Versuch 39: p_H -Optimum bei 0,00625 M. Harnstoff.

Tabelle XXXIX.

Enzym ccm	M/1- Phosphat ccm	H ₂ O ccm	Harnstoff	Harnstoffkonzentration Mol pro Liter	Reaktionszeit Min.	NH ₃ mg	Maximum NH ₃ mg	t	a · k	p_H			sk red.
										vor	nach	Mittel	
1	5	3	1 ccm $\frac{M}{16}$	0,00625	2	0,42	2,13	477	15	6,86	6,87	6,86	33
1	5	3	1 „ $\frac{M}{16}$	0,00625	2	0,67	2,13	820	26	7,15	7,17	7,16	58
1	5	3	1 „ $\frac{M}{16}$	0,00625	2	0,87	2,13	1142	36	7,44	7,46	7,45	80
1	5	3	1 „ $\frac{M}{16}$	0,00625	2	1,03	2,13	1435	45	7,73	7,80	7,76	100
1	5	3	1 „ $\frac{M}{16}$	0,00625	2	0,96	2,13	1301	41	7,94	8,04	7,99	91
1	5	3	1 „ $\frac{M}{16}$	0,00625	2	0,94	2,13	1265	39,5	8,10	8,22	8,16	88
1	5	3	1 „ $\frac{M}{16}$	0,00625	2	0,87	2,13	1142	36	8,30	8,42	8,36	80
1	5	3	1 „ $\frac{M}{16}$	0,00625	2	0,67	2,13	820	26	8,70	8,78	8,74	58
1	5	2	2 „ $\frac{M}{1}$	0,2	2	1,36	68,12	44	44	7,15	7,18	7,16	98
1	5	2	2 „ 8 M	1,6	2	1,50	545	6	48	7,15	7,18	7,16	107

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 18°. — Enzym: Frisch (30 : 150; 2 Stunden) — Wegen der kurzen Reaktionszeit und der Kleinheit der zu bestimmenden Ammoniakmengen sind die Versuchsfehler ziemlich groß.

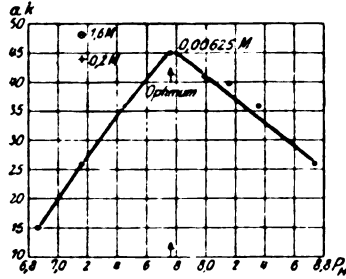


Abb. 15. Resultat: p_H -Optimum bei 0,00625 Mol Harnstoff ist etwa 7,76.

Versuch 40: p_H -Optimum bei 0,0125 M. Harnstoff.

Tabelle XL.

Enzym ccm	$M_{1/2}$ Phosphat ccm	H_2O ccm	Harnstoff	Harnstoffkonzentration Mol pro Liter	Reaktionszeit Min.	NH_3 mg	Maximum NH_3 mg	t	ak	p_H			ak red.
										vor	nach	Mittel	
1	5	2	2 ccm $M/16$	0,0125	5	1,45	4,26	361	23	6,86	6,89	6,87	55
1	5	2	2 " $M/16$	0,0125	5	1,87	4,26	502	31	7,15	7,19	7,17	74
1	5	2	2 " $M/16$	0,0125	5	2,21	4,26	635	40	7,54	7,62	7,58	95
1	5	2	2 " $M/16$	0,0125	5	2,30	4,26	674	42	7,64	7,76	7,70	100
1	5	2	2 " $M/16$	0,0125	5	2,21	4,26	635	40	7,73	7,91	7,82	95
1	5	2	2 " 8 M	1,6	5	3,28	545	5,3	42	7,15	7,22	7,19	100

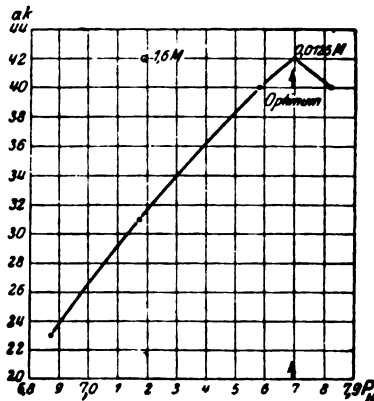


Abb. 16. Resultat: Für 0,0125 Mol Harnstoff liegt das p_H -Optimum etwa bei 7,69.

Versuch 41: p_H -Optimum bei 0,05 M. Harnstoff.

Tabelle XLI.

Enzym ccm	M _{1/2} - Phosphat ccm	H ₂ O ccm	Harnstoff	Harnstoff- konzentration Mol pro Liter	Reak- tions- zeit Min.	NH ₃ mg	Maxi- mum NH ₃ mg	k	s · k	P _H			s k red.
										vor	nach	Mittel	
1	5	2	2 ccm M _{1/4}	0,05	8	2,88	17,03	101	25	6,86	6,92	6,89	68
1	5	2	2 „ M _{1/4}	0,05	8	3,15	17,03	111	27,8	6,94	7,00	6,97	76
1	5	2	2 „ M _{1/4}	0,05	8	3,66	17,03	131	32,8	7,15	7,20	7,18	89
1	5	2	2 „ M _{1/4}	0,05	8	3,95	17,03	143	36	7,34	7,44	7,39	97
1	5	2	2 „ M _{1/4}	0,05	8	4,0	17,03	147	37	7,54	7,74	7,64	100
1	5	2	2 „ M _{1/4}	0,05	8	3,82	17,03	138	34,5	7,73	8,01	7,87	95
1	5	2	2 „ M _{1/4}	0,05	8	3,55	17,03	127	31,8	7,94	8,30	8,12	86
1	5	2	2 „ M _{1/4}	0,05	8	3,28	17,03	116	29	8,10	8,46	8,28	78
1	5	2	2 „ M _{1/4}	0,05	8	2,90	17,03	101	25	8,30	8,66	8,48	68
1	5	2	2 „ M _{1/4}	0,05	8	2,14	17,03	74	19	8,70	8,94	8,82	52
1	5	2	2 „ M _{1/1}	0,2	8	4,24	68,12	36	36	7,15	7,23	7,19	97
1	5	2	2 „ 8M	1,6	8	4,73	545	4,75	38	7,15	7,24	7,19	103

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 18°. — Enzym: Frisch
(30 : 150; 1 1/2 Stunde).

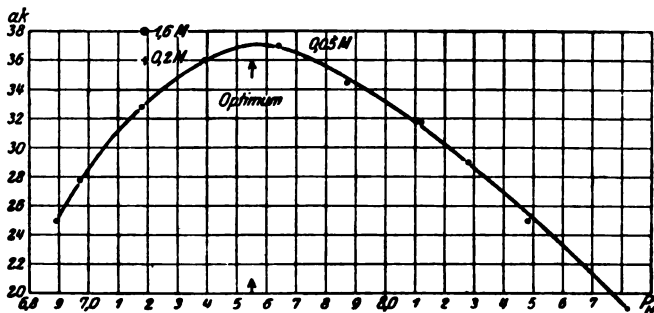
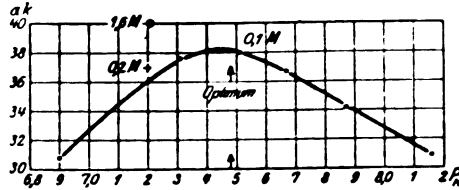


Abb. 17. Resultat: Für 0,05 Mol Harnstoff liegt das p_H -Optimum etwa bei 7,55.

Versuch 42: p_H -Optimum bei 0,1 M. Harnstoff.

Tabelle XLII.

Enzym ccm	M _{1/2} - Phosphat ccm	H ₂ O ccm	Harnstoff	Harnstoff- konzentration Mol pro Liter	Reak- tions- zeit Min.	NH ₃ mg	Maxi- mum NH ₃ mg	k	s k	P _H			s k red.
										vor	nach	Mittel	
1	5	—	4 ccm M _{1/4}	0,1	10	4,51	34,06	62	30,8	6,86	6,95	6,90	81
1	5	—	4 „ M _{1/4}	0,1	10	5,42	34,06	75	37,6	7,25	7,36	7,31	99
1	5	—	4 „ M _{1/4}	0,1	10	5,47	34,06	76	38	7,44	7,58	7,51	100
1	5	—	4 „ M _{1/4}	0,1	10	5,29	34,06	73	36,7	7,54	7,80	7,67	94
1	5	—	4 „ M _{1/4}	0,1	10	4,96	34,06	68	34,2	7,73	8,01	7,87	90
1	5	—	4 „ M _{1/4}	0,1	10	4,53	34,06	62	31	7,94	8,28	8,16	81
1	5	2	2 „ M _{1/1}	0,2	10	5,54	68,12	37	37	7,15	7,26	7,20	97
1	5	2	2 „ 8M	1,6	10	6,18	545	5	40	7,15	7,27	7,21	105



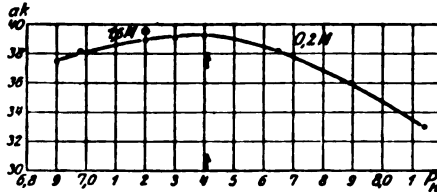
Totalvolumen:
10 ccm. — Tem-
peratur: 18,5°. —
Enzym: Frisch
(30 : 150; 2 Stun-
den).

Abb. 18. Resultat: Für 0,1 Mol Harnstoff liegt das p_H -Optimum etwa bei 7,4.

Versuch 43: p_H -Optimum bei 0,2 M. Harnstoff.

Tabelle XLIII.

En- sym ccm	M/ ₁ - Phos- phat ccm	H ₂ O ccm.	Harnstoff	Harnstoff- konzentration Mol pro Liter	Reak- tions- zeit Min.	NH ₃ mg	Maxi- mum NH ₃ mg	k	s · k	p _H			s · k red.
										vor	nach	Mittel	
1	5	2	2 ccm M/ ₁	0,2	8	4,55	68,12	37,5	37,5	6,86	6,95	6,90	95
1	5	2	2 „ M/ ₁	0,2	8	4,62	68,12	38,2	38,2	6,94	7,03	6,98	97
1	5	2	2 „ M/ ₁	0,2	8	4,71	68,12	38,9	38,9	7,15	7,24	7,20	99
1	5	2	2 „ M/ ₁	0,2	8	4,73	68,12	39,1	39,1	7,25	7,34	7,30	99.5
1	5	2	2 „ M/ ₁	0,2	8	4,76	68,12	39,3	39,3	7,34	7,45	7,40	100
1	5	2	2 „ M/ ₁	0,2	8	4,62	68,12	38,2	38,2	7,54	7,76	7,65	97
1	5	2	2 „ M/ ₁	0,2	8	4,40	68,12	36	36	7,73	8,05	7,89	92
1	5	2	2 „ M/ ₁	0,2	8	4,00	68,12	33	33	7,94	8,34	8,14	84
1	5	2	2 „ 8 M.	1,6	8	4,93	545	4,95	39,6	7,15	7,25	7,20	101



Totalvolumen: 10 ccm.
— Temperatur: 18,5°. —
Enzym: Frisch (130 : 150;
1 3/4 Stunden).

Abb. 19. Resultat: Für 0,2 Mol Harnstoff liegt das p_H -Optimum etwa bei 7,4. Bei dieser Konzentration ist die Empfindlichkeit gegen p_H -Variationen besonders klein.

Versuch 44: p_H -Optimum bei 0,4 M. Harnstoff.

Tabelle XLIV.

En- sym ccm	M/ ₁ - Phos- phat ccm	H ₂ O ccm	Harnstoff	Harnstoff- konzentration Mol pro Liter	Reak- tions- zeit Min.	NH ₃ mg	Maxi- mum NH ₃ mg	k	s · k	p _H			s · k red.
										vor	nach	Mittel	
1	5	3	1 ccm 4 M.	0,4	8	4,09	136,24	16,5	33,0	6,86	6,94	6,90	90
1	5	3	1 „ 4 „	0,4	8	4,22	136,24	17,1	34,2	6,94	7,02	6,98	93
1	5	3	1 „ 4 „	0,4	8	4,45	136,24	18	36,0	7,15	7,24	7,20	98
1	5	3	1 „ 4 „	0,4	8	4,51	136,24	18,3	36,6	7,25	7,35	7,30	100
1	5	3	1 „ 4 „	0,4	8	4,51	136,24	18,3	36,6	7,34	7,45	7,40	100
1	5	3	1 „ 4 „	0,4	8	4,49	136,24	18,2	36,4	7,44	7,58	7,51	99
1	5	3	1 „ 4 „	0,4	8	4,33	136,24	17,6	35,2	7,54	7,74	7,64	96
1	5	3	1 „ 4 „	0,4	8	3,75	136,24	15,1	30,2	7,94	8,32	8,13	82

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17,5°. — Enzym: Frisch
(30 : 150; 2 Stunden).

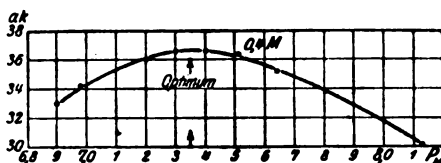


Abb. 20. Resultat: Für 0,4 Mol Harnstoff liegt das p_H -Optimum etwa bei 7,35.

Versuch 45: p_H -Optimum bei 0,8 M. Harnstoff.

Tabelle XLV.

Enzym ccm	M ₁ - Phosphat ccm	H ₂ O bcm	Harnstoff 4 M	Harnstoff- konzentration Mol pro Liter	Reaktions- zeit Min.	NH ₃ mg	Maxi- mum NH ₃ mg	k	sk	p _H			sk red.
										vor	nach	Mittel	
1	5	2	2 ccm 4 M	0,8	8	4,46	272,48	8,98	35,9	6,86	6,95	6,90	92
1	5	2	2 „ 4 M	0,8	8	4,53	272,48	9,1	36,4	6,94	7,03	6,98	93
1	5	2	2 „ 4 M	0,8	8	4,66	272,48	9,4	37,5	7,05	7,15	7,10	96
1	5	2	2 „ 4 M	0,8	8	4,69	272,78	9,64	38,6	7,15	7,25	7,20	99
1	5	2	2 „ 4 M	0,8	8	4,73	272,48	9,7	38,9	7,25	7,35	7,30	100
1	5	2	2 „ 4 M	0,8	8	4,73	272,48	9,7	38,9	7,34	7,45	7,40	100
1	5	2	2 „ 4 M	0,8	8	4,53	272,48	9,1	36,4	7,44	7,59	7,52	93
1	5	2	2 „ 4 M	0,8	8	4,51	272,48	9,0	36,4	7,54	7,76	7,65	93
1	5	2	2 „ 4 M	0,8	8	4,22	272,48	8,5	33,9	7,64	7,90	7,77	87
1	5	2	2 „ 4 M	0,8	8	3,77	272,48	7,6	30,4	7,94	8,32	8,13	78

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17,5°. — Enzym: Frisch
(30 : 150; 2 Stunden).

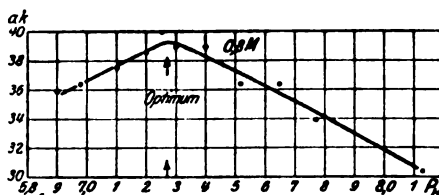


Abb. 21. Resultat: Für 0,8 Mol Harnstoff liegt das p_H -Optimum etwa bei 7,27.

Kapitel VIII.

Neue Formel für die Anfangsgeschwindigkeiten bei resp. p_H -Optimum.

65. In allen diesen Versuchen fällt ak — für die Anfangsgeschwindigkeiten bei Harnstoffkonzentrationen von 0,00625 M bis 1,6 M (Verhältnis 1 : 256) unter optimalen p_H -Bedingungen — in demselben Gebiete. Wie ausgezeichnet die Konstanz von ak ist, zeigt mehr direkt folgender Versuch, der eine genaue Wiederholung von Versuch 22 darstellt, mit dem Unterschied, daß hier in jeder Reihe die Reaktion bei resp. p_H -Optimum fortgehen dürfte.

Versuch 46: Verschiedene Harnstoffkonzentrationen bei resp. p_H -Optimum.

Tabelle XLVI.

Enzym ccm	Phosphat ccm	H ₂ O ccm	Harnstoff	Harnstoffkonzentration Mol pro Liter	Reaktionszeit Min	NH ₃ mg	Maximum NH ₃ mg	t	sk	p_H			p_H - Optimum
										vor	nach	Mittel	
1	5	3	1 ccm $\frac{M}{16}$	0,00625	1,9	0,76	2,13	1010	(32)*	7,81	7,88	7,84	7,76
1	5	2	2 „ $\frac{M}{16}$	0,0125	4	1,70	4,26	553	35	7,64	7,72	7,68	7,69
1	5	—	4 „ $\frac{M}{16}$	0,025	8	3,53	8,52	290	36	7,54	7,70	7,62	7,62
1	5	2	2 „ $\frac{M}{4}$	0,05	8	3,86	17,03	139	35	7,44	7,56	7,50	7,55
1	5	—	4 „ $\frac{M}{4}$	0,1	8	4,13	34,06	70	35	7,44	7,57	7,50	7,48
1	5	2	2 „ $\frac{M}{1}$	0,2	8	4,24	68,12	35	35	7,34	7,44	7,39	7,41
1	5	3	1 „ 4 M	0,4	8	4,33	136,24	17,5	35	7,25	7,34	7,30	7,35
1	5	2	2 „ 4 M	0,8	8	4,40	272,48	8,8	35	7,25	7,35	7,30	7,27
1	5	—	4 „ 4 M	1,6	8	4,46	545	4,4	35,5	7,15	7,25	7,20	7,20

*) Die Reaktion fand hier, wie ersichtlich, nicht beim p_H -Optimum statt.

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17°. — Enzym: Frisch (30 : 150; 2 Stunden).

Aus den Versuchen 38—46 ziehe ich folgende Schlüsse:

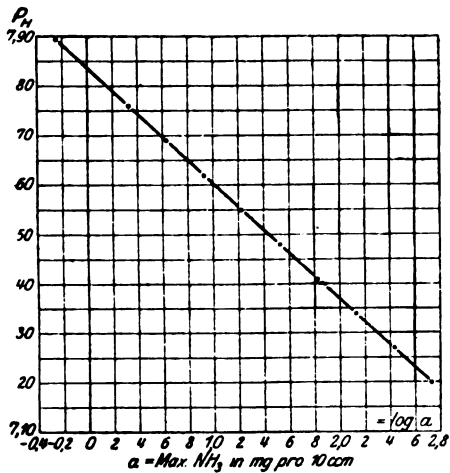
1. Die für die Enzymwirkung günstigste Wasserstoffionenkonzentration ist bei der Sojaurease nicht von der Substratmenge unabhängig, sondern jede Harnstoffkonzentration hat (bei im übrigen unveränderten Verhältnissen) ihr besonderes p_H -Optimum. Hierbei handelt es sich nicht um unbedeutende Unterschiede. Denn die p_H -Optima liegen fast über einer ganzen p_H -Einheit verstreut.

Tabelle XLVIa.

Harnstoffkonzentration Mol pro Liter	Max. NH ₃ pro 10 ccm mg	log s	p_H -Optimum zwischen	Wahrscheinlicher Optimalpunkt
0,00167	0,57	— 0,25		7,90*)
0,00625	2,13	0,33	7,74—7,78	7,76
0,0125	4,26	0,63	7,66—7,72	7,69
0,025	8,52	0,93	7,55—7,65	7,62
0,05	17,03	1,23	7,50—7,60	7,55
0,1	34,06	1,53	7,40—7,50	7,48
0,2	68,12	1,83	7,30—7,50	7,41
0,4	136,24	2,13	7,30—7,40	7,35
0,8	272,48	2,44	7,25—7,35	7,27
1,6	545	2,74	7,15—7,25	7,20

*) Dieser Punkt ist aus Versuchen von Barendrecht⁹⁾ von mir berechnet.

Aus dem geradlinigen Verlauf der Kurve in Abb. 22 sieht man, daß die Wasserstoffionenkonzentration der Optimalpunkte sich der Harnstoffkonzentration annäherungsweise proportional verschiebt. Dies bedeutet, daß selbst während der Reaktion in Zusammenhang mit der Erniedrigung der Substratkonzentration eine Verschiebung in der Lage des p_H -Optimums eintritt.

Abb. 22. p_H -Optima.

Berechnet man von diesem Gesichtspunkt z. B. den Versuch 29 E_2 nach der Formel $k = \frac{a-x}{t} \log \frac{a}{a-x}$, so erhält man die Reihe 65; 72; 67, oder auf p_H -Optimum und die Einheitskonzentration reduziert: 39; 36; 35.

2. Auch die p_H -Empfindlichkeit der Urease ist im Optimumbereiche von der Substratkonzentration abhängig. Bei der mittleren Harnstoffkonzentration 0,2 M weist sie ein Minimum auf. Die zugehörige Kurve ist so flach, daß eine Steigerung in p_H von 6,8 bis 7,9 nur eine Veränderung in ak von 37 (über 39) bis 36 (d. h. 3 Einheiten) mit sich führt. Dies erklärt die gute Konstanz von ak in den Versuchen 27 F_1 , 29 F_2 , 30, 32 u. 34.

In meinen früheren Versuchen hatte ich rein zufälligerweise diese Harnstoffkonzentration (0,2 M) als Einheit gewählt. Nach dem Obigen hat diese Wahl nunmehr eine innere Berechtigung.

3. Die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit ist unter optimalen p_H -Bedingungen von der Harnstoffkonzentration in einem Grade abhängig, der der Formel $k = \frac{a}{t} \log \frac{a}{a-x}$ genau entspricht. Damit ist nicht gesagt, daß diese Formel für den ganzen Reaktionsverlauf gültig ist. Vielmehr ist sie als ein Spezialfall einer mehr umfassenden Gleichung anzusehen.

Literatur.

