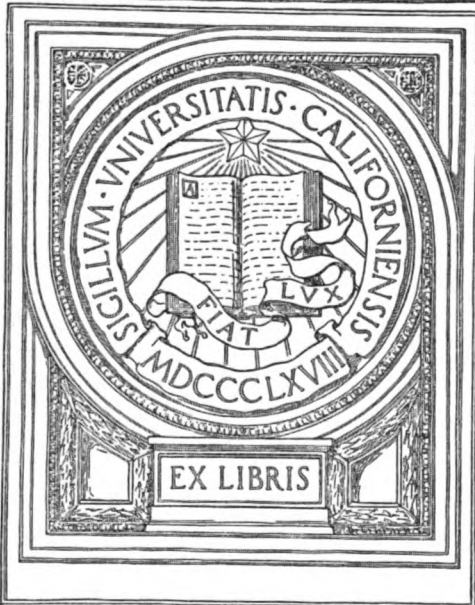


UC-NRLF



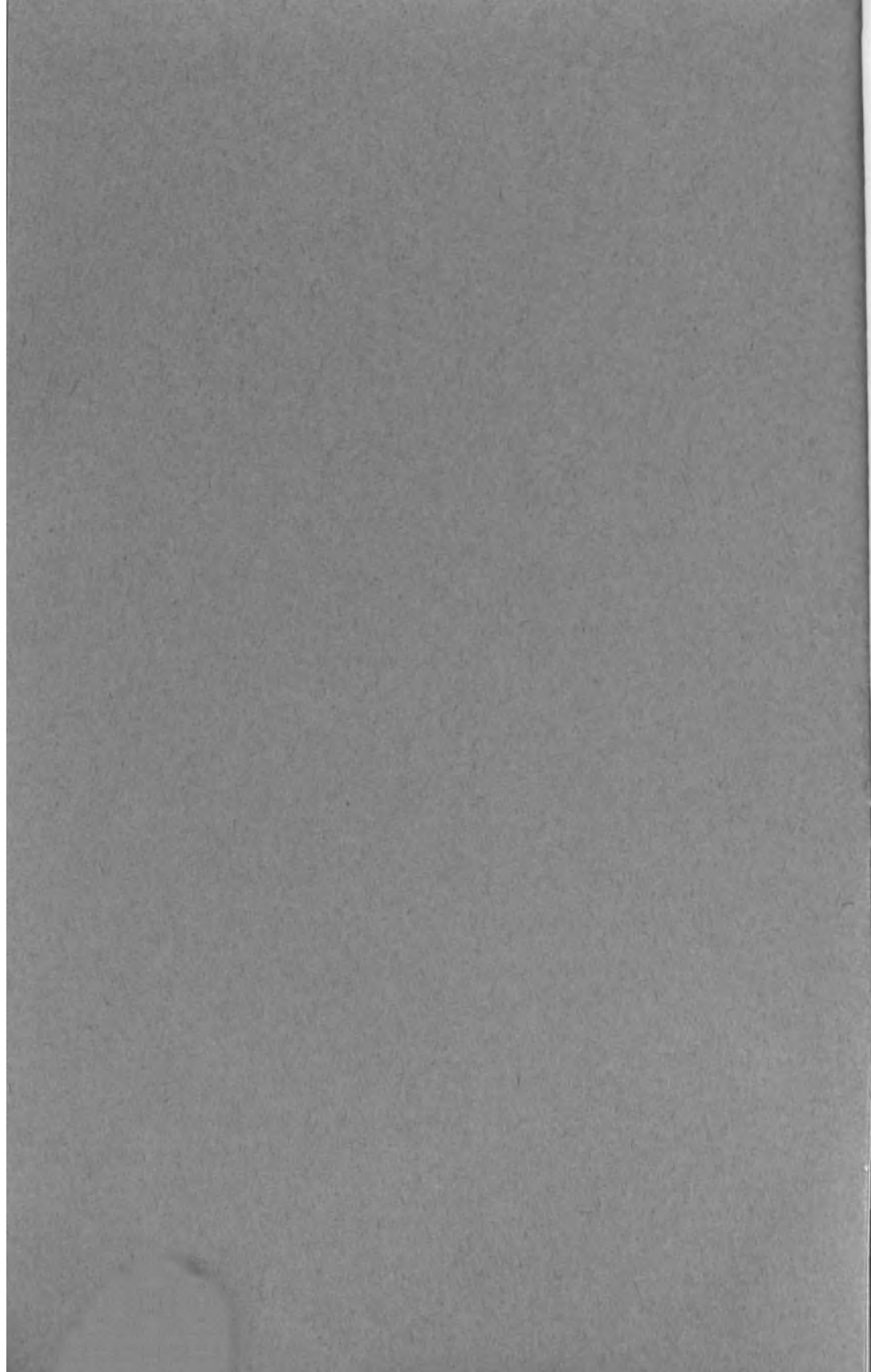
B 3 778 064

UNIVERSITY OF CALIFORNIA  
MEDICAL CENTER LIBRARY  
SAN FRANCISCO



EX LIBRIS













*Yefremov*



# THE UNIVERSITY OF CHICAGO

PHILOSOPHY DEPARTMENT

PHILOSOPHY 101

LECTURE NOTES

BY

PROFESSOR

JOHN

SMITH

CHICAGO

1998

PHILOSOPHY DEPARTMENT

UNIVERSITY OF CHICAGO

PHILOSOPHY 101

LECTURE NOTES



# 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. Bottazzi - Neapel, G. Bredig -  
Karlsruhe i. B., R. Doerr - Basel, A. Durrig - Wien, F. Ehrlich - Breslau, H. v. Euler - Stock-  
holm, J. Feigl - Hamburg, S. Flexner - New York, J. Forssman - Lund, S. Fränkel - Wien,  
E. Freund - Wien, H. Freundlich - Berlin-Dahlem, E. Friedberger - Greifswald, E. Fried-  
mann - Berlin, O. v. Fürth - Wien, P. Haber - Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger - Gro-  
ningen, P. Härtl - Budapest, E. Hägglund - Abo, A. Heffter - Berlin, V. Henri - Paris,  
V. Henriques - Kopenhagen, R. O. Herzog - Berlin-Dahlem, K. Hess - Berlin-Dahlem,  
W. Heubner - Göttingen, R. Höber - Kiel, M. Jacoby - Berlin, A. Koch - Göttingen, M. Koch-  
mann - Halle a. S., F. Landolf - Buenos Aires, L. Langstein - Berlin, E. Laqueur - Amster-  
dam, P. A. Levene - New York, L. v. Liebermann - Budapest, J. Loeb - New York,  
S. Loewe - Dorpat, A. Loewy - Berlin, Th. Madsen - Kopenhagen, A. Magnus-Levy -  
Berlin, J. A. Mandel - New York, L. Marchlewski - Krakau, P. Mayer - Karlsbad, J. Melsen-  
helmer - Greifswald, L. Michaels - Berlin, H. Mollisch - Wien, J. Morgenroth - 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. Salaskin - St. Peters-  
burg, T. Sasaki - Tokio, A. Scheunert - Berlin, A. Schloßmann - Düsseldorf, S. P. L. Sørensen -  
Kopenhagen, K. Spiro - Basel, E. H. Starling - London, J. Stoklasa - Prag, W. Straub -  
Freiburg i. B., A. Stutzer - Königsberg i. Pr., K. Suto - Kanazawa, U. Suzuki - Tokio,  
H. v. Tappeiner - München, K. Thomas - Leipzig, H. Thoms - Berlin, P. Trendelenburg -  
Rostock, O. Warburg - Berlin, E. Widmark - Lund, W. Wichowski - Prag, A. Wohl - Danzig,  
J. Wohlgenuth - Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg - Berlin

Hundertsiebenundzwanzigster Band

Festband  
für

Franz Hofmeister



Berlin

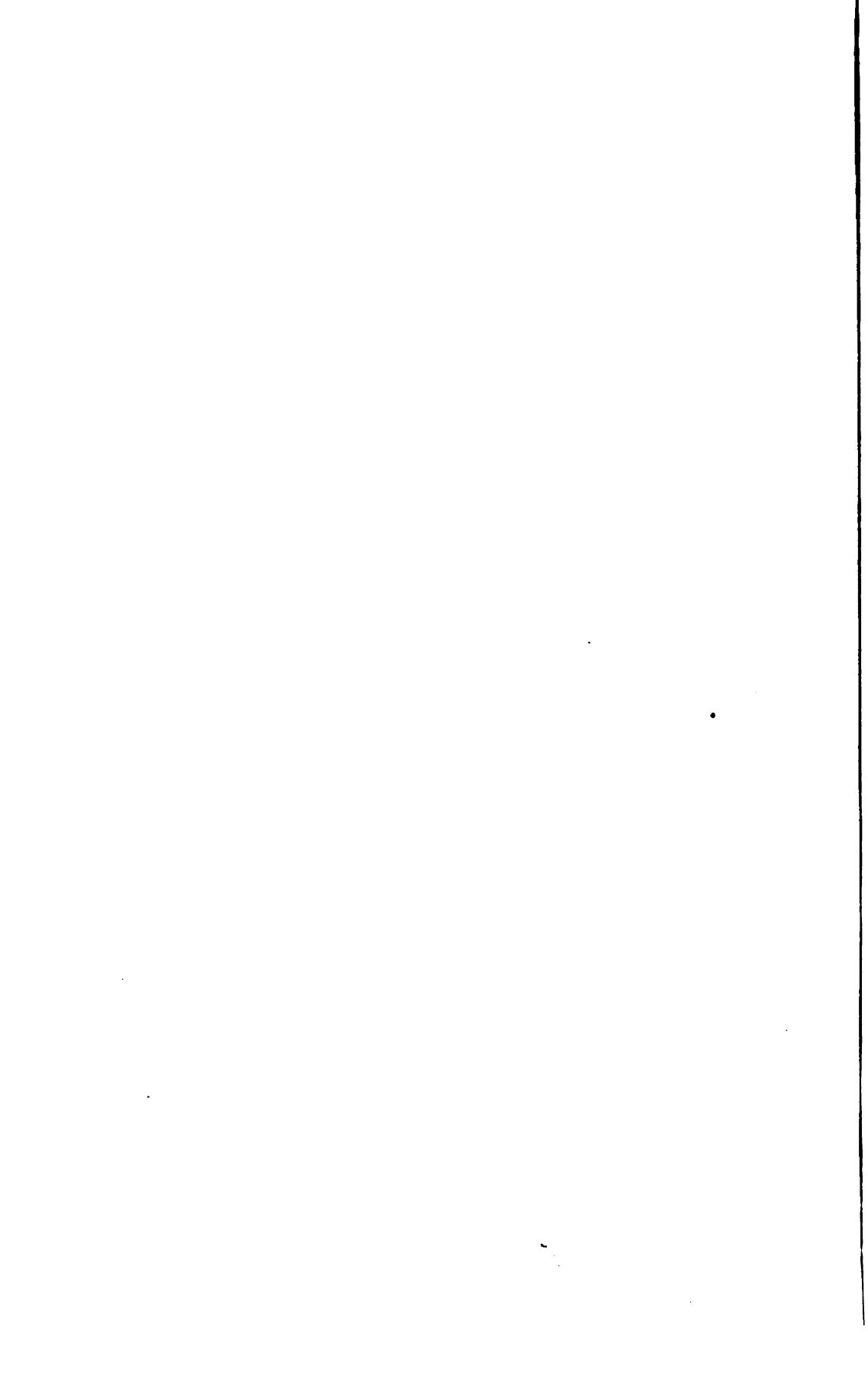
Verlag von Julius Springer

1922

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig

**FRANZ HOFMEISTER**  
GEWIDMET  
VON SEINEN SCHÜLERN,  
MITARBEITERN UND FREUNDEN

141725



## Inhaltsverzeichnis.

	Seite
<b>Elias, H. und St. Weiß.</b> Über die Rolle der Säure im Kohlenhydratstoffwechsel. V. Mitteilung. Säure und Alkali in ihrer Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel der Hefezelle . . . . .	1
<b>Stepp, Wilhelm.</b> Zur Frage des Acetaldehydnachweises im Harn . . . . .	13
<b>Bethe, Albrecht.</b> Der Einfluß der H-Ionenkonzentration auf die Permeabilität toter Membranen, auf die Adsorption an Eiweißsolen und auf den Stoffaustausch der Zellen und Gewebe . . . . .	18
<b>Langstein, Leo.</b> Sind die bei der Säurehydrolyse des Blutglobulins nachweisbar werdenden Kohlenhydratgruppen ein Spaltungsprodukt des Eiweißmoleküls? . . . . .	34
<b>Biedermann, W.</b> Über die Wirkung von Pepsin und Trypsin auf Diastase . . . . .	38
<b>Morawitz, P. und G. Denecke.</b> Über Quellungsvorgänge im subcutanen Gewebe . . . . .	47
<b>Parnas, J. K. und Richard Wagner.</b> Beobachtungen über Zuckerneubildung. Nach Versuchen, die an einem Falle besonderer Kohlenhydratstoffwechselstörung angestellt wurden. I. Mitteilung . . . . .	55
<b>Pohl, Julius.</b> Zur Kenntnis des Methyl- und Isopropylalkoholschicksals . . . . .	67
<b>Mautner, Hans und Ernst P. Pick.</b> Über die durch Schockgifte erzeugten Zirkulationsstörungen. II. Das Verhalten der überlebenden Leber . . . . .	72
<b>Wieland, Hermann.</b> Über die Bedeutung des Calciums für die geringe Empfindlichkeit der Kröte gegen Herzgifte . . . . .	94
<b>Magnus-Alesleben, E. und P. Hoffmann.</b> Über den Einfluß der nervösen Versorgung auf die vitale Färbbarkeit der Muskeln . . . . .	103
<b>Eppinger, Hans.</b> Zur Chemie der amyloiden Entartung . . . . .	107
<b>Schulz, Fr. N.</b> Über Farbstoff und Wachs der Blutlaus ( <i>Schizoneura lanigera</i> ) . . . . .	112
<b>Pollak, Leo.</b> Über den Einfluß von Ammosäuren und Fettsäuren auf die Blutzuckerregulation . . . . .	120
<b>Fürth, Otto und Walter Fleischmann.</b> Über die Ermittlung des Tyrosin-gehaltes von Proteinen . . . . .	137
<b>Pauli, Wolfgang.</b> Über Proteinienbeweglichkeit . . . . .	150
<b>Oswald, Ad.</b> Die physiologische Wirkung der Metallammoniate und verwandter Verbindungen . . . . .	156
<b>Frog, F. und S. Schmidt-Nielsen.</b> Die Fettsäureverteilung des Butterfettes . . . . .	168
<b>Geiger, E. und O. Loewi.</b> Über Änderung des Cholingehaltes der Froschmuskulatur durch elektrische Reizung . . . . .	174
<b>Emlden, Gustav und Heinz Lawaczek.</b> Über die Bildung anorganischer Phosphorsäure bei der Kontraktion des Froschmuskels . . . . .	181

	Seite
<b>Knoop, F.</b> Über Reduktionen und Oxydationen und eine gekoppelte Reaktion im intermediären Stoffwechsel des Tierkörpers . . . . .	200
<b>Goldschmidt, M.</b> Die Lipotide der Linse . . . . .	210
<b>Münzer, Egmont.</b> Über die Chemie des artefiziellen Icterus . . . . .	214
<b>Liljestrand, G. und N. Stenström.</b> Versuche über den Gaswechsel und das Minutenvolumen des Herzens bei Massage und passiven Bewegungen. Vorläufige Mitteilung . . . . .	218
<b>Barrenscheen, Hermann K.</b> Über Fructosurie . . . . .	222
<b>Loewe, S.</b> Zur physikalischen Chemie der „Lipotide“. Die Durchwanderung von Methylenblau durch organische Lösungen . . . . .	231
<b>Ellinger, Alexander und S. M. Neuschlosz.</b> Vergleichende Untersuchungen über Viscosität und Ultrafiltrationsgeschwindigkeit von Serum . . . . .	241
<b>Staub, H.</b> Phosphatwirkung am Herzen . . . . .	255
<b>Baer, Julius.</b> Zur Lokalisation des Fettsäureabbaues im Organismus . . . . .	275
<b>Przibram, Hans.</b> Die Ausfärbung der Puppenkokone gewisser Schmetterlinge ( <i>Eriogaster</i> , <i>Saturnia</i> ) eine typische Dopareaktion . . . . .	286
<b>Porges, Otto.</b> Über einen Fall von ungewöhnlicher Acetonurie . . . . .	293
<b>Spiro, K.</b> Zur lyotropen Reihe und zur $\beta$ -Oxydation . . . . .	299
<b>Glässner, Karl.</b> Eine neue Pepsinbestimmungsmethode . . . . .	312
<b>Löffler, Wilhelm.</b> Das Verhalten des Blutzuckers in verschiedenen Altersstufen nach Einnahme von Glucose per os . . . . .	316
<b>Reichel, Heinrich.</b> Zur Wasser- und Ionenverteilung im Organismus . . . . .	322
<b>Neuberg, Carl und Heinz Ohle.</b> Zur Kenntnis der Carboligase. III. Mitteilung. Der Bau der biosynthetisch verknüpften mehrgliedrigen Kohlenstoffketten . . . . .	327
Berichtigung . . . . .	340
Autorenverzeichnis . . . . .	341



(Aus der I. Medizinischen Klinik in Wien.)

## Über die Rolle der Säure im Kohlenhydratstoffwechsel.

V. Mitteilung<sup>1)</sup>.

Säure und Alkali in ihrer Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel der Hefezelle.

Von

H. Elias und St. Weiß.

(Ausgeführt mit Unterstützung der Fürst Liechtenstein-Spende.)

(Eingegangen am 3. August 1921.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

In einer früheren Mitteilung<sup>2)</sup> war gezeigt worden, daß verhältnismäßig geringe Säuremengen imstande sind, Glykogen aus der Leber zu mobilisieren. Da dieser Effekt auch in Chloralhydratnarkose sowie nach Splanchnicusdurchschneidung zu erzielen ist, da ferner diese Glykogenmobilisierung durch Säure die histologische Struktur der Nebenniere intakt läßt, erscheint eine Beteiligung der Nebenniere bei dem Zustandekommen dieser Erscheinung ausgeschlossen. Durchblutungen an der isolierten Kaltblüterleber mit schwach angesäuerten Lösungen führten ohne Adrenalin zu einer deutlichen Glykogenmobilisierung, so daß bereits nach diesen Versuchen die Säurewirkung als eine Wirkung auf die Leberzelle aufgefaßt wurde. Daß die Säure auf andere Zellen, z. B. auf die Zelle des quergestreiften Muskels nicht in gleicher Weise glykogenmobilisierend wirkt, beweist nichts gegen die Zellwirkung der Säure, sondern eben nur das eine, daß die Muskelzelle in sehr zweckmäßiger Weise [vgl. Elias und Schubert<sup>3)</sup>] gegen Glykogenverluste durch die im Muskel so häufig unter physiologischen Bedingungen entstehende Säure geschützt ist.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. **48**, H. 1 u. 2, S. 120; **52**, H. 5 u. 6, S. 331; **90**, H. 3 u. 4, S. 229; **117**, H. 1 u. 2, S. 10.

<sup>2)</sup> H. Elias, diese Zeitschr. **48**, 120.

<sup>3)</sup> H. Elias und Schubert, diese Zeitschr. **90**, 229.

Gegen die noch nicht erwiesene Annahme, daß die glykogenmobilisierende Wirkung der Säure als reine Zellwirkung aufzufassen ist, könnte vielleicht ein Einwand erhoben werden, seitdem man weiß, daß die Säure im zentralen sowie im vegetativen Nervensystem eine Nervenübererregbarkeit mit dem Angriffspunkt in den Nervenendigungen hervorruft. Ähnlich wie Kahn annimmt, daß durch die Piqure ein erhöhter Erregungszustand in den sympathischen Nervenendigungen in der Leber zustande kommt, der durch das gleichzeitig secernierte Adrenalin noch besonders gefördert wird, konnte man sich auch vorstellen, daß die Säure in den Splanchnicusendigungen eine Übererregbarkeit setzt, wie in den Versuchen von Fröhlich<sup>1)</sup> und Chiari, und daß infolgedessen unterschwellige, sonst erfolglose Reize an diesen übererregbaren Nervenendigungen zum vollen Erfolg der Glykogenmobilisierung führen. Nachdem durch Kretschmer<sup>2)</sup> sowie durch Pollak und Fröhlich<sup>3)</sup> die aktivierende Wirkung der Säure auf das Adrenalin, durch Elias und Sammartino<sup>4)</sup> die reaktivierende Wirkung der neutralisierenden Säuren auf das durch Alkali unwirksam gewordene Adrenalin erwiesen worden war, mußte man auch daran denken, daß die Säurewirkung auf eine Aktivierung der Adrenalinreste in den Leberzellen zurückzuführen wäre. Doch sprach in hohem Maße gegen diese Annahme die Beobachtung, daß die Säurewirkung auf die Glykogenmobilisierung auch nach einer länger vorausgegangenen Durchspülung mit neutralen Flüssigkeiten zustande kommt, in welcher Zeit das Adrenalin aller Wahrscheinlichkeit nach hätte ausgespült resp. oxydiert werden müssen.

Jedenfalls bleiben für die Säurewirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel in der Leberzelle 3 Erklärungsmöglichkeiten übrig:

1. durch Übererregbarkeit der Nervenendigungen,
2. durch Aktivierung von Adrenalinresten in der Zelle,
3. durch direkte Zellwirkung.

Die Entscheidung dieser Frage, die der Gegenstand vorliegender Mitteilung ist, mußten Säure- und Alkaliversuche an glykogenhaltigen Zellen bringen, die weder Nervenendigungen tragen noch mit Adrenalin in Berührung gekommen sind. Diesen Anforderungen schienen Frosch-

<sup>1)</sup> Chiari, R. und Fröhlich, A., Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **64**, 214. 1911.

<sup>2)</sup> W. Kretschmer, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmak. **57**, 438. 1907.

<sup>3)</sup> Fröhlich und Pollak, Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. **77**, 265. 1914.

<sup>4)</sup> Elias und Sammartino, diese Zeitschr. **117**, 10.

eier als Repräsentanten der Tierreihe und Hefezellen als Repräsentanten der Pflanzenreihe zu entsprechen. In dieser Mitteilung sind nur die an der Hefezelle gemachten Erfahrungen angeführt. Bei Verwendung der Hefezellen mußten wir uns darauf gefaßt machen, daß sie sich gegen Säure nicht besonders empfindlich erweisen würde, da sie ja selbst bei der Gärung Säurebildner sind.

### Methodik.

Zu Beginn unserer Versuche verwendeten wir einfachen, käuflichen „Germ“, ohne Rücksicht auf Reinheit, Art und Alter der Hefe. Erst als die ersten (Säure-) Versuche keine eindeutigen Resultate ergaben und sich die Frage aufdrängte, ob nicht die gefundenen Schwankungen im Glykogengehalt der Hefe auf die Verschiedenheit der Hefearten, resp. auf verschiedenes Alter zurückzuführen seien, wurden zur Entkräftung dieses Einwandes ganz frische reinrassige, aus dem Institut für Gärungsindustrie in Wien (Prof. Eduard Jalowetz) bezogene Hefestämme verwendet.

Es wurden stets in Zentrifugierröhrchen gleiche Hefemengen (1—2 g) in Wasser resp. in saurer und alkalischer Lösung von gewünschter Konzentration gleichmäßig suspendiert. Das Volumen dieser Suspension betrug zuerst 10 ccm. Das Versuchsröhrchen wurde in die Zentrifuge gestellt, zentrifugiert und dann Sediment wie darüberstehende leicht getrübe Flüssigkeit gesondert verarbeitet. Nach Einengung derselben wurden beide Glykogenbestimmungen nach Pflüger in der Modifikation von Parnas in demselben Röhrchen bis zu Ende durchgeführt, so daß große Versuchsserien bis 50 Röhrchen ziemlich rasch nebeneinander ausgeführt werden konnten. Später gelang es, die untersuchte Hefemenge in einem so kleinen Flüssigkeitsvolumen zu suspendieren ( $2\frac{1}{3}$  ccm), daß der Fassungsraum des Zentrifugierröhrchens genügte, um die gesamte Menge in demselben Röhrchen ohne Trennung zu verarbeiten. Das Glykogen wurde stets als solches dargestellt, durch Hydrolyse in Zucker übergeführt und dieser nach Bertrand bestimmt. Die immer durchgeführten Doppelbestimmungen zeigen eine durchaus befriedigende Übereinstimmung (Maximalfehler 4%, Durchschnitt 2—3%).

Zuckerlösungen wurden als Suspensionsflüssigkeiten nie verwendet, sondern nur Aqua destillata, um die Resultate von Veränderungen im Ablauf der Gärung unabhängig zu machen, die ja bekanntlich außerordentlich durch Verschiebungen in der H-Ionenkonzentration zu beeinflussen ist, wie sie umgekehrt auch diese wieder beeinflußt. Als Säurezusatz verwendeten wir HCl und  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  als Alkali NaOH,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , und zwar in abgestuften Konzentrationen von  $\frac{n}{320}$  bis  $\frac{n}{5}$ . Alle in dieser Mitteilung niedergelegten Versuche sind als Reihenversuche angelegt. Solche Serien mußten einerseits durch die größere Anzahl der Einzelversuche, aber vor allem auch durch den gleichsinnigen Anstieg oder Abstieg der aus den erhaltenen Werten zu konstruierenden Kurve die Beweiskraft des Resultates erhöhen, andererseits aber auch gleichzeitig das Minimum, eventuell auch das Maximum der wirksamen Säure- resp. Alkalidosis anzeigen.

Jeder Versuch wurde für  $2\frac{1}{2}$  Stunden bei  $37^\circ$  in den Thermostaten gestellt.

Später erwies es sich auch als nötig, zur Kontrolle Versuche mit Hefepreßsaft anzustellen, der in der Buchnerschen Presse nach der klassischen Vorschrift aus der mit Quarzsand und Kieselgur verriebenen Hefe bei einem Druck von 250 Atmosphären ausgepreßt wurde.

Zur Kontrolle wurde in der gleichen Menge Hefe vor dem Versuch und in der gleichen Hefeportion, die mit Wasser auf das gleiche Volumen gebracht und gleichzeitig mit dem Hauptversuch in den Brutofen gestellt worden war, nach Abbrechen des Versuches das Glykogen bestimmt. Nachdem sich in vielen Versuchen kein merklicher Unterschied im Glykogengehalt dieser beiden Kontrollen hatte feststellen lassen, ließ man es bei der zweiten Kontrolle allein bewenden.

Die angeführten Glykogenwerte sind sämtlich als Dextrose berechnet, um den Vergleich mit den in einigen Versuchen bestimmten Gesamtkohlenhydraten zu ermöglichen.

Um die Gesamtmenge der vorhandenen Kohlenhydratwerte festzustellen, wurde, abgesehen von der gleichzeitig in einer anderen Probe gemachten Glykogenbestimmung, der ganze Versuch durch 2 Stunden in 2,2proz. HCl hydrolysiert, dann erst nach Schenck enteiweißt und darauf der Zucker nach Bertrand bestimmt. Da es sich als notwendig herausstellte, Rest-N-Bestimmungen bei dieser Versuchsanordnung zu machen, wurde die Enteiweißung mit Uranacetat und im Filtrat die N-Bestimmung nach Kjeldahl durchgeführt. In dem eigens zu dem Zweck zusammengestellten resp. geblasenen Apparat differierten die Doppelbestimmungen maximal um 0,04 mg. Der durchschnittliche Fehler betrug 0,02 mg

## I. Heferversuche.

### A. Säurewirkung.

Obwohl wir uns sagen mußten, daß die Hefe mit Wahrscheinlichkeit gegen Säure, wie oben auseinandergesetzt wurde, ziemlich resistent sein müßte, stellten wir doch zur Sicherheit einige Versuche in dieser Richtung an. Sie seien in einer Tabelle zusammengefaßt (Tabelle I).

In einigen Versuchen wurde überdies der Glykogen- und Zuckergehalt der Hefe und der darüberstehenden sauren Flüssigkeit gesondert bestimmt, da sich aber der Glykogengehalt und der Zuckergehalt der Suspensionsflüssigkeit als unverändert erwiesen hatte, sei von der Wiedergabe dieser Versuche hier abgesehen.

Aus den in Tabelle I angeführten Versuchen ergibt sich, daß von einer konstanten Wirkung oder gar von einem bei steigender Säurekonzentration gleichsinnig zunehmenden oder abnehmenden Einfluß der Säure auf den Glykogengehalt der Hefe keine Rede sein kann. Nach dieser Erkenntnis wurden die Heferversuche zum Studium der Säurewirkung auf den Glykogengehalt der Zelle aufgegeben und Froscheierversuche angestellt (darüber in einer späteren Mitteilung).

### B. Alkaliversuche.

Daß Zucker unter Alkaliwirkung in größerem Ausmaß als sonst als Glykogen in der Leber retiniert wird, ist bereits unter den verschiedensten Bedingungen nachgewiesen worden, vgl. z. B. Elias, Macleod, Underbill, Murlin usw. Wieweit diese Alkaliwirkung als Zellwirkung angesehen werden kann, sollte in den folgenden Untersuchungen geprüft werden.

Tabelle I.

Wirkung von Säurelösungen (HCl und  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) auf den Glykogengehalt von Hefe (1 g); Glykogenwerte nach  $2\frac{1}{2}$  stündigem Brutofenaufhalt ( $37^\circ$ ).

Versuchs-Nr.	Datum	Hefeart	Kontrollversuch Glykogen in mg	Säureversuch												Bemerkungen	Charakterisierung des Resultats			
				Säureart	Säurekonzentration						in 10 ccm gearbeitet							in $2\frac{1}{2}$ ccm gearbeitet		
					$n/240$	$n/120$	$n/60$	$n/30$	$n/15$	$n/7,5$	absol. in mg	in% der Kontr.	absol. in mg	in% der Kontr.	absol. in mg			in% der Kontr.	absol. in mg	in% der Kontr.
3 B	20. X. 20	gew. Hefe	37,4 = 100%	HCl		24	64,2	28,1	75,2	37	99	41,6	111,2	44,4	118,6	45,4	121,3	Gleichmäßiger Anstieg von Glykogenverlust bis Glykogenzunahme.		
4 B	3. XI. 20	gew. Hefe	36,2 = 100%	HCl	30,4	108,8	43,9	121,2	44,7	123,4	40,8	112,6	38	104,9	40,4	121,5	40,4	111,3	Kein Glykogenverlust, schwankende Glykogenzunahme.	
5 B	7. XI. 20	reinh. Hefe	30,3 = 100%	HCl	30,8	101,6	30,8	101,6	30,2	100,3	30,2	100,3	20,6	97,8	31	102,2	31	102,2	Keine Veränderung.	
6 B	11. XI. 20	"	24,3 = 100%	HCl				26,4	103,8	25,1	103,2	24,9	102	22,7	92,6	22,7	93,5	Abfall von Glykogenzunahme bis Glykogenverlust.		
7 B	17. XI. 20	"	24,4 = 100%	HCl				26,2	107,3	21,3 <sup>*)</sup>	87,4 <sup>*)</sup>	26,2	107,3	26,8	114,7	26,8	109,8	Keine beweisende Veränderung.		
8 B	5. I. 21	"	21,7 = 100%	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$							17,8	82,1	18,2	84,4	18,6	85,8		Glykogenschwund.		

\*) Versuchsfehler?

Es seien zunächst 2 Versuche, in denen das Glykogen in der Hefe nach Entfernung der darüberstehenden Flüssigkeit bestimmt wurde, in graphischen Darstellungen angeführt, von denen die eine die Verschiebung des Glykogengehaltes in beiden Versuchen in mg, die andere in Prozenten des ursprünglichen Glykogengehaltes anzeigt. (Abb. 1 u. 2). Aus diesen 2 Versuchen ergibt sich, daß das Alkali erst bei einer Konzentration von  $\frac{n}{80}$  auf den Glykogengehalt der Hefe einwirkt, und zwar dauernd steigend bis zu  $\frac{n}{20}$ . Höhere Konzentrationen führen zwar auch noch zu einer Zunahme des Glykogens gegenüber dem Anfangswert, doch

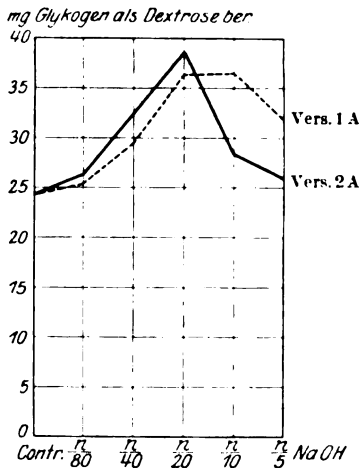


Abb. 1. Graphische Darstellung von Vers. 1A - - - - - und Vers. 2A ——— Veränderungen im Glykogengehalt von abzentrifugierten Hefezellen auf Alkaliwirkung in steigenden Konzentrationen. 2 $\frac{1}{2}$ stündiger Aufenthalt im Brutofen. Absolute Mengen in 1g Hefe.

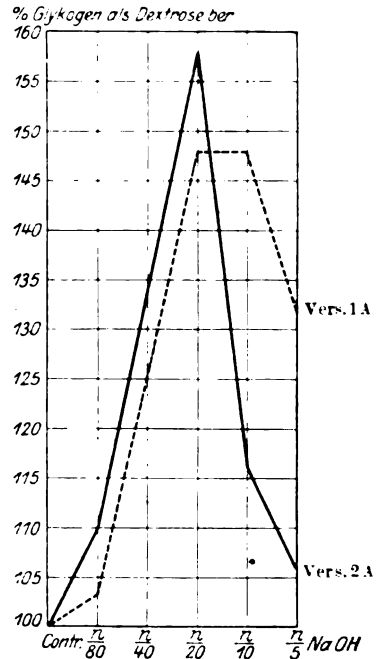


Abb. 2. Graphische Darstellung von Vers. 1A - - - - - und Vers. 2A ——— Glykogenmengen in % des Kontrollwertes. Veränderungen im Glykogengehalt von abzentrifugierten Hefezellen auf Alkaliwirkung in steigenden Konzentrationen. 2 $\frac{1}{2}$ stündiger Aufenthalt im Brutofen.

wird diese Glykogenzunahme bei steigender Alkalikonzentration immer geringer.

Dieser geringere Glykogengehalt der Hefe bei höherer Alkalikonzentration wäre entweder durch eine geringere Glykogenproduktion oder durch eine zunehmende Glykogenabgabe an die umgebenden Flüssigkeiten zu erklären. Diese Frage mußte sich durch Glykogenbestimmungen in Hefe + Flüssigkeit, evtl. durch gesonderte Glykogenbestimmungen in der Hefe und in der von der Hefe abzentrifugierten Flüssigkeit entscheiden lassen.

Tabelle II.

Wirkung von Alkalilösungen (NaOH und  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) auf den Glykogengehalt von Hefe (1 g) [Gesamtglykogen]; Glykogenwerte nach  $2\frac{1}{2}$  stündigem Aufenthalt im Brutofen bei  $37^\circ$ .

Versuchs-Nr.	Datum	Hefeart	Kontrollversuch Glykogen in mg	Alkaliart	Alkaliversuche. Alkali-Säurekonzentration.												Bemerkungen	Charakterisierung des Resultates Glykogenzunahme			
					Glykogen als Dextrose berechnet.						Glykogen als Dextrose berechnet.										
					$\frac{v}{120}$	$\frac{v}{100}$	$\frac{v}{140}$	$\frac{v}{160}$	$\frac{v}{180}$	$\frac{v}{200}$	absol. in mg	in% der Kontr.	absol. in mg	in% der Kontr.	absol. in mg	in% der Kontr.					
3 A	20. X. 20	gew. Hefe	37,4 = 100%	NaOH	37,9	101,2	37,4	100	37,1	99,2	37,7	100,8	46,7	124,8	48,1	128,6	46,0	123,9	Wert bei der höchsten Konzentration etwas gesunken	gleichmäßig ansteigend	
4 A	3. XI. 20	"	36,1 = 100%	NaOH	36,9	101,9	37,0	102,2	35,5	98	42,6	117,6	45,7	126,2	46	127	47,9	132,3	"	"	
5 A	7. XI. 20	rein- rass. Hefe	30,3 = 100%	NaOH	29,9	98,7	31,2	102,9	30,4	100,3	35,6	117,4	34,4	113,5	39,9	131,6	40,5	133,6	"	"	
9	12. II. 21	"	21,0 = 100%	NaOH							21,0	100	21,3	101,4	23,8	113,3	26,1	123,8	etwas weniger ansteigend	etwas weniger ansteigend	
10	23. II. 21	"	17,8 = 100%	NaOH							19,0	106,7	22,4	126,3	25,4	142,1	19,0	175,8	stark ansteigend	stark ansteigend	
11	17. III. 21	"	10,8 = 100%	NaOH							13,2	122,2	18,8	174	19,0	175,8	12,6	143,5	bes. stark ansteigend	bes. stark ansteigend	
12	4. IV. 21	"	11,7 = 100%	NaOH							12,6	107,6	14,3	122	16,8	143,5	114,5	139,3	stark ansteigend	stark ansteigend	
Im Mittel:					100,6	101,7			99,2	108,9	114,5	132	139,3								
8 A	5. I. 21		21,7 = 100%	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$							22,2	102,3	23,0	105,9	23,0	119,8			geringer, gleichmäßiger Anstieg.		

Es seien zunächst tabellarisch die Gesamtglykogenbestimmungen in Hefe und Flüssigkeit angeführt (Tabelle II). Vor der Besprechung dieser Versuche seien 3 Einzelversuche mit der Durchschnittskurve, wie sie sich aus dem Mittel aller angestellten Versuche konstruieren ließ, gemeinsam in einer graphischen Darstellung zusammengefaßt. (Abb. 3.)

Aus der Betrachtung dieser Versuche ergibt sich, daß die niedrigen Alkalikonzentrationen unter  $\frac{n}{40}$  gar keinen Einfluß auf den Glykogengehalt der Hefe nehmen. Von da an steigt in allen gemachten Versuchen

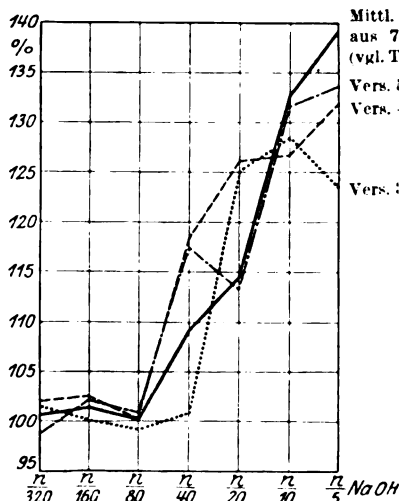


Abb. 3. Graphische Darstellung von Vers. 3A, 4A, 5A und des Mittels von 7 Versuchen aus Tabelle II. Glykogenmengen in % des Kontrollwertes. Veränderungen im Glykogengehalt von Hefezellen auf Alkalieinwirkung in steigenden Konzentrationen. 2 $\frac{1}{2}$ stündiger Aufenthalt im Brutofen.

mit der Alkalikonzentration auch das Gesamtglykogen, und zwar, wie man aus der graphischen Darstellung entnehmen kann, in ziemlich gleich-

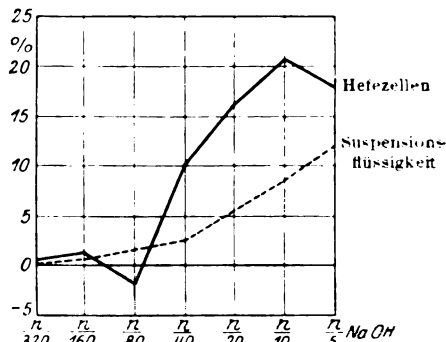


Abb. 4. Graphische Darstellung des Durchschnitts aus den Versuchen der Tabelle III. Glykogenmengen in % des Kontrollwertes. Veränderungen im Glykogengehalt der Hefezellen (—) und ihrer Suspensionsflüssigkeit (-----) auf Alkalieinwirkung in steigenden Konzentrationen. 2 $\frac{1}{2}$ stündiger Aufenthalt im Brutofen.

mäßiger Weise, in 2 Stunden um ca. 30% des Anfangswertes. Das beweist, daß die geringere Glykogenzunahme in den Hefezellen, bei höherer Alkalikonzentration nicht auf einer geringeren Glykogenproduktion beruhen kann, sondern daß Glykogen in vermehrter Menge gebildet wird, daß aber dieses bei höherer Alkalikonzentration zum großen Teil von den Zellen an die Umgebungsflüssigkeit abgegeben wird. Dasselbe haben gesonderte Bestimmungen in Hefezellen und in der Flüssigkeit gezeigt, es seien 3 solche Versuche angeführt (Tabelle III, Abb. 4).

Aus diesen Versuchen entnehmen wir, daß der Glykogengehalt in den Hefezellen bei höheren Konzentrationen





sinkt oder gleichbleibt, jedenfalls aber nicht in beträchtlicher Weise zunimmt, während die Glykogenwerte in der Flüssigkeit sehr rasch ansteigen. Ob die Hefezellen, die große Mengen Glykogen angehäuft haben, nach und nach auch immer größere Mengen Glykogen an die umgebende Flüssigkeit abgeben, oder ob die Zelle durch die längere Einwirkung der relativ stärkeren alkalischen Lösungen gegen Schluß des Versuchs abstirbt und dann erst ihr Glykogen abgibt, bleibt vorderhand dahingestellt. Daß aber die Glykogenanreicherung nur durch die intakte Zelle erfolgen kann, zeigte uns ein Versuch, bei dem statt der Zelle der Zellpreßsaft verwendet wurde (in der Buchnerschen Presse bei einem Druck von 250 Atmosphären dargestellt). Dabei haben sich nur minimale und unregelmäßige Schwankungen im Glykogengehalt des Preßsaftes nachweisen lassen. So kann es als festgestellt gelten, daß Hefezellen auf Alkali Glykogen anhäufen, und daß diese Glykogenanhäufung als Zellwirkung anzusehen ist. Wenn diese an der nervenlosen Hefezelle gemachten Erfahrungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel der Leberzelle angewendet werden dürfen, so läßt sich natürlich eine beruhigende Wirkung des Alkalis auf die Nervenendigungen danach durchaus nicht ausschließen, wir dürfen aber wohl mit Berechtigung auch hier eine direkte Zellwirkung des Alkalis wenigstens als sehr wirksamen Teilfaktor dieses Effekts annehmen.

Nachdem auf diese Weise festgestellt worden war, daß die Hefezelle auf steigende Alkalidosen in steigendem Maße Glykogen produziert und bei den höchsten Alkalikonzentrationen Glykogen an die Umgebung abgibt, drängt sich von selbst die Frage auf, ob das vermehrte Glykogen auf Kosten von Zucker entsteht.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde neben dem Glykogen der Gesamtkohlenhydratbestand in der Hefe und in der alkalischen Flüssigkeit zusammen vor und nach dem Versuch bestimmt. Handelte es sich bei der Vermehrung von Glykogen um eine einfache Kondensation des Zuckers zu Glykogen, so mußte der Gesamtkohlenhydratbestand während des Versuches gleichbleiben. Während eine Verminderung des Gesamt-Kohlenhydrates eventuell auf Verbrauch durch den Lebensprozeß zurückzuführen wäre, mußte eine Vermehrung der Gesamtkohlenhydrate auf intracelluläre Bildung von KH aus noch unbekanntem Muttersubstanzen schließen lassen. Diese Muttersubstanzen könnten niedrige N-freie Vorstufen der Dextrose sein oder Fette oder Spaltlinge der Eiweißreihe. Diese letzte Eventualität mußte sich dadurch nachweisen lassen, daß der Rest-N in den Zellen zunimmt. Es seien solche Versuche angeführt, in denen Glykogen, Gesamt-Kohlenhydrat und z. T. Rest-N bestimmt wurde (Tabelle IV).

Diese Versuche zeigen deutlich, daß die Gesamtkohlenhydrate

Tabelle IV.

Wirkung von Alkalilösungen (NaOH) auf den Rest-N, auf das Gesamtglykogen, auf die Gesamtkohlenhydrate von Hefezellen (1 g) während eines 2 $\frac{1}{2}$ -stündigen Aufenthaltes im Brutofen bei 37°; Berechnung der Zunahme an Gesamtkohlenhydraten und des höchsten durch Eiweißspaltung zu erklärenden Kohlenhydratzuwachses. (Glykogenvermehrung in denselben Versuchen s. Tabelle II.)

Versuchs-Nr.	Datum	Hefart	Kontrollversuch			Alkaliversuch (NaOH) Alkalkonzentration										
			abs. in mg	in % *)	n/10	abs. in mg	in % *)	n/10	abs. in mg	in % *)	n/10	abs. in mg	in % *)			
														abs. in mg	in % *)	abs. in mg
10	25. II. 21	reine Hefe	Rest N	0,55	—	—	0,59	—	—	0,73	—	—	1,04	—	—	
			Gesamtglykogen als Dextrose berechnet	17,8	70,0	—	19,0	74,8	—	22,4	88,1	—	—	25,4	100,0	—
			Gesamtkohlenhydrate als Dextrose berechnet	25,4	100,0	—	28,2	111,0	—	33,6	132,7	—	—	35,2	138,5	—
			Kohlenhydrate außer Glykogen	7,6	30,0	—	9,2	36	—	11,2	44	—	—	9,8	39	—
			Zunahme der Gesamtkohlenhydrate	—	—	—	2,8	11	—	8,2	33	—	—	9,8	39	—
11	17. III. 21	reine Hefe	Zugl., aus Eiweiß maximal	—	—	—	0,26	1	—	1,2	4,7	—	3,19	12,6	—	
			Zugl., nicht aus Eiweiß minimal	—	—	—	2,5	10	—	7,0	28,3	—	—	6,6	26,4	—
			Rest N	0,3	—	—	0,43	—	—	0,53	—	—	—	0,8	—	—
			Gesamtglykogen als Dextrose berechnet	10,8	81,8	—	13,2	100	—	18,8	142,4	—	—	19,0	143,9	—
			Gesamtkohlenhydrate als Dextrose berechnet	13,2	100	—	15,0	113,6	—	22,2	168,1	—	—	23,8	180,1	—
12	4. IV. 21	reine Hefe	Kohlenhydrate außer Glykogen	2,4	18,2	—	1,8	14	—	3,4	2,6	—	4,8	36	—	
			Zunahme der Gesamtkohlenhydrate	—	—	—	1,8	14	—	9,0	68,1	—	—	10,6	80	—
			Zugl., aus Eiweiß maximal	—	—	—	0,85	6,5	—	1,5	11,4	—	—	3,25	24,7	—
			Zugl., nicht aus Eiweiß minimal	—	—	—	0,9	7,5	—	7,5	56,7	—	—	7,3	55,3	—
			Gesamtglykogen als Dextrose berechnet	11,7	66,4	—	12,6	71,5	—	14,3	81,2	—	—	16,8	95,4	—
12	4. IV. 21	reine Hefe	Gesamtkohlenhydrate als Dextrose berechnet	17,6	100	—	19,4	110,2	—	20,4	115,9	—	22	125,5	—	
			Kohlenhydrate außer Glykogen	5,9	33,6	—	6,8	38	—	6,1	34,7	—	—	5,4	30	—
			Zunahme der Gesamtkohlenhydrate	—	—	—	1,8	10,2	—	2,8	15,9	—	—	4,4	25,5	—

\*) des anfänglichen Gesamtglykogenwertes.

jedenfalls an Menge zunehmen, ungefähr gleichviel wie das Glykogen, vielleicht sogar etwas mehr. Ferner erhellt aus den Versuchen, daß der Rest-N bei steigendem Alkaligehalt der Suspensionsflüssigkeit zunimmt<sup>1)</sup>. Freilich genügt auch das Maximum an Kohlenhydraten, das aus den gespaltenen Eiweißmolekülen entstehen konnte, nicht, um die Steigerung der Gesamt-Kohlenhydrate auch nur zur Hälfte zu erklären. Es ist daher anzunehmen, daß die Hefezelle auf die steigenden Alkalidosen zum Teil durch Eiweißabbau, zum Teil aber auch aus N-freien Substanzen Kohlenhydrat in steigender Menge bildet.

### Zusammenfassung.

1. Hefezellen zeigen in sauren Medien keine regelmäßigen Veränderungen ihres Glykogengehaltes.

2. Hefezellen reichern sich in alkalischen Lösungen von geringen Konzentrationen suspendiert mit Glykogen an; bei höheren Konzentrationen entstehen noch größere Glykogenmengen, die aber dann zum Teil nicht mehr in der Zelle selbst liegen bleiben, sondern von dieser an die umgebende Flüssigkeit abgegeben werden.

3. Die Glykogenvermehrung in der Hefe durch Alkali beruht nicht auf einer Umwandlung von vorgebildetem Zucker in Glykogen, denn die Gesamt-Kohlehydrate scheinen nach Alkaliwirkung in der Hefe vermehrt.

4. Die Vermehrung der Kohlenhydrate in den Hefezellen bei Alkaliwirkung beruht z. T. auch auf der Umprägung von Eiweiß in Kohlenhydrate (Beweis durch die Zunahme des Rest-N).

5. Diese Vermehrung der Kohlenhydrate und des Glykogens in der Einzelzelle erlaubt den Schluß, daß die zuckersparende Wirkung des Alkalis auf die Leberzelle zumindest zum Teil eine direkte Zellwirkung ist.

<sup>1)</sup> Vgl. die alten Versuche von Dufourt (Arch. de méd. expér. 1890, S. 424, zit. nach Lépine), der an mit Fleisch gefütterten Hunden stets nach längerer Alkalizufuhr die doppelten Glykogenmengen in den Organen gefunden hat als an den Kontrolltieren ohne Alkali.

## Zur Frage des Acetaldehydnachweises im Harn.

Von  
Wilhelm Stepp.

(Aus der Medizinischen Universitätsklinik zu Gießen.)

(Eingegangen am 22. August 1921.)

Nachdem es gelungen ist, die im Blut und im Harn von Diabetikern zuweilen auftretenden aldehydartig reagierenden Substanzen<sup>1) 2)</sup> mit aller Sicherheit als Acetaldehyd zu erkennen<sup>3)</sup>, erscheint es wünschenswert, im größeren Maßstab zu untersuchen, ob der neu aufgefundene Körper auch bei anderen Krankheiten im Harn zu finden ist.

Nach den Erfahrungen beim Diabetes muß man freilich stets mit der gleichzeitigen Anwesenheit von Aceton rechnen. Hat man es in einer Flüssigkeit mit Acetaldehyd und Aceton zu tun, so sind die sonst zum Nachweis von Ketonen und Aldehyden für gewöhnlich benutzten Proben nicht zu gebrauchen, da sie fast durchweg auf der Reaktionsfähigkeit der Carbonylgruppe beruhen, die beiden Gruppen von Substanzen eigen ist.

Im folgenden möge kurz eine Übersicht über die einfachsten Methoden gegeben werden, die es uns erlauben, die Anwesenheit des Acetaldehyds neben Aceton im Harn mit Sicherheit zu erkennen. Vorausgeschickt sei, daß diese Reaktionen, wenn sie überhaupt irgendwelche Schlußfolgerungen gestatten sollen, im Destillat des Harnes angestellt werden müssen. Da der Acetaldehyd einen sehr niedrigen Siedepunkt hat (21 °), so kann man zur Herstellung des Destillats sich zweckmäßigerweise eines Fraktionieraufsatzes bedienen, etwa in der von Hempel angegebenen Form. Zur qualitativen Prüfung genügen 20 oder 40 ccm Harn, die je nach der Neigung zum Schäumen mit dem mehrfachen Volumen Wasser verdünnt werden. Zum Ansäuern benutzt man Essig-

---

<sup>1)</sup> W. Stepp, Zeitschr. f. physiol. Chem. **107**, 29. 1919.

<sup>2)</sup> W. Stepp, diese Zeitschr. **107**, 60. 1920.

<sup>3)</sup> W. Stepp und R. Feulgen, Zeitschr. f. physiol. Chem. **114**, 301. 1921.

säure (auf 100 ccm Volumen ca. 2 ccm der 50 proz. Essigsäure). Als Vorlage dient ein nur wenige Kubikzentimeter eisgekühltes Wasser enthaltendes, schlankes Meßzylinderchen, in das ein mit dem Kühler verbundenen Rohr taucht. Der Meßzylinder muß in Eis gepackt sein und so viel Wasser<sup>1)</sup> enthalten, daß die aufsteigenden Gasblasen eine möglichst hohe Flüssigkeitsschicht zu durchwandern haben. Von größter Wichtigkeit ist es, daß man ganz langsam erhitzt, so daß eine Gasblase nach der anderen langsam aufsteigt; andernfalls muß man mit Verlusten rechnen. Durch die Benutzung des Fraktionieraufsatzes wird eine starke Anreicherung etwa vorhandenen Acetaldehyds erzielt. Unterwirft man ein Volumen von 100 ccm der Destillation, so kann man sich mit etwa 5 ccm Destillat begnügen. Man ist dann sicher, daß aller Aldehyd übergegangen ist. Zu beachten ist allerdings, daß die Flüssigkeit im Destillierkolben nicht zu stark koche, da sonst die Wirksamkeit des Fraktionieraufsatzes illusorisch wird.

### 1. Reduktion ammoniakalischer Silberlösung.

Die Reduktionsprobe mittels ammoniakalischer Silberlösung gestaltet sich am empfindlichsten bei Verwendung des B. Tollensschen Reagens in der Weise, wie ich es in einer früheren Arbeit in dieser Zeitschrift beschrieb<sup>2)</sup>. Ich möchte an dieser Stelle nur noch hervorheben, daß man bei der Bereitung des Tollensschen Reagens mit dem Ammoniakzusatz aufhören soll, noch bevor alles Silberoxyd in Lösung gegangen ist. Die noch verbleibende geringe Trübung entfernt man durch Filtrieren durch ein gehärtetes Filter. Von dem Filtrat setzt man 2–3 Tropfen zu einigen Kubikzentimetern des zu prüfenden Destillats und stellt gleichzeitig einen blinden Versuch mit destilliertem Wasser an. Ist Aldehyd vorhanden, so tritt, je nach dessen Menge, schon nach wenigen Minuten oder erst nach längerem Stehen eine Dunkelfärbung bzw. ein schwarzer Niederschlag auf. Auf das Erhitzen verzichtet man am besten ganz. Das Verhalten der Kontrollprobe (destilliertes Wasser + Tollens' Reagens) zeigt uns an, inwieweit eine etwa auftretende Dunkelfärbung auf Ausscheidung von Silberoxyd infolge von Ammoniakverdunstung zu beziehen ist; übrigens läßt sich später ausfallendes Silberoxyd leicht an seiner Löslichkeit bei erneutem Ammoniakzusatz erkennen.

Fällt die Tollenssche Probe mit einem in der beschriebenen Weise gewonnenen Destillat positiv aus, so ist die Gegenwart eines leicht flüchtigen Aldehyds sehr wahrscheinlich. Nach eigenen Untersuchungen an reinen Lösungen von Acetaldehyd fällt die Tollenssche Probe

<sup>1)</sup> Das Wasser in der Vorlage muß schon vorher durch längeres Stehen in Eis stark abgekühlt sein.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. **107**, 60. 1920.

noch in einer Verdünnung 1 : 100 000 im Verlauf von 5 Minuten positiv aus. Außer von den Aldehyden wird ammoniakalische Silberlösung von manchen aromatischen Aminen, Alkaloiden, mehrwertigen Phenolen, *o*-Diketonen, Cyclohexemonen und anderen Stoffen mehr gegeben. Ameisensäure reduziert ammoniakalische Silberlösung nicht, wohl aber Silbernitratlösung.]

## 2. Reduktion Fehlingscher Lösung.

Die Reduktion Fehlingscher Lösung durch aliphatische Aldehyde ist in bezug auf die Schnelligkeit und Empfindlichkeit der Reaktion mit der Reduktion ammoniakalischer Silberlösung nicht zu vergleichen. Es scheint, daß die einzelnen Aldehyde sich verschieden verhalten, und daß die Gegenwart anderer Substanzen den Ablauf der Reaktion in beschleunigendem oder hemmendem Sinn beeinflussen kann. Während man beim Kochen stark verdünnter Aldehydlösung zunächst vielfach gar keine Veränderung der Fehlingschen Lösung beobachten kann, tritt in der Kälte bei längerem Stehen die Reduktion ganz allmählich ein und ist selbst bei verdünnten Lösungen nach 24—48 Stunden sehr deutlich. Es setzt sich dann ein dichter Niederschlag von rotem Kupferoxydul am Boden des Gefäßes nieder. Handelt es sich um aller kleinste Aldehydmengen, so kommt es nicht zum Ausfall von Kupferoxydul, sondern nur zu einer ausgesprochenen Grünfärbung der Fehlingschen Lösung.

Da es außer Aldehyd wohl kaum andere flüchtige Substanzen gibt, die in der Kälte Fehlingsche Lösung reduzieren, so ist die Probe nicht ohne Bedeutung.

## 3. Rotfärbung von fuchsinschwefliger Säure.

Eine durch wenig schweflige Säure entfärbte Fuchsinlösung wird durch Aldehyde intensiv rot bis violettrot gefärbt. Genaue Angaben über die Herstellung eines empfindlichen Reagens macht Guyon<sup>1)</sup>. 1—2 ccm der fuchsinschwefligen Säure werden mit der gleichen Menge des auf Aldehyde zu prüfenden Destillats kräftig geschüttelt. Die Anwesenheit von Aldehyd zeigt sich durch Rotfärbung der Flüssigkeit an. Die Probe ist nach meinen Versuchen nicht sehr empfindlich und wird bei kleinen Aldehydmengen erst nach längerem Stehen positiv. Auch hier empfiehlt sich die Anstellung eines blinden Versuchs mit destilliertem Wasser.

Aceton gibt keine Reaktion mit fuchsinschwefliger Säure.

<sup>1)</sup> Siehe bei Hans Meyer, Analyse und Konstitutionsermittlung organischer Verbindungen, 3. Aufl., Verl. von Springer, Berlin 1916, S. 682.