- ¹⁾ Annet, Urease in Soja, Canavalia, Ricinus usw. *Biochemical Journ.* **8**, 449–52. 1914. — ²⁾ Armstrong und Horton, Selektivität. Hemmung durch NH_3 . Beschleunigung durch CO_2 . Theorie der Hydratation. *Proc. Roy. Soc. Lond.* **85**, 109–27. 1912. — ³⁾ Armstrong, Benjamin, und Horton, Einfluß fremder Stoffe. Rk nicht monomolekular. *Proc. Roy. Soc. Lond.* **86**, 328–43. 1913. — ⁴⁾ Armstrong, E. F. u. H. E., Versuche mit Sojaurease und Phosphat. *Proc. Roy. Soc. Lond.* **86**, 578–79. 1913. — ⁵⁾ Aubel und Colin, kein Einfluß von Glucose auf Bakt.-Urease. *Compt. rend. de la soc. de biol.* **78**, 174–75. 1915. — ⁶⁾ Bahlmann, Mikromethode z. U-Bestimmung in Blut mittelst Sojaurease, Durchlüftung, direkter Neasslerisation. *Ned. Tijdschr. v. Geneesk.* **64** (I), 473–73. 1920. — ⁷⁾ Barendrecht, Strahlungstheorie f. Enzyme der Bisaccharide. *Zeitschr. f. physikal. Chemie* **40**, 456. 1904. — ⁸⁾ Barendrecht, Strahlungstheorie für Enzyme der Bisaccharide. *Biochemical Journ.* **7**, 559. 1913. — ⁹⁾ Barendrecht, Wirkungsweise der Sojaurease. *Ekvation. Recueil de travaux chim. des Pays-Bas* **39**, 2–87. 1920. — ¹⁰⁾ Bayliss, Alkoholbehandlung der Sojaurease. *Journ. of physiol.* **50**, 85–87. 1915/16. — ¹¹⁾ Bayliss, Oberflächenspannung vermindernde Stoffe wie Saponin hemmen die Urease-wirkung. *Arch. Nierl. Phys.* **2**. 1918. — ¹²⁾ Berthelot und André, U-Spaltung durch Erwärmen, Säuren, Alkalien. *Compt. rend.* **103**, 1052–53. 1886. — ¹³⁾ Berthelot und Petit, Wärmentwicklung bei U-Spaltung 6,4–8 Cal. *Ann. de Chim. et de Phys. Ser. 6* **20**, 13–20. 1890. — ¹⁴⁾ Beijerinck, Anhäufungsversuche mit Ureumbakterien. *Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.* **7** (II), 33–61. 1901. — ¹⁵⁾ Beijerinck, *Arch. Néerl. sc. ex. et nat.* **7** (II), 28. 1902. — ¹⁶⁾ Beijerinck, Moma Bohnen keine Sojabohnen. *Chem. Weekblad* 1916, S. 285. — ¹⁷⁾ Bocorny, Harnstoff als C- und N-Quelle für grüne Pflanzen. *Arch. f. d. ges. Physiol.* **172**, 466–96. 1918. — ¹⁸⁾ Boerhave, *Elementa Chimiae II* 1732, S. 329, Lugdanum, *Elementa Chimiae II* 1732, S. 286, Lipsiae. — ¹⁹⁾ Bous-singault, Durchlüftungsprinzip bei NH_3 -Bestimmung. *Journ. f. prakt. Chemie* **51**, 281. 1850. — ²⁰⁾ Bous-singault, Vakuumdestillation bei NH_3 -Bestimmung. *Ann. chim. phys. Ser. 3* **29**, 479. — ²¹⁾ Brodmeier, Proteus zersetzt U energisch. *Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.* **16** (I), 380–91. 1895. — ²²⁾ Burchard, Mg-Phosphat als Accelerator. *Arch. f. Hyg.* **36**, 264–84. 1899. — ²³⁾ Burri, Eine Urobakterienart (von 5) anaerob. *Chem.-Ztg.* **36**, 841. 1912. — ²⁴⁾ Cambier, Urobacillus Schützenbergii. *Ann. de Micrograph.* **5**, 323. 1893. — ²⁵⁾ Camerer, Jr., U-Bestimmung im Harn nach verschiedenen Methoden. *Zeitsch. f. Biol.* **36**, 236–90. 1899. — ²⁶⁾ Carnot und Gerard, Toxische Wirkungen der Sojaurease. *Compt. rend. de la soc. de biol.* **82**, 391–96. 1919. — ²⁷⁾ Carnot und Gerard: Ursache: Anhäufung von NH_3 im Leber. *Compt. rend* **169**, 88–90. 1919. — ²⁸⁾ Cazeneuve und Livon, Harn-gärung in der verschlossenen Blase vom Hunde. *Compt. rend.* **85**, 571–74. 1877. — ²⁹⁾ Chattaway, Historisches über Harnstoff. *Chem. News* **99**, 121–23. 1909. — ³⁰⁾ Christensen, Vorläufige Mitteilung über Humusstoffe als

- C-Nahrung. *Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.* **24** (II), 130. 1909. — ²¹⁾ Christensen, Natürliche und künstliche Humusstoffe als C-Nahrung für Uromikroben. *Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.* **27** (II), 336—62. 1910. — ²²⁾ Cohn, *Micrococc. Urease als Namen des Ureferments.* *Beitr. z. Biol. d. Pfl.* **I**, 1872, S. 158—60. — ²³⁾ Czapek, Allgemeines über die Urobakterien und die Urease. *Biochem. d. Pflanz.* **2**, S. 169—71. 1920. — ²⁴⁾ Dox, Urease in *Penicillium Camemberti*. *Journ. of Biolog. Chem.* **6**, 463, 466. 1909. — ²⁵⁾ Dox, Ureasegehalt in frischen Sojabohnen konstant. *Amer. Journ. of Pharm.* **92**, 153—157. 1920. — ²⁶⁾ Düggeli, U-spaltende Pilze. Ein Vortrag. *Naturw. Wochenschr.* **14**, 305—15. 1915. — ²⁷⁾ Dumas Formel des Harnstoffs: $C^4O^2 + \frac{H^4Az^2}{H^4Az^2}$. *Ann. chim. phys. Ser. 2* **44**, 273—78. 1830. — ²⁸⁾ Eigenberger, Gesellschafts Methode schlecht, Marshalls gut. *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **93**, 370—77. 1914/15. — ²⁹⁾ Escales und Köpke, Vakuum-Destill. von U bei 160—190° gibt Am-cyanat. *Chem.-Ztg.* **35**, 595. 1911. — ⁴⁰⁾ Euler und Brandting, Kritik über Groll. Eigene Versuche geben keinerlei Anhaltspunkte für eine Periodizität in der Wirksamkeit der Ureaselösung. *Biochem. Zeitschr.* **97**, 113—22. 1919. — ⁴¹⁾ Falk, Margarethe, Auxoureaesen im Bluteserum. Kreisende Urease nach Injektion. *Diese Zeitschr.* **59**, 298—325. 1914. — ⁴²⁾ Falk und Seguiras, Urease in der Castorbohne (*Ricinus*). *Journ. Chem. Soc.* **35**, 292—94. 1914. — ⁴³⁾ Falk und Segiura, Einfluß von Säuren, Alkalien und Salzen auf *Ricinusurease*. *Journ. Chem. Soc.* **36**, 2166—70. 1914. — ⁴⁴⁾ Falk, Kritik über van Slykes Theorie der Enzymwirkung. *Journ. of Biolog. Chem.* **28**, 389—90. 1917. — ⁴⁵⁾ Fawsitt, Die Rk-U → Am-cyanat bei 100° monomolekular. *Zeitschr. f. physikal. Chemie* **41**, 601. 1902. — ⁴⁶⁾ Fiske, Verbess. von Marshall-van Slykes Methode. *Journ. of Biolog. Chem.* **23**, 455—58. 1915. — ⁴⁷⁾ Flügge, *Micrococcus Urease liquefaciens*. *Die Mikroorganismen* **2**, S. 172—73. 1896. — ⁴⁸⁾ Folin, Neue Methode zur NH_3 -Bestimmung (durch Auslüftung). *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **37**, 161—76. 1902/03. — ⁴⁹⁾ Folin und Youngburg, U-Bestimmung mittelst Jackbohnenurease. *Direkte Nesslerisation.* *Journ. of Biolog. Chem.* **38**, 111—12. 1919. — ⁵⁰⁾ Fosse, Harnstoff und Urease gleichzeitig in *Aspergillus niger* und Weizenkeimlingen. *Compt. rend.* **158**, 1374—76. 1914. — ⁵¹⁾ Fosse, Urease in verschiedenen Pflanzen. *Compt. rend. de la soc. de biol.* **77**, 129—131. 1914. — ⁵²⁾ Fourcroy und Vauquelin, $\frac{19}{20}$ der Substanzen im Harn ist ein neuer besonderer Stoff „urée“. *Ann. de Chim.* **31**, 48—71. 1899. — ⁵³⁾ Fourcroy und Vauquelin, Die Eigenschaften der neuen Substanz. *Ann. de Chim.* **32**, 80—162. 1800. — ⁵⁴⁾ Frankland, Die Mikroorganismen sind Tiere. *Chem. News* **51**, 78—79. 1885. — ⁵⁵⁾ Frankland, Bei Harngärung nimmt org. C und N ab, NH_3 zu. *Journ. Chem. Soc. Lond.* **47**, 159—83. 1885. — ⁵⁶⁾ Geilinger, 4 (von 12) Stämmen Urobakterien anaerob. *Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.* **47** (II), 245—301. 1916/17. — ⁵⁷⁾ Gesellschaft, Marshalls Methode gut. Zucker und Eiweiß stören nicht. *Ned. Tijdschr. v. Geneesk.* **49** (II), 661—67. 1913. — ⁵⁸⁾ Gesellschaft, Referat der überstehenden Abhandlung. *Zentralbl. f. d. ges. inn. Med.* **35** (I), 637. 1914. — ⁵⁹⁾ Golding Bird, Urinary deposits § 354, S. 398.

- 1851—57. — ⁶⁰) Graaff und Zande, Kritik über Mom. Urease in Sojabohnen. Chem. Weekbl. **13**, 258—64. 1916. — ⁶¹) Grigaut und Guérin, Verbess. von Folin-Denis Methode mit Nesslerisation. Compt. rend. de la soc. de biol. **83**, 25—27. 1919. — ⁶²) Groll, Urease größtenteils im Kerne der Sojabohne. Chem. Weekbl. **13**, 254—55, 333. 1916. — ⁶³) Groll, Periodische Schwankungen in der Aktivität bei Aufbewahrung von Ureaselösungen. Kolloid-Zeitschr. **21**, 138—48. 1917. — ⁶⁴) Groll, Periodische Schwankungen in der Aktivität bei Aufbewahrung von Ureaselösungen. Arch. Néerl. de physiol. **1**, 3. livr., S. 403—24. 1917. — ⁶⁵) Groll, Einwirkung von Kationen und Anionen auf Sojaurease. Kon. Ak. v. Wetensch. Amsterdam. Proc. **20**, Nr. 4, S. 559—65. 1917. — ⁶⁶) Guiard, Einführen von Pilzen in die gesunde Blase erzeugt keine Harngärung. Etud. clin. u. exp. sur la transf. des urines. Thèse Paris 1883, S. 53. — ⁶⁷) Hahn und Saphra, Einfache Methode zur U-Bestimmung mit Ureasetrockenpräparaten. Dtsch. med. Wochenschr. **40**, 430—31. 1914. — ⁶⁸) Hahn, U-Bestimmung mit Urease. Dir. jodom. Titration. Dtsch. med. Wochenschr. **41**, 134—36. 1915. — ⁶⁹) Hahn, Antwort zu Horváth und Kadletz. Dtsch. med. Wochenschr. **45**, 911—12. 1919. — ⁷⁰) Hahn, Bemerkungen zu den Arbeiten von Wester und Pin Yin Yi. Ber. d. Deutsch. pharm. Ges. **30**, 329. 1920. — ⁷¹) Hankel, Alkalität des Harns bei Rückenmarkskrankheiten. Med. Zeitschr. v. Ver. f. Heilk. in Pr. **19**, 1834. — ⁷²) Hankel, Referat der überst. Abhandlung. Schmidts Jahrbuch **3**, 1. — ⁷³) van Helmont, Über die Harngärung. Opusc. medic. inaudita I de Lithiasi § 22, S. 27, Francof. 1682. — ⁷⁴) Henri, Theorie und Verlauf der Enzymwirkungen. Zeitschr. f. phys. Chemie **39**, 194. 1901. — ⁷⁵) Henry, Darstellung von U aus dem Harn. Journ. of Pharm. **15**, 161. 1829. — ⁷⁶) Hepburn und Bazzoni, 100 Stunden in flüssiger Luft schadet Urease nur wenig. J. Frankl. Inst. **180**, 603—05. 1915. — ⁷⁷) Hofmeister, Proteus vulgaris spaltet U. Fortschr. d. Med. **10**, 904, 960. 1892. — ⁷⁸) Horowitz, 24 Bakterienarten, u. a. Proteus, spalten Urea. Ann. de l'inst. Pasteur **30**, 307—18. 1916. — ⁷⁹) Horváth und Kadletz, Hahns Methode schlecht. Abänderung derselben. Dtsch. med. Wochenschr. **42**, 414—16. 1916. — ⁸⁰) Jacoby und Umeda, Einwirkung von Serum und Aminosäuren auf Ureasen. Diese Zeitschr. **68**, 23—47. 1915. — ⁸¹) Jacoby und Sugga, Darstellung von Ureasetrockenpräparaten durch Alkoholfällung und durch Eintrocknen. Diese Zeitschr. **69**, 116—27. 1915. — ⁸²) Jacoby, Absorption der Sojaurease durch Fibrinlocken. Fermentimmunität. Auxowirkung von Aminosäuren und Serum. Diese Zeitschr. **74**, 93—122. 1916. — ⁸³) Jacoby, Einwirkung von HgCl₂, KCN und NiO auf Soja- und Bakterienurease. Reaktivierung. Diese Zeitschr. **76**, 275—96. 1916. — ⁸⁴) Jacoby, Die Natur der Auxosubstanzen im Serum. Fermentbildung und Fermentwirkung. Diese Zeitschr. **77**, 402—07. 1916. — ⁸⁵) Jacoby, Fermentbildung bei Urobakterien Einfluß verschiedener Substanzen. Diese Zeitschr. **79**, 35—50. 1917. — ⁸⁶) Jacoby, Fermentbildung. Diese Zeitschr. **80**, 357—63. 1917. — ⁸⁷) Jacoby, Fermentbildung. Diese Zeitschr. **81**, 332—41. 1917. — ⁸⁸) Jacoby, Fermentbildung. Diese Zeitschr. **83**, 74—80. 1917. — ⁸⁹) Jacoby, Trockenpräparate aus Urobakterien. Diese Zeitschr. **84**,

354—58. 1917. — ⁹⁰) Jacoby, Aldehyde schaden Sojaurease. Diese Zeitschr. **85**, 358—64. 1918. — ⁹¹) Jacoby, Fermentbildung bei Proteus und Bact. Coli. Diese Zeitschr. **86**, 320—36. 1918. — ⁹²) Jacoby, Über künstliche Zymogene. Diese Zeitschr. **104**, 316—22. 1920. — ⁹³) von Jaksch, Nährboden. Verschiedene Pilzstadien. Zeitschr. f. physiol. Chemie **5**, 395—421. 1881. — ⁹⁴) Jansen, Glycerin macht Ureaselösungen haltbarer. Chem. Weekbl. **12**, 483. 1915. — ⁹⁵) Jansen, Bestimmung von Arginin mit Arginase + Urease. Chem. Weekbl. **14**, 125—29. 1917. — ⁹⁶) Jacquemart, Bodensatz im Harn beim Stehen ist fermentreich. Andeutung zur quantitativen Verfolgung der Harn gärung. Ann. chim. phys. Sér. 3 **7**, 149—151. 1843. — ⁹⁷) Kan Kato, Urease in Bambusschößlingen. Zeitschr. f. physiol. Chemie **75**, 461—63. 1911. — ⁹⁸) Kellner, Urobakterien im Erdboden bis zu 1,2 m Tiefe. Landw. Jahrb. **15**, 712—17. 1886. — ⁹⁹) Kiesel, Urease in blauen Lupinen und Weizenkeimen. Zeitschr. f. physiol. Chemie **75**, 169—96. 1911. — ¹⁰⁰) Kikkaji, Urease in Cortinellus edodes. Zeitschr. f. physiol. Chemie **51**, 201—06. 1907. — ¹⁰¹) Korzynski, Verb. von Urea mit 2 HCl bei niedrigen Temperaturen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **43**, 1820—24. 1910. — ¹⁰²) Kossowicz, Eine Reihe Schimmelpilze spalten Urea. Zeitschr. . . Gärungsphysiol. **1**, 60—62. 1912. — ¹⁰³) Kossowicz, U als N-Quelle für Schimmelpilze. Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **2**, 51—55. 1913. — ¹⁰⁴) Kossowicz, Urease in Schimmelpilzen. Les catalyseurs bioch. Paris 1914, S. 567. — ¹⁰⁵) Kruse, Eine gewisse U-spaltende Wirkung scheint fast allen Mikroorganismen zuzukommen. Mikrobiologie 1910, S. 595—98. — ¹⁰⁶) Labberté, Sojaurease: Wirkung nicht monomolekular. Enzymkonzentration. Hemmung durch Am Carb. und Salze. Pharm. Weekbl. **52**, 1428—40. 1915. — ¹⁰⁷) Ladureau, Das Harnferment wirkt auch im Vakuum, bei hohem Druck, in Atm. von O₂, N₂, H₂, CO₂ und N₂O. Compt. rend. **99**, 877—88. 1884. — ¹⁰⁸) Laschins, Das Solenoid begünstigt die U-Spaltung durch Bac. Pasteuri nicht. Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1911, S. 260—72. — ¹⁰⁹) Lea, Der Alkoholniederschlag im ammoniak. Harn enthält das Ferment, durch Wasser ausziehbar. Journ. of Physiol. **6**, 136—42. 1885. — ¹¹⁰) Lea, Journ. of physiol. **10**, 226. 1890. — ¹¹¹) Leoni, 1/2 proz. H₂SO₄ hindert die Harn gärung. Staz. sperim. agrar. ital. **31**, 209—21. 1898. — ¹¹²) Lehmann und Neumann, Nur wenige Pilzarten spalten U. Atlas u. Grundr. der Bakt. München 1911/12. — ¹¹³) Leube, Isolierung von 1 kugeligen und 3 stäbchenförmigen Urobakterien aus gär. Harn und aus der Luft. Virchows Archiv **100**, 540—70. 1885. — ¹¹⁴) Leuper und Tonnet, Spuren Urease im menschlichen Harn. Compt. rend. de la soc. de biol. **76**, 649—50. 1914. — ¹¹⁵) Lewis, U beeinflusst die Oberflächenspannung des Wassers nicht (S. 624 u. 634). Zeitschr. f. phys. Chemie **74**, 619—40. 1910. — ¹¹⁶) Lieske, U als N-Quelle für Bakterien. Jahrb. f. wissenschaft. Botanik **50**, 328—54. 1911/12. — ¹¹⁷) Li Yu Ying und Grandovinet, Eine Monographie. Le Soja. Paris. Challamal 1912. — ¹¹⁸) Löhnis, U-Spaltung durch Bakterien. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. **12** (II), 452. 1904. — ¹¹⁹) Löhnis, Impfung und Jahreszeit (am besten im Juli). Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. **14** (II), 7. 1906. — ¹²⁰) Marshall jr., Bestimmung von U mittelst

Sojaurease und direkter Titration. Journ. of Biolog. Chem. **14**, 283–90. 1913. — ¹²¹⁾ Marshall jr., Bestimmung von U mittelst Sojaurease. Auslösung des NH_3 nach Folin. Journ. of Biolog. Chem. **15**, 487–96. 1914. — ¹²²⁾ Marshall jr., Einfluß von Verdünnung, Säuren, Alkalien und Äthylalkohol auf Sojaurease. Journ. of Biolog. Chem. **17**, 351–61. 1914. — ¹²³⁾ Mateer und Marshall, 15 mal mehr Urease in der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) als in der Sojabohne. Journ. of Biolog. Chem. **25**, 297. 1916. — ¹²⁴⁾ Meissner, Dtsch. Zeitschr. f. Chir. **13**, 344. 1880. — ¹²⁵⁾ Verbr. des U-Fermentes im Luftstaub. Bull. de la Soc. chim. **29**, 387–97. 1878. — ¹²⁶⁾ Miquel, Neues stäbchenförmiges U-Ferment (*Bac. Ureae*). Bull. de la Soc. chim. **31**, 391–93. 1879. — ¹²⁷⁾ Miquel, Sporen von *Bac. ureae* verträgt 95° mehrere Stunden. Bull. de la Soc. chim. **32**, 126–27. 1879. — ¹²⁸⁾ Miquel, Verbreitung der Urobakterien in der Luft. Annuaire de l'Obs. de Montsouris 1882, S. 464. — ¹²⁹⁾ Miquel, Anwendung von Harnpilzbouillon zu U-Bestimmungen. Compt. rend. **111**, 397–99, 501–02. 1890. — ¹³⁰⁾ Miquel, Verbreitung der Urobakterien. Neue Arten. Einführung des Namens „Urease“. Ann. de Micrographie **1**. 1888; **2**. 1889; **3**. 1891; **4**. 1892; **5**. 1893; **7**. 1895; **8**. 1896; **9**. 1897. — ¹³¹⁾ Miquel, Zusammenfassung. Systematik der Urobakterien. Etudes sur la fermentation ammon. et les ferments de l'urée. Paris 1898. — ¹³²⁾ Miquel, Historik und Übersicht über die Urobakterien. Lafars Handbuch der techn. Mykologie **3**, S. 71–83. 1904. — ¹³³⁾ Moll, Über die Antiurease. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **2**, 344–54. — ¹³⁴⁾ Mom, U-Bestimmung mittelst *Bac. Pasteurii*. Die U-spaltende Wirkung der Sojabohne beruht auf Urobakterien an den Schalen. Chem. Weekbl. **13**, 72–75, 255–57. 1916. — ¹³⁵⁾ Muenck, Urease in Samen von blauer, gelber und weißer Lupine. Landw. Vers. **85**, 393. 1914. — ¹³⁶⁾ Müller, Konservierung des menschlichen Harns. Journ. f. prakt. Chemie **61**, 452. 1860. — ¹³⁷⁾ Musculus, Harnfermentpapier als Reagens auf U. Bestimmung durch dies Papier und direkte Titration. Compt. rend. **78**, 132–34. 1874. — ¹³⁸⁾ Musculus, Freies Ferment im Cystitisharn. Compt. rend. **82**, 333–36. 1876. — ¹³⁹⁾ Musculus, U-Bestimmung durch Trockenferment. Arch. f. d. ges. Physiol. **12**, 214–19. 1876. — ¹⁴⁰⁾ Mörner, Methode zur U-Bestimmung im Harn. Skandinav. Arch. f. Physiol. **14**, 297. 1903. — ¹⁴¹⁾ Némec, Urease in Getreidesamen. Diese Zeitschr. **91**, 126–30. 1918. — ¹⁴²⁾ Nencki und Zaleski, Vakuumdestillation bei NH_3 -Bestimmung. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **36**, 385. — ¹⁴³⁾ Nencki und Zaleski, Vakuumdestillation bei NH_3 -Bestimmung. Zeitschr. f. physiol. Chemie **33**, 193. — ¹⁴⁴⁾ Neumann, Aktivierung der Sojaurease durch Serum. Diese Zeitschr. **69**, 134–40. 1915. — ¹⁴⁵⁾ Onodera, Einwirkung von Elektrolyten, Nichtelektrolyten, Alkaloiden auf Sojaurease. Co-Enzym. Biochemical Journ. **9**, 544–74. 1915. — ¹⁴⁶⁾ Oppenheimer, Urobakterien und deren Fermente. Die Fermente, IV. Aufl. 1913, S. 355–58. — ¹⁴⁷⁾ Partos, Apparat zur Bestimmung von CO_2 bei U-Spaltung durch Sojaurease. Diese Zeitschr. **103**, 292–98. 1920. — ¹⁴⁸⁾ Pasteur, Ursache der Harngärung ein organisiertes Ferment, dessen Keime aus der Luft kommen. Compt. rend. **50**, 849–54. 1860. — ¹⁴⁹⁾ Pasteur, Das Ferment

ist ein Pilz „torule ammoniacale“. Ann. de Chim. et de Phys. Sér. 3 **64**, 52, 55. 1862. — ¹⁵⁰) Pasteur und Joubert, Le ferment soluble de M. Musculus est produit par le petit ferment organisé de l'urée. Compt. rend. **83**, 5—8. 1876. — ¹⁵¹) Picton, van Helmont Entdecker von NH₃ (gas pingue). The Story of Chemistry London 1889, S. 88. — ¹⁵²) Pin Yin Yi, Versuche mit Robiniaurease. Spaltung durch diese von as-dimethylurea und as-diäthylurea unter Abscheidung der Amine. Ber. d. Deutsch. pharm. Ges. **30**, 178—91. 1920. — ¹⁵³) Plimmer und Skelton, Versuchsergebnisse mit Marshalls späterer Methode. Biochemical Journ. **8**, 70—73. 1914. — ¹⁵⁴) Pool, Nachweis von U durch Phenolphthalein + 1/2 Sojabohne. Pharm. Weekbl. **57**, 178—79. 1920. — ¹⁵⁵) Proust, Harn in verschlossener Flasche 6 Jahre haltbar. Bei der Fermentation wirkt der Luftstickstoff mit. Ann. de Chim. et de Phys. **36**, 258—77. 1801. — ¹⁵⁶) Proust, Destillation von U-Lösung gibt nur Am-Carbonat. Ann. de Chim. et der Phys. Sér. 2 **14**, 259—88. 1820. — ¹⁵⁷) Prout, Darstellung von reinem U (über Nitrat). Zusammensetzung: H = 6,66; C = 19,99; O = 26,66; N = 46,66%. Ann. of Philosophy **11**, 352—56. 1818. — ¹⁵⁸) Prout, Schweiggers Journ. **22**, 449. — ¹⁵⁹) Robinson und Oppenheim, Methode zum Aufbewahren von Sojaurease. Journ. Lab. et clin. Med. (St. Louis) **4**, 448. 1918/19. — ¹⁶⁰) Rochaix und Dufourt, Neue Urobakterien aus Pferdmist. Compt. rend. de la soc. de biol. **69**, 312—14. 1910. — ¹⁶¹) Rochaix, Neue Urobakterien aus Pferdmist. Ann. soc. Linn. Lyon. **57**, 205—07. 1911. — ¹⁶²) Rona und György, Sojaurease: pH-Optimum 7,3—7,5. Keine Auxwirkung von Aminosäuren oder Serum bei Gegenwart von Phosphat als Puffer. Diese Zeitschr. **111**, 115—33. 1920. — ¹⁶³) Rona und Petow, Einige Gifte für Sojaurease. Diese Zeitschr. **111**, 134—65. 1920. — ¹⁶⁴) Rovere, Urease in der Thymusdrüse junger Kälber. Giorn. Acc. med. Torino **76**. — ¹⁶⁵) Rouelle cadet, Entdeckung von Urea im Harn. Journ. de méd. 1773. — ¹⁶⁶) Schibata, Urease in Aspergillus Niger. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **5**, 384. 1903/04. — ¹⁶⁷) Schlösing, Methode zur NH₃-Bestimmung. Journ. f. prakt. Chemie **52**, 372. 1851. — ¹⁶⁸) Schnitzler, Proteus vulgaris spaltet Urea. Zur Ätiologie des Cystitis. Wien 1892. — ¹⁶⁹) Semal, U-Spaltung durch Schimmelpilze. Ann. de pharm. **4**, 279. 1894. — ¹⁷⁰) Shearman, Myriaden von Tierchen im ammoniakalischen Harn eines Kranken. Prov. Journ. 1846. — ¹⁷¹) Shearman, Schmidts Jahrb. **55**, 276. 1847, Ref. — ¹⁷²) Simon und Meyer, U-spaltende Enzyme im Harn. Zeitschr. f. Urologie **4**, 660. 1910. — ¹⁷³) Simonson, Aerobe und anaerobe Urobakterien. Diss. Zürich 1911. — ¹⁷⁴) Söhngen, Ureaspaltung bei Nichtvorhandensein von Eiweiß durch mehrere Gruppen von Mikroben (nicht Urobac. Pasteurii). Irisierung. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. **23** (II), 91—98. 1909. — ¹⁷⁵) Söhngen, Chem. Weekbl. **11**, 42—59. 1914. — ¹⁷⁶) Söldner, Vakuumdestillation bei NH₃-Bestimmung. Zeitschr. f. Biol. **38**, 237. — ¹⁷⁷) Sumner und Bodansky, U-Bestimmung mit Jackbohnenurease. Fällung der Eiweißstoffe durch Hg-K-Jodid + HCl. Nesslerisation. Journ. of Biolog. Chem. **38**, 57—61. 1919. — ¹⁷⁸) Takeuchi, Urease in Sojabohnen. Selektivität. Journ. coll. agric. Tokyo **1**, 1—14. 1909. — ¹⁷⁹) Takeuchi, Technische Anwendung von Sojaurease zur Darstellung

von Am-Sulfat aus dem Menschenharn. Chem.-Ztg. **35**, 408. 1911. —
¹⁸⁰) Tervaert und Lier, U-Bestimmung in Blutproben mittelst Soja-
 urease. Ned. Tijdschr. v. Geneesk. **2**, 17. 1916. — ¹⁸¹) Thoms, Historisches
 über die Urease. Ber. d. Deutsch. pharm. Ges. **30**, 175–78. 1920. —
¹⁸²) Tissier und Martelly, Eine Menge Verdauungsbakterien spalten
 Urea, u. a. Proteus und Bac. coli. Ann. de l'inst. Pasteur **16**, 865–902.
 1902. — ¹⁸³) Traube, Harn gärung in der Blase als Folge von der Anwendung
 unreiner Katheter. H. Fischer: Berl. klin. Wochenschr. **2**, 18. 1864. —
¹⁸⁴) Van Slyke, Prüfung von Marshalls Methode. Selektivität der Urease.
 Wirkung nicht monomolekular. Journ. of Biolog. Chem. **16**, 127–31.
 1913/14. — ¹⁸⁵) Van Slyke und Zacharias, Ureasetrockenpräparat
 durch Acetonfällung. Eigenschaften. Kritik über Hahn und Saphra.
 Dtsch. med. Wochenschr. **40**, 1219–21. 1914. — ¹⁸⁶) Van Slyke und
 Cullen, Ekvation für die Wirkung der Urease. Journ. of Biolog. Chem.
19, 141–80. 1914. — ¹⁸⁷) Van Slyke und Zacharias, Einfluß der
 H.-Konzentration. p_{H} -Optimum 7. Journ. of Biolog. Chem. **19**, 181–210.
 1914. — ¹⁸⁸) Van Slyke und Cullen, Ureasetrockenpräparate. Anwen-
 dung. Journ. of Biolog. Chem. **19**, 211–28. 1914. — ¹⁸⁹) Van Slyke
 und Cullen, U-Bestimmung mit Sojaurease. Vorsichtsmaßregeln. Journ.
 of Biolog. Chem. **24**, 117–22. 1916. — ¹⁹⁰) Van Slyke, Antwort zu Falk.
 Journ. of Biolog. Chem. **28**, 391. 1917. — ¹⁹¹) Van Tieghem, Reinzüchtung
 von Pasteurs Torula. Diese spaltet nicht Äthylurea, aber Hippursäure.
 Hefe spaltet Urea nicht. Compt. rend. **58**, 210–14. 1864. — ¹⁹²) Van
 Tieghem, Weitere Studien über „torule ammoniacale“. Thèse de la Fac.
 des Sc. Paris 1864, Nr. 256. — ¹⁹³) Vauquelin, Bei der Zersetzung des
 Harnstoffs muß man ein Zutreten von Wasser annehmen. Ann. de Chim.
 et de Phys. Sér. 2 **25**, 423–26. 1824. — ¹⁹⁴) Viehöver, Bot. Unter-
 suchung harnstoffspaltender Bakterien. Systematik. Kritik. Centralbl.
 f. Bakt. u. Parasitenk. **39** (II), 209–359. 1913/14. — ¹⁹⁵) Wakulenko,
 Urease in Robinia, Lupinen, Sesam, Strophantus. Landw. Vers.-Stat.
82, 313–91. 1913. — ¹⁹⁶) Walker und Hambly, Bei 100° geht Urea
 in Wasserlösung teilweise in Am-cyanat über. Reaktion bimolekular.
 Gleichgewicht etwa bei 5% Am-cyanat. Chem. News 1895, S. 46. —
¹⁹⁷) Walker und Hambly, Bei 100° geht Urea in Wasserlösung teilweise
 in Am-cyanat über. Reaktion bimolekular. Gleichgewicht etwa bei 5%
 Am-cyanat. Journ. Chem. Soc. Lond. **67**, 746–67. 1895. — ¹⁹⁸) Walker,
 Bei 100° geht Urea in Wasserlösung teilweise in Am-cyanat über. Reaktion
 bimolekular. Gleichgewicht etwa bei 5% Am-cyanat. Zeitschr. f. phys.
 Chemie **42**, 207–08. 1902. — ¹⁹⁹) Wells und Caldwell, Keine Urease
 im Harn der Menschen und der Anthropoiden. Biochem. Zentralbl. **17**.
 1914/15. — ²⁰⁰) Wester und Schirm, Prüfung von Marshall-van Slykes
 Methode. Ergebnisse nicht genügend. Chem. Weekbl. **12**, 213. 1915. —
²⁰¹) Wester, Chem. Weekbl. **13**, 663–77. 1916. — ²⁰²) Wester, Soja-
 urease: Einfluß von Giften, Enzymmenge, Belichtung und Temperatur.
 Pharm. Zentralhalle **57**, 423–30. 1916. — ²⁰³) Wester, Ureasegehalt in
 holländischen Samen und in verschiedenen Arten Sojabohnen. Chem.
 Weekbl. **16**, 1548–56. 1919. — ²⁰⁴) Wester, Ureasegehalt in holländischen

Samen und in verschiedenen Arten Sojabohnen. Pharm. Zentralhalle **61**, 377—82. 1920. — ²⁰⁵⁾ Wester, Schwankungen in der Wirkung eines Sojabohnenextraktes beim Erwärmen auf 37°. Pharm. Zentralhalle **61**, 293—95. 1920. — ²⁰⁶⁾ Wester, Einfluß von Enzymmenge, U-Konzentration, Glycerin auf Sojaurease und Canavaliaurease. Ber. d. Deutsch. pharm. Ges. **30**, 163—75. 1920. — ²⁰⁷⁾ Wester, Einwirkung von Kationen und Anionen auf Sojaurease. Recueil de travaux chim. des Pays-Bas 1920. — ²⁰⁸⁾ Wöhler, Künstliche Bildung des Harnstoffs aus Ag-Cyanat + Salmiaklösung oder Pb-Cyanat + flüss. NH₃. Poggendorffs Ann. d. Phys. u. Chem. **12**, 253—56. 1828. — ²⁰⁹⁾ Wöhler, Aus Cyangas + Wasser bildet sich etwas Harnstoff, also aus rein anorganischem Material. Poggendorffs Ann. d. Phys. u. Chem. **15**, 619—30. 1829. — ²¹⁰⁾ Wüster, Vakuumdestillation bei NH₃-Bestimmung. Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. 1889, S. 1903. — ²¹¹⁾ Zemplen, Urease in Robinia, in Gramina nicht. Zeitschr. f. physiol. Chemie **79**, 229—34. 1912. — ²¹²⁾ Zemplen, Technische Verwendung von Robiniaurease zur Darstellung von Am-Sulfat aus dem Menschenharn. Zeitschr. f. angew. Chemie **25**, 1560—62. 1912.

Über heterogenetisches Antigen und Hapten¹⁾.

XV. Mitteilung über Antigene.

Von

Karl Landsteiner.

(Aus dem Laboratorium des R. K. Ziekenhuis, den Haag.)

(Eingegangen am 19. April 1921.)

Ein Zusammenhang, der durch meine vorhergehenden Untersuchungen²⁾ nahegelegt wurde und im folgenden noch erörtert wird, veranlaßte mich zu der Untersuchung der heterogenetischen Antigene. Darunter werden bekanntlich jene durch Forssma³⁾ und die seiner Mitteilung folgenden Arbeiten in verschiedenen Organen vieler Tierarten, z. B. Pferd, Katze, Huhn, aufgefundenen Stoffe verstanden, nach deren Injektion bei Kaninchen Hämolyse gegen Hammelblut entstehen, die sogenannten heterogenetischen Lysine. Bezüglich der Literatur verweise ich auf die in den Mitteilungen von Doerr und Pick⁴⁾, Friedberger⁵⁾, Sachs und Georgi⁶⁾ angegebenen Zitate⁷⁾. Unter der großen Zahl von Arbeiten, die über den Gegenstand gemacht wurden, beschäftigt sich ein Teil auch mit Versuchen über die Eigenschaften und Beschaffenheit der heterogenetischen Antigene.

¹⁾ Kurz mitgeteilt in der Sitzung der Kon. Akad. von Wetenschappen te Amsterdam vom 26. Febr. 1921.

²⁾ 13. u. 14. Mitt., diese Zeitschr. **93**, 118. 1919; **104**, 280. 1920.

³⁾ Diese Zeitschr. **37**, 78. 1911.

⁴⁾ Diese Zeitschr. **50**, 129. 1913; **60**, 257. 1914.

⁵⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **20**. 1913; **21**. 1914; **26**, 217. 1919.

⁶⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **21**, 342. 1914.

⁷⁾ Bei dieser Gelegenheit möchte ich die von mir schon vor langer Zeit aufgefundene Tatsache in Erinnerung bringen, daß normale Agglutinine immer auf viele Arten von Blut wirken. Münch. med. Wochenschr. 1902, Nr. 40.

Die ersten Angaben darüber stammen von Doerr und Pick¹⁾. Diese Autoren fanden, daß Pferdeniere stundenlang gekocht werden kann, ohne ihr Immunisierungs- und Bindungsvermögen zu verlieren.

Sie geben ferner an, daß das Antigen gegen Alkoholbehandlung widerstandsfähig ist. In ihrer zweiten Arbeit berichteten Doerr und Pick, daß das Antigen in das nach Pohl bereitete Organplasma übergeht und durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat, durch stark verdünnte Essigsäure, durch Erwärmen auf 38° ausgeflockt wird und sich demnach wie ein Nucleoproteid verhält. Im Anschluß an Doerr und Pick haben auch Sachs und Georgi²⁾ alkoholische Extrakte zum Nachweis des heterogenetischen Antigens verwendet. Friedberger (in Gemeinschaft mit Poor, Suto, Schiff) machte Untersuchungen über das im Harn enthaltene heterogenetische Antigen (vgl. Doerr und Pick) und fand, daß bei der Behandlung von Urin mit Alkohol der Extrakt Bindungsvermögen besitzt, nicht aber der Rückstand (Berl. klin. Wochenschr. 1913, Nr. 34), hielt aber später die Versuche nicht für richtig³⁾.

Die Versuche von Sordelli, Fischer, Wernicke, Pico⁴⁾ aus dem Institut von R. Kraus, über die nun und noch weiterhin zu berichten ist, hatten in einem wichtigen Punkt ein neues Ergebnis.

Die Autoren berichten in bezug auf die Beschaffenheit des Antigens folgendes:

„3. Durch Alkohol und Äther kann man aus Nieren des Meer-schweinchens und des Hundes und aus den Blutkörperchen von Schaf und Ziege 2 Fraktionen gewinnen.

a) Eine in Alkohol und Äther lösliche welche das Bindungsvermögen der Organe und nativen Blutkörperchen behält.

b) Eine unlösliche, welche keine Aktivität besitzt“⁵⁾.

„4. Vermittels der Komplementbindungsmethode ließ sich folgendes feststellen:

¹⁾ l. c. vgl. Sachs und Nathan, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 19, 235. 1913.

²⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 21, 346. 1914, vgl. Georgi, Arbeiten a. d. Inst. f. exp. Ther. Frankfurt a. M. 1919. H. 9, S. 43.

³⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 28, 217.

⁴⁾ Rev. del inst. bacteriol. Buenos-Aires 1, Nr. 3, S. 229. 1918.

⁵⁾ Im englischen Text: „and an insoluble one, which has hardly any activity at all.“

a) Der in Alkohol lösliche Teil besitzt das heterogenetische Antigen.

b) In dem unlöslichen Teil ist es nicht vorhanden.“

„5. Die Immunisierung mit den durch Alkoholäther fraktionierten Teilen von Meerschweinchen- und Hundeniern führt zu folgendem Ergebnisse:

a) Der unlösliche Teil vermag die Bildung von Hämolytinen anzuregen, trotz Fehlens jedes Bindungsvermögens in vitro.

b) Der lösliche Teil ruft entgegen seinem Bindungsvermögen in vitro keine Hämolytinebildung hervor.“

Es ist weiterhin anzuführen, daß Sordelli und Pico¹⁾ eine charakteristische Flockungsreaktion der alkoholischen Organextrakte durch heterogenetisches Immuneserum auffanden, eine Beobachtung, die später auch von Sachs und Guth²⁾ mitgeteilt wurde.

Daß nach Sordelli und Fischer nicht der in vitro bindende Alkoholextrakt, wohl aber der Rückstand nach der Alkoholextraktion immunisiert, ist offenbar zunächst schwer zu verstehen, da es danach den Anschein hat, daß durch Einspritzung einer Substanz spezifische Immunkörper für eine andere Substanz gebildet werden.

Ich habe bei meiner Untersuchung, die ich zum größten Teil ohne Kenntnis der Arbeiten von Sordelli und seinen Mitarbeitern ausgeführt habe, Resultate erhalten, die mit jenen der genannten Autoren in wesentlichen Teilen übereinstimmen. Ich fand nämlich auch, daß alkoholische und ätherische Extrakte der Pferdenniere, trotzdem sie starkes Bindungsvermögen in vitro besitzen, doch keine oder sehr geringe Immunkörperbildung bewirken. Durch die Gesamtheit meiner Versuche, zusammengehalten mit früheren Ergebnissen, kam ich aber, wie ich glaube, zu einer befriedigenden Auffassung des Sachverhaltes.

Versuch (nebst Angabe der Versuchsanordnung bei den Proben und der Immunisierung im allgemeinen).

Verriebene Pferdenniere wird in der 10fachen Menge 0,9proz. NaCl-Lösung aufgenommen, durch eine einfache Lage Gaze filtriert. Hier wie in den folgenden Versuchen wurden die Injektionsflüssigkeiten (gewöhnlich mit $\frac{1}{4}$ – $\frac{1}{2}$ % Phenol versetzt) im Eiskasten aufbewahrt.

¹⁾ Rev. del inst. bacteriol. Buenos-Aires 2, Nr. 3, S. 261. 1919.

²⁾ Med. Klin. 1920, Nr. 6. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 30, 517. 1920.

100 g durch die Fleischmaschine getriebene Pferdeniere werden mit dem 10fachen 95proz. Alkohol versetzt eine Woche lang unter mehrfachem Schütteln bei Zimmertemperatur extrahiert, filtriert, im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird nochmals in 50 ccm absoluten Alkohol unter kurzdauerndem Erwärmen auf dem Wasserbad aufgenommen, nach dem Erkalten von einem ausgeschiedenen Niederschlag abfiltriert und am nächsten Tag von einem wieder gebildeten Sediment abgegossen. Die alkoholische Lösung wird im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit 40 ccm Äther behandelt und so eine ätherlösliche Fraktion gewonnen.

Zur Injektion wurde verwendet: 1. Die wässrige Pferdeniere-Emulsion; 2. die in Alkohol, aber nicht in Äther lösliche Fraktion in NaCl-Lösung emulgiert; 3. die in NaCl-Lösung emulgierte ätherlösliche Fraktion; 4. der in Alkohol ungelöst gebliebene oder nach dem Erkalten wieder abgeschiedene Teil des ersten Alkoholextraktes, der sich leicht in NaCl-Lösung auflöste. Das Gewicht dieser Fraktion betrug weniger als 10% der im ersten Alkoholextrakt erhaltenen Substanzmenge (3,7 g); die Stamm-lösung davon wurde auf 5 ccm gebracht.

Injiziert wurde 3 mal, in Abständen von einer Woche, intraperitoneal, wie auch bei allen folgenden Versuchen. Das erstmal erhielten die Kaninchen eine 0,1 g, das zweitemal eine 0,2 g frischer Nierensubstanz entsprechende Menge, das drittemal die mit Suspension 1 behandelten Tiere 0,2 g, die anderen 3 Gruppen das 4fache dieser Menge.