#### 4. Riminische Reaktion in der L. Lewinschen Modifikation.

Die Riminische Probe in der ursprünglichen Ausführungsart mit Diäthylamin hat sich mir nicht bewährt. Auch Aceton gibt einen deutlich positiven Ausfall, wenn auch nicht von dem Farbenton, wie ihn der Acetaldehyd zeigt. Schließlich überzeugte ich mich davon, daß man auch im blinden Versuch (mit destilliertem Wasser + Nitroprussidnatrium + Diäthylamin) eine schwache Blaufärbung bekommt, und das Ergebnis blieb das gleiche, als ich diese Probe mit einem von E. Merck, Darmstadt ganz frisch bezogenen Präparat wiederholte.

Dagegen ist die Lewinsche Modifikation<sup>1)</sup> der Riminischen Probe mit Piperidin an Stelle des Diäthylamins sehr wohl zu gebrauchen, da Aceton hierbei nicht in Reaktion tritt. Am empfindlichsten finde ich die Probe, wenn man — bei kleinen Aldehydmengen — eine ganz dünne, frisch bereitete Nitroprussidnatriumlösung verwendet, von der man einige Tropfen zu der zu prüfenden Lösung gibt. Wenn nun das Reaktionsgemisch sorgfältig mit Piperidin überschichtet wird, so tritt bei Anwesenheit von Aldehyd an der Berührungsstelle ein blauer Ring auf (Kornblumenfarbe). Handelt es sich nur um ganz geringe Aldehydspuren, so verschwindet der blaue Ring sehr schnell wieder. Nach L. Lewin ist die Reaktion beweisend für die Anwesenheit von Acetaldehyd. Die folgenden Aldehyde, die durchgeprüft wurden, geben die Reaktion nicht: Formaldehyd, Trichloraldehyd, Isobutylaldehyd, Benzaldehyd, Salicylaldehyd, Phenylacetaldehyd, Önanthol und Furfurol. Paraldehyd verhielt sich ähnlich wie Acetaldehyd, aber nur in stärkerer Konzentration, ebenso Propionaldehyd.

#### 5. Identifikation des Acetaldehyds mit Dimethylhydroresorcin.

Die Identifizierung des Acetaldehyds in Körperflüssigkeiten kann bei den in Frage kommenden Mengen nur durch die Darstellung einer geeigneten Verbindung durchgeführt werden. In ketonfreien Lösungen ist hierfür das Hydrazone des p-Nitrophenylhydrazins sehr geeignet. C. Neuberg hat dieses Produkt zur Charakterisierung des Acetaldehyds bei seinen Studien über die Hefegärung mit bestem Nutzen verwendet<sup>2)</sup>. Für die acetonhaltige Flüssigkeit wäre die Herstellung eines Hydrazons unzuweckmäßig, weil auch das Aceton Hydrazone bildet. Das Gegebene ist hier das von Vorländer<sup>3)</sup> zuerst angegebene Verfahren mit Dimethylhydroresorcin. 2 Moleküle Dimethylhydroresorcin treten mit 1 Molekül Aldehyd zusammen unter Austritt eines Moleküls Wasser und Bildung gut krystallisierender Verbindungen, der Alkyldenbisdimethylhydroresorcine. Diese Kondensa-

<sup>1)</sup> L. Lewin, B. **32**, 3388. 1899.

<sup>2)</sup> C. Neuberg, diese Zeitschr. **36**, 68. 1911 u. ff.

<sup>3)</sup> D. Vorländer, B. **30**, 1801. 1897.



tionsprodukte lassen sich verschieden leicht in ihre Anhydride umwandeln, deren Schmelzpunkte zum Teil sehr erheblich von den eigenen entfernt liegen; hierdurch wird die Unterscheidung der einzelnen Aldehydverbindungen sehr erleichtert. C. Neuberg und E. Reinfurth<sup>1)</sup> haben das Dimethylhydroresorcin, nach dem Vorschlag Neubergs kurz Dimedon genannt, mit gutem Erfolg zur Abscheidung des Acetaldehyds aus Gärgut benutzt. Stepp und Feulgen<sup>2)</sup> haben kürzlich durch die Darstellung der Acetaldehydverbindung aus Diabetikerharn das Vorkommen von Acetaldehyd in den Ausscheidungen des menschlichen Körpers sichergestellt. Bezüglich der Einzelheiten der Darstellung sei auf die Arbeit von Stepp und Feulgen verwiesen.

Daß die Unterscheidung der Dimedonverbindung des Acetaldehyds, des Aldomedons nach Neuberg, von den Verbindungen mit anderen Aldehyden, an deren Vorkommen man denken könnte, leicht durchgeführt werden kann, zeigen die Forschungen der Vorländerschen Schule. In einer Arbeit von Volkholz<sup>3)</sup> findet sich eine Zusammenstellung der bekannten Aldehydverbindungen mit Dimedon, aus der ich die folgenden Daten entnehme.

Aldehyd	Verbindungen mit Dimethylhydroresorcin			
	Säuren		Anhydride	
	Formel	Schmelzpunkt	Formel	Schmelzpunkt
Formaldehyd . . . . .	$C_{17}H_{24}O_4$	187—188°	$C_{17}H_{22}O_3$	171°
Acetaldehyd . . . . .	$C_{18}H_{26}O_4$	189°	$C_{18}H_{24}O_3$	173—174°
Propionaldehyd . . . . .	$C_{19}H_{28}O_4$	150—151°	$C_{19}H_{26}O_3$	139°
Isovalerylaldehyd . . . . .	$C_{21}H_{32}O_4$	153—155°	$C_{21}H_{30}O_3$	168°
Furfurol . . . . .	$C_{21}H_{26}O_5$	148—150°	$C_{21}H_{24}O_3$	162—165°

Wie man sieht, liegen beim Acetaldehyd der Schmelzpunkt des Aldomedons und der seines Anhydrids um mehr als 30° auseinander. Dadurch ist die sichere Unterscheidung von anderen Aldehyden gewährleistet.

Das Kondensationsverfahren mit Dimethylhydroresorcin stellt also eine Methode dar, die mit absoluter Sicherheit die Anwesenheit des Acetaldehyds in Körperflüssigkeiten neben Aceton zu erkennen erlaubt. Da das Molekulargewicht des Reagens verhältnismäßig groß ist, bekommt man selbst mit kleinen Aldehydmengen eine genügende Ausbeute an Kondensationsprodukt. Immerhin empfiehlt es sich, unter Verwendung eines Fraktionieraufsatzes zu arbeiten, wie es in der Einleitung beschrieben wurde.

<sup>1)</sup> C. Neuberg und E. Reinfurth, Diese Zeitschr. **106**, 281. 1920.

<sup>2)</sup> W. Stepp und R. Feulgen, l. c.

<sup>3)</sup> H. Volkholz, Bestimmung von Aldehyden mit Dimethylhydroresorcin. Inaug. Dissert. Halle 1902.

# **Der Einfluß der H-Ionenkonzentration auf die Permeabilität totter Membranen, auf die Adsorption an Eiweißsolen und auf den Stoffaustausch der Zellen und Gewebe.**

Von

**Albrecht Bethe.**

(Aus dem Institut für animalische Physiologie, Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 2. September 1921.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

## **1. Einfluß der Reaktion der Lösung auf die Diffusion von Farbstoffen durch Pergament-Dialysierhülsen.**

Nach der von Lhermite aufgestellten, von Nernst, Overton und Höber weiter ausgebauten Hypothese<sup>1)</sup>, daß die Durchlässigkeit einer Membran von der Löslichkeit der permeierenden Substanz in der Membransubstanz abhängig ist, war zu vermuten, daß der Durchtritt von Farbstoffen durch einen Dialyseschlauch bei denjenigen  $C_H$  beschleunigt würde, welche die Anfärbung z. B. einer Pergamenthülse bei dem betreffenden Farbstoff begünstigen. Die sauren Farbstoffe färben Pergament sehr viel stärker in saurer Lösung als in neutraler und noch stärker als in alkalischer Lösung. Umgekehrt verhalten sich die meisten basischen Farbstoffe. Wenn es sich hierbei auch um keinen Lösungsprozeß, sondern um „Adsorption“ an dem kolloidalen Gel handelt, so liegt doch insofern eine Ähnlichkeit vor, als der adsorbierte Farbstoff wenigstens zum großen Teil wieder ausgewaschen werden kann. Ob der Adsorption ein mehr chemischer oder mehr physikalischer Vorgang zugrunde liegt, spielt für die hier zu erörternden Fragen keine Rolle.

Methodik: In die Öffnung der eingeweichten Hülsen<sup>2)</sup> wurden passende, kurze Glasröhren fest eingebunden. Nach dem Trocknen wurde der umwickelte Teil zur vollkommenen Abdichtung mit syrischem Asphalt, gelöst in Chloroform, mehrmals überpinselt. Die Glasansätze wurden nach Beschickung der Hülsen mit 10 resp. 15 ccm dest. Wasser mit Gummistopfen verschlossen. Die Farbstofflösung (300 ccm) kam in große Pulverflaschen mit Glasstöpsel. In der Lösung

<sup>1)</sup> Siehe Höber, Physikalische Chemie der Zelle. 4. Aufl., 1914, S. 398.

<sup>2)</sup> Schleicher und Schüll, Nr. 579.

schwamm die Dialysierhülse. Die zusammengehörigen Flaschen wurden auf eine senkrechtstehende Holzscheibe aufgebunden, die durch einen Motor in dauernder langsamer Drehung erhalten wurde. — Zur Untersuchung wurde in verschiedenen zeitlichen Abständen der Hülseinhalt vorsichtig herausgenommen und mit einer Probe der Außenlösung colorimetrisch verglichen<sup>1)</sup> (Colorimeter von Dr. Krüss, Hamburg, mit Lummer-Brodhuhnschem Prisma). Nachher wurden die Lösungen möglichst quantitativ wieder in die Hülse zurückgefüllt. Die Temperatur in dem benutzten Kellerraum war ziemlich gleichmäßig und schwankte zwischen 16 und 19° C. Zur Konstanterhaltung fehlten die Einrichtungen.

Von basischen Farbstoffen, die bei den in Betracht kommenden  $C_H$  rein kathodisch wandern<sup>2)</sup>, wurden untersucht: Methylenblau (588)<sup>3)</sup>, Janusrot (164) und Capriblau (556), außerdem das sich amphoter verhaltende Pyronin G (468) und das schon bei geringer Säuerung partiell anodisch werdende Methylviolett 6 B (430). Von sauren Farbstoffen wurden benutzt Cyanol (415), Eriocyanin (447), Lichtgrün (411) und Thiocarmin (591), alle bei den in Frage kommenden  $C_H$  rein anodisch.

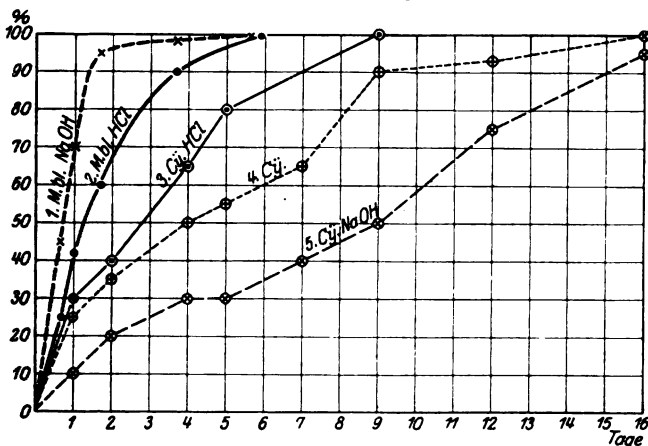


Abb. 1. Diffusion eines basischen Farbstoffs (Methylenblau 588, M. bl.) und eines sauren Farbstoffs (Cyanol 415, Cy) gegen Wasser bei verschiedener  $C_H$ . Anfangskonzentration des Farbstoffs  $\frac{1}{1000}$ -Mol. Zunahme der Konzentration des Farbstoffs im Dialyseachlauch in % der Außenlösung. Kurve 1 u. 5:  $\frac{1}{1000}$ -N. Na OH (lang gestrichelt), Kurve 2 u. 3:  $\frac{1}{1000}$ -H Cl (ausgezogen), Kurve 4: neutral (kurz gestrichelt). (Versuch vom 29. V. u. 7. VIII. 1913.)

Die angestellten Versuche haben im wesentlichen die Voraussetzung bestätigt: Bei den von Pergament schneller und stärker adsorbierten Farbstoffen tritt der Diffusionsausgleich fast ausnahmslos in kürzerer Zeit ein als bei den langsamer und weniger stark anfärbenden. Da basische Farbstoffe in neutraler Lösung meist stärker anfärben als saure, so tritt bei den ersteren der Ausgleich in der Regel auch schneller ein als bei den letzteren. Abweichungen finden sich dann, wenn der Farbstoff nicht durchfärbt, sondern nur von außen anfärbt.

<sup>1)</sup> Meist durch meine damalige Kieler Laborantin, Fräulein Hoeck, um nach Möglichkeit subjektiv beeinflusste Ablesungen zu vermeiden.

<sup>2)</sup> Siehe Bethe, Kolloid-Zeitschr. 24, 11. 1920.

<sup>3)</sup> Die eingeklammerten Zahlen sind die Nummern in Schulz und Julius, 4. Aufl. Berlin 1902.

Bei den untersuchten sauren Farbstoffen wurde ohne Ausnahme der Diffusionsausgleich durch saure Reaktion beschleunigt, durch alkalische Reaktion erheblich verlangsamt (Abb. 1, Kurve 3–5, Cyanol, Ausgleich zu 50% in saurer Lösung nach 3, in neutraler nach 4 und in alkalischer nach 9 Tagen. Abb. 2, II, Kurve d u. e, Eriocyanin; 50% Ausgleich: sauer nach 3, alkalisch nach 12 Tagen). Lichtgrün und Thiocarmin wurden weniger genau untersucht, zeigen aber dasselbe nur in längerer Zeit. Die Pergamenthülsen sind stets in saurer Lösung am dunkelsten und in neutraler wieder dunkler als in alkalischer Lösung gefärbt.

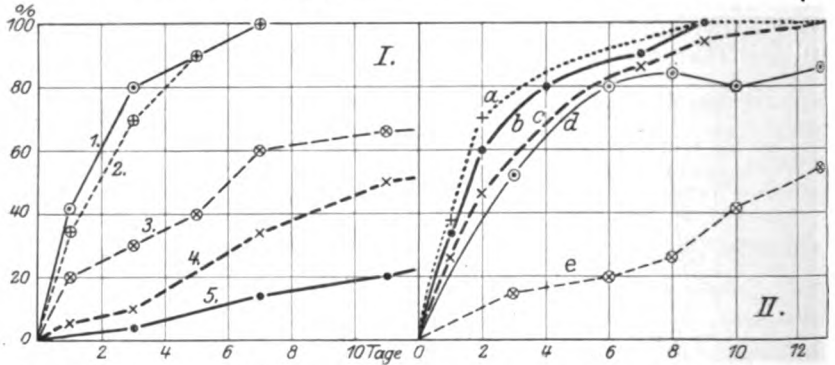


Abb. 2, I. Diffusion von  $\frac{\text{Pyronin}}{1000}$  Mol. (468) (amphoterer Farbstoff) und von  $\frac{\text{Janusrot}}{3000}$  Mol. (164) (basischer Farbstoff) gegen Wasser. Pyronin: Kurve 1 in  $\frac{\text{HCl}}{250}$ , 2 in neutraler Lösung und 3 in  $\frac{\text{NaOH}}{500}$ . Janusrot Kurve 4 in  $\frac{\text{NaOH}}{300}$  und 5 in  $\frac{\text{HCl}}{300}$ . (Beide Versuche vom 7. IV. 1913.)

Abb. 2, II. Diffusion von  $\frac{\text{Methylviolett}}{2500}$  Mol. (430) (basischer Farbstoff, partiell anodisch) und  $\frac{\text{Eriocyanin}}{2500}$  Mol. (447) (saurer Farbstoff). Methylviolett: Kurve a in neutraler Lösung, b in  $\frac{\text{HCl}}{500}$  und c in  $\frac{\text{NaOH}}{1000}$ . Eriocyanin: Kurve d in  $\frac{\text{HCl}}{500}$  und e in  $\frac{\text{NaOH}}{500}$  (Versuche vom 7. VIII. u. 21. V. 1913.)

Gerade umgekehrt verhalten sich von basischen Farbstoffen Methylblau (schnell diffundierend) und Janusrot (langsam). Bei Methylblau (Abb. 1, Kurve 1 u. 2) wurde ein Ausgleich zu 50% in alkalischer Lösung nach ca. 17 Stunden und in saurer Lösung nach ca. 32 Stunden gefunden; beim Janusrot (Abb. 2, I, Kurve 4 und 5) war ein Ausgleich zu 20% in alkalischer Lösung nach 5 und in saurer nach 11 Tagen erreicht. Die Hülsen sind in alkalischer Lösung sehr stark, in neutraler weniger und in saurer nur schwach gefärbt.

Eine Ausnahme bildete das Capriblau, bei welchem die Diffusion in saurer Lösung schneller erfolgte als in alkalischer (neutral wurde nicht versucht). Die Anfärbung des Pergaments war in alkalischer Lösung ganz außerordentlich stark. Vielleicht ist daran zu denken, daß durch den starken Farbniederschlag eine Porenverstopfung zustande kommt.

Ebenfalls abweichend verhielt sich der basische Farbstoff Methylviolett (Abb. 2, II, Kurve a, b u. c), bei dem die Diffusion am schnellsten in neutraler, am langsamsten in alkalischer Lösung verlief. Dieser Farbstoff wird aber bereits bei geringen Alkalizusätzen partiell anodisch<sup>1)</sup>. Ferner färbt sich Pergament mit Methylviolett in neutraler Lösung viel stärker als in saurer und noch viel stärker als in alkalischer Lösung von der gewählten  $C_H$ <sup>2)</sup>. Das stimmt mit dem Ausfall der Diffusionsversuche aufs beste überein. — In Abb. 2, I sind noch die Kurven von einem amphoteren Farbstoff (Pyronin, Kurve 1—3) abgebildet<sup>1)</sup>. Saure und neutrale Reaktion ergeben keinen deutlichen Unterschied, während alkalische Reaktion eine stärkere Depression der Diffusionsgeschwindigkeit erkennen läßt. Dies erklärt sich daraus, daß der Farbstoff bei alkalischer Reaktion aus einem basischen (kathodischen) in einen sauren (anodischen) verwandelt wird. Damit stimmt wieder überein, daß die Anfärbung von Pergament bei neutraler Reaktion sehr viel stärker ist als in alkalischer Lösung.

Da die Dispersität saurer Farbstoffe bei Säurezusatz und basischer Farbstoffe bei Alkalizusatz abnimmt, ihr Durchtritt durch die Membran unter diesen Umständen aber wegen der besseren Adsorbierbarkeit zunimmt, so können aus der Diffusionsgeschwindigkeit von Farbstoffen und anderer elektrisch geladener Teilchen Schlüsse auf die Teilchengröße wohl kaum gezogen werden. Auf keinen Fall beweisen Diffusionsversuche durch Membranen hindurch irgend etwas über den Dispersitätsgrad, wenn verschieden geladene Kolloide, wie saure und basische Farbstoffe, gegeneinander in Vergleich gesetzt werden, wie dies oft geschehen ist. Bei gleichgeladenen Substanzen mag ein Vergleich möglich sein, wenn die Versuche bei gleicher  $C_H$  angestellt werden.

## 2. Einfluß der Reaktion auf die Farbstoffspeicherung von Kolloiden im Solzustand.

Meines Wissens sind alle bisherigen Versuche über den Einfluß der  $C_H$  auf die Färbbarkeit von Kolloiden an Gelen angestellt. Versuche an Solen bieten aber ein besonderes biologisches Interesse, da die lebenden Zellen, besonders im Zellplasma, vorzugsweise aus Solen zu bestehen scheinen. Die Färbbarkeit lebender Zellen ist aber in sehr hohem Maße

<sup>1)</sup> Bethe, l. c. S. 16.

<sup>2)</sup> Vergleiche die Befunde von O. Kestner, Arch. f. Dermatol. u. Syphilis **130**, 472. 1921. — Siehe auch die Arbeiten von R. Keller, Elektrohistol. Untersuchungen. Prag 1920. Zeitschr. f. physikal. Chem. **98**, 338. 1921. Auf die neuartigen Vorstellungen dieses Autors möchte ich nicht eher eingehen, als ich seine Befunde nachgeprüft habe.

von der Reaktion im inneren und äußeren Medium abhängig<sup>1)</sup>. Saure Reaktion im Zellinneren erhöht die Speichermöglichkeit für saure Farbstoffe und setzt die Färbbarkeit durch basische Farbstoffe herab, während umgekehrt bei alkalischer Reaktion saure Farbstoffe gar keine oder fast gar keine Anfärbung bewirken, basische Farbstoffe aber außerordentlich stark gespeichert werden. Ganz ähnlich verhalten sich, wie lange bekannt und zuerst von Hofmeister an Leimplatten genauer untersucht ist, Gele; um aus dieser Tatsache weitergehende Schlüsse für die Theorie der Färbung lebender Zellen ziehen zu dürfen, fehlte der Nachweis, daß sich Sole in dieser Beziehung gerade so verhalten wie Gele. Diese Lücke habe ich versucht auszufüllen<sup>2)</sup>.

**Methodik:** Die Versuchsanordnung war im Prinzip die gleiche wie bei den Diffusionsversuchen gegen Wasser, nur wurde in die Diffusionshülsen statt Wasser eine Eiweißlösung eingefüllt. Es konnten als Eiweißkörper nur solche in Frage kommen, welche bei leichter Änderung der  $C_{H^+}$  nicht zur Ausfällung gebracht werden. Da die Versuche mit Hinblick auf biologische Verhältnisse gemacht wurden, hier aber in den Zellen und Geweben stets Gemische vorlagen, so durften geeignete unreine Substanzen zur Verwendung kommen, die am leichtesten zu beschaffen sind. Es wurde daher als Innenlösung verwandt: 1. Rinderserum. 2. ungekochte Magermilch und 3. 5% Gelatine; 1. und 2. bei Zimmertemperatur. 3. im Thermostaten bei 30° C. Bei 1. war der Farbstoff in Ringer gelöst, bei 2. und 3. in Wasser. Zur Verhütung der Fäulnis wurden der Außenlösung auf je 300 ccm 20 Tropfen 2proz. Thymollösung zugesetzt. Trotz möglicher Reinlichkeit bei der Colorimetrierung treten doch meistens, besonders bei Gelatine, wo höhere Temperaturen nötig waren, bei langdauernden Versuchen mit der Zeit leichte Zersetzungserscheinungen ein. Die  $C_{H^+}$  der Außenlösung wurde stets am Ende, meist noch ein- oder zweimal während des Versuchs mit der Gaskette bestimmt.

Als Repräsentant der basischen Farbstoffe wurde Methylenblau gewählt; von sauren Farbstoffen wurde meist Cyanol, einigemal auch Eriocyanin, Lichtgrün (in saurer und neutraler Lösung) und Thioearmin verwendet.

Die drei angewandten Eiweißlösungen (Gelatine, Serum und Milch) gaben gleichartige Resultate. Methylenblau (basischer Farbstoff) wurde aus saurer Lösung nur in geringer Menge in die Kolloidlösung aufgenommen. Auch nach einer Zeit, welche 2- oder 3mal so lang war als notwendig, um bei Diffusion gegen Wasser Verteilungsgleichgewicht zu bewirken, war die Farbkonzentration im Inneren nur auf etwa 40% der Außenkonzentration gestiegen. In alkalischer Lösung war dagegen schon nach wenigen Stunden — schneller als bei Diffusion gegen Wasser — Gleichheit der Farbkonzentration gegenüber der Außenlösung erreicht, und im Lauf von wenigen Tagen wurde eine maximale Anreicherung des Farbstoffes in der Eiweißlösung von mehreren 1000% der Außenlösung, in manchen Fällen sogar

<sup>1)</sup> A. Bethe, Wien. med. Wochenschr. 1916, Nr. 14. — K. Rohde, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 168, 411. 1917.

<sup>2)</sup> Ein kurzer Hinweis auf diese Versuche findet sich schon in meiner oben (Anm. 1) zitierten Arbeit.

eine vollkommene Erschöpfung derselben gefunden. Andererseits wurde die Anfärbung der Eiweißlösung durch saure Farbstoffe stets sehr verzögert, wenn die Lösung alkalisch war, und es kam nie zum Ausgleich der Konzentration, während der Farbstoff aus saurer Lösung zu mehreren 100% aufgespeichert wurde.

Wurde während des Verlaufs des Versuchs die Reaktion der Lösung durch Zusatz von Lauge zur sauren Lösung und von Säure zur alkalischen Lösung umgestimmt, so trat mit wenigen Ausnahmen auch eine Umkehr in der Farbverteilung ein. Die vorher schwach gefärbte Innenlösung nahm viel Farbe aus der Außenlösung auf, während sich die vorher stark gefärbte Eiweißlösung zusehends entfärbte und sogar weit unter 100% der Konzentration der Außenlösung sank. Dies letztere ist besonders beweisend dafür, daß z. B. bei Methyleneblau die geringe Anfärbung in saurer Lösung nicht darauf zurückzuführen ist, daß das Verteilungsgleichgewicht in der Versuchszeit noch nicht erreicht war, sondern daß die geringe Farbaufnahme auf einer negativen Adsorption beruht.

Beispiele: Abb. 3, I zeigt den Verlauf eines Versuchs mit 5% Gelatine und Methyleneblau. Bei alkalischer Reaktion (Kurve B) steigt die Farbmenge in der Innenlösung in 8 Tagen auf ca. 2000% der Farbkonzentration der Außenlösung an. Am 10. Tag wird eine zur Neutralisation der anfänglich zugefügten Alkalimenge genügende Menge HCl zugesetzt. Die Farbkonzentration im Inneren fällt schnell auf weniger als 100% ab. Dieser weitgehende Abfall ist wohl teilweise darauf zurückzuführen, daß die Gelatine in saure Gärung übergegangen war. Weitere Säurezusätze am 18., 25. und 29. Tag senken die Farbkonzentration bis auf 40% herab! Die  $C_H$  am Ende des Versuchs ( $10^{-2.54}$ ) ist geringer, als sie ohne Gegenwart von Kolloid sein würde (ca.  $10^{-2.0}$ ), weil das Kolloid einen Teil der H-Ionen bindet.

Ganz anders verläuft die Kurve A, wo anfänglich saure Reaktion herrschte. Nach 14 Tagen hat die Farbkonzentration in der Gelatine erst 40% der Konzentration der Außenlösung erreicht und steigt in den nächsten Tagen nicht weiter an. Der Ordinatenmaßstab der A-Kurve ist 10 mal größer als der der B-Kurve! (Bei Diffusion gegen Wasser wäre bei viel niedriger Temperatur — 16—18°, siehe Abb. 1 — schon nach 6 Tagen Ausgleich der Konzentration vorhanden). Auf 2 maligen Zusatz von Alkali, der aber noch nicht genügt, um Neutralisation zu bewirken, steigt die Farbkonzentration im Sol langsam bis auf 100% an. (Kontrollversuche hatten gezeigt, daß die Gegenwart von Gelatine in der Farblösung ebenso wie von kleinen Mengen Säure resp. Alkali nur geringe Veränderungen der Farbtiefe bewirken, welche vernachlässigt werden können.)

Abb. 3, II zeigt einen ähnlichen Versuch mit Milch. Ein Vergleich zwischen Außen- und Innenlösung war wegen der Trübung der Milch nicht möglich. Die Speicherung des Farbstoffs in der Milch konnte nur aus der Abnahme der Farbmenge in der Außenlösung (gegenüber einer unveränderten Menge der Anfangslösung) erschlossen werden. Diese Veränderung in der Außenlösung ist in den Kurven A und B dargestellt. Die Endabnahme beträgt bei saurer Lösung nur 10%. bei alkalischer Lösung dagegen 100%, d. h. die Lösung war

entfärbt. Nach Beendigung des Versuchs wurde der Milch Salzsäure zugesetzt, mit Wasser zu 500 ccm aufgefüllt und gekocht. Das Casein fällt aus und wird abfiltriert, was in stark saurer Lösung ohne wesentlichen Farbstoffverlust an das Filter möglich ist (Fällung z. B. mit Sublimat ist nicht angängig, weil das Methylenblau mit ausfallen würde). Colorimetrischer Vergleich der Filtrate zeigt, daß in B mindestens 14,5 mal soviel Farbstoff enthalten ist als in A und daß in A weniger Farbstoff gespeichert ist als im gleichen Volum der Außenlösung am Anfang vorhanden war.

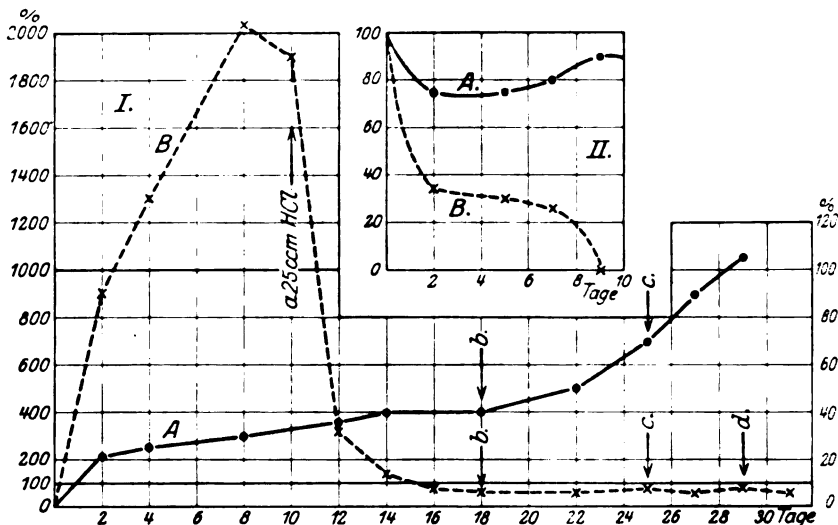


Abb. 3, I. Diffusion von Methylenblau  $\frac{1}{1500}$  Mol. aus wässriger saurer Lösung (A: 25 ccm  $\frac{\text{HCl}}{10}$  in 300 ccm Farblösung;  $C_H = 10^{-2.08}$ ) und wässriger alkalischer Lösung (B: 25 ccm  $\frac{\text{NaOH}}{10}$  in 300 ccm Farblösung;  $C_H = 10^{-11.2}$ ) gegen 10 ccm 5proz. Gelatine im Solzustand (30° C) Konzentrationsänderung des Farbstoffs in Gelatine in % der jeweiligen Außenlösung. Maßstab für A rechts, für B links! Bei a Zusatz von 25 ccm  $\frac{\text{HCl}}{10}$  zu B. Bei b Zusatz von 10 ccm  $\frac{\text{NaOH}}{10}$  zu A und von 10 ccm  $\frac{\text{HCl}}{10}$  zu B; ebenso bei c. Bei d Inhalt von A verloren gegangen, zu B wieder 10 ccm  $\frac{\text{HCl}}{10}$ .  $C_H$  in Proben der Außenlösung bestimmt am 25. Tag in A zu  $10^{-2.29}$ , in B zu  $10^{-4.50}$  und am 31. Tag in B zu  $10^{-2.54}$  (Versuch vom 27. V. 1913).

Abb. 3, II. Diffusion von Methylenblau  $\frac{1}{1500}$  Mol. aus wässriger Lösung 300 ccm gegen 20 ccm ungekochte Milch. A in salzsaurer Lösung ( $10^{-2.52}$ ), B in alkalischer Lösung ( $10^{-11.48}$ ). Verminderung der Farbstoffkonzentration der Außenlösung ausgedrückt in % der Anfangskonzentration (Versuch vom 6. V. 1914).

Abb. 4 zeigt einen analogen Versuch wie Abb. 3, I mit einem sauren Farbstoff (Cyanol gegen Gelatine). Bei saurer Lösung (Kurve A) schneller Anstieg der Innenkonzentration auf ca. 250%, während in alkalischer Lösung (B) zuerst 70% erreicht werden, die Konzentration aber weiterhin wieder auf etwa 40% absinkt. Am 11. Tag wird zu jeder Lösung eine zur Neutralisation theoretisch genügende Menge Alkali resp. Säure zugegeben (vor der Zugabe ist Lösung A noch sauer, Lösung B noch alkalisch). Die B-Kurve steigt jetzt steil an, während aus unbekanntem Gründen die A-Kurve hoch bleibt, auch noch nach einem weiteren Alkalizusatz am 16. Tag. Die  $C_H$ -Bestimmung in B vor Zusatz der zweiten Säuremenge zeigt, daß auch hier die Gelatine von sich aus sauer



geworden ist. — Die Gelatine zeigte sich am Ende des Versuchs verändert, indem sie beim Abkühlen nicht mehr erstarrte.

Versuche mit Eriocyanin gegen Gelatine geben ähnliche Resultate. Mit Lichtgrün liegt nur ein Versuch in saurer und neutraler Lösung gegen Serum (neutralisiert) vor, der nur über 4 Tage lief. In dieser Zeit war aus neutraler Lösung überhaupt keine sichtbare Farbmenge in das Serum übergegangen, während in saurer Lösung mehr als 100% Farbstoff ins Serum übergegangen waren. Eine

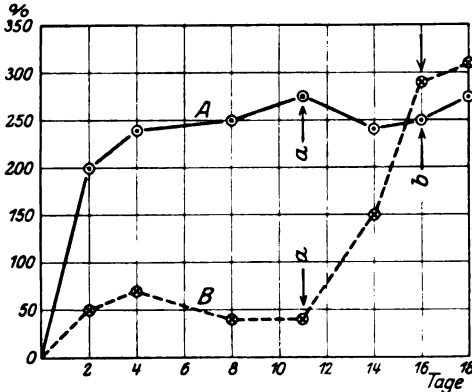


Abb. 4. Diffusion von Cyanol  $\frac{1}{1500}$  Mol. aus wässriger saurer Lösung (A: 25 ccm  $\frac{\text{HCl}}{10}$  in 300 ccm Farblösung,  $C_H = 10^{-2.08}$ ) und wässriger alkalischer Lösung (B: 25 ccm  $\frac{\text{NaOH}}{10}$  in 300 ccm Farblösung:  $C_H = 10^{-11.9}$ ) gegen 10 ccm 5 proz. Gelatine im Solzustand (80° C). Konzentrationsänderung des Farbstoffs in Gelatine in % der jeweiligen Außenlösung. Bei a Zusatz von 25 ccm  $\frac{\text{NaOH}}{10}$  zu A und von 25 ccm  $\frac{\text{HCl}}{10}$  zu B. Bei b Zusatz von 20 ccm  $\frac{\text{NaOH}}{10}$  zu A und von 20 ccm  $\frac{\text{HCl}}{10}$  zu B.  $C_H$  in Außenlösung von A vor Zusatz a =  $10^{-2.31}$ , vor Zusatz b =  $10^{-8.29}$ , am Ende des Versuchs =  $10^{-9.12}$ .  $C_H$  in Außenlösung von B vor Zusatz a =  $10^{-10.56}$ , vor Zusatz b =  $10^{-2.79}$ , am Ende des Versuchs =  $10^{-2.06}$ . (Versuche vom 9. VII. 1913.)

in die gleiche Außenlösung eingehängte mit Wasser gefüllte Dialysierhülle zeigte im inneren Wasser nur ganz geringe Anfärbung. Zum Ausgleich bis auf 50% sind nach anderen Versuchen bei Lichtgrün in saurer Lösung schon ungefähr 30 Tage nötig. Das Kolloid fördert also auch bei schlecht diffundierenden sauren Farbstoffen in saurer Lösung den Farbdurchtritt in außerordentlicher Weise.

Versuche mit Methylenblau gegen Rinderserum zeigten, wie die Versuche mit Gelatine und Milch, schon in kurzer Zeit hohe Anreicherung der Farbe im Serum bei alkalischer Reaktion (z. B. 270% in 3 Tagen); auch bei neutraler Reaktion war die Speicherung noch bedeutend (150% in 3 Tagen), während in saurer Lösung in derselben Zeit nur 50% erreicht wurden.

### 3. Die Färbung tierischer und pflanzlicher Zellen bei verschiedener $C_H$ , mit basischen, sauren und amphoterem Farbstoffen.

Meine eigenen Versuche<sup>1)</sup> und die Versuche von Rohde<sup>2)</sup> an lebenden Zellen haben ergeben, daß sich diejenigen Zellarten, welche neutrale oder schwach alkalische Reaktion im Inneren zeigen, mit basischen

<sup>1)</sup> Wien. med. Wochenschr. 1916, Nr. 14 (Festschrift für Exner).

<sup>2)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 168, 411. 1917.

Farbstoffen stark färben, während sie sich mit sauren Farbstoffen nicht oder sehr blaß färben. Von Natur mehr alkalisch oder künstlich alkalisch gemachte Zellen färben sich noch stärker mit basischen Farbstoffen, während umgekehrt von Natur saure oder künstlich sauer gemachte Zellen basische Farbstoffe nur wenig aufnehmen, sich aber mit leicht diffusiblen, sauren Farbstoffen, gleichgültig, ob sie lipoidlöslich sind oder nicht, deutlich und manchmal sogar sehr stark tingieren lassen. Da sich nicht nur Eiweißgele, sondern, wie hier gezeigt wurde, auch Eiweißsole bei verschiedener  $C_H$  ebenso verhalten, so scheint hiermit eine genügende Erklärung für das Verhalten der ja stets eiweißreichen Zellen gegeben zu sein und auch dafür, daß sich häufig eiweißreichere Zellteile stärker tingieren<sup>1)</sup>.

Ein Unterschied gegenüber den Modellversuchen liegt nur insofern vor, als bei der Färbung von Zellen, welche schon von Natur von der neutralen Reaktion abweichen, der Farbstoff außen in neutraler Lösung geboten werden kann. Etwas Ähnliches läßt sich im Modellversuch wohl nur schwer erreichen. Aber auch bei solchen Zellen wird der Effekt noch erhöht, wenn die Außenlösung nach derselben Richtung wie das Zellinnere von der neutralen Reaktion abweicht. (Auch bei den Zellen, die nur schwer in ihrer Reaktion umzustimmen sind, wie z. B. Hefezellen, wird die Anfärbung mit basischen Farbstoffen wesentlich vermindert<sup>2)</sup> und eine deutliche Anfärbung mit manchen sauren Farbstoffen erzielt, wenn die Außenlösung sauer ist. Unveröffentlichte Versuche von mir und Schaller aus dem Jahre 1907.) Ferner unterscheiden sich die Modellversuche in neutralem System dadurch von dem Färbungsergebnis an neutralen Zellen, daß im ersten Fall mit sauren Farbstoffen doch immerhin eine deutliche Anfärbung eintritt, während dieselbe im letzteren Fall meist ganz vermißt wird. Es müßte also bei den Zelleiweißkörpern schon in neutraler Lösung eine stark negative Adsorption für saure Farbstoffe vorliegen, welche im Modellversuch erst bei alkalischer Reaktion deutlich wird. Vielleicht werden weiter fortgesetzte Modellstudien auch hierfür Analoga bieten. Hierbei ist vorausgesetzt, daß die Plasmahaut stets für geeignete, saure Farbstoffe durchgängig ist.

Ich habe mich schon früher der wohl zuerst von Küster und Ruhland ausgesprochenen Ansicht angeschlossen, daß alle leichter diffusiblen sauren Farbstoffe zwar in Zellen eindringen, aber hier in vielen Fällen nicht bis zur Sichtbarkeitsgrenze angereichert werden. Diesen Mangel an deutlicher Anfärbung führte ich auf die neutrale resp. alkalische Reaktion der betreffenden Zellen zurück. Um das Eindringen bei

<sup>1)</sup> Siehe Rohde, l. c. S. 419.

<sup>2)</sup> Siehe auch Endler, diese Zeitschr. **42**, 440. 1912 u. **45**, 359. 1912 und Nierenstein, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **179**, 289. 1920.

solchen sich nicht deutlich färbenden Zellen zu beweisen, habe ich auf Grund folgender Überlegung Versuche angestellt:

Eine Reihe von sauren Farbstoffen wie z. B. Thiocarmin<sup>1)</sup> und Indigotin sind leicht reduzierbar. Wenn sie in Zellen eindringen, denen kein freier Sauerstoff zur Verfügung steht, so werden sie hier reduziert werden. Dadurch wird das Verteilungsgleichgewicht gestört, das Leukoprodukt wird herausdiffundieren und neuer nicht reduzierter Farbstoff eintreten, bis aller Farbstoff reduziert ist oder die Zellen absterben. Daraus ergab sich folgende Versuchsanordnung:

In den Aortenbulbus eines gut schlagenden Froschherzens wird nach Unterbindung der übrigen Gefäße ein kleines Y-förmiges Röhrchen eingebunden und mit wenigen Tropfen der zu reduzierenden Farbstofflösung (in Tyrodelösung gelöst) gefüllt, so daß dieselbe Farbmenge vom Herzen immer hin- und hergepumpt wurde. Das Ganze war von einem mit Glashähnen versehenen Gefäß umgeben, durch das Wasserstoff hindurchgeleitet und das nach einigen Minuten verschlossen wurde. Nach 1—2 Stunden war die Flüssigkeit meist entfärbt oder sehr viel heller geworden, und das Herz hatte zu schlagen aufgehört. Beim Durchleiten von Sauerstoff färbte sich die Flüssigkeit wieder, und das Herz begann wieder zu schlagen.

Es war die Möglichkeit vorhanden, daß die Reduktion nicht in den Zellen stattgefunden hatte, sondern durch eine vom Muskel ausgeschiedene reduzierende Substanz hervorgerufen wurde, wie dies wohl mit Recht für die Reduktion von Indigo durch Bakterien<sup>2)</sup> angenommen wird. Ich habe daher die Versuche in gleicher Weise wiederholt, das Röhrchen aber nicht mit Farblösung, sondern mit reiner Tyrodelösung gefüllt. Diese konnte, nachdem das Herz nach 1—2 Stunden zu schlagen aufgehört hatte, durch Kippen des Apparates ohne Zutritt von Sauerstoff in eine an der Wand des Gefäßes befindliche Ausbuchtung hineingetrieben werden, in der sich ein Tropfen der reduzierbaren Farblösung befand. Die entstehende verdünnte Farblösung zeigte sich nicht heller als eine gleichkonzentrierte Lösung, welche nicht mit dem Gewebe in Berührung gewesen war. Offenbar war also der Farbstoff in den Versuchen der ersten Art wirklich in die Zellen eingedrungen und dort reduziert worden, oder aber: Es war die Reduktion an der Kontaktfläche der Zellen erfolgt. Die letztere Möglichkeit kann durch Versuche kaum ausgeschaltet werden, scheint mir aber weniger wahrscheinlich. — Es sei noch hervorgehoben, daß weder Indigotin noch Thiocarmin eine im Mikroskop erkennbare Färbung des Herzmuskels bewirken.

Ähnliche Versuche habe ich in Straßburg mit Herrn Schaller und in Kiel mit Herrn Lübbert auch an Hefezellen und Fäulnisbakterien angestellt: Die längere Zeit in Wasserstoffatmosphäre gehaltenen Kulturen wurden unter Sauerstoffabschluß zentrifugiert. Die zellarme Kulturflüssigkeit zeigte keine oder geringe Reduktion von Thiocarmin und Indigotin, während dieselben Farbstoffe von den Zellen selbst, wenn gleichfalls Sauerstoff ferngehalten wurde, schnell reduziert wurden. Diese Versuche sind aber insofern nicht ganz beweisend, als auch abgetötete Zellen noch reduzieren. Wie groß der Prozentsatz an toten Zellen in den Kulturen ist, läßt sich aber schwer nachweisen.

Diese Versuche geben zwar keine unumstößlichen Beweise für das Eindringen von sauren Farbstoffen in Zellen, die eine Anfärbung mit

<sup>1)</sup> Thiocarmin ist nach Nierenstein (Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **179**, 273. 1920) im Diamylamin-Ölsäuregemisch unlöslich!

<sup>2)</sup> Pfeffer, Pflanzenphysiologie, 2. Aufl., 1897, Bd. I, S. 558.

solchen Farbstoffen nicht zeigen; sie machen aber immerhin das Eindringen recht wahrscheinlich. Die Mengen, die beim Verteilungsgleichgewicht eingedrungen sind, können jedenfalls nur sehr klein sein; es ist daher wohl möglich, daß sie sich der Beobachtung selbst bei dem von Wiechmann<sup>1)</sup> angewandten makroskopisch-colorimetrischen Verfahrens (an Blutkörperchen) entziehen.

Von Interesse mußte es auch sein, wie sich amphotere Farbstoffe gegenüber lebenden Zellen verhalten. Daß es Farbstoffe gibt, welche sich in saurer Lösung wie basische Farbstoffe verhalten, d. h. in einem elektrischen Potentialgefälle zur Kathode wandern, während sie in alkalischer Lösung zur Anode wandern, also die Eigenschaften saurer Farbstoffe annehmen, habe ich kürzlich nachgewiesen<sup>2)</sup>. Nun sind zweifellos die besten Vitalfärber basische Farbstoffe, und nur ausnahmsweise können Vitalfärbungen auch mit sauren Farbstoffen erzielt werden. Wenn dieser fast prinzipielle Unterschied auf einer Eigenschaft der Plasmahaut beruhte, so müßten amphotere Farbstoffe, wenn sie schwer umstimbaren Zellen als Kation in schwach saurer Lösung dargeboten werden, eine Anfärbung bewirken; diese müßte aber ausbleiben, wenn der Farbstoff als Anion, also in alkalischer Lösung, die Zellen von außen umspült. Vermögen aber alle diffusiblen Farbstoffe die Plasmahaut zu durchdringen, und ist für das Färberesultat im wesentlichen das Speicherungsvermögen des Zellinnern maßgebend, dann muß das Färberesultat annähernd dasselbe sein, gleichgültig, ob der Farbstoff draußen als Kation oder als Anion vorhanden ist. Bei Zellen, welche auch in schwach sauren und schwach alkalischen Lösungen ihre Reaktion beibehalten, wird der Farbstoff nach der Passage durch die Plasmahaut in das Salz verwandelt werden, welches der Innenreaktion entspricht. Er wird also, gleichgültig, welches Farbsalz draußen dargeboten wird, etwa in gleichem Maße anfärbend wirken. Dies letztere war in der Tat der Fall.

Für die Versuche eigneten sich am besten Prune pure und Corein, aber auch Gallocyanin D, obwohl schwer löslich, Pyronin und Rhodamin B, B extra gaben gute Resultate. Die Farbstoffe wurden in Wasser gelöst, die eine Portion mit geringen Mengen HCl, die andere mit wenig NaOH versetzt und jede auf ihre Wanderungsrichtung untersucht. Sie wurden so schwach sauer resp. so schwach alkalisch gemacht, als dies mit einer sicher kathodischen resp. anodischen Wanderungsrichtung vereinbar war. Darauf ließ ich die Lösungen in gut verschlossenen Gefäßen auf die zu untersuchenden Zellen einwirken, um sie bald darauf mikroskopisch zu untersuchen. Als Objekte benutzte ich Opalinen und andere Infusorien aus dem Darm des Frosches, ferner Darmepithel des Frosches, Zellen von Gelbenrüben, Spirogyra und die sauren Zellen der Epidermis weißer Nelken. Während sich die

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **189**, 120. 1921. Ich halte es für sehr möglich, daß mit dem Verfahren Wiechmanns ein Eindringen bei höherer  $C_H$  festzustellen ist.

<sup>2)</sup> Kolloid-Zeitschr. **27**, 16. 1920.

erstgenannten Objekte mit den gebräuchlichen sauren Farbstoffen überhaupt nicht färbten, zeigten sie sowohl in den kathodischen wie in den anodischen Lösungen der amphoteren Farbstoffe eine fast gleich deutliche Anfärbung (auch Granulafärbung bei Anwendung von Corein und Prune pure bei gut erhaltener Beweglichkeit bzw. guter Plasmolysierbarkeit). Die sauren Nelkenzellen, die sich mit basischen Farbstoffen wenig intensiv färben, aber saure Farbstoffe speichern, zeigten gegenüber den beiden Lösungen der amphoteren Farbstoffe keinen deutlichen Intensitätsunterschied. Wohl aber unterschieden sich die gefärbten neutralen Zellen von den gefärbten sauren Zellen im Farbton, entsprechend ihrer Innenreaktion. Die sauren Zellen färbten sich mehr rötlich, die basischen resp. neutralen mehr bläulich, gleichgültig, ob die Außenlösung sauer war (und einen rötlichen Ton hatte) oder alkalisch war (und bläulich aussah). Zu bemerken ist noch, daß die amphoteren Farbstoffe in ihrem Färbvermögen für Gelatine, Pergament usw. viel weniger durch die Reaktion der Farbflotte beeinflußt werden, als dies bei basischen resp. sauren Farbstoffen der Fall ist. Dies war zu erwarten.

Auch diese Befunde sprechen dafür, daß es für die Menge eines eindringenden Farbstoffes im wesentlichen auf das Zellinnere ankommt, und daß die Plasmahaut hierbei keine ausschlaggebende Rolle spielt. Jedenfalls kann der oft so deutliche Unterschied zwischen sauren und basischen Farbstoffen nicht darauf beruhen, daß etwa die Plasmahaut für positiv geladene Teilchen leicht durchgängig, für negativ geladene dagegen undurchgängig ist.

Neuerdings hat Nierenstein<sup>1)</sup> eine modifizierte Lipoidtheorie aufgestellt, bei welcher auf die Verhältnisse in der Zelle sehr viel mehr Gewicht gelegt wird, als dies bei der klassischen Lipoidtheorie der Fall war. Die sehr zahlreichen, leider nur an einem einzigen Objekt (Paramäcien) untersuchten Farbstoffe gaben dann eine Färbung, wenn sie sich auch in einem Gemisch eines neutralen Fettes mit einer freien Fettsäure und einer organischen Base (Ölsäure-Diamylamin-Ölmischung) lösten. Die Art und der Grad der Anfärbung wird nicht nur von der Gegenwart dieser Stoffe in einer Außenschicht, sondern auch von ihrer Verteilung im Inneren der Zelle abhängig gemacht.

Die Übereinstimmung ist an dem untersuchten Objekt in der Tat überraschend gut. Wenn die Theorie aber wirklich etwas leisten soll, so muß die Übereinstimmung auch für alle anderen lebenden Objekte gelten. Das ist jedoch offenbar nicht der Fall. Zu den Farbstoffen, die in dem Ölgemisch nicht löslich sind, gehört nach Nierenstein das Guineagrün B, das Lichtgrün SF, das Fuchsin S und das Thio-carmin, ferner nach Wiechmann<sup>2)</sup> auch das Cyanol extra. Mit allen diesen Farbstoffen kann man zwar schwach alkalische und neutrale Zellen nicht sichtbar anfärben, wohl aber saure Zellen [Blutkörperchen von Ascidien<sup>3)</sup>, Zellen der weißen Nelke<sup>4)</sup> usw.]. Ganz besonders leicht

1) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **179**, 233. 1920.

2) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **189**, 120. 1921.

3) Bethe, Bull. de l'inst. océanographique. Monaco. 1914, Nr. 284.

4) Rohde, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **168**, 422. 1917.

geht dies mit Cyanol. Hier ergeben sich also schon Schwierigkeiten für die neue Lipoidtheorie, die ich im Augenblick als unüberwindbar ansehe. Einen weiteren Einwand gegen die gewiß sehr ansprechende Hypothese Nierensteins sehe ich darin, daß man wohl kaum anzunehmen berechtigt ist, die sich mit vielen Farbstoffen besonders stark färbenden Granulae enthielten reichliche Mengen von Öl, Ölsäure und organischen Basen. Vielmehr ist es von vielen dieser Granulae ziemlich sicher, daß sie eiweißartiger Natur sind. Auch fehlt ein klares Bild, welche Substanzen in den Zellen die Rolle des Diämylamins, also einer gut fettlöslichen, aber wenig wasserlöslichen organischen Base, übernehmen sollen.

Zusatz bei der Korrektur: In einer soeben erschienenen Arbeit (Jahrb. f. wissensch. Botanik 60, 354. 1921) leugnet Collander unter andrem den Einfluß der Innenreaktion der Zellen auf die Färbbarkeit, obwohl er z. T. die Angaben von Rohde und mir an pflanzlichen Objekten bestätigt. Collander hat übersehen, daß ich nie die Innenreaktion als allein bestimmend, sondern nur als sehr stark mitbestimmend angesehen habe. Ich würde mich daher gar nicht wundern, wenn es stark saure Zellen gäbe, die sich mit sauren Farbstoffen nicht besonders stark färben. (Rabarber fanden wir im Gegensatz zu C. färbbar.) Bei den vielen Dutzenden pflanzlicher Objekte, die Rohde und ich untersuchten, färbten sich die deutlich sauren Zellen auch mehr oder weniger stark mit sauren Farbstoffen. Nur diese sind namentlich in unsern Arbeiten aufgeführt, dagegen nicht die vielen anderen neutralen oder schwach alkalischen, welche farblos oder fast farblos blieben. Diese Übereinstimmung, die ebenso auch bei Tieren zu konstatieren ist, ist doch recht auffallend. — Collander ist offenbar der Meinung, daß die Eiweißkonzentration und die Abweichung von der neutralen Reaktion groß sein muß, um negative resp. positive Adsorption saurer Farbstoffe zu erzielen. Beides trifft nicht zu.

Auf andere Einwände Collanders hoffe ich in einer späteren Arbeit eingehen zu können. Die Ladung sehe auch ich als wesentlich bei der vitalen Färbung an, aber in einem ganz anderen Sinn als Collander dies tut. Die von ihm wieder neu aufgestellte Hypothese, die Plasmahaut sei für Farbkationen permeabel, für Farbanionen nicht, scheint mir durch die oben beschriebenen Versuche mit amphotheren Farbstoffen wiederlegt zu sein.

#### 4. Einfluß der $C_H$ auf Resorption und Exkretion von Farbstoffen.

Wenn die Reaktion einen so bedeutenden Einfluß auf die Diffusionsgeschwindigkeit durch Membranen ausübt, besonders dann, wenn sich jenseits derselben eine geeignete kolloidale Lösung befindet, so lag es nahe, auch den Einfluß der Reaktion auf den Prozeß der Farbstoffresorption durch den Darm und der Farbstoffausscheidung durch die Nieren zu untersuchen. Auf meine Veranlassung ist diese Frage durch Herrn Dr. Rohde<sup>1)</sup> am Frosch und von Herrn Dr. Pohle<sup>2)</sup> am Hund untersucht worden. Beide kamen im wesentlichen zu dem gleichen Resultat: Die Resorption basischer Farbstoffe wird wesent-

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 182, 114. 1920.

<sup>2)</sup> Dtsch. med. Wochenschr. 1921. Nr. 48.

lich beschleunigt und verstärkt, wenn gleichzeitig mit dem Farbstoff Alkali verabreicht wird; sie wird vermindert, wenn zugleich Säure eingeführt wird. Umgekehrt wird die Resorption saurer Farbstoffe durch Säuregaben beschleunigt und durch Alkaligaben verlangsamt. Unter den gleichen Umständen, unter denen die Resorption begünstigt bzw. verschlechtert wird, wird auch die Ausscheidung durch die Niere beschleunigt bzw. herabgesetzt. Besonders deutlich tritt der Einfluß auf die Ausscheidung zutage, wenn der Farbstoff intravenös infundiert und gleichzeitig Alkali oder Säure per os zugeführt wird. Parallel mit der Farbstoffausscheidung geht eine Veränderung der Reaktion des Harnes. Bei sauren Farbstoffen zeigt die Farbstoffausscheidung ihr Maximum, wenn der Harn am sauersten ist, bei basischen Farbstoffen, wenn der Harn am alkalischsten ist.

Bei Einverleibung saurer Farbstoffe ohne gleichzeitige Gabe von Säure steigt während der Ausscheidungsperiode die  $C_H$  des Harnes an, um nachträglich unter die Norm zu sinken. Offenbar erleichtert der Organismus den Farbaustritt durch vermehrte Säureabgabe, die nachträglich wieder eingespart wird (Pohle). Andererseits können bei gleichzeitiger Säure- resp. Alkaliverabreichung noch solche saure resp. basische Farbstoffe zur Resorption und zur Ausscheidung gebracht werden, die sonst nicht oder nur schwer aufgenommen und abgeschieden werden (Rohde).

Die Aufnahme und Abgabe von Farbstoffen wird nach diesen Versuchen unter den gleichen Umständen begünstigt und erschwert, unter welchen ihr Durchtritt durch tote Membranen im positiven oder negativen Sinne beeinflusst wird. Auf der Seite der Resorption erscheint dies Verhalten ohne weiteres verständlich: Bei sauren Farbstoffen und relativ saurer Reaktion im Verdauungskanal befindet sich auf der Lumenseite seiner Wand viel Säure und viel Farbstoff, auf der Blutseite seiner Wand wenig Säure und wenig Farbstoff, außerdem reichlich Kolloid, welches ein um so mehr ein Vakuum für den Farbstoff darstellt, je mehr es nach der sauren Seite hin verändert wird. Der aufgenommene Farbstoff, ebenso wie die übergetretene Säure werden aber sofort mit dem Blutstrom weitergeführt. Stärker alkalische Reaktion im Verdauungskanal wird umgekehrt den Durchtritt saurer Farbstoffe erschweren, dagegen den basischer Farbstoffe erleichtern.

Ganz anders liegt die Sache bei der Exkretion von seiten der Niere. Hier haben wir — bei saurem Farbstoff und Säuregabe — zur Zeit der stärksten Ausscheidung auf der Blutseite eine relativ niedrige  $C_H$  und eine relativ geringe Farbstoffkonzentration, dagegen auf der Harnseite hohe  $C_H$  und hohe Farbkonzentration. Ohne besondere Kräfte würden (wie im Darm) Säure und Farbstoff auf die Blutseite übergehen. Wenn wir nun sehen, daß entgegen den Vorgängen im Modellversuch weiter Säure und saurer Farbstoff zur Harnseite hin transportiert wird,

so muß hier auf eine besondere aktive Tätigkeit der Nierenepithelien geschlossen werden. Dabei ist der aktive Vorgang offenbar die Ausscheidung der Säure, mit der die Ausscheidung des sauren Farbstoffes dann Hand in Hand geht. Umgekehrt ist das Vehikel der Ausscheidung basischer Farbstoffe das in den Harn durch aktive Nierentätigkeit abströmende Alkali.