Die Hämolyse wurde bei diesem und den folgenden Versuchen auf die folgende übliche Weise geprüft. Von den Serumverdünnungen wurde 0,5 ccm mit 0,5 ccm auf das 10fache verdünntem frischen Meerschweinchenserum und im ersten Versuch 0,1, später 0,05 ccm gewaschenem 50proz. Schafblut versetzt. Wo es nicht anders angeführt ist, ist in den folgenden Versuchsprotokollen die hämolytische Wirkung der auf das 250fache verdünnten Seren nach 1stündigem Stehen im Wasserbad von 37° angeführt.

Vor den Injektionen wurden die Seren der Kaninchen auf Hämolyse geprüft und solche Tiere, deren Seren stark lösten, nicht zum Versuche genommen. Das Serum der zu Injektionen benutzten Tiere löste bei der Verdünnung 1 : 25 unter den angegebenen Versuchsbedingungen in einer halben Stunde nicht komplett.

Bezeichnung der Hämolyse: k = komplett, fk = fast komplett, s. st = sehr stark, st = stark, m = mäßig, schw = schwach, Sp = Spur.

Die Seren wurden immer eine Woche nach der letzten Einspritzung geprüft.

Der beschriebene mit 11 Kaninchen angestellte Versuch hatte folgendes Ergebnis (nach 3 Injektionen):

Art des injizierten Materials	Nieren-suspension		Alkoholfraktion			Ätherfraktion			In kaltem Alkohol ungelöster Teil des ersten Alkoholextraktes		
	k	m	0	0	0	0	0	0	Sp	schw	0
Hämolyse . .	k	m	0	0	0	0	0	0	Sp	schw	0

Es zeigt sich demnach, daß eine kräftige Hämolysinbildung bei einem der mit der unveränderten Nierensubstanz behandelten Tieren, aber nicht nach Injektion von Alkohol- oder Ätherextrakt stattgefunden hatte. Bemerkenswert erscheint die stärkere Wirkung der Seren der 4. Gruppe in Vergleich zu denen der 2. und 3., die darauf hindeutet, daß hier vermutlich eine geringe Produktion von Immunkörpern stattgefunden hat.

Da das erhaltene Resultat im Gegensatz zu den mir damals bekannten Angaben der Literatur über die Alkohollöslichkeit des Antigens stand, hielt ich es für nötig, den Versuch (modifiziert) zu wiederholen.

Pferdeniere wurde jetzt, wie in den noch folgenden Versuchen, 2 mal durch eine Fleischmaschine, dann durch ein grobes und durch ein feines Sieb getrieben. Es wurden 3 Gruppen von Tieren, im ganzen 9 Kaninchen, zum Versuch genommen, denen ich die folgenden Präparate injizierte.

1. Der in der 10fachen Menge NaCl-Lösung aufgeschwemmte Brei.

2. 10 g des Nierenbreis wurden mit 100 ccm 80 proz. Alkohol 1 Tag bei Zimmertemperatur stehengelassen, die Lösung im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft, mit NaCl-Lösung emulgiert, auf 100 ccm gebracht.

3. Wie 2., nur die Extraktion mit absolutem Alkohol gemacht.

Von allen Lösungen wurden jedesmal 2 ccm injiziert.

Hämolyse in der Verdünnung 1 : 250 nach 2 Injektionen:

Art des injizierten Materials	Nierensuspension			80 proz. Alkohol- extrakt			Absoluter Alkohol- extrakt		
	k	k	k	0	0	0	0	0	0
Hämolyse	k	k	k	0	0	0	0	0	0

Bei schwacher Verdünnung geprüft zeigten die Seren der 2. und 3. Gruppe keine deutlich stärkere Hämolyse als das Serum normaler Tiere.

Das Resultat entspricht demnach dem schon angeführten, insofern wieder nur die mit nativer Nierensuspension behandelten Tiere Hämolysin gebildet hatten, die alkoholischen Extrakte aber unwirksam waren.

Dieser unerwartete Befund veranlaßte mich, die Angaben über die Bindungsfähigkeit der alkoholischen Organextrakte in vitro nachzuprüfen.

Verdünnungen von hämolytischem Serum, das durch Injektionen von Pferdeniere gewonnen war, wurden mit varierten Mengen in NaCl-Lösung emulgierten alkoholischen Pferdenierenextraktes (dargestellt durch Alkoholbehandlung von Extrakten und Suspensionen in Kochsalzlösung) versetzt, 1 Stunde im Brutofen gehalten, dann Komplement und Hammelblut zugesetzt. Gleichartige Versuche mit dem in Alkohol ungelösten Teil der

Nierensuspension und mit unveränderten wässrigen Extrakten oder Suspensionen.

Wie es zu erwarten ist, erhielt ich gleiche Resultate, wie sie in den oben angeführten Arbeiten enthalten sind. Das Bindungsvermögen der ursprünglichen wässrigen Extrakte fand sich in den alkoholischen Auszügen wieder, während der nach der Alkoholbehandlung zurückbleibende Rückstand nicht oder nur sehr wenig wirksam war. Um Wiederholung zu vermeiden, führe ich nur einen solchen Versuch im folgenden an (s. u.) und verweise im übrigen auf die zitierten Mitteilungen¹⁾.

Nach diesen Feststellungen mußte nun untersucht werden, wie sich der nach der Alkoholextraktion zurückbleibende Teil der Nierensubstanz, der natürlich die Hauptmenge der Proteine enthalten muß, in bezug auf die immunisierende Wirkung verhält. Damit beschäftigen sich die 2 folgenden Versuche, in denen außerdem der Einfluß der Extraktion mit Äther, der Extraktion mit siedendem Alkohol und der Effekt von Mischungen der beiden aus der Behandlung mit Alkohol resultierenden Anteile untersucht wurde.

Der feine Brei der Pferdeniere (s. o.) wurde mit der 3fachen Menge Kochsalzlösung ungefähr 40 Stunden unter häufigem Umschütteln im Eiskasten stehengelassen, durch ein Tuch koliert, zentrifugiert und durch ein Faltenfilter filtriert. Mit diesem stark getrübbten, aber nur wenig sedimentierenden Extrakt (E.) wurden nach verschiedenartigen Verarbeitungen die einzelnen Gruppen von Kaninchen injiziert. Die Präparate waren:

1. Der unveränderte Extrakt (E.).
2. E. wird mit der 5fachen Menge Alkohol versetzt, nach 2 Tagen (mehrmaliges Umschütteln) durch ein gehärtetes Filter filtriert, das Filtrat bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft.
3. E. wird in mehreren Operationen im Lauf von 2 Tagen mit dem 6fachen Volumen Äther im Scheidetrichter extrahiert, wobei die Trennung wegen der Bildung einer Emulsion einige Schwierigkeit bietet. Die Ätherlösung wird eingedampft.
4. Der in 2. gewonnene Niederschlag wird abgepreßt und in NaCl-Lösung suspendiert.
5. Aus der in 3. erhaltenen wässrigen Flüssigkeit werden die Ätherreste durch Erwärmen vertrieben.

Alle Präparate werden in so viel NaCl-Lösung aufgenommen, daß das Volumen dem verwendeten Ausgangsmaterial E. gleich ist.

Mit den so hergestellten Präparaten wurden Bindungsversuche in vitro gemacht. Die Alkohol- und Ätherextrakte wurden zu diesem Zweck in

¹⁾ Z. B. Arbeiten a. d. Inst. f. exp. Ther. in Frankfurt H. 9, S. 44. 1919.

Alkohol aufgenommen und durch allmählichen Zusatz der 6fachen Menge Kochsalzlösung fein emulgiert.

Zu den einzelnen Proben kamen von den im Verhältnis zu den oben angeführten 6fach verdünnten Flüssigkeiten 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 ccm, deren Volumen auf 0,5 ccm ergänzt wurde, dazu 0,5 ccm der 2fach komplett lösenden Menge von heterogenetischem Lysin, nach 1 Stunde bei 37° noch 0,5 ccm $\frac{1}{10}$ Komplement und 0,05 ccm 50proz. Schafblut.

Ergebnis nach 30' 37°.

Zusatz	Wässriger Nierenextrakt				Alkoholextrakt				Ätherextrakt				Alkoholniederschlag				Nierenextrakt mit Äther behandelt			
	0,3	0,1	0,03	0,01	0,3	0,1	0,03	0,01	0,3	0,1	0,03	0,01	0,3	0,1	0,03	0,01	0,3	0,1	0,03	0,01
Menge des Zusatzes	0	0	Sp	fk	0	0	schw	st	Sp	st	fk	k	0,3	0,1	0,03	0,01	0,3	0,1	0,03	0,01
Hämolyse	0	0	Sp	fk	0	0	schw	st	Sp	st	fk	k	0,3	0,1	0,03	0,01	0,3	0,1	0,03	0,01

Von den verschiedenen Flüssigkeiten wurden in wöchentlichen Abständen 2 ccm, dann 4, 4 und 5 ccm injiziert. Die folgende Tabelle gibt die Hämolyse der 1 : 250 verdünnten Seren von 15 Kaninchen eine Woche nach der letzten Injektion wieder. Die Hämolysinbildung war nach den ersten Injektionen noch gering, wahrscheinlich weil durch die Papierfiltration ein großer Teil der wirksamen Substanzen entfernt war.

Art des injizierten Materials	Nierenextrakt			Alkoholextrakt			Ätherextrakt			Alkoholniederschlag			Nierenextrakt mit Äther behandelt		
	k	k	f.k	0	0	0	Sp	0	0	schw	st	Sp	s.st	schw	st
Hämolyse . .	k	k	f.k	0	0	0	Sp	0	0	schw	st	Sp	s.st	schw	st

Eines der Seren der ersten Gruppe löste auch noch bei 1 : 500 komplett.

Für den folgenden Versuch wurde Pferdenierenbrei wieder in der 3fachen Menge 0,9proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt und nach 20stündigem Stehen im Eiskasten (mehrmaliges Umschütteln) 2 mal durch eine einfache lockere Stofflage koliert.

Die injizierten Präparate waren:

1. Der unveränderte Extrakt oder Suspension (S.).
2. 100 ccm von S. blieben mit 600 ccm 95proz. Alkohol unter mehrmaligem Umschütteln 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen, dann wurde durch ein gehärtetes Filter filtriert, der Filtrückstand nochmals in 200 ccm Alkohol aufgeschwemmt. Nach weiterem 1tägigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde wieder filtriert und der Filtrückstand in 100 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt.
3. Zu einer wie Präparation 2 dargestellten Suspension wird der Rückstand der Alkoholextrakte, die bei der 2 maligen Behandlung dieser Portion mit Alkohol gewonnen wurden, nach Emulsion in wenig Kochsalzlösung zugesetzt, so daß das gesamte Volumen zum Schluß 100 ccm betrug.

Art des injizierten Materials	Wässriger Nierenextrakt			Alkoholextrakt			Alkoholextrakt + Alkoholextrakt			Alkoholextrakt mit warmem Alkohol behandelt			Nierenextrakt gekocht					
	st	m	schw	m	schw	st	m	schw	st	m	schw	st	m	schw	st	m	schw	
Hämolyse n. d. 1. Inj.																		
" " 2 "																		
" " 3 "																		
" " 4 "																		
" " 5 "																		
" " 6 "																		
" " 7 "																		
" " 8 "																		
" " 9 "																		
" " 10 "																		

Die Eindampfung der Alkoholextrakte geschah sehr rasch in einem Luftstrom bei ca. 40°.

4. 100 ccm von S. wurden mit 600 ccm Alkohol 3 Tage lang bei Zimmertemperatur digeriert und der Niederschlag nach dem Abfiltrieren mit 100 ccm Alkohol 1/2 Stunde lang im Wasserbad unter Rückfluß ausgekocht, dann wieder abfiltriert und der Filtrerrückstand in 100 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

5. Die ursprüngliche Suspensio S. wurde 1/2 Stunde im kochenden Wasserbad unter Rückfluß erwärmt.

Zum Versuch wurden 24 Kaninchen genommen, die Injektionen von je 3 ccm der Flüssigkeit erhielten.

Die nebenstehende Tabelle enthält die Resultate der Hämolyseversuche nach der 1. und 2. Injektion bei einer Verdünnung der Seren von 1 : 250. Bei kompletter Hämolyse ist die Zahl beigefügt, die die höchste noch vollständig lösende Verdünnung anzeigt.

Einige der Kaninchen, die mit dem mit Alkohol gekochten Material behandelt waren, wurden noch ein 3. und 4. Mal damit injiziert. Das Serum bewirkte auch dann in der Verdünnung 1 : 250 keine oder nur eine sehr geringe als Sp. bezeichnete Hämolyse.

Aus den angeführten Versuchen ergeben sich die folgenden Feststellungen über das Verhalten des heterogenetischen Antigens.

Die durch Extraktion mit Alkohol aus der Pferdierie zu gewinnenden Substanzen sind in vitro ungefähr ebenso wirksam wie die unveränderte Substanz; sie haben aber nicht mehr die Eigenschaft, eine deutlich nachweisbare Bildung von Hämolysin bei Tieren hervorzurufen, wenigstens dann nicht, wenn man nur so viel injiziert, als in gut wirksamen Mengen des unveränderten Materials enthalten ist. Diese Beobachtung ist eine Bestätigung der zitierten Angaben von Sordelli und Fischer. Ob unter anderen Bedingungen, z. B. bei Anwendung größerer Mengen, doch eine Wirkung zu erzielen ist, bleibt noch festzustellen. (Man vgl. den ersten der mitgeteilten Versuche.)

Der nach Behandlung der Nierenemulsionen bzw. wässrigen Extrakte mit kaltem Alkohol entstehende Niederschlag ist *in vitro* beinahe unwirksam, wie das auch Sordelli und Fischer sowie Georgi gefunden haben. Nach der Injektion dieses Niederschlages entstehen wohl noch Hämolyse, doch ist, was mir für das Verständnis wichtig erscheint, die Antigenwirkung in meinen Versuchen sehr beträchtlich schwächer als die des ursprünglichen Materials, während Sordelli und Fischer eine solche Abschwächung nicht erwähnen¹⁾.

Die Bedeutung dieses Umstandes wird dadurch hervorgehoben, daß nach kurzem Erwärmen mit Alkohol, wie die letzte Tabelle zeigt, die Antigenwirkung vollständig oder bis auf geringe Spuren aufgehoben ist. In bemerkenswertem Gegensatz dazu ist die Antigenwirkung, wenn man in wässriger Lösung kocht, gut erhalten, wie dies Doerr und Pick zuerst nachgewiesen haben. In meinen Versuchen war allerdings der Titer der mit erhitztem Material erzielten Seren deutlich geringer als nach Injektion der unveränderten Nierensubstanz. Ferner ist zu erwähnen, daß auch die Behandlung mit Äther bei gewöhnlicher Temperatur die Antigenwirkung deutlich abschwächt, anscheinend stärker als Kochen in wässriger Flüssigkeit.

Ein Zusatz von Alkoholextrakt zum Alkoholniederschlag brachte keine deutliche Veränderung hervor, während Sordelli und Fischer angeben, daß solche Gemische unwirksam sind. Vielleicht ist dieser Gegensatz die Folge einer Verschiedenheit der angewendeten Mengen oder anderer differenter Versuchsbedingungen.

Die Gesamtheit der von den anderen Autoren und mir erhobenen Befunde ist meiner Meinung nach am einfachsten zu erklären, wenn man annimmt, daß das Antigen aus einem für die Immunisierung notwendigen Eiweißanteil und einem damit verbundenen, die spezifisch bindende Gruppe enthaltenden, wahrscheinlich lipoiden (s. u.) Teil besteht, welcher letzterer durch Alkohol

¹⁾ In einem soeben erschienenen kurzen zusammenfassenden Bericht über ihre Arbeiten schreiben Sordelli und seine Mitarbeiter ohne Anführung neuer Versuche „Un fait tres interessant, et qui merite une étude approfondie, c'est que les organes extraits par l'alcool ont encore le pouvoir antigenique (quoique faible) et cependant ne fixent pas les anticorps hemolytiques (Compt. rend. de la soc. de biol. 84, 174 vom 22. Januar 1921, enthaltend den Sitzungsbericht der Réunion biol. de Buenos-Aires 4. Nov. 1920).

und teilweise durch Äther abgetrennt wird. Diese Anschauung wird dadurch sehr nahe gelegt, daß ich in früheren Arbeiten¹⁾ über Immunsereen gegen Azoproteine fand, daß diese Seren mit einfach gebauten Teilstücken des Antigens reagieren oder auch mit anderen niedrig molekularen Substanzen, wenn diese eine ähnliche Gruppe enthalten wie die charakteristische des Antigens.

Dieses Verhältnis war bei den Azoimmunsereen dadurch nachweisbar, daß hier zum ersten Male Antigene mit genau bekannter chemischer Konstitution der spezifisch bindenden Gruppen zur Verwendung kamen. Da es zweckmäßig sein wird, für spezifisch bindende aber nicht immunisierende²⁾ Stoffe eine Bezeichnung zu haben, will ich dafür den Ausdruck Hapten benützen und in Vorschlag bringen³⁾.

Diese Bezeichnung ist unabhängig davon, ob meine Annahme über die Natur des heterogenetischen Antigens zutrifft, doch für die durch Alkohol abtrennbaren, heterogenetischen Lysin bindenden, aber nicht immunisierenden Substanzen mit Nutzen verwendbar, während bisher dafür der nicht gut passende Ausdruck Antigen benützt wurde.

Der Fall des heterogenetischen Antigens ist übrigens unter den natürlich vorkommenden Antigenen nicht der erste oder einzige seiner Art.

So erhielt Waelsch (Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 71, 503. 1913) durch Immunisierung mit einer Art von Subtilisbakterien Immunsereen, die mit einem Acetonextrakt der Bacillen Komplementbindung gaben, während die Injektion der Acetonextrakte selbst keine Antikörperbildung bewirkte. Dieser Fall zeigt demnach volle Analogie mit dem des heterogenetischen Antigens⁴⁾.

¹⁾ Diese Zeitschr. 93, 106; 104, 280.

²⁾ Oder im Vergleich zum Bindungsvermögen unverhältnismäßig schwach immunisierende Stoffe.

³⁾ Vgl. Spronck, Nederl. Tijdschr. van Geneesk. 1, 2132. 1921. Andere schon vorhandene Ausdrücke, z. B. freie Receptoren, sind nicht verwendbar, da sie für Substanzen mit Antigenwirkung angewendet werden.

⁴⁾ Die wirksame reine Substanz muß darum nicht acetonlöslich sein, da Lipide in Mischungen mit anderen Stoffen dieser Art bekanntlich oft eine veränderte Löslichkeit zeigen.

Nahe verwandt sind die früheren Beobachtungen von Kurt Meyer über Bandwurmantigene. Dieser Autor fand zunächst (Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 11, 211. 1911)¹⁾, daß Bandwurmlipide mit spezifischen Antiseren Komplementbindung bewirken, aber keine Antikörperbildung hervorrufen. Andererseits war nach Ätherextraktion wässriger Bandwurmextrakte nicht nur das Komplementbindungsvermögen fast aufgehoben, sondern auch die Antigenwirkung bedeutend geschwächt. Danach führte auch Meyer die Antigenwirkung auf ein Zusammenwirken von Lipoiden mit wahrscheinlich eiweißartigen Körpern zurück, eine Ansicht, die er aber später nicht aufrechthielt. Nach diesen Ergebnissen bestünde auch hier eine vollständige Analogie zu dem Verhalten des heterogenetischen Antigens in den Versuchen von Sordelli und Fischer und von mir. Später fand K. Meyer²⁾ aber eine, wenn auch geringe Antikörperbildung mit Tuberkelbacillenlipoiden und auch mit Lipoiden von Bandwürmern. Das cephalinähnliche Lipoid hatte gute Antigenwirkung; bei der lecithinartigen Fraktion war die Antikörperbildung trotz starken Bindungsvermögens in vitro schwach und inkonstant. Diese Unverhältnismäßigkeit der Antigenwirkung bei den lecithinähnlichen Körpern stellt also doch wieder eine gewisse Übereinstimmung zu dem heterogenetischen Antigen her, um so mehr, als es noch möglich ist, daß unter gewissen Bedingungen z. B. bei Anwendung größerer Substanzmengen auch in diesem Falle noch Antigenwirkung zu erzielen sein könnte (vgl. die oben mitgeteilte erste Versuchsreihe).

Eine Aufklärung dieser noch nicht durchsichtigen Verhältnisse wäre gegeben, wenn man annehmen dürfte, daß Lipide unter Umständen im injizierten Tiere Verbindungen mit Proteinen eingehen und dadurch zu Antigenen würden.

Zu erwähnen ist noch, daß K. Meyer auch eine spezifische Ausflockung von Bandwurmlipoiden mit Immuserum erhielt, ebenso wie Sordelli und Pico und Sachs und Guth mit dem alkohollöslichen Hapten der Meerschweinchen und Pferdeniere und anderen Organen.

Eine andere hierher gehörende Beobachtung liegt möglicher-

¹⁾ S. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 7, 732. 1910; 9, 530. 1911.

²⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 20, 367. 1913; 15, 245. 1912.

weise, wie schon K. Meyer¹⁾ anführt, in den Mitteilungen von Kleinschmidt²⁾ (s. Much) über Reaktionen des Serums von Leprösen mit gewissen Lipoiden vor.

Da auch der Wassermannschen Reaktion nach den Arbeiten von mir und meinen Mitarbeitern³⁾ und anderen Autoren⁴⁾ in einer Einwirkung auf Lipoiden besteht, so kann die Frage aufgeworfen werden, ob auch hier ein ähnlicher Mechanismus wie bei den heterogenetischen Antikörpern anzunehmen ist. Dies käme besonders in Betracht, wenn man die zuerst von Weil⁵⁾ gemachte Annahme zugrunde legt, daß die wirksamen Substanzen des Syphilisserums echte Antikörper seien, die durch die Antigenwirkung von durch den pathologischen Prozeß entstandenen Zerfallsprodukten der Organe entstehen.

Zu einer rationellen Beantwortung der Frage sind offenbar neue Untersuchungen nötig.

Kurt Meyer deutet in seiner letzten Arbeit⁶⁾ die von ihm gefundenen Tatsachen dahin, daß er in den Lipoiden selbst Antigene sieht, die zum Teil nur einen sehr schwachen Sekretionsreiz — Ictus immunisatorius — im Sinne Ehrlichs ausüben. In ähnlicher Weise fassen auch Sordelli und Fischer⁷⁾ das Fehlen einer immunisierenden Wirkung der Alkoholextrakte auf.

Die von mir versuchte Deutung des heterogenetischen Antigens als Lipoideiweißverbindung scheint mir, wie bemerkt, den Tatsachen im allgemeinen gut zu entsprechen. Die Vorstellung von dem Bindungs- und Immunisierungsvermögen derartiger Lipoproteinsubstanzen wurde übrigens schon früher durch mich und andere Autoren diskutiert⁸⁾.

Eine gewisse Schwierigkeit scheint darin zu bestehen, daß die mit kaltem Alkohol extrahierte Organsubstanz noch deutlich, wenn auch schwach, immunisiert, aber fast nicht mehr bindet. Sordelli und Fischer nehmen an, daß es sich vielleicht um Reste unveränderten Antigens handelt. Ich möchte hinzufügen, daß man noch daran denken kann, daß durch Extraktion eines Teiles der Lipoiden die Eigenschaften des ganzen Komplexes

¹⁾ l. c. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **11**, 211.

²⁾ Berl. klin. Wochenschr. 1910, S. 57.

³⁾ Landsteiner, Müller und Poetzl, Wien. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 51.

⁴⁾ Porges und Meyer, Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 51; Levaditi und Yamanouchi, Soc. Biol. 1907, Nr. 38.

⁵⁾ Weil und Braun, Wien. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 18; 1908; 1909. — Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 49, 52. Vgl. z. B. Breinl, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **29**, 463. 1920.

⁶⁾ l. c. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **20**, 367; cf. **11**, 214.

⁷⁾ l. c. S. 266.

⁸⁾ Landsteiner und v. Eisler, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. **39**, 317. 1905; Pick und Schwartz, diese Zeitschr. **15**, 453. 1909; Bordet, *Traité de l'immunité*. Masson, Paris 1920, S. 486.

in bestimmter Weise verändert sein könnten. Einer weiteren Aufklärung bedarf auch noch der Widerspruch, der darin zu bestehen scheint, daß nach Friedberger und Suto¹⁾ die alkohollösliche (nicht durch Phosphorwolfransäure fällbare) Fraktion des Pferdeharnes heterogenetische Antikörper erzeugt.

Die chemische Beschaffenheit des bindenden Körpers untersuchten Wornicke und Sordelli²⁾ und fanden, daß er eine in warmem Äthyl- und Methylalkohol, ferner in Benzol, Toluol, Xylol leicht lösliche, in Äther unlösliche Substanz ist, die Stickstoff und Phosphor enthält. Meine eigenen Beobachtungen decken sich zum Teil nicht ganz mit diesen Angaben. So erhielt ich bei einem in bestimmter Weise hergestellten Präparat durch Kochen mit Benzol und Filtrieren eine nur schwach opaleszierende, scheinbare Lösung, die aber bei starkem Zentrifugieren auffallenderweise ein gallertartiges, gequollenes Sediment lieferte, das starkes Bindungsvermögen besaß. Es wäre wohl möglich, daß solche Differenzen durch einen verschiedenen Grad der Reinheit der Präparate bedingt sein könnten und meine Versuche müßten in dieser Beziehung vervollständigt werden.

Nachtrag.

Die in der vorliegenden Mitteilung wiedergegebene Auffassung erhält dadurch eine starke Stütze, daß ich in neuen Versuchen eine Bildung von Hämolyisin für Schafblut bei Kaninchen erhielt, denen ich eine (erwärmte oder nicht erwärmte) Mischung zweier unwirksamer (s. o.) Komponenten, nämlich von verdünntem Schweineserum und alkoholischem Pferdenierenextrakt injizierte. Über diese Versuche wird noch eingehender zu berichten sein.

¹⁾ l. c. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 28, 217.

²⁾ Inst. bacteriol. Buenos Aires 2, Nr. 3, S. 281. 1919. In dem schon erwähnten neuen kurzen Bericht (Soc. Biol. 1921, Nr. 3) bezeichnen die Autoren die isolierte Substanz als ein Cerebrosid.

Weitere Ausarbeitung der Indikatorenmethode ohne Puffer.

Von
L. Michaelis und R. Krüger¹⁾.

(Eingegangen am 20. April 1921.)

Mit 1 Abbildung im Text.

I. Normierung der elektrometrischen p_{H} -Messung.

Der Zweck dieser Untersuchungen ist es, die vor kurzem beschriebene Methode zur Messung von p_{H} durch Indikatoren ohne Puffer²⁾ zu vervollkommen. Da zur Eichung dieser Methode andauernd elektrometrische p_{H} -Bestimmungen erforderlich sind, wollen wir damit beginnen, einige Erörterungen über die Normierung der elektrometrischen p_{H} -Messung mitzuteilen, welche sich auf Grund neuerer Kenntnisse als notwendig erwiesen haben. Die elektrometrische Messung beruht bekanntlich auf der Messung der EMK. von Konzentrationsketten mit Wasserstoffelektroden derart, daß das p_{H} der einen Lösung als bekannt vorausgesetzt wird. Hierbei ist es gleichgültig, ob man wirklich eine solche Konzentrationskette herstellt oder statt dessen eine Wasserstoffelektrode gegen eine Kalomelektrode ableitet. Denn auch die Eichung der Kalomelektrode beruht auf der Vergleichung mit einer Wasserstoffelektrode, für welche das p_{H} der Lösung als bekannt vorausgesetzt wird. Bis vor kurzem schien es nun keine Schwierigkeit zu bereiten, eine Lösung mit bekanntem p_{H} als Ausgangslösung herzustellen. Man wählte dazu z. B. HCl-Lösungen bekannter Konzentration, meist zur Verminderung der Diffusionspotentiale versetzt mit einem Überschuß von KCl. Die $[H]$ einer solchen Lösung wurde auf folgende Weise berechnet: Man nahm die Arrhenius'sche Regel als gültig an, daß in einer Mischung

¹⁾ Für Kapitel II, IV, VI, VII.

²⁾ L. Michaelis u. A. Gyemant, Diese Zeitschr. **109**, 165. 1920.

von HCl + KCl der Dissoziationsgrad der HCl der gleiche sei wie in einer reinen HCl-Lösung von gleichem Cl-Gehalt wie die Mischung. Den Dissoziationsgrad einer solchen HCl-Lösung berechnete man aber aus dem Verhältnis des molekularen Leitvermögens der HCl in dieser Lösung im Vergleich zur molekularen Leitfähigkeit von HCl in einer unendlich verdünnten HCl-Lösung. An der Richtigkeit dieser Rechnung sind durch die Untersuchungen von Bjerrum¹⁾, Milner²⁾, Ghosh³⁾, Noyes⁴⁾ u. a. berechnete Zweifel entstanden. Wir haben durch diese Untersuchungen zweierlei gelernt: 1. Es ist nicht richtig, daß man aus den Leitfähigkeitsdaten den wahren Dissoziationsgrad erfährt; 2. es trifft nicht zu, daß wir mit den Konzentrationsketten die wahre Konzentration der H⁺-Ionen messen, sondern wir messen eine Größe, welche Bjerrum im Anschluß an gewisse Begriffsbestimmungen von Lewis die H-Ionenaktivität nennt, und welche nur in äußerst verdünnten Lösungen der wahren Konzentration der H-Ionen gleich ist. Die nach Bjerrum definierte „aktive Masse“ der Ionen und nicht die wahre Masse ist es aber auch, welche wir bei allen Reaktionen der H⁺-Ionen in das Massenwirkungsgesetz einsetzen müssen, und sie ist es auch, die wir bei allen biologisch wichtigen Wirkungen der H⁺-Ionen erfahren wollen. Die Umlösung, die wir für die Konzentrationsketten nötig haben, muß also so beschaffen sein, daß wir ihre H⁺-Aktivität genau kennen. Nun sind die Forschungen über den wirklichen Betrag dieser Größe noch in vollem Fluß und es wäre verfrüht, sich auf ganz bestimmte Zahlen festzulegen. Es bleibt uns somit vorläufig nur übrig, die H⁺-Aktivität der Umlösung nach der alten Methode zu berechnen und uns bewußt zu bleiben, daß alle unsere elektrometrischen p_H -Messungen einen kleinen Fehler enthalten. Um nun zu bewirken, daß dieser Fehler eine konstante Größe sei, so daß alle Messungen von p_H stets mit dem gleichen additiven Fehler behaftet sind und somit ihre praktische Verwertbarkeit in vollem Umfange behalten, ist es notwendig, von einer einzigen geeigneten Umlösung auszugehen, ihr p_H vorläufig auf alte Weise zu berechnen und alle Messungen

¹⁾ N. Bjerrum, Zeitschr. f. Elektrochem. **24**, 321. 1918.

²⁾ Milner, Philos. Magaz. **23**, II, 551. 1912 und **25**, II, 742. 1913.

³⁾ J. Chandra Ghosh, Journ. of the chem. soc., **113**, 449, 707, 790. 1918

⁴⁾ Noyes und Mac Innes, Journ. Americ. Chem. Soc. **42**, 239. 1920

auf diese zu beziehen. Wenn dann in Zukunft die H^+ -Aktivität dieser Urlösung definitiv festgelegt sein wird, sind alle unsere p_H -Messungen durch Addition einer ganz bestimmten Zahl (wahrscheinlich höchstens $+0,05$) korrigierbar. Vorläufig können wir aber die Zahlen ohne diese Korrektur ohne Störung benutzen.

Diese Urlösung ist am besten eine Mischung von wenig HCl mit einem Überschuß von KCl, welche derart gewählt wird, daß ihr Diffusionspotential gegen eine gesättigte KCl-Lösung verschwindend klein wird. Die Lösung muß also sehr wenig HCl enthalten, aber immerhin soviel, daß ihr p_H durch unvermeidliche Verunreinigungen durch Kohlensäure oder durch Alkali aus dem Glas nicht merklich gestört wird. Als eine derartige Urlösung schlage ich vor: 0,1 n-HCl 5 ccm; n-KCl 19,5 ccm; Wasser auf 200 ccm, d. h. eine Lösung von 0,0025 n-HCl und einem gesamten Chlorgehalt von 0,1 n. Diese Lösung hat, wie ich mich überzeugt habe, kein meßbares Diffusionspotential gegen eine gesättigte KCl-Lösung; denn die Ableitung mit 3,5 n und mit 1,7 n-KCl-Lösung ergab keinen Unterschied im Potential (Bjerrumsches Kriterium). Andererseits ist der HCl-Gehalt groß genug, um durch die unvermeidlichen Verunreinigungen eines sonst guten Wassers nicht beeinflußt zu werden. In dieser Lösung ist p_H , nach der Arrhenius'schen Regel und unter Zugrundelegung der Kohlrausch'schen Leitfähigkeitsmessungen genau in dem Sinne wie es Sørensen¹⁾ gemacht hat, = 2,640. Nach Bjerrum²⁾ berechnet wäre p_H = 2,695; jedoch werden wir bis zur völligen Sicherung dieser Zahl den Wert 2,640 anwenden.

Da nun diese Urlösung nicht unbegrenzt haltbar ist, benutzen wir aus Bequemlichkeitsgründen bei der täglichen Arbeit nicht diese Lösung, sondern die „Standardacetatlösung“, nachdem wir ihr p_H an jener Urlösung geeicht hatten. Diese zu ganz verschiedenen Zeiten wiederholten Eichungen ergaben folgendes:

Temperatur	p_H des Standardacetat	
20,0°	4,614	} im Mittel p_H = 4,616
19,5°	4,618	
20,0°	4,617	
20,0°	4,615	
16,5°	4,618	

¹⁾ Sørensen, Diese Zeitschr. 21, 131. 1909.

²⁾ Nach brieflicher freundlicher Auskunft durch Bjerrum.

Diese Zahl kann unbedenklich für ein Temperaturintervall von mindestens 15—25° verwendet werden, da p_{H} in einem Acetatpuffer von der Temperatur äußerst wenig abhängig ist.

In Wirklichkeit benutzten wir als Ableitungselektrode die gesättigte Kalomelektrode, und zwar in der Weise, daß an jedem Tage ihr Potentialunterschied gegen Standardacetat bestimmt wurde, in demselben Elektrodengefäß unter genau denselben Bedingungen, unter denen die p_{H} -Bestimmungen in den weiterhin zu untersuchenden Lösungen vorgenommen wurden. Wir benutzten immer die gleiche Kalomelektrode. Ihr Potentialunterschied gegen Standardacetat schwankte in mehreren Monaten zwischen 514,0 und 515,0 Millivolt¹⁾, er wurde an jedem Versuchstage von neuem festgestellt.

II. Die Eichung des m-Nitrophenols für Zimmertemperatur.

Die in der früheren Arbeit ausgeführte Eichung des m-Nitrophenol erschien uns noch nicht genügend. Da wir zu diesem Indikator erst ganz zuletzt gelangten, wurde seine Untersuchung nicht mit derselben Gründlichkeit durchgeführt wie bei den anderen Indikatoren. Da nun dieser Indikator dasjenige p_{H} -Bereich umspannt, welches für physiologische Lösungen, Meerwasser u. dgl. das wichtigste ist und daher bisher durch keinen anderen Indikator ersetzt werden kann²⁾, hielten wir seine nochmalige Eichung für notwendig. Diese wurde folgendermaßen ausgeführt: Phosphatpuffer wurden teils mit CO₂-freiem Wasser, teils mit NaCl-Lösungen verdünnt und einerseits elektrometrisch p_{H} , andererseits auf die in der vorigen Arbeit beschriebenen Weise der Farbgrad bestimmt. Je 25 ccm der Lösung wurden mit 0,5—1,0 ccm 0,3 proz. Lösung von m-Nitrophenol versetzt und eine andere Probe ohne Zusatz

¹⁾ Der absolute Betrag dieser Kalomelektrode ist also um etwa 2 Millivolt verschieden von der im Jahre 1914 benutzten; verschiedene in den letzten Jahren hergestellte Elektroden standen dem neuen Wert meist näher als dem alten. Das wichtigste ist daß eine gut abgelagerte Kalomelektrode konstant ist; der absolute Betrag ist ja bei dieser Arbeitsweise belanglos. Es ist möglich, daß diese Unterschiede durch den Reinheitsgrad des KCl bedingt werden; Spuren von Verunreinigungen mit anderen Chloriden müssen auf den Cl-Gehalt der „gesättigten“ Lösung von Einfluß sein.

²⁾ Die Farbwerke Leopold Cassella & Co. in Frankfurt a. M. haben sich in dankenswerter Weise bereit erklärt m-Nitrophenol von jetzt ab zu fabrizieren.

Tabelle I.

Puffer	dessen Konzentration	Konzentration des zugesetzten NaCl normal	Konzentration des Indikatoren % ₁₀₀	Farb-grad	γ	pH elektrometrisch	pH berechnet	pH Mittel
Phosphat	n/300	—	0,12	0,170	0,689	7,696	8,385	8,330
„	n/150	—	0,06	0,192	0,629	7,683	8,312	
„	n/75	—	0,06	0,181	0,656	7,719	8,375	
„	n/150	—	0,06	0,120	0,813	7,389	8,202	
„	n/150	—	0,06	0,0475	1,289	7,030	8,319	
„	n/150	—	0,06	0,0567	1,220	6,984	8,259	
„	n/375	—	0,06	0,050	1,289	7,066	8,355	
„	n/375	—	0,06	0,0525	1,289	7,062	8,318	
„	n/300	—	0,06	0,100	0,955	7,363	8,318	
„	n/75	—	0,048	0,175	0,674	7,683	8,357	
„	n/75	—	0,048	0,185	0,644	7,683	8,327	
„	n/150	0,05	0,06	0,260	0,454	7,752	8,206	
„	n/750	0,1	0,18	0,067	1,144	7,157	8,301	
„	n/300	0,1	0,12	0,125	0,845	7,398	8,243	
„	n/150	0,1	0,06	0,280	0,410	7,747	8,157	
„	n/75	0,1	0,072	0,113	0,895	7,311	8,206	
„	n/750	0,185	0,18	0,060	1,195	7,068	8,263	
„	n/300	0,185	0,12	0,110	0,908	7,298	8,206	
„	n/300	0,145	0,12	0,115	0,886	7,398	8,284	
„	n/150	0,145	0,06	0,283	0,404	7,800	8,204	
„	n/150	0,145	0,06	0,220	0,550	7,614	8,164	
„	n/150	0,20	0,06	0,230	0,525	7,658	8,183	
„	n/75	0,20	0,084	0,090	1,005	7,186	8,191	
„	n/300	0,25	0,12	0,069	1,130	7,037	8,167	
„	n/750	0,28	0,18	0,0533	1,249	6,955	8,204	
„	n/300	0,28	0,12	0,090	1,005	7,161	8,166	
„	n/75	0,30	0,084	0,093	0,989	7,134	8,123	
„	n/75	0,30	0,084	0,0743	1,096	7,077	8,173	
„	n/75	0,30	0,084	0,111	0,904	7,308	8,212	
„	n/750	0,40	0,18	0,0467	1,311	6,877	8,188	
„	n/300	0,40	0,18	0,080	1,061	7,159	8,170	
„	n/300	0,40	0,24	0,0275	1,550	6,644	8,194	
„	n/150	0,40	0,12	0,165	0,704	7,448	8,152	
„	n/75	0,40	0,096	0,078	1,073	7,068	8,141	
„	n/75	0,50	0,084	0,093	0,989	7,160	8,149	
„	n/75	0,50	0,084	0,0914	0,998	7,146	8,144	
„	n/750	0,57	0,18	0,042	1,358	6,807	8,165	
„	n/300	0,57	0,18	0,073	1,104	7,112	8,216	
„	n/75	0,60	0,072	0,117	0,878	7,321	8,199	
„	n/75	0,70	0,096	0,090	1,005	7,061	8,066	
„	n/300	0,78	0,18	0,067	1,144	7,033	8,177	
„	n/150	0,80	0,06	0,164	0,707	7,452	8,159	
„	n/300	1,0	0,18	0,060	1,195	6,995	8,190	
„	n/300	1,0	0,12	0,103	0,940	7,158	8,096	
„	n/150	1,0	0,12	0,120	0,870	7,296	8,166	

des Indikators elektrometrisch gemessen. Ist F der Farbgrad, p_k der Indikatorexponent (negativer Logarithmus der Dissoziationskonstante des Indikators), so ist:

$$p_k = p_H + \log \frac{1 - F}{F}$$

oder

$$p_k = p_H - \varphi.$$

Die Untersuchungen ergaben folgendes (s. Tabelle I):

Wie wir früher auseinandersetzen, ist zu erwarten, daß das scheinbare p_k der Lösung je nach dem Salzgehalt derselben etwas verschieden ausfällt. Betrachten wir unsere Tabelle daraufhin, so bemerken wir folgendes: Das p_k in einer praktisch salzfreien Lösung ist in der Tat etwas größer als in den salzhaltigen; aber von einem Salzgehalt von 0,1 n an ist die maximale Änderung, welche das Salz hervorruft, schon fast erreicht und ändert sich bis in die höchsten untersuchten Konzentrationen (1 n) nur wenig weiter. Der größte Einfluß bei Änderung der Salzkonzentration besteht in ganz niederen Salzkonzentrationen. Wir schlagen auf Grund dieser Zahlen folgende Tabelle vor:

Tabelle II.

Reduziertes p_k' für m-Nitrophenol bei verschiedenen NaCl-Gehalt.

n-Salzgehalt	Reduziertes p_k' für 17°	Es ist also die Verkleinerung von p_k durch das Salz:
0—0,01	8,33	0
0,05 (interpoliert)	8,28	0,05
0,10	8,23	0,10
0,15 (phys. NaCl-Lösung)	8,22	0,11
0,20	8,18	0,15
0,30—0,60 ¹⁾	8,17	0,16
bis 1,0	8,15	0,18

III. Der Temperatureinfluß bei m-Nitrophenol.

Was nun den Temperaturkoeffizienten von p_k betrifft, so gilt nach den Erörterungen der früheren Arbeit die folgende Beziehung:

$$\frac{dp_k}{d\tau} = \frac{d \log \frac{F}{1-F}}{d\tau} + \frac{dp_H}{d\tau} = \frac{d\varphi}{d\tau} + \frac{dp_H}{d\tau}.$$

¹⁾ Dieser Salzgehalt umfaßt alle Meerwässer, so daß man für jedes beliebige Meerwasser die gleiche Konstante benutzen kann.

Das erste dieser beiden Glieder wird colorimetrisch nach der früher beschriebenen Methode ermittelt. Wiederholungen dieser Bestimmungen ergaben folgendes: In 2 Versuchsserien wurde gefunden $\frac{d\varphi}{d\tau}$ im Mittel = $-0,0653$ bzw. $-0,0077$. Nehmen wir noch die Versuchsserie aus der früheren Arbeit hinzu ($-0,0076$), so ergibt sich als Mittelwert $-0,00728$. Dieser Wert erscheint somit genügend gesichert. Nicht so sicher dagegen ist der Wert des zweiten Summanden, und es ist sehr angenehm, daß er nur ein unbedeutendes Korrekturglied darstellt. Dieses ist die Änderung von p_H in einem gegebenen Phosphatpuffer pro Grad Temperaturänderung. Er wurde in der früheren Arbeit aus calorimetrischen Daten = $0,00395$ berechnet. Experimentell mit Hilfe von p_H -Messungen fanden Michaelis und Garmendia¹⁾ nur $0,002$, und eine Wiederholung dieser Bestimmung ergab in diesem Jahre fast übereinstimmend wiederum dasselbe. Inzwischen hat auch Walbum²⁾ p_H von Phosphatpuffern bei verschiedenen Temperaturen bestimmt und überhaupt keine meßbare Änderung zwischen 18° und 70° gefunden. Wir glauben daher gut zu tun, vorläufig den Mittelwert zwischen dem Wert von Walbum (= 0) und unserer eigenen ($0,002$) also $0,001$ wählen zu dürfen. Bei der Kleinheit dieses Korrekturgliedes werden wir hiermit keinen belangreichen Fehler machen. Hieraus würde sich ergeben $\frac{dp_2}{d\tau} = -0,0083$, und in der folgenden Tabelle sind die daraus berechneten Temperaturkorrekturen zusammengestellt, die an den Werten der Tabelle II angebracht werden müssen.

Tabelle III.