Was für saure und basische Farbstoffe gilt, wird vermutungsweise auch für andere Substanzen, die schwer resorbierbar und schwer auszuscheiden sind, Geltung haben, sowie sie elektrische Ladungen tragen. Von physiologischen Substanzen wird man hier in erster Linie an die Harnsäure denken, wie dies auch schon Pohle<sup>1)</sup> ausgeführt hat.

Von mir angestellte Versuche am Kaninchen führten zu keinen sicheren Resultaten. Ich injizierte Kaninchen täglich subcutan eine Harnsäureaufschwemmung und gab dann am 4. Tag per os HCl in größeren Mengen. Die im Harn auftretende Harnsäuremenge war aber sehr viel größer als die täglich normal ausgeschiedene und die täglich zugeführte Menge zusammengenommen, so daß demgegenüber der geringen Steigerung der Ausscheidung am Salzsäuretag keine Bedeutung zugeschrieben werden konnte. Die gesuchte beschleunigende Wirkung der Säurezufuhr wurde überdeckt durch die zuerst von Griesbach<sup>2)</sup> gefundene vermehrte Harnsäurebildung, welche bei Harnsäurezufuhr auftritt. — Weitere Versuche nach dieser Richtung, ebenso wie Dialysierversuche mit Harnsäure sind begonnen.

Aber von einer anderen Seite her scheint sich die Annahme, daß Säureausscheidung die Harnsäureausscheidung begünstigt, stützen zu lassen: Falls Harnsäure leichter zur Ausscheidung kommt, wenn gleichzeitig leichter diffusible und stärker dissoziierte Säuren ausgeschieden werden, dann muß der Harn derjenigen Tiere, welche im wesentlichen Harnsäure ausscheiden, stark sauer sein. Nachdem ich gesehen hatte, daß der frischgelassene Harn von Tauben Methylrot zum Umschlag bringt, hat Herr Dr. Pohle auf meine Veranlassung frischen Harn von Tauben mit der Gaskette untersucht und dabei folgende Werte gefunden:  $C_H = 10^{-5,34}$ ,  $10^{-4,91}$  und  $10^{-5,4}$ . Das sind Werte, die für ein Tier mit vegetarischer Lebensweise sehr hoch sind, denn in der Regel liegt bei pflanzenfressenden Säugern der Wert um  $10^{-7}$  herum.

### Zusammenfassung.

1. Die Diffusion von Farbstoffen gegen Wasser durch Pergament hindurch wird durch die Reaktion sehr stark beeinflußt. Sie wird bei sauren Farbstoffen durch saure Reaktion beschleunigt, durch alkalische Reaktion herabgesetzt, umgekehrt bei basischen Farbstoffen.

2. Diffundiert der Farbstoff aus wässriger Lösung durch Pergament in eine Eiweißlösung, so reichert sich der Farbstoff in dem Sol dann sehr

<sup>1)</sup> l. c.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. **101**, 172. 1920.



stark an, wenn ein saurer Farbstoff in saurer Lösung benutzt wird. Dagegen zeigt sich negative Adsorption, wenn bei saurem Farbstoff die Lösung alkalisch ist. Umgekehrt verhalten sich basische Farbstoffe. Der Prozeß ist reversibel.

3. Auf der Basis dieser Versuche werden die Färbungsergebnisse an lebenden Zellen besprochen und in guter Übereinstimmung mit der Hypothese gefunden, daß der Wasserstoffionenkonzentration eine wesentliche Rolle bei der vitalen Färbung zukommt.

4. Auch bei der Resorption des Darmes und der Exkretion der Niere spielt die H-Ionenkonzentration eine wesentliche Rolle.

# **Sind die bei der Säurehydrolyse des Blutglobulins nachweisbar werdenden Kohlenhydratgruppen ein Spaltungsprodukt des Eiweißmoleküls?**

Von

**Leo Langstein.**

(Aus dem Kaiserin Auguste Victoria-Haus, Reichsanstalt zur Bekämpfung der Säuglings- und Kleinkindersterblichkeit.)

(Eingegangen am 3. September 1920.)

In die Zeit meiner Tätigkeit im physiologisch-chemischen Laboratorium Hofmeisters in Straßburg i. E., dem ich für die Einführung in die Biochemie von Herzen dankbar bleibe, fällt meine Arbeit über die Abspaltung des Glykosamins aus krystallisiertem Eiereiweiß; sie war für mich Veranlassung, meine Studien über die Kohlenhydratgruppe der Eiweißkörper weiter fortzusetzen. In der Klinik Friedrich Müllers in Basel habe ich die Bluteiweißkörper in den Kreis meiner Untersuchungen gezogen. Es war ein außerordentlich überraschender Befund, als ich bei meinen Spaltungsversuchen einen Zucker erhielt, den ich mit d-Glucose identifizieren mußte<sup>1</sup>). Aber noch andere Kohlenhydrate sind damals in der Spaltungsflüssigkeit des Globulins nachgewiesen worden; auffallend war der Befund der Fructose, von der ich allerdings nicht feststellen konnte, ob sie nicht ein sekundäres Spaltungsprodukt sei, entstanden aus der Glucose durch Einwirkung der Alkalien, und eine Aminohexose, die sich aber von Glykosamin in einigen wesentlichen Punkten zu unterscheiden schien. Bezüglich der Menge im Eiweißmolekül des Globulins vorhandener und abspaltbarer Kohlenhydrate habe ich auf Grund der quantitativen Bestimmung der reduzierenden Substanzen 1,4% angenommen. Über die Art der Bindung des Zuckers konnte ich natürlich nur Hypothesen aufstellen. Mir schien es nicht unwahrscheinlich, daß es sich um locker gebundenen Zucker handelt, aber ich hielt es für ausgeschlossen, daß der gefundene Zucker, nur beigemengt, einer Verunreinigung des Globulins entstammt.

---

<sup>1</sup>) Langstein, Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss. Wien **112** (Abt. 11b). 1903 und **113** (Abt. 111). 1904.

Die Nachprüfung meiner Arbeit durch Abderhalden, Bergell und Dörpinghaus<sup>1)</sup> schien die von mir erhaltenen Resultate nicht zu bestätigen. Die genannten Autoren hydrolysierten nach der vor mir angewendeten Methode 500 g in den Höchster Farbwerken hergestellten Globulins, fanden jedoch nur den 10. Teil abspaltbarer Kohlenhydrate im Verhältnis zu dem, was ich angegeben hatte, nämlich nur 0,1% reduzierender Substanz. Sie stellten das Osazan dar und sprechen das Kohlenhydrat als Glucose an. Mit Rücksicht auf die geringe gefundene Menge kamen sie jedoch zur Ablehnung meiner Auffassung, die Glucose stelle einen, wenn auch vielleicht nur locker gebundenen Bestandteil des Eiweißmoleküls dar, sondern äußerten die Meinung, daß der gefundene Zucker wahrscheinlich nichts anderes sei als eine Verunreinigung bzw. Beimengung vom Blut her.

E. Fischer interessierte sich außerordentlich für diese Frage, und nach einer in seinem Institut stattgehabten Diskussion hat er mich aufgefordert, noch einmal in eine Prüfung und Aufklärung der Widersprüche einzutreten. Meine mittlerweile von der Kinderheilkunde und dem Säuglingsschutz vollständig absorbierte Tätigkeit hat immer wieder zu einer Aufschiebung der auch für mich wünschenswerten Aufgabe geführt, zudem war das Rohmaterial in der Kriegszeit außerordentlich schwer zu erhalten. Als jedoch größere Mengen Serums wieder erhältlich waren, habe ich sie laufend zur Darstellung des Globulins benutzt. Es kam darauf an, zunächst ein reines Globulinpräparat zu erhalten. Zu diesem Zwecke wurde das frische Pferdeserum von bernsteingelber Farbe erst bis zu  $\frac{1}{4}$ -Sättigung mit heißgesättigtem, neutral reagierendem Ammonsulfat versetzt. Der dabei entstehende Niederschlag, die Fibrinogen und Fibringlobulinfraktion, die noch etwas Globulin enthielt, wurde vernachlässigt. Erst das Filtrat wurde zur weiteren Darstellung benutzt. Nach Halbsättigung mit Ammonsulfat, Absetzenlassen und Filtrieren wurde der Niederschlag mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, dann in Wasser gelöst, wieder filtriert und nochmals bei Halbsättigung gefällt. Diese Prozedur wurde 3 mal wiederholt. Ein kleinerer Teil der Fällung wurde nach Filtration in Tüchern abgepreßt, in Wasser gelöst und im Pergamentbeutel so lange unter fließendem Wasser dialysiert, bis das Wasser keine deutliche  $\text{BaSO}_4$ -Reaktion mehr gab, was ca. 10 Tage in Anspruch nahm. Dann wurde die Lösung mit Alkoholäther versetzt und einige Tage stehen gelassen. Das ausgefallene Globulin wurde schließlich abfiltriert, einige Male mit Alkoholäther gewaschen und in einer Reibschale zu einem schneeweißen Pulver verrieben (Präparat 1). Der größere Teil der Fällung wurde nochmals in Wasser gelöst und die wässrige,

<sup>1)</sup> Abderhalden, Bergell und Dörpinghaus, Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 530. 1904.

hellbraun gefärbte Lösung in siedendes, schwach essigsäures destilliertes Wasser eingetragen. Der dabei entstehende Globulinniederschlag wurde nun wie Präparat 1 bis zur  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Freiheit dialysiert, nochmals mit heißem Wasser gründlich gewaschen, bis auch keine Spur von  $\text{H}_2\text{SO}_4$  mehr nachzuweisen war, mit Alkoholäther und heißem Alkohol lange Zeit gewaschen, dann nacheinander unter Alkohol und unter Äther einige Tage stehengelassen und schließlich zu feinem, weißem Pulver verrieben (Präparat 2). Der Unterschied zwischen Präparat 1 und 2 besteht also darin, daß das erste nicht in heißem Wasser ausgekocht, während Präparat 2 gründlich dieser Prozedur unterworfen wurde.

#### Hydrolyse von Präparat 1 mit 3proz. Schwefelsäure.

25 g Globulin wurden mit 500 ccm 3proz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3 Stunden unter Rückfluß gekocht, nach Abkühlung auf den Gehalt von 5% Schwefelsäure gebracht, mit 200 ccm 20proz. Phosphorwolframsäure gefällt, abgesaugt, mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -haltigem, heißem Wasser der Niederschlag nachgewaschen und das Filtrat mit heißer Barytlösung bis zur annähernden neutralen Reaktion versetzt. Der Rest der Säure wurde mit Baryumcarbonat abgestumpft und das Filtrat in vacuo eingedampft. Die beim Einengen wieder schwach alkalisch gewordene Flüssigkeit wurde mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  neutralisiert, das  $\text{BaSO}_4$  abzentrifugiert und die nun neutrale Flüssigkeit auf ein Volumen von 200 ccm aufgefüllt. Etwas opalescent, Reduktionsprobe positiv, sehr schwache Biuretreaktion. Bei der Reduktionsbestimmung nach Pavy verbrauchten 40 ccm der Pavy Mischung 8 ccm der Zuckerlösung, die Lösung war also 0,12proz., 25 g enthielten also 0,24 g und 100 g Globulin mithin 0,96 g reduzierender Substanz.

#### Hydrolyse von Präparat 2 mit 5proz. Bromwasserstoffsäure.

Je 25 g Globulin wurden mit 500 ccm 5proz.  $\text{HBr}$ <sup>1)</sup> 3 $\frac{1}{2}$  Stunden hydrolysiert, dann das Hydrolysat mit 200 ccm 20proz. Phosphorwolframsäure gefällt und vom Niederschlag abgenutscht. Filtrat gibt noch eine deutliche Biureprobe, Reduktion +, Molisch +. Das Filtrat wurde nun bei 40° in vacuo eingengt, die Säure in Intervallen mit geschlemmtem Bleicarbonat abgestumpft, der Rückstand mit frisch gefälltem Silberoxyd und Silbercarbonat behandelt und das Filtrat mit Bleizucker gefällt. In der nun vom Rest der Phosphorwolframsäure befreiten Flüssigkeit wurde die Zuckersubstanz mit Ammoniak niedergeschlagen, der Niederschlag in Wasser aufgenommen und durch Einleiten von  $\text{H}_2\text{S}$  entbleit. Die farblose Lösung wurde nochmals auf ein kleines Volumen in vacuo eingengt und schließlich auf 50 ccm auf-

<sup>1)</sup> Neuberg, B. 34, 3963. 1901.

gefüllt. Die Titration nach Pavy ergab in 3 verschiedenen Proben einen Gehalt von 0,46, 0,43 und 0,60% reduzierender Substanz.

Die Lösung zeigte eine deutlich positive Gärungsprobe, und drehte eine Spur nach links, die Reaktion nach Seliwanoff fiel zunächst negativ aus und wurde erst nach längerem Stehen schwach positiv.

Schon diese wenigen Versuche sprechen deutlich dafür, daß die bei der Säurebehandlung nachweisbar werdenden reduzierenden Substanzen keine Verunreinigung darstellen. Wenn aus einem Präparat nach überaus gründlicher Reinigung, Ausfällung der Fibringlobulinfraktion, tagelangem Dialysieren sich immer noch 0,5–0,9% reduzierender Substanz abspalten läßt, nachdem mit Sicherheit ein nicht geringer Teil von Zucker durch die verschiedenen Manipulationen verloren ging bzw. verändert wurde, von einer Vollständigkeit der Abspaltung also keine Rede ist, kann man wohl kaum mehr von einer Beimengung sprechen.

# Über die Wirkung von Pepsin und Trypsin auf Diastase.

Von

**W. Biedermann.**

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität zu Jena.)

(Eingegangen am 3. September 1921.)

Meine Untersuchungen<sup>1)</sup> haben mich zu dem Ergebnis geführt, daß Amylasen verschiedener Herkunft ein im wesentlichen übereinstimmendes Verhalten zeigen. Es handelt sich immer um komplexe Verbindungen eines ansich völlig unwirksamen, albumosenartigen, aber auch noch einen hitzekoagulablen Anteil einschließenden Proteids mit Ionen verschiedener Salze, die schon durch Dialyse getrennt werden können. Aus menschlichem Parotidenspeichel (auch aus gemischtem Mundspeichel) läßt sich jenes Proteid leicht in vollkommener Reinheit gewinnen und ist durch seine charakteristischen Reaktionen auch dann leicht zu erkennen, wenn es mit anderen Eiweißkörpern oder Kohlenhydraten gemischt vorkommt (Malzpräparate, Eiereiweiß, Gummi arab.). Das „aktivierte“ Ferment ist nicht an eine bestimmte [H.] gebunden, sondern kann seine Wirkung bei neutraler wie auch bei saurer und alkalischer Reaktion entfalten. Es hängt das ganz wesentlich von der Menge der jeweils vorhandenen wirksamen Substanz (der Konzentration der Fermentlösung) ab, so daß z. B. Speicheldiastase, die ihre optimale Wirkung in verdünnter Lösung bei neutraler Reaktion zeigt, nicht minder kräftig auch bei ausgeprägt saurer oder alkalischer Reaktion zu wirken vermag, wenn nur die Fermentmenge groß genug ist.

Eine gewisse Verschiedenheit von Amylasen verschiedener Herkunft muß zugegeben werden, denn es üben verdünnte Lösungen von Malzdiastase die stärkste Wirkung bei schwach saurer, solche von Speicheldiastase bei neutraler und solche von Pankreasdiastase (vielleicht?) bei alkalischer Reaktion aus. Wenn die organische Komponente der Diastasen ein Proteid ist, so war zu erwarten, daß alle Eingriffe, die erfahrungsgemäß zu tieferehenden chemischen und physikalischen Ver-

---

<sup>1)</sup> Fermentforschung 1—5.

änderungen von Eiweißstoffen führen, auch immer eine mehr oder weniger ausgeprägte Beeinträchtigung der enzymatischen Wirkung zur Folge haben werden. Dies ist in der Tat der Fall. So läßt sich zeigen, daß in dem Maße, als beim Erhitzen reiner Fermentlösungen ein koagulabler Anteil der „Speichelalbumose“ abgetrennt wird, auch die diastatische Kraft bis auf einen geringen Rest abnimmt, der dann aber auch beim Kochen standhält. Auch der namentlich in stark verdünnten Lösungen immer deutlich hervortretende, schädigende Einfluß von Säuren und Alkalien wird verständlich, wenn man die physikochemischen Veränderungen berücksichtigt, welche Eiweißkörper unter gleichen Umständen erleiden. Es schien daher auch von Interesse, zu prüfen, wie sich Amylasen eiweißverdauenden Fermenten gegenüber verhalten.

In der Literatur finden sich über die Einwirkung von Pepsin und Trypsin auf „Diastase“ nur wenige und zudem widersprechende Angaben. Während nach Pozerski<sup>1)</sup> sowie E. F. Terroine und J. Weil<sup>2)</sup> Trypsin auf Amylase sehr energisch zerstörend wirken soll, findet Wroblewsky<sup>3)</sup> „daß Diastase in sehr schwach alkalischer Lösung durch Trypsin nicht zerstört, in sehr schwachsaurer Lösung durch Pepsin aber wohl zerstört wird“.

Meine Versuche beschränken sich vorläufig auf Speicheldiastase, da diese allein in genügender Reinheit sich darstellen läßt und andererseits im Speichel in oft sehr konzentrierter Lösung enthalten ist. Der Einfluß der Reaktion ist natürlich bei allen solchen Verdauungsversuchen von ausschlaggebender Bedeutung und muß stets berücksichtigt werden. Fehlschlüsse sind sonst unvermeidlich. Wenn die herrschenden Vorstellungen von der außerordentlichen Empfindlichkeit diastatischer Fermente schon gegen äußerst geringe Mengen von Säure oder Alkali richtig wären, müßte man überhaupt die Möglichkeit, ihr Verhalten gegen Proteasen zu prüfen, bezweifeln. Unter allen Umständen mußte daher zunächst festgestellt werden, wie sich die Speichelamylase unter den Bedingungen wirksamer Pepsin- und Trypsinverdauung verhält. Nachdem sich herausgestellt hatte (vgl. Fermentforschung 5), daß die Menge aktiven Fermentes für den mit seiner Wirkung überhaupt verträglichen Säure- resp. Alkaliwert von ausschlaggebender Bedeutung ist, indem eine gegebene Säure- (Alkali-) Menge in dem Maße weniger schädigt, als die Fermentmenge zunimmt, schien das einzuschlagende Verfahren ohne weiteres vorgezeichnet. Es mußten möglichst konzentrierte Diastaselösungen auf einen Säure-

<sup>1)</sup> Thèse de Paris 1902 (Malys Jahresber. 1902, S. 460).

<sup>2)</sup> E. F. Terroine und J. Weil, Journ. de physiol. et de pathol. gén. **14**, 473. 1912.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. **24**. 1898.

resp. Alkaligrad gebracht werden, bei welchem ohne wesentliche Beeinträchtigung der diastatischen Kraft energische Proteolyse möglich war. Es war nur die Frage, ob dies erreichbar ist.

Wenn man sich fragt, worauf wohl der so auffallende Einfluß der Amylase menge auf die hemmende Wirkung von Säuren und Alkalien beruht, so liegt es in Hinblick auf die Eiweißnatur der organischen Komponente nahe, der Bindung von H- resp. OH-Ionen die wesentlichste Bedeutung zuzuschreiben. Mit wachsendem Säurezusatz zu einer gegebenen Menge Protein kommt es zu einer zunehmenden Bindung der Säure bis zu einem Maximum. Diese erfolgt unter Eintreten des Wasserstoffs in das Eiweiß und Bildung elektronegativer Eiweißionen, während die Cl-Ionen zum größten Teil frei bleiben. Im Überschuß der Säure wird die Ionisation des Proteinchlorids zurückgedrängt, erkennbar an einer raschen Zunahme der Cl-Ionenwirkung und Abnahme der im elektrischen Strom überführbaren Eiweißmengen. Die Säurebindung geht Hand in Hand mit einer starken Zunahme der Viscosität infolge starker Hydratation der Eiweißionen, deren Maximum zusammenfällt mit dem Moment, wo eben freie HCl in der Lösung nachweisbar ist. Vergleicht man das Bindungsvermögen starker und schwacher Säuren, so bleibt letzterenfalls die Bindung an Eiweiß erheblich zurück; hält man aber isohydrische Konzentrationen (gleichen H-Ionengehaltes) nebeneinander, dann ist die Bindung aus der schwachen Säure wesentlich stärker (Wo. Pauli).

Wenn also auch der Proteinkomponente diastatischer Fermente Säurebindungsvermögen zukommt, so wird man mit einiger Wahrscheinlichkeit annehmen dürfen, daß es für den Einfluß eines Säurezusatzes zu einer Diastaselösung nicht gleichgültig ist, ob neben „gebundener“ noch „freie“ Säure vorhanden ist oder nicht. In der Tat läßt sich leicht zeigen, daß eine tiefergreifende Veränderung (Schädigung) des Fermentes erst dann einsetzt, wenn freie Säure nachweisbar ist. Da es nun um so eher zu einem Säureüberschuß kommt, je verdünnter die Fermentlösung ist, so wird sich offenbar auch ein schädigender Einfluß um so früher geltend machen, je weniger Ferment in einem gegebenen Volum der Lösung vorhanden ist. Das Auftreten freier Säure läßt sich bei Anwendung von HCl in einfachster Weise durch Günzburgs Reagens kontrollieren.

Wenn ich einer Probe (etwa 10 ccm) meines filtrierten Speichels oder einer entsprechend konzentrierten reinen (mucinfreien) Lösung von „Speichelalbumose“ tropfenweise  $\frac{n}{10}$ -HCl zusetze, so entwickelt sich sehr bald eine diffuse Trübung und schließlich wird der Speichel (bzw. die Lösung) stark opalescent, ohne daß freie HCl nachweisbar ist und ohne daß sich bei sofortiger Prüfung eine Abnahme der diastatischen Kraft erkennen läßt. Nach wie vor führt Zusatz eines ein-



zigen Tropfens zu 1—2 ccm 1 proz. AmylaseLösung sofort den achromischen Punkt herbei, obschon solche Lösungen blaues Lackmuspapier stark röten.

Es ist dies um so bemerkenswerter, als das Auftreten der Trübung eher das Gegenteil hätte erwarten lassen. Handelt es sich doch um eine spezifische Reaktion des Proteids, an welches man die diastatische Wirkung gebunden findet, anscheinend eine Spaltung ähnlicher Art, wie sie auch bei vorsichtigem Erhitzen (zwischen 60 und 80°) eintritt, nur bleibt ersterenfalls die fermentative Wirkung voll erhalten, während sie beim Erhitzen eine starke Abschwächung erfährt. Ohne hier auf diese im Gefolge der Säurebindung auftretende Erscheinung näher einzugehen, begnüge ich mich mit der Feststellung der Tatsache, daß bei Bindung beträchtlicher Säuremengen trotz stark entwickelter Opalescenz die diastatische Wirkung keinen Schaden leidet; dementsprechend gibt auch das klare Filtrat einer solchen Fermentlösung nach vorsichtigem Neutralisieren noch alle charakteristischen Fällungsreaktionen. Sobald aber die Prüfung mit Günzburgs Reagens ein positives Resultat liefert, erscheint die Enzymwirkung plötzlich erloschen, läßt sich aber durch Neutralisieren wiederherstellen. Es handelt sich also auch dann noch nicht um eine wirkliche Zerstörung des Fermentes. Aber auch schon gebundene Säure kann unter Umständen zu einer (relativen) Hemmung der diastatischen Wirkung führen und zwar hängt dies einerseits von der Menge der Säure, dann aber auch von der Dauer der Einwirkung und der Temperatur ab, bei welcher diese erfolgt. Es ist für die beabsichtigten Verdauungsversuche nun wesentlich, daß noch bei verhältnismäßig hohen Säuregraden die diastatische Wirkung so gut wie gar nicht beeinflußt wird und unter den gegebenen Umständen die explosionsartige Wirkung des Speichels (resp. einer reinen Fermentlösung) mehr als 24 Stunden unverändert erhalten bleibt. Je mehr sich aber der Säuregrad jenem durch das Auftreten freier Säure charakterisierten Grenzwert nähert, desto mehr macht sich bei längerem Stehen der Lösungen (besonders in der Wärme) eine Verzögerung im Eintritt des achromischen Punktes geltend.

Offenbar treten dann allmählich Veränderungen des Fermentes ein, die mit einer Schwächung und schließlichen Aufhebung der diastatischen Kraft Hand in Hand gehen und sich um so rascher entwickeln, je größer die Säuremengen sind. Man wird also schließen dürfen, daß die Eiweißgrundlage der Amylasen infolge der Säurebindung anfangs noch keine tieferegreifenden Veränderungen erleidet, daß sich aber solche bei einem Säuregrad, der zum Auftreten freier Säure führt, sehr rasch geltend machen.

Es steht dies durchaus in Übereinstimmung mit dem Verhalten anderer Eiweißkörper, indem die Erfahrung lehrt, daß mit Säuren schwacher Konzentration versetztes Albumin, wenn es höchstens bei Zimmertemperatur und nicht länger als wenige Tage gehalten wird, durch Dialyse von der Säure befreit werden kann, ohne in seinen ursprünglichen Eigenschaften verändert zu werden. Daß hier die Dialyse eine hydrolytische Abspaltung der Säure an der Grenzmembran und Exosmose der freien Säure bedeutet, steht nach unseren Kenntnissen der Eiweißsalze außer Zweifel (Wo. Pauli). Erst bei längerer Behandlung von Albumin mit verdünnten Säuren in der Wärme bildet sich Acidalbumin, ein denaturiertes, wasserunlösliches Protein, welches sowohl in kleinen Mengen Säure wie auch in Lauge löslich ist; doch ist die chemisch konstitutive Veränderung, die das Eiweiß dabei erleidet, noch unbekannt (Wo. Pauli).

Auf Grund dieser Erfahrungen schienen sich nun einer Prüfung der Pepsinwirkung auf das Speichelferment gewisse Schwierigkeiten entgegenzustellen, wenigstens unter der allerdings nicht unbestrittenen Voraussetzung, daß der Erfolg der Pepsinverdauung an das Vorhandensein freier Säure geknüpft ist. Schon älteren Beobachtern war es nicht entgangen, daß die Bestandteile des Mageninhaltes bei der Verdauung HCl binden und damit die Wirkungskraft des Pepsins schädigen. „Die Verdauung sistiert, sobald die freie HCl verschwunden ist und tritt sofort wieder ein, sobald man etwas HCl zufügt.“ (Oppenheimer, *Fermente* 2, 532. 1913.) Für die Lösung koagulierten Eiweißes fand Johanna Christiansen (diese Zeitschr. 46, 257. 1912) das Vorhandensein einer großen Menge freier HCl am günstigsten. Für die Bedeutung freier Säure scheint auch der Umstand zu sprechen, daß saure Salze die Wirkung des Pepsins auf freie Eiweißkörper nur in sehr mangelhafter Weise ermöglichen. Gerade an die Verwendung saurer Phosphate und Citrate hatte ich aber zunächst gedacht, da es bekannt ist, daß sich diesen gegenüber Diastasen ungleich widerstandsfähiger erweisen als gegen freie Säuren. Da andererseits angegeben wird, daß Pepsin Eiweiß noch bei minimalen Säuregraden angreift (E. Zuntz, *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.* 2) — als Grenze der Wirksamkeit ergab sich erst eine gegen Phenolphthalein neutrale Reaktion, während bei gegen Phenolphthalein saurer, gegen Lackmus alkalischer (H. etwa =  $10^{-7}$ ) stets noch langsame Bildung von Albumosen nachweisbar war — hatte ich erwartet, Pepsin in Lösungen von primärem Phosphat gut wirksam zu finden. Es war dies aber keineswegs der Fall. Die Verwendung solcher Salze war daher ausgeschlossen. Eine weitere Schwierigkeit schien sich aus der auffallenden Beobachtung von Abderhalden und Steinbeck (*Zeitschr. f. phys. Chem.* 68. 1919) zu ergeben, wonach bei der Einwirkung von Magensaft und HCl von der gleichen Konzen-

tration auf gelöste Proteine sich kein erheblicher Unterschied bemerkbar ließ, während ein solcher sehr auffallend hervortrat, wenn es sich um feste Eiweißstoffe handelte. Es schien hiernach überhaupt in Frage gestellt, ob es möglich sein würde, die Einwirkung des Pepsins auf das Speichelferment zu prüfen. Nun hat aber J. Christiansen bei Wo. Pauli gezeigt, daß gemeines, gelöstes Eiweiß im Gegensatz zu koaguliertem von Pepsin schon bei gewöhnlicher Temperatur und einem Säurewert angegriffen wird, bei welchem freie HCl noch nicht vorhanden ist. Die Verdauung wurde durch Viscositätsbestimmungen kontrolliert, eine Methode, mittels deren schon E. S. Spriggs (Zeitschr. f. phys. Chem. 35. 1902) unter Kossels Leitung eine sehr deutliche Wirkung von Pepsin auf Eiweißlösungen feststellen konnte. Schon 3 Minuten nach Vermischung von Serum mit einer Pepsin-HCl-Lösung fand J. Christiansen (bei 25°) eine deutliche Abnahme der Viscosität, die während weiterer 2 Stunden sehr zunahm. In Kontrollversuchen wurde untersucht, ob Säure allein eine merkliche Abnahme innerhalb der Versuchszeit bewirken kann; es zeigte sich, daß das nicht der Fall war. Erst nach 24 Stunden war eine ganz geringfügige Abnahme zu konstatieren. Weitere Kontrollversuche bezweckten festzustellen, ob inaktiviertes Pepsin in den verwendeten sehr schwachen Konzentrationen einen wahrnehmbaren Einfluß auf die Viscosität ausübt; dies war aber gleichfalls nicht der Fall. Immer ergab sich, daß Eiweißlösungen, die die gleiche anfängliche Viscosität besaßen, unter Pepsineinfluß mit gleicher Schnelligkeit in bezug auf ihre Viscositätsabnahmen, ganz gleichgültig, ob freie HCl zugegen ist oder nicht. „Für die viscosimetrisch bestimmte, verdauende Wirkung des Pepsins auf gelöstes, gemeines, nicht koaguliertes Albumin ist nur der ionische Zustand des Eiweißes, nicht aber die Konzentration der anwesenden freien H-Ionen maßgebend“ (Wo. Pauli).

Wenn also das Protein der Speicheldiastase von Pepsin überhaupt angegriffen wird, so mußte sich dies durch Abnahme evtl. Vernichtung der diastatischen Wirkung verraten, wenn man einer möglichst fermentreichen Lösung nach entsprechendem Ansäuern Pepsin zufügt. Um die Versuche einwandfrei zu gestalten, kommt es wesentlich darauf an, den richtigen Säuregrad zu treffen. Ist die Säuremenge gar zu klein, so wirkt das Pepsin zu schwach und man findet die diastatische Kraft selbst nach vielen Stunden noch ungeschwächt. Hat man andererseits zu viel Säure zugesetzt, so macht sich schon ohne Pepsin sehr bald eine Verminderung der fermentativen Wirkung bemerkbar, die bis zu völliger Aufhebung sich steigern kann. Beweisend für die Angreifbarkeit der Speicheldiastase durch Pepsin ist ein Versuch offenbar nur dann, wenn die verdaute Probe eine starke Abnahme der diasta-

tischen Kraft zu einer Zeit erkennen läßt, wo die in gleicher Weise angesäuerte, pepsinfreie Lösung noch ihre ursprüngliche Wirksamkeit besitzt.

Einen guten Anhaltspunkt für den richtigen Säuregrad liefert die schon erwähnte Opaleszenz, welche fermentreiche Lösungen beim Ansäuern (mit HCl oder Citronensäure) immer zeigen. Hört man mit dem Säurezusatz auf, sobald die Trübung voll entwickelt ist, so darf man sicher sein, nicht übersäuert zu haben. Ich gebe im folgenden einen solchen Versuch als Beispiel:

10 ccm filtrierter Speichel wurden mit HCl in der eben beschriebenen Weise angesäuert, worauf 8 ccm einen Zusatz von Pepsin (P. absolut. in lamellis Merck.) erhielten; 2 ccm wurden zurückbehalten, um zu prüfen, ob die diastatische Wirksamkeit auch ohne Pepsin allmählich abnimmt. Schon nach  $\frac{1}{2}$  Stunde machte sich an der bei 40° gehaltenen Pepsinprobe Aufhellung und starke Verminderung der Viscosität bemerkbar (Verdauung des Mucins). 1 Tropfen davon führte in 2 ccm 1 proz. Amylase den achromischen Punkt in 12 Minuten herbei, während 1 Tropfen der nur angesäuerten Kontrollprobe in ebensoviel Amylose die Jodreaktion sofort zum Verschwinden brachte. Die Hemmung wurde dann bei fortschreitender Verdauung immer stärker; nach 2 Stunden erforderte die Umsetzung der gleichen Menge Amylose schon mehr als 1 Stunde und nach 4 Stunden war es zu völliger Vernichtung der diastatischen Wirksamkeit gekommen, während die nicht verdaute Probe auch nach 24 Stunden noch keine Verminderung der fermentativen Wirkung erkennen ließ.

Es macht den Eindruck, als ob das Mucin des Speichels zunächst eine Art Schutzwirkung ausübt, jedenfalls erwiesen sich entsprechend konzentrierte mucinfreie Lösungen von reiner Speichelalbumose Pepsin gegenüber sehr viel empfindlicher, verhielten sich aber im übrigen völlig übereinstimmend.

Es muß nach diesen Erfahrungen gewiß als sehr überraschend gelten, daß dasselbe Ferment, welches von Pepsin so leicht angegriffen wird, gegen Trypsinverdauung vollständig widerstandsfähig ist. Vom teleologischen Standpunkt freilich erscheint dies fast selbstverständlich, da ja anderenfalls die Wirkung der Pankreasdiastase neben Trypsin im Darm kaum zu verstehen wäre. Es gelingt sehr leicht, eine ziemlich starke diastatische Wirkung auch an Lösungen käuflicher Trypsinpräparate nachzuweisen. Wenige Tropfen einer solchen in der Konzentration, wie sie gewöhnlich bei Verdauungsversuchen benützt wird, genügen, um mehrere Kubikzentimeter 1 proz. nach meiner Methode hergestellter Amyloselösung in kurzer Zeit bis zum Verschwinden der Jodreaktion umzusetzen und zwar unter denselben Bedingungen, wie sie auch für das Trypsin am günstigsten sind. Obschon diese Protease

sich auch schon bei neutraler Reaktion als wirksam erweist, so kann man bei Prüfung ihres Einflusses auf Speicheldiastase doch ohne weiteres die optimalen Bedingungen einführen, da ja eine so konzentrierte Fermentlösung, wie sie unverdünnter gut wirksamer Speichel darstellt, sehr bedeutende Zusätze von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  oder gar  $\text{NaHCO}_3$  ohne Beeinträchtigung der diastatischen Kraft verträgt (vgl. Fermentforschung 4).

Es möchte dies auf den ersten Blick auffällig erscheinen, wenn man die stark schädigende Wirkung berücksichtigt, welche nach den übereinstimmenden Angaben aller Beobachter schon kleinste Mengen alkalischer Laugen auf diastatische Fermente ausüben. Das gleiche gilt für lösliche Eiweißkörper überhaupt. „Während die Albumine bei niedrigerer Temperatur erst durch stärkere Säurekonzentrationen tiefergehende chemische Veränderungen erfahren, besteht im allgemeinen eine weit größere Empfindlichkeit vieler Eiweißstoffe gegen Alkalien auch schon bei Zimmertemperatur“ (Wo. Pauli). Es spielt aber auch hier wieder die Konzentration der Fermentlösung eine ganz wesentliche Rolle. Die meisten Versuche beziehen sich auf sehr stark verdünnte Lösungen, bei welchen es demgemäß sehr bald zu einem Alkaliüberschuß kommen muß.

So empfindlich sich nun gelöste Eiweißkörper und also auch Diastaselösungen gegen freies Alkali (Hydroxyde) erfahrungsgemäß erweisen, so wenig gilt das gleiche in bezug auf die oben genannten alkalischen Salze, wenn nur die Menge des vorhandenen Fermentes nicht zu gering ist. Es bestehen hier also ganz ähnliche Unterschiede wie zwischen freien Säuren und sauren Salzen. Die schwachen Säuren resp. Basen, welche die primären Alkaliphosphate oder Citrate bzw. die Bicarbonate darstellen, deren physikalisch-chemische Wirkung auf gelöste Eiweißkörper noch eine genauere Untersuchung verdient, schädigen jedenfalls Diastaselösungen ohne jeden Vergleich weniger als freie Säuren oder Alkalien. Aber selbst vom  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  gilt dies noch bis zu einem gewissen Grade, so daß man einem unverdünnten, kräftig wirkenden Speichel erstaunlich große Mengen ohne merkliche Beeinträchtigung der diastatischen Kraft beimischen kann.

Die Speichelverdauungsversuche sind demgemäß überaus einfach anzustellen. Es ist nichts weiter nötig als eine Portion Speichel oder eine entsprechend konzentrierte Lösung von Speichelalbumose mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  alkalisch zu machen und dann, nachdem man sich von der unveränderten Wirksamkeit überzeugt hat, Trypsin zuzusetzen und bei  $40^\circ$  zu verdauen. Das Ergebnis bleibt unter allen Umständen ein negatives. Die diastatische Wirkung nimmt auch nach vielstündiger Digestionsdauer nicht im geringsten ab und die Lösungen geben nach wie vor alle charakteristischen Fällungsreaktionen der Speichelalbumose. Wir haben es

also hier mit einem völlig „trypsinfesten“ löslichen Eiweißkörper zu tun, gewiß eine auffallende Tatsache, wenn man das Verhalten anderer löslicher Eiweißstoffe damit vergleicht. Neben diesem sehr bemerkenswerten Gegensatz im Verhalten des diastatischen Speichelfermentes zu Pepsin und Trypsin scheint mir aber auch noch die Tatsache besonderes Interesse zu verdienen, daß die Speicheldiastase Säure (resp. Alkali) zu binden vermag, ohne daß zunächst die diastatische Wirkung dadurch beeinträchtigt wird, während dies sofort geschieht, sobald freie H- (resp. OH-) Ionen zugegen sind. Es liegt in diesem Verhalten nicht nur ein weiterer Beweis für die Proteinnatur des Fermentes, sondern es besteht offenbar auch die Möglichkeit, auf die gleiche Beschaffenheit eines anderen Fermentes zu schließen, falls ähnliche Beziehungen zwischen Säuretoleranz und Fermentmenge bestehen wie bei der Diastase.

---

# Über Quellungsvorgänge im subcutanen Gewebe.

Von

P. Morawitz und G. Denecke.

(Aus der Medizinischen Klinik der Universität Greifswald.)

(Eingegangen am 3. September 1921.)

Der Mechanismus der Ödembildung wird in neuester Zeit wieder viel diskutiert. Hierbei wird auch für die Wassersucht Nierenkranker extrarenalen Faktoren eine größere Bedeutung zugeschrieben als früher. Über die Wirkungsart dieser extrarenalen Faktoren ist aber noch keine Einigung erzielt worden. Es sind im wesentlichen zwei Anschauungsreihen, die sich heute gegenüberstehen: Die erste stellt als Ursache der Ödembildung in Anlehnung an ältere Versuche von Cohnheim, Magnus u. a. eine Schädigung der Gefäße in den Vordergrund. Infolge Erkrankung der Gefäßendothelien soll es zu einem vermehrten Durchtritt von Flüssigkeit in die Gewebe kommen. Dieser muß zu Ödem führen, wenn gleichzeitig die Aufsaugung der Flüssigkeit gestört ist [Volhard<sup>1</sup>), Siebeck<sup>2</sup>), Schlayer<sup>3</sup>), Eppinger<sup>4</sup>)]. Eine andere Vorstellungreihe, die man als Quellungstheorie bezeichnen kann, geht auf die bekannten Versuche von M. H. Fischer<sup>5</sup>) über Änderungen des Quellungsdruckes protoplasmatischer Substanzen unter dem Einflusse physikalisch-chemischer Faktoren zurück. Wenn auch viele Einzelheiten der Fischerschen Betrachtungsweise als widerlegt angesehen werden können [Moore<sup>6</sup>)], so wird doch der Grundgedanke Fischers, der Änderungen der Gewebe und ihrer wasseranziehenden Kraft als Ödemursache in den Vordergrund stellt, heute von vielen Forschern anerkannt [Hülse<sup>7</sup>), Munk<sup>8</sup>), Quincke<sup>9</sup>), Frey<sup>10</sup>), Beckmann<sup>11</sup>)]. Nicht der Zustand der Membranen, also der Gefäßendothelien ist dafür entscheidend, ob Ödembildung erfolgt, sondern der Zustand der Zellen selbst. Speziell für die durch Unterernährung entstehenden Kriegsödeme ist diese Anschauung von manchen Seiten betont worden [Jansen<sup>12</sup>), Schittenhelm und Schlecht<sup>13</sup>), Hülse].

Es schien uns angesichts dieser Vorstellungen erwünscht, zu untersuchen, wie sich ein künstliches, gequollenes, kolloidales System im Gewebe gesunder Individuen einerseits verhält, andererseits im Gewebe von Tieren, bei denen Ödemneigung besteht.

Technik. Als künstliches gequollenes System, das mit dem Gewebewasser in Flüssigkeitsaustausch treten soll, dient 20 proz. Agar. Der Agar wird nur mit Ringerlösung hergestellt, sterilisiert und in dünner Schicht in Petrischalen ausgegossen. Mit sterilisiertem Lochseisen werden aus der Agarschicht tablettenartige Plättchen ausgestanzt. Das Gewicht der Plättchen betrug meist etwa 0,1 g. Die Agarplättchen wurden zunächst in sterilen, geschlossenen Wiegegläschen gewogen. Nach der Wägung lassen wir die Tabletten 24 Stunden lang in steriler Ringerlösung im Brutschranke vorquellen. Dann wird wieder gewogen. Bei dieser zweiten Wägung ist darauf zu achten, daß die Agartabletten in dem Augenblicke auf die Wage kommen, in dem sie gerade durch Verdunstung der anhaftenden Spuren von Ringerlösung den feuchten Oberflächenschimmer verloren haben. Bei einiger Übung lernt man bald diesen Zeitpunkt erkennen. Daß es uns gelungen ist, gleichmäßige Bedingungen herzustellen, zeigen die unten wiedergegebenen Versuchsprotokolle. Im allgemeinen nehmen die 20 proz. Agartabletten innerhalb 24 Stunden bei Bruttemperatur in Ringerlösung etwas an Gewicht zu. Die Zunahme ist meist gering. In einigen Versuchen haben wir auch die Vorquellung in sterilem Serum vorgenommen (1 mal Kaninchen-, 2 mal Menschenserum), ohne daß wir der Ringerlösung gegenüber durchgreifende Unterschiede gesehen hätten.

Die H-Ionenkonzentration der zur Herstellung des Agars und zur Vorquellung der Tabletten dienenden Ringerlösung betrug nach der colorimetrischen Methode von L. Michaelis<sup>14)</sup>  $p_H = 7,3$ .

Die so hergestellten, 24 Stunden in Ringerlösung vorgequollenen, sterilen Agartabletten werden sofort nach der zweiten Wägung in das Unterhautgewebe von Kaninchen versenkt. Wir wählten hierzu die Gegend neben der Lumbalwirbelsäule, damit die Tiere nach der Operation die Wunde nicht berühren können. Nach dem Hautschnitt muß erst völlige Stillung jeder, auch der kleinsten Blutung abgewartet werden, dann wird das Unterhautgewebe stumpf gelockert und eine für die Aufnahme zweier Tabletten hinreichende Tasche gebildet. Gewöhnlich legen wir 2 Tabletten in jede Tasche und machten 2 Hautschnitte zu beiden Seiten der Wirbelsäule. Die Tabletten waren so gelagert, daß man sie später in der richtigen Reihenfolge wieder entfernen konnte. In ein paar Versuchen haben wir die Tabletten auch unter die Fascie geschoben. Doch hatten wir hier mehr mißlungene Versuche infolge Blutung oder Infektion. Der Schluß der kleinen Hautwunde geschieht mit den v. Herffschen Wundklammern, um die beim Nähen möglichen mechanischen Insulte auszuschalten.

Nach 24 Stunden werden die Tabletten nach Öffnung der Wunde wieder entfernt und unter denselben Vorsichtsmaßregeln gewogen wie zuvor.

Trotz unseres Bestrebens, ganz aseptisch zu arbeiten, sind doch einige Versuche durch Eiterbildung und Entzündung in der Umgebung der eingelegten Tabletten unbrauchbar geworden. Die mikroskopische Untersuchung ließ dann einen Leukocytenbelag erkennen. Falls die Asepsis aber gewahrt blieb — und das war in der Mehrzahl der Versuche der Fall — war weder makro- noch mikroskopisch eine Veränderung der Oberfläche des eingelegten Agartablettchens zu sehen. Nur solche gut gelungene Versuche sind in den Tabellen aufgeführt. Auch eine Einwanderung von Leukocyten in die Agartablette war mikroskopisch in keinem Fall nachweisbar.

Neben einer größeren Zahl von Versuchen an Normaltieren führten wir nun auch genau mit der gleichen Technik eine Anzahl von Experimenten an Tieren aus, die sich im Zustande beginnender Ödembildung befanden. Wir riefen Ödemneigung hervor 1. durch Urannitrat nach P. F. Richter<sup>15)</sup>, 2. durch Unterbindung der Ureteren.

Die Urantiere erhielten 3 Tage lang 0,005 g Urannitrat subcutan, außerdem während dieser Tage je eine subcutane Injektion von 50 cem Ringerlösung. Sobald die Harnmenge stark abzunehmen begann, meist am 4. bis 5. Tage der Vergiftung,



führten wir den Versuch aus. Deutlich sichtbares, subcutanes Ödem war in keinem Falle vorhanden. Doch konnten wir meist schon bei der Operation feststellen, daß das Subcutangewebe feuchter schien als bei normalen Tieren. Bei der Sektion der Tiere wurde fast immer Höhlenhydrops gefunden. Das Subcutangewebe war meist saftreicher als normal, ohne aber wesentlich geschwollen zu sein. Vom Schnitt lief keine Flüssigkeit ab.

Die Tiere, deren Ureteren unterbunden waren, lebten 3—5 Tage. Eins erhielt einmal eine Injektion von 20 ccm Kochsalzlösung. Deutliche Ödeme oder Höhlenergüsse bildeten sich bei diesem Tier nicht aus. Wohl aber sah das Unterhautgewebe bei der Operation resp. Sektion feuchter als normal aus.

Die folgenden Tabellen unterrichten über das Resultat der Versuche.

Tabelle I.  
Vorversuche an normalen Kaninchen.

Ver- suchs- Nr.	Gewicht der Tabletten g	Gewicht nach der Vor- quellung g	Än- derung in %	Gewicht nach dem Versuch g	Än- derung in %	Bemerkungen
I	0,0674	0,0892	+32,3	0,0762	-14,5	Tabletten 2 Stdn. in Kaninchen- serum vorgequollen, 24 Stdn. subcutan gelegen.
	0,0526	0,0690	+31,1	0,0549	-20,4	
	0,0594	0,0744	+25,4	0,0620	-16,6	
	0,0598	0,0684	+14,3	0,0590	-13,7	
II	0,1470	0,1678	+14,1	0,1578	-5,9	Tabletten 24 Std. in Ringer- lösung vorgequollen, dann 24 Stdn. subcutan gelegen.
	0,1482	0,1668	+12,5	0,1634	-2	
	0,1436	0,1638	+14,1	0,1604	-2,1	
III	0,1382	0,1674	+21,1	0,1558	-6,9	Tabletten 48 Std. in Ringer- lösung vorgequollen, dann 24 Stdn. subcutan gelegen.
	0,0824	0,0894	+ 8,4	0,0846	-5,3	
	0,1300	0,1666	+28,1	0,1552	-6,3	
	0,1386	0,1564	+12,8	0,1478	-5,5	

Die Tabelle I ist insofern mit Vorsicht zu beurteilen, als es uns damals offenbar noch nicht gelang, die Versuchsbedingungen gleichmäßig zu gestalten. Daher wohl die ziemlich großen quantitativen Unterschiede in den einzelnen Versuchen, die wahrscheinlich zum größten Teil darauf zurückzuführen sind, daß anfänglich große dünne Agarscheiben verwandt wurden, mit viel größerer Oberfläche als die späteren, und daß ferner im Anfang 10 proz. Agar genommen wurde. Wägefehler sind in dieser Tabelle wahrscheinlich auch von Bedeutung, da wir den Augenblick, in welchem das Wasser auf der Oberfläche der Pastillen verdunstet war, in diesen Versuchen noch nicht gleichmäßig abzuschätzen wußten. Immerhin sind die Versuche in qualitativer Richtung verwertbar. Sie zeigen, daß die Agartabletten bei Vorquellung in Ringerlösung an Gewicht zunehmen, daß sie aber dieses Gewicht bei 24stündigem Aufenthalte im subcutanen Gewebe nicht festzuhalten vermögen.

Die Tabelle II zeigt kleinere und gleichmäßigere Ausschläge als die Tabelle I, was wohl mit der inzwischen besser ausgebildeten Technik

**Tabelle II.**  
Versuche an normalen Kaninchen.

Ver- suchs- Nr.	Gewicht der Tabletten g	Gewicht nach der Vor- quellung g	Än- derung in %	Gewicht nach dem Versuch g	Än- derung in %	Bemerkungen
IV	0,1292	0,1322	+2,3	0,1272	-3,7	2 Tabletten, 24 Std. in Ringer- lösung vorgequollen, 24 Std. subcutan gelegen.
	0,0882	0,0882	+0	0,0862	-2,3	
V	0,1804	0,1854	+2,8	0,1724	-7	3 Tabletten, 24 Std. in Men- schenserum vorgequollen, 24 Stdn. subcutan gelegen.
	0,1852	0,1892	+2,2	0,1882	-0,5	
	0,1832	0,1850	+1	0,1800	-2,7	
VI	0,1130	0,1142	+1,1	0,1140	-0,2	3 Tabletten, 24 Std. in Ringer- lösung vorgequollen, 24 Stdn. subcutan gelegen.
	0,1216	0,1216	+0	0,1208	0,7	
	0,1152	0,1146	-0,5	0,1144	-0,2	
VII	0,0992	0,0994	+0,2	0,0976	-1,8	4 Tabletten, 48 Std. in Ringer- lösung vorgequollen, 24 Stdn. subcutan gelegen.
	0,0864	0,0874	+1,2	0,0822	-5,9	
	0,0788	0,0794	+0,8	0,0762	-4	
	0,0982	0,0974	-0,8	0,0958	-1,6	

zusammenhängen mag. Doch ist das Resultat im wesentlichen das gleiche: Bei Vorquellung in Ringerlösung oder in Serum nehmen die Agartabletten meist etwas an Gewicht zu, doch kann man vereinzelt Gleichbleiben oder eine ganz geringfügige Abnahme feststellen. Im subcutanen Gewebe nehmen sie beim normalen Tier regelmäßig an Gewicht ab. Nur in wenigen mißlungenen, hier nicht angeführten Versuchen, in denen sichtbare Vereiterung oder Blutung aufgetreten war, konnten Gewichtszunahmen festgestellt werden. Im ganzen ist die Gewichtsabnahme im Hauptversuch größer als die Zunahme im Vorversuch, wenn auch einzelne Versuche sich anders verhalten.

Tabelle III zeigt, daß bei uranvergifteten Tieren die vorgequollenen Agartabletten im Gegensatze zum Befunde beim Normalen in 24 Stunden im Unterhautgewebe regelmäßig zunehmen. Die Zahl der Versuche ist so groß, die Erscheinung in allen Versuchen ohne jede Ausnahme festzustellen, daß wir behaupten können: im subcutanen Gewebe uranvergifteter Tiere nehmen künstliche kolloidale Systeme an Gewicht nicht ab wie bei Normaltieren. Unter den von uns gewählten Bedingungen ist sogar eine geringe Zunahme zu bemerken.

Die Resultate sind dieselben wie bei den Uranversuchen, also Gewichtszunahme der Agartabletten. Die Zunahme ist allerdings meist gering; eine Abnahme wie bei den Normaltieren ist aber in keinem Versuche aufgetreten.

Es fragt sich nun, wie diese konstanten Unterschiede entstehen, und welche der Faktoren, die für Gewichtszu- und -abnahme der ge-

**Tabelle III.**  
**Versuche an uranvergifteten Kaninchen.**

Nr.	Gewicht der Tabletten g	Gewicht nach der Vorquellung g	Änderung in %	Gewicht nach dem Versuch g	Änderung in %	Bemerkungen
VIII	0,1386	0,1416	+2,2	0,1462	+3,2	} 24 Std. in Menschen- } 24 Std. in serum vorgequollen } Urantier } 24 Std. in Ringerlö- } Nr. 1 sub- sung vorgequollen. } cutan.
	0,1364	0,1380	+1,2	0,1418	+2,7	
	0,1422	0,1440	+1,2	0,1468	+1,9	
	0,1308	0,1334	+1,9	0,1366	+2,4	
IX	0,1026	0,1016	-0,9	0,1030	+1,3	24 Std. in Ringerlösung vorgequollen, 24 Std. subcutan im Urantier Nr. 2.
	0,0974	0,0960	-1,4	0,0978	+1,9	
	0,0974	0,1012	+3,9	0,1024	+1,2	
	0,1114	0,1106	-0,7	0,1108	+0,2	
X	0,1248	0,1270	+1,8	0,1308	+2,9	4 Tabletten, 24 Std. in Ringerlösung vorgequollen, 24 Std. subcutan in Urantier Nr. 2 (früher Normaltier III).
	0,1272	0,1282	+0,7	0,1292	+0,7	
	0,1276	0,1284	+0,6	0,1320	+2,8	
	0,1236	0,1254	+1,4	0,1256	+0,2	
XI	0,1138	0,1226	+7,7	0,1246	+1,6	3 Tabletten, 24 Std. in Ringerlösung vorgequollen, 24 Std. subcutan Urantier Nr. 4.
	0,1102	0,1174	+6,5	0,1202	+2,4	
	0,1020	0,1080	+5,8	0,1108	+2,5	
XII	0,1160	0,1226	+5,4	0,1252	+2,1	3 Tabletten, 48 Std. in Ringerlösung vorgequollen, 24 Std. subcutan in Urantier Nr. 4 (s. vor. Versuch).
	0,1244	0,1340	+7,7	0,1368	+2,1	
	0,1078	0,1112	+3,1	0,1134	+1,9	
XIII	0,2420	0,2902	+15,8	0,2880	+2,9	2 Tabletten, 24 Std. in Ringerlösung vorgequollen, 24 Std. in Urantier Nr. 5.
	0,1172	0,1324	+4,5	0,1370	+3,4	
XIV	0,0640	0,0628	-1,9	0,0688	+9,5	} 24 Std. } In Ringerlösung vorgequollen, dann 24 Std. subcutan in Urantier Nr. 5. } 48 Std. }
	0,1030	0,1024	-0,5	0,1050	+2,5	
	0,0712	0,0720	+1,1	0,0756	+5,0	
	0,0974	0,0980	+0,6	0,1030	+5,1	
XV	0,0944	0,0954	+1,1	0,0980	+2,7	2 Tabletten, 24 Std. in Ringerlösung vorgequollen, 24 Std. subcutan in Urantier Nr. 6.
	0,0760	0,0750	-1,3	0,0782	+4,2	
XVI	0,1102	0,1092	-0,9	0,1128	+3,1	3 Tabletten, 24 Std. in Ringerlösung, 24 Std. subcutan in Urantier Nr. 6.
	0,1084	0,1084	+0,0	0,1156	+6,7	
	0,0798	0,0804	+0,8	0,0834	+3,7	

quollenen Systeme von Bedeutung sind, sich geändert haben. Faktoren, die der Untersuchung zugänglich sind, sind folgende: Die Temperatur. Sie war in unseren Versuchen an Normaltieren und Ödemtieren dieselbe. Die H-Ionenkonzentration. M. H. Fischer hat ihr geradezu die überragende Rolle beim Zustandekommen von Ödemen zugeschrieben. Allerdings hat er mit dieser Lehre keinen vollen Anklang gefunden. Daß bei Zuständen von Niereninsuffizienz eine Art „kompensierter“ Acidose besteht, die sich in Abnahme der alveolaren CO<sub>2</sub>-Spannung und des CO<sub>2</sub>-Bindungsvermögens des Blutes äußert, ist bekannt [Straub

**Tabelle IV.**  
**Versuche an Kaninchen mit Unterbindung der Ureteren.**

Nr.	Gewicht der Tabletten	Gewicht nach der Vorquellung	Änderung in %	Gewicht nach dem Versuch	Änderung in %	Bemerkungen
XVII	0,1772	0,1894	+6,8	0,1910	+0,8	4 Tabletten, 24 Std. in Ringerlösung vorgequollen, 24 Std. subcutan Kan. V. mit Ureterenunterbind. am 2. Tage.
	0,1784	0,1900	+6,5	0,1918	+0,9	
	0,1234	0,1348	+9,2	0,1360	+0,9	
	0,1162	0,1246	+7,2	0,1264	+1,4	
XVIII	0,1894	0,2014	+6,3	0,2060	+2,2	Dasselbe Tier. Desgl. 1 Tag später.
	0,1342	0,1470	+9,5	0,1488	+1,2	
XIX	0,2242	0,2304	+2,8	0,2342	+1,6	2 Tabletten, 7 Tage in Ringerlösung, 24 Std. subcutan. Kan. VI.
	0,1612	0,1656	+2,7	0,1692	+2,1	
XX	0,2448	0,2480	+2,1	0,2570	+3,6	2 Tabletten 24 Std. in Ringerlösung vorgequollen, 24 Std. subcutan.
	0,1710	0,1740	+1,8	0,1810	+4,0	

und Schlayer<sup>12)</sup>, Elmendorf<sup>16)</sup>, Kuhlmann<sup>18)</sup>]. Dagegen vermißt Rolly<sup>19)</sup>, der mit der Gaskettenmethode arbeitete, bei Urämikern fast immer eine Änderung der H-Ionenkonzentration. Wir haben mit der Methode von L. Michaelis eine Anzahl Bestimmungen im Blut von normalen Kaninchen, Tieren mit Uranvergiftung und solchen mit unterbundenen Ureteren ausgeführt, außerdem einige Bestimmungen des  $p_H$  im Höhlenhydrops bei uranvergifteten Tieren.

	$p_H$ in	
	Serum	Ascites
Normales Tier . . . . .	7,9	
dasselbe nach 3 · 0,005 Uran . . . . .	7,3	7,1
normales Tier . . . . .	7,5	
dasselbe nach 2 · 0,05 Uran . . . . .	7,4	7,4
normales Tier . . . . .	7,3	
dasselbe nach Unterbindung der Ureteren . . . . .	7,3	

Es ergibt sich hieraus, daß eine eindeutige Änderung des  $p_H$  unter unseren Versuchsbedingungen nicht vorkommt.

Der osmotische Druck ist von uns im Blute normaler und kranker Tiere bestimmt worden. Es ist selbstverständlich, daß hier Änderungen zu erwarten sind, da die Molenausscheidung durch die Nieren ungenügend ist.

Normales Tier . . . . .	$\delta = 0,59$
normales Tier. . . . .	$\delta = 0,59$
Urantier . . . . .	$\delta = 0,62$
	$\delta = 0,60$
Uretertier . . . . .	$\delta = 0,59$

Wir haben nun eine Anzahl von Reagensglasversuchen gemacht, um zu sehen, wie Änderungen des osmotischen Druckes von der Größenordnung, die in unseren Versuchen beobachtet wurde, die Quellung beeinflussen. Die Ringerlösung wurde durch Zusatz von NaCl hyper-tonisch gemacht, da es sich ja auch bei der Zunahme des osmotischen Druckes bei Niereninsuffizienz vorwiegend um Retention von NaCl handelt.

Agarpastillen werden 48 Stunden in verschieden konzentrierter Ringerlösung gequollen bei 37°.

Nr.	Anfangs-gewicht	End-gewicht	Zunahme in %	
1.	0,1658	0,1680	1,3	} Ringer $\delta = 0,60$
2.	0,1764	0,1792	1,5	
3.	0,1768	0,1794	1,5	
4.	0,1810	0,1832	1,2	} 100 Ringer + 0,1 NaCl $\delta = 0,71$
5.	0,1904	0,1928	1,3	
6.	0,1894	0,1924	1,6	
7.	0,1794	0,1838	2,5	} 100 Ringer + 0,2 NaCl $\delta = 0,78$
8.	0,1864	0,1940	4,1	
9.	0,1684	0,1718	2,9	
10.	0,1888	0,1962	3,9	

Den osmotischen Druck des Gewebewassers konnten wir wegen seiner geringen Menge nicht untersuchen. Nun ist ja bekannt [Galeotti<sup>20</sup>) Bottazzi<sup>21</sup>), Beckmann], daß Ödemflüssigkeiten bisweilen einen höheren osmotischen Druck haben als das Blut, und daß auch ihr NaCl-Gehalt höher sein kann. Doch sind die Differenzen nicht so groß wie in unseren Reagensglasversuchen. Aus diesen ergibt sich, daß eine Erniedrigung des Gefrierpunktes um 0,1° durch Zusatz von NaCl keinen deutlichen Einfluß auf das Endgewicht der Tabletten hat.

Hiernach ist also wenig wahrscheinlich, daß es Änderungen der H-Ionenkonzentration oder solche des osmotischen Druckes für das verschiedene Verhalten gequollener kolloidaler Systeme im Subcutan-gewebe normaler und ödematöser Tiere verantwortlich gemacht werden können.

Weitergehende Schlüsse können vorerst nicht gezogen werden. Es ist aber möglich, daß diese Versuche für die Lehre von der Ödem-bildung Bedeutung gewinnen, wenn man das Verhalten gequollener kolloidaler Systeme in organischen Flüssigkeiten unter möglichst vielfachen Bedingungen weiterstudiert.

### Zusammenfassung.

Künstliche kolloidale Systeme (Agartabletten, die in Serum- oder Ringerlösung vorgequollen sind) nehmen im subcutanen Gewebe normaler Tiere in 24 Stunden regelmäßig an Gewicht ab.

Im Subcutangewebe von Tieren, die mit Uran vergiftet sind, oder solcher mit Ureterenunterbindung nehmen die Tabletten ein wenig zu, niemals ab.

Es ist unwahrscheinlich, daß dieses differente Verhalten von Änderungen der H-Ionenkonzentration oder Änderungen des osmotischen Druckes abhängt.

---

#### Literatur.

- 1) Volhard, Die doppelseitigen hämatogenen Nierenerkrankungen. Handb. von Mohr-Staehelin 1918. — 2) Siebeck, Die Beurteilung und Behandlung der Nierenkranken. Tübingen 1920. — 3) Schlayer und Schmidt, Arch. f. klin. Med. **104**, 44. 1911. — 4) Eppinger, Pathologie und Therapie des menschlichen Ödems. Berlin 1917. — 5) Fischer, M. H., Das Ödem. Dresden 1910. — 6) Moore, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **147**, 28. 1912. — 7) Hülse, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **225**, 234. 1918. — 8) Munk, Monatsschr. f. Geburtsh. u. Gynäkol. **50**, 22. 1919. — 9) Quincke, Med. Klin. 1921. — 10) Frey, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **19**, 422. 1921. — 11) Beckmann, Dtsch. Arch. f. klin. Med. **135**, H. 1 u. 2 und 3 u. 4. 1921. — 12) Jansen, Münch. med. Wochenschr. 1918, Nr. 1 und die Ödemkrankheit. Vogel, Leipzig 1920. — 13) Schittenhelm und Schlecht, Die Ödemkrankheit. Springer 1919. — 14) Michaelis, L., Praktik. der physikalischen Chemie. Springer 1921. — 15) Richter, P. F., Dtsch. med. Wochenschr. 1910, Nr. 38, S. 1737. — 16) Straub und Schlayer, Münch. med. Wochenschr. 1912, Nr. 22. — 17) Elmendorf, diese Zeitschr. **60**. 1914. — 18) Kuhlmann, Untersuchungen über die Blutalkalescenz usw. Inaug.-Diss. Greifswald 1920. — 19) Rolly, Dtsch. Zeitschr. f. Nervenheilk. **47—48**. 1913. — 20) Galeotti, zit. bei Bottazzi S. 316. — 21) Bottazzi, Ergebn. d. Physiol. **7**, 161. 1908.

(Aus der Universitäts-Kinderklinik in Wien.)

## Beobachtungen über Zuckerneubildung.

### I. Mitteilung.

Nach Versuchen, die an einem Falle besonderer Kohlenhydratstoffwechselstörung angestellt wurden.

Von

**J. K. Parnas** (Lemberg) und **Richard Wagner** (Wien).

(Ausgeführt mit Unterstützung der Fürst Liechtenstein-Spende.)

(Eingegangen am 20. September 1921.)

### I.

Die Lehre von der Zuckerneubildung aus Stoffen, die keine Kohlenhydrate sind, stützt sich vorwiegend auf folgende Gruppen von Experimenten:

1. Auf Versuche an überlebenden Organen, insbesondere der durchspülten oder durchbluteten Leber, wobei Vermehrung des Glykogenbestandes in der Leber bei Durchspülung mit zuckerfreier Flüssigkeit, oder aber Vermehrung des Zuckergehaltes bei Durchblutung der glykogenarmen Leber die Zuckerneubildung anzeigt.

2. Auf Stoffwechselversuche an pankreasdiabetischen oder phlorhizinvergifteten Individuen; die Vermehrung der Zuckerausfuhr bei einem als glykogenarm angesehenen Individuum, die auf Zufuhr von bestimmten Substanzen eintritt, wird in dieser Versuchsanordnung als Zeichen einer Zuckerneubildung aus der zugeführten Substanz betrachtet.

Ohne auf die erste Versuchsanordnung näher eingehen zu wollen, die in nur wenigen Fällen angewendet worden ist (Grube, Parnas-Baer, Embden-Isaak, Barrenscheen u. a.) und bis jetzt nicht in der Lage war, unanfechtbare Schlüsse zuzulassen, möchten wir uns der zweiten Art der Versuchsanordnung zuwenden, welche in den Versuchen Lüthjes<sup>1)</sup> den bedeutendsten und sichersten Beweis für die Zuckerbildung aus Eiweiß geliefert hat und in den Versuchen der Lusk-schen<sup>2)</sup> Schule die Erkenntnis der Zuckerbildung aus einzelnen Bau-

<sup>1)</sup> Dtsch. Arch. f. klin. Med. **79**, 498. 1904; Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **106**, 160. 1904 (zit. nach Lichtwitz).

<sup>2)</sup> Asher und Spiro, Ergebn. d. Physiol. **12**, 380. 1912.

steinen sowie intermediären, stickstofffreien Stoffwechselprodukten bedeutend erweitert und vertieft hat. Nach diesen Versuchen sind unter den Aminosäuren Glykokoll, Alanin, Glutaminsäure, Leucin, Cystin und Asparagin als Zuckerbildner anzusehen, unter den intermediären stickstofffreien Stoffwechselprodukten Milchsäure, Glycerinsäure, Propionsäure, Isobuttersäure, Isocapronsäure, n-Heptylsäure, im allgemeinen jene Fettsäuren, welche nicht Acetonbildner sind<sup>1)</sup>.

Indessen ist trotz der inneren Geschlossenheit, welche diese Versuche aus verschiedenen Schulen und Laboratorien aufweisen, nicht zu verkennen, daß sie prinzipiell anfechtbar sind. In manchen Versuchen werden größere Extrazuckermengen ausgeschieden, als aus der betreffenden Aminosäure entstehen konnten; die Undeutlichkeit der Ergebnisse trat unter anderem in den Anschauungen über Zuckerneubildung aus Brenztraubensäure zutage, welche nach Ansicht der einen (u. a. Dakin und Janney<sup>2)</sup>) als Zuckerneubildner aufzufassen war, nach überzeugenden Experimenten anderer Forscher [Fröhlich und Pollak<sup>3)</sup>] an der isolierten Kaltblüterleber sich hingegen als Glykogen mobilisierendes Agens erwies. So kam es denn, daß in jüngster Zeit die Grundlagen der Lehre von der Zuckerneubildung überhaupt in Frage gestellt wurden. Leo Pollak<sup>4)</sup> fand bei Kaninchen nach Darreichung von Substanzen, welche bis jetzt als Muttersubstanzen der Zuckerneubildung galten, Hyperglykämie, ohne daß eine ähnliche Hyperglykämie durch Zucker selbst oder Milchsäure hervorgerufen würde. Er schloß daraus, daß die Wirkung dieser Substanzen sowohl auf die Zuckerausscheidung als auf den Blutzuckergehalt eine adrenalinartige Wirkung sei, und stützte diese Auffassung auf die Tatsache, daß diese Wirkung durch Ergotamin aufgehoben wird. Die Pollakschen Befunde erscheinen um so bemerkenswerter, weil sie den gesamten Grundlagen unserer Auffassung von der Zuckerneubildung eine neue Deutung zu geben scheinen: in der großen Reihe der von ihm untersuchten Substanzen erscheinen genau diejenigen, welche bis jetzt als Muttersubstanzen der Zuckerneubildung galten, als zuckermobilisierende Agentien; dagegen fehlt diese mobilisierende Wirkung gerade allen denjenigen Substanzen, die durch  $\beta$ -Oxydation in Acetonkörper übergehen müßten.

Gerade als diese Fragestellung durch L. Pollak in Fluß gebracht worden war, bot uns ein Zufall die Möglichkeit, durch die Analyse einer

<sup>1)</sup> Zit. nach der Zusammenstellung bei Lichtwitz, Klinische Chemie, Springer 1918, S. 128 u. 129.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. **15**, 177. 1913 (zit. nach Lichtwitz).

<sup>3)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **77**, 265. 1914.

<sup>4)</sup> Vers. dtsch. Naturf. u. Ärzte in Nauheim 1920, Pharmakol. Sektion.



klinisch einzig dastehenden Störung des Kohlenhydratstoffwechsels diese Frage unter anderen experimentellen Bedingungen zu prüfen, als dies bis jetzt möglich war. Wir werden diesen Fall an anderer Stelle klinisch und experimentell ausführlich beschreiben und Konsequenzen erörtern, die sich in bezug auf die Korrelation der Stoffwechsel beeinflussenden Drüsen daraus ergeben; an dieser Stelle wollen wir nur die Experimente erörtern, welche zur Frage der Zuckerneubildung Beziehung haben.

Ein 9jähriges Mädchen, welches mit einem Lebertumor<sup>1)</sup> unklarer Provenienz in die Klinik aufgenommen wurde, zeigte eine eigenartige Störung des Zuckerstoffwechsels: im Nüchternzustand (morgens) zeigt das Kind zuckerfreien, acetonreichen Harn, der Blutzucker hat so geringe Werte, daß sie bei Anwendung der Bertrand-Michaelisschen Methode<sup>2)</sup> analytisch unfaßbar sind. Nach Zufuhr von kohlenhydrathaltiger Nahrung schnellte der Blutzuckergehalt in die Höhe und erreichte auf der Höhe der Verdauung hyperglykämische Werte, die bei gemischter Kost bis zu Werten von 0,4% ansteigen können. Dieser Zustand dauert tagsüber an und ist mit Aufhören der Ketonurie und mit dem Bestehen einer erheblichen Glykosurie verbunden. Nach der letzten Mahlzeit, etwa gegen 17 Uhr, hört die Glykosurie gewöhnlich gegen 5 Uhr morgens auf, und in den nachfolgenden Stunden wird reichlich Ketonkörper enthaltender Harn ausgeschieden, während der Blutzucker weiterhin auf einen fast aglykämischen Wert absinkt. Der Fall ist also durch eine extreme Labilität des Zuckershaushaltes gekennzeichnet und verhält sich so, als wie wenn gar keine Einrichtungen vorhanden wären, um den eingebrachten Zucker zu speichern, bei Zuckermangel dagegen den Blutzucker aus Reservekohlenhydraten oder aus anderen Muttersubstanzen der eigenen Gewebe zu ergänzen. Die Analyse des Falles führte uns sehr bald zu der Auffassung, daß die Fähigkeit, exogenes, mit der Nahrung zugeführtes Eiweiß in Kohlenhydrate umzuwandeln, wohl erhalten war; denn nach Zufuhr von Eiweißkörpern, sei es in Form von Fleisch oder reinen Eiweißkörpern (Leim, Erepton), stieg der Blutzuckergehalt bis zu fast normalen Werten. Hingegen unterblieb die Einschmelzung des Gewebseiweißes zum Zwecke der Kohlenhydratbildung, wie sie bei schwerem Diabetes stattfindet, bei diesem Individuum; sie ließ sich, wie wir an anderem Orte berichten werden, durch Fütterung großer Schilddrüsenmengen hervorrufen. Dagegen verhielt sich das Kind so, als wie wenn gar keine mobilisierbaren Glykogenvorräte vorhanden wären. Nicht nur die außerordentliche Labilität des Blutzuckers

<sup>1)</sup> Leber gleichmäßig vergrößert, von derber Konsistenz, glatter Oberfläche und plumpem Rand. WaR. negativ.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. 59, 166.

spricht dafür, sondern vor allem die Tatsache, daß auf subcutane Einverleibung von 0,5 mg Adrenalin bei aglykaemischen Niveau der Blutzuckergehalt nicht in die Höhe ging. Auf Grund dieser Zusammenhänge glauben wir berechtigt zu sein, in diesem Falle einen pathologischen Zustand zu erblicken, den wir im Anschluß an die bekannte Bezeichnung Naunyns als Azooamylie betrachten möchten. Die Beziehung dieses Zustandes zum menschlichen Diabetes, der heute kaum noch als reine Dyszooamylie betrachtet werden kann, werden wir an anderer Stelle erörtern.

Dieses Kind, welches, ohne auf Adrenalin zu reagieren und ohne anscheinend durch chemische Reize mobilisierbares Glykogen zu besitzen, dennoch auf Eiweißverfütterung mit Erhöhung des Blutzuckerspiegels antwortet, erschien uns geeignet, um die zuvor erörterten Fragen der Zuckerneubildung zu studieren. Wenn Adrenalin, der mächtigste unter den zuckermobilisierenden Reizen, wirkungslos ist, so wird eine adrenalinartige Wirkung kaum bei den von uns verfütterten Substanzen anzunehmen sein, die an und für sich, auch in den L. Pollakschen Versuchen, eine viel schwächere Wirkung entfalten. Falls diesen Substanzen sowohl die Fähigkeit, in Zucker umgewandelt zu werden, als auch zuckermobilisierende Wirkung zukommt, so könnte an dem von uns untersuchten Individuum nur die zuckerneubildende Wirkung in Erscheinung treten.

## II.

Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß 15 Stunden nach der letzten Mahlzeit, nachdem man sich durch die Gerhardt'sche Probe von dem Zustand des Zuckerhungers überzeugt hatte, eine Blutprobe entnommen und die untersuchte Substanz in geeigneter Form verfüttert wurde. Die Menge wurde so abgemessen, daß die erwartete Zuckerneubildung einen merklichen Einfluß auf den Blutzuckerspiegel ausüben konnte. Wenn wir bei dem zirka 20 kg wiegenden Kind 1,5 l Blut annehmen, so müßte der momentane Übertritt von etwa 1,5 g Zucker in den Kreislauf genügen, um einen normalen Blutzuckergehalt von  $1^{0}/_{00}$  hervorzurufen; da wir es hier aber mit einem komplizierten dynamischen Gleichgewicht zu tun haben, dessen einzelne Faktoren — Geschwindigkeit der Resorption, der Desamidierung, Umwandlung in Kohlenhydrate, Zuckerübertritt in die Verbrauchsorgane sowie Fettbildung und Verlust durch Glykosurie — quantitativ gar nicht abzuschätzen sind, so richteten wir unsere Versuche so ein, daß eine Zuckerneubildung von nicht unter 10 g Glykose zu erwarten war, und rechneten natürlich auf viel geringere Blutzuckerwerte als diejenigen, welche nach Zufuhr von 10 g Traubenzucker auftraten. Im Verlauf der darauffolgenden Stunden wurden, während das Kind dauernd noch nüchtern blieb, weitere Blutproben entnommen und analysiert. Der Urin wurde

während der ganzen Versuchsperiode gesammelt und auf Zucker und Ketonkörper untersucht. Die Blutzuckerbestimmungen wurden an mit NaF ungerinnbar gemachtem Blut nach Bertrand - Michaelis (l. c.) ausgeführt, und für die Bestimmung wurde jedesmal 1, höchstens 2 ccm Blut verwendet<sup>1)</sup>.

### 1. Nüchternwerte.

In der Zeit von Anfang Januar bis Ende Juli 1921 wurde insgesamt 52 mal das Blut nüchtern quantitativ untersucht; in der überwiegenden Mehrzahl der Untersuchungen wurde dabei am Boden des Zentrifugenröhrchens auch nicht einmal ein Hauch von rotem Kupferoxydul beobachtet, und es erscheint fraglich, ob die Reduktionswerte, welche nach Auflösung des geringen, gallertigen, grünlichen Niederschlages in der Eisensulfatlösung gefunden wurden, überhaupt auf Kupferoxydul zu beziehen sind. Daß etwas höhere Nüchternwerte an solchen Versuchstagen, vor welchen die Abendmahlzeit nicht gerade überwacht worden und vielleicht an langsamer verdauten Kohlenhydraten reichlicher als gewöhnlich war, im Blute gefunden wurden, hat keine prinzipielle Bedeutung; jedenfalls läßt sich der aglykämische Wert jederzeit reproduzieren.

### 2. Blutzucker nach Kohlenhydratverabreichung.

Den Einfluß von Kohlenhydratdarreichung auf den Blutzuckerspiegel zeigt die Tabelle I.

Tabelle I.

Datum	Gabe	Blutzucker %	Zeitpunkt der Bestimmung nach Eingabe
9. I. 1921	20 g Traubenzucker . . . . .	0,292	3/4 Stunden
	30 „ Weißbrot . . . . .		
19. I. 1921	30 „ Traubenzucker . . . . .	0,222	1/2 „
	30 „ Weißbrot . . . . .	0,209	3 „
12. II. 1921	Reichlich Stärke und Zucker enthaltende gemischte Kost	0,109	5 1/2 „
	Reichlich Stärke und Zucker enthaltende gemischte Kost	0,430	2 „
16. IV. 1921	40 g Galaktose . . . . .	0,193	2 „
1. VI. 1921	Reichlich Stärke und Zucker enthaltende gemischte Kost	0,378	2 „

<sup>1)</sup> Da der Einwand möglich erscheint, daß die Nichtauffindbarkeit von Zucker mit der Bertrand - Michaelisschen Methode in ähnlicher Weise auf die Anwesenheit basischer Substanzen zurückzuführen ist, wie dies von Lesser (diese Zeitschr. 54, 252. 1913) im Froschblut gezeigt worden ist, möchten wir darauf aufmerksam machen, daß beigebrachter oder auch aus stickstoffhaltigen Substanzen entstandener Zucker im Blute dieses Kindes immer auffindbar war. Zur weiteren Kontrolle wurde überdies das Nüchternblut auch mehrmals mit der Bangschen Mikromethode auf Zucker untersucht, aber auch auf diesem Wege praktisch zuckerfrei befunden.

### 3. Verhalten des Blutzuckers nach Adrenalin.

Unsere Versuche, einen Adrenalineffekt nachzuweisen, zeigten die folgenden Ergebnisse:

- a) 6. II. 1921. 8<sup>h</sup> 15' nüchtern Blutentnahme; kein Zucker (0,16 ccm  $\frac{n}{100}$ -KMnO<sub>4</sub> für 1 ccm Blut).  
 8<sup>h</sup> 30' subcutan 0,5 mg Adrenalin (Tonogen Richter).  
 9<sup>h</sup> 30' Blutentnahme; kein Zucker (0,16 ccm  $\frac{n}{100}$ -KMnO<sub>4</sub> für 1 ccm Blut).

Urin während der ganzen Probe zuckerfrei; Gerhardt'sche Probe ++++. Gesamtaceton in 1140 ccm (24 Stundenmenge) = 0,6 g; derselbe Befund auch in den folgenden Adrenalinversuchen.

- b) 8. II. 1921. 8<sup>h</sup> 25' nüchtern Blutentnahme; kein Zucker (0,18 ccm  $\frac{n}{100}$ -KMnO<sub>4</sub> für 1 ccm Blut).  
 8<sup>h</sup> 30' subcutan 0,5 mg Adrenalin Höchst.  
 9<sup>h</sup> 30' Blutentnahme, für 1 ccm Blut 0,45 ccm  $\frac{n}{100}$ -KMnO<sub>4</sub>.  
 c) 28. II. 1921. 8<sup>h</sup> 00' nüchtern Blutentnahme; 0,068% Blutzucker.  
 8<sup>h</sup> 20' subcutan 0,5 mg Adrenalin Höchst.  
 8<sup>h</sup> 55' Blutentnahme, 0,0107% Blutzucker (annähernd, da extrapoliert).

Bei einem Parallelversuch an einem gesunden Kind stieg der Blutzuckerwert innerhalb derselben Zeit und nach derselben Adrenalinaufgabe von 0,09% auf 0,15%.

- d) 1. III. 1921. 8<sup>h</sup> 00' nüchtern Blutentnahme; 0,043% Blutzucker.  
 8<sup>h</sup> 20' subcutan 0,5 mg Adrenalin Höchst.  
 8<sup>h</sup> 55' Blutentnahme, 0,055% Blutzucker  
 e) 20. IV. 1921. 8<sup>h</sup> 10' nüchtern Blutentnahme; 0,066% Blutzucker.  
 8<sup>h</sup> 15' subcutan 0,6 mg Adrenalin Höchst mit sehr starker Wirkung auf den Kreislauf.  
 8<sup>h</sup> 50' Blutentnahme; kein Zucker (für 1 ccm Blut das Doppelte der Zuckermenge, welche 0,30 ccm  $\frac{n}{100}$ -KMnO<sub>4</sub> entspricht).  
 9<sup>h</sup> 25' Blutentnahme mit demselben Ergebnis.

Die mitgeteilten Versuche zeigen eindeutig, daß nach Adrenalin-darreichung keine Annäherung an einen normalen Blutzuckerwert, geschweige denn eine Hyperglykämie zustande kommt. In Versuchen, in welchen das Adrenalin (einmal zufällig, das andere Mal absichtlich) in einem Moment gegeben wurde, in welchem sich der Blutzuckerspiegel auf dem absteigenden Ast des täglichen Zyklus befand, ohne noch den Nullwert erreicht zu haben, folgte kein Ansteigen, sondern vielmehr ein beschleunigter Abfall des Blutzuckerwertes, vermutlich infolge eines durch erhöhte Herzarbeit, Respirationstätigkeit usw. hervorgerufenen Mehrverbrauchs an Zucker. Wir möchten bemerken, daß das Kind sich in bezug auf die Kreislaufbeeinflussbarkeit außerordentlich adrenalinempfindlich erwies, so daß die Wiederholung der Versuche schon unter großen Bedenken erfolgte.

**4. Beeinflussung des Blutzuckerspiegels durch Eiweißdarreichung.**

9. II. 1921. 8<sup>h</sup> 15' nüchtern Blutentnahme; < 0,02% Zucker.  
 8<sup>h</sup> 30' 150 g fettfreies Kalbfleisch.  
 10<sup>h</sup> 30' Blutentnahme: 0,079% Zucker; dann wieder 150 g fettfreies Kalbfleisch.  
 12<sup>h</sup> 30' Blutentnahme; 0,097% Zucker.
21. II. 1921. 8<sup>h</sup> 00' nüchtern. Urin zuckerfrei. Gerhardt + + +. Blutzucker: Keine Reduktion.  
 8<sup>h</sup> 15' 25 g Erepton Höchst.  
 10<sup>h</sup> 00' Blutentnahme: 0,094% Zucker.  
 12<sup>h</sup> 00' Blutentnahme: 0,086% Zucker.
24. II. und 25. II. 1921.  
 9<sup>h</sup> 30' des 24. II. Fleischbrühe + 50 g Gelatine.  
 8<sup>h</sup> 00' des 25. II. nüchtern Blutentnahme: 0,0873% Zucker; dann wieder Fleischbrühe + 50 g Gelatine.  
 10<sup>h</sup> 00' Blutentnahme: 0,0816% Zucker.  
 12<sup>h</sup> 00' Blutentnahme: 0,0831% Zucker.  
 Der Harn von 8<sup>h</sup> 00' bis 12<sup>h</sup> 00' des 25. II. zuckerfrei.

Aus allen diesen Versuchen geht eindeutig hervor, daß mit der Nahrung zugeführtes exogenes Eiweiß den Blutzucker bis zum Normalwert hebt. Wir glauben, daß dieses Ergebnis nicht anders aufzufassen ist als im Sinne einer Neubildung von Zucker aus den Aminosäuren des zugeführten Eiweißes.

**5. Blutzuckerspiegel nach Zufuhr stickstofffreier Substanzen.**

30. V. 1921. Glycerin.  
 8<sup>h</sup> 00' nüchtern. Urin zuckerfrei. Gerhardt + + +. Blutzucker < 0,02%.  
 8<sup>h</sup> 05' 20 ccm Glycerin als Limonade.  
 9<sup>h</sup> 30' Blutentnahme: 0,0953% Zucker.  
 11<sup>h</sup> 30' Blutentnahme: 0,113% Zucker.  
 Urin 8<sup>h</sup> 00' bis 11<sup>h</sup> 30' reduziert deutlich. Aceton nur in Spuren; Gerhardt negativ.

Das Glycerin scheint demnach ein mächtiger Zuckerbildner zu sein.

- 4 VI. 1921. Milchsäures Calcium.  
 8<sup>h</sup> 00' nüchtern. Urin zuckerfrei. Gerhardt + + +. Blutzucker < 0,02%.  
 8<sup>h</sup> 20' bis 8<sup>h</sup> 30' 20 g Calciumlactat.  
 10<sup>h</sup> 00' Blutentnahme: 0,0792% Zucker.  
 11<sup>h</sup> 45' Blutentnahme: 0,100% Zucker.  
 Urin 8<sup>h</sup> 00' bis 11<sup>h</sup> 50' reduziert.

Milchsäure ist demnach, wie auch sonst bekannt, als kräftiger Zuckerbildner anzusehen.

25. VII. 1921. Glykolsäures Natrium.

Der Versuch wurde leider unter ungünstigen Bedingungen ausgeführt; denn der Morgenurin dieses Tages enthielt noch Zucker, und dementsprechend hatte das Blut noch einen hohen Zuckerspiegel. Indessen

zeigte sich hier nach Glykolsäurearreicherung ein Abfall des Blutzuckers 0,0999% auf 0,079% im Verlauf von 2 Stunden; es scheint demnach Glykolsäure kein Zuckerbildner zu sein.

Außer diesen Substanzen wurde noch Propionsaures Natrium versucht, wurde aber wenige Minuten nach der Darreichung quantaliter erbrochen; ebenso erging es mit Lithiumlactat.

### 6. Einfluß von Aminosäuren auf den Blutzucker.

- a) 26. II. 1921. Alanin.  
 8<sup>h</sup> 00' nüchtern. Blutentnahme: Kein Zucker dann 25 g dl-Alanin.  
 10<sup>h</sup> 00' Blutentnahme: 0,084% Zucker.  
 12<sup>h</sup> 00' Blutentnahme: 0,079% Zucker.
- b) 9. IV. 1921. Alanin. Wie der vorherige Versuch.  
 Nüchternwert: 0,036% Zucker  
 nach 1½ Stunden: 0,078% Zucker.
- c) 11. IV. 1921. Alanin. Versuchsbedingungen wie in den vorigen Versuchen.  
 Nüchternwert: < 0,02% Zucker  
 nach 1½ Stunden: noch außerhalb der Tabelle  
 nach 3½ Stunden: 0,082% Zucker.
23. II. 1921. Glutaminsäure.  
 8<sup>h</sup> 00' nüchtern. Blutentnahme: < 0,02% Zucker, dann 25 g optisch aktive Glutaminsäure.  
 10<sup>h</sup> 00' Blutentnahme: 0,062% Zucker.  
 12<sup>h</sup> 00' Blutentnahme: 0,0616% Zucker.

Auf Grund dieser Versuche möchten wir die Ansicht aussprechen, daß die untersuchten stickstofffreien Körper, sowie auch die untersuchten Aminosäuren und Aminosäurengemische im Sinne der alten Auffassung als Muttersubstanzen der Zuckerbildung aufzufassen sind.

### III.

Die Frage der Zuckerbildung aus Fett kann wohl als eine der wichtigsten Fragen der Zuckerneubildung bezeichnet werden, sicher ist sie die meist umstrittene. In der Pflanzenphysiologie steht die Bildung von Kohlenhydraten aus Fett einwandfrei fest; sie findet bei der Keimung von Fettsamen statt und läßt sich anatomisch und chemisch sicher nachweisen. In der Tierphysiologie wurzelt der Gedanke an eine Umwandlung von Fett in Kohlenhydrate in sehr verschiedenen Gebieten der Stoffwechsellhre. Chauveaus geniale Lehre von den isoglykosischen Äquivalenten nimmt bekanntlich an, daß Zucker der einzige Betriebsstoff der Muskeltätigkeit ist, und daß sowohl Eiweiß als auch Fett für den Zucker in dem Verhältnis eintreten, in welchem aus ihnen im intermediären Stoffwechsel Zucker gebildet wird. Wenn wir dem Grundgedanken Chauveaus heute näher stehen als der herrschenden

Lehre von der isodynamen Vertretung von Fett, Eiweiß und Zucker, so ist diese Wandlung durch die Entwicklung der Lehre vom intermediären Stoffwechsel, von den chemischen Vorgängen im tätigen Muskel und nicht zuletzt durch die Feststellung von Krogh und Lindhardt<sup>1)</sup> begründet, daß Fett und Kohlenhydrate als Energiespender im arbeitenden menschlichen Körper durchaus nicht isodynam sind, sondern daß für die gleiche Arbeitsleistung ein um etwa 10% höherer Gesamtenergieumsatz bei Fettverbrennung nötig ist als bei Zuckerverbrennung. Krogh selbst benutzt die Hypothese der Fettumwandlung in Zucker (l. c., S. 362). Wir müssen aber zugeben, daß die Zuckerbildung aus Fett sowohl die Ergebnisse Kroghs als auch die Versuche stützen würde, durch welche Chauveau seine Lehre von der Isoglykose zu begründen suchte (Compt. rend., 125 und 126, 1897 und 1898), wenn sie auf irgendwelche andere Weise bewiesen wäre, etwa so wie die Zuckerbildung aus Eiweiß, daß dagegen die Ableitung dieses bestimmten chemischen Prozesses aus dem Verhalten beider Stoffe im Energiewechsel eine kühne Hypothese ist, für die man sich in einer Zeit schwer entschließen kann, in der man gewohnt ist, für die im intermediären Stoffwechsel angenommenen Vorgänge exaktere Beweise zu verlangen. Die Beweise für Zuckerbildung aus Fett, welche auf die [nach Pembrey<sup>2)</sup>] sehr niedrigen, 0,3–0,4 betragenden respiratorischen Koeffizienten der winterschlafenden Haselmaus gegründet waren, haben der Kritik nicht standgehalten [Hari<sup>3)</sup>].

Besondere Bedeutung kommt der Frage der Zuckerbildung aus Fett in der Theorie des Diabetes zu, und sie ist auch im Zusammenhang mit den Fragen des natürlichen und experimentellen Diabetes besonders intensiv diskutiert worden. Carl von Noorden hat bekanntlich in dieser Frage in sehr entschlossener Weise für die Zuckerbildung aus Fett Stellung genommen, und wir möchten nur auf die ausführliche Begründung seiner Ausführungen hinweisen<sup>4)</sup>. Das von v. Noorden angeführte Argument, es läge kein annehmbarer Grund vor, warum die Fettbildung aus Zucker kein reversibler Prozeß sein sollte, erscheint bedenklich: hydrolytische Spaltungen sind im tierischen Organismus wohl reversibel, durchaus aber nicht solche Vorgänge, bei welchen gewaltige Verschiebungen des Sauerstoffs und Wasserstoffs und vor allem Abspaltung von Kohlensäure vorkommt. v. Noorden bemerkt aber richtig, daß wir hier mit allgemeinen Betrachtungen nicht viel weiterkommen; es sind aber bisher keine reproduzierbaren, bestätigten, beherrschbaren Experimente mitgeteilt worden,

---

1) Biochem. Journ. **14**, 290–363.

2) Journ. of physiol. **27** u. **29**.

3) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **130**, 112. 1909.

4) Die Zuckerkrankheit, 7. Aufl., 1917, S. 16–22 u. 242–244.

in welchen irgend eine Funktion der Zuckerbildung durch Fettzufuhr positiv beeinflußt worden wäre, und die Anhänger der Zuckerbildung aus Fett erklären den negativen Ausfall aller dahingehenden Versuche sehr richtig damit, daß mobiles Fett im Organismus immer verfügbar ist, folglich nicht das Fettangebot der begrenzende Faktor der Zuckerbildung sein kann. Als wichtigstes Argument für die Zuckerbildung aus Fett erscheint wohl die Tatsache, daß im Hunger und im Diabetes das Blutzuckerniveau aufrecht erhalten wird, und dies schien für die Rolle des Zuckers als einer intermediären Zwischenstufe des Fettabbaus, welche von der Leber für die Verbrauchsorgane zubereitet wird, zu sprechen. Nun fehlt in unserem Falle praktisch der Blutzucker, obwohl bei dem recht fetten Kind Fett reichlich zur Verfügung steht, in dem zeitweise lipämischen Plasma zirkuliert und bisweilen sogar zur Lipurie führt. Es läßt sich der Blutzucker durch Darreichung von Fettemulsionen nicht in die Höhe treiben, obwohl das Fett reichlich abgebaut wird, was aus der Ausscheidung großer Acetonkörpermengen hervorgeht. Wäre die Zuckerbildung aus Fett irgendwie bewiesen, so könnte man an die Möglichkeit denken, daß dem von uns beobachteten Falle die Fähigkeit, Zucker aus endogenem oder exogenem Fett zu bilden, verloren gegangen ist; daß die Deutung, die wir gegeben haben, und welche nur eine Einschränkung des Abbaues des eigenen Gewebseiweißes annimmt, für die Erklärung des Falles genügt, schließt jene Annahme nicht aus. Indem wir diese Annahme nicht unerörtert lassen, möchten wir betonen, daß wir diese doppelt hypothetische Deutung keineswegs annehmen oder befürworten. Wir erblicken vielmehr in dem extrem niedrigen Blutzuckerwert bei vorhandenem energischen Fettstoffwechsel ein wichtiges Argument zugunsten der Auffassung, daß die Fettsäurenkomponente des Fettes im tierischen Stoffwechsel nicht in Kohlenhydrate überzugehen vermag.

Wenn man an dem Standpunkt festhält, daß die Zuckerbildung aus Fett in der Weise stattfindet, daß keine Ansammlung von adipogenem Zucker im Organismus stattfindet, daß aber intermediäre Abbauprodukte des Zuckers (etwa Ketonkörper, wie Minkowski meint) unmittelbar vor ihrer Verwertung in den Verbrauchsorganen zu Zucker werden, der sofort umgesetzt wird, so ist es jedenfalls wichtig, auf den prinzipiellen Unterschied zwischen der bewiesenen Zuckerbildung aus Eiweiß und unbewiesenen Umwandlung von Fett in Zucker hinzuweisen; denn nur die erstere führt nachweislich zu Blutzucker und Glykogen, die zweite nicht einmal zu Blutzucker. Es wird, nebenbei gesagt, eine Klärung der Frage erst durch Untersuchungen gelingen, die nachweisen werden, welche intermediären Abbauprodukte des Fettes, die von der Leber in ihrer beim Fettstoffwechsel so regen Tätigkeit zubereitet werden, in den Verbrauchsorganen verwertet werden, und auf welchen Wegen dies



geschieht. Es wird sich vielleicht dabei erweisen, daß wasserlösliche, sauerstoffhaltige Abbauprodukte, deren Bildung mit den derzeitigen Vorstellungen über den Abbau der Fettsäuren verträglich ist, im Stoffwechsel des Muskels diejenige Rolle spielen, die man dem hypothetischen adipogenen Zucker zugeschrieben hat.

Wir führen im folgenden die auf diese Frage bezüglichen Versuche an:

a) 18. IV. 1921. Morgens nüchtern bei aglykämischem Niveau 50 g Olivenöl in Wasser und Soda emulgiert gegeben; bei zweimaliger Untersuchung des Blutes im Verlaufe von  $3\frac{1}{2}$  Stunden kein Zucker im Blut nachweisbar, hingegen nach 7 Stunden Steatorrhöe und Lipurie. Gesamtaceton stieg von 0,04% auf 0,102%.

b) 8. IX. 1921. Wiederholung des Versuchs unter den gleichen Bedingungen: Kein Anstieg des Blutzuckers über das aglykämische Niveau.

c) 3. IX. 1921. Bei Gegenwart von Zucker im Nüchternblut nach 50 g Olivenölemulsion Absinken des Wertes von 0,101% über 0,081% bis auf 0,063% im Verlauf von 3 Stunden.

Indem wir diese Versuche mitteilen, welche, an einem bis jetzt einzigartigen pathologischen Falle gewonnen, dennoch prinzipielle Fragen des Stoffwechsels berühren, sind wir uns der Stellung und der Schwächen solcher Beweise bewußt, insbesondere gegenüber dem jederzeit reproduzierbaren Experiment am Tier. Vielleicht wird die pathologisch-chemische Charakteristik des Lebertumors, den wir beobachtet und analysiert haben, nicht lange einzigartig bleiben, sondern es werden vielleicht solcher Fälle mehrere bekannt werden und in ähnlicher Weise der Analyse des Zuckerstoffwechsels dienen, wie die seltene Alkaptonurie der Aufklärung des Tyrosinstoffwechsels gedient hat. Es wird sich dann, wie so oft schon, das Wort Hofmeisters bewahrheiten: „Denn auch ihm (dem Theoretiker) ist die Erfahrung am kranken Menschen an dem von der Natur selbst angestellten Experiment ein unversiegliger Jungbrunnen von Anregung.“

# Zur Kenntnis des Methyl- und Isopropylalkoholschicksals.

Von  
**Julius Pohl.**

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 20. September 1921.)

Die biologische Bewertung der Alkohole hängt ganz ab von der Dosis, in der sie aufgenommen werden. Wie große Gaben befähigen, die Zentren des Nervensystems lähmungsartig zu treffen, so können kleine Gaben namentlich bei wiederholter Darreichung Wirkungen auf das Wachstum oder den Stoffwechsel oder Fermente oder spezifisch nervöse Erscheinungen (Neuritis) auslösen. Beim Äthylalkohol sind diese Verhältnisse im ganzen gründlich studiert, weit weniger sicher gilt dies von dem Einfluß anderer Alkohole. Zwei Lücken ähnlicher Art zu füllen ist Aufgabe folgender, im allgemeinen nicht zusammenhängender Versuchsreihen.

Vom Methylalkohol, von dem bereits sehr kleine Gaben nachhaltige Störungen der Sehsphäre bedingen — schon ein Teelöffel voll soll nach Buller Erblindung erzeugt haben — ist speziell die untere Grenze der schädigenden Dosis nicht bekannt; da wir anzunehmen Grund haben, daß die schädigende Wirkung des Methylalkohols mit seiner schweren Verbrennbarkeit zusammenhängt und deshalb die zeitlichen Verhältnisse der Ausscheidung seines Oxydationsproduktes, der Ameisensäure, eine Vorstellung von seiner Ablagerung im Tierkörper gestatten, so habe ich in einer Versuchsreihe festzustellen versucht, ob auch bei sehr kleinen und wiederholten Gaben diese seine grundlegende Eigenschaft, retiniert zu werden, in Erscheinung tritt.

Zu diesem Behufe habe ich Tieren (Hunden) reinsten über Kaliumcarbonat destillierten, also ameisensäurefreien Methylalkohol an vier aufeinanderfolgenden Tagen zu je 3 g auf 100 ccm per os gegeben. Die die Ameisensäurebestimmung betreffenden Details sind in meiner Arbeit<sup>1)</sup> nachzusehen. Die Versuche, denen die Bestimmung der Ameisensäure an einem Normaltag vorausging, verliefen folgendermaßen:

<sup>1)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **31**, 281. 1893. „Über die Oxydation des Methylalkohols im Tierkörper.“

## Versuch 1: Hund, 7500 g.

Normalausscheidung . . . . .	0,0086 g	ameisensaures	Natron
I. Versuchstag . . . . .	0,0210	„	„
II. „ . . . . .	0,0210	„	„
III. „ . . . . .	0,0084	„	„
IV. „ . . . . .	0,0693	„	„
V. „ . . . . .	0,0363	„	„

## Versuch 2: Hund, 13 800 g.

Normalausscheidung . . . . .	0,0054 g	„	„
I. Versuchstag . . . . .	0,0336 „	„	„
II. „ . . . . .	0,0219 „	„	„
III. „ . . . . .	0,0075 „	„	„
IV. „ . . . . .	0,0864 „	„	„

## Versuch 3: Hund, 7700 g.

Normalausscheidung . . . . .	0,00254 g	ameisensaures	Natron
I. Versuchstag . . . . .	0,0022	„	„
II. „ . . . . .	—	„	„
III. „ . . . . .	0,01674 „	„	„
IV. „ . . . . .	0,01768 „	„	„
V. „ . . . . .	0,06198 „	„	„

Da ältere Versuche über die Ausscheidung der der Verbrennung entgehenden Mengen von Ameisensäure zeigen, daß dieselben den Körper rasch verlassen, so lehren vorstehende 3 Versuche übereinstimmend, daß auch so kleine Mengen wie täglich 3 g, an bis 14 kg schwere Tiere verabfolgt, zu einer ansteigenden Ameisensäureausscheidung, zu einer Retention des Methylalkohols führen.

Es ergibt sich hieraus die Auffassung, daß auch derartige und wohl noch kleinere Dosen Methylalkohol, wiederholt aufgenommen, durch Speicherung des Alkohols schädigend wirken können. Diese Daten haben nun eine ganz eminente praktische Bedeutung, seitdem in den nordischen Ländern ein sog. Sulfitäthylalkohol in großen Massen erzeugt wird, der bis 2% Methylalkohol enthält und von der betreffenden Industrie als Ersatz des Gärungsäthylalkohols zu Genußzwecken auf den Markt gebracht wird. Ich halte die tägliche Aufnahme selbst solcher Mengen (wie 2 g pro Tag) für bedenklich und schlage aus prophylaktischen Gründen vor, den freien Verkauf eines solchen Sprits nur zu technischen Zwecken zu gestatten.

Die nächsten Versuche gelten dem Isopropylalkohol  $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ . Seitdem es gelingt, vom Calciumcarbid über das Acetylen zum Acetaldehyd zu gelangen, lassen sich aus dem Oxydationsprodukt des letzteren, der Essigsäure, große Mengen von Aceton gewinnen, die wiederum durch einen katalytischen Reduktionsprozeß in Isopropylalkohol verwandelt werden. Im allgemeinen sind die toxikologischen Eigenschaften des Propyl- und Isopropylalkohols die gleichen wie die

des Äthylalkohols. Boruttau<sup>1)</sup> findet Äthyl- und Isopropylalkohol gleich giftig und kommt ebenso wie Heffter<sup>2)</sup> zu dem Schluß, daß gegen eine hygienisch-kosmetische Verwendung dieses Alkohols kein Einwand besteht. Zu einem endgültigen Urteil aber über die innerliche Verwendungsmöglichkeit des Isopropylalkohols, speziell über seine Brauchbarkeit als Nahrungsmittel, in niedrigen Konzentrationen, fehlt bislang eine Angabe über sein Schicksal im tierischen Organismus. Dies festzustellen ist Aufgabe nachfolgender Versuche.

Dieselben sind mit einem Isopropylalkohol vom K.P. 81–82<sup>3)</sup> ausgeführt<sup>3)</sup>. Derselbe gab keine Reaktion mit Phenylhydrazin, mit Nitroprussidnatrium, mit Frommes Reagens; war also acetonfrei. Dabei beobachtete ich, daß eine 2proz. Lösung schon in der Kälte mit Jod-Jodkalium Jodoformreaktion gibt. Es kommt also zur Oxydation des Isopropylalkohols zu Aceton. Bei geringeren Konzentrationen, etwa 0,2%, dauerte es bis zu einer halben Stunde, bevor die Jodoformreaktion eintritt. Bei kleineren Mengen noch länger, so daß eine schnelle jodometrische Bestimmung des Isopropylalkohols für die in Frage kommenden Konzentrationen ausgeschlossen erscheint. Da sich außerdem herausstellte, daß der Isopropylalkohol teilweise unverändert, teilweise als Aceton von den Tieren ausgeatmet wird, so führte ich die quantitativen Bestimmungen der Exhalationsprodukte folgendermaßen durch: Das Aceton nach Messinger, den Isopropylalkohol durch Oxydation mit chromsaurem Kali in saurer Lösung. Eigene Versuche lehrten, daß Aceton durch chromsaures Kali in der Kälte nicht angegriffen wird. Die Bestimmung des Propylalkohols basiert auf folgenden Gleichungen:



60 g Isopropylalkohol brauchen demnach ein Molekül O = 16 g O

$$30 \text{ g} \quad \text{..} \quad \text{..} \quad \text{..} \quad \frac{0}{2} = 49,0 \text{ g chroms. Kali}^4)$$

4,908 Chr. auf den Liter bedeuten 3 g Isopropylalkohol, 1 cem verbrauchter Kaliumchromatlösung ist somit gleich 0,003 Isopropylalkohol. Die Abschwächung der Chromatlösung durch die Oxydation wurde immer mit je 10 cem einer Mohrschen Salzlösung durch Tüpfelung mit frischer Ferricyankaliumlösung geprüft. Die Brauchbarkeit des Verfahrens lehrt folgender Versuch:

10 cem Mohrsches Salz verbrauchen 2,5 Chromatschwefelsäurelösung.

Unter Berücksichtigung, daß 1 cem Isopropylalkohol = 0,791 g Isopropylalkohol ist, werden 0.1 g Isopropylalkohol in 10 cem Wasser

<sup>1)</sup> Ch. C. 1921, III, 873.

<sup>2)</sup> Vierteljahrsschr. f. gerichtl. Med. u. öff. Sanitätsw. 58. 1919.

<sup>3)</sup> Der Alkohol entstammt der Chem. Fabrik I. D. Riedel, A.-G. Berlin.

<sup>4)</sup> Treadwell, Quantitative Analyse S. 394 u. 469.

mit 50 Chromatlösung = 60 ccm 24 Stunden in der Kälte stehengelassen. Nach 24 Stunden verbrauchen 10 ccm Mohrscher Salzlösung 9 ccm von diesen 60.

$$\frac{60}{9} \cdot 2,5 = 16,66 .$$

Von 50 ccm waren also  $50 - 16,66 = 33,34$  Chromat. verbraucht.  $33,3 \cdot 0,003 = 0,099$ . Statt 0,1 sind also 0,099 Isopropylalkohol nachgewiesen.

Eine zweite Probe mit 0,1 lieferte genau dasselbe Resultat. Bei 0,05 wurde 0,057 gefunden. Je kleiner die Dosis, desto größer sind also die Versuchsfehler.

Um das Schicksal des Isopropylalkohols festzustellen, wurden Kaninchen und Hunde, die den Alkohol mittels Schlundsonde in verdünnter Lösung erhalten hatten, in eine geräumige Glocke gebracht und durch eine Wasserstrahlpumpe das Exhalat durch 4 mit Wasser beschickte Gefäße geleitet, hierdurch seine Bestandteile gebunden. Das Volumen der Auffangflüssigkeit war gewöhnlich etwa 5 Liter. Die nähere Beschreibung des Verfahrens siehe bei Asser<sup>1)</sup>. Dauer des Versuches 12 Stunden. Die Exhalatflüssigkeit zeigte folgende Eigenschaften: 250 ccm Exhalatflüssigkeit eines Hundes von 7500, der 5 ccm Isopropylalkohol auf 100 erhalten hatte, ergaben im Vakuum über Kaliumcarbonat zwischen 40 und 48° C destilliert folgende Reaktionen:

Jodoformreaktion: in der Kälte, sofort positiv,

Nitropussidreaktion + Essigsäure: schwach positiv.

Gunning Reaktion: positiv.

Frommes Salicylaldehydreaktion: positiv.

Das Exhalat enthielt also sicher Aceton. Außerdem reagierte die Exhalatflüssigkeit mit saurer Chromatlösung beim Stehen in der Kälte. Es enthielt also Isopropylalkohol. (Wenn auch die Chromatreaktion im allgemeinen nur die Gegenwart eines Alkohols überhaupt anzeigt, so halte ich mich für berechtigt, Gegenwart von Isopropylalkohol anzunehmen, wenn derselbe gereicht worden ist.) Bei den Versuchen wurden immer je 50 Chromatlösung mit 450 ccm des Exhalats 24 Stunden stehen gelassen.

Wenn nun, wie oben angegeben, verdünnter Isopropylalkohol mit Jod-Jodkalium unter Jodoformbildung reagiert, so könnte in einem Gemenge von Aceton und Isopropylalkohol ein Teil des Jods auch von letzterem beschlagnahmt worden sein. Es sind die von mir als Aceton berechneten Zahlen also eher etwas zu hoch als zu niedrig.

Ferner hebe ich hervor, daß selbst nach 10 g Isopropylalkohol vom Hund nur ein inaktiver Harn ausgeschieden wird, der weder vor noch

<sup>1)</sup> Asser, Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therap. **15**. 325. 1914.

nach der Inversion Kupfersulfat reduzierte. Es wurde somit keine oder nur Spuren von gepaarten Glukuronsäuren (Neubauer)<sup>1)</sup> nach diesen Dosen ausgeschieden. Einige Beispiele solcher Versuche mögen folgen.

Ein Kaninchen, 2200 g, erhält 3 ccm = 2,37 Isopr. auf 50 ccm per os. 5720 ccm Auffangflüssigkeit. In denselben nachgewiesen 0,258 g auf Isopr. umgerechnetes Aceton und 0,02814 Isopr., im ganzen also wurden 0,286 = 12% des gereichten Alkohols ausgeschieden, 88% verbrannt.

Bei einem Tier von 7100 g, das nach 6,3 g Isopr. durch 12 Stunden exhalierete und dann durch einen Versuchsfehler zugrunde ging, wurden in je 100 g der Leber 0,048 g Isopropylalkohol durch Destillation wiedergefunden. Die nach dieser Zeit also im Körper zurückbleibenden Alkoholmengen sind ganz gering.

Aus 7 Normalversuchen am Kaninchen ergibt sich eine Ausscheidung von 12,8%, somit Verbrennung von 87,2% und aus 11 negativen Vergiftungsversuchen, die deshalb als normale angesehen werden können, eine Ausscheidung von 12,4% Verbrennung von 87,6% des gereichten Alkohols.

Ich halte mich somit unter Berücksichtigung, daß die Exhalation noch etwas länger als gerade 12 Stunden andauern könnte, zu dem Schlusse berechtigt, daß kleine Dosen Isopropylalkohol, die gar keine Rauscherscheinungen hervorrufen, zu mehr als 80% kalorisch verbraucht, d. h. oxydiert werden. Dadurch nähert sich der Isopropylalkohol dem Äthylalkohol, von welchem letzterem bekanntlich mehr als 90% verbrannt werden. Daß ein Überschreiten der gewählten Dosen andere Zahlen liefern muß, ist selbstverständlich, ebenso, daß weit größere Dosen des Alkohols gefährlich, ja tödlich wirken können.

Um ein Urteil darüber zu gewinnen, ob durch tägliche Darreichung kleiner Mengen von Isopropylalkohol das Wachstum und Allgemeinbefinden eines wachsenden Tieres beeinflußt werden, habe ich einem kleinen Hund von 1440 g fast täglich 3–5 ccm, in toto 224 ccm, innerhalb zweier Monate gereicht. Während anfangs auf 3 g leichtes Taumeln eintrat, vertrug das Tier später je 5 ccm ohne nervöse Erscheinungen. Vom 24. V. bis 25. VII. stieg sein Gewicht von 1440 auf 4040 g, d. i. eine Zunahme von 2600 g. Ein Kontrolltier desselben Wurfs, das ich ebenso oft mit einem gleichen Volumen Wasser per Schlundsonde fütterte, stieg in derselben Zeit von 1440 auf 3820 g, d. i. eine Zunahme von 2380 g.

Es erzeugen also die gewählten Isopropylalkoholmengen keinerlei Wachstumsstörung, überhaupt keine Alteration des Befindens. Wenn es gelingt, den jetzt technisch in so großen Mengen gewonnenen Isopropylalkohol von den ihm anhaftenden unangenehmen Geruchskörpern zu befreien, dann erhebt sich kein Bedenken, denselben — in vernünftigen Dosen — auch als Genußmittel zu verwenden: seine nennenswerte calorische Zersetzung im Warmblüterkörper ist vorstehend erwiesen.

<sup>1)</sup> Neubauer, N., Glykuron-äurepaarung bei Stoffen der Fettreihe. Arch. f. exp. P. u. Pharm. 46, 1901.

Nachdem das Schicksal des Isopropylalkohols am normalen Tier sichergestellt war, ging ich daran, eine Reihe von Stoffen, die allgemein als auf den Stoffwechsel wirksam angesehen werden, wie Jodnatrium, Chinin u. dgl., sowie die Produkte endokriner Drüsen und mit denselben zusammenhängende Körper, wie Adrenalin, Pituglandol, Oxyphenyläthylamin, Histamin usw., in ihrem Einfluß auf die Oxydation des Isopropylalkohols zu untersuchen. Die Versuche wurden so ausgeführt, daß an einem Tage die normale Oxydationsfähigkeit bestimmt wurde und sodann nach einem Ruhetag der betreffende Körper dem gleichen Tier subcutan neben Isopropylalkohol gereicht wurde. Obwohl ich die Versuche, die Monate in Anspruch nahmen, vielfach variierte, ließ sich irgendein sicherer Einfluß all der genannten Körper auf die Alkohol oxydation nicht nachweisen, was mit persönlichen Erfahrungen über die Rolle solcher Stoffe für die Oxydation von Purinkörpern<sup>1)</sup> in einem Gegensatz steht. Oft verliefen die Versuche bei Wiederholung im entgegengesetzten Sinne oder brachten Werte, die innerhalb der normalen Schwankungen liegen. Als Beispiel hierfür nur folgende Zahlen: Ein Hund, der nach 3 ccm Isopropylalkohol 0,241 Aceton, auf Isopropylalkohol berechnet, und keinen Isopropylalkohol ausschied, d. i. = 10% des Gereichten, liefert nach 3 mg Adrenalin subcutan + 3 ccm Isopropylalkohol 0,3143 Aceton und Isopropylalkohol.

Ein zweites Tier, 3500 g, liefert in der Norm 9,1% im Exhalat, nach 3 mg Adrenalin plus Isopropylalkohols 15%, nach 4 mg Adrenalin 11,7%.

Ein Normalkaninchen liefert nach 3 ccm Isopropylalkohol 9,4% in der Ausatemluft, nach 0,868 JNa + 2 H<sub>2</sub>O = 0,25 JNa p. K. 15,1% Isopropylalkohol im Exhalat.