Temperaturkorrektur für m-Nitrophenol.

Der Wert von p_2 wird zunächst für 17° aus Tabelle II abgelesen. Beträgt die Versuchstemperatur t Grad, so ist zum Schluß folgende Größe ϕ zu addieren:

t	ϕ
5°	+0,10
10°	+0,06
15°	+0,02
$17,5^\circ$	± 0

¹⁾ Diese Zeitschr. 67, 431. 1914.

²⁾ Walbum, Diese Zeitschr. 107, 219. 1920.

t	ϑ
20°	-0,02
25°	-0,06
30°	-0,11
35°	-0,15
40°	-0,18
45°	-0,22
50°	-0,26

Eine ganz exakte p_{H} -Bestimmung mittels m-Nitrophenol geschieht also nach der Formel

$$p_{\text{H}} = p_{\text{H}}' - \varphi + \vartheta .$$

p_{H}' wird je nach dem Salzgehalt der Lösung aus Tabelle II entnommen; $\varphi = \log \frac{1-F}{F}$, wo F der Farbgrad ist, φ ist graphisch aus der früheren Kurve¹⁾ zu entnehmen, und ϑ ist die Temperaturkorrektur aus Tabelle III.

Schließlich muß noch eine Eigentümlichkeit der m-Nitrophenol besprochen werden. Der Übergang der farblosen in die gefärbte Modifikation beruht wie bei allen Indikatoren nach der anerkannten und nicht mehr als Gegensatz zur Ostwaldschen empfundenen Theorie von Hantzsch auf einer tautomeren Umlagerung der Pseudosäure in die echte Säure. Diese Umlagerung geschieht bei den meisten Indikatoren mit unmeßbarer Geschwindigkeit, bei anderen Farbstoffen wie Säurefuchsin, Wasserblau u. a. sehr langsam. Bei m-Nitrophenol erfolgt sie für gewöhnlich unmeßbar schnell, nur in äußerst elektrolytarmer Lösung wie Flußwasser vergehen etwa 3 Minuten bis zur Einstellung der definitiven Farbtiefe, die Farbe ist im ersten Augenblick heller als im definitiven Zustand. Man soll also bei der Messung von Fluß- und Wasserleitungswasser die Farbvergleiche nicht früher als 4 Minuten nach Zusatz des Indikators ausführen.

IV. Erweiterung der Indikatorenreihe.

Zwischen dem für p-Nitrophenol und α -Dinitrophenol günstigsten p_{H} -Bereich findet sich noch eine Lücke, die nicht einwandfrei überbrückt ist; nur zur Not kann, wie wir in der früheren Mitteilung erwähnten, noch p-Nitrophenol bei ganz farblosen Flüssigkeiten in diesem Bereich verwendet werden. Wir bemühten uns

¹⁾ Michaelis u. Gyemant, Diese Zeitschr. 109, S. 204 und 205.

deshalb, geeignete einfarbige Indikatoren für dieses Gebiet zu finden. Auf Grund der vorliegenden Bestimmungen von Dissoziationskonstanten¹⁾ vermuteten wir, daß unter den bisher noch nicht von uns untersuchten Isomeren der Dinitrophenole sich geeignete Körper finden würden. Außer den von uns schon benutzten Isomeren wurden von Holleman und Wilhelmy²⁾ (C. 1, 509. 1903) noch dargestellt:

	Dissoziationskonstante bei 25° nach Bader ¹⁾
γ -Dinitrophenol = 1 Oxy, 2,5-Dinitrobenzol	7 · 10 ⁻⁶
δ -Dinitrophenol = 1 Oxy 3,4-Dinitrobenzol	3,7 · 10 ⁻⁶
ϵ -Dinitrophenol = 1 Oxy, 2,3-Dinitrobenzol	1,2 · 10 ⁻⁶

Wir sind Herrn Dr. L. Benda zu größtem Dank verpflichtet, daß er auf unsere Anregung diese zum Teil sehr mühsam herstellbaren Körper in der Fabrik von Leop. Cassella & Co. in Frankfurt a. M. dargestellt und uns zur Verfügung gestellt hat. Die Bestimmung der Indikatorkonstanten ergaben folgendes Resultat.

Die Ausgangslösung war „Standardacetat“ (100 ccm n-NaOH, 200 ccm n-Essigsäure, 700 ccm dest. Wasser). Diese Lösung wurde in den Versuchen 5fach verdünnt, teils mit Wasser, teils mit NaCl-Lösungen. Versuchstemperatur 17° ($\pm 0,5^\circ$).

	Definitiver NaCl-Gehalt	F	φ	p _H elektro- metrisch	Redu- ziertes p _H	Mittel
γ -Dinitrophenol	0	0,250	0,477	4,665	5,142	} 5,16
	0	0,245	0,489	4,665	5,154	
	0	0,225	0,513	4,665	5,178	
	0,15 n	0,230	0,525	4,557	5,082	} 5,08
	0,15 n	0,230	0,525	4,557	5,082	
	0,15 n	0,235	0,513	4,557	5,070	
	0,5 n	0,230	0,525	4,484	5,009	} 5,01
	0,5 n	0,220	0,555	4,484	5,034	
	0,5 n	0,225	0,507	4,484	4,991	
δ -Dinitrophenol	0	0,170	0,689	4,665	5,354	
	0,15 n	0,154	0,740	4,557	5,297	
	0,5 n	0,146	0,787	4,484	5,251	
ϵ -Dinitrophenol	0	0,385	0,203	4,665	4,868	
	0,15 n	0,385	0,203	4,557	4,760	
	0,5 n	0,370	0,231	4,484	4,715	

¹⁾ Bader, Zeitschr. f. physikal. Chemie 6, 289. 1890.

²⁾ A. F. Holleman und O. Wilhelmy, Recueil de travaux chim. des Pays-Bas 31, 432. 1903; zit. nach Chem. Centralblatt 1, 509. 1903.

Zur Ausfüllung unserer Indikatorenlücke ist somit ϵ -Dinitrophenol der ungeeignetste, es unterscheidet sich von α -Dinitrophenol am wenigsten. Der geeignetste wäre δ -Dinitrophenol. Da aber seine Darstellung ganz besonders schwierig ist und γ -Dinitrophenol auch noch sehr gut brauchbar ist, schlagen wir das letztere zum praktischen Gebrauch vor. Deshalb bestimmten wir für das γ -Präparat auch den Temperaturkoeffizienten. Die Methode war die gleiche wie die früher für das α -Dinitrophenol beschriebene. Der Versuch ergab für eine mit Wasser 5fach verdünnte Standardacetatlösung, für die wir p_H als unabhängig von der Temperatur betrachten dürfen, folgendes:

Temperatur	F	$\log \frac{1-F}{F} = \varphi$
12,5°	0,215	0,562
17,0°	0,240	0,501
38,0°	0,285	0,400
46,0°	0,290	0,389

Hieraus ergibt sich durch graphische Mittelung für $\frac{d\varphi}{d\tau} = \frac{dp_k}{d\tau} = 0,0049$.

Hieraus ergibt sich für γ -Dinitrophenol folgende Tabelle:

Tabelle IV.

p_k des γ -Dinitrophenol einschließlich Salz- und Temperaturkorrektur.

p_k für 17° bei		
Salzgehalt = 0	0,15 n	0,5 n
$p_k = 5,15$	5,08	5,02
Temperaturkorrektur für		
5°		+0,06
10°		+0,03
15°		+0,01
17°		± 0
20°		-0,01
25°		-0,04
30°		-0,06
40°		-0,11
50°		-0,16

Für weitere Indikatoren liegt vorderhand kein Bedürfnis vor. Das γ -Dinitrophenol füllt aber besonders für den Bakterio-

logen und Gärungschemiker eine empfindliche Lücke aus, weil es dasjenige p_H -Bereich umspannt, welches den durch Bakterien oder Hefen gesäuerten zuckerhaltigen Nährböden entspricht.

V. Der „Säurefehler“ der Indikatoren; Anwendung auf Fluß- und Meerwasser.

Die Indikatoren sind Säuren oder Basen, und, selbst in Form ihrer Alkalisalze bzw. Chloride verwendet, keine Neutralsalze. Deshalb müssen sie die h der Lösung, welche man mit ihnen messen will, verändern. In den meisten Fällen wird diese Änderung unmeßbar klein, nämlich um so kleiner, je besser die zu untersuchende Lösung gepuffert ist, und je weniger Indikator man braucht. Die meisten Indikatoren färben so stark, daß die angewendeten Mengen keine meßbare Änderungen der h hervorbringen. Trotzdem ist es von Wichtigkeit, diesem Problem nachzugehen. Das *m*-Nitrophenol hat nämlich ein verhältnismäßig schwaches Färbevermögen, und wenn man sehr schlecht gepufferte Lösungen wie Fluß- und Meerwasser mit ihm untersucht, so ist es von Wichtigkeit, sich von der Größe der verursachten Fehler eine Vorstellung zu machen. Das Problem kann allgemein folgendermaßen formuliert werden. Gegeben sei eine Pufferlösung, bestehend aus einer schwachen Säure und ihrem Salz (also $\text{CO}_2 + \text{Bicarbonat}$); nunmehr werde eine zweite schwache Säure, der Indikator, hinzugefügt. Es scheint mir für die Entwicklung des Problems am vorteilhaftesten, den Puffer sich zusammengesetzt zu denken aus der Gesamtmenge A_1 der schwachen Säure (CO_2) und der dem Bicarbonat äquivalenten Menge Natronlauge L . Dann ist die freie $\text{CO}_2 = A_1 - L$, das Bicarbonat $= L$, und es ist

$$h = k_1 \cdot \frac{[A_1 - L]}{[L]}, \quad (1)$$

wo L stets $< A$ sein muß, und wo k die Dissoziationskonstante der CO_2 ist. Nunmehr werde eine zweite Säure, der Indikator, in der Konzentration A_2 hinzugefügt; die Dissoziationskonstante dieser Säure sei $= k_2$.

Dann wird das Gleichgewicht verschoben. Die gesamte Lauge, L , verteilt sich zwischen die beiden Säuren; die beiden Anteile der Lauge seien L_1 und L_2 ; unter $[L_1]$ können wir die

Konzentration der Anionen der ersten Säure, unter $[L_2]$ die der zweiten verstehen.

Dann bestehen folgende Beziehungen:

$$\frac{[H'] \cdot [L_1]}{[A_1 - L_1]} = k_1,$$

$$\frac{[H'] \cdot [L_2]}{[A_2 - L_2]} = k_2,$$

$$L_1 + L_2 = L.$$

Wir haben 3 Gleichungen für die 3 Unbekannten H' , L_1 , L_2 . Lösen wir sie nach $[H']$ auf, so erhalten wir zunächst eine quadratische Gleichung, von der nur die eine Wurzel physikalische Bedeutung hat:

$$[H'] = M + \sqrt{M^2 + N} \quad (2)$$

wo
$$M = \frac{k_1(A_1 - L) + k_2(A_2 - L)}{2L}$$

und
$$N = k_1 \cdot k_2 \cdot \frac{(A_1 + A_2 - L)}{L}.$$

Mit Hilfe dieser Gleichung sind wir imstande, den Einfluß des Indikators auf die h zu berechnen¹⁾. Führen wir die Rechnung an einem konkreten Fall durch, und zwar auf den Fall, wo die Bedingungen dafür am meisten gegeben zu sein scheinen, daß der Indikator diejenige h , die er messen soll, verschiebt. Die zu messende Lösung sei Wasserleitungswasser, also eine sehr schlecht gepufferte Lösung, und der Indikator m-Nitrophenol, also ein wenig farbkraftiger Indikator, von dem man ziemlich viel braucht.

Wir können angenähert das Leitungswasser betrachten als eine Lösung mit 0,0036 mol. Bicarbonat und 0,0003 mol. freie CO_2 . Dann ist also $A_1 = 0,0039$, $L = 0,0036$, $k_1 = 3,10^{-7}$.

¹⁾ Die Gleichung kann auf jedes kombinierte Puffersystem angewendet werden, z. B. für das biologisch höchst wichtige, von Windisch und Dietrich studierte System Phosphat + Carbonat. Mischt man z. B. CO_2 und Na_2HPO_4 , so ist A_1 die molare Konzentration der gesamten Kohlensäure; A_2 ist die Konzentration der insgesamt vorhandenen zweiten Säure, als welche man sich die dem Na_2HPO_4 entsprechende Menge NaH_2PO_4 vorzustellen hat; L ist die Hälfte des in dem Na_2HPO_4 vorhandenen Na. Für k_1 und k_2 hat man die auf den betreffenden Gesamt-Na-Gehalt „reduzierten“ Dissoziationskonstanten der Kohlensäure und der Phosphorsäure (der zweiten Stufe) einzusetzen.

In dieser Lösung ist

$$\lambda = 2,5 \cdot 10^{-8}$$

$$p_{\lambda} = 7,60.$$

Nun setzen wir m-Nitrophenol hinzu. Eine schon mehr als reichliche Menge ist 0,5 ccm einer 0,3 proz. Lösung auf ein etwas breites Reagensglas mit 25 ccm Wasser; die Lösung ist also 0,00085 molar an Farbstoff und es ist $A_2 = 0,00085$; $k_2 = 4,9 \cdot 10^{-9}$. Hieraus ergibt sich für das Gemisch:

$$M = 1,063 \cdot 10^{-8}$$

$$N = 4,70 \cdot 10^{-10}$$

$$\lambda = 3,48 \cdot 10^{-8}$$

$$p_{\lambda} = 7,46$$

$$p_{\lambda} \text{ ohne Indikator} = 7,60.$$

Der Fehler hat also für p_{λ} den Betrag $-0,14$.

Wendet man nur die Hälfte des Indikators an, was praktisch immer noch eine überflüssig reichliche Menge ist, so wäre nach dem Indikatorzusatz:

$$M = 1,03 \cdot 10^{-8}$$

$$N = 2,94 \cdot 10^{-10}$$

$$\lambda = 3,03 \cdot 10^{-8}$$

$$p_{\lambda} = 7,52$$

$$p_{\lambda} \text{ ohne Indikator} = 7,60$$

Dieser Fehler ist viel kleiner.

Zur experimentellen Bestätigung dieser Theorie wurde folgender Versuch gemacht. Wasserleitungswasser wurde mit p-Nitrophenol bei einer Temperatur von 19°C untersucht und zwar mit wechselndem Gehalt am Indikator.

Definitiver Gehalt des Wassers am Indikator		F	p_{λ}
in Proz.	in Normalität		
0,03	0,00216	0,11	7,42
0,03		0,11	7,42
0,015	0,00158	0,128	7,50
0,0075	0,00079	0,168	7,59
0,0050	0,000527	0,170	7,64
0,00375	0,000385	0,168	7,63
0,00375		0,168	7,63
0,00375		0,176	7,66

Wir sehen, daß das scheinbare p_H mit fallender Indikatormenge zu einem Grenzwert steigt, den wir etwa = 7,65 annehmen können. Die Ausschläge sind zu klein, um eine streng quantitative Bestätigung der Theorie zu ermöglichen; qualitativ wird die Theorie bestätigt.

Eine andere Probe Wasser gab als Grenzwert $p_H = 7,60$; die Sörensensche Methode ergab mit Phosphatpuffern und mit α -Naphtholphthalein ebenfalls 7,60, mit Bromthymolblau (Clark) (nur gerade noch meßbar) 7,56. Für diese Indikatoren braucht man den Säurefehler der Indikatoren nicht in Betracht zu ziehen, weil man von ihnen wegen ihres höheren Färbevermögens weniger braucht. Aber sie erfordern dafür die Puffervergleichslösungen, weil sie zweifarbig sind.

Eine entsprechende Untersuchung an Meerwasser¹⁾ ergab folgendes:

Definitiver Gehalt der
Meerwassers an
m-Nitrophenol

in Proz.	p_H	
0,012	7,49	
0,0060	7,57	
0,0040	7,73	
0,0020	7,80	
0,0012	7,90	
0,0010	7,91	Dasselbe Wasser nach der Sörensenschen Methode (Phosphate, Neutralrot; Salzfehler = 0,10 ange- nommen) ergibt $p_H = 7,90$, also übereinstimmend.
0,0010	7,84	
0,00060	7,86	
0,00050	7,89	
0,00025	7,92	
		Konstant. Mittel = 7,89

Es empfiehlt sich daher, so schlecht gepufferten Lösungen wie Meerwasser vom $p_H = 7,9$ nicht mehr als 0,001% m-Nitrophenol zuzusetzen. Ist ein Wasser saurer, so ist es auch resistenter gegen den Indikator, und man kann mehr nehmen; ist es alkalischer, so nimmt man besser noch weniger. Das kommt darauf hinaus, daß man am besten immer etwa diejenige Indikatormenge nimmt, welche dieselbe Farbtiefe erzeugt wie 0,001%

¹⁾ Die Anregung, diese Eichungen auf Meerwasser auszudehnen, stammt von Herrn Prof. Johan Hjort, auf dessen Veranlassung wir eine Probe Nordseewasser aus 51° 4' n., 0° 47,5' ö. erhielten.

bei einem p_H von 7,9. Diese Farbtiefe ist ungefähr gleich derjenigen, welche 0,0003% m-Nitrophenol in verdünnter NaOH erzeugt. Hieraus ergibt sich folgende **Vorschrift zur Messung von Fluß- und Meerwasser**:

Man benutzt 25 cm hohe Reagensgläser von etwa 15 mm innerem Durchmesser und ebenem Boden, in denen 40 ccm Wasser eine Höhe von 22—23 cm einnehmen. In ein solches Glas gibt man 40 ccm 0,01 bis 0,02 n NaOH und 0,30 ccm einer Lösung von m-Nitrophenol 1:3000. Die Farbtiefe dieses Röhrchens ist es, die man 40 ccm des zu untersuchenden Wassers ungefähr erteilen soll. Die Färbung ist nur schwach, aber gerade hierbei ist das Auge für feine Differenzen der Farbtiefe am empfindlichsten. Man beobachtet gegen eine weiße Porzellanscheibe bei gutem Tageslicht. Je nach dem p_H des Meerwassers wird man von der Indikatorlösung (1:3000) meist zwischen 0,6 bis 2 ccm auf 40 ccm Meerwasser zur Erreichung dieser Farbtiefe brauchen.

Alle diese Manipulationen sind in Wirklichkeit viel einfacher als es beim Lesen scheint.

VI. Zur Theorie des Salzfehlers.

Als Ursache für die Veränderung des Farbtones, welchen die Gegenwart eines Neutralsalzes bei gleichem p_H hervorruft, haben wir in der früheren Arbeit 2 Momente herangezogen: 1. Die Bildung undissoziierter Salz-moleküle aus der Indikatorsäure und dem Kation des Neutralsalzes, 2. die Ionenaktivitätstheorie. Wir hatten es als wahrscheinlich hingestellt, daß beide Momente in Wirklichkeit in Betracht kommen können, daß aber für gewöhnlich das zweite Moment überwiegt. Für Indikatoren von mehr kolloidalem Charakter wie Kongorot kommen zweifellos auch noch Änderungen des Dispersitätsgrades als Ursache für die Änderung der Farbe hinzu. Jedoch dürfen wir dieses Moment für die Nitrophenole ausschließen. Aber einen Umstand haben wir bisher noch nicht berücksichtigt, welcher, wie wir sehen werden, zwar für unsere Methode belanglos ist, aber für eine erschöpfende Theorie doch erörtert werden muß.

Wenn man Lösungen von gleichem Gehalt an einem Indikator unserer Serie in verdünnter NaOH, in welcher also nur die

gefärbte Modifikation der Moleküle vorhanden ist, bei verschiedenen Temperaturen miteinander vergleicht, so ist die Farbtiefe etwas verschieden. Daraus folgt, daß die chromophore Eigenschaft der gefärbten Indikatormodifikation keine absolut konstante ist, sondern von der Temperatur abhängt. Es ist ferner bekannt, daß die Farbtiefe und -nuance vieler Farbstoffe auch von der Natur des Lösungsmittels abhängt. Es lag daher die Vermutung nahe, daß ein Teil der Salzwirkung auch darauf beruhen könne, daß die chromogene Eigenschaft des Farbstoffchromophors durch Neutralsalze bzw. durch die durch sie hervorgerufene Änderung der Eigenschaften des Lösungsmittels geändert werden könnte. Hierüber gaben folgende Versuche Aufschluß.

Eine stets gleich bemessene Menge Indikator in $n/50$ -NaOH wurde mit verschiedenen Mengen von Neutralsalzen versetzt und die Farbtiefen verglichen. Bezeichnen wir die Farbtiefe ohne Salzzusatz mit 1, so zeigten sich folgende Farbtiefen:

Je 0,5 ccm 0,03proz. m-Nitrophenollösung und 0,5 ccm n-NaOH wurden auf 25 ccm Gesamtvolumen aufgefüllt, teils mit, teils ohne KCl; die erste Zeile zeigt den definitiven Salzgehalt, die zweite den relativen Farbgrad an:

KCl-Gehalt	3,2	1,6	0,8	0,4	0 n
Farbtiefe	1,5	1,14	1	1	1

Es ist also durch sehr hohe Salzkonzentration in der Tat eine Vertiefung der Farbe selbst in stark alkalischer Lösung eingetreten, von der man mit größerer Wahrscheinlichkeit annehmen kann, daß sie durch eine Änderung der optischen Eigenschaft der chromophoren Gruppe der gleichen Molekülart hervorgerufen wird, als durch die Entstehung einer neuen Molekülart (etwa des Na-Salzes) von anderen optischen Eigenschaften. Diese Änderung ist jedoch so gering, daß sie in einer 1,6n-KCl-Lösung nur soeben die Fehlergrenzen überschreitet, unterhalb dieser Konzentration überhaupt nicht bemerkbar ist und erst in 3n-Lösungen deutlich wird. Daraus folgt, daß diese Art des Salzfehlers zwar vorhanden ist, aber bei allen praktisch vorkommenden p_H -Messungen selbst bei so salzreichen Lösungen wie Meerwasser noch nicht in Betracht kommt.

VII. Anhang. Die Wirkung der Neutralsalze auf das p_H von Pufferlösungen.

Die Beschäftigung mit der Theorie des Salzfehlers der Indikatoren gab uns Veranlassung, einer Frage nachzugehen, die eine enge Beziehung hierzu hat, nämlich: Wie wird das p_H eines Puffers durch einen Überschuß von Neutralsalzen verschiedener Art und Konzentration beeinflußt? Die Versuche wurden an Acetat- und Phosphatpuffern ausgeführt.

a) Versuche mit Acetat.