Ein nächstes Tier, 2800 g, liefert normal 14,8% Isopropylalkohol im Exhalat, nach 0,86 JNa 14,3%.

Nach Pituglandol fand ich eine Ausscheidung von 18%, nach Histamin von 12%, also Werte, die alle noch in das Normalbereich von 20% fallen.

Um festzustellen, ob dem Isopropylalkohol ein besonderer Einfluß auf den Eiweißstoffwechsel zukommt, habe ich einen großen Hund (über 10 Kilo schwer), der sich bei gleichmäßiger Nahrung im Stickstoffgleichgewicht befand, auf einmal 20 ccm Isopropylalkohol in 150 ccm gelöst gegeben und die Gesamtstickstoffwerte im Harn bestimmt.

2tägiger Stickstoff im Harn vor dem Versuch . . . . . 4,52 g

Nach der Reichung des Alkohols . . . . . 5,20 g

Von einer nennenswerten Änderung des Eiweißumsatzes kann selbst bei dieser kräftigen Dosis nicht die Rede sein.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. 78, 200. 1916, Über Purinstoffwechsel nach Giften.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität in Wien.)

## Über die durch Schockgifte erzeugten Zirkulationsstörungen.

### II. Das Verhalten der überlebenden Leber.

Von

**Hans Mautner und Ernst P. Pick.**

(Mit Unterstützung der Fürst Liechtenstein-Spende.)

(Eingegangen am 23. September 1921.)

In einer früheren Mitteilung<sup>1)</sup> haben wir darauf hingewiesen, daß die Wirkung gewisser Stoffe, die wir als Schockgifte bezeichnet haben, im wesentlichen durch das Verhalten der Leber bedingt wird. Dazu führt uns vor allem die Beobachtung, daß bei Karnivoren, insbesondere bei Hunden, die Leber nach Pepton, Histamin und der Anaphylaxievergiftung, welche einen plötzlichen Blutdruckabfall bedingen, gegen die Norm mächtig vergrößert und strotzend mit Blut erfüllt ist. Die Herbivorenleber zeigt dagegen in der Regel keine derartige Vergrößerung, und der Blutdruck steigt häufig kräftig an. Die Analyse dieser Erscheinungen wurde sowohl am lebenden Tier, wie auch an überlebenden Organen in Durchblutungsversuchen durchgeführt und leitete zu dem Schlusse, daß die Schockgifte als Krampfgifte der glatten Muskulatur im allgemeinen und der Gefäßmuskulatur der Leber-, Darm- und Lungengefäße im besonderen durch Verschuß der Abflußwege in der Karnivorenleber eine mangelhafte Füllung des rechten Herzens mit nachfolgendem Blutdrucksturz bedingen. In anderen Fällen, wie z. B. beim Kaninchen, fehlt den Lebergefäßen die Fähigkeit, auf Schockgifte in dieser Weise zu reagieren, und das Vergiftungsbild wird durch den Krampf in anderen Capillargebieten, vor allem jener der Pulmonalgefäße, beherrscht. Schließlich gibt es Tiergattungen, bei denen durch die Kontraktion der glatten Muskulatur anderer Organe, wie der Bronchialmuskulatur der Meerschweinchen, die tödliche Vergiftung entsteht. Zum Vergleich mit diesen Giften untersuchten wir gleichzeitig

---

<sup>1)</sup> Mautner und Pick, Münch. med. Wochenschr. 1915, Nr. 34, S. 1141.



die Wirkung des Adrenalins auf die verschiedenen Capillargebiete an lebenden und überlebenden Organen, insbesondere an der Leber, Mittlerweile sind unsere Versuchsergebnisse in bezug auf die Bedeutung der Leber 2 Jahre später durch die Arbeiten von R. Weil<sup>1)</sup> und von Eggleston<sup>2)</sup> bestätigt worden.

Die von uns bisher aus äußeren Gründen nicht mitgeteilten Versuche mögen hier zum kleinen Teil schon deswegen Platz finden, weil seither unsere damaligen Ergebnisse anderen Autoren als Grundlage zu weiteren Beobachtungen dienten. Andererseits haben die Arbeiten englischer Autoren, wie jene von Bayliss und seinen Mitarbeitern, sowie auch von Dale und seinen Schülern über den traumatischen Schock und ähnliche Zustände, wichtige Aufschlüsse über den Mechanismus, der zur Blutdrucksenkung führt, erbracht, wobei sie nach ausgedehnter Gewebszertrümmerung die Entstehung von Stoffen annehmen, die dem Histamin ähnlich wirken. Insbesondere waren es Dale und Richards<sup>3)</sup>, die in großen Untersuchungsreihen die Wirkungsweise des Histamins auf verschiedene Capillargebiete der Katze studierten. Sie nehmen an, daß Histamin sowohl Vasokonstriktion als auch Vasodilatation herbeiführe, daß jedoch die Vasokonstriktion ausschließlich an den Arterien, die Vasodilatation an den Capillaren einsetze. Der durch Histamin an der Katze erzeugte Schock wird nach Dale und Laidlaw<sup>4)</sup> bei rascher intravenöser Injektion größerer Dosen im wesentlichen durch Kontraktion der Lungen- und Eingeweidearterien bedingt, bei langsamer Injektion kleiner Dosen dagegen durch allgemeine Erweiterung der Capillaren und Plasmaverlust aus den Gefäßen infolge von Endothelveränderungen erzeugt. Durch die Stauung des Blutes in den Capillaren und kleinsten Venen erhalte das Herz zu wenig Blut und laufe leer. Während also nach unseren Untersuchungen hauptsächlich durch die Verengung der Abflußwege der Leber und des Krampfes der Pulmonalgefäße das Leerlaufen des Herzens bedingt würde, verlegen Dale und Laidlaw die Hauptwirkung der Schockgifte in das erweiterte periphere Capillargebiet.

Die folgenden, hauptsächlich an Hunden und Meerschweinchen, ferner an Affen, Katzen und Kaninchen ausgeführten Versuche mögen zur Klarstellung dieser Probleme beitragen. Da außerdem gerade die Kreislaufverhältnisse der Leber für mannigfaltige Fragen des Stoff-

---

<sup>1)</sup> Journ. of immunol. **2**, 525. 1917; zit. nach Zentralbl. f. Bioch. u. Biophys. **21**, 533. 1919.

<sup>2)</sup> Journ. of immunol. **2**, 571. 1917; zit. nach Zentralbl. f. Bioch. u. Biophys. **21**, 534. 1919.

<sup>3)</sup> Journ. of physiol. **52**, 110. 1919.

<sup>4)</sup> Journ. of physiol. **52**, 355. 1919.

wechsels [Hofmeister<sup>1)</sup>, E. Neubauer<sup>2)</sup>, Masing<sup>3)</sup>, Bang und Tenström<sup>4)</sup>, Fröhlich und Pollak<sup>5)</sup>, Elias und Sammartino<sup>6)</sup>] in den Vordergrund biochemischer Studien gerückt sind, erscheint uns auch von diesen Gesichtspunkten aus die Mitteilung unserer einschlägigen Versuche wünschenswert.

### Methodik.

Die Technik unserer Durchströmungsversuche, über die allein wir hier berichten wollen, bestand darin, daß das Tier meist in Äthernarkose aus der Carotis entblutet und durch die in der Jugularis externa eingebundene Kanüle mit Ringer oder Tyrodelösung solange durchspült wurde, bis die Leber blutfrei war. Hierauf wurde in situ in die Vena portae eine mit Flüssigkeit gefüllte Kanüle eingebunden, die mittels Gummiverbindungen mit drei Mariottschen Flaschen vereinigt war. Letztere enthielten in Ringer oder Tyrode gelöst die zur Durchströmung verwendeten Substanzen, also verschiedene Sera, Witte-Pepton, Histamin, Adrenalin, Amylnitrit, Natrium nitrosum, Bariumchlorid, Pilocarpin, Atropin, sowie die Kontrolle, Ringer- oder Tyrodelösung. Die Ausflußkanüle wurde durch die Vena cava in die Vena hepatica eingeführt. Die Arteria hepatica wurde abgebunden, da sich für unsere Versuche der Einfluß ihres Stromgebietes bald als nebensächlich erwies. Nachdem alle Verbindungen in situ hergestellt worden waren, wurde die Leber unter sorgfältigster Schonung ihrer Oberfläche von ihrer Umgebung gelöst und in ein mit Ringer oder Tyrode gefülltes Wasserbad, dessen Temperatur konstant auf 38–39° gehalten wurde, auf Wattebäusche gelagert. Die Mariottschen Flaschen waren in einer Höhe von 7–10 cm über der Ausflußkanüle angebracht. Die Ausflußmengen wurden entweder durch Zählen der ausfließenden Tropfen innerhalb einer halben oder einer Minute oder durch Bestimmung der Zeit festgestellt, in der 10 resp. 40 ccm Flüssigkeit ausströmten. Einige Versuche wurden mit einem modifizierten Embdenschen Durchströmungsapparat ausgeführt, wobei die Leber in einem Onkometer lag, so daß das Volumen graphisch festgehalten und die Ausflußmengen gleichzeitig gemessen werden konnten.

1) Nothnagel vortrag. Urban & Schwarzenberg 1913.

2) Diese Zeitschr. **43**, 335. 1912; **52**, 118. 1913.

3) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **69**, 431. 1912.

4) Diese Zeitschr. **50**, 437. 1913.

5) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **77**, 265. 1914.

6) Diese Zeitschr. **117**, 10. 1921.

**A. Versuche an Hunden.**

**Versuch 1 vom 30. VII. 1914.**

Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausflußzeit für 40 ccm	Bemerkungen
6 <sup>h</sup> 7'	Ringer mit gerin- gem Blutzusatz	65 Sekunden	
6 <sup>h</sup> 10'		60 ..	
6 <sup>h</sup> 11'		66 ..	
6 <sup>h</sup> 12'	2 g Wittepepton in 60 ccm Ringer	40 ..	
6 <sup>h</sup> 15'		81 ..	
6 <sup>h</sup> 18'		Langsames Tropfen, plötzlich wieder rasches Stömen	Enorme Stauung, die Leber stellt sich direkt auf und fällt gleich wieder zusammen
6 <sup>h</sup> 20'		47 Sekunden	
6 <sup>h</sup> 23'		44 ..	

**Versuch 2 vom 3. XII. 1914.**

Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausflußzeit für 10 ccm	Zeit	Durch- strömungs- zeit	Aus- flußzeit für 10 ccm	Bemer- kungen
5 <sup>h</sup> 30'	Ringer	27 Sekunden	5 <sup>h</sup> 55 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		63 Sek.	
5 <sup>h</sup> 31'		27 ..	5 <sup>h</sup> 58'	Ringer	32 ..	
5 <sup>h</sup> 33'		34 ..	5 <sup>h</sup> 59'		27 ..	
5 <sup>h</sup> 34'		34 ..	6 <sup>h</sup> 1'		33 ..	
5 <sup>h</sup> 36'		33 ..	6 <sup>h</sup> 18'		34 ..	
5 <sup>h</sup> 36 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '	5 g Wittepep- ton in 100 ccm Ringer		6 <sup>h</sup> 19'			
5 <sup>h</sup> 38'		85 ..	6 <sup>h</sup> 20'	1%o Bari- umchlorid in Ringer		
5 <sup>h</sup> 41'		85 ..	6 <sup>h</sup> 21'		7 Min.	
5 <sup>h</sup> 43'		69 ..	6 <sup>h</sup> 23'		∞	
5 <sup>h</sup> 45'		65 ..	6 <sup>h</sup> 26'	Ringer		
5 <sup>h</sup> 46 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '	Ringer		6 <sup>h</sup> 26 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '	1%o Natrium- nitrit in Ringer		
5 <sup>h</sup> 48'		35 ..				
5 <sup>h</sup> 49'		27 ..				
5 <sup>h</sup> 50'		26 ..	6 <sup>h</sup> 40'		3 Tropfen in d. Min.	
5 <sup>h</sup> 52'		28 ..			3'26 Sek.	Leber er- holt sich
5 <sup>h</sup> 54'	3 g Wittepep- ton in 100 ccm Ringer		6 <sup>h</sup> 45'			

**Versuch 3 vom 10. XII. 1914.**

Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausflußzeit für 10 ccm	Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausflußzeit für 10 ccm
5 <sup>h</sup> 51'	Ringer		6 <sup>h</sup> 14'	1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> mg Adren. in 100 ccm Ringer.	
5 <sup>h</sup> 54'		57 Sekunden			
5 <sup>h</sup> 57'		60 ..			
6 <sup>h</sup>		64 ..	6 <sup>h</sup> 15'		5 Minuten
6 <sup>h</sup> 3'		68 ..	6 <sup>h</sup> 21'		2 Min. 30 Sek.
6 <sup>h</sup> 13'		68 ..	6 <sup>h</sup> 32'		1 .. 18 ..

## Fortsetzung des Versuchs 3.

Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausflußzeit für 10 ccm	Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausflußzeit für 10 ccm
6h 34'	2½ mg Adrenalin in 100 ccm Ringer	1 Min. 15 Sek.	6h 43'	1% Bariumchlorid in Ringer	1 Minute
6h 37'			6h 45'		1 "
6h 38'			6h 46'		
6h 39'	Ringer	1 " 13 "	6h 50'		2 Min. 5 Sek.
			6h 55'		1 " 13 "

## Versuch 4 vom 15. XII. 1914.

5h 32'	Ringer		5h 48'		2 Min. 45 Sek.
5h 36'		52 Sekunden	5h 55'		2 " 45 "
5h 42'		58 "	5h 57'	Ringer	
5h 43'	5% Wittepepton in Ringer		6h 3'		1 " 15 "
5h 44½'		2 Min. 15 Sek.	6h 6'		1 " 15 "
			6h 7½'		1 " 4 "

## Versuch 5 vom 21. XII. 1914.

4h 14'		67 Sekunden	4h 34½'		1 Min. 28 Sek.
4h 15'		69 "	4h 37'		1 " 31 "
4h 16'	5% Wittepepton in Ringer		4h 41'		1 " 47 "
				4h 43'	1 mg Adrenalin in 100 ccm Ringer
4h 17'		1 Min. 44 Sek.			
4h 20'		1 " 47 "			
4h 23'		1 " 59 "	4h 43½'		2 " 16 "
4h 27'		2 " 5 "	4h 45'		3 " 5 "
4h 30½'		2 " 11 "	4h 46'		3 Minuten
4h 33'	Ringer				

## Versuch 6 vom 18. XII. 1914.

4h 15'	Ringer	37 Sekunden	4h 34'		59 Sekunden	
4h 16'		37 "	4h 37'		51 "	
4h 18'	1½ g Kochsalz in 100 ccm Ringer		4h 49'	Ringer	56 "	
				4h 52'		54 "
				4h 55'		54 "
4h 19'		27 "	4h 57'		52 "	
4h 20'		30 "	4h 58'	1% Wittepepton in Ringer		
4h 21'		32 "				
4h 22'	2 g Kochsalz in 100 ccm Ringer		5h		56 "	
				5h 2'		62 "
				5h 5'		60 "
4h 24'		40 "	5h 7'		62 "	
4h 25'		44 "	5h 8'	5% Wittepepton in Ringer		
4h 26'		54 "				
4h 29'		58 "	5h 9½'		68 "	
4h 30'	4 g Kochsalz in 100 ccm Ringer		5h 11'		100 "	
				5h 14'		100 "
				5h 17'		93 "
4h 31'		59 "				

## Versuch 7 vom 7. I. 1915.

Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausflußzeit für 10 ccm	Bemerkungen
4 <sup>h</sup> 42'	Tyrode	24 Sekunden	
4 <sup>h</sup> 43'		25 "	
4 <sup>h</sup> 45'		25 "	
4 <sup>h</sup> 46'	5 <sup>o</sup> / <sub>100</sub> Wittepepton in Tyrode		
4 <sup>h</sup> 46 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		28 "	
4 <sup>h</sup> 47'		1 Min. 5 Sek.	
4 <sup>h</sup> 40'		54 Sekunden	
4 <sup>h</sup> 50'		48 "	
4 <sup>h</sup> 53'		46 "	
4 <sup>h</sup> 54 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '	Tyrode		
4 <sup>h</sup> 55 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		24 "	
4 <sup>h</sup> 57'		23 "	
5 <sup>h</sup> 12'		34 "	
5 <sup>h</sup> 13 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		34 "	
5 <sup>h</sup> 14'	1 mg Histamin in 100ccm Tyrode		
5 <sup>h</sup> 15'		1 Min. 5 Sek.	Zufluß aus der Mariott'schen Flasche sehr rasch, Abfluß aus der Leber langsam
5 <sup>h</sup> 16 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		3 " 35 "	
5 <sup>h</sup> 20'	Tyrode		
5 <sup>h</sup> 21 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		46 Sekunden	
5 <sup>h</sup> 24'		38 "	
5 <sup>h</sup> 25 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		37 "	
5 <sup>h</sup> 27'		38 "	
5 <sup>h</sup> 28'	1 mg Histamin in Tyrode		
5 <sup>h</sup> 28 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		45 "	
5 <sup>h</sup> 30'		50 "	
5 <sup>h</sup> 32'		44 "	
5 <sup>h</sup> 33 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		45 "	
5 <sup>h</sup> 34 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '	Tyrode		
5 <sup>h</sup> 42'		49 "	
5 <sup>h</sup> 44'		50 "	
4 <sup>h</sup> 45'		50 "	

## Versuch 8 vom 11. I. 1915.

4 <sup>h</sup> 30'	Tyrode		
4 <sup>h</sup> 32'		40 Sekunden	
4 <sup>h</sup> 33 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		32 "	
4 <sup>h</sup> 35'		35 "	
4 <sup>h</sup> 35 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '	1 <sup>o</sup> / <sub>100</sub> Wittepepton in Tyrode		
4 <sup>h</sup> 36'		35 "	
4 <sup>h</sup> 37'		33 "	
4 <sup>h</sup> 38'		33 "	
4 <sup>h</sup> 38 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '	3 <sup>o</sup> / <sub>100</sub> Wittepepton in Tyrode	Sofort stoppt der Aus- fluß und sistiert durch 6 Min. einzelne Tropfen plötzlich rascher Aus- fluß (17 Sek.).	Aus der Mariott'schen Flasche strömt Flüssigkeit rasch nach. Die Leber schwillt mächtig an.
4 <sup>h</sup> 44'			
4 <sup>h</sup> 45'			
4 <sup>h</sup> 46'		33 Sekunden	

## Fortsetzung des Versuchs 8.

Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausflußzeit für 10 ccm	Bemerkungen	
4 <sup>h</sup> 47'	Tyrode	35 Sekunden		
4 <sup>h</sup> 48'				
4 <sup>h</sup> 49'	5 <sup>o</sup> / <sub>10</sub> Wittepepton in Tyrode	36 ..		
4 <sup>h</sup> 50'				
4 <sup>h</sup> 51'		37 ..		
4 <sup>h</sup> 53'		45 ..		
4 <sup>h</sup> 55'		50 ..		
4 <sup>h</sup> 57'		55 ..		
4 <sup>h</sup> 58'		Tyrode		
4 <sup>h</sup> 58 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '			54 ..	
5 <sup>h</sup> 1 <sup>'</sup> / <sub>2</sub> '			46 ..	
5 <sup>h</sup> 4'			44 ..	
5 <sup>h</sup> 5 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '	5 <sup>o</sup> / <sub>10</sub> Wittepepton in Tyrode	46 ..		
5 <sup>h</sup> 7 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		47 ..		
5 <sup>h</sup> 8 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '				
5 <sup>h</sup> 10'		60 ..		
5 <sup>h</sup> 12'		71 ..		
5 <sup>h</sup> 15'		90 ..		
5 <sup>h</sup> 17'		93 ..		
5 <sup>h</sup> 20'		Tyrode		
5 <sup>h</sup> 21'			81 ..	
5 <sup>h</sup> 23'			73 ..	
5 <sup>h</sup> 25'		70 ..		
5 <sup>h</sup> 28 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '	1mg Adrenalin in 100 ccm Tyrode	70 ..		
5 <sup>h</sup> 36'		85 ..		
5 <sup>h</sup> 39'		81 ..		
5 <sup>h</sup> 40'				Leber bleibt klein, der Zufluß aus der Mariottschen Flasche und der Abfluß aus der Leber langsam
5 <sup>h</sup> 41'			2 Min. 59 Sek.	
5 <sup>h</sup> 44'			8 .. 45 ..	Abfluß nimmt nach und nach ab
5 <sup>h</sup> 54'		Tyrode		
5 <sup>h</sup> 56'			5 .. 37 ..	
6 <sup>h</sup> 6'			2 .. 55 ..	
6 <sup>h</sup> 10'		1mg Adrenalin in 100 ccm Tyrode		
6 <sup>h</sup> 15'		9 .. 40 ..	Zufluß aus der Mariottschen Flasche und Ablauf aus der Leber langsam	
6 <sup>h</sup> 29'	1 <sup>o</sup> / <sub>10</sub> Papaverin in Tyrode			
6 <sup>h</sup> 31'		5 .. 7 ..		
6 <sup>h</sup> 38'		5 .. 30 ..		

## Versuch 9 vom 15. I. 1915.

Zeit	Durchströmungsflüssigkeit	Ausflußzeit für 10 ccm
5 <sup>h</sup> 40'	1mg Histamin in 100 ccm Tyrode	50 Sekunden
5 <sup>h</sup> 42'		50 ..
5 <sup>h</sup> 47'		51 ..
5 <sup>h</sup> 48'		

## Fortsetzung des Versuchs 9.

Zeit	Durchströmungsflüssigkeit	Ausflußzeit für 10 ccm	
5 <sup>h</sup> 49'		3 Min. 2 Sek.	
5 <sup>h</sup> 52'		2 " 45 "	
5 <sup>h</sup> 55'		2 " 27 "	
5 <sup>h</sup> 59'	Tyrode		
6 <sup>h</sup>		1 " 10 "	
6 <sup>h</sup> 2'		58 "	
6 <sup>h</sup> 3'		56 "	
6 <sup>h</sup> 4'	3% Wittepepton in Tyrode		
6 <sup>h</sup> 5'		59 "	
6 <sup>h</sup> 7'		1 " 4 "	
6 <sup>h</sup> 9'		1 " 5 "	
6 <sup>h</sup> 11'	1 mg Histamin in 100 ccm Tyrode		
6 <sup>h</sup> 12'		3 " 27 "	
6 <sup>h</sup> 16'		2 " 48 "	
6 <sup>h</sup> 19'	Tyrode		
6 <sup>h</sup> 21'		1 " 37 "	
6 <sup>h</sup> 24'		1 " 29 "	
6 <sup>h</sup> 28'		1 " 35 "	
6 <sup>h</sup> 31'		1 " 45 "	
6 <sup>h</sup> 33'	1 mg Adrenalin in 100 ccm Tyrode	12 " 30 "	ungerechnet aus 2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> ccm, die in 3' 7" abfließen
6 <sup>h</sup> 40'	Tyrode		
6 <sup>h</sup> 50'		5 " 49 "	
6 <sup>h</sup> 55'		6 " "	ungerechnet aus 2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> ccm
7 <sup>h</sup>	1 g Natrium nitrosum in 100 ccm Tyrode		
7 <sup>h</sup> 1'		4 " 20 "	
7 <sup>h</sup> 6'		4 " 4 "	
7 <sup>h</sup> 11'	1 mg Adrenalin in 100 ccm Tyrode		
7 <sup>h</sup> 12'		12 " 40 "	ungerechnet aus 2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> ccm
7 <sup>h</sup> 16'	Tyrode		
7 <sup>h</sup> 18'		20 "	ungerechnet aus 2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> ccm
7 <sup>h</sup> 24'	1 g Natrium nitrosum in 100 ccm Tyrode		
7 <sup>h</sup> 26'		17 " 20 "	ungerechnet aus 2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> ccm

## Versuch 10 vom 19. I. 1915.

Zeit	Durchströmungsflüssigkeit	Ausflußzeit für 10 ccm	Bemerkungen
5 <sup>h</sup> 15'	Tyrode	18 Sekunden	
5 <sup>h</sup> 17'		18 "	
5 <sup>h</sup> 18'		18 "	
5 <sup>h</sup> 19 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		18 "	
5 <sup>h</sup> 20'	3% Wittepepton in Tyrode		
5 <sup>h</sup> 20 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		17 "	Durchfluß sistiert auf Sekunden

Fortsetzung des Versuchs 10.			Versuch 11 vom 21. I. 1915.		
Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausflußzeit für 10 ccm	Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausflußzeit für 10 ccm
5 <sup>h</sup> 21 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '	Tyrode	21 Sekunden	5 <sup>h</sup> 8'	Tyrode	30 Sekunden
5 <sup>h</sup> 47'		32 ..	5 <sup>h</sup> 9'		30 ..
5 <sup>h</sup> 48 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		28 ..	5 <sup>h</sup> 10'	5% Wittepep- ton in Tyrode	
5 <sup>h</sup> 50'		25 ..			3 Min. 30 Sek.
5 <sup>h</sup> 53'					2 .. 20 ..
5 <sup>h</sup> 54'	1 mg Histamin in 100 ccm Tyrode		5 <sup>h</sup> 11'		
			5 <sup>h</sup> 16'	Tyrode	
			5 <sup>h</sup> 19'		1 .. 27 ..
5 <sup>h</sup> 54 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		52 ..	5 <sup>h</sup> 20'		44 Sekunden
5 <sup>h</sup> 55'		1 Min. 17 Sek.	5 <sup>h</sup> 22'		38 ..
5 <sup>h</sup> 57'		2 .. 7 ..	5 <sup>h</sup> 24'	5% Wittepep- ton in Tyrode	
6 <sup>h</sup> 3'	Tyrode		5 <sup>h</sup> 25'		
6 <sup>h</sup> 5'		1 ..	5 <sup>h</sup> 27'		1 Min. 38 Sek.
6 <sup>h</sup> 7'		55 Sekunden	5 <sup>h</sup> 29'		1 .. 32 ..
6 <sup>h</sup> 11'		50 ..	5 <sup>h</sup> 33'	Tyrode	
6 <sup>h</sup> 21'		30 ..	5 <sup>h</sup> 35'		36 Sekunden
6 <sup>h</sup> 24'		27 ..	5 <sup>h</sup> 36'	1 mg Histamin in 100 ccm Ty- rode	
6 <sup>h</sup> 26'	1 mg Adrenalin in 100 ccm Tyrode				
		27 ..	5 <sup>h</sup> 37'		3 Min. 39 Sek.
6 <sup>h</sup> 27 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		1 Min. 9 Sek.	5 <sup>h</sup> 42'		2 .. 7 ..
6 <sup>h</sup> 33'		4 .. 6 ..	5 <sup>h</sup> 46'	Tyrode	
6 <sup>h</sup> 34'	Tyrode		5 <sup>h</sup> 54'		28 Sekunden
6 <sup>h</sup> 40'		5 .. 30 ..	5 <sup>h</sup> 55'	1 mg Adrenalin in 100 ccm Ty- rode	
6 <sup>h</sup> 48'		2 .. 30 ..			
6 <sup>h</sup> 50'		1 .. 30 ..	5 <sup>h</sup> 56'		2 Min. 60 Sek.
			6 <sup>h</sup>		4 .. 23

Versuch 12 vom 9. VII. 1914. Leber im Emdenschen Durchblutungs-  
apparat und Onkometer. Hund am 23. VI. 1914 durch subcutane Injektion von  
3 ccm Pferdeserum sensibilisiert. Durchströmung mit defibriniertem Eigenblut  
+ Ringer. Temperatur im Onkometer 35,5°. Druck 35—40.

Zeit	Durchströmungsflüssigkeit	Ausflußzeit für 40 ccm	Bemerkungen
4 <sup>h</sup> 44'	Defibr. Blut + Ringer	57 Sekunden	
4 <sup>h</sup> 47'		57 ..	
4 <sup>h</sup> 49'	Zusatz von 50 ccm Rinder- serum		Kurve unverändert
4 <sup>h</sup> 53'	Zusatz von 50 ccm Pferde- serum		
4 <sup>h</sup> 54'	Zusatz von 50 ccm Pferde- serum		Kurve steigt steil an
4 <sup>h</sup> 56'		1 Min. 19 Sek.	
5 <sup>h</sup> 1'		1 .. 5 ..	
5 <sup>h</sup> 7'		59 Sekunden	Kurve wieder abgefallen

Versuch 13 vom 14. VII. 1914. Hunde am 25. VI. durch subcutane Injektion  
von 3 ccm Pferdeserum sensibilisiert. Leber im Onkometer im Emdenschen  
Durchblutungsapparat. Druck 35—55.



Zeit	Durchströmungsflüssigkeit	Ausflußzeit für 40 ccm	Bemerkungen
5 <sup>h</sup> 6'	600 ccm defibriniert. Eigenblut	65 Sekunden	
5 <sup>h</sup> 30'		42 "	
5 <sup>h</sup> 32'	Zusatz von 100 ccm Rinderserum		
5 <sup>h</sup> 34'		46 "	Kurve unverändert
5 <sup>h</sup> 36'	Zusatz von 100 ccm Pferdeserum		
5 <sup>h</sup> 38'		2 Min. 30 Sek.	Kurve steigt steil an
5 <sup>h</sup> 51'		38 Sekunden	
5 <sup>h</sup> 56'	Zusatz von 7 mg Adrenalin		
5 <sup>h</sup> 58'		2 Min. 30 Sek.	

Versuch 14 vom 14. VII. 1914. Leber im Onkometer im Emdenschen Durchblutungsapparat. Druck 30—40. Temperatur im Kasten 42°, im Onkometer 38<sup>1</sup>/<sub>2</sub>°.

Zeit	Durchströmungsflüssigkeit	Ausflußzeit für 40 ccm	Bemerkungen
5 <sup>h</sup> 11'	Defibriniertes Eigenblut + Ringer	34 Sekunden	
5 <sup>h</sup> 13'		37 "	
5 <sup>h</sup> 16'		41 "	
5 <sup>h</sup> 18'	Zusatz von 100 ccm Pferdeserum		
5 <sup>h</sup> 21'		45 "	Kurve unverändert
5 <sup>h</sup> 25'		58 "	

Versuch 15 vom 18. VII. 1914. Leber im Onkometer im Emdenschen Durchblutungsapparat. Temperatur im Onkometer 39,5°. Druck 25—35.

Zeit	Durchströmungsflüssigkeit	Ausflußzeit für 40 ccm	Bemerkungen
4 <sup>h</sup> 56'	Defibriniertes Eigenblut + Ringer	1 Min. 7 Sek.	
4 <sup>h</sup> 58'	Zusatz von 100 ccm Pferdeserum		Kurve unverändert
4 <sup>h</sup> 59'		1 " 2 "	
5 <sup>h</sup> 5'		1 " 4 "	
5 <sup>h</sup> 10'	Zusatz von 5 g Wittepepton	Im Moment des Anstiegs der Kurve wird rasch Blut ausgepreßt Dann langsames Tropfen	Kurve steigt steil an
5 <sup>h</sup> 11'			
5 <sup>h</sup> 15'		2 Min. 56 Sek.	
5 <sup>h</sup> 24'		2 " 40 "	
5 <sup>h</sup> 30'		2 " 40 "	

Diese Versuche zeigen, daß die überlebende Leber des Hundes, mit Ringer oder Tyrode durchspült, sehr gleichmäßige Ausflußzeiten aufweist. Auf Pepton-, noch stärker auf Histaminzusatz zur Durch-

spülungsflüssigkeit tritt erst für Sekunden starkes Ausströmen aus der Leber ein, dann sistiert der Ausfluß gänzlich oder wird doch wesentlich eingeschränkt. Dabei wird der Zufluß nicht gehemmt, was sich aus dem fast unveränderten Abströmen aus den Mariottischen Flaschen feststellen läßt. Die Leber schwillt enorm an, stellt sich nahezu auf, nach kurzem fällt sie wieder zusammen und der Abfluß nimmt zu. Dieses Bild der Leberstauung kann unseres Erachtens nur dadurch erklärt werden, daß im Abflußgebiet der Vena hepatica ein Hemmungsmechanismus durch die angeführten Gifte in Tätigkeit gesetzt wurde, der bewirkt, daß die Flüssigkeit aus der Leber nicht abströmen kann, während das gesamte Gebiet der Portalvenen samt dem Capillarsystem dem Zufluß offen geblieben ist. Infolgedessen wird der Druck in den Lebercapillaren ansteigen, die Capillaren werden erweitert. Erst wenn der Druck durch die nachströmende Flüssigkeit eine solche Höhe erreicht hat, daß er den Hemmungsmechanismus in der Hepatica überwindet, wird plötzlich Flüssigkeit abströmen können und die Leber sinkt zusammen. Schon daraus geht hervor, daß je nach der Stärke der *Vis a tergo* der Verschuß der Lebervenen eine länger oder kürzer dauernde Sperrung des Abflusses bewirken wird. Ähnlich verhält sich die Leber des mit Pferdeserum sensibilisierten Hundes gegen Pferdeserum, während die Leber des nicht vorbehandelten Hundes gegen Pferdeserum ebenso fast völlig refraktär bleibt wie die Leber beider gegen Rinderserum. Wir ersehen daraus, daß gewisse Teile der glatten Muskulatur der Gefäße durch die Vorbehandlung des lebenden Tieres auch im überlebenden Organ überempfindlich geblieben sind, so daß sie mit homologem Serum in Berührung gebracht, in Kontraktion geraten. Allerdings ist hierbei zu erwähnen, daß die hier in Frage kommende Muskulatur der Sperrvorrichtung in der Vena hepatica erst bei relativ hoher Konzentration des artfremden Serums in Funktion tritt; dadurch ist ein, wenn auch nur quantitativer Unterschied gegenüber dem gleichen Phänomen gegeben, welches an der überlebenden Darm- und Uterusmuskulatur von W. H. Schultz<sup>1)</sup> und von H. H. Dale<sup>2)</sup> beobachtet worden ist.

Ganz anders als die Wirkung der Schockgifte ist die des Adrenalins auf die überlebende Leber. Hier sehen wir an der Hundeleber niemals das Bild der gewaltigen Stauung, sondern vielmehr ein Kleinerwerden des Organs. Gleichzeitig damit sehen wir, daß der Zu- und Abfluß stoppt. Wir müssen daher annehmen, daß durch Adrenalin nicht allein der Verschuß der Hepatica herbeigeführt wird, sondern auch der der übrigen Lebergefäße, wie dies schon aus den Versuchen von Bayliss und

<sup>1)</sup> Hyg. lab. bull. Nr. 80, Washington 1912.

<sup>2)</sup> Journ. of pharmacol. a. exp. therap. 4, H. 3. 1913.

Starling<sup>1)</sup>, Schmidt<sup>2)</sup>, Burton - Opitz<sup>3)</sup> an Hundelebern hervorgeht.

Ähnlich wie Adrenalin wirkt Baryt, die Wirkung dieser beiden Substanzen kann durch Natrium nitrosum, in geringerem Grade durch Papaverin aufgehoben werden.

Bekanntlich hat Demoore<sup>4)</sup> eine besondere Empfindlichkeit der Leberzellen gegenüber Schwankungen der Isotonie festgestellt, indem hypotonische Lösungen Quellung und damit Vergrößerung der Leber, hypertontische dagegen Schrumpfung und Verkleinerung bewirken. Da wir nur isotonische und hypertontische Lösungen verwendet haben, kann die von uns festgestellte Peptonwirkung nicht auf Quellung bezogen werden. Den Vergleich der Wirkung hypertontischer Salzlösungen mit Peptonlösungen ermöglicht Versuch 6, in dem sich hypertontische Kochsalzlösungen gegenüber ähnlich konzentrierten Peptonlösungen als nahezu wirkungslos erwiesen.

Auf einen Umstand sei hier noch aufmerksam gemacht. In unseren Durchströmungsversuchen zeigen sich Peptonlösungen, die schwächer konzentriert waren als 3%, kaum wirksam. Indeß ist nicht zu erwarten, daß die gleichen Konzentrationen, die intravital den Blutdrucksturz herbeiführen, auch unter den viel ungünstigeren Bedingungen des überlebenden Organes gleich wirksam sind. Hier mag auch die Tatsache von Einfluß sein, daß bei Durchspülung mit verdünntem Blut die Peptonwirkung viel intensiver war wie mit einfacher Ringerlösung. Auch Dale und Richards<sup>5)</sup> machen darauf aufmerksam, daß die vasodila-

### B. Versuche an Katzen.

Versuch 1 vom 22. VII. 1914. Leber im Embdenschen Durchströmungsapparat im Onkometer.

Zeit	Durchspülungsflüssigkeit	Ausflußzeit für 40 ccm
12 <sup>h</sup> 57'	Ringer mit Zusatz	
1 <sup>h</sup> 7'	Defibrinierten Eigenblutes	53 Sekunden
1 <sup>h</sup> 9'		54 "
1 <sup>h</sup> 10'		65 "
1 <sup>h</sup> 12'	Zusatz von 5 g Wittepepton in 60 ccm Ringer gelöst	
1 <sup>h</sup> 14'		2 Min. 41 Sek.
1 <sup>h</sup> 18'		3 " 46 "
1 <sup>h</sup> 23'		4 " 20 "
1 <sup>h</sup> 26 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '	3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> ccm Amylnitrit	
1 <sup>h</sup> 28'		3 Minuten

1) Journ. of physiol. **16**, 159. 1894.

2) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **126**, 173. 1909.

3) Quart. journ. of exp. physiol. **5**, 309. 1912.

4) Bull. de l'acad. roy. de méd. de Belgique Dezember 1906.

5) a. a. O.

tatorische Wirkung des Histamins bei künstlicher Durchspülung von Katzenorganen nur erzielt wird, wenn die Spülflüssigkeit rote Blutkörperchen und etwas Adrenalin enthalte.

Versuch 2 vom 7. XI. 1914. Durchströmung mit Mariottschen Flaschen

Zeit	Durchspülungsflüssigkeit	Ausflußzeit für 40 ccm
4 <sup>h</sup> 28'	Ringer	1 Min. 9 Sek.
4 <sup>h</sup> 30'		1 " 9 "
4 <sup>h</sup> 32'	5% Wittepepton in Ringer	
4 <sup>h</sup> 33'		1 " 17 "
4 <sup>h</sup> 36'	Ringer	
4 <sup>h</sup> 37'		1 " 24 "
4 <sup>h</sup> 39'		1 " 16 "
4 <sup>h</sup> 45'		1 " 16 "
4 <sup>h</sup> 48'		1 " 22 "
4 <sup>h</sup> 50'		1 " 20 "
4 <sup>h</sup> 52'		1 " 26 "
4 <sup>h</sup> 55'		1 " 22 "
5 <sup>h</sup> 8'		1 " 12 "
5 <sup>h</sup> 12'		1 " 12 "
5 <sup>h</sup> 16'		1 " 18 "
5 <sup>h</sup> 19'	4% Wittepepton in Ringer	
5 <sup>h</sup> 21'		1 " 26 "
5 <sup>h</sup> 25'		1 " 45 "
5 <sup>h</sup> 27'	Ringer	
5 <sup>h</sup> 28'		1 " 24 "
5 <sup>h</sup> 31'		1 " 19 "

Versuch 3 vom 14. I. 1915.

Zeit	Durchspülungsflüssigkeit	Ausflußzeit für 10 ccm
4 <sup>h</sup> 35'	Tyrode	
4 <sup>h</sup> 37'		25 Sekunden
4 <sup>h</sup> 39'		26 "
4 <sup>h</sup> 40'		27 "
4 <sup>h</sup> 41'	3% Wittepepton in Tyrode	
4 <sup>h</sup> 41 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		33 "
4 <sup>h</sup> 42'		36 "
4 <sup>h</sup> 44'		38 "
4 <sup>h</sup> 44 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '	Tyrode	
4 <sup>h</sup> 46'		38 "
4 <sup>h</sup> 49'		40 "
4 <sup>h</sup> 50'	1 mg Histamin in 100 ccm Tyrode	
4 <sup>h</sup> 50 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		55 "
4 <sup>h</sup> 51 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		1 Minute
4 <sup>h</sup> 53'		1 "
4 <sup>h</sup> 56'	Tyrode	
4 <sup>h</sup> 58'		41 Sekunden
4 <sup>h</sup> 59'		41 "
5 <sup>h</sup>	1 mg Adrenalin in 100 ccm Tyrode	
5 <sup>h</sup> 1'		1 Min. 15 Sek.
5 <sup>h</sup> 3'		3 " 21 "

Die hier angeführten Versuche der Durchströmung der Katzenleber sind aus zehn gleichartigen ausgewählt. Sie zeigen fast alle übereinstimmend, daß die Wirkung auf Schockgifte eine geringere ist als beim Hund. Dagegen tritt die Wirkung des Peptons auf die Katzenleber äußerst deutlich dann hervor, wenn zur Durchströmungsflüssigkeit Blut zugesetzt wurde. Es ist somit kein Zweifel, daß auch bei der überlebenden Katzenleber grundsätzlich dieselben Verhältnisse bei der Durchspülung mit Schockgiften Platz greifen wie bei der Hundeleber. Doch scheint die Sperrvorrichtung in den Lebervenen der Katzen weniger empfindlich zu sein wie jene der Hunde. Diese Tatsache erklärt, warum Dale und Richards bei ihren Histaminversuchen an lebenden Katzen eine Lebervergrößerung nicht beobachtet haben.

Gegen Adrenalin verhält sich die Katzenleber ebenso wie die Hundeleber.

C. Versuch am Affen (*Macacus resus*, 3½ kg).

Versuch vom 2. III. 1915. Ausgebreitete miliare Tuberkulose, auch des Peritoneums und der Leber. Leber am Wasserbad, aus Mariottschen Flaschen durchspült.

Zeit	Durchströmungsflüssigkeit	Ausflußzeit für 10 ccm
6h 21'	Tyrode	55 Sekunden
6h 36'	Tyrode	50 „
6h 37'	3% Pepton in Tyrode	
6h 38'		1 Min. 15 Sek.
6h 41'		1 „ 24 „
6h 43'		1 „ 15 „
6h 44'	1 mg Adrenalin in 100 ccm Tyrode	
6h 45'		Ausfluß sistiert
6h 52'		5 Minuten

Ähnlich wie die Katzenleber verhielt sich auch die Affenleber, die mit Pepton und mit Adrenalin durchströmt worden war. Man sieht nach Peptondurchströmung mit Tyrode eine sehr geringe Verlangsamung des Ausflusses, während Adrenalin den Durchfluß unter Verkleinerung des Organes hemmt. Gerade die Wirkung des Adrenalins beweist, daß sich die Affenleber in ihrem ganzen Verhalten mehr den Fleischfressern

## D. Versuche an Meerschweinchen.

Versuch 1 vom 20. VII. 1914. Durchspülung der Leber in situ aus Mariottschen Flaschen. Am 10. VII. 1 ccm Pferdeserum subcutan injiziert.

Versuch 2 vom 21. VII. 1914. Leber am Wasserbad aus Mariottschen Flaschen durchspült.

Zeit	Durchspülungsflüssigkeit	Ausfließende Tropfen in 15 Sek.	Zeit	Durchspülungsflüssigkeit	Ausfließende Tropfen in 15 Sek.
5h 3'	Ringer		11h 8'	Ringer	
5h 5'		42	11h 9'		23
5h 6'		42	11h 12'		24
5h 7'		45	11h 13'		25
5h 8'		42	11h 14'		24
5h 9'		42	11h 15'	5% Wittepepton in Ringer	
5h 9½'	1/3 Pferdeserum + 2/3 Ringer		11h 16½'		27
5h 10'		41	11h 17'		28
5h 11'		42	11h 18'		27
5h 18'	Ringer			Ringer	
5h 20'		42	12h		24
5h 21'		42	12h 1'		23
5h 22'	5% Wittepepton in Ringer		12h 2'	1 mg Adrenalin in 100 ccm Ringer	
5h 22½'		42			23
5h 23'		42	12h 3'		22
5h 24'		42	12h 4'		22
5h 25'		44	14h 5'		21
5h 26'		45	12h 7'		20

nähert als den Pflanzenfressern, wiewohl die überlebende Affenleber den Schockgiften gegenüber nur mit kleinem Ausschlag reagiert, was uns bewogen hat, in der früheren Mitteilung dieselbe in Analogie zu den Lebern der Pflanzenfresser zu setzen.

Versuch 3 vom 22. VII. 1914. Am 10. VII. 1 ccm Pferdeserum subcutan injiziert. Leber aus Mariottschen Flaschen durchspült.

Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausfließende Tropfen in 30 Sek.	Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausfließende Tropfen in 30 Sek.
9 <sup>h</sup> 47'	Ringer	66	10 <sup>h</sup> 2'		59
9 <sup>h</sup> 48'		68	10 <sup>h</sup> 2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '	Ringer	
9 <sup>h</sup> 49'		65	10 <sup>h</sup> 3'		59
9 <sup>h</sup> 51,	1/4 Pferdeserum + 3/4 Ringer		10 <sup>h</sup> 4'		58
9 <sup>h</sup> 53'		64	10 <sup>h</sup> 5'	5% Wittepep- ton in Ringer	58
9 <sup>h</sup> 54'		63	10 <sup>h</sup> 6'		58
9 <sup>h</sup> 55'	Ringer		10 <sup>h</sup> 14'	Ringer	58
9 <sup>h</sup> 59'		58	10 <sup>h</sup> 14 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '	1 mg Adrenalin in 100 ccm Ringer	
10 <sup>h</sup>	1/4 Pferdeserum + 3/4 Ringer	55			
10 <sup>h</sup> 1'		56	10 <sup>h</sup> 16'		61

Versuch 4 vom 23. VII. 1914. Am 10. VII. 1 ccm Pferdeserum subcutan injiziert. Leber aus Mariottschen Flaschen durchspült.

Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausfließende Tropfen in 30 Sek.	Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausfließende Tropfen in 30 Sek.
11 <sup>h</sup> 56'	Ringer	62	12 <sup>h</sup> 9'		47
11 <sup>h</sup> 56 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		62	12 <sup>h</sup> 10'		50
11 <sup>h</sup> 58'		61	12 <sup>h</sup> 10 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '	1/4 Pferdeserum + 3/4 Ringer	
11 <sup>h</sup> 59'	1 mg Adrenalin in 100 ccm Ringer		12 <sup>h</sup> 11'		46
12 <sup>h</sup>		60	12 <sup>h</sup> 12'		44
12 <sup>h</sup> 1'		62	12 <sup>h</sup> 12 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		44

Versuch 5 vom 5. III. 1915. Durchströmung aus der Mariottschen Flasche, 7 cm über der Ausflußöffnung. (Niederer Druck).

Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausfließende Tropfen in 1 Min.	Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausfließende Tropfen in 1 Min.
7 <sup>h</sup> 6'	Tyrode	35	7 <sup>h</sup> 15'		40
7 <sup>h</sup> 7'		34	7 <sup>h</sup> 16'		40
7 <sup>h</sup> 8'		35	7 <sup>h</sup> 18'		39
7 <sup>h</sup> 8 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '	3 g Wittepepton in 100 ccm Ringer		7 <sup>h</sup> 21'	1 mg Adrenalin in 100 ccm Ringer	
7 <sup>h</sup> 9'		37	7 <sup>h</sup> 22'		40
7 <sup>h</sup> 10'		38	7 <sup>h</sup> 23'		30
7 <sup>h</sup> 11'		40	7 <sup>h</sup> 24'		28
7 <sup>h</sup> 12'		40	7 <sup>h</sup> 25'		28
7 <sup>h</sup> 13'		40	7 <sup>h</sup> 26'		28
7 <sup>h</sup> 14'		41	7 <sup>h</sup> 27'		28

## Fortsetzung des Versuch 3.

Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausfließende Tropfen in 1 Min.	Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausfließende Tropfen in 1 Min.
7 <sup>h</sup> 28'	Tyrode	27	7 <sup>h</sup> 40'	3 g Wittepepton in 100 ccm Ringer	
7 <sup>h</sup> 30'					
7 <sup>h</sup> 31'		29			
7 <sup>h</sup> 33'					
	5 g Barium- chlorid in 100 ccm Ringer		7 <sup>h</sup> 41'	5 g Barium- chlorid in 100 ccm Ringer	30
7 <sup>h</sup> 34'		56	7 <sup>h</sup> 42'		22
7 <sup>h</sup> 35'		48	7 <sup>h</sup> 42 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> '		
7 <sup>h</sup> 37'		46	7 <sup>h</sup> 43'		24
7 <sup>h</sup> 38'		44	7 <sup>h</sup> 44'		28
7 <sup>h</sup> 39'	40	7 <sup>h</sup> 45'	26		

Die hier veröffentlichten Protokolle decken sich mit zahlreichen anderen, die aus Raumersparnis nicht mitgeteilt werden. Sie alle zeigen in gleicher Weise, daß die Meerschweinchenleber weder auf Pepton noch im anaphylaktischen Schock irgend eine nennenswerte Veränderung der Durchströmung aufweist. Weder der Zu- noch der Abfluß waren geändert. Aber auch gegen andere Gifte, wie Adrenalin und Baryt, die bei der Kaninchenleber stets den Durchfluß hemmen, bleibt die Meerschweinchenleber nahezu völlig refraktär. Mit Adrenalin, selbst in konzentrierten Lösungen, sieht man hier und da eine leichte Verminderung der Tropfenzahl eintreten. Dagegen bewirken selbst 5proz. Lösungen von Bariumchlorid, die bei den Hundelebern einen mehrere Minuten anhaltenden Krampf der Gefäße erzeugen, nicht nur keine Verengung der Lebergefäße, sondern eher eine Erweiterung, die vielleicht auf das Schrumpfen der Leberzellen zurückgeführt werden kann.

Wir müssen nach diesen Befunden annehmen, daß der Meerschweinchenleber nicht allein eine Vorrichtung, die bei den Carnivoren eine Sperrung der Lebervenen herbeiführt, fehlt, sondern daß ihr auch alle diejenigen Apparate am Gefäßsystem abgehen, an welche Adrenalin- oder Barytlösungen mittelbar oder unmittelbar angreifen. Es läßt sich naturgemäß auf Grund unserer Versuche nicht voraussagen, ob dies am Mangel des entsprechenden Nervenapparates liegt oder ob das Erfolgsorgan, die glatte Muskulatur der Lebergefäße des Meerschweinchens, so mangelhaft entwickelt ist, daß trotz der Gefäßnerven der Reiz ohne Effekt bleibt. Wir erinnern daran, daß auch die Lebergefäße des Frosches, wie Fröhlich und Pollak<sup>1)</sup> fanden, durch Adrenalin und Baryt nicht beeinflußt werden.

<sup>1)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **77**, 265. 1914.

## E. Versuche an Kaninchen.

Versuch 1 vom 21. VII. 1914. Leber aus der Mariott'schen Flasche durchströmt.

Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Zahl der ab- fließenden Tropfen in $\frac{1}{4}$ Min.	Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Zahl der ab- fließenden Tropfen in $\frac{1}{4}$ Min.
1 <sup>h</sup> 4'	Ringer	32	1 <sup>h</sup> 12'		29
1 <sup>h</sup> 6'		30	1 <sup>h</sup> 13'		27
1 <sup>h</sup> 7'		29	1 <sup>h</sup> 15'	1 mg Adrenalin in 100 ccm Ringer	
1 <sup>h</sup> 8'		27			
1 <sup>h</sup> 8 $\frac{1}{2}$ '	5 g Wittepepton in 100 ccm Ringer	27	1 <sup>h</sup> 16'		32
			1 <sup>h</sup> 16 $\frac{1}{2}$ '		31
1 <sup>h</sup> 9'		27	1 <sup>h</sup> 17'	Ringer	32
1 <sup>h</sup> 10'		31	1 <sup>h</sup> 19'		30
1 <sup>h</sup> 11'		31	1 <sup>h</sup> 20'		30

Versuch 2 vom 24. VII. 1914. Anordnung wie oben.

Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Zahl der ab- fließenden Tropfen in $\frac{1}{2}$ Minute	Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Zahl der ab- fließenden Tropfen in $\frac{1}{2}$ Minute
10 <sup>h</sup> 44'	$\frac{1}{3}$ defibriertes Eigenblut + $\frac{2}{3}$ Ringer	57	11 <sup>h</sup> 9'	5 g Wittepepton in 100 ccm Ringer	
10 <sup>h</sup> 46'		60	11 <sup>h</sup> 10'		65
10 <sup>h</sup> 47'		56	11 <sup>h</sup> 10 $\frac{1}{2}$ '		66
10 <sup>h</sup> 47 $\frac{1}{2}$ '	1 mg Adrenalin in 100 ccm obiger Mischung	56	11 <sup>h</sup> 11'		69
			11 <sup>h</sup> 12'		65
10 <sup>h</sup> 48'		48	11 <sup>h</sup> 13'		66
10 <sup>h</sup> 50'		50	11 <sup>h</sup> 54'	Ringer	60
10 <sup>h</sup> 52'		50	11 <sup>h</sup> 55'		57
10 <sup>h</sup> 57'	Ringer	56	11 <sup>h</sup> 56'		56
10 <sup>h</sup> 58'		58	11 <sup>h</sup> 57'		56
10 <sup>h</sup> 59'	1 mg Adrenalin in 100 ccm Ringer		11 <sup>h</sup> 57 $\frac{1}{2}$ '	0.001 g Hista- min in 100 ccm Ringer	
10 <sup>h</sup> 59 $\frac{1}{2}$ '		57	11 <sup>h</sup> 58'		53
11 <sup>h</sup>		56	11 <sup>h</sup> 59'		53
11 <sup>h</sup> 1'		55	12 <sup>h</sup>		57
11 <sup>h</sup> 8'		54			

Zahlreiche, an überlebenden Kaninchenlebern ausgeführte Durchströmungsversuche, von denen einige hier angeführt wurden, haben ergeben, daß die Kaninchenleber sich so verhält wie die Meerschweinchenleber. Durchströmung mit selbst 5proz. Peptonlösungen und konzentrierten Histaminlösungen hatten in der Regel keine Sperre des Abflusses zur Folge. Nur hier und da zeigte sich, wie aus dem Versuch Nr. 4 hervorgeht, daß Histamin auch hier eine vorübergehende Hemmung des Abflusses erzeugt, die aber im Vergleich zu der vollständigen Sperre bei der Hundeleber auf eine nur geringfügige Verengung der Abflüßbahnen hinweist.



Versuch 3 vom 25. VII. 1914. Versuchsanordnung wie oben.

Zeit	Durchströmungsflüssigkeit	Tropfenzahl in 1/4 Min.
10 <sup>h</sup> 40'	Blut + Ringer (warm)	34
10 <sup>h</sup> 42'		32
10 <sup>h</sup> 43'		29
10 <sup>h</sup> 44'		30
10 <sup>h</sup> 45'		30
10 <sup>h</sup> 48'	Sauerstoff durchgeleitet Adrenalin 1:100 000 in Rin- ger mit Blutzusatz	32
10 <sup>h</sup> 49'		34
10 <sup>h</sup> 51'		45
10 <sup>h</sup> 53'		42
10 <sup>h</sup> 56'		62
10 <sup>h</sup> 58'	Adrenalin 1:200 000 in Rin- ger mit Blutzusatz	52
10 <sup>h</sup> 59'		52
11 <sup>h</sup>		52
11 <sup>h</sup> 1'		57
11 <sup>h</sup> 2'		56
11 <sup>h</sup> 3'	Adrenalin 1:33 000 in Ringer mit Blutzusatz	56

Versuch 4 vom 19. II. 1915. Versuchsanordnung wie oben.

Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausflußzeit für 10 ccm in Sek.	Zeit	Durchströmungs- flüssigkeit	Ausflußzeit für 10 ccm in Sek.
6 <sup>h</sup> 19'	Tyrode	31	6 <sup>h</sup> 42'	Tyrode	35
6 <sup>h</sup> 20'			6 <sup>h</sup> 43'		37
6 <sup>h</sup> 21'			6 <sup>h</sup> 45'		41
6 <sup>h</sup> 22'			6 <sup>h</sup> 49'		33
6 <sup>h</sup> 23'			6 <sup>h</sup> 55'		
	1 mg Adrenalin in 100 ccm Tyrode	31	6 <sup>h</sup> 55 1/2'	0.001 g Hista- min in 100 ccm Tyrode	
6 <sup>h</sup> 24'	Tyrode	31	6 <sup>h</sup> 56'	5 g Wittepep- ton in 100 ccm Tyrode	37
6 <sup>h</sup> 25 1/2'		31	7 <sup>h</sup> 58'		80
6 <sup>h</sup> 27'		34	7 <sup>h</sup>		88
6 <sup>h</sup> 28'		31	7 <sup>h</sup> 4'		100
6 <sup>h</sup> 29'		35	7 <sup>h</sup> 6'		60
6 <sup>h</sup> 31'	5 g Wittepep- ton in 100 ccm Tyrode	34	7 <sup>h</sup> 10'	Tyrode	57
6 <sup>h</sup> 32'		34	7 <sup>h</sup> 11'		50
6 <sup>h</sup> 35'		34	7 <sup>h</sup> 12'		
6 <sup>h</sup> 38'		32			
6 <sup>h</sup> 41'					

Auch bei der Durchspülung mit Adrenalin zeigte sich, ähnlich wie bei der Meerschweinchenleber, daß die Lebergefäße des Kaninchens gegen Adrenalin in verschiedenen Konzentrationen unempfindlich sind. Wir sehen im Gegenteil hier und da sogar eine Beschleunigung des Durchflusses, die auf eine Erweiterung der Capillaren zurückgeführt

werden muß, wie sie auch Dale und Richards<sup>1)</sup> bei ihren Katzenversuchen und Fröhlich und Bauer<sup>2)</sup> am Trendelenburgschen Froschpräparat mit sehr verdünnten Adrenalinlösungen sahen.

Von in der Literatur niedergelegten früheren Durchströmungsversuchen mit Adrenalin sind hier jene von Masing<sup>3)</sup> zu nennen, der überlebende Lebern von Kaninchen durchblutet hat. Auch er findet nach Zusatz von Adrenalin zu der aus defibriertem Kaninchenblut bestehenden Durchspülungsflüssigkeit vielfach keine Gefäßwirkung des Adrenalins, was er allerdings auf vorhergehende Blausäure- und Formolvergiftung zurückführt. Aus unseren Versuchen müssen wir schließen, daß das Kaninchen weder eine Sperrvorrichtung in den Lebervenen, noch den für Adrenalin hochempfindlichen Nervenmuskelapparat der Lebergefäße besitzt, über den die Carnivoren verfügen.

#### Zusammenfassung.

Bei den hier angeführten Untersuchungen an der überlebenden Leber ließ sich feststellen, daß die Carnivorenleber bei Durchströmung mit Schockgiften, wie Wittepepton und Histamin oder in der anaphylaktischen Reaktion mit einer Sperrung der Abflußwege in den Lebervenen antwortet, während der Zufluß von den Portalvenen aus unverändert bleibt; infolgedessen schwillt die Leber mächtig an.

Die überlebende Leber des Pflanzenfressers ist gegen diese Einwirkungen unempfindlich, der Zufluß und der Abfluß bleiben in gleicher Weise wie das Lebervolumen unverändert. Auch bei anderen Giften, wie Adrenalin und Bariumchlorid, zeigt sich zwischen der überlebenden Leber der Fleischfresser und der Pflanzenfresser ein wichtiger Unterschied, indem die erstere infolge der Kontraktion des ganzen Gefäßgebietes kleiner wird, wobei Zu- und Abfluß gleichsinnig gehemmt werden, während die letztere keine wesentlichen Größenveränderungen oder Störungen im Zu- und Abfluß aufweist. Nach unseren Versuchen scheint die Fähigkeit der Leber, auf Pharmaka mit einem Gefäßkrampf zu reagieren, in der Reihe Hund, Katze, Affe, Kaninchen, Meerschweinchen abzunehmen.

Wir führen das Sistieren des Durchflusses unter Anschwellung des Organes auf ein Hindernis in den abführenden Gefäßen, also im Bereich der Vena hepatica, zurück, während Adrenalin alle Gefäßbahnen wenigstens in den von uns meist verwendeten Dosen gleichmäßig verengt. Ein Mechanismus, der imstande ist, am überlebenden Organ den Durchfluß unter recht erheblichem Druck auf Minuten völlig aufzuheben, muß auch für die Zirkulationsverhältnisse beim lebenden Tier von größ-

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

<sup>2)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 84, 33. 1918.

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

tem Einfluß sein können. Er erscheint uns ausreichend, um die Blutverteilung im Organismus von Grund aus umzuschalten, die Portalgefäße mit Blut zu überladen und das Herz mangelhaft mit Blut zu versorgen, was bis zum Blutdrucksturz im großen Kreislauf führt. Dem entspricht auch die Erniedrigung des Blutdruckes des Hundes und meistens auch der Katze nach Injektion von Schockgiften, während das Meerschweinchen und oft das Kaninchen darauf Blutdrucksteigerung aufweisen. Die Gründe dieses Verhaltens des Pflanzenfressers konnten wir erst in Untersuchungen am lebenden Tier aufklären. (Kontraktion der Darmgefäße und Wegfall des Stromhindernisses in der Vena hepatica.)

Die von uns aus unseren Tierversuchen gefolgerte Sperrvorrichtung in der Vena hepatica, welche insbesondere gegen jene Gifte hochempfindlich ist, die wir als Schockgifte bezeichnet haben, wurde neuerlich auch anatomisch von Arey und Simonds<sup>1)</sup> nachgewiesen. Sie fanden, daß die Venae hepaticae des Hundes mit kräftiger glatter Muskulatur ausgestattet sind, jene des Kaninchens dagegen, sowie die Portalvenen diese Muskulatur entbehren. Dieser in die Lebervenen des Fleischfressers eingeschaltete Mechanismus besitzt, wie neue Untersuchungen von Lamson und Roca<sup>2)</sup> beweisen, auch unter physiologischen Bedingungen großen Einfluß, indem er den Diffusionsdruck zwischen Blut und Lymphe in der Leber und hiedurch die Menge, Konzentration und Viscosität des Blutes zu regulieren vermag. Damit stimmt auch überein, daß unsere Schockgifte durchaus Lymphagoga erster Ordnung im Sinne Heidenhains sind, und erklärt den Zusammenhang von Lymphbildung und Leber, wie ihn bereits Starling<sup>3)</sup> nachweisen konnte.

Der Mechanismus, den wir bei der Vergiftung des Fleischfressers mit Eiweißderivaten annehmen, unterscheidet sich in einigen wesentlichen Punkten von der Auffassung, die Dale und seine Mitarbeiter in ihren letzten Mitteilungen über Histaminschock auseinandersetzen. Wie schon eingangs erwähnt, sehen sie das auslösende Moment für den Blutdrucksturz in der Erweiterung aller Capillaren und den gleichzeitig einsetzenden Austritt von Plasma aus dem Gefäßsystem in das Gewebe. Auch der von uns angenommene Mechanismus führt notwendigerweise zur Erweiterung der Capillaren, insbesondere im Bereich des Splanchnicusgebietes, jedoch auch in anderen Capillargebieten. Der grundsätzliche Unterschied dieser Auffassungen liegt aber darin, daß nach Dale eine aktive Erweiterung der Capillaren angenommen werden muß, während nach unseren experimentellen Ergebnissen durch Verschuß der Abflußwege in den Lebervenen, ferner auch in den Lungenvenen eine passive Erweiterung und Plasmaverlust durch Rückstauung allein ein-

<sup>1)</sup> Anat. record. **18**, 219. 1920.

<sup>2)</sup> Journ. of pharmacol. a. exp. therap. **17**, H. 6, S. 481. 1921.

<sup>3)</sup> Journ. of physiol. **17**, 30. 1874.

treten kann. Der plötzliche Verschluß der Lebervenen und Lungenvenen erscheint uns als das Primäre und Ausschlaggebende, die Erweiterung der Capillaren erst als das Sekundäre. Es ist einleuchtend, daß durch die plötzliche Sperrung eines großen Teils der Strombahn, wie dies durch die Verengerung der Lebervenen geschieht, der plötzliche Blutdruckabfall völlig erklärt ist, während die Erweiterung des peripheren Capillargebietes und Austritt von Flüssigkeit aus den Gefäßen bei gleichzeitiger Kontraktion der arteriellen Bahnen (Dale) nur zu einer allmählich einsetzenden Blutdruckerniedrigung führen könnte. Außerdem geht aus den experimentellen und histologischen Untersuchungen von A. R. Rich<sup>1)</sup> hervor, daß die Erweiterung der Capillaren im Splanchnicusgebiet und der Blutdruckabfall zeitlich durchaus nicht zusammenfallen und daß sogar während einer Blutdrucksteigerung Erweiterung der Capillaren des Netzes bestehen kann.

Diese unsere Auffassung von der Bedeutung der Sperrvorrichtung in den Lebervenen für den Schock findet eine wesentliche Stütze in den oben mitgeteilten Versuchen an der isolierten überlebenden Leber. Damit decken sich auch die Erfahrungen, daß bei Wegfall dieses Verschlußmechanismus, wie bei Herbivoren, oder bei dessen Ausschaltung, wie bei Hunden mit Eckscher Fistel Schockgifte ein völlig geändertes Vergiftungsbild darbieten und vielfach der Blutdrucksturz sogar in Blutdrucksteigerung umschlägt, während die „umgekehrte“ Ecksche Fistel, bei der das gesamte Blut, auch jenes der Vena cava inferior, durch die Leber geleitet wird, die Schockwirkung verstärkt (Denneke).

Dale äußert Bedenken, daß der Leber die überragende Bedeutung für das Zustandekommen des Schockes zukommt, die wir ihr zusprechen, weil er den Effekt auf den Blutdruck bei Injektion in die Vena portae später auftreten sah als bei Injektion in die Vena cava oder gar in die Aorta. Bei der enormen Wirkung auf die überlebende Leber ist unseres Erachtens ein Zweifel darüber nicht möglich, ob die Leber aktiv in die Veränderungen des Blutkreislaufes eingreift. Die nur Sekunden betragenden Zeitdifferenzen bei Eintreten der Histaminwirkung Dales können auf das verschiedene Einsetzen der anderen sich zusammenschließenden Gefäßgebiete zurückgeführt werden.

Endlich ist zu bemerken, daß die Capillargifte, deren Kenntnis wir Heubner und seinen Schülern verdanken, sich in ihrer Wirkung sehr wesentlich von jener der Schockgifte unterscheiden, wiewohl auch sie eine mächtige Capillarerweiterung und Endothelschädigung verursachen.

#### Schlußsätze.

1. Die Schockgifte (Pepton, Histamin, Anaphylaxie) lösen bei jenen Tierarten (Hund, Katze, Affe), bei denen sie

<sup>1)</sup> Journ. of exp. med. 33, 1, 287. 1921.

einen Blutdrucksturz bewirken, an der überlebenden Leber einen Verschuß der Venae hepaticae mit darauf folgender mächtiger Stauung und Erweiterung der Lebercapillaren aus.

2. Bei jenen Tierarten, bei welchen die Schockgifte im Leben keinen Blutdrucksturz veranlassen (Meerschweinchen, Kaninchen), führen sie an der isolierten Leber keine Sperrung der Lebervenen und keine Leberstauung herbei.

3. Adrenalin und Baryt verengen gleichmäßig das ganze Gefäßgebiet der überlebenden Leber der Carnivoren, so daß Zufluß und Abfluß gleichsinnig gehemmt werden. Auf die Lebergefäße der Herbivoren haben diese beiden Gifte keinen nennenswerten Einfluß.

4. Diese Sperrvorrichtung in den Lebervenen ist für das Auftreten des Schocks von wesentlicher Bedeutung.

# Über die Bedeutung des Calciums für die geringe Empfindlichkeit der Kröte gegen Herzgifte.

Von

**Hermann Wieland.**

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 27. September 1921.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Frage der Unempfindlichkeit der Kröte gegen ihr eigenes Gift und gegen Herzgifte überhaupt ist verschiedentlich Gegenstand experimenteller Untersuchungen gewesen. Dabei wurde gefunden, daß dieses Tier in der Tat eine ziemlich hohe Resistenz gegen Herzgifte besitzt, wenn diese stomachal oder subcutan beigebracht werden. Diese Resistenz kann verschiedene Gründe haben: Durch verzögerte Resorption, durch mangelnde Herzspezifität, d. h. durch vorwiegende Bindung an andere Körperbestandteile, durch Zersetzung oder eine andere entgiftende Reaktion im Stoffwechsel oder endlich durch prompte Ausscheidung könnte die Konzentration des Giftes im Herzen unter der zur Erzielung einer tödlichen Vergiftung erforderlichen Höhe gehalten werden. Es wäre aber auch denkbar, daß das Herz selbst weniger empfindlich ist, daß eine echte „Gewebssimmunität“ vorliegt.

Heuser<sup>1)</sup>, der diese Frage eingehend erörtert, entscheidet sich für die letztere Möglichkeit, daß „die Herzmuskulatur dieser Spezies in ihrer Reaktionsfähigkeit diesen Stoffen (den Herzgiften) gegenüber besonders träge ist“. Er kommt zu diesem Urteil auf indirektem Wege durch experimentelle Ausschaltung der anderen Möglichkeiten, hat aber den direkten Weg, Prüfung der Gifte am ausgeschnittenen Herzen, nicht betreten, weil es ihm nicht gelungen war, das ausgeschnittene Krötenherz schlagend zu erhalten. Ich möchte dazu bemerken, daß die Herstellung eines guten Herzpräparates bei der Kröte in der Tat nicht ganz so einfach ist wie beim Frosch: einmal gerinnt das Krötenblut in der Kanüle sehr viel rascher als das Froschblut, vor allem ist aber das Krötenherz gegen Dehnung sehr empfindlich. Es kommt vor, daß der Ventrikel

---

<sup>1)</sup> Otto Heuser, Arch. internat. de pharmaco-dyn. et de thérap. **10**, 483. 1902.

eine kurze Aufblähung beim Auswaschen mit dauernder tonischer Kontraktur beantwortet.

Fühner<sup>1)</sup> hat die Frage wieder aufgenommen und die Giftigkeit des Krötengiftes für das ausgeschnittene Herz von Kröten und Fröschen untersucht. Die Wirkung auf das Krötenherz ist geringer als die auf das Herz vom Frosch (Gras- und Wasserfrosch), aber deutlich und in gleicher Weise vorhanden. Nun hat Fühner nicht mit dem reinen Gift, sondern mit einem Auszug der Krötenhaut mit Ringerlösung gearbeitet; seine Befunde könnten also, wie schon Abel und Macht<sup>2)</sup> hervorheben, durch die Gegenwart anderer giftiger Stoffe in seinem Extrakt — ich denke z. B. an Seifen — getrübt sein.

Da mir eine kleine Menge des reinen Gifts<sup>3)</sup> zur Verfügung stand, habe ich die Bearbeitung der in mancher Hinsicht interessanten Frage der Herzgiftfestigkeit der Kröte erneut aufgenommen.

In erster Linie sollte die Giftigkeit des Bufotalins bei subcutaner Einspritzung vergleichsweise für Kröte und Frosch festgestellt werden.

Die Versuche wurden nach der zeitlosen Methode von Straub<sup>4)</sup> Ende April angestellt. Die zur Einspritzung bestimmten Lösungen wurden aus einer 0,4 bis 1,0 proz. Stammlösung von Bufotalin durch Verdünnen mit Ringer bereitet. Das Gewicht der Tiere, Kröten und Grasfrösche, lag nahe um 20 g; die Dosen sind auf 1 g Körpergewicht berechnet.

#### Tödliche Dosis von Bufotalin für den Grasfrosch.

Ein Frosch mit 0,0043 mg/1 g überlebt; ebenso alle Tiere mit niedrigeren Dosen.

Ein Frosch mit 0,0051 mg/1 g wird am nächsten Tag tot aufgefunden; Herz in typischer Kontraktur. Alle anderen, mit höheren Dosen behandelten Frösche sind ebenfalls eingegangen; in jedem Fall systolischer Herzstillstand.

Die tödliche Dosis von Bufotalin für 1 g Frosch liegt also zwischen 0,0043 und 0,0051 mg; im Mittel bei 0,0047 mg.

Bei Kröten ist es mir nicht gelungen, die tödliche Bufotalindosis zu finden, weil die geringe Wasserlöslichkeit dieses Stoffes das Überschreiten einer gewissen Dosis verhindert. Eine Kröte, die 0,143 mg/1 g erhalten hatte, war, von einer vorübergehenden Depression, die offenbar dem mit eingespritztem Alkohol zuzuschreiben ist, abgesehen, völlig munter und blieb am Leben. Bufotalin ist für den Grasfrosch mindestens

<sup>1)</sup> Hermann Fühner, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **63**, 374. 1910.

<sup>2)</sup> John J. Abel und David L. Macht, Journ. of pharmacol. a. exp. therap. **3**, 319. 1912.

<sup>3)</sup> Das Präparat, reinstes, krystallisiertes Bufotalin, verdanke ich meinem Bruder Heinrich Wieland. Zur Chemie des Bufotalins vgl. E. St. Faust, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **47**, 278. 1902. — Heinrich Wieland und F. J. Weil, B. **46**, 3315. 1913. — Heinrich Wieland, Sitzungsber. d. Bayr. Akad. d. Wissensch., Math.-physik. Kl. **1920**, S. 329.

<sup>4)</sup> W. Straub, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **80**, 52. 1916.

30 mal so giftig wie für die Kröte; dieses Tier ist also in der Tat gegen sein eigenes Gift sehr wenig empfindlich.

Zur Entscheidung der zweiten Hauptfrage, ob diese geringe Empfindlichkeit daher rührt, daß das Gift nie in höherer Konzentration mit dem Herzen in Berührung kommt, oder ob sie in einer besonderen Eigenart des Herzens selbst ihren Grund hat, wurden zahlreiche Versuche an den Herzen von Kröten und Grasfröschen, einige wenige auch an Wasserfröschen angestellt. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Froscharten hat sich nicht gezeigt; der Wasserfrosch scheint gegen Bufotalin etwas weniger empfindlich zu sein als der Grasfrosch.

Die Versuche wurden nach der Straub'schen Methode in den Monaten September und Mai bis Juni angestellt. Die zur Vergiftung des Herzens bestimmten Lösungen wurden durch Verdünnung einer 0,25 proz. alkoholischen Bufotalinlösung mit Ringer dargestellt.

### A. Froschversuche mit Bufotalin.

Bufotalinkonzentrationen von 1 : 800 000 sind auch bei stundenlanger Einwirkungsdauer unwirksam. Die Konzentration 1 : 400 000 verursachte Rhythmusstörungen, wie man sie bei Digitaliskörpern sieht, Ausfälle von Kammerkontraktionen und Gruppenbildung, in einem Falle 5, in einem anderen 8 Minuten nach der Vergiftung; das erste Herz stand 16, das zweite 26 Minuten nach Einbringung der Giftlösung still. In beiden Fällen war während der Vergiftung eine leichte Erhebung der Kurvenfußpunkte, eine Verminderung der Diastolen, zu bemerken; der Ventrikel blieb in fast erschlafftem Zustand stehen. Ein drittes Herz, das mit Bufotalin in derselben Konzentration vergiftet worden war, schlug nahezu 2 Stunden ohne Rhythmusstörung; etwa 5 Minuten nach der Vergiftung zeigte sich eine allmählich zunehmende Verminderung der Hebelausschläge nach beiden Seiten, aber mehr auf Kosten der Systole.

Ein Herz zeigte 9 Minuten nach der Vergiftung mit Bufotalin 1 : 300 000 Frequenzhalbierung, an die sich bald Ausfälle von noch mehr Kammerkontraktionen anschlossen, so daß sich später typische Lucianische Perioden ausbildeten.

Entsprechend verläuft die Vergiftung des Froschherzens mit höheren Konzentrationen (1 : 200 000 und 100 000), nur daß hier die Erscheinungen, Abnahme der Diastolen, Rhythmusänderungen, Stillstand in Mittelstellung, rascher eintraten. Typisch für das Vergiftungsbild bei der Konzentration 1 : 200 000 ist das Auftreten von Perioden, die sich oft über Stunden ausdehnen können; gelegentlich wird ausgeprägte Herzperistaltik beobachtet. Während, wie oben erwähnt, schon die Konzentration 1 : 400 000 genügen kann, um den Ventrikel stillzustellen, ist dazu in anderen Fällen die doppelte innerhalb der Versuchszeit von



1–2 Stunden nicht ausreichend; sicher tödlich ist die Konzentration 1 : 100 000.

Hohe Konzentrationen (1 : 25 000–10 000) stellen das Herz innerhalb weniger Sekunden still, bisweilen, aber nicht regelmäßig, in extremer tonischer Kontraktur.

### B. Krötenversuche mit Bufotalin.

Am ausgeschnittenen Herzen dieses Tieres bewirken Konzentrationen unter 1 : 100 000 keine erkennbaren Veränderungen; erst bei der Konzentration 1 : 50 000 ist eine geringe Wirkung feststellbar. Unmittelbar nach Einbringen der Giftlösung nehmen die systolischen Ausschläge um etwa  $\frac{1}{4}$ – $\frac{1}{3}$  ab; die Diastole ändert sich nicht. Dieser Zustand bleibt stationär und läßt sich durch Auswaschen des Herzens mit Ringerlösung prompt beseitigen, wie überhaupt die durch Bufotalin am Krötenherzen hervorgerufenen Veränderungen sehr viel leichter und vollständiger reversibel sind als am Froschherzen.

Bufotalin 1 : 25 000 erniedrigt die Hebelausschläge um  $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{2}$ ; auch hier bildet sich in kurzem ein Zustand aus, der über  $\frac{1}{2}$  Stunde — so lange er beobachtet wird — unverändert bleibt. In einem Fall wurden vorübergehend Ventrikelausfälle beobachtet.

Bei der Konzentration 1 : 10 000 ist die plötzliche Abnahme der Systolen noch ausgeprägter; hier macht sich auch eine leichte Abnahme der Diastolen bemerkbar, die aber bald wieder zurückgeht. Sehr schnell treten Rhythmusveränderungen, Frequenzhalbierung und Ausfälle von noch mehr Kammerschlägen auf; in einem Fall wurden nach Vergiftung mit Bufotalin 1 : 8 000 ziemlich typische Lucia nische Perioden beobachtet. Dies letztere Herz hat in Perioden über 4 Stunden geschlagen, bis der Versuch abgebrochen wurde.

In der Konzentration 1 : 5 000 stellt Bufotalin das Krötenherz fast augenblicklich still, und zwar in Diastole; selbst in diesem Fall ließ sich das Herz mehrere Minuten später durch Auswaschen mit Ringerlösung vollständig wiederherstellen.

Auch am ausgeschnittenen Herzen ist demnach Bufotalin für die Kröte sehr viel weniger giftig als für den Frosch. Eine zahlenmäßige Angabe läßt sich bei der verhältnismäßig geringen Zahl meiner Versuche und bei der bekannten Schwierigkeit, Versuche am ausgeschnittenen Herzen zur Giftmessung zu verwerten, kaum machen; jedenfalls ist, wenn man den Herzstillstand als Kriterium verwenden will, Bufotalin für das Herz des Frosches mindestens 20 mal so giftig wie für das der Kröte. Auch im Charakter der Giftwirkung besteht ein wesentlicher Unterschied. Während Bufotalin am Froschherzen durchaus digitalisähnliche Wirkungen zeigt, die Systolen des Ventrikels verstärkt und schließlich — außer bei den niedrigsten Konzentrationen — das

Herz in Mittelstellung oder in Kontraktur stillstellt, ist von dieser tonusfördernden Wirkung des Gifts am Krötenherzen nur bei den höchsten Konzentrationen eine leichte Andeutung zu bemerken. Diesen Unterschied hat schon Fühner<sup>1)</sup> richtig erkannt, obwohl er sich ihm offenbar lange nicht so deutlich gezeigt hat wie mir; wenigstens habe ich bei meinen Versuchen mit der reinen Substanz nie Bilder gesehen, wie sie Fühner (a. a. O., Abb. 7, 8 und 10) mitteilt.

Versuche mit anderen Herzgiften sind an der Kröte verschiedentlich angestellt worden, so mit Helleborein von Honda<sup>2)</sup>, mit Strophanthin, Helleborein und Scillipikrin von Heuser<sup>3)</sup>, mit Digitoxin von Lhoták von Lhota<sup>4)</sup>. Ich habe die Versuche Lhotáks von Lhota wiederholt und — genau wie bei Bufotalin angegeben — die tödliche Dosis des Digitoxins für die Kröte festgestellt. Da große Mengen Digitoxin eingespritzt werden mußten, kam eine Lösung des Glykosids in 50 proz. Alkohol in Anwendung, von der bis zu 0,8 ccm (also bis 0,4 ccm Alkohol) eingespritzt wurden; solche Alkoholmengen werden, wie sich aus dem Verlauf der Vergiftung ergab, von der Kröte ertragen (vgl. zur Alkoholfestigkeit der Kröte auch Heuser a. a. O.).

#### Tödliche Dosis von Digitoxin für die Kröte.

Eine Kröte mit 0,055 mg/1 g überlebt; ebenso alle Tiere mit niedrigeren Dosen.

Eine Kröte mit 0,07 mg/1 g wird am nächsten Tag tot aufgefunden. Herz in typischer Kontrakturstellung.

Die tödliche Dosis von Digitoxin für 1 g Kröte liegt also zwischen 0,055 und 0,07 mg, im Mittel bei 0,063 mg. Aus den Versuchen Lhotáks von Lhota, die an Kröten von 40—60 g angestellt worden sind, berechnet sich sogar ein Wert von etwa 0,1 mg/1 g. Aber auch der von mir festgestellte Wert von 0,063 mg/1 g ist im Vergleich zur tödlichen Froschdosis des Digitoxins — 0,00365 mg/1 g [Straub<sup>5)</sup>] — sehr hoch, das Verhältnis der tödlichen Dosen für Frosch und Kröte etwa 1 : 17.

#### C. Versuche mit Digitoxin am ausgeschnittenen Krötenherzen.

Am ausgeschnittenen Herzen des Grasfrosches bewirkt Digitoxin noch in der Konzentration von 1 : 200 000 innerhalb  $\frac{1}{2}$ —2 Stunden Ventrikelstillstand in Mittelstellung.

Am Krötenherzen ist diese Konzentration nahezu wirkungslos. Unmittelbar nach Einbringen der Giftlösung in die Kanüle tritt hier, wie auch bei der Konzentration 1 : 100 000 eine leichte Verminderung der Systolen ein, die sich aber in wenigen Minuten wieder ausgleicht.

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

<sup>2)</sup> J. Honda, Arch. internat. de pharmacodyn. et de thérap. **9**, 431. 1901.

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

<sup>4)</sup> C. Lhoták von Lhota, diese Zeitschr. **52**, 362. 1913.

<sup>5)</sup> a. a. O.

Digitoxin 1 : 50 000 vermindert die Hebelausschläge augenblicklich auf etwa  $\frac{1}{3}$ ; nach wenigen Sekunden fallen Kammerkontraktionen aus. In dieser gestörten Rhythmik, Frequenzhalbierungen und Gruppen, bleibt die Herztätigkeit lange erhalten; in einem Versuch, der am längsten beobachtet wurde, schlug das Herz am folgenden Morgen noch.

Stärker ausgeprägt sind die Veränderungen der Schlagfolge bei der Konzentration 1 : 25 000; aber auch hier schlug ein Herz mindestens 1 Stunde lang weiter.

Digitoxin 1 : 10 000 stellt das Herz fast augenblicklich in Diastole still.

Bei keiner Konzentration wurden mehr als Andeutungen einer tonussteigernden Wirkung beobachtet, wie sie am Froschherzen für Digitoxin so charakteristisch ist.

Auch die Glykoside der Digitalingruppe — ganz entsprechend wie Digitoxin verhält sich nach einigen orientierenden Versuchen Strophanthin — wirken demnach auf das ausgeschnittene Krötenherz sehr viel weniger stark als auf das Froschherz. Aber nicht nur weniger stark, sondern auch qualitativ verschieden: Es kommt zwar auch beim Krötenherzen zu typischen Rhythmusveränderungen, aber das andere Charakteristikum der Digitaliswirkung, die tonische Kontraktur, fehlt. Ein weiterer Unterschied liegt in dem Verhalten des vergifteten Herzens gegen Auswaschung. Gerade so wie bei der Bufotalinvergiftung sehen wir auch nach Digitoxin, selbst in den höchsten Konzentrationen, am ausgeschnittenen Herzen der Kröte eine weitgehende, fast absolute Reversibilität.

Wie eingangs erwähnt wurde, gerinnt Krötenblut sehr leicht, so daß es kaum gelingt, bei der Herstellung des Herzpräparats alles Blut aus dem Ventrikel zu entfernen. Wenn auch manches dagegen sprach, so konnte man immerhin daran denken, daß die zurückgebliebenen Gerinnsel eine Art von Schutz gegen die Giftwirkung darstellen könnten. Um diese Möglichkeit auszuschalten, habe ich in einem Fall bei der Präparation des Herzens und zur Ausspülung von Kanüle und Ventrikel calciumfreie Ringerlösung mit Zusatz von Natriumoxalat verwendet und dann erst gewöhnliche Ringerlösung in die Kanüle eingefüllt. Das gut schlagende Herz verhielt sich bei Vergiftung mit Digitoxin genau so wie alle anderen; der Grund für das verschiedene Verhalten der Herzen von Frosch und Kröte gegen Herzgifte liegt also tiefer.

Besitzt nun etwa das Krötenherz die Fähigkeit zur tonischen Kontraktur überhaupt nicht? Gegen diese Annahme sprechen der Sektionsbefund der mit Digitoxin getöteten Kröten, bei denen der Ventrikel in systolischem Stillstand angetroffen wurde, und das Verhalten des Ventrikels gegen Dehnung; einen weiteren Beweis liefern Versuche, in denen die Wirkung von Barium auf das ausgeschnittene Krötenherz geprüft wurde.

#### D. Versuche mit Barium.

Barium ist nach den Versuchen Heusers<sup>1)</sup> bei subcutaner Injektion für die Kröte ebenso giftig wie für den Frosch. Meine Versuche am ausgeschnittenen Herzen, die unter Verwendung von Ringerlösung mit Zusatz von Bariumchlorid angestellt wurden, ergaben sogar eher eine höhere Empfindlichkeit der Kröte. Während das Herz des Wasserfrosches erst durch eine  $\text{BaCl}_2$ -Konzentration von 1 : 250 im Verlauf mehrerer Minuten stillgestellt wird, erfolgt der Ventrikelstillstand des Krötenherzens fast augenblicklich schon bei einer Konzentration von 1 : 750. Wesentliche qualitative Unterschiede in der Wirkung des Bariumchlorids auf die Herzen beider Tierarten scheinen nicht zu bestehen; beiden gemeinsam ist jedenfalls das eine, für diese Betrachtungen wichtige Kennzeichen, daß der Ventrikel in tonischer Kontraktur stillsteht. Es besteht also — worauf schon Heuser hinweist — ein grundsätzlicher Unterschied zwischen den Stoffen der Digitalingruppe und dem Barium.

#### E. Versuche mit Calcium.

Es erhebt sich nun die weitere Frage, wie sich das Krötenherz gegen eine Vermehrung des Ca-Gehalts seiner Nährlösung verhält, eine Frage, deren Beantwortung deshalb wichtig erscheint, weil man geneigt ist, das Calcium gewissermaßen als das Hormon des Herzmuskeltonus zu betrachten.

Die Versuche über die Wirkung des Calciums auf das Krötenherz wurden in der Weise angestellt, daß Ringerlösungen von verschiedenem Ca-Gehalt in das Herz gebracht wurden; jede Lösung wurde 2 mal erneuert, ehe mit der Schreibung der Herzstätigkeit begonnen wurde.

Die Versuche, von denen einer auf der beigefügten Kurve dargestellt ist, hatten das Ergebnis, das zwar das Optimum des Ca-Gehalts für das Krötenherz bei 0,02%  $\text{CaCl}_2$  liegt, also in derselben Höhe wie für den Frosch. Während aber Steigerung des Ca-Gehalts bei dem Herzen dieses Tieres eine Vermehrung des Herzmuskeltonus verursacht, tritt beim Krötenherzen eine Verminderung ein.

Dieser Befund, daß das Ca-Ion das Herz zweier äußerlich so nahe verwandter Tiere in entgegengesetzter Weise beeinflußt, ist überraschend; vielleicht ist von weiteren Versuchen, die an diesem Punkt ansetzen, eine Klärung dieses verschiedenen Verhaltens und eine Bereicherung unserer Kenntnisse über die Herzwirkung des Calciums überhaupt zu erwarten.

Die paradoxe Reaktion des Krötenherzens gegen Calcium gibt nun eine Erklärung für die Unempfindlichkeit der Kröte gegen Herzgifte. Loewi<sup>2)</sup> hat gezeigt, daß Strophanthin in calciumfreier Ringerlösung

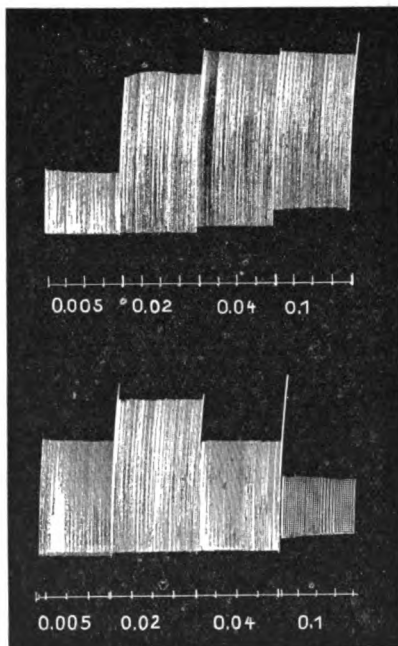
<sup>1)</sup> a. a. O.

<sup>2)</sup> O. Loewi, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **82**, 131. 1917.

am ausgeschnittenen Froschherzen die typische Kontraktur nicht auslöst, und daraus und aus weiteren Versuchen den Schluß gezogen, daß dieses Gift das Herz in besonderer Weise für Calcium empfindlich mache, und daß die Vergrößerung der Systole, die Rhythmusänderungen und die systolische Kontraktur nach Strophanthin nichts anderes darstellen als die Calciumwirkung am sensibilisierten Herzen. In der Tat hat sich nachweisen lassen, daß eine Steigerung des Ca-Gehalts der Speiseflüssigkeit sich am Froschherzen in derselben Weise äußert wie die Vergiftung mit Strophanthin. Unter der Annahme, daß die Gifte dieser Gruppe das Herz gegen Calcium empfindlich machen, wird es nun verständlich, daß Bufotalin, Digitoxin und Strophanthin am Krötenherzen keine tonische Kontraktur hervorbringen, sondern so wirken wie vermehrter Ca-Gehalt der Speiseflüssigkeit, d. h. die Systole vermindern und das Herz in erschlafte Zustand stillstellen.

Damit scheint ein neuer Beweis für die Richtigkeit der Loewischen Anschauungen gegeben zu sein, daß die Herzwirkung der Digitaliskörper letzten Endes eine Calciumwirkung ist. Die Zurückführung der Vergiftungserscheinungen auf Calciumwirkung erklärt uns, warum Bufotalin usw. am ausgeschnittenen Krötenherzen Abnahme der Systolen und diastolischen Stillstand hervorrufen; die relative Giftfestigkeit

der Kröte wird daraus aber nicht ohne weiteres verständlich. Wir kommen der Lösung dieser Frage näher, wenn wir uns vor Augen halten, daß die systolische Kontraktur, wie sie am Froschherzen durch die Gifte der Digitalingruppe hervorgerufen wird — vielleicht infolge sekundärer Veränderungen — einen irreversiblen Zustand darstellt, während das in Diastole stehengebliebene Krötenherz durch Auswaschen jederzeit wieder in Gang zu bringen ist, und ferner, daß auch die schwerste Vergiftung des ausgeschnittenen Krötenherzens sich durch Entfernung der Giftlösung glatt beheben läßt; eine Speicherung der Gifte im Herzen scheint also bei der Kröte nicht stattzufinden. In einer gewissen Analogie dazu steht der Befund Loewis, daß der durch Vergiftung mit einer sicher tödlichen Strophanthinkonzentration am ausgeschnittenen Frosch-



herzen erzeugte systolische Stillstand sich durch Auswaschen mit Ca-freier Ringerlösung leicht beseitigen läßt.

### Zusammenfassung.

Bufotalin, das Gift des Hautdrüsensekrets der Kröte, ist für dieses Tier bei subcutaner Einverleibung mindestens 30 mal weniger giftig als für den Grasfrosch; diese Giftfestigkeit der Kröte besteht in geringerem Maße auch gegenüber dem Digitoxin. Das ausgeschnittene Krötenherz wird durch Bufotalin, Digitoxin und Strophanthin in bedeutend geringerem Maß und in anderer Weise beeinflußt als das Froschherz: Zwar werden die für die Wirkung der Digitaliskörper typischen Rhythmusänderungen auch bei der Kröte beobachtet, aber die Verstärkung der Systole fehlt, und das Herz bleibt diastolisch stehen. Vermehrung des Calciumgehalts in der Speiseflüssigkeit des Krötenherzens verursacht keine Zunahme, sondern im Gegenteil eine Abnahme des Tonus. Unter der Annahme, daß die Herzgifte mittelbar wirken, indem sie das Organ gegen die physiologische Calciumwirkung empfindlicher machen (Loewi), wird die abweichende Reaktion des Krötenherzens gegen das Bufotalin und die Glykoside verständlich. Die geringe Schädlichkeit der Herzgifte für die Kröte steht offenbar auch mit der paradoxen Calciumwirkung in Zusammenhang. Bariumchlorid wirkt auf das Krötenherz im wesentlichen gleich wie auf das Froschherz: dieser Stoff scheint demnach unmittelbar, nicht auf dem Umweg über das Calcium zu wirken.

Fräulein Martha Waegelein möchte ich für ihre eifrige und verständnisvolle Mitarbeit bei diesen Versuchen auch hier meinen herzlichen Dank aussprechen.

# Über den Einfluß der nervösen Versorgung auf die vitale Färbbarkeit der Muskeln.

Von

E. Magnus-Alsleben und P. Hoffmann (Würzburg).

(Eingegangen am 3. Oktober 1921.)

Seit Ehrlichs<sup>1)</sup> farbenanalytischen Studien sind intravitale Färbungen unter verschiedenen Gesichtspunkten häufig angewandt worden.

Manchmal, wie z. B. in den Untersuchungen von Suzuki aus dem Aschoffschen Institut<sup>2)</sup>, sollte die Injektion des Farbstoffes am lebenden Tier (Karmin) zu späteren mikroskopischen Untersuchungen dienen. In anderen Arbeiten, wie z. B. von Goldmann<sup>3)</sup> wurde geprüft, wie Farbstoffe (Trypanblau, Isaminblau, Pyrrholblau) von den Geweben unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen (Gravidität, Entzündung, Tumorbildung) gespeichert werden. Von besonderem Interesse sind natürlich alle jene Beobachtungen, in welchen neben der Verteilung auf die einzelnen Organe und Gewebe geprüft werden kann, ob und welchen chemischen Veränderungen die injizierten Farbstoffe im Gewebe unterliegen. Hierzu sind natürlich nur bestimmte Farbstoffe geeignet. Unter solchem Gesichtspunkte hatte ja Ehrlich das Sauerstoffbedürfnis des Organismus studiert. Neuerdings hat Thunberg<sup>4)</sup> die Wirkung der Gewebe auf die Entfärbung des Methylenblau in origineller Weise dazu benutzt, um intermediäre Stoffwechselprodukte und die dabei entstehenden Enzyme zu untersuchen.

Über einige Beobachtungen aus diesem Gebiete, welche wir gelegentlich einer Untersuchung über den Einfluß des Nervensystems auf Entzündungsprozesse machten, sei in Folgendem kurz berichtet.

Wenn man bei Fröschen mit durchschnittenen peripheren Nerven (wir durchschnitten den Ischiadikus oder manchmal die gesamten Wurzeln des 8., 9. und 10. Rückenmarkssegments auf einer Seite) Methylenblau injiziert, färbt sich die gelähmte Muskulatur blau, während die gesamten übrigen Muskeln fast farblos bleiben. Das zeigt sich am deutlichsten, wenn man die Injektion 1 oder noch besser 2 Tage nach der Nervendurchschneidung vornimmt und das Tier nach wiederum 1–2 Tagen tötet. Läßt

<sup>1)</sup> Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Berlin 1885.

<sup>2)</sup> Morphologie der Nierensekretion. Jena 1912.

<sup>3)</sup> Bruns Beitr. z. klin. Chirur. **64.** 1909; **78.** 1912; Berl klin. Wochenschr. 1912, Nr. 36.

<sup>4)</sup> Skandin. Arch. f. Phys. **40,** S. 1. 1920.

man einen längeren Zeitraum, etwa 8 Tage, zwischen Nervendurchschneidung und Injektion verstreichen, so ist die Blaufärbung am gelähmten Muskel viel weniger ausgesprochen. Um deutliche Resultate zu bekommen, muß man relativ große Farbmengen injizieren, etwa 1—2 ccm 1proz. Methylenblaulösung, welche für die Frösche durchaus nicht indifferent sind. Injektionen mit Karmin, Trypanblau und Isominblau zeigten dieses Verhalten nicht. Normale und gelähmte Muskulatur waren hier nicht in gesetzmäßiger Weise different.

† Nach Feststellung dieser Tatsachen waren zwei Fragen zu entscheiden. 1. Ist die Muskulatur des gelähmten Gliedes wirklich die einzige, welche den Farbstoff festhält, oder enthalten ihn die anderen Muskeln auch, aber in reduziertem und deshalb farblosem Zustand? 2. Ist die Muskelruhe die alleinige Ursache des verschiedenen Verhaltens oder müssen noch andere Momente als Folge der Nervendurchschneidung angenommen werden?

Die gewöhnliche Methode, die Leukobase des Methylenblau in den Farbstoff überzuführen, nämlich einfaches Aufhängen in der Luft oder Einwirkung von Wasserstoffsperoxyd, führte zu einem negativen Resultat; die normale Muskulatur blieb unter diesen Umständen farblos. Hiernach dürfte die Anwesenheit der freien Leukobase auszuschließen sein. Dagegen bestand nach den Untersuchungen von Herter<sup>1)</sup> die Möglichkeit, daß die Leukobase in irgend einer Bindung anwesend sei, welche die sofortige Bläuung verhindert. Herter hatte nämlich gefunden, daß nach Methylenblauinjektion die wässrigen Extrakte frischer Organe sich nur wenig an der Luft bläuen, dagegen Extrakte (aus Leber und Galle) nach Behandlung mit Salzsäure eine viel stärkere Bläuung zeigten. Wir fanden nun, daß die normale, farblose Muskulatur nach kurzem Eintauchen in verschiedene verdünnte Säuren (3—5proz. Salzsäure oder Schwefelsäure) allmählich eine intensive Blaufärbung annahm. Allerdings zeigten die so behandelten Muskeln einen leicht blaugrünlischen Schimmer und unterschieden sich dadurch deutlich von dem reinen Blau, welches man sonst nach Injektionen mit Methylenblau sieht.

Hiernach darf wohl als gesichert gelten, daß Methylenblau tatsächlich in allen Muskeln gespeichert wird; in den gelähmten als gewöhnliches Methylenblau, in den normalen als reduziertes. Die Leukobase findet sich in einer durch verdünnte Säure leicht spaltbaren Bindung. Die genauere Natur derselben, ebenso die Ursache des grünlichen Farbtones, den die Muskeln nach Spaltung und Oxydation annehmen, muß in weiteren Versuchen festgestellt werden.

Die zweite der obigen Fragen nach der Ursache des Unterschiedes zwischen normaler und gelähmter Muskulatur sollte auf verschiedenen

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 493. 1904.



Wegen der Lösung näher gebracht werden. Die Angaben der Literatur über die diesbezüglichen Eigenschaften ruhender und tätiger Muskeln sind nicht ganz übereinstimmend. Nach einer alten Angabe von Gescheidlen<sup>1)</sup> sollen die tätigen Muskeln indigoschwefelsaures Natron stärker reduzieren als ruhende. Dagegen besagen die neueren Untersuchungen von Strassner<sup>2)</sup>, daß zwischen ruhender und tätiger Muskulatur kein Unterschied im Reduktionsvermögen gegenüber Methylenblau besteht. Die reduzierenden Eigenschaften sollen auf dem labilen Wasserstoff der Sulfhydrylgruppen beruhen.

Verzár<sup>3)</sup> untersuchte eine Reihe von sauren und basischen vitalen Farbstoffen auf ihr Verhalten im ruhenden und durch Reizung des Nerven in Tetanus versetzten Muskel. Eine deutliche Differenz fand er bei den sauren Farbstoffen Säurefuchsin, Lichtgrün und Guineagrün B. Die basischen Farbstoffe Methylenblau und Methylgrün zeigten keine Differenz zwischen tätigen und ruhenden Muskeln. Die Farbstoffe wurden in beiden Fällen reduziert.

Wir wollten prüfen, ob bei einem durch Curare völlig bewegungslos gemachten Frosch sich die Muskulatur ebenso verhält wie die entnervte eines normalen Frosches. Diese Versuche scheiterten aber daran, daß wir zurzeit kein gutes Curare-Präparat bekommen konnten. Ein uns zur Verfügung stehendes Curare lähmte zwar prompt, war aber so giftig, daß die Frösche nach der ebenfalls nicht indifferenten Methylenblauinjektion bald starben. Die Muskulatur war farblos, aber wegen des zu rasch eintretenden Todes schien das nicht beweiskräftig. Untersuchungen mit einem Curare-Ersatzpräparate sind noch im Gange. Wir versuchten dann den umgekehrten Weg und setzten die gelähmten Muskeln durch faradische Reizung in Tätigkeit. An zwei aufeinanderfolgenden Tagen wurde das gelähmte Bein etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde in tetanischen Zuckungen gehalten. Das Resultat war eindeutig negativ. Die Muskulatur blieb blau, eine Reduktion trat durch die forcierte Muskelaktion nicht ein. Gegen die Beweiskraft dieser Versuche läßt sich freilich der Einwand erheben, daß die Bewegungen infolge faradischer Reizung nicht mit den spontanen identisch sind, und daß durch Reizung, welche nach Intensität, Dauer und Intervallen sich den physiologischen Verhältnissen möglichst nähert, ein abweichendes Resultat erhalten werden könnte.

Es läßt sich also durch Intravitalinjektion von Methylenblau nachweisen, ob die Muskeln eines Kaltblüters im Zusammenhang mit dem Zentralnervensystem stehen oder nicht und zwar schon zu einer Zeit, zu welcher noch keine Spur von Degenerationserscheinungen des Muskels gegenüber dem elektrischen Strom vorhanden ist. Bekannter-

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 8, 506. 1874.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. 29, 245. 1910.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschr. 90, 63. 1919.

maßen degenerieren Kaltblütermuskeln außerordentlich langsam und es läßt sich eine verminderte Reizbarkeit erst nach vielen Wochen nachweisen. Nach vorliegenden Untersuchungen darf das Fortschreiten der Degeneration entnervter Muskeln nicht ausschließlich auf Inaktivität bezogen werden; tägliche Massage und faradische Reizung haben z. B. in den Untersuchungen von Hartmann und Blatz<sup>1)</sup> das Eintreten der Degeneration nicht hinausgeschoben. Ebenso wenig hat wiederholte faradische Reizung die Bläuung unserer Froschmuskeln aufgehoben. Die Vasomotorenlähmung allein kann nach unseren heutigen Kenntnissen ebenfalls nicht für das abweichende Verhalten verantwortlich gemacht werden, da gerade die Skelettmuskeln der Gefäßnerven entbehren. Unsere Beobachtungen stimmen mit den eben zitierten Versuchen darin überein, daß künstliche Reizung den normalen Einfluß der Nerven auf die chemischen Prozesse im Muskel nicht zu ersetzen vermag.

---

<sup>1)</sup> Journ. of the amer. medic. association 74, 878. 1920.

## Zur Chemie der amyloiden Entartung.

Von

Hans Eppinger (Wien).

(Eingegangen am 3. Oktober 1921.)

Folgender klinisch und anatomisch beobachteter Fall bot mir Gelegenheit, der Frage nach der Konstitution der „Amyloidsubstanz“ näher zu treten.

Ein junges, 17 Jahre altes Mädchen sucht Spitalshilfe auf, weil sie sich seit längerer Zeit müde und matt fühlt und daher nicht imstande ist, ihrer gewohnten Arbeit als Köchin bei einer kleinen Familie nachzukommen. Bei der Untersuchung in der klinischen Ambulanz zeigt sich eine mächtig vergrößerte Milz und Leber. Mit der Wahrscheinlichkeitsdiagnose — eine Blutuntersuchung unterblieb zunächst — myeloische Leukämie wurde die Pat. auf die Klinik aufgenommen.

Die genaue Untersuchung — aus der wir nur die wichtigsten Daten herausheben wollen — ergibt: Graziil gebautes, ihrem Alter entsprechend großes Mädchen; blaß, keine Ödeme, abgemagert, kein Fieber; Puls ohne Besonderheiten; nirgends Schwellungen der Lymphdrüsen nachweisbar; die adenoiden Gebilde nicht vergrößert; Augenhintergrund normal. Die Thoraxuntersuchung ergibt keine Anhaltspunkte für Tuberkulose; auch bei der Röntgenuntersuchung der Brustorgane lassen sich keine pathologischen Schatten feststellen; intercutane Tuberkulinprobe negativ. Herz eher klein. Keine Druckempfindlichkeit des Sternums oder der Rippen. Abdomen leicht vorgewölbt, Nabel verstrichen. Bei der Perkussion und Palpation zeigen sich die typischen Veränderungen einer vergrößerten Milz und Leber. Die Organe sind sehr hart, dabei nirgends druckempfindlich; an keiner Stelle Reiben nachweisbar; freie Flüssigkeit ist im Cavum peritonei nicht zu ermitteln, Leber ziemlich scharfrandig, Incisur an normaler Stelle. Es bestehen weder Obstipation noch Diarrhöen. Genitalbefund normal; Menses im 14. Lebensjahre beginnend, seit  $\frac{1}{2}$  Jahre fehlend. Harn zeigt Spuren von Albumen, enthält kein Urobilin. Blutbild leicht chlorotisch; 4,2 Millionen Erythrocyten, bei 60% Hämogl.; 5600 Leukocyten, mäßige Lymphocytose, keine pathologischen Blutzellen; Blutplättchen eher vermindert. Serum hell, enthält normale Farbstoffmengen; Wassermannsche Probe negativ.

Wir sind trotz fast halbjähriger Beobachtung zu keiner sicheren Diagnose gekommen. Ziemlich unvermittelt wurde das Mädchen, das noch kurz vorher mit bestem Appetite gegessen hatte, auffallend schläfrig, müde; zu Bett gebracht erbrach sie; leichte Temperatursteigerung; in der Annahme, es dürfte sich um eine alimentäre Intoxikation handeln, wurde der Pat. ein Laxans gereicht. In der folgenden Nacht wurde Pat. komatös, ohne wieder zu erwachen. Das eigentümliche Krankheitsbild erinnerte teils an Urämie, Coma diabeticorum, teils an Tumor cerebri. Die wenige Stunden vor dem Exitus vorgenommene Lumbalpunktion ergab einen negativen Befund. In den letzten Tagen hatte sich

das Abdominalbild, soweit es sich um die Größe der Milz und Leber handelte, nicht verändert. Veränderungen im Blute oder Urin (Aminosäuren, wegen des Verdachtes eines Coma hepaticum) wurden gleichfalls nicht wahrgenommen.

Auch die Sektion hatte die Ursache des scheinbar unvermittelt eingetretenen Todes nicht klargestellt; vor allem ergab die Untersuchung des Cerebrums ein völlig negatives Resultat. Sehr interessant war das Verhalten der Milz und Leber, indem sich eine schwere Amyloidose beider Organe feststellen ließ; besonders merkwürdig war das Verhalten des linken Leberlappens; während der rechte Anteil eine glatte Oberfläche darbot, zeigte der linke das Bild einer Leber, die gleichsam von Tumormetastasen durchsetzt war; an einer Stelle wölbte sich ein hellgelblicher Tumor vor; am Durchschnitte drang dieser gelbliche, wie Bernstein etwas durchscheinende Tumor tief in das Parenchym ein; eine scharfe Abgrenzung gegen die Umgebung war nicht zu ermitteln; der gleichmäßig verfärbte und in seiner Qualität einheitlich erscheinende Tumor war über Mannsfaust groß. Wurden dünne Scheiben aus dem Tumor geschnitten, so erwies sich das Gebilde als ein schwer schneidbares: es zeigte sich ein beträchtlich stärkerer Widerstand als ihn die ohnehin schon derbe Leber darbot; auffallend war, wie durchsichtig die abgetragenen Scheiben waren; wurden dünnere Schichten auf Zeitungspapier gelegt, so waren die darunter gelegenen Buchstaben deutlich zu erkennen.

Bei der histologischen Untersuchung vermißte man jegliche celluläre Configuration. Das Ganze bot eine gleichmäßige, wie gallertig aussehende Struktur, an den meisten Stellen war das Gefüge nicht einmal faserig. Gegenüber Eosin zeigte sich der Schnitt sehr aufnahmefähig, gegenüber Hämatoxylin wieder gar nicht. Schnitte aus den Randpartien des Tumors ließen Veränderungen erkennen, die sehr an Amyloid erinnerten. Dies zusammen mit dem makroskopischen Verhalten der Milz und des rechten Leberlappens forderten auf, Reaktionen auf Amyloid anzustellen. Dabei zeigte sich, daß ein allmählicher Übergang zwischen amyloid entarteter Leber und jenem indifferenten Gewebe bestand, das all die charakteristischen Reaktionen darbot, die dem Histologen als Amyloid bekannt sind. Mit Gentianaviolett färbte sich der Tumorschnitt leuchtend rot, auf Jod-Schwefelsäure reagierte er mit Dunkelblaufärbung. Die Milz bot histologisch das typische Bild einer Sagomilz. Geringe Andeutungen von Amyloid zeigten sich noch im Herzen und in der Darmwand.

Der Anatom fühlte sich bemüßigt, nach den Ursachen dieser ausgebreiteten Amyloidose zu fahnden. Trotz allen Suchens nach tuberkulös veränderten Drüsen ließ sich nichts dafür Charakteristisches feststellen. Es wurden auf der Suche nach okkulten Eiterherden auch verschiedene Knochen aufgestemmt; auch hier war das Ergebnis ein negatives.

Offenbar handelte es sich hier um einen jener seltenen Fälle, die von den Anatomen als genuine Amyloidose angesprochen werden, und auf die z. B. Hansmann gelegentlich der Amyloiddebatte auf dem Pathologentage zu Berlin 1904 hingewiesen hatte; das Merkwürdige unseres Falles scheint nur dies zu sein, daß es hier auch zur Bildung einer Art von amyloider Neubildung gekommen war, oder besser gesagt, zur Anhäufung eines eigentümlichen Gebildes, das sich histologisch ganz ähnlich verhielt wie eben „Amyloid“.

Die Beobachtung als solche erschien mir interessant genug, so daß ich den Fall etwas genauer beschrieben habe.

Durch die Beobachtungen Hanssens aus dem Hofmeisterschen Institute ist die Amyloidfrage in ein neues Stadium gerückt. Das

Schöne und Originelle war die Auswahl des Ausgangsmateriales. Während man bis jetzt zur Darstellung des Amyloids die ganzen Leichenorgane in Gebrauch nahm und das zur Analyse zu verwertende Material aus dem Gewebe durch künstliche Verdauung zu isolieren versuchte, präparierte Hanssen aus der menschlichen Amyloidmilz die Sagokörnchen mit Messer und Pinzette heraus, befreite die Körner durch Schütteln in destilliertem Wasser von eventuell noch anhaftenden Gewebeflocken und verwendete dieses mechanisch isolierte Amyloid zur Untersuchung. Das Neue, das sich aus diesen Untersuchungen von Hanssen ergab, war das Fehlen einer gepaarten Schwefelsäure: das mechanisch isolierte, sonst intakte Amyloid enthielt somit keine Chondroitinschwefelsäure, womit die alten Beobachtungen von Oddi und Krawkow überholt schienen.

Der vorliegende Fall, durch den wir in die Lage kamen, eine so große Menge an reinstem „Amyloid“ in die Hand zu bekommen, forderte auf, die Untersuchungen von Hanssen zu überprüfen. Im wesentlichen konnten wir sie bestätigen.

Technisch gingen wir in folgender Weise zu Werke: Der Amyloidtumor wurde aus dem Leberparenchym herausgeschnitten, wobei wir bemüht waren, möglichst im Tumor zu schneiden, um möglichst wenig intaktes Lebergewebe dem Untersuchungsmaterial einzuverleiben. Die Tumorstücke wurden in kleinere Partien zerlegt und bei 40° getrocknet, pulverisiert und im Vakuum über Schwefelsäure aufbewahrt. Die Menge des getrockneten Pulvers betrug ca. 11 g.

Das bräunlichweiße Pulver gab mit Jod eine rotbraune Färbung, die nach Zusatz von verdünnter Schwefelsäure in Blauschwarz überging. Es wurden die verschiedenen Eiweißreaktionen angestellt; dabei zeigte sich: Biuretprobe schwach positiv; Xanthoproteinreaktion ebenfalls positiv; mit  $\alpha$ -Naphtol tritt erst nach längerer Zeit eine Spur einer Reaktion ein; auch die Orceinprobe tritt erst nach langem Kochen spurenweise positiv auf; Millonsche Probe sehr stark positiv, Glyoxylsäureprobe stark positiv, aber erst nach geraumer Zeit; Schwefelprobe — des öfteren angestellt — stets negativ. Der Nachweis auf Phosphor mißlang.

Die Elementaranalyse ergab folgende Werte: C 50,26%; H 7,29%; N 14,79%; C/N 3,39; der Aschengehalt war minimal; 0,2347 g gaben 0,0006 g. Die Untersuchung des Schwefelgehaltes ergab kaum wägbare Spuren an Bariumsulfat, so daß man die Substanz praktisch schwefelfrei bezeichnen konnte.

Vergleichen wir unsere Werte mit jenen, die Hanssen gefunden hatte, so zeigt sich somit eine weitgehende Übereinstimmung; unsere Beobachtung geht insofern noch um einen Schritt weiter, als sich unsere Substanz überhaupt als schwefelfrei erwies.

Die relativ große Menge des uns zur Verfügung stehenden Materials forderte auf, das Amyloid auf seine Eiweißnatur hin zu prüfen. Neuberger hat bereits in dieser Richtung einen Versuch unternommen, wobei er sich allerdings noch eines Amyloids bediente, das nach Krawkow dargestellt war. Neuberger arbeitete nach der Fischerschen Estermethode und erhielt dabei folgende Werte: sein Amyloid enthielt: 0,8% Glykokoll; 22,2% Leucin; 3,8% Glutaminsäure; 4,0% Tyrosin; 3,1% Pyrrolidincarbonsäure; 13,9% Arginin und 11,6% Lysin. —

Zwecks Analyse der Eiweißbauprodukte bedienten wir uns der Methode von van Slyke. Vorversuche an Hämoglobin und Edestin lehrten uns, daß wir uns auf unsere Zahlen verlassen konnten; wir kamen zu fast gleichen Werten, wie sie z. B. van Slyke für das Hämoglobin und Edestin angab. Die von uns für das „Amyloid“ gefundenen Zahlen geben wir in Tabellenform:

Ammoniakstickstoff (Glutaminsäure, Asparaginsäure) . . . . .	13,08%
Melaninstickstoff (Tryptophan) . . . . .	4,41%
Cystinstickstoff . . . . .	0,00%
Argininstickstoff . . . . .	14,67%
Histidinstickstoff . . . . .	0,00%
Lysinstickstoff . . . . .	4,34%
Aminostickstoff des Filtrates (Tyrosin, Leucin, Alanin, Glykokoll, Phenylalanin) . . . . .	45,25%
Nichtaminostickstoff des Filtrates (Prolin, Oxypyrolin, die Hälfte des Tryptophans) . . . . .	15,80%
	<u>97,55%</u>

Von Fürth sind in der letzten Zeit Methoden ausgearbeitet worden, die es ermöglichen, Tryptophan und Tyrosin in kleinen Eiweißmengen zu bestimmen. Der Liebenswürdigkeit von Fürth haben wir es zu verdanken, wenn wir hier bereits auf Zahlen hinweisen können, die mit Methoden erhalten wurden, welche erst demnächst veröffentlicht werden. Der Tryptophangehalt nach der Fürthschen Methode betrug 4,23%, der Tyrosingehalt 12,34%.