Standardacetat (0,1 n-Essigsäure + 0,1 n-Na-Acetat) wurde 5fach verdünnt, teils mit reinem Wasser, teils mit Salzlösungen. Der definitive Salzgehalt war in den Lösungen mit Salz überall 0,5 n. Bei den verschiedenen Salzen zeigte sich elektrometrisch gemessen bei 17° folgendes p_H :

	ohne Salz	RbCl	$\frac{1}{2}$ K ₂ SO ₄	KCl	KBr	NH ₄ Cl	NaCl	NaCl + $\frac{1}{100}$ Mol CaCl ₂	LiCl	$\frac{1}{2}$ BaCl ₂	$\frac{1}{2}$ CaCl ₂
$p_H =$	4,865	4,587	4,578	4,569	4,569	4,512	4,484	4,484	4,452	4,382	4,268

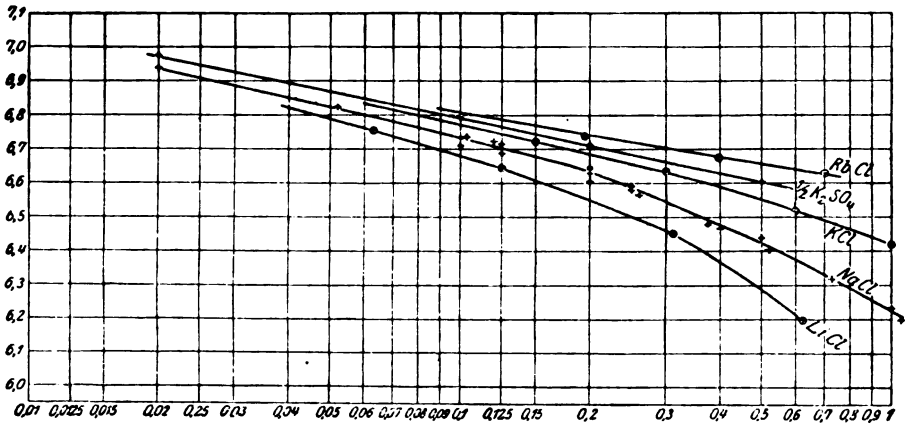


Abb. 1. Abszisse: Salzkonzentration in Normalität, in logarithmischen Maßstab abgetragen. Ordinate: p_H . Jede Kurve gilt für die angeschriebene Salzart. Die für den Salzgehalt = 0 zu extrapolierende gemeinschaftliche Asymptote ist gemäß Tabelle VI die Horizontale 7,1.

Alle Neutralsalze verkleinern also p_H . Parallelversuche mit verschiedenen K-Salzen zeigen, daß die Natur des Anions von keinem oder sehr geringem Belang ist. Dagegen wächst die Wirkung der Kationen bei den Alkalkationen mit steigendem

Hydratationsgrad, d. h. mit fallendem Atomgewicht; die Wirkung der Zwertigen Kationen übertrifft die der Alkalikationen bei weitem. NH_4 steht zwischen K und Na. Die physiologisch so berühmte Mischung von $\text{NaCl} + 2$ Mol-Prozenten CaCl_2 verhält sich nicht anders als reines NaCl .

Tabelle V.

Abhängigkeit des p_{H} von Phosphatgemischen von verschiedenen Konzentrationen verschiedener Salze.

Salz	Salzgehalt normal	Phosphatgemisch *)	Temperatur °C	p_{H}	p_{H}'
NaCl	0,02	„,5“	17,5	6,404	
„	0,062	„,5“	16,0	6,824	
„	0,10	„,5“	15,5	6,709	
„	0,104	„,5“	16,0	6,736	
„	0,12	„,5“	17,5	6,722	
„	0,125	„,5“	17,5	6,713	
„	0,125	„,8,3“	18,0	7,387	6,688
„	0,20	„,8,3“	17,5	6,604	
„	0,20	„,8,3“	17,0	6,647	
„	0,20	„,8,3“	16,5	6,642	
„	0,20	„,8“	16,5	7,229	6,627
„	0,25	„,5“	17,0	6,592	
„	0,25	„,8,3“	18,0	7,280	6,581
„	0,26	„,5“	15,5	6,565	
„	0,375	„,8“	16,5	7,079	6,477
„	0,40	„,5“	15,5	6,429	
„	0,40	„,8“	16,5	7,068	6,466
„	0,50	„,5“	17,0	6,439	
„	0,52	„,5“	15,5	6,404	
„	0,73	„,5“	16,0	6,318	
„	1,0	„,5“	16,5	6,233	
„	1,04	„,5“	15,5	6,198	
KCl	0,06	„,5“	18,5	6,822	
„	0,15	„,5“	18,0	6,722	
„	0,30	„,5“	18,0	6,635	
„	0,60	„,5“	17,5	6,517	
„	1,0	„,5“	17,0	6,419	
K_2SO_4	0,02	„,5“	15,5	6,950	
„	0,10	„,5“	16,0	6,792	
„	0,20	„,5“	15,5	6,719	
„	0,50	„,5“	15,5	6,604	
LiCl	0,063	„,5“	18,0	6,756	
„	0,125	„,5“	18,5	6,645	
„	0,313	„,5“	18,0	6,453	
„	0,625	„,5“	18,0	6,198	
RbCl	0,195	„,5“	16,5	6,738	
„	0,398	„,5“	16,5	6,675	
„	0,70	„,5“	16,5	6,630	

*) Sörensensche Bezeichnungsweise der Mischungszahl.

b) Versuche mit Phosphaten (s. Tabelle V und Diagramm).

Die Versuche wurden für eine Reihe von Salzen auch bei wechselnder Salzkonzentration angestellt. Als Puffer wurde eine Mischung des Sörensenschen sekundären und primären $m/15$ -Phosphat in starker Verdünnung benutzt. Die Verdünnungsflüssigkeit enthielt die zugesetzten Salze. Das Mischungsverhältnis von primärem und sekundärem Phosphat wurde etwas variiert. Die Berechnung wurde in folgender Weise ausgeführt: Es wurde an-

genommen, daß $h = k' \cdot \frac{\text{primäres Phosphat}}{\text{sekundäres Phosphat}}$, wo k' die für den

betr. Salzgehalt „reduzierte“ Dissoziationskonstante bedeutet. Aus dem bekannten Mischungsverhältnis der Phosphate und dem elektrometrisch gemessenen p_H wurde hiernach k' bzw. p_k' berechnet und in das Diagramm S. 323 als Ordinate aufgetragen. Die Abszisse gibt die molare Salzkonzentration in logarithmischer Transformierung. Die Resultate sind qualitativ die gleichen wie beim Acetatpuffer, nächstens mit dem Unterschied, daß der dort nur minimale Unterschied zwischen KCl und K_2SO_4 sich etwas deutlicher bemerkbar macht und überhaupt alle Ausschläge größer sind. Das beruht zweifellos auf der Zweiwertigkeit der HPO_4'' -Ionen.

Früher hätte man die Wirkung dieser Salze dadurch erklärt, daß die elektrolytische Dissoziation derjenigen Salze, welche aus ihren Kationen und dem Acetat- bzw. Phosphation gebildet werden, verschieden sei; z. B. daß von den Alkalisalzen Rb-Acetat am stärksten, Li-Acetat am schwächsten dissoziiert ist. Nach der Ionenaktivitätstheorie, insbesondere von Bjerrum (l. c.), ist diese Deutung unzureichend geworden. Es ist vielmehr anzunehmen, daß die Aktivität der Acetat- bzw. Phosphationen durch die einzelnen Ionenarten in spezifischer Weise geändert wird. Jedoch wollen wir diese bei den Physikochemikern noch in Fluß befindliche Frage hier nicht weiter theoretisch behandeln, sondern nur die Tatsachen mitteilen als ein Material, welches zur Ausarbeitung dieser Theorie von Nutzen sein kann. Das lebhafteste Interesse, welches der Physiologe der Entwicklung dieser Theorie entgegenzubringen gezwungen ist, veranlaßte uns zu diesem kleinen experimentellen Beitrag bei dieser Gelegenheit. Zu demselben Thema gehört es, wenn wir in Tabelle VI darstellen,

wie sich das p_H des Sörensenschen Phosphatgemisches „5“ durch Verdünnung mit CO_2 -freiem Wasser ändert.

Ebenso wie wir hier sehen, daß die aktive Masse der Acetat- oder Phosphationen durch verschiedene Salze verschieden geändert wird, ist auch zu erwarten, daß verschiedene Salze die Aktivität der Indikatorionen in verschiedener Weise beeinflussen. Die Größe des Salzfehlers eines Indikators sollte daher nicht auf eine gewisse „Salzkonzentration“ überhaupt bezogen werden, sondern müßte für jedes Salz einzeln bestimmt werden. Wir haben in der ersten Mitteilung schon gezeigt, daß der Salzfehler durch Ca-Salze viel größer ist als der durch Alkalisalze. Es ist aber auch zu erwarten, daß die verschiedenen Alkalisalze etwas verschiedene Salzfehler geben. Praktisch wird das selten in Betracht kommen, weil in allen physiologischen Lösungen das NaCl so überwiegt, daß man den ohnehin schon kleinen Salzfehler wie in einer reinen NaCl-Lösung ansetzen kann.

Tabelle VI.

Abhängigkeit des p_H des Phosphatgemisches „5“ von der Verdünnung.

Verdünnung	Temperatur • C	p_H	Mittel
unverdünn*	15,5	6,798	} 6,813
	15,5	6,817	
	16,0	6,820	
	16,0	6,818	
$1/3$	16,0	6,902	} 6,904
	14,5	6,905	
$1/5$	15,5	6,980	} 6,990
	15,5	6,998	
$1/5$	14,5	6,993	
$1/50$	16,0	7,077	
$1/50$	14,5	7,063	} 7,069
	15,0	7,068	
$1/25$	15,5	7,068	7,068
$1/50$	15,5	7,069	} 7,088
$1/50$	14,5	7,098	
$1/50$	14,5	7,098	
$1/∞$	wahrscheinliche Extrapolation:		(7,10)

*) Insgesamt $1/15$ molar an Phosphorsäure; $1/30$ molar an K^+ ; $1/15$ molar an Na^+ ; zusammen $1/10$ molar an Kationen überhaupt.

Zusammenfassung.

Die Konstante, der Temperaturkoeffizient derselben und der Salzfehler des *m*-Nitrophenols wird bestimmt; ein neuer Indikator, γ -Dinitrophenol, wird beschrieben. Die Frage, welche Veränderung des p_H durch den Zusatz eines Indikators zu der zu messenden Lösung hervorgerufen wird, wird theoretisch und praktisch behandelt und danach Vorschriften zur colorimetrischen p_H -Bestimmung in sehr pufferarmen Lösungen wie Fluß- und Meerwasser gegeben; ferner ein kurzer Beitrag zur Theorie des Salzfehlers und zur Ionenaktivitätstheorie.

Die für die Messung von Fluß- und Meerwasser erforderlichen hohen Reagenzgläser, sowie ein geeignetes Gestell, welches die Colorimetrie wesentlich erleichtert, liefert E. Leitz, Berlin, Luisenstr. 45.

Welche Zuckerart wird vom Säugling im Harn ausgeschieden, wenn die für ihn festgestellte Assimilationsgrenze für Rohrzucker in der Nahrung überschritten wird?

Eine Methode und ein Berechnungsmodus zur quantitativen Bestimmung mehrerer Zuckerarten nebeneinander im Harn.

Von

Hans Murschhauser.

(Aus der akademischen Kinderklinik in Düsseldorf.)

(Eingegangen am 22. April 1921.)

Bekanntlich ist selbst der gesunde tierische Organismus nicht befähigt, unbegrenzte Mengen von löslichen Kohlenhydraten zu verbrennen. Wird er durch überreichliche Zufuhr per os damit überschwemmt, so kommt es zur Ausscheidung von Zucker in den Harn, zur alimentären Glykosurie.

Die Größe, bis zu welcher die Aufnahme von Kohlenhydrat gesteigert werden muß, damit Übertritt in den Harn erfolgt — die Assimilationsgrenze —, ist abhängig von der Art des Kohlenhydrats, der Tierart, der Individualität, dem Befinden des Individuums und wie es scheint, auch von dem Füllungszustand des Magens.

Wir haben uns hier auf die Verhältnisse zu beschränken, wie sie für den Menschen während des 1. Lebensjahres und zwar bei Verabreichung von Rohrzucker Geltung haben.

Bei den jüngst in der Kinderklinik in Düsseldorf ausgeführten Versuchen, die die Festsetzung der Assimilationsgrenze für die verschiedenen Kohlenhydrate beim Säugling bezweckten¹⁾, zeigte es sich, daß nach Verabreichung größerer Mengen Rohrzucker in einmaliger Gabe der Harn reduzierend auf Fehlingsche Lösung wirkte.

¹⁾ Über das Ergebnis der Toleranzversuche wird E. Aschenheim an anderer Stelle berichten.

Die Versuche waren so angestellt worden, daß die Säuglinge, die 5^h nachmittags ihre Milch zu sich genommen hatten, um 9^h abends eine bestimmte Menge ca. 20 proz. Rohrzuckerlösung zu trinken bekamen. Die Fälle, in denen ein teilweises Erbrechen der aufgenommenen Flüssigkeit erfolgte, wurden von der weiteren Verfolgung ausgeschaltet. Nach Verabreichung der Zuckerlösung wurde der Harn in 4stündigen Perioden, also von 9—1^h nachts und von 1—5^h morgens getrennt gesammelt, und jede Portion für sich auf ihr Verhalten gegen Fehlingsche Lösung geprüft.

Überstieg die Menge des in einer Gabe gereichten Rohrzuckers 8—10 g pro kg Körpergewicht, so zeigte der Harn reduzierende Eigenschaften.

Da im Rohrzucker die Aldehyd- bzw. die Carbonylgruppe seiner Komponenten nicht frei liegt, so tauchte die Frage auf, welche Zuckerart in diesem Falle die Reduktion bedingte und ob neben reduzierendem Zucker unveränderter Rohrzucker in den Harn überginge.

Die Beantwortung dieser Frage stößt beim Säugling auf einige Schwierigkeiten. Die an sich geringe Menge Harn, die ein Säugling innerhalb 8 Stunden abgibt, erfährt durch die auf reichlichen Zuckerkonsum erfolgende Retention von Wasser im Organismus eine weitere Verringerung; dazu kommt als erschwerender Umstand, daß der ausgeschiedene Zucker sich fast nur in den Harnanteilen der ersten 4 Stunden nach der Aufnahme der Nahrung findet und daß seine Menge sehr gering ist. Denn wurden selbst Mengen von 12 g Rohrzucker pro kg Säugling verfüttert, so fiel die qualitative Probe mit Fehlingscher Lösung oder Nylanderischem Reagens oft nur sehr schwach positiv aus. Es mußte deshalb zur einwandfreien Feststellung der Zuckerart, welche der Säugling beim Überschreiten der Assimilationsgrenze für Rohrzucker im Harn ausscheidet, mit der zu verabreichenden Zuckermenge ziemlich hoch gegangen werden.

Zu den Schwierigkeiten, die durch die besonderen Verhältnisse beim Säugling bedingt werden, traten analytische. Sie waren in früheren Versuchen an Erwachsenen und Hunden entweder deshalb nicht zu überwinden, weil man sich größtenteils damit begnügte, die Frage qualitativ zu lösen, ein Unternehmen, das, wie ich gleich zeigen werde, unmöglich zum Ziele führt, oder weil

der negative Ausfall der qualitativen Reduktionsproben ihre Beseitigung erübrigte. Ich halte deshalb die ausführliche Beschreibung des Weges, den ich bei der Analyse eingehalten habe, im Interesse einer späteren Nachprüfung oder Erforschung dieses Gebietes für erforderlich, schon aus dem Grunde, weil die quantitative Bestimmung mehrerer Zuckerarten nebeneinander äußerst ungenügend durchgearbeitet und deshalb unbefriedigend beschrieben ist.

Ich beschränkte mich zunächst darauf, den oder die betreffenden Zucker qualitativ zu ermitteln. Es ergab sich, von Abweichungen bei einzelnen Säuglingen, deren Toleranzgrenze vermutlich höher lag, abgesehen, im allgemeinen folgender qualitativer Befund:

1. die Harnreduzierten Fehlingsche Lösung und Nylanders Reagens;

2. sie lieferten ohne vorhergehende Hydrolyse mit Phenylhydrazin reichliche Mengen eines in gelben, büschelig geordneten Nadeln krystallisierenden Osazons; dieses Osazon war in Wasser von 60° unlöslich, gab auch keine löslichen Anteile an dasselbe ab;

3. die Bialsche Probe in der Modifikation von E. Kraft fiel negativ aus.

4. Mit den beiden letztgenannten Reaktionen war die Abwesenheit von Pentosen sichergestellt. Sie fand indes eine weitere Bestätigung durch den negativen Ausfall der Probe nach Jolles¹⁾, durch den gleichzeitig der Beweis für die Abwesenheit von Glykuronsäuren erbracht war.

5. Auch die Tatsache, daß die vergorenen Harnreduzierer mit Phenylhydrazin kein Osazon lieferten, spricht für das Fehlen von Pentosen.

6. Die frischen Harnreduzierer reagierten lebhaft auf Hefezusatz.

Nach den bis jetzt gewonnenen Ergebnissen, vor allem aus dem vorliegenden Reduktionsvermögen und der Osazonbildung ohne vorausgegangene Hydrolyse war bei Abwesenheit von Pentosen der Schluß zu ziehen, daß entweder Dextrose oder Lävulose oder aber ein Gemisch von beiden vorlag. Der Beweis für die Gegenwart von Lävulose wurde erbracht durch eine positive Seliwanoffsche Reaktion. Ob die Lävulose aber frei oder als

¹⁾ Diese Zeitschr. 2, 244. 1906.

Rohrzucker vorlag, war damit nicht entschieden. Im letzteren Falle müßte gleichzeitig freie Dextrose vorhanden sein.

Nun zeigten die Harnen im polarisierten Lichte meist keine oder nur sehr geringe Drehung nach links. Die optische Inaktivität oder eine schwache Linksdrehung könnte gedeutet werden durch das gleichzeitige Vorhandensein von Dextrose und Lävulose in bestimmten Mengenverhältnissen; sie könnte auch bedingt sein durch die Anwesenheit von Lävulose und Rohrzucker, ja selbst bei gleichzeitiger Gegenwart beider Monosaccharide neben dem Disaccharid wäre optische Inaktivität oder schwache Linksdrehung möglich.

Wie man sieht, führt die qualitative Analyse zu keinem definitiven Ergebnis; deshalb sind alle bisherigen Befunde, die sich lediglich auf qualitative Proben aufbauen, unsicher. Eine Entscheidung war nur von der quantitativen Analyse zu erwarten.

Sie erfolgte durch die gleichzeitige Bestimmung des Drehungs- und Reduktionsvermögens des Harnes vor und nach der Inversion mit Salzsäure.

Analyse von Harnprobe I.

Zur Untersuchung gelangte der Harn von 2 Säuglingen, der während der ersten 4 Stunden nach Aufnahme der Rohrzuckerlösung ausgeschieden worden war. Das Volumen des Gemisches betrug ca. 130,0 ccm.

Bei Orientierungsversuchen zur Ermittlung des Reduktionsvermögens hatte es sich gezeigt, daß das gebildete Kupferoxydul, vermutlich durch die Kolloide des Harnes, in Lösung gehalten wurde und deshalb nicht abzufiltrieren war. Zur Beseitigung dieses Hindernisses wurden die Harnen nach dem Verfahren von C. Patéin und E. Dufa u¹⁾ mit Quecksilbernitrat geklärt und waren so gleichzeitig für die Polarisation vollständig klar und farblos gemacht.

Reduktionsvermögen des Harnes vor der Inversion: 50,0 ccm Harn wurden nach dem genannten Verfahren geklärt, auf 100,0 ccm ergänzt und dann filtriert.

75,0 ccm des verdünnten Harnes ergaben:

0,3155 g Cu_2O (nach Pflüger)

= 0,1348 g als Dextrose bzw.

0,1406 g als Invertzucker gerechneten, direkt reduzierenden Zucker.

100,0 ccm des (1 + 1) verdünnten Harnes enthielten demnach 0,1876 g direkt reduzierenden Zucker (als Invertzucker gerechnet).

¹⁾ Journ. d. chim. et pharm. 10, 433.

Reduktionsvermögen des Harnes nach der Inversion mit Salzsäure:

50,0 ccm Harn wurden mit Salzsäure invertiert, dann neutralisiert mit Mercurinitrat gefällt usw. und schließlich auf 100,0 ccm aufgefüllt.

75,0 ccm des verdünnten Harnes ergaben:

$$\begin{aligned} & 0,4903 \text{ g Cu}_2\text{O (nach Pflüger)} \\ & = 0,2260 \text{ g als Dextrose} \\ & \text{bzw. } 0,2410 \text{ g als Invertzucker gerechneten Zucker.} \end{aligned}$$

100,0 ccm invertierten, (1 + 1) verdünnten Harns enthielten somit 0,3213 g reduzierenden Zucker, als Invertzucker gerechnet.

100,0 ccm des Originalharns enthielten:

$$\begin{aligned} \text{Nach Inversion} &= 0,6426 \text{ g reduz. Zucker,} \\ \text{vor} & \text{,,} = 0,3752 \text{ ,, ,,} \end{aligned}$$

Durch Inversion hinzugekommen = 0,2674 g Invertzucker (= 0,1337 g Dextrose + 0,1337 g Lävulose) aus dem im Harn enthaltenen Rohrzucker. Vor der Inversion zeigte der Harn (1 + 1 verdünnt) im 189,4 mm-Rohre eine Drehung von $\alpha = +0,00^\circ$, nach der Inversion war $\alpha = -0,20^\circ$.