Auch die quantitative Phosphorbestimmung ergab ein negatives Resultat.

Schließlich waren wir noch bemüht, uns ein Urteil über die Anwesenheit von Purinstickstoff zu bilden. Einem Rat von S. Fränkel folgend, hydrolysierten wir ca. 1 g Substanz mit Schwefelsäure, neutralisierten nach 12stündigem Kochen die Flüssigkeit und fällten das Filtrat mit ammoniakalischer Silbernitratlösung; der Niederschlag wurde mit verdünnter Ammoniaklösung gewaschen. Der gesamte Niederschlag kam in einen Kjeldalkolben, wurde hier in Wasser suspensiert und mit Magnesiumoxyd so lange gekocht, bis sämtlicher Ammoniak ausgetrieben war. Der Rückstand wurde dann mit Schwefelsäure in gewöhnlicher Weise nach der Kjeldahlmethode hydrolysiert und schließlich durch

Kochen mit Kalilauge auf seinen Stickstoff hin untersucht. Auf diese Weise erhielten wir Zahlen, die auf ca. 1% Purinstickstoff hinweisen würden.

Fassen wir unsere Resultate zusammen, so läßt sich sagen: Das von uns aus der Leber isolierte, hieselbst in Form eines Tumors eingelagerte Amyloid ist wahrscheinlich ein Eiweißkörper. Das prozentuelle Verhältnis des Kohlenstoffs zum Stickstoff ist ganz ähnlich wie in anderen Proteinen. Die Substanz ist phosphor- und schwefelfrei und enthält somit keine Chondroitinschwefelsäure. Das „Amyloid“ baut sich aus den verschiedensten Aminosäuren auf. Auffallend ist auf der einen Seite der hohe Tyrosingehalt, auf der anderen das Fehlen von Cystin und Histidin. Die Substanz ist reich an Diaminosäuren und daher von ziemlich basischem Charakter; sie scheint Purine zu enthalten und dürfte, soweit die qualitativen Proben zu verwerten sind, frei von Kohlenhydraten sein.

Das Amyloid scheint daher ein Eiweißkörper zu sein, der sich wesentlich von den Proteinen unterscheidet, mit denen der menschliche Körper sonst sein Auskommen findet. Vielleicht liegt gerade in dieser Tatsache die Ursache, warum diese offenbar sich unter pathologischen Bedingungen bildende Substanz im Körper nicht die Angriffspunkte findet, die andere Proteine haben, und warum das gleichsam körperfremde Amyloid hier zur Ablagerung kommt. —

---

# Über Farbstoff und Wachs der Blutlaus (*Schizoneura lanigera*).

Von  
Fr. N. Schulz.

(Aus der Chemischen Abteilung des Physiologischen Institutes zu Jena.)

(Eingegangen am 5. Oktober 1921.)

Die Blutlaus befällt Narben und Safttriebe von Apfelbäumen und bildet wegen ihrer lebhaften Vermehrung einen schweren Schädling. Sie macht sich augenfällig durch Ausscheidung feiner, etwa  $\frac{1}{2}$  cm langer, weißer wolliger Fäden, die oft ganze Zweige dicht überziehen. Beim Zerdrücken der unter diesem Gespinst sitzenden weichen Läuse entleert sich ein intensiv roter Saft (Blutlaus).

Es schien mir von Interesse, über die Natur der weißen Fäden, die man als eine Wachsart angesprochen hat, etwas Genaueres zu erfahren, insbesondere mit Rücksicht auf die bei anderen Blattläusen (z. B. *Coccus Cacti*: Cocchenillewachs, und *Psylla alni*, Erlensauger: *Psylla*-wachs) gemachten Feststellungen.

Das Gespinst ist sehr leicht, so daß ich schon größere Mengen von stark befallenen Zweigen verarbeiten mußte, um nur etwa 1,5 g der „Wachsmasse“ rein zu bekommen.

Zur Gewinnung des Untersuchungsmaterials habe ich die einzelnen befallenen Stellen mit einem mit Alkohol befeuchteten Wattebausch leicht abgerieben, dann den Wattebausch ausgequetscht und von neuem mit Alkohol durchtränkt. Schließlich habe ich dann den Wattebausch mit dem anhaftenden Material in das Gefäß mit dem ausgepreßten Alkohol geworfen. Auf diese Weise bekommt man die Hauptmasse der wolligen Ausscheidung der Läuse, die dabei zerquetscht werden, nebst Staubteilchen und Teilen der Blätter und Zweige.

I. Der Farbstoff. Der alkoholische Auszug ist intensiv rot-violett. Die Intensität ist im Hochsommer erheblich größer wie von Mitte August ab bei Auszügen, die etwa der gleichen Menge von Wollbelag entsprechen.

Reibt man die Zweige mit einem trockenen Wattebausch ab, so geht die anfangs rote Farbe bald in Braungelb über. Durch nachträglichen Zusatz von Alkohol erhält man dann nur blaß gelbbraune Lösungen.

Der Alkohol wird durch Filtration von den ungelösten Massen abgetrennt, der Wattebausch besonders ausgequetscht. Man erhält so hochrote Lösungen mit einem leichten Stich ins Violette. Beim Zusatz von etwas Alkali wird der Farbenton intensiv violett, bei Zusatz von



Spuren von Säure (auch Essigsäure) schlägt die Farbe in Gelb um. Der Farbstoff verhält sich demnach ähnlich wie Cochenillefarbstoff. Spektroskopisch zeigt die alkoholische Farbstofflösung Absorption des äußersten Rot sowie des ganzen Spektrum etwa von  $620 \mu\mu$  an, so daß nur ein Bezirk von etwa  $700-620 \mu\mu$  frei bleibt. Gelegentlich ist ein schwacher Streifen bei  $650 \mu\mu$  angedeutet, der bei einer Lösung des Cochenillefarbstoffes, die sich im übrigen ebenso verhält wie die Farblösung aus der Blutlaus, fehlt. Dieser Streifen ist auf eine Beimengung zurückzuführen. Beim Verdunsten der alkoholischen Lösung hinterbleibt eine geleeartige, rote Masse, in welcher gelbliche, fettähnliche Tropfen eingestreut sind, die beim Erkalten erstarren. Die Masse löst sich bei leichtem Anwärmen in Alkohol glatt wieder auf. In Äther löst sich die fettähnliche Masse leicht, während der Farbstoff im wesentlichen ungelöst zurückbleibt. In diesem Zustand löst sich die Farbmasse nicht mehr in Alkohol, auch nicht heiß, wohl aber leicht in Wasser. Die wässrige Lösung ist hochrot. Ich habe den Farbstoff zunächst nicht genauer untersucht.

Durch mehrfaches Verdunsten des zum Entfetten benutzten Äthers und Wiederaufnehmen mit Äther erhält man eine nur schwach gefärbte Fettmasse und anderseits noch weitere Mengen des entfetteten Farbstoffes.

Extrahiert man die vom Alkohol abfiltrierten Massen (Wattebausch und Blutlausleiber) mit Äther, so bekommt man eine gelbliche bis gelbbraunliche ätherische Lösung, welche eine ganze Reihe scharfer spektraler Absorptionsbänder zeigt.

Bei frisch bereiteten Lösungen lassen sich mindestens 6 zum Teil außerordentlich scharf hervortretende Banden beobachten. Mit einem Zeißschen Gitterspektroskop (mit Vergleichsspektrum) ließen sich diese Streifen folgendermaßen lokalisieren:  $654-647 \mu\mu$ ,  $574-568 \mu\mu$ ,  $548-538 \mu\mu$ ,  $526 \mu\mu$ ,  $507-499 \mu\mu$ ,  $478 \mu\mu$ . Außerdem habe ich mehrfach einen ganz schmalen, aber sehr dunkeln Streifen bei  $589 \mu\mu$  beobachtet.

Die Lösung ändert beim Stehen allmählich ihre Farbe mehr nach dem Braun zu. Bei intensiver Lichteinwirkung geht diese Veränderung rascher vor sich, es verschwinden dabei die Absorptionsbanden zum Teil, während das Band bei  $654-647 \mu\mu$  schärfer hervortritt, so daß man bei älteren, einige Wochen alten, Lösungen nur dieses Band in schönster Ausbildung wahrnimmt.

Beim Verdunsten der ätherischen Lösung hinterbleibt eine leicht gelbbraunliche, bei gewöhnlicher Temperatur körnige, sich fettig anfühlende Masse. Beim Auflösen in warmem Alkohol und Wiedereerkalten scheidet sich ein beträchtlicher Teil der Fettmassen in schönen Krystalldrüsen wieder aus. Die hinterbleibende alkoholische Mutterlauge ist gelbbraunlich und zeigt sehr scharf den Streifen bei  $654-647 \mu\mu$ .

Eine genauere Untersuchung dieses Farbstoffes habe ich ebenfalls nicht vorgenommen. Man wird ihn zunächst zu der Gruppe der Lipochrome rechnen. Auf einer Bemengung dieses Lipochroms ist der

gelegentlich auch in der alkoholischen Farbstofflösung auftretende Streifen (bei  $650\ \mu\mu$ ) zurückzuführen.

II. Die „Wachsmasse“. Beim Verdunsten der ätherischen Lösung (s. vorher) bei Zimmertemperatur hinterbleibt eine harte, fast kreideartige, sich etwas fettig anfühlende Masse, die aus Nadelaggregaten besteht, die in Rosettenform oft pilzartig auf einem Stil aufsitzen. Ich gebrauche den Ausdruck „Wachsmasse“, obschon es sich, wie wir sehen werden, nicht um ein Wachs im chemischen Sinne handelt.

Es zeigt schon dieses ganze Verhalten die ausgezeichnete Krystallisationsfähigkeit der Substanz. Die Krystalle sind doppelbrechende Nadeln. Beim Krystallisieren treten häufig schöne Liesegangsche Ringe auf. Es gibt das namentlich unter dem Polarisationsmikroskop außerordentlich zierliche Bilder.

Erwärmt man etwas von der „Wachsmasse“ auf dem Objektträger, deckt den öligen Tropfen unter leichtem Druck mit dem Deckglas zu, so schießen beim Erkalten von Krystallisationszentren ausgehende feine Nadeln in dünner Schicht an. Bei gekreuzten Nicols kann man dann häufig eine außerordentlich regelmäßige Abwechslung von Hell und Dunkel beobachten, die in ihrer Regelmäßigkeit an Strukturbilder erinnert, wie sie von Skelettbildungen niederer Tiere her bekannt sind.

Es macht zunächst den Eindruck, als ob doppelbrechende und einfachbrechende Schichten sich in regelmäßiger Weise abwechselten, es handelt sich aber tatsächlich um abwechselnd dichtere und dünnere Krystallisationszonen. Die dünneren Stellen erscheinen im Kontrast zu den dickeren Schichten zunächst fast ganz dunkel. Bei starker Vergrößerung läßt sich aber doch die Doppelbrechung der auch hier vorliegenden Nadeln nachweisen. Beobachtet man die Erscheinung während des Erstarrens, so sieht man, daß die Krystallisation von einzelnen Punkten aus eintritt und dann kreisförmig weiterschreitet unter abwechselnder Bildung von dichteren und weniger dichten Schichten. Es handelt sich um eine ähnliche Erscheinung, wie sie E. Küster<sup>1)</sup> beschrieben hat, nur daß es sich hier nicht um eine Krystallisation in einer heterogenen Kolloidmasse, sondern um einen Erstarrungsvorgang einer, wie man zunächst annehmen muß, homogenen Masse handelt.

Die Bildung ringförmiger Schichten von verschiedener Dichte läßt sich besonders schön makroskopisch beobachten bei der aus der „Wachsmasse“ durch Verseifen gewinnbaren Fettsäure (s. später).

Die Wachsmasse ist in kaltem Alkohol ziemlich schwer löslich, in heißem Alkohol dagegen sehr leicht. Beim Erkalten krystallisiert dieselbe daher zum großen Teil wieder aus. Das anhaftende „Lipochrom“ bleibt dabei im wesentlichen im Alkohol zurück, so daß man nach 2—3 maligem Umkrystallisieren die „Wachsmasse“ fast rein weiß bekommt. Auch aus der beschriebenen alkoholischen Farbstofflösung kann man, wie oben angedeutet, noch weiteres weißes Wachs gewinnen.

<sup>1)</sup> E. Küster, Über rhythmische Krystallisation. Kolloid-Zeitschr. **14**, H. 6, S. 307—319. 1914.

Es handelt sich offenbar um eine ihrer Herkunft nach schon von vornherein ziemlich einheitliche Fettmasse, denn der Schmelzpunkt wird durch mehrfaches Umkrystallisieren nicht erheblich geändert. Er liegt zunächst bei etwa 52—51° und sinkt schon beim zweiten Umkrystallisieren auf 48—49°.

Ich konnte mir zunächst etwa 1 $\frac{1}{2}$  g reiner „Wachsmasse“ verschaffen, welche dreimal aus Alkohol umkrystallisiert und rein weiß war.

Die „Wachsmasse“ war kreideartig, körnig, pulverisierbar, fühlte sich kaum fettig an. Papier wird dementsprechend nicht durchscheinend gemacht. Die harte Konsistenz ist um so auffallender, als der Schmelzpunkt verhältnismäßig niedrig liegt, und zwar bei 49—48°. Die Masse ist in Äther, Chloroform, Benzol, in heißem Alkohol leicht löslich, in kaltem Alkohol recht schwer löslich. Mit Wasser treten weder Lösungs- noch Quellungserscheinungen ein. In konzentrierter Schwefelsäure löst sich die Masse unter schwacher Gelbfärbung.

Aus heißem Alkohol krystallisiert die Masse in Körnern, die sich aus feinen Nadeln zusammensetzen. Beim Erkalten der geschmolzenen Masse tritt schon bei Temperaturen, die wenig unterhalb des Schmelzpunktes liegen, eine vollständige krystallinische Erstarrung ein. Auf diesem ausgezeichneten Krystallisierungsvermögen beruht offenbar die Neigung zur Bildung Liesegangscher Ringe, und kann daher als ein Kriterium für die Einheitlichkeit der Masse angesehen werden.

Die Wachsmasse ist durch Kochen mit alkoholischer Kalilauge glatt verseifbar.

Zu Vorversuchen benutzte ich die beim Umkrystallisieren erhaltenen alkoholischen noch stärker gefärbten Mutterlaugen, die sicher neben der „Wachsmasse“ noch andere fettartige Stoffe enthielten. Schon nach kurzem Aufsieden wurden Seifenlösungen erhalten, die beim Eintragen in Wasser völlig klar bleiben. Beim Ansäuern (Essigsäure oder Salzsäure) entstand eine voluminöse Fällung von Fettsäuren, beim Zusatz von Bariumchlorid eine Fällung von Barytseife. Die durch Säure aus der Barytseife freigemachte Fettsäure, ebenso wie die durch Säure direkt gefällte Fettsäure hatte einen Schmelzpunkt von 38—40°. Sie war in Alkohol, auch kalt, in Äther, Chloroform, Benzol leicht löslich.

Zu den Hauptversuchen benutzte ich zwei verschiedene Präparate von verschiedener Darstellung, die beide bei 48—49° schmolzen, rein weiß waren und mikroskopisch einheitlich aus feinen Nadeln bestanden.

Zu der ersten Versuchsreihe benutzte ich 0,38 g, zu der zweiten Reihe 1,07 g; beide Versuchsreihen wurden unter Vermeidung von Verlusten durchgeführt, insbesondere die zweite, jedoch war die Verarbeitung, soweit es sich nicht um die direkte Bestimmung handelt, nicht quantitativ.

Die Verseifungszahl betrug bei Präparat I 204, bei Präparat II 213, also eine sehr gute Übereinstimmung.

0,38 g in 10 ccm Alkohol mit 10 ccm ca.  $\frac{1}{2}$ -alkoholischer Kalilauge 15 Minuten auf dem Wasserbad gelinde gekocht. Bei der Verseifung verbraucht 2,8 ccm  $\frac{1}{2}$ -KOH.

1,07 g in 10 ccm Alkohol mit 20 ccm  $\frac{1}{2}$ -Kalilauge gekocht  $\frac{1}{4}$  Stunde. Bei der Verseifung verbraucht 8,2 ccm  $\frac{1}{2}$ -KOH. Die Verseifungsflüssigkeit war völlig klar, blaßgelb.

Die hohe Verseifungszahl spricht dafür, daß eine verhältnismäßig niedrige Fettsäure mit einem ebenfalls niedrig molekularen Alkohol in dem ursprünglichen Wachs gepaart gewesen ist.

Nach der Verseifung und Neutralisation wurde mit reichlich Wasser versetzt. Es entstand eine völlig klare Seifenlösung, woraus ebenfalls auf die Abwesenheit eines hochmolekularen Alkohols geschlossen werden kann. Die neutrale Seifenlösung wurde mit reichlich Bariumchlorid versetzt, wodurch ein sehr voluminöser Niederschlag entstand (Barytseifen). Das völlig klare Filtrat hiervon wurde auf Glycerin verarbeitet.

In Versuch 1 wurde auf dem Wasserbad eingengt. Der erhaltene Sirup (mit reichlich Bariumchlorid) wurde mit starkem Alkohol aufgenommen, der Alkohol verdunstet. Der ölige Rückstand (einige Tropfen) gab die Boraxflammprobe, die Acroleinprobe, außerordentlich intensiv, löste Kupferoxydhydrat bei durch Natronlauge alkalischer Reaktion.

Im Versuch 2 wurde das Filtrat von der Barytseife nach einem dem Bestimmungsverfahren im Wein angepaßten Verfahren quantitativ bestimmt. Da beim Eindampfen der Lösung Verluste von Glycerin nicht vermeidbar sind, gilt der gefundene Wert als Minimalwert. Es wurde zu dem beim Einengen erhaltenen Rückstand 96 proz. Alkohol hinzugegeben. Dieser alkoholische Auszug wurde verdunstet, der Rückstand mit einem Gemisch von 2 Teilen absolutem Alkohol und 3 Teilen Äther aufgenommen, filtriert, wie er verdunstet, getrocknet und gewogen. Der Rückstand wog 0,15 g. Die ölige, mit festen Körnchen durchsetzte Masse löste sich nicht völlig in Wasser. Es wurde daher in der wässrigen Lösung eine Bestimmung des Glycerins nach Benedikt und Zsigmondy (Modifikation von Mangold) vorgenommen. Nach der Oxydation mit Kaliumpermanganat wurde das erhaltene Ca-Oxalat durch Titration bestimmt. Es ergab sich eine 0,086 g KOH entsprechende Menge von 0,07 g Glycerin.

Es ist also zweifellos Glycerin in erheblichen Mengen unter den Verseifungsprodukten der Wachsmasse enthalten. Die Menge ist auf 7–10% zu schätzen. Es ist ausgeschlossen, daß diese verhältnismäßig großen Mengen von Glycerin auf ein als Verunreinigung beigemengtes Fett zurückzuführen sind. Das Triglycerid der Palmitinsäure liefert 11% Glycerin.

Trotzdem habe ich versucht, Anhaltspunkte dafür zu bekommen, ob etwa außer dem Glycerin noch ein hochmolekularer Alkohol am Aufbau der „Wachsmasse“ beteiligt sei. Dieser Versuch war aber völlig negativ.

Es wäre möglich, daß ein hochmolekularer Alkohol durch die Alkaliseife in Lösung gehalten worden wäre. Dieser müßte dann beim Überführen der Alkaliseife in Barytseife mit ausfallen. Es wurde daher die mit Wasser gewaschene Barytseife mit siedendem Alkohol und siedendem Äther mehrfach ausgekocht. Die alkoholischen bzw. ätherischen Auszüge wurden verdunstet, der geringe Rückstand, dem noch etwas Salze beigemischt waren, wurde mit Äther aufgenommen. Der Ätherrückstand betrug in Versuch 1 0,009 g, in Versuch 2 0,012 g, also Mengen, die im Verhältnis zur Ausgangsmasse nicht in Betracht kommen.

Der Versuch zeigt jedoch, daß die Barytseife in Alkohol und Äther nicht löslich ist.

Zur Charakterisierung der bei der Verseifung entstandenen Fettsäure wurde die mehrfach mit Alkohol und Äther ausgezogene Barytseife mit salzsaurem Alkohol gekocht, und zwar mit dem Filter, auf dem die Seife gesammelt und gereinigt wurde, das Filter wurde dann noch mit heißem Äther ausgezogen. Ein sichtbarer Rückstand blieb hierbei nicht.

Die salzsauren alkoholischen Lösungen der Fettsäure wurden in reichlich Wasser eingetragen. Dabei setzte sich die Fettsäure sehr gut ab; es war ein völlig klares Filtrat zu erhalten, das sich auf weiteren Wasserzusatz nicht trübte. Die auf dem Filter gesammelte Fettsäure wurde gut ausgewaschen, dann in Äther gelöst und mit den geringen Mengen der aus dem Filter durch Äther direkt gewonnenen Fettsäure vereinigt.

Im Versuch I wurde aus 0,38 g Ausgangsmaterial 0,26 g Fettsäure = 68,3% gewonnen, im Versuch II aus 1,07 g 0,816 g Fettsäure = 76%. Auch der Wert für Versuch II ist ein Minimalwert. Die hohe Ausbeute an Fettsäure ist ein weiterer Beweis dafür, daß kein hochmolekularer Alkohol am Aufbau des „Waxes“ der Blutlaus beteiligt ist.

Zur näheren Charakterisierung der Fettsäure wurde zunächst versucht, das Basenbindungsvermögen festzustellen. Einen gewissen Anhaltspunkt hierfür gibt ja schon die Verseifungszahl.

Versuch 1: 1000 g Wachs = 683 g Fettsäure = 204 g Kalilauge.

Versuch 2: 1000 g Wachs = 760 g Fettsäure = 213 g Kaliumhydroxyd.

Daraus ergäbe sich unter der Voraussetzung, daß es sich um eine einwertige Fettsäure handelt, und daß anderweitig kein Alkali an der Verseifung gebunden wird, ein Molekulargewicht von annähernd 190–200. Da die Werte für die Fettsäuremenge aber Minimalwerte sind, sind auch die Werte für das Molekulargewicht tatsächlich höher anzunehmen. Würde man unter Berücksichtigung des Glycerinbefundes die wirkliche Menge der Fettsäure zu etwa 90% annehmen, so ergäbe das ein Molekulargewicht von 230–240. Das Molekulargewicht der Palmitinsäure beträgt 256.

Bei den Versuchen, die isolierte Fettsäure in alkoholischer Lösung mit Natronlauge und Phenolphthalein zu titrieren, bekam ich erheblich niedrigere Werte für das Alkalibindungsvermögen, die auf ein Molekulargewicht von etwa 500 hindeuten. Ich habe aber Zweifel an der Richtigkeit dieser Werte, nachdem ich mich davon überzeugt habe, daß der Farbenumschlag ins Rote schon eintritt, ehe alle Fettsäure neutralisiert ist, und zwar sobald durch den Zusatz der wässrigen Natronlauge infolge der Verdünnung des Alkohols die Fettsäure beginnt auszufallen.

Aus dem gleichen Grunde bedürfen meine Bestimmungen für das Barytbindungsvermögen der Fettsäure, die ganz ähnliche Werte ergaben wie die durch Titration mit NaOH, der Nachprüfung.

Die direkte Molekulargewichtsbestimmung durch Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung einer Lösung der Fettsäure in Benzol ergab ein Molekulargewicht von 327.

0,725 g Fettsäure (bei 80° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet) wurden in 11,642 g Benzol gelöst. Die Lösung zeigte eine Gefrierpunktniedrigung von 0,95°.

Ich habe keinen Grund, daran zu zweifeln, daß die benutzte Fettsäure rein und einheitlich war. Meine Kriterien dafür sind: 1, die Beschaffenheit des Ausgangsmaterials (das dreimal umkrystallisierte Wachs mit konstantem Schmelzpunkt), 2. der konstante Schmelzpunkt der Fettsäure (der sowohl bei den beiden Versuchen genau 36° betrug als auch bei den verschiedenen mit der Fettsäure vorgenommenen Operationen immer der gleiche blieb), und 3. das ausgezeichnete und sehr charakteristische Krystallisationsvermögen. Ich bin mir bewußt, daß es sich um keine absolut sicheren Kriterien handelt, da auch Gemenge von Stoffen, z. B. von gallensauren Salzen, sich ähnlich verhalten können.

Der Schmelzpunkt wurde sowohl bei der ursprünglich isolierten Fettsäure bestimmt als auch nach der Neutralisation der alkoholischen Lösung und Wiederausfällen durch Ansäuern und Eintragen in Wasser. Ferner wurde mit derselben Fettsäure eine Jodierung mit Hüblscher Jodlösung vorgenommen (s. später) und dann durch Verdunsten des Chloroforms wieder die Fettsäure mit dem alten Schmelzpunkt zurückgewonnen. Mit der gleichen Masse wurde dann Barytseife hergestellt und aus dieser die Fettsäure mit dem alten Schmelzpunkt wiedergewonnen. Während der ganzen Versuche waren im ganzen von 0,81 g Fettsäure nur 0,1 g verschwunden (zum größten Teil für die Schmelzpunktbestimmungen).

Die Fettsäure zeigte ein ganz eigenartiges Krystallisationsvermögen, was namentlich bei der niedrigen Lage der Schmelzpunkttemperatur sehr auffallend ist. Schon bei wenigen Grad unterhalb 36° begann die krystallinische Erstarrung. Bei Zimmertemperatur war die Masse schneeweiß, talgartig, hart, fast wie Stearin. Die Erstarrung erfolgte, namentlich wenn das Öl in dünner Schicht sich befand, unter Bildung prachtvoller Ringsysteme.

Die Krystallisation der Fettsäure erfolgt von zahlreichen Krystallisationspunkten aus, indem sich immer ein Ring um den anderen herum entwickelt, bis die verschiedenen Ringsysteme einander berühren. Es entwickelt sich so ein außerordentlich zierliches Mosaik von Ringsystemen.

Die Fettsäure ist eine gesättigte Säure. Beim Versuch, die Jodzahl nach Hübl zu bestimmen, ergab sich die Tatsache, daß Jod nicht addiert wird.

Im Versuch 1 wurden 0,199 g Fettsäure nach Hübl mit 15 ccm Chloroform und 20 ccm Jod-Quecksilberchloridlösung behandelt und dann titriert. Gegenüber dem Blindversuch ergab sich ein Verbrauch von 0,5 ccm Thiosulfat (32,9 ccm statt 33,4 ccm) = 0,006 g Jod.

Im Versuch 2 wurden 0,81 g Fettsäure benutzt. Es wurden 0,3 ccm Thiosulfat verbraucht. Durch Verdunsten der Chloroformlösung wurde die Fettsäure wiedergewonnen. Das Gewicht hatte sich nicht verändert. Schmelzpunkt ebenfalls unverändert.

Mit der oben erwähnten Rohfettsäure (aus den Mutterlaugen der Reindarstellung gewonnen), die einen etwas höheren Schmelzpunkt

zeigte als die reine Fettsäure (38–39°), wurde ebenfalls eine Jodierung nach Hübl vorgenommen. Es ergab sich eine Jodzahl von 19.

0,149 g Rohfettsäure verbrauchten 2,3 ccm Thiosulfat = 0,0288 g Jod. Beim Verdunsten des Chloroforms nach der Jodierung hinterblieb eine braunrötliche Masse, während die Rohfettsäure nur schwach gelblich war. Die Masse erstarrte körnig, ohne Bildung von Ringen.

Es geht hieraus hervor, daß der Rohfettsäure eine ungesättigte Fettsäure in geringen Mengen beigemischt ist, die beim Umkrystallisieren entfernt worden ist, ein weiterer Beweis für die Reinheit der zu Versuch I und II benutzten Wachsmasse.

Die bisherigen Beobachtungen haben demnach ergeben, daß das von der Blutlaus abgesonderte Wachs kein eigentliches Wachs im chemischen Sinne ist. Die in reinem Zustand bei 48–49° schmelzende Masse ist das Glycerid einer gesättigten Fettsäure. Die Glycerinmenge wird auf 7–10% geschätzt. Die Fettsäure wurde mit einer Ausbeute von 76% tatsächlich gewonnen. Die Fettsäure schmilzt bei 36°. Dieser niedrige Schmelzpunkt weist auf ein verhältnismäßig niedriges Molekulargewicht hin. Die direkte Molekulargewichtsbestimmung ergab ein Molekulargewicht von 327. Das würde einer gesättigten Fettsäure mit 20–22 C-Atomen entsprechen. Aber schon die Palmitinsäure hat einen erheblich höheren Schmelzpunkt. Es dürfte sich demnach um eine Fettsäure mit verzweigter Kette handeln. Auf alle Fälle ist die gefundene Fettsäure mit den bekannten Fettsäuren der normalen Reihe nicht identifizierbar.

Das untersuchte Fett, das sicher den Hauptbestandteil der Wollfäden der Blutlaus ausmacht, wenn es nicht identisch mit denselben ist, hat mit den bei anderen Insekten beschriebenen Wachsorten nichts gemein, weder mit dem Bienenwachs noch mit dem Cocchenillewachs oder dem Psyllawachs. Es ist das ein interessantes Beispiel dafür, daß im morphologischen System einander nahestehende Tiere in ihrem Chemismus selbst da, wo es sich um Anpassung an verwandte Funktionen handelt, erheblich auseinandergelien können.

In älterer Zeit sind gelegentlich bei Blattläusen besondere Fettsäuren beschrieben.

Ich kann hier nicht darauf eingehen. Ohne Nachuntersuchungen wird es sich nicht entscheiden lassen, ob die bei Schizoneura gefundenen Verhältnisse auch bei anderen Blattläusen mit lebhafter Gespinnstbildung sich wiederfinden lassen. Ich hoffe an etwas reichlicherem Material näheren Aufschluß über die neue Fettsäure gewinnen zu können und habe es daher vermieden, eine besondere Bezeichnung für diese Säure einzuführen.

---

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Wien.)

## Über den Einfluß von Aminosäuren und Fettsäuren auf die Blutzuckerregulation\*).

Von

Leo Pollak (Wien).

(Mit Unterstützung der Fürst Liechtenstein-Spende.)

(Eingegangen am 11. Oktober 1921.)

Mit 24 Abbildungen im Text.

### I.

Zahlreiche Arbeiten der beiden letzten Dezennien haben sich mit dem Problem befaßt, welche Produkte des Eiweiß- oder Fettstoffwechsels im Organismus in Glucose resp. Glykogen umgewandelt werden. Ein großer Teil der gegenwärtigen Anschauungen in dieser Frage stützt sich auf Versuche, die an Tieren im sogenannten totalen Phloridzindiabetes [Graham Lusk<sup>1</sup>), Ringer<sup>2</sup>) u. a.] oder an pankreaslosen Hunden [Embden<sup>3</sup>) und Salomon] ausgeführt wurden. Solchen Tieren wurden Aminosäuren oder Fettsäuren resp. Derivate derselben beigebracht und aus dem in bekannter Weise aus dem D:N-Quotienten berechneten Extrazucker auf ihren Übergang in Glucose geschlossen. Diese Schlußweise ist, wie wiederholt, zuerst wohl von Pflüger<sup>4</sup>), hervorgehoben wurde, nicht zwingend. Der Extrazucker kann ebensowohl durch Umwandlung der zugeführten Substanz in Glucose entstanden sein, als auch durch eine Reizwirkung dieser Substanz erklärt werden, die zur Mobilisierung von Zucker aus Glykogen oder anderen Kohlenhydratquellen des Organismus führt, ähnlich etwa, wie wir dies vom Adrenalin wissen. Schließlich könnten beide Entstehungsarten nebeneinander bestehen. Embden und Almagia<sup>5</sup>) haben versucht, zwischen diesen beiden Möglichkeiten durch den rechnerischen Nachweis, daß die Menge der Extraglucose aus den sehr geringen Glykogenbeständen des Pankreastieres nicht hergeleitet werden könnte, zugunsten der

---

\*) Ein kurzer Bericht über die hier veröffentlichten Untersuchungen wurde von mir auf der Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte 1920 in Bad Nauheim in der pharmakologischen Sektion erstattet.



Annahme einer direkten Umwandlung der Aminosäuren in Zucker zu entscheiden. Aber gerade bei diesen glykogenarmen Pankreastieren wirkt ein typischer Glykogenmobilisator wie Adrenalin besonders stark glykosurievermehrend<sup>6)</sup> und die gleiche Wirkung haben Adrenalin und gewisse Narkotica bei glykogenarmen Phloridzinhungertieren<sup>7)</sup>. Auch konnte ich<sup>8)</sup> selbst zeigen, daß bei Kaninchen, die durch Hunger und Strychnin völlig glykogenfrei gemacht worden waren, trotz weiterer Karenz Adrenalin Glykosurie hervorruft. Wenn es auch sicher richtig ist, daß die Wirkung dieser Zuckermobilisatoren in erster Linie in einer überstürzten Diastasierung des Leberglykogens besteht (manche von ihnen wirken überhaupt nur bei größerem Glykogenvorrat des Organismus, alle wirken bei glykogenreichen Tieren stärker), so ist ihre Wirksamkeit, wie soeben gezeigt, doch durchaus nicht an das Vorhandensein faßbarer Glykogenvorräte in der Leber obligat gebunden. Es läßt sich also die Frage, ob eine Substanz die Glykosurie eines diabetischen Tieres dadurch steigert, daß sie intermediär in Glucose umgewandelt wird (Gluconeogenese), oder dadurch, daß sie Zucker mobilisierend wirkt, d. h. mit anderen Worten, in die normale Blutzuckerregulation störend eingreift, auch durch Versuche am glykogenfreien Tier nicht entscheiden.

Ebenso wenig kommt dem namentlich von Graham Lusk und seiner Schule als Beweis für die direkte Umwandlung in Glucose angesehenen Umstand, daß zugeführte Substanz und Extrazucker in einem fixen quantitativen Verhältnis zueinander stehen, wirkliche Überzeugungskraft zu, da ja z. B. auch die Menge des injizierten Adrenalins und die Menge des ausgeschiedenen Zuckers *ceteris paribus* eine gewisse Proportionalität erkennen lassen. Übrigens ist auch in den Versuchen der amerikanischen Autoren das Verhältnis injizierte Substanz: Extrazucker durchaus nicht konstant, die Schwankungen sind sehr erheblich; ja es finden sich sogar Versuche, in denen die Menge des ausgeschiedenen Extrazuckers bedeutend größer ist, als sie es selbst bei quantitativer Umwandlung des zugeführten Stoffes in Glucose sein könnte, so daß die Autoren zu komplizierten Hypothesen greifen müssen, um das unerwartete Resultat verständlich zu machen (vgl. Ringers Versuche mit Propionsäure und Acetaldehyd<sup>9)</sup>).

Die Annahme, daß die Aminosäuren resp. Fettsäuren in den Versuchen am Pankreastier oder Phlorhizintier nicht (oder nicht nur) als Zuckerbildner, sondern als Glykogenmobilisatoren gewirkt hätten, wurde um so naheliegender, als Fröhlich und ich<sup>21)</sup> an der überlebenden Froschleber gezeigt hatten, daß außer Adrenalin auch zahlreiche andere Substanzen, darunter insbesondere die als intermediäre Stoffwechselprodukte in Betracht kommenden Ketonsäuren zuckermobilisierende Fähigkeit besitzen. Diese Annahme war jedoch zu beweisen und dafür schienen mir die Verhältnisse beim normalen Tier wesentlich günstiger zu liegen als beim pankreaslosen resp. beim phlorizinvergifteten Tier. Bekanntlich gewährleistet im normalen Organismus die Einrichtung der Blutzuckerregulation eine weitgehende Unabhängigkeit der Höhe des Blutzuckerspiegels von der Größe der intermediären Zucker- resp. Gly-

kogenbildung<sup>10</sup>). Nach Zufuhr von Glucose z. B., des hauptsächlichsten Glykogenbildners, bleibt der Zuckerspiegel des Blutes nach dem Abklingen der kurzdauernden Resorptionshyperglykämie normal, ebenso nach peroraler Eiweißzufuhr, obwohl der Übergang eines großen Teiles des verfütterten Eiweißes in Glucose feststeht. Schwankungen in der Blutzuckerhöhe nach parenteraler Zufuhr von Eiweißspaltlingen resp. Fettsäuren konnten daher von vornherein mit großer Wahrscheinlichkeit auf Reizwirkung bezogen werden und weitere Beweise für diese Annahme waren zu suchen. Da nur geringe Ausschläge zu erwarten standen, und die Anlage von Blutzuckerserien nötig erschien, wurde diese Untersuchung erst durch die Einführung und Bewährung der Mikromethode ermöglicht, bei der die durch größere Blutentnahmen und die damit verbundenen Prozeduren bedingten Schwankungen des Blutzuckerniveaus in Wegfall kommen. Wie Bang<sup>11</sup>) gezeigt hat und ich nach eigenen Erfahrungen bestätigen kann, ist der Blutzuckerspiegel eines Karenz-Kaninchens außerordentlich konstant, die durch stündliche oder halbstündliche Bestimmungen erhaltene Blutzuckerkurve nimmt bei solchen Tieren einen ganz flachen Verlauf.

Die Anordnung meiner Versuche war durchwegs derart, daß Kaninchen mittleren Gewichts, die vorher ausreichend ernährt wurden und denen am Vortage 20 g Glucose mittels Schlundsonde gegeben wurde, um eine gewisse Höhe des Glykogenbestandes zu erzielen, nach 12stündiger Karenz zur Untersuchung kamen. Die zu untersuchende Substanz wurde in der Menge von 1 g in 20 ccm Wasser körperwarm subcutan injiziert und zwar wurde, um die Resorption günstiger und den Injektionsreiz möglichst gering zu gestalten, die Flüssigkeit auf 2—3 Injektionsstellen verteilt. In allen Versuchen erfolgte die Injektion knapp nach der ersten Blutentnahme. Die Methodik der Zuckerbestimmung war die letzte von Bang<sup>12</sup>) beschriebene Modifikation seiner Mikromethode. Es wurden durchwegs Doppelbestimmungen gemacht. Vor jeder Serie habe ich Blindbestimmungen ausgeführt, überdies die Verlässlichkeit der Reagentien häufig durch Kontrolle an reinen Traubenzuckerlösungen sicher gestellt. Ich habe mich in eigenen Versuchen ausdrücklich überzeugt, daß der Zusatz von Aminosäuren in Konzentrationen bis zu 1% die Reduktionswerte bei der Bangschen Methode nicht beeinflusst.

## II.

Der erste Versuch zeigt, daß subcutane Injektion von 15 ccm Ringer-Lösung unter den gleichen Bedingungen wie in den folgenden Versuchen appliziert, den Blutzucker nicht beeinflusst.

### Versuch 1.

Kaninchen ♂ 2750 g.

	Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
6. II.	10 <sup>h</sup> 15' a. m.	0,12	15 ccm Warmblüter-Ringer subcutan.
	10 <sup>h</sup> 45'	0,12	
	11 <sup>h</sup> 45'	0,13	
	12 <sup>h</sup> 45'	0,13	
	5 <sup>h</sup> 15' p. m.	0,13	
7. II.	10 <sup>h</sup> a. m.	0,13	

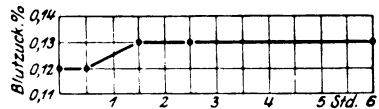


Abb. 1.

Daß auch die Injektion vieler anderer Substanzen für den Blutzuckerspiegel gleichgültig ist, geht zum Teil aus weiter unten veröffentlichten Versuchen hervor. — Ich führe hierfür als Beleg noch einen Versuch mit Harnstoff an.

**Versuch 2.**  
Kaninchen 2600 g.

	Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
23. V.	10 <sup>h</sup> a. m.	0,1	1 g Harnstoff in 20 ccm Wasser subcutan.
	11 <sup>h</sup>	0,11	
	12 <sup>h</sup>	0,12	
	1 <sup>h</sup>	0,1	
	5 <sup>h</sup> p. m.	0,11	

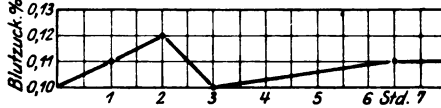


Abb. 2.

Die folgenden Versuche zeigen die Wirkung der Injektion von verschiedenen Aminosäuren. Zunächst zwei mit asparaginsaurem Natrium (zwei andere Versuche verliefen ganz analog).

**Versuch 3.**  
Kaninchen ♀ 2750 g.

	Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
17. II.	11 <sup>h</sup>	0,1	1 g asparaginsaures Natrium (Kahlbaum) in 20 ccm Wasser subcutan.
	11 <sup>h</sup> 30'	0,13	
	12 <sup>h</sup> 30'	0,16	
	1 <sup>h</sup> 30'	0,17	
	5 <sup>h</sup> 30' p. m.	0,11	

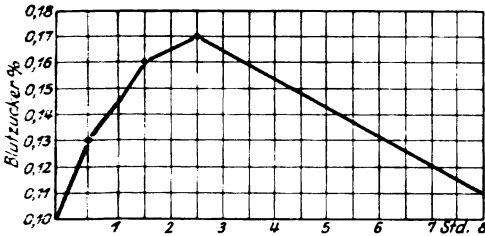


Abb. 3.

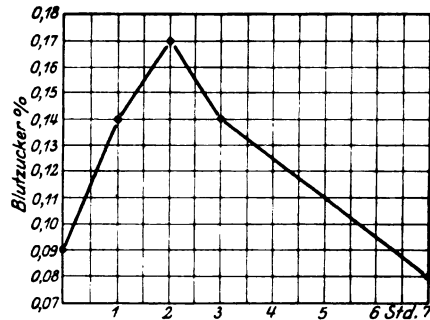


Abb. 4.

**Versuch 4.**  
Kaninchen ♀ 1700 g.

	Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
	10 <sup>h</sup> 30'	0,09	1 g asparaginsaures Natrium subcutan.
	11 <sup>h</sup> 30'	0,14	
	12 <sup>h</sup> 30'	0,17	
	1 <sup>h</sup> 30'	0,14	
	5 <sup>h</sup> 30'	0,08	

In beiden Versuchen sehen wir eine deutliche Beeinflussung der Blutzuckercurve. An Stelle des flachen Verlaufs in den beiden ersten Versuchen tritt ein deutlicher Anstieg, der nach einer halben Stunde schon manifest ist, nach 2 Stunden das Maximum erreicht und nach 6—7 Stunden wieder abgeklungen ist. Die Kurve verläuft also sehr ähn-

lich einer nach subcutaner Adrenalininjektion gewonnenen. Die Größe der Zunahme (von 0,09 auf 0,17) ist geringer als nach den üblichen Adrenalinosen, liegt aber jedenfalls weit außerhalb der Fehlergrenzen. Ganz ähnliche Resultate ergeben die folgenden Versuche mit Glykokoll und Alanin.

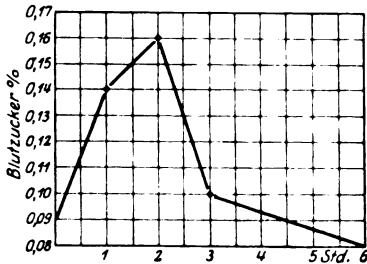


Abb. 5.

## Versuch 5.

Kaninchen ♀ 1700 g.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
10h 30'	0,09	1 g Glykokoll (Kahlbaum) subcutan.
11h 30'	0,14	
12h 30'	0,16	
1h 30'	0,1	
5h 30' p. m.	0,08	

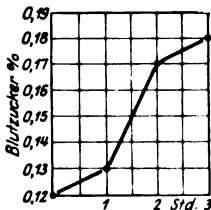


Abb. 6.

## Versuch 6.

Kaninchen ♀ 2700 g.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
10h	0,12	1 g Alanin (Kahlbaum) in 20 ccm Wasser subcutan.
11h	0,13	
12h	0,17	
1h	0,18	

Hingegen zeigt Injektion von 1 g Leucin (in 30 ccm Wasser unter Erwärmen gelöst) keine deutliche Wirkung auf den Blutzucker.

## Versuch 7.

Kaninchen ♀ 2300 g.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
10h	0,1	1 g Leucin (Merck) subcutan.
11h	0,08	
12h	0,09	
1h	0,11	
5h	0,11	

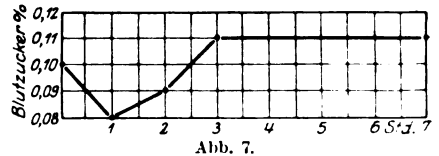


Abb. 7.

Es war nun zunächst zu prüfen, ob die beobachtete Hyperglykämie an das Vorhandensein von Leberglykogen gebunden ist. Versuche an durch Hunger und Strychninkrämpfe völlig glykogenfrei gemachten Tieren konnte ich mit Rücksicht auf den prekären Stand unseres Tiermaterials nicht anstellen (bei diesen Versuchen riskiert man gewöhnlich einige Tiere), aber die folgende Kurve an einem durch anderweitige Versuche erschöpften und durch mehrtägigen Hunger sehr abgemagerten und daher sicherlich glykogenarmen Tier zeigt, daß die Größe der Hyperglykämie zu mindestens vom Glykogenvorrat des Tieres abhängig ist.

Versuch 8.

Kaninchen ♀ 2200 g. Mehrtägiger Hunger, das Tier stark abgemagert.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
10 <sup>h</sup>	0,1	1 g Alanin subcutan.
10 <sup>h</sup> 30'	0,13	
11 <sup>h</sup>	0,12	
12 <sup>h</sup>	0,14	
1 <sup>h</sup>	0,1	

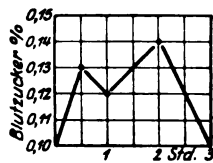


Abb. 8.

Der Gipfel der Kurve liegt niedriger als in dem Alaninversuch Nr. 6, der Ausgangspunkt ist nach 3 Stunden wieder erreicht.

In der Einleitung wurde darauf hingewiesen, daß eine hyperglykämische Wirkung injizierter Eiweißabkömmlinge beim normalen Tier von vornherein mit großer Wahrscheinlichkeit auf Reizwirkung im Sinne einer gesteigerten Glykogenolyse zu beziehen wäre. Es lag nahe zu untersuchen, ob es sich um eine adrenalinähnliche sympathikomimetische Reizwirkung handelt, was durch den Ergotoxinversuch zu entscheiden war. Bekanntlich hat Dale<sup>13)</sup> gezeigt, daß wir im Ergotoxin ein spezifisches Mittel besitzen, um sympathische Reize fördernder Art zu blockieren. Miculicich<sup>14)</sup> hat dann nachgewiesen, daß es durch vorhergehende oder gleichzeitige Ergotoxinbehandlung gelingt, die Adrenalinhyperglykämie und ebenso die auf zentraler Sympathicusreizung beruhende Diuretinhyperglykämie aufzuheben oder zum mindesten stark abzuschwächen. Das gleiche gilt nun auch für die beschriebene Aminosäurenhyperglykämie. Im folgenden Versuch kam das Präparat Ergotamin der Firma Sandoz zur Anwendung, dessen hemmende Wirkung sowohl auf die blutdrucksteigernde als auf die blutzuckersteigernde Funktion des Adrenalins vorher nachgewiesen wurde. An sich beeinflußt es den Blutzucker nicht.

Versuch 9.

Kaninchen ♀ 2250 g.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
9 <sup>h</sup>	0,09	1 mg Ergotamin subcutan. Das Tier ist erregt, schreit, die Ohrgefäße sind kontrahiert.
9 <sup>h</sup> 30'	0,1	
10 <sup>h</sup>	0,09	1 g asparaginsaures Na + 0,5 mg Ergotamin. Das Tier noch immer aufgeregt; schreit bei der Blutentnahme.
11 <sup>h</sup>	0,09	
12 <sup>h</sup>	0,08	
1 <sup>h</sup>	0,1	
3 <sup>h</sup> 30' p. m.	0,08	

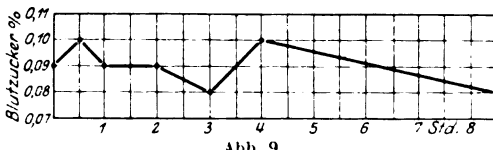


Abb. 9.

Zu der in den übrigen Versuchen mit asparaginsaurem Natrium so deutlich ausgeprägten Hyperglykämie kommt es also unter Ergotaminwirkung nicht, die Blutzuckerkurve nimmt einen ganz flachen Verlauf. Damit

scheint mir bewiesen, daß die Aminosäuren ähnlich wie Adrenalin durch sympathikomimetische Reizwirkung zu Glykogenmobilisierung und dadurch zu Hyperglykämie führen.

Von höher molekularen Eiweißabkömmlingen habe ich noch Witte-Pepton in den Kreis der Untersuchung gezogen.

#### Versuch 10.

Kaninchen ♀ 2750 g.

	Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
28. I.	10 <sup>h</sup> 30'	0,08	15 ccm 5 proz. Lösung von Witte-Pepton subcutan.
	12 <sup>h</sup>	0,13	
	1 <sup>h</sup>	0,17	
	5 <sup>h</sup> p. m.	0,14	
29. I.	12 <sup>h</sup> mittag	0,09	

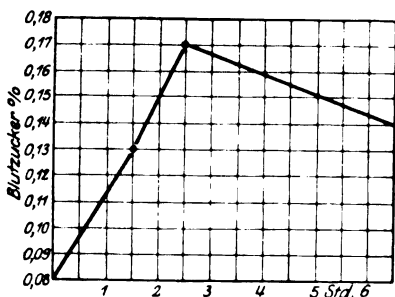


Abb. 10.

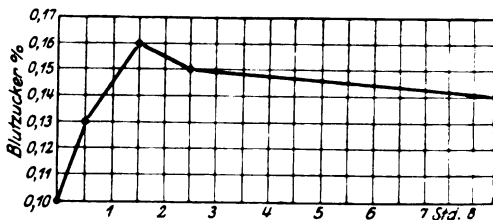


Abb. 11.

#### Versuch 11.

Kaninchen ♀ 2700 g.

	Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
10. II.	9 <sup>h</sup> 25'	0,11	15 ccm 5 proz. Witte-Peptonlösung subcutan.
	9 <sup>h</sup> 55'	0,13	
	10 <sup>h</sup> 55'	0,16	
	11 <sup>h</sup> 55'	0,15	
	5 <sup>h</sup> 55' p. m.	0,14	
11. II.	9 <sup>h</sup> 15' a. m.	0,11	

In beiden Versuchen kommt es zu Hyperglykämie, die nach 8 Stunden noch nicht abgeklungen ist, also länger dauert als die nach Aminosäuren, was mit der langsameren Resorption der Peptonlösung in Zusammenhang stehen dürfte. Es sei hier erwähnt, daß intravenöse Injektion von Pepton nach Versuchen von Mac Guigan<sup>15)</sup> beim Hunde gleichzeitig mit der Schockwirkung eine Blutzuckersenkung hervorruft \*).

\*) Dagegen findet S. Kuriyama<sup>27)</sup> beim Kaninchen nach intravenöser Injektion von 10% Peptonlösung (0,3—0,7 g per kg) gleichfalls Hyperglykämie, ungefähr im gleichen Ausmaße wie in meinen Versuchen und von 3—4 stündiger Dauer.

Mit reinen Eiweißkörpern habe ich keine Versuche angestellt, es ist bereits bekannt, daß subcutane Injektion von Gelatine, Pferdeserum oder Pleuraexsudat bei Menschen eine gleichfalls sehr langsam abklingende Hyperglykämie<sup>16)</sup> erzeugt.

III.

In der gleichen Anordnung wurden weiterhin Versuche mit gesättigten Fettsäuren angestellt, teils aus dem Grunde, weil in den Phloridzinversuchen der amerikanischen Autoren auch gewisse Fettsäuren zur Ausscheidung von Extrazucker geführt haben, teils darum, weil die bekannten Beziehungen dieser Substanzen zur Acetonkörperbildung es von Interesse erscheinen ließen, ihren Einfluß auf die Blutzuckerregulation kennen zu lernen. Die einzelnen Fettsäuren wurden vorsichtig mit Normalnatronlauge oder Natriumcarbonat genau neutralisiert und in Mengen, die 1 g Propionsäure äquimolekular sind, subcutan injiziert. Größere Mengen habe ich absichtlich vermieden, da sich herausstellte, daß z. B. von Normalbuttersäure schon 2 g deutlich toxisch wirkten, die Tiere matt und dyspnoisch wurden, so daß eine uncharakteristische toxische Hyperglykämie etwaige Unterschiede der einzelnen Säuren verschleiert hätte.

Versuch 12.  
Kaninchen ♀ 1700 g.

Zeit	Blutzucker %	Bemrkung
9 <sup>h</sup> 45'	0,1	1,1 g essigsäures Natrium
10 <sup>h</sup> 15'	0,11	(entsprechend 0,85 g
10 <sup>h</sup> 45'	0,11	Essigsäure) in 20 ccm
11 <sup>h</sup> 45'	0,1	Wasser subcutan.
12 <sup>h</sup> 45'	0,11	

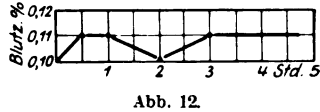


Abb. 12.

Versuch 13.  
Kaninchen ♀ 1700 g.

Zeit	Blutzucker %
10 <sup>h</sup>	0,11
10 <sup>h</sup> 30'	0,19
11 <sup>h</sup>	0,22
12 <sup>h</sup>	0,17
1 <sup>h</sup>	0,15
6 <sup>h</sup> p. m.	0,12

Bemerkung  
1 g Propionsäure (Kahlbaum)  
mit Normalnatronlauge genau neutralisiert in 20 ccm Wasser subcutan.

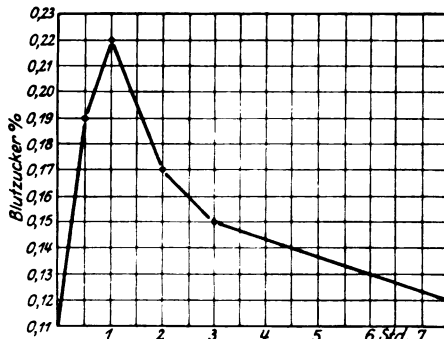


Abb. 13.

## Versuch 14.

Kaninchen 1500 g.

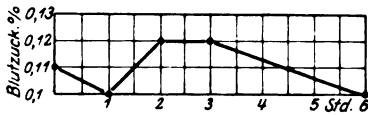


Abb. 14.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
10h	0,11	1,2 g Normalbuttersäure neutralisiert in
11h	0,1	20 ccm Wasser subcutan.
12h	0,12	
1h	0,12	
5h 30' p. m.	0,1	

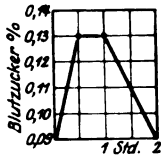


Abb. 15.

## Versuch 15.

Kaninchen ♀ 1700 g.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
10h 15'	0,09	1,2 g Iso-Buttersäure (Kahlbaum)
10h 45'	0,13	neutralisiert subcutan.
11h 15'	0,13	
12h 15'	0,09	

## Versuch 16.

Kaninchen ♀ 1500 g.

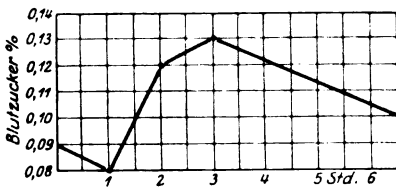


Abb. 16.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
10h	0,09	1,4g Normal-Valeriansäure (Kahlbaum)
11h	0,08	neutralisiert subcutan.
12h	0,12	
1h	0,13	
6h p. m.	0,1	

Die Versuche lassen einen klaren Anstieg des Blutzuckerspiegels eigentlich nur bei Injektion von Propionsäure erkennen. Hier ist (wenigstens im Versuch 13) die Hyperglykämie sogar stärker als in den Aminosäureversuchen. Sicher unbeeinflusst bleibt der Blutzucker nach Essigsäure und wohl auch nach Normalbuttersäure, während die Versuche mit Isobuttersäure und Normalvaleriansäure zwar einen schwachen Blutzuckeranstieg zeigen, der außerhalb der Fehlerquellen der Methodik liegt, dem aber keine rechte Überzeugungskraft zukommt. Die Versuchsanordnung wurde deshalb derart modifiziert, daß gleichzeitig mit den Fettsäuren 1 g Glucose subcutan injiziert wurde, da anzunehmen war, daß ein gleichzeitig gesetzter glykogenolytischer Reiz den Übergang des überschüssigen Zuckers aus dem Blut in die Zellen, in erster Linie in die der Leber, erschweren würde, was sich in einer Verlängerung und Verstärkung der jeder Zuckerinjektion folgenden Resorptionshyperglykämie äußern mußte. Der folgende Versuch zeigt zunächst den Verlauf der Blutzuckerkurve nach subcutaner Injektion von 1 g Glucose.



Versuch 17.

Kaninchen 1500 g.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
10 <sup>h</sup>	0,09	1 g Glucose in 20 ccm Wasser subcutan.
10 <sup>h</sup> 30'	0,13	
11 <sup>h</sup>	0,1	
12 <sup>h</sup>	0,09	
1 <sup>h</sup>	0,09	
5 <sup>h</sup> p. m.	0,09	

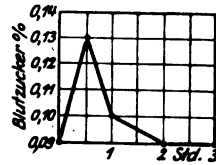


Abb. 17.

Die Resorptionshyperglykämie ist nach einer halben Stunde manifest, nach 1 Stunde ist sie beinahe, nach 2 Stunden völlig abgeklungen. In anderen Versuchen mit 1 g Glucose hatte der Blutzucker schon nach 1 Stunde den Ausgangswert wieder erreicht.