Unter der Voraussetzung, daß der dem gefundenen Reduktionsvermögen vor der Inversion entsprechende Zucker nur Dextrose wäre und kein Rohrzucker vorläge, hätten wir eine Drehung für den nichtinvertierten, verdünnten Harn von $\alpha = +0,188^\circ$ zu erwarten; wäre dagegen nur Lävulose zugegen, so müßte die Drehung $\alpha = -0,330^\circ$ betragen; die Summe der Drehungswinkel, die wir aus den dem gefundenen Cu_2O entsprechenden Mengen von Dextrose und Lävulose errechnen, hat somit einen Wert von $0,518^\circ$.

Für den Fall der Abwesenheit von Rohrzucker könnte nun das prozentuale Verhältnis der beiden Glykosen zueinander aus dem gefundenen Drehungswinkel nach der von mir angegebenen Formel¹⁾ abgeleitet werden.

Wir haben aber nachgewiesen, daß der Harn (1 + 1 verdünnt) eine 0,1337 g Invertzucker entsprechende Menge, also 0,1270% Rohrzucker aus solchen enthält. Diese Menge gibt dem verdünnten Harn an sich eine Drehung von $\alpha = +0,161^\circ$. Durch die gleichzeitige Anwesenheit von Rohrzucker erfahren die oben genannten Drehungswerte für Dextrose und Lävulose eine Verschiebung um den bezeichneten, von dem Rohrzucker stammenden Betrag nach der Plusseite hin.

Läge demnach neben Rohrzucker reine Dextrose vor, so müßte der Harn einen Drehungswinkel von $\alpha = [+0,188^\circ + (+0,161^\circ)] = +0,349^\circ$ aufweisen; läge neben Rohrzucker reine Lävulose vor, so würde der Drehungswinkel $\alpha = (-0,330^\circ + [+0,161^\circ]) = -0,169^\circ$ betragen. In Wirklichkeit zeigte der Harn eine Drehung von $\pm 0,00^\circ$. Es muß also neben Rohrzucker ein Gemenge von Dextrose und Lävulose vorliegen. Wir erfahren jetzt das prozentuale Verhältnis der beiden Zucker zueinander auf dem von mir eingeschlagenen Wege²⁾ nach:

$$(a + b) : 100 = a : x,$$

¹⁾ Diese Zeitschr. 118, 120. 1921.

²⁾ Diese Zeitschr. 118, 126. 1921.

100,0 ccm des (1 + 1) verdünnten Harns enthielten also 0,1260 g als Invertzucker gerechneten, direkt reduzierenden Zucker.

Reduktionsvermögen des Harnes nach der Inversion: 25,0 ccm Harn wurden mit Salzsäure invertiert, dann wurde neutralisiert, nach Patéin und Dufau weiter behandelt, schließlich auf 50,0 ccm aufgefüllt und filtriert.

30,0 ccm des Filtrats ergaben: 0,1484 g Cu_2O (nach Pflüger)
 = 0,0603 g Dextrose
 = 0,0621 g Invertzucker.

100,0 ccm (1 + 1) verdünnten Harns enthalten somit nach Inversion = 0,2070 g als Invertzucker gerechneten reduzierenden Zucker.

Der Gehalt von 100,0 ccm des (75,0 H. + 25,0 Wasser) verdünnten Harns an reduzierendem Zucker betrug demnach

nach der Inversion = 0,4140%
 vor „ „ = 0,2520%;

der Harn enthält somit eine 0,1620% Invertzucker (= 0,081 g Dextrose + 0,081 g Lävulose) entsprechende Menge Rohrzucker.

Der in der oben angegebenen Weise 2 mal verdünnte Harn zeigte vor der Inversion eine Drehung im 189,4 mm-Rohre von $\alpha = -0,100^\circ$,
 nach der Inversion $\alpha = -0,225^\circ$.

Angenommen, der direkt reduzierende Zucker wäre nur Lävulose, ferner angenommen, das Reduktionsvermögen der Lävulose sei dasselbe wie das des Invertzuckers¹⁾ und Rohrzucker wäre überhaupt nicht zugegen, so müßte der Harn im 189,4 mm-Rohre einen Drehungswinkel von $\alpha = -0,219^\circ$ aufweisen. Nehmen wir andererseits an, der aus dem Kupferoxydul berechnete Zucker sei reine Dextrose, und Rohrzucker sei nicht zugegen, so müßte der verdünnte Harn eine Rechtsdrehung von $\alpha = +0,126^\circ$ zeigen. Die Summe beider Drehungswinkel ist diesmal $0,345^\circ$.

Durch die gleichzeitige Gegenwart von 0,077 g Rohrzucker verschieben sich die eben angegebenen Drehungswerte um $+0,098^\circ$, so daß beim Vorliegen reiner Lävulose neben Rohrzucker eine Drehung von $\alpha - 0,121^\circ$, beim Vorliegen reiner Dextrose neben dem Disaccharid eine solche von $\alpha = +0,224^\circ$ resultieren würde.

Da der verdünnte Harn einen Drehungswinkel von $\alpha = -0,10^\circ$ aufweist, so müssen neben Lävulose noch geringe Mengen von Dextrose vorhanden sein. Wir berechnen nach der oben aufgestellten Formel das prozentuale Verhältnis von Lävulose : Dextrose = 94 : 6. Die Menge der in dem verdünnten Harn enthaltenen Zucker beträgt also:

Lävulose = 0,118%, Dextrose = 0,008%, Rohrzucker = 0,077%.

¹⁾ Das Reduktionsvermögen der Lävulose ist tatsächlich etwas schwächer als das des Invertzuckers; der Unterschied beträgt im vorliegenden Falle ca. 2,8% des Gesamtreduktionswertes.

Kontrolle durch Umrechnung der analytisch ermittelten Zuckerwerte auf ihre Drehung und Vergleich dieser mit der beobachteten.

Vor der Inversion:

0,118% Lävulose geben einen Drehungswinkel von	$\alpha = -0,205^\circ$ (189,4 mm-Rohr)	
0,008% Dextrose geben einen Drehungswinkel von	$\alpha = +0,008^\circ$	„
	<hr/>	„
	-0,197°	„
0,077% Rohrzucker geben einen Drehungswinkel von	$\alpha = +0,098^\circ$	„
Der durch die vollständige Analyse sich ergebende Winkel beträgt also . . .	$\alpha = -0,099^\circ$,	
der beobachtete	$\alpha = -0,100^\circ$.	

Nach der Inversion:

Lävulose als solche im verdünnten Harn	= 0,118%, $\alpha = -0,205^\circ$ (189,4 mm-Rohr)	
Lävulose durch Inversion	= 0,040% = $\alpha = -0,068^\circ$	„
	<hr/>	„
	-0,273°	„
Dextrose als solche im verd. Harn	= 0,008% = $\alpha = +0,008^\circ$	„
Dextrose aus Rohrzucker	= 0,040% = $\alpha = +0,040^\circ$	„
	<hr/>	„
	+0,048°	„
Der durch vollständige Analyse berechnete Winkel beträgt somit	$\alpha = -0,225^\circ$,	
der beobachtete Winkel	$\alpha = -0,225^\circ$.	

Aus den für den (1 + 1) verdünnten Harn gefundenen Werten er rechnen wir:

Für den (75,0 + 25,0) verdünnten Harn		für den Originalharn
% Rohrzucker	0,154	0,205%
% Lävulose	0,236	0,315%
% Dextrose	0,016	0,021%

Die in unseren Versuchen verwendeten Säuglinge schieden also, wenn ihnen Rohrzucker in einer Menge gereicht wurde, die weit jenseits der für sie festgelegten Assimilationsgrenze lag, ein Gemenge von Rohrzucker, Lävulose und Dextrose aus.

Das gleichzeitige Auftreten der 3 Kohlenhydrate im Harn hat indes verschiedene Ursachen. Die Ausscheidung des Disaccharids kommt dadurch zustande, daß das rohrzuckerspaltende Ferment im Darne seine Schuldigkeit nicht vollständig erfüllt hat; der unverändert in das Blut übergehende Rohrzucker wird, da er weder in der Leber noch in irgendeinem anderen Organ

gespalten wird, im Harn als solcher wieder erscheinen genau so, wie das nach intravenöser oder subcutaner Injektion von Rohrzuckerlösungen der Fall ist. Die Ausscheidung von Dextrose und Lävulose muß damit erklärt werden, daß die Fähigkeit der Leber, Glykosen zu Glykogen zu polymérisieren und als solches zu fixieren, begrenzt ist.

Ob nach großen Rohrzuckerdosen regelmäßig alle 3 Kohlenhydrate ausgeschieden werden, ob ferner irgendwelche Beziehungen in dem Mengenverhältnis der Kohlenhydrate zueinander bestehen, läßt sich aus den wenigen Versuchen nicht mit Sicherheit sagen: es hat jedoch den Anschein, als ob regelmäßig die Menge der ausgeschiedenen Lävulose die der Dextrose überwiegen würde, die Dextrose sogar gelegentlich gänzlich fehlen könnte. Diese Tatsache beansprucht ein gewisses Interesse. Bei der Spaltung des Rohrzuckers im Darm wird aus jedem Molekül je ein Molekül Dextrose und ein Molekül Lävulose gebildet. Es wäre also zu erwarten, daß, wenn überhaupt reduzierender Zucker ausgeschieden wird, dieser aus gleichen Teilen Dextrose und Lävulose bestehen müßte.

Das veränderte Verhältnis im Harn kann nun so gedeutet werden, daß die Assimilationsgrenze für Lävulose unter den vorliegenden Umständen niedriger liegt als die für Dextrose. Ich nehme an, daß der im Verhältnis zur Dextrose vermehrten Ausscheidung von Lävulose ein komplizierterer Prozeß zugrunde liegt. Durch die einseitige unverhältnismäßig starke Belastung des Organismus mit dem sehr leicht verbrennlichen Kohlenhydrat kommt es zu einer Anhäufung von Alkalicarbonat im Blute. Die partielle Umwandlung der Dextrose in Lävulose durch Carbonate in vitro ist eine bekannte Reaktion. Zu ihrer Auslösung bedarf es allerdings einer Hydroxylionenkonzentration, wie wir sie im Blute nach dem Stande unseres Wissens kaum erwarten können. Es muß also angenommen werden, daß sich im Blute diese Umwandlung schon bei einer geringen Erhöhung der Alkaleszenz evtl. unter Mitwirkung anderer Katalysatoren vollzieht.

Es besteht eine weitere Möglichkeit, das Vorherrschen von Lävulose zu erklären. Die nach Verabreichung größerer Zuckermengen ausgeschiedenen Harne waren fast regelmäßig trüb und die aus dem Aussehen gezogene Schlußfolgerung, daß die Harne alkalisch reagieren würden, bewahrheitet sich in den meisten

Fällen. Es muß deshalb damit gerechnet werden, daß die partielle Umwandlung von Dextrose in Lävulose im Harn sich vollzogen hat. Über den Ort der Umwandlung lassen sich vorläufig nur Vermutungen hegen.

Soweit ich die Literatur übersehe, ist das gleichzeitige Auftreten der 3 Kohlenhydrate im Harn nach reichlicher Rohrzuckerfütterung beim Säugling noch nicht festgestellt worden.

Auch über das Verhalten des erwachsenen Organismus gegenüber großen Rohrzuckerdoson ist nicht vieles bekannt.

Einer der ersten, der über Versuche am Menschen berichtete, war Worm Müller¹⁾ Er stellte beim Erwachsenen fest, daß nach Einnahme von 250 g Rohrzucker 1,81 g, nach 150 g Rohrzucker 0,85 g und nach Einnahme von 50 g ca. 0,10 g Rohrzucker im Harn erschienen Neben der Tatsache, daß Worm Müller nur Rohrzucker, aber keine Inversionsprodukte desselben im entleerten Harn vorfand, fällt die ganz unverhältnismäßig geringe Steigerung der ausgeschiedenen zur eingenommenen Zuckermenge auf. Hofmeister²⁾ ermittelte in Fütterungsversuchen am Hunde neben anderen die Assimilationsgrenze für Rohrzucker und bemerkte dabei das Auftreten reduzierender Substanzen im Harn. Über die Natur dieser Stoffe macht er, da zu kleine Reduktions- und Drehungswerte vorlagen, keine Angaben. Er bemerkt jedoch, daß Inversion der Harnproben mit Säure an Reduktion und Drehung nichts ändere, daß somit unveränderter Rohrzucker in nachweisbarer Menge nicht ausgeschieden worden sei.

In einem Falle beobachtete er eine Linksdrehung des Harns und leitete daraus die Vermutung ab, daß Lävulose oder Dextrose und Lävulose zugegen wären. Diese letztere Beobachtung deckt sich mit den Feststellungen Claude Bernards³⁾, nach denen beim Hunde überschüssig verfütterter Rohrzucker zum Teil invertiert in den Harn übergang und der entleerte Harn regelmäßig links drehte.

Aus einem Vergleich seiner Ergebnisse am Hunde mit denen Worm Müllers am Menschen leitete Hofmeister die Vermutung ab, daß es sich hier um einen spezifischen Unterschied zwischen Mensch und Tier handle. Allerdings hatte auch er in einzelnen Versuchen, bei denen Hunde weit über die Assimilationsgrenze hinausgehende Mengen Rohrzucker erhalten hatten, unveränderten Rohrzucker, in einem Falle sogar bei Abwesenheit seiner Spaltungsprodukte nachweisen können. Zahlenmäßige Angaben hierüber hat er nicht gemacht, wie er denn überhaupt seine Schlüsse aus dem qualitativen Verhalten der Harnen gegen Fehlingsche Lösung und aus dem Drehungsvermögen der Harnen zog. Nur zu einem Falle macht er die ausdrückliche Bemerkung, daß Reduktion und optische

¹⁾ Arch. f. d. ges. Physiol. **34**, 586.

²⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **25**, 252. 1889.

³⁾ Leçons sur le diabète, Paris 1877, S. 270, 320.

Wirksamkeit genau verglichen wurden und in diesem Fahe kommt er zu der Annahme, daß annähernd gleiche Mengen Dextrose und Lävulose vorhanden sein müßten.

Die oben mitgeteilten Zahlen für die im Harn von Säuglingen ausgeschiedenen Zuckermengen wurden auf Verabreichung von Rohrzuckermengen gewonnenen, die die Assimilationsgrenze zum Teil weit überschritten. Im Höchsthalle wurden 18—21 g Zucker pro kg Körpergewicht gegeben. Man denke sich diese Menge auf den Erwachsenen übertragen! Sie betrüge für einen 60—70 kg schweren Mann 1260—1470 g. Ich glaube nicht, daß ein Erwachsener imstande wäre, solche Quantitäten auf einmal und ohne Schaden in sich aufzunehmen.

Ähnliches hat sich ja auch aus Fütterungsversuchen mit Dextrose ergeben, für welche die Assimilationsgrenze beim Säugling zum Teil überhaupt nicht zu ermitteln war, da die zu verabreichenden Zuckermengen schließlich nicht mehr aufgenommen werden konnten¹⁾.

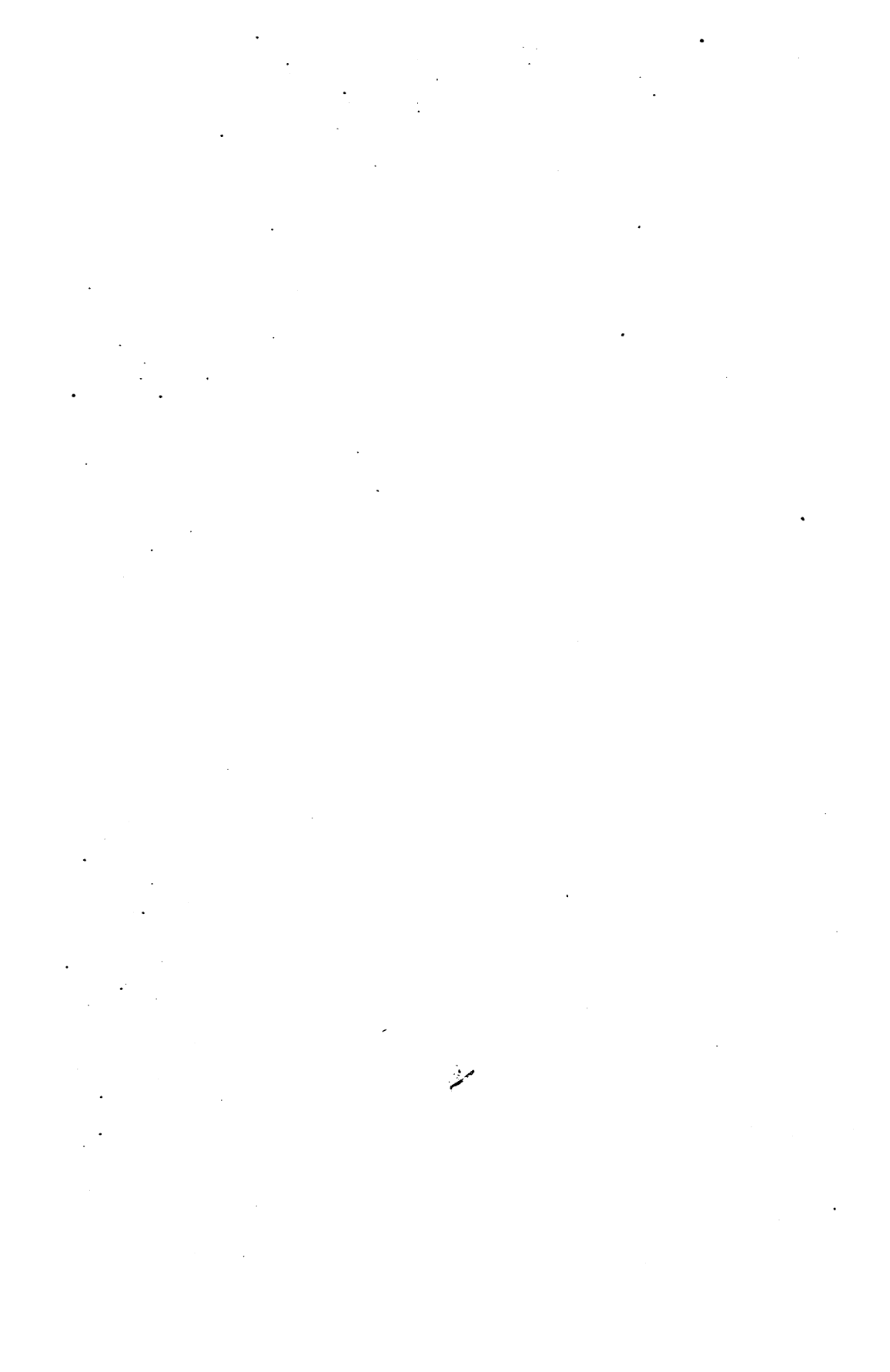
Neben diesen quantitativen Unterschieden in der Assimilationskraft von löslichen Kohlenhydraten nimmt der Säugling eine qualitative Besonderheit für sich in Anspruch, die darin besteht, daß seine Toleranz für Rohrzucker ungefähr ebenso groß oder selbst geringer ist als für Dextrose. Der Erwachsene reagiert schon auf über 100 g Dextrose, aber erst auf die 3fache Menge Rohrzucker²⁾ mit Glykosurie, beim Säugling liegt die Assimilationsgrenze für Rohrzucker bei 8—10 g pro kg Körpergewicht, für Dextrose zum Teil wesentlich höher

¹⁾ W. Kahn, Jahrb. f. Kinderheilk. 94 (3), 15.

²⁾ Zuntz und Loewy, Physiologie des Menschen 1913, S. 538.

Autorenverzeichnis.

- Boresch, Karl.** Die wasserlöslichen Farbstoffe der Schizophyceen. S. 167.
- Brinkman, R. s. van Creveld.**
- van Creveld, S. und R. Brinkman.** Ein direkter Beweis für die Impermeabilität der Blutkörperchen des Menschen und des Kaninchens für Glucose. S. 65.
- Duchoň, František s. Neméc.**
- Ege, R. s. Henriques.**
- Hattori, Kenzo.** Kolloidstudien über den Bau der roten Blutkörperchen und über Hämolyse. III. Ultramikroskopische Untersuchungen an Lipoiden. S. 45.
- Henriques, V. und R. Ege.** Vergleichende Untersuchungen über die Glucosekonzentration in dem arteriellen Blut und in dem venösen Blut aus den Muskeln. S. 121.
- Herzberg, Kurt.** Der Nachweis kleinster Milchzuckermengen im Harn durch Bildung von Formaldehyd. S. 81.
- Joël, Ernst.** Zur Visco- und Stalagmometrie des Harns. S. 93.
- Karczag, L.** Studien über Oxydationskatalysen. S. 16.
- Krönig, W. s. Meier.**
- Krüger, R. s. Michaelis.**
- Landsteiner, Karl.** Über heterogenetisches Antigen und Hapten. XV. Mitteilung über Antigene. S. 294.
- Lesser, E. J.,** Die räumliche Trennung von Glykogen und Diastase in der Leberzelle. S. 108.
- Lövgren, Sture.** Studien über die Urease. S. 215.
- Meier, Klothilde u. W. Krönig.** Blutgasanalysen. IX. Narkose und kolloidale Ladung. S. 1.
- Michaelis, L. und R. Krüger.** Weitere Ausarbeitung der Indikatorienmethode ohne Puffer. S. 307.
- Murschhauser, Hans.** Welche Zuckerart wird vom Säugling im Harn ausgeschieden, wenn die für ihn festgestellte Assimilationsgrenze für Rohrzucker in der Nahrung überschritten wird. Eine Methode und ein Berechnungsmodus zur quantitativen Bestimmung mehrerer Zuckerarten nebeneinander im Harn. S. 328.
- Neméc, A. und František Duchoň.** Versuche über Vorkommen und Wirkung der Saccharophosphatase im Pflanzenorganismus. S. 73.
- Petry, Eugen.** Zur Kenntnis der Bedingungen der biologischen Wirkung der Röntgenstrahlen. I. Mitteilung. S. 23.
- Warburg, Otto.** Physikalische Chemie der Zellatmung. S. 134.



THE LIBRARY
UNIVERSITY OF CALIFORNIA
San Francisco Medical Center

THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE STAMPED BELOW

7 DAY LOAN

<p>OCT 9 1963</p> <p>7 DAY</p> <p>OCT 16 1963</p> <p>OCT 16 1963</p> <p>OCT 16 1963</p> <p>7 DAY</p> <p>JUL 27 1964</p> <p>JUL 27 1964</p>		
--	--	--

15m-12,'60 (B5248s4) 4815

SEALERS