Die Resultate der kombinierten Injektion von Glucose und Fettsäuren zeigen die Versuche 18—22. Selbstverständlich wurden beide Lösungen, die des Zuckers und die der Fettsäuren, an verschiedenen Körperstellen injiziert, um eine gegenseitige Beeinflussung der Resorption auszuschließen.

Versuch 18.

Kaninchen ♀ 1800 g.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
5 <sup>h</sup> 15'	0,11	1 g Glucose und 1,2 g Normal-Buttersäure (neutralisiert) in je 20 ccm Wasser subcutan.
5 <sup>h</sup> 45'	0,13	
6 <sup>h</sup> 15'	0,13	
7 <sup>h</sup> 15'	0,11	

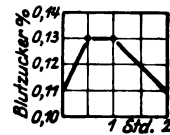


Abb. 18.

Versuch 19.

Kaninchen ♀ 1800 g.

Zeit	Blutzucker %
10 <sup>h</sup> 15'	0,08
10 <sup>h</sup> 45'	0,19
11 <sup>h</sup> 15'	0,14
12 <sup>h</sup> 15'	0,12
1 <sup>h</sup> 15'	0,13
1 <sup>h</sup> 45'	0,12
5 <sup>h</sup> 45' p. m.	0,1

Bemerkung  
1 g Glucose und 1,2 g Isobuttersäure (neutralisiert) in je 20 ccm Wasser subcutan.

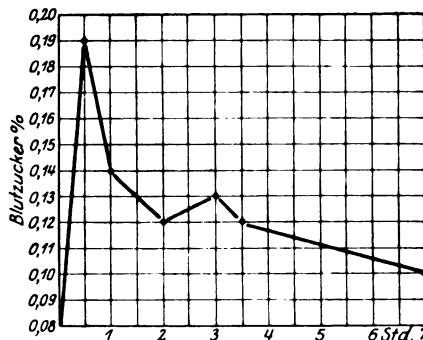


Abb. 19.

## Versuch 20.

Kaninchen ♀ 1800 g.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
10 <sup>h</sup> 30'	0,09	1 g Glucose + 1,4 g Normal-Valeriansäure (neutralisiert) in je 20 ccm Wasser sub- cutan.
11 <sup>h</sup>	0,16	
11 <sup>h</sup> 30'	0,14	
12 <sup>h</sup> 30'	0,12	
1 <sup>h</sup> 30'	0,12	
5 <sup>h</sup> 30' p. m.	0,09	

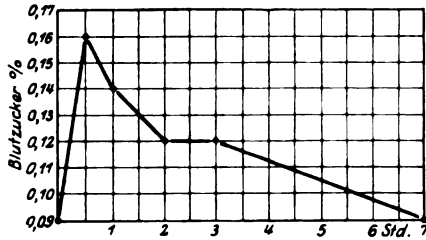


Abb. 20.

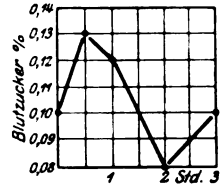


Abb. 21.

## Versuch 21.

Kaninchen ♂ 2200 g.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
5 <sup>h</sup> 15'	0,1	1 g Glucose + 1,4 g Iso-Valeriansäure *) (neutralisiert) in je 20 ccm Wasser sub- cutan.
5 <sup>h</sup> 45'	0,13	
6 <sup>h</sup> 15'	0,12	
7 <sup>h</sup> 15'	0,08	
8 <sup>h</sup> 15'	0,1	

## Versuch 22.

Kaninchen 2400 g.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
10 <sup>h</sup>	0,12	1 g Glucose + 1 g**) Normal-Capron- säure (neutralisiert) in je 20 ccm Wasser subcutan.
10 <sup>h</sup> 30'	0,12	
11 <sup>h</sup>	0,12	
12 <sup>h</sup>	0,11	
	0,11	

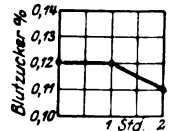


Abb. 22.

Das Ergebnis ist jetzt eindeutig. Bei der Kombination von Glucose mit Normalvaleriansäure und mit Isobuttersäure erreicht der Blutzuckerspiegel nicht nur ein beträchtlich höheres Niveau als bei Injektion von Glucose allein, die Hyperglykämie hält auch merklich länger an. Dagegen ist der Verlauf der Blutzuckerkurve bei der Kombination Glucose—Normalbuttersäure, resp. Glucose—Isovaleriansäure und Glucose—Normalcapronsäure annähernd der gleiche wie bei Injektion von Glucose allein.

Daß der Wirkungsmechanismus der Fettsäuren derselbe ist wie der der Aminosäuren, wurde am Beispiel der Propionsäure, der stärkst-

\*) Ich verdanke das Präparat Herrn Dr. Richard Kolm.

\*\*) Irrtümlich kam in diesem Versuch nur 1 g statt 1,6 g zur Verwendung.

wirkenden aus dieser Gruppe, bewiesen. Beide Teile des folgenden Versuches wurden mit kurzem Zeitintervall an dem gleichen Tier angestellt, das erste Mal 1,5 g Propionsäure allein gegeben, das andere Mal kombiniert mit Ergotamin.

**Versuch 23a.**  
Kaninchen 2200 g.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
10 <sup>h</sup> 30'	0,09	1,5 g Propionsäure (neutralisiert)
11 <sup>h</sup>	0,12	in 40 ccm Wasser subcutan.
11 <sup>h</sup> 30'	0,16	
12 <sup>h</sup> 30'	0,15	
1 <sup>h</sup> 30'	0,13	

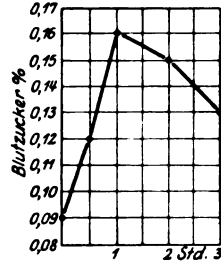


Abb. 23a.

**Versuch 23b.**

Dasselbe Tier. 1<sup>h</sup> 30' 1 mg Ergotamin (Sandoz) subcutan.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
5 <sup>h</sup> 30'	0,08	1,5 g Propionsäure (neutralisiert)
6 <sup>h</sup>	0,08	in 40 ccm Wasser + 0,5 mg
6 <sup>h</sup> 30'	0,1	Ergotamin subcutan.
7 <sup>h</sup> 30'	0,1	
8 <sup>h</sup> 30'	0,09	

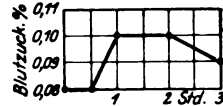


Abb. 23b.

Auch hier verhindert Ergotamin das Zustandekommen der Hyperglykämie. Ebenso fällt der Blutzuckeranstieg äußerst schwach aus, wenn man am glykogenarmen Tier arbeitet, wie der folgende Versuch beweist.

**Versuch 24.**

Kaninchen ♂ 2000 g. Durch mehrtägiges Hungern stark abgemagert.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
5 <sup>h</sup> 15'	0,09	1,5 g Propionsäure (neutralisiert) in 40 ccm
5 <sup>h</sup> 45'	0,11	Wasser subcutan.
6 <sup>h</sup> 15'	0,12	
7 <sup>h</sup> 15'	0,11	
8 <sup>h</sup> 15'	0,11	

Die beiden letzten Versuche widerlegen auch den möglichen Einwand, daß die Zunahme der Reduktionswerte nach der Injektion von Fettsäuren nicht durch Traubenzucker, sondern durch irgendwelche reduzierende Umwandlungsprodukte dieser Fettsäuren bedingt wäre, etwa durch Aldehyde, wie man nach den Arbeiten von Stepp<sup>17)</sup> vermuten könnte. Denn eine solche, an sich sehr unwahrscheinliche Umwandlung, könnte weder vom Glykogengehalt der Leber abhängig sein, noch auch durch Ergotamin verhindert werden.

Ordnet man die bezüglich Blutzuckerzunahme positiven und negativen Fettsäuren in eine Reihe, so ergibt sich folgende Gruppierung:

positiv sind	negativ sind
Propionsäure (stark)	Essigsäure
Isobuttersäure (schwach)	Normalbuttersäure
Normalvaleriansäure (schwach)	Isovaleriansäure
	Normalcapronsäure.

Man erhält also dieselben Reihen, die E m b d e n in seinen bekannten Versuchen über Acetonkörperbildung in der überlebenden Leber gefunden hat, nur ist das Ergebnis gerade entgegengesetzt: Die in meinen Versuchen eine Hyperglykämie auslösenden Fettsäuren, das sind die mit einer ungeraden Anzahl von Kohlenstoffatomen in der nicht verzweigten Kette, bilden nach E m b d e n <sup>18)</sup> keine Acetonkörper, während die acetonkörperbildenden Fettsäuren, nämlich die mit einer geraden Zahl von Kohlenstoffatomen in der unverzweigten Kette den Blutzucker unbeeinflusst lassen. Der gleiche Gegensatz gilt auch für die Aminosäuren. Die einzige, in meinen Versuchen bezüglich Blutzuckers unwirksame Aminosäure, das Leucin, ist nach E m b d e n ein ausgesprochener Acetonbildner, während Glykokoll, Alanin und Asparagin in E m b d e n s Versuchen negative, in meinen Versuchen positive Ausschläge geben. (Tyrosin, gleichfalls ein Acetonbilder, konnte ich nicht untersuchen, da es sich nicht in genügender Konzentration in wässrige Lösung bringen läßt.) In eine Erklärung dieses interessanten Antagonismus möchte ich derzeit nicht eintreten, da sie rein hypothetisch bleiben müßte. Ich hoffe zu dieser Frage durch bereits begonnene Versuche über Acetonkörperbildung später Stellung nehmen zu können.

Die oben beschriebenen Reihen stimmen auch völlig mit den von Ringer<sup>19)</sup> an Phloridzintieren gewonnenen Ergebnissen überein. In seinen Versuchen machen Propionsäure, n-Valeriansäure und n-Heptylsäure Extrazucker und vermindern gleichzeitig die Ausscheidung der Acetonkörper, während Essigsäure, n-Butter- und n-Capronsäure keine Ausscheidung von Extrazucker veranlassen. In der Deutung seiner Versuche nehme ich allerdings, wie bereits eingangs erwähnt, einen anderen Standpunkt ein. Die erwähnte Beziehung zu den Acetonkörpern war der Anlaß, die Einwirkung von Acetessigsäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure auf die Blutzuckerkurve zu studieren. Daß Aceton selbst, offenbar wegen seiner narkotischen Eigenschaften, eine toxische Glykosurie auslöst, ist schon lange bekannt. In Versuchen von Geelmuyden<sup>19)</sup> bewirkte Acetessigsäure beim Phloridzintier Mehrausscheidung von Zucker, und auch in den Versuchen von Fröhlich und mir<sup>21)</sup> an der überlebenden Froschleber hatte es in 0,35 proz. Lösung Glykogenmobilisierung zur Folge. Am normalen Kaninchen läßt es, in der Menge von 1 g subcutan gegeben, den Blutzucker unverändert (zwei Versuche).

Versuch 25.  
Kaninchen 2700 g.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
10 <sup>h</sup>	0,1	1 g Acetessigsäure*) neutralisiert in 20 ccm
11 <sup>h</sup>	0,08	Wasser subcutan.
12 <sup>h</sup>	0,1	
1 <sup>h</sup>	0,1	

Das gleiche negative Resultat ergab Injektion von inaktiver  $\beta$ -Oxybuttersäure.

Versuch 26.  
Kaninchen ♂ 2200 g.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
5 <sup>h</sup> 5'	0,11	1,4 g inaktive $\beta$ -Oxybuttersäure (Kahl-
5 <sup>h</sup> 35'	0,11	baum) neutralisiert in 20 ccm Wasser
6 <sup>h</sup> 5'	0,11	subcutan.
7 <sup>h</sup> 5'	0,1	
8 <sup>h</sup> 5'	0,1	

Schließlich teile ich noch einen Versuch mit Milchsäure mit, weil deren Übergang in Glucose durch zahlreiche Tatsachen erhärtet ist. Trotzdem läßt sie den Blutzuckerspiegel des normalen Tieres in diesem sowie in einem zweiten Versuch unverändert.

Versuch 27.  
Kaninchen 2200 g.

Zeit	Blutzucker %	Bemerkung
5 <sup>h</sup> 30'	0,09	1,3 g milchsaures Lithium (inaktiv) in
6 <sup>h</sup> 30'	0,1	20 ccm Wasser subcutan.
7 <sup>h</sup> 30'	0,09	
8 <sup>h</sup> 30'	0,09	

#### IV.

Das Ergebnis der im Vorstehenden mitgeteilten Versuche läßt sich in wenige Worte zusammenfassen. Gewisse Aminosäuren, wie Glykoll, Alanin, Asparaginsäure, rufen beim normalen Kaninchen in Mengen von 1 g subcutan injiziert eine deutliche Hyperglykämie hervor. Unwirksam ist Leucin, während eine 5 proz. Lösung von Wittepepton den gleichen positiven Effekt hat. Gesättigte Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl von Kohlenstoffatomen wirken gleichfalls blutzuckersteigernd, während die Fettsäuren mit einer geraden Anzahl von Kohlenstoffatomen in dieser Hinsicht unwirksam sind. Das Verhalten der Fettsäuren ist demnach gerade das entgegengesetzte wie bei der Acetonkörperbildung in der überlebenden Leber. Die durch die angeführten Substanzen erzeugte Hyperglykämie ist in ihrer Stärke vom Glykogen-

\*) Aus dem Ester nach Ceresole dargestellt.

bestand der Tiere abhängig und läßt sich durch vorhergehende und gleichzeitige Injektion eines Ergotoxinpräparates komplett aufheben. Sie ist nicht die Folge einer Umwandlung der betreffenden Substanzen in Glucose, sondern beruht offenbar ähnlich wie die Adrenalinhyperglykämie auf gesteigerter Glykogenolyse infolge Erregung sympathischer Nerven. Die Gründe für diese Auffassung wurden bereits erörtert, ich verweise hier noch darauf, daß gerade eine Substanz wie Milchsäure, deren Übergang in Glucose im Tierkörper durch andere Tatsachen gesichert erscheint, den Blutzuckerspiegel nicht beeinflußt. Eine weitere Stütze der Anschauung von der glykogenmobilisierenden Funktion von Eiweißabbauprodukten sehe ich ferner in Befunden, die im Asherschen Laboratorium erhoben wurden. Verfütterung von Pepton macht die Leber von Ratten nahezu glykogenfrei, nach Zufuhr von hydrolysiertem Kasein ist der Glykogengehalt der Leber wesentlich niedriger als nach der gleichen Menge nativen Kaseins [Tschannen<sup>22</sup>]. Pletnew<sup>23</sup>) sah nach Zufuhr von Eiweißspaltlingen, insbesondere nach Pepton, die Zuckerassimilationsgrenze von Hunden absinken.

Ob die Sympathicusreizung durch die genannten Substanzen peripheren oder zentralen Angriffspunkt hat, geht aus meinen Versuchen nicht hervor und müßte an Tieren, deren zur Leber führende Nerven durchtrennt sind, untersucht werden. Hierzu fehlt mir vorderhand das notwendige Tiermaterial.

Durch meine Versuche erscheint zum erstenmal für wohldefinierte Produkte des Eiweiß- und Fettsäureabbaus der Nachweis einer Reizwirkung auf den Glykogenabbau in der Leber erbracht. Die längst bekannte Erscheinung, daß reichliche Eiweißzufuhr bei schweren Fällen von Diabetes mellitus die Assimilation der Kohlenhydrate verschlechtert (eiweißempfindliche Fälle), dürfte in diesen Beobachtungen ihre Erklärung finden; dies um so mehr, als gerade der Pankreasdiabetes gegen sympathikomimetische Reize besonders empfindlich ist (vgl. Eppinger, Falta und Rudinger<sup>6</sup>), O. Loewi<sup>24</sup>), Fröhlich und Pollak<sup>21</sup>). Die bekannte Schwierigkeit, durch Verfütterung von Eiweiß oder Eiweißspaltlingen einen einwandfreien Glykogenansatz zu erzielen und die bei solchen Versuchen erhobenen kontroversen Resultate könnten gleichfalls durch diese Reizwirkung verursacht sein.

Was die eingangs erörterte Frage über den Ursprung des Extrazuckers in den Versuchen an Pankreas- und Phloridzintieren betrifft, so kommt nach meinen Versuchen die Reizwirkung der beigebrachten Aminosäuren und Fettsäuren jedenfalls sehr wesentlich in Betracht. Das macht auch den von Glaessner und Pick<sup>25</sup>) an Phloridzinkaninchen erhobenen Befund verständlich, daß die Steigerung der Glykosurie nach Injektion von Aminosäuren im Hungerzustand viel schwächer ausfällt oder ganz ausbleibt, eine Tatsache, die mit der Theorie der Um-

wandlung in Zucker schwer zu erklären ist. Daß außerdem einzelne der untersuchten Aminosäuren oder Fettsäuren in den Pankreas- resp. Phlorhizinversuchen auch als direkte Glucosebildner fungieren können, wird durch meine Versuche natürlich nicht ausgeschlossen. Anders als beim normalen Tier muß ja beim Pankreas- und Phloridzintier infolge der überstürzten Mobilisierung von Glykogen jede Steigerung der Zuckerbildung durch Zufuhr hierfür geeigneten Materials den Zuckergehalt des Blutes erhöhen. Wieviel von dem ausgeschiedenen Extrazucker auf Reizwirkung, wieviel auf Glykoneogenese zu beziehen ist, ließe sich vielleicht durch Versuche an Phloridzintieren mit gleichzeitiger Ergotoxinanwendung entscheiden. Da die in meinen Versuchen hyperglykämisch wirksamen Aminosäuren einen beträchtlichen Teil des Eiweißmoleküls ausmachen, andererseits der Übergang von Eiweiß in Zucker in großem Umfang anzunehmen ist, ist es von vornherein wahrscheinlich, daß gewisse Aminosäuren sowohl glykogenmobilisierend wirken, als auch direkt in Zucker umgewandelt werden können. Es spricht manches dafür, daß die Aminosäuren und wohl auch Fettsäuren nicht als solche die erwähnte Reizwirkung ausüben, vielmehr erst Umwandlungsprodukte derselben, vielleicht Ketonsäuren das eigentlich Wirksame sind. An der überlebenden Froschleber haben nämlich Fröhlich und ich<sup>21)</sup> bei Durchströmung mit Aminosäuren keine Glykogenmobilisierung feststellen können, wohl aber bei Durchströmung mit Ketonsäuren. Der Gedanke liegt nahe, daß es dann bestimmte Derivate der Aminosäuren sind, die für die Reizwirkung, andere wieder, die für die Umwandlung in Zucker in Betracht kommen. So ist z. B. für das Alanin sowohl der Übergang in Brenztraubensäure als auch in Milchsäure im Tierkörper nachgewiesen. Brenztraubensäure bewirkt aber durch Reizwirkung Hyperglykämie [Paul Mayer<sup>26)</sup>, Fröhlich und ich<sup>11)</sup>], während die Umbildung von Milchsäure zu Zucker durch Untersuchungen der Embdenschen Schule nachgewiesen ist.

#### Literatur.

- <sup>1)</sup> Ringer und Lusk, Zeitschr. f. physiol. Chem. **66**, 106. 1910. — <sup>2)</sup> Ringer, Journ. of biol. chem. **12**, **14** u. **15**. — <sup>3)</sup> Embden und Salomon, Betr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **5**, 507 u. **6**, 63. — <sup>4)</sup> Pflüger, Das Glykogen. 2. Aufl. 1905. — <sup>5)</sup> Embden und Almagia, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **7**, 298. — <sup>6)</sup> Eppinger, Falta und Rudinger, Zeitschr. f. klin. Med. **66**, 1. 1908. — Fröhlich und Pollak, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **77**, 299. 1914. — <sup>7)</sup> Sansum und Woodyatt, Journ. of biol. chem. **21**, 1. — <sup>8)</sup> Pollak, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **61**, 166. 1909. — <sup>9)</sup> Ringer, Journ. of biol. chem. **12**, 541 u. **16**, 563. — <sup>10)</sup> Pollak, L., Med. Klinik 1921, Nr. 31. — <sup>11)</sup> Bang, Der Blutzucker 1913. — <sup>12)</sup> Bang u. Hatlehoel, diese Zeitschr. **87**, 264. 1918. — <sup>13)</sup> Dale, Journ. of physiol. **34**. 1906. — <sup>14)</sup> Miculicich, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **69**, 133. 1912. — <sup>15)</sup> Mac Guigan, Journ. of pharmakol.

6, 604. 1915. — <sup>16)</sup> Löwy, J., Dtsch. Arch. f. klin. Med. **120**, 131. 1916. — <sup>17)</sup> Stepp  
Ergebn. d. Physiol. **19**, 290. 1921. — <sup>18)</sup> Embden, Beitr. z. chem. Physiol. u.  
Pathol. **8**, 121 u. 129. — <sup>19)</sup> Ringer, Journ. of biol. chem. **14**, 43 u. 525. —  
<sup>20)</sup> Geelmuydeen, Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**, 176. 1911. — <sup>21)</sup> Fröhlich  
u. Pollak, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **77**, 265. 1914. — <sup>22)</sup> Tschannen,  
diese Zeitschr. **59**, 202. 1914. — <sup>23)</sup> Pletnew, Zit. nach Tschannen, diese  
Zeitschr. **59**, 202. — <sup>24)</sup> Loewi, O., Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **59**. 1908.  
— <sup>25)</sup> Glaessner u. Pick, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **10**, 473. — <sup>26)</sup> Mayer,  
P., diese Zeitschr. **40**, 441. 1912 u. **49**, 486. 1913. — <sup>27)</sup> S. Kuriyama, Journ.  
of biol. chem. **29**, 127. 1917.



# Über die Ermittlung des Tyrosingehaltes von Proteinen.

Von

Otto Fürth und Walter Fleischmann.

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener Physiologischen Universitätsinstitutes.)

(Eingegangen am 16. Oktober 1921.)

Vor etlichen Jahren haben O. Folin und W. Denis<sup>1)</sup> ein bequemes colorimetrisches Verfahren zur Ermittlung des Tyrosingehaltes von Proteinen mitgeteilt. Dasselbe beruht auf einer Farbenreaktion, welche das Tyrosin ebenso wie andere Phenolderivate mit einem (aus Natriumwolframat, Phosphormolybdänsäure und Phosphorsäure bereiteten) Reagens gibt. Es erschien nun aber sehr auffallend, daß die neue Methode Zahlen lieferte, welche die bisher vorliegenden auf gravimetrischem Wege (durch Wägung des aus den Hydrolysaten abgeschiedenen Tyrosins) gewonnenen Werte erheblich, zuweilen um mehr als das Doppelte, überstiegen, und es ergab sich die Frage, ob das an sich schwer lösliche Tyrosin sich denn wirklich gar so unvollständig aus den neutralisierten Eiweißhydrolysaten abscheidet.

Diese Frage ist von E. Abderhalden und D. Fuchs<sup>2)</sup> auf Grund von Versuchen mit Tyrosin, das sie Leimlösungen zugesetzt hatten, entschieden verneint worden: „Im Gegensatz zu Folin und Denis glauben wir, daß es möglich ist, auf dem beschriebenen Wege und oft auch ohne die Fällung mit Phosphorwolframsäure das gesamte Tyrosin zu gewinnen. Dagegen stimmen wir Folin und Denis und ferner auch Osborne darin vollkommen zu, daß die meisten bisher veröffentlichten Tyrosinbestimmungen nicht mit der nötigen Sorgfalt ausgeführt sind. Die Bestimmung des Gehaltes eines Proteins an Tyrosin erfordert viel Aufmerksamkeit und von Fall zu Fall besondere Maßnahmen, um Verluste durch in Lösung bleibendes Tyrosin zu verhindern. Die colorimetrische Methode von Folin und Denis vermag die Bestimmung des Tyrosins durch Krystallisation nicht zu ersetzen, weil sie auch andere Aminosäuren nachweist und infolgedessen zu hohe Werte liefert.“ Es schien da vor allem das Tryptophan in Betracht zu kommen. Jedoch auch das Oxyprolin gibt, wie die Autoren meinen, Blaufärbung mit dem Folin-Denis-Reagens. „Es ergibt sich aus den gemachten Beobachtungen ein Grund mehr zur Ablehnung der von Folin und Denis zur Tyrosinbestimmung vorgeschlagenen Methode und der mit ihr erhal-

<sup>1)</sup> O. Folin and W. Denis, Journ. of biol. chem. **12**, 239 u. 245. 1912.

<sup>2)</sup> E. Abderhalden und D. Fuchs, Zeitschr. f. physiol. Chem. **83**, 473 u. 85, 90. 1913.

tenen Resultate.“ In ähnlichem Sinne ablehnend äußerten sich auch R. A. Aders Plimmer und E. C. Eaves (s. u.) sowie neuerdings R. Aiken Gortner und G. E. Holm<sup>1)</sup> sowie P. Thomas und A. Chabrié<sup>2)</sup>. Dieser Meinung gegenüber haben aber C. O. Jones und D. Breise Jones<sup>3)</sup> betont, das Tryptophan könne die Bestimmung nicht beeinträchtigen, da es bei Säurehydrolyse vollständig zerstört wird. Ebenso dürfte sich das Oxytryptophan verhalten. Jedoch auch das Oxyprolin könne nicht als störend betrachtet werden; gibt doch die Gelatine, die 6% davon enthält, nach Hydrolyse mit dem Folinschen Reagens nur eine ganz schwache (wahrscheinlich auf Tyrosin zurückzuführende) Färbung.

Die Frage, ob das Folinsche Verfahren brauchbare oder zu hohe Werte liefert, ist also vorderhand als eine offene zu betrachten, und erschien uns eine kritische Nachprüfung derselben dringend erwünscht.

Es erschien aber weiterhin geboten, nach anderen Möglichkeiten außer der gravimetrischen Bestimmung Umschau zu halten, um über den wahren Tyrosingehalt der Proteine zu einem annähernd richtigen Urteile zu gelangen.

Da stießen wir denn vor allem auf die Versuche von A. I. Brown und E. Th. Miller<sup>4)</sup>, die später von R. A. Aders Plimmer und E. Cowper Eaves<sup>5)</sup> fortgesetzt und ausgestaltet worden sind. Derselben liegt der durchaus beachtenswerte Gedanke zugrunde, das recht konstante Bromadditionsvermögen des Tyrosins der Bestimmung des Gehaltes der Proteine an dieser Aminosäure zugrunde zu legen. Wenn diese Versuche zu keinen positiven Resultaten geführt hatten, so geschah dies, wie später auseinandergesetzt werden soll, nur darum, weil die genannten Autoren die Säurehydrolyse vermeiden zu müssen glaubten und sich, wohl oder übel, mit der tryptischen Verdauung behelfen.

Ein anderer Weg hat sich uns in dem auf der Millonsschen Farbenreaktion basierenden neuen colorimetrischen Verfahren von M. Weiss<sup>6)</sup> erschlossen, das zwar nur als Vorgang annähernder Schätzung gelten kann, als solcher sich aber immerhin brauchbar erwiesen hat.

Eine vierte Möglichkeit ergab sich uns endlich aus einem Diazotierungsverfahren. Auf dem Umstande, daß das Histidin, wie Pauly festgestellt hat, durch die Eigenschaft ausgezeichnet ist, mit Diazoniumverbindungen schöne Farbenreaktionen zu geben, ist seiner-

<sup>1)</sup> R. Aiken Gortner und G. E. Holm, Journ. of the Americ. chem. soc. **42**, 1678. 1920; Chem. Centralblatt **1920**. IV. 668.

<sup>2)</sup> P. Thomas und A. Chabrié, Cpt. rend. de l'Acad. **170**, 1622. 1920; Chem. Centralblatt **1920**. IV. 369.

<sup>3)</sup> Journ. biol. chem. **36**, 319. 1918.

<sup>4)</sup> A. I. Brown and E. Th. Miller, Journ. of the Americ. chem. soc. **89a**, 145. 1906.

<sup>5)</sup> R. A. Aders Plimmer and Elizabeth Cowper Eaves, Biochem. Journ. **7**, 297. 1913.

<sup>6)</sup> M. Weiss, diese Zeitschr. **97**, 170. 1919.

zeit in diesem Laboratorium von M. Weiss und N. Ssobolew<sup>1)</sup> ein colorimetrisches Verfahren, im Heidelberger Physiologischen Institute<sup>2)</sup> ein titrimetrischer Vorgang zur quantitativen Bestimmung des Histidins basiert worden. Nun ist, soweit bekannt, unter den Bruchstücken des Eiweißmoleküles, neben dem Histidin, nur noch das Tyrosin befähigt, beim Diazotierungsversuche gefärbte Verbindungen zu geben. Man konnte also, nach Beseitigung des Histidins aus einem Eiweißhydrolysgemenge durch Phosphorwolframsäurefällung, immerhin versuchen, im Filtrate das Tyrosin mit Hilfe der Diazoreaktion colorimetrisch zu ermitteln.

Wir gehen nunmehr zur Mitteilung unserer Versuche über.

### I. Colorimetrisches Verfahren von Folin und Denis.

1. Wir haben damit begonnen, die Zuverlässigkeit des Verfahrens an reinen Tyrosinlösungen nachzuprüfen.

Das Phenolreagens wurde entsprechend den Vorschriften von Folin und Denis bereitet<sup>3)</sup>. Tyrosinlösungen verschiedener Verdünnung wurden (von Tyrosin 0,02% [Kahlbaum] in  $\frac{2}{10}$ -HCl gelöst, ausgehend) hergestellt. Die Reaktion wurde meist so ausgeführt, indem je 5 ccm der Lösung mit 5 ccm Phenolreagens und 25 ccm gesättigter Natriumcarbonatlösung versetzt wurden.

Zum Vergleiche wurden auch einige Versuche mit p-Oxybenzoesäure (Kahlbaum) herangezogen. Die Versuche sind in nachfolgender Tabelle wiedergegeben.

Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß jener Konzentrationsbereich, wo überhaupt von einer annähernden Proportionalität zwischen Konzentration und Färbungsintensität die Rede sein kann, ziemlich eng gezogen ist (etwa 0,005—0,020% Tyrosin). Jedoch auch innerhalb dieses Bereiches ist die Fehlerbreite keineswegs gering (etwa 5—30%). Jenseits einer Konzentration von 0,02% bleibt die Reaktion eben einfach stecken, derart, daß die Ablesungen am Dubosq-Colorimeter ganz unbrauchbare Resultate ergeben<sup>4)</sup>. Auch ein Mehr-

<sup>1)</sup> M. Weiss und N. Ssobolew (chem. Abteilung des Wiener physiol. Inst.), diese Zeitschr. **58**, 119. 1913.

<sup>2)</sup> Lautenschläger, Zeitschr. f. physiol. Chem. **102**, 226. 1918.

<sup>3)</sup> 20 g Natriumwolframat (z. Analyse Kahlbaum) und 4 g Phosphormolybdän-säure wurden in 100 ccm Wasser gelöst, dazu 50 ccm 17proz. Phosphorsäure (= 8,5 g reiner Phosphorsäure). Es wurde 2 Stunden lang unter Rückflußkühlung gekocht, abgekühlt und auf 200 ccm aufgefüllt.

<sup>4)</sup> Zu einem ganz analogen Resultate sind kürzlich Ross Aiken Gortner und George E. Holm bei ihren sorgfältigen (erst nachträglich zu unserer Kenntnis gelangten) Untersuchungen gekommen (l. c. p. 1692): „The amount of color which is developed in a solution is not a linear function of the concentration of the reactive material, but the color values fall off sharply as concentration increases, until only an insignificant fraction of the reactive material is indicated by the measurement of the color values of the solutions, containing any considerable amount of the reactive substances.“

Tabelle I.

Statt %	wurden gefunden %								
	Tyrosin						Oxybenzoesäure		
	a	b	c	d	e	f	g	a	b
0,005	0,008	0,008		0,007					
0,006						0,008			
0,008						0,009			
0,010	0,014	0,012		0,013		0,010		0,013	0,015
0,012			0,017		0,015	0,012			0,017
0,013					0,017				
0,014			0,018		0,018	0,014			0,020
0,015	0,018	0,016		0,018	0,020			0,019	
0,016			0,019		0,020	0,014			0,020
0,017					0,020				
0,018					0,020	0,016			0,021
0,019			0,021		0,020				
0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,016	0,020	0,020	0,020
0,022			0,025						
0,025	0,022		0,025	0,023		0,018			
0,026			0,026						
0,030		0,024		0,024		0,022			
0,033	0,022								
0,035	0,022	0,026							
0,040	0,019	0,028		0,024		0,033	0,033	0,020	
0,060								0,030	
0,080								0,041	
0,100								0,040	

zusatz von Phenolreagens ändert nichts an dem Sachverhalte. Wenn man daher groben Täuschungen entgehen will, darf man es nicht versäumen, wenn man eine Bestimmung dieser Art ausgeführt hat, sich davon zu überzeugen, ob nicht eine Wiederholung der Bestimmung mit verschiedenen Verdünnungsgraden der Tyrosinlösung das Resultat wesentlich ändert.

2. Wir haben nun weiter versucht, bei einer Anzahl von Protein-substanzen den darin enthaltenen Tyrosingehalt colorimetrisch zu ermitteln. Ein Beispiel mag unseren Vorgang veranschaulichen.

#### Tyrosinbestimmung im Casein.

1 g käuflichen Caseins wurde, genau eingewogen, mit 25 ccm Salzsäure 20% in halblitrigen Kjeldahl-Kolben 12 Stunden lang unter Rückflußkühlung hydrolysiert. Die schwarze trübe Lösung wurde in einen Meßkolben übergespült, auf 100 ccm aufgefüllt, sodann zur Beseitigung der Melanoidine durch ein trockenes Barytfilter filtriert (Lösung a = 1proz. Caseinhydrolysat).

Von dieser Lösung a wurden 2 ccm mit 5 ccm Phenolreagens und 25 ccm einer gesättigten Natriumcarbonatlösung versetzt. Nachdem die Reaktion ihr Maximum erreicht hatte, wurde im Meßkolben auf 100 ccm verdünnt (Lösung a/50).

Die Standardlösung wurde nun in der Weise bereitet, daß 5 ccm einer 0,020proz. Tyrosinlösung mit 5 ccm Phenolreagens und 25 ccm  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ges.

versetzt und schließlich auf 100 ccm verdünnt wurden. Die Konzentration des Tyrosins in dieser Lösung betrug sodann 0,001%.

Beim colorimetrischen Vergleiche mit Hilfe des Dubosq-Colorimeters entsprach einer Schichtdicke von 20 mm der Standardlösung eine solche von 15,5 mm der Lösung a/50.

Berechnung:  $x: 0,001 = 20: 15,5$ ,  $x = 0,0013$ .

Die Lösung a/50 entspricht sonach einer 0,0013proz. Tyrosinlösung, die Lösung a sonach einer 0,065proz. Tyrosinlösung.

100 ccm des Caseinhydrolysates a, die 1 g Casein entsprechen, enthalten sonach 0,065 g Tyrosin, d. h. Casein enthält **6,5% Tyrosin**.

Zwei weitere Bestimmungen analoger Art ergaben **6,2** bzw. **6,1%** Tyrosin; in guter Übereinstimmung mit den eigenen Bestimmungen von Folin und Denis, die bei ihren Caseinanalysen die Werte **6,5** bzw. **6,5%** gefunden hatten.

In analoger Weise wurden eine Anzahl von Proteinen der Analyse unterworfen. Die Resultate finden sich in Tabelle II zusammengestellt. Der Vergleich mit den danebenstehenden gravimetrischen Tyrosinwerten älterer Analysen ergibt nur bei dem außerordentlich tyrosinreichen Fibroin gute Übereinstimmung (Folin - Denis 11%, gravimetrische Bestimmung  $10\frac{1}{2}\%$ ). In allen anderen Fällen erscheinen die nach Folin - Denis ermittelten Zahlen sehr erheblich, meist um ein Vielfaches größer als die gravimetrischen Zahlen.

3. Fehlerquellen. Wir haben uns nunmehr auf die Suche nach Fehlerquellen des Verfahrens gemacht. Wir haben uns davon überzeugt, daß das Folin'sche Phenolreagens Farbenreaktionen mit Reduktionsmitteln der verschiedensten Art gibt, so mit Schwefelwasserstoffwasser, Amoniumsulfid, Zinnchlorür, Acetaldehyd und Formaldehyd, und es liegt auf der Hand, daß es kaum möglich ist, in einem so komplizierten Gemenge, wie es eine Eiweißhydrolysenflüssigkeit nun einmal ist, das Wirksamwerden reduktiver Faktoren von vornherein auszuschließen.

Insbesondere hat sich unser Verdacht einerseits auf die Aldehydgruppe etwa vorhandenen Glucosamins, andererseits aber auf das Cystin und den bei Zerstörungen desselben auftretenden Schwefelwasserstoff gelenkt. Was das erstere betrifft, gibt eine nicht allzu verdünnte Lösung von Glucosaminchlorhydrat (ebenso eine Trauben- oder Rohrzuckerlösung) eine kräftige Farbenreaktion. Tatsächlich kann aber die in einer Eiweißhydrolysenflüssigkeit evtl. auftretende Glucosaminmenge nicht ausreichen, um eine sehr weitgehende Fälschung der Analysenresultate zu erklären<sup>1)</sup>.

Ähnliches gilt auch von einer Cystinbeimengung: Eine Gelatineprobe, die eine Beimengung von 10% Cystin enthielt, gab nach 12stündiger Hydrolyse mit

<sup>1)</sup> Ein Gemenge von 0,01% Tyrosin mit 0,01% Glucosaminchlorhydrat ergab (statt 0,01%) 0,012% Tyrosin, ein solches mit 0,05% Glucosaminchlorhydrat 0,013%. Ein Gemenge von Gelatine mit Glucosamin, das 3% von dem letzteren enthielt, gab, nach vollzogener Hydrolyse, nur eine spurenweise Folin-Denis-Reaktion.

konz. Salzsäure nur eine blaßblaue Färbung mit dem Phenolreagens, kaum viel stärker als eine Lösung des analogen reinen Gelatinehydrolysates<sup>1)</sup>.

Es ergab sich weiterhin, daß die unbekannte, die Analysenresultate fälschende Beimengung nicht durch Phosphorwolframsäure fällbar ist. Eine colorimetrische Tyrosinbestimmung im Casein (s. o.) nach vorausgegangener Ausfällung des Hydrolysates mit diesem Fällungsmittel ergab noch immer 6,0%, also kaum weniger wie früher (6,1—6,5%).

Auch läßt sich die schuldtragende Beimengung nicht durch Ausschütteln mit Amylalkohol und nachfolgende Wasserdampfdestillation beseitigen. Ein Hydrolysat von Legumin gab direkt 5,5—6,0% Tyrosin, nach Ausschütteln mit Amylalkohol und darauffolgender 1½-stündiger Wasserdampfdestillation 6,0%.

Eine sehr auffällige und für die Beurteilung der Zuverlässigkeit des Folin - Denisschen Verfahrens sehr wichtige Beobachtung haben wir aber beim Eindampfen von Proteinhydrolysaten gemacht.

Ein Keratinhydrolysat hatte uns Werte von 6,3—6,7% Tyrosin ergeben (während E. Fischer und Dörpinghaus gravimetrisch nur 4,6% Tyrosin gefunden hatten). Das salzsaure Hydrolysat wurde nun am Wasserbade fast zur Trockne gedampft, sodann der Rückstand mit Wasser wieder auf das ursprüngliche Volumen gebracht. Die Bestimmung nach Folin - Denis ergab nunmehr 10% (!) Tyrosin.

Im Fibrin hatten frühere Beobachter auf gravimetrischem Wege 3,3—3,8% Tyrosin gefunden. Wir fanden auf colorimetrischem Wege 7½—8% Tyrosin, nachdem wir aber das salzsaure Hydrolysat zur Trockne gedampft hatten, ergab die Colorimetrie nunmehr 10½% Tyrosin.

Offenbar hat sich also beim andauernden Eindampfen der salzsauren Lösungen irgend eine sekundäre Zersetzung vollzogen (wobei vermutlich irgend ein reduktiver Faktor zur Geltung kommt) und hat der auf Tyrosin bezogene colorimetrische Wert nicht nur keine Abnahme, vielmehr eine erhebliche Zunahme erfahren.

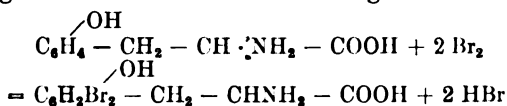
Man muß nun annehmen, daß jede Hydrolyse imstande sein könnte, eine derartige, die Analysenresultate fälschende Veränderung hervorzurufen.

Wir gelangen daher, im Vereine mit früheren Überlegungen, zu dem Resultate, daß die Bestimmung nach Folin und Denis nicht geeignet ist, eine verlässliche Beurteilung des Tyrosin-gehaltes von Proteinen zu ermöglichen, daß vielmehr die auf diesem Wege gewonnenen Werte nur als Maximalwerte gelten dürfen.

<sup>1)</sup> Cystein (aus Cystin durch Reduktion mit granuliertem Zinn in salzsaurer Lösung und Beseitigung des Zinns mit Schwefelwasserstoff gewonnen) gab intensive Blaufärbung mit dem Phenolreagens, etwa halb so stark wie die entsprechende Tyrosinmenge. Dagegen gab Thioessigsäure keine Farbenreaktion.

## II. Bromadditionsverfahren.

E. Th. Millar<sup>1)</sup> hat seinerzeit festgestellt, daß Tyrosin in salzsaurer Lösung mit Brom nach der Gleichung:



reagiert. Es wurde dies in der Art ermittelt, daß eine salzsaure Tyrosinlösung mit KBr, sodann mit  $\frac{m}{30}$  NaBrO<sub>3</sub> versetzt wurde. Das dabei nach der Gleichung:



in Freiheit gesetzte Brom wird schnell an das Tyrosin anaddiert. Der Bromüberschuß wird schließlich festgestellt, indem KJ hinzugefügt und das durch Brom in Freiheit gesetzte J in üblicher Weise mit Hilfe von Thiosulfat und Stärkekleister titriert wird<sup>2)</sup>.

Das theoretische Erfordernis für 1 g Tyrosin beträgt im Sinne obiger Gleichung 1,765 g Br. Millar hat praktisch 1,808 g gefunden.

Wir haben einige Versuche ausgeführt, um das Bromadditionsvermögen des Tyrosins zu kontrollieren:

Beispiel: 0,2 g Tyrosin (aus Hornspänen gewonnen, durch wiederholte Umkrystallisation gereinigt) wurde in 40 ccm HCl 1proz. gelöst; dazu 25 ccm konz. HCl und 50 ccm NaBr 2proz. Nunmehr wurde aus einer Bürette langsam  $\frac{m}{30}$  NaBrO<sub>3</sub> bis zum Eintritte einer bleibenden intensiv gelben Färbung hinzugefügt. Es wurden 26,7 ccm  $\frac{m}{30}$  NaBrO<sub>3</sub> verbraucht. Sodann wurde 20 ccm NaJ 4proz. und etwas Stärkekleister hinzugefügt und mit  $\frac{n}{10}$ -Thiosulfat zurücktitriert; Verbrauch 4,4 ccm  $\frac{n}{10}$ -Thiosulfat. Da, im Sinne obiger Gleichung, einem Kubikzentimeter  $\frac{m}{30}$  NaBrO<sub>3</sub> je 2 ccm  $\frac{n}{10}$ -Brom entsprechen, ergibt sich die Berechnung:

$$\begin{array}{r} 2 \times 26,7 = 53,4 \frac{n}{10}\text{-Br} \\ \underline{\quad \quad \quad - 4,4} \\ 49,0 \frac{n}{10}\text{-Br} \end{array}$$

Da 1 ccm  $\frac{n}{10}$ -Br = 0,008 g Br entspricht, so ergibt sich ein Bromverbrauch von  $49,0 \times 0,008 = 0,392$  g Brom für 0,2 g Tyrosin oder

$$1,960 \text{ g } \text{,,} \text{,, } 1,0 \text{ g } \text{,,}$$

Weitere Versuche ähnlicher Art ergaben für 1 g Tyrosin eine Bromaddition von

$$\begin{array}{l} 1,952 \text{ g} \\ 2,004 \text{ g} \\ 2,100 \text{ g} \\ 1,816 \text{ g} \\ 1,792 \text{ g} \end{array} \left. \begin{array}{l} \text{Zurücktitrieren eines größeren Brom-} \\ \text{überschusses nach einer Wartezeit} \\ \text{von 5—15 Minuten.} \\ \text{Vermeidung eines größeren Bromüber-} \\ \text{schusses und einer längeren Wartezeit.} \end{array} \right\}$$

<sup>1)</sup> I. H. Millar, Transact. Guinness Research Labor. 1903. I. Part. vergl. A. I. Brown und E. Th. Millar l. c. und R. A. Aders Plimmer and Elizabeth Cowper Eaves l. c. — Aus einer neuen Mitteilung von R. Zeynek, Zeitschr. f. physiol. Chem. 114, S. 276 (1921) geht hervor, daß in Eisessig suspendiertes Tyrosin unerwartet glatt unter Bildung des 3,5-Halogenderivates auf die Einwirkung von Chlor oder Brom reagiert.

<sup>2)</sup> Wir erhielten aus 10 ccm einer durch Einwägung hergestellten  $\frac{m}{30}$  NaBrO<sub>3</sub> eine Jodabscheidung entsprechend 19,4, 20,2 und 19,5 ccm  $\frac{n}{10}$ -Thiosulfat (statt 20,0 ccm theoretisch).

Die Bromaddition an das Tyrosin erfolgt also tatsächlich im Sinne obiger Gleichung und erscheint demnach als eine feste Basis für ein Tyrosinbestimmungsverfahren von vornherein nicht ungeeignet.

R. A. Aders Plimmer und E. C. Eaves<sup>1)</sup> betonten, daß von den Bestandteilen des Eiweißmoleküls nur das Tyrosin, Tryptophan und Histidin, nicht aber das Cystin und Phenylalanin befähigt sind, Brom aufzunehmen. In Unkenntnis der inzwischen sichergestellten Tatsache, daß bei totaler Säurehydrolyse das Tryptophan unter Abscheidung schwer löslicher Melanoidine vollständig zerstört wird<sup>2)</sup>, haben sie von einer Säurehydrolyse ganz Abstand genommen und sich mit der Trypsinverdauung begnügt. Dabei halfen sie sich mit der höchst unsicheren und willkürlichen Annahme<sup>3)</sup>, bei kurzdauernder Trypsinverdauung werde nur Tyrosin und noch kein Tryptophan abgespalten. Wenn man nun das Verdauungsgemenge durch Phosphorwolframsäurefällung von Histidin befreit und nunmehr das Bromadditionsvermögen feststellt, so sei dies auf Tyrosin zu beziehen. So wurde eine 1 proz. Caseinlösung in  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,25% unter Chloroformzusatz 5 Stunden bis 4 Tage mit Trypsin 0,1% digeriert und portionenweise analysiert. Es würde sich so als Tyrosinabspaltung ergeben:

Nach 5	6	23	30	48	96	Stunden
5,35	5,34	6,35	8,23	7,98	8,23%	Tyrosin

Die Autoren legten sich nun den Sachverhalt so zurecht, daß sie annahmen, die Zahlen nach 6 Stunden seien die richtigen Tyrosinzahlen, und das spätere Plus sei auf Abspaltung von Tryptophan zu beziehen.

Es liegt auf der Hand, daß tatsächlich auf einer so schwankenden Grundlage ein Bestimmungsverfahren unmöglich aufgebaut werden kann. Wohl aber schien es von vornherein vielversprechend, nach erfolgter Säurehydrolyse und Fällung mit Phosphorwolframsäure in dem wasserhellen, von Tryptophan und Histidin freien Filtrate das Tyrosin auf dem Wege der Bromaddition zu bestimmen. Dieser Weg hat sich tatsächlich als gangbar und aussichtsvoll erwiesen.

Beispiel:

#### Tyrosinbestimmung im Casein.

10 g getrockneten Caseins wurden mit 50 ccm konz. HCl unter Rückflußkühlung hydrolysiert; sodann wurde in eine Schale übergespült, am Wasserbade fast zur Trockne gebracht und in 100 ccm Wasser aufgenommen. Dazu 200 ccm Phosphorwolframsäure 20% (Kahlbaum). Nach 2 Tagen wurde scharf abgenutscht, dreimal mit (mit Salzsäure angesäuerter) verdünnter Phosphorwolframsäurelösung nachgewaschen. Es fällt noch ein grobgeballter Niederschlag aus, der abfiltriert wird. Das Gesamtvolumen des farblosen, wasserhellen Filtrates beträgt 350 ccm,

<sup>1)</sup> l. c. S. 301 u. 303.

<sup>2)</sup> Vgl. diesbezüglich O. Fürth und F. Lieben, Colorimetrische Untersuchungen über das Tryptophan IV. Über Melanoidinbildung bei der Säurehydrolyse von Proteinen und ihre Abhängigkeit von Tryptophankomplexen. Diese Zeitschr. **116**, 224. 1921.

<sup>3)</sup> Vgl. diesbezüglich O. Fürth und F. Lieben, Colorimetrische Untersuchungen über das Tryptophan III. Über die Abspaltung des Tryptophans beim Verdauungsvorgange. Diese Zeitschr. **109**, 153. 1921.



davon werden 70 ccm (entsprechend 2 g Casein) weiter verarbeitet. Es werden 70 ccm konz. HCl und 30 ccm NaBr 2% hinzugefügt; sodann läßt man aus einer Bürette  $\frac{m}{30}$  NaBrO<sub>3</sub> bis zu dauernder Gelbfärbung (13,8 ccm) hinzuzießen. Nunmehr wird NaJ (10 ccm einer 4 proz. Lösung) nebst Stärkekleister hinzugefügt und mit  $\frac{n}{10}$ -Thiosulfat zurücktitriert. Verbrauch 3,5 ccm.

$$\begin{array}{r} 13,8 \times 2 = 27,6 \text{ ccm } \frac{n}{10}\text{-Brom} \\ - 3,5 \text{ ccm } \frac{n}{10}\text{-Brom} \\ \hline 24,1 \text{ ccm } \frac{n}{10}\text{-Brom} \end{array}$$

$24,1 \times 0,008 = 0,1928$  g Brom verbraucht.

Da 1 g Tyrosin (s. o.) 1,8 g Brom verbraucht, entspricht dies ( $x: 0,1928=1: 1,8$ ) einem Quantum von 0,107 g Tyrosin in 2 g Casein oder 0,053 Tyrosin in 1 g Casein.

Der Tyrosingehalt des Caseins berechnet sich sonach mit 5,3%.

Eine Wiederholung der Bestimmung ergab 5,2% Tyrosin. Eine weitere Bestimmung, bei der der Überschuß (der übrigens nicht störenden) PWS. mit Barytwasser entfernt worden war, ergab 4,75% Tyrosin; in guter Übereinstimmung mit dem von E. Fischer<sup>1)</sup> ermittelten Werte von 4,5%).

Ein analoger Vorgang beim Fibrin ergab 4,7% Tyrosin, während Abderhalden und Voitinovici<sup>2)</sup> 3,3 und 3,5%, F. Reach<sup>3)</sup> nach Abspaltung des Tyrosins durch Trypsinverdauung 3,8% gefunden hatten.

Gute Übereinstimmung ergab sich auch beim

Legumin: Bromaddition 2,1%, gravimetrisch 1,5–2,4%, sowie beim Fibrin: Bromaddition 11,0%, gravimetrisch 10,5%.

Eine grobe Diskrepanz dagegen ergab sich beim Keratin (aus Hornspähnen) in dem sich auf gravimetrischem Wege  $3\frac{1}{2}$ – $4\frac{1}{2}$ % Tyrosin nachweisen läßt, während die Bromaddition bei einem Präparate 7,1%, bei einem anderen gar 9,4–10,2% Tyrosin ergab. Beim Blutalbumin ergab die Bromaddition 5–6% Tyrosin; gravimetrisch sollen nur  $2$ – $2\frac{1}{2}$ % nachweisbar sein.

Beim Eindampfen eines salzsauren Blutalbuminhydrolysates erfolgte keine Zunahme des Bromadditionsvermögens des Hydrolysates; direkt 5% Tyrosin; dasselbe zur Trockne gebracht, in HCl 20% aufgenommen und titriert: 4% Tyrosin.

Die große Schärfe der Ablesungen bei der Bromadditionsmethode in den wasserhellen Filtraten läßt grobe Analysenfehler kaum möglich erscheinen, und es ergibt sich nunmehr als ungelöste Frage, ob in derartigen Fällen die Krystallisation des Tyrosins wirklich eine so unvollständige gewesen ist, oder ob nicht doch vielleicht manche Eiweißkörper einen unbekanntem bromaddierenden Baustein enthalten. An das

<sup>1)</sup> E. Fischer, Zeitschr. f. physiol. Chem. **23**, 15. 1901.

<sup>2)</sup> E. Abderhalden und Voitinovici, Ebenda **52**, 373. 1907.

<sup>3)</sup> F. Reach, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **158**, 268. 1899.

Oxyprolin kann dabei nicht gedacht werden, da das Hydrolysat der Gelatine, die 6% davon, dagegen kein Tyrosin enthält<sup>1)</sup>, wie wir uns überzeugt haben, überhaupt kein Brom addiert.

Derartige Widersprüche mußten uns eine weitere Orientierung durch andere, auf fundamental anderen Prinzipien basierende Methoden wünschenswert erscheinen lassen.

### III. Colorimetrische Schätzung des Tyrosingehaltes auf Grund der Millonschen Reaktion nach Weiss<sup>2)</sup>.

Ein Beispiel möge den Vorgang illustrieren:

1 g Blutalbumin wurde mit HCl 20% 12 Stunden lang hydrolysiert, auf 100 ccm aufgefüllt und das Melanoidin abfiltriert (Lösung A).

Als Standard diente 0,1 g Tyrosin (Kahlbaum), gelöst in 5 ccm Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% und 95 ccm H<sub>2</sub>O, sodann 50fach verdünnt und mit einem Tropfen Chloroform versetzt. Die Lösung enthält 0,002% Tyrosin.

Die Reaktion wurde nun in der Weise angestellt, daß man 3 ccm der Standardlösung mit 3 ccm einer (5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthaltenden) 10proz. Mercurisulfatlösung und ferner 3 Tropfen NaNO<sub>2</sub> 0,5% versetzte. Nunmehr wurde vorsichtig zu beginnendem Sieden erwärmt und 5 Minuten stehen gelassen, wobei eine blaßrote Färbung, jedoch keine Trübung in Erscheinung trat.

In analoger Weise wurde eine Serie von Verdünnungen mit A angesetzt.

Es ergab sich A/10: zu dunkel, trübt sich beim Erkalten,  
A/15: etwas zu dunkel, trübt sich beim Erkalten,  
A/20: zu hell, bleibt klar.

A/15 entspricht einem 0,066proz. Eiweißhydrolysat. Dieses als richtige Verdünnung anerkannt, würde einer 0,002proz. Tyrosinlösung entsprechen; d. i.

66 g Eiweiß: 2 g Tyrosin oder  
100 g Eiweiß: 3 g Tyrosin;

würde A/20 als richtige Verdünnung betrachtet, so hieße das: 100 g Eiweiß enthalten 4 g Tyrosin.

Da die Wahrheit in der Mitte liegt, wäre demnach der Tyrosingehalt des Blutalbumins auf etwa 3 $\frac{1}{2}$ % zu schätzen. Es ist dies etwas mehr als der gravimetrischen Bestimmung, aber um vieles weniger als der Methode von Folin und Denis sowie der Bromaddition entspricht.

Weitere Resultate sind in Tab. II angeführt. Die Übereinstimmung mit dem Bromverfahren ist beim Casein, Keratin, Fibrin, Conglutin eine leidliche, beim Ovalbumin, Blutalbumin eine unbefriedigende.

### IV. Colorimetrische Schätzung des Tyrosingehaltes auf Grund der Diazoreaktion.

Beispiel: 1 g käuflichen Ovalbumins wurde mit 25 ccm HCl 20% in einem halblitrigen Kjeldahl-Kolben 12 Stunden lang unter Rückfluß lebhaft gekocht, das Hydrolysat sodann mit einem Überschusse von Phosphorwolframsäure 20% ausgefällt, der Niederschlag scharf abgenutscht und mit ein wenig HCl-haltigem Wasser nachgewaschen. Das wasserhelle Filtrat wurde mit einem Überschusse feingepulverten Ätzbaryts von Phosphorwolframsäure befreit, das neue Filtrat

<sup>1)</sup> P. A. Levene und W. A. Beatty, Zeitschr. f. physiol. Chem. **49**, 261. 1906.

<sup>2)</sup> l. c.

mit gesättigter  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung von Ba befreit und die Flüssigkeit mit HCl neutralisiert. Ein aliquoter Teil, entsprechend 0,25 g Eiweiß, wurde eingedampft, die überstehende Flüssigkeit von der abgeschiedenen Krystallmasse abgesehen, mit Wasser nachgewaschen, schließlich auf 100 ccm aufgefüllt („Lösung K“).

Als Standard diente eine 0,01 proz. Tyrosinlösung in  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Weiterer Vorgang ganz analog der Histidinbestimmung nach Weiss und Ssobolew (l. c.). Das Reagens wurde durch Mischen von einem Teil der Sulfanilsäurelösung<sup>1)</sup> mit 2 Teilen  $\text{NaNO}_2$  0,5% frisch bereitet, zu 10 ccm der Probe (Verdünnungen der Lösung K, bzw. des Tyrosinstandards) wurde 3 ccm Reagens und eine Messerspitze wasserfreier Soda hinzugefügt, sodann wurde auf 20 ccm aufgefüllt.  $\frac{K}{1}$  war im Vergleich zum Tyrosinstandard viel zu dunkel,  $\frac{K}{2}$  und  $\frac{K}{2^{1/2}}$  viel zu hell,  $\frac{K}{1^{1/2}}$  etwas zu hell,  $\frac{K}{1^{1/4}}$  annähernd gleich. Das heißt so viel als: Ein 0,25 proz. Eiweißhydrolysat mußte  $1^{1/4}$  fach (also auf 0,20%) verdünnt werden, um ein 0,01% Tyrosinlösung adäquat zu werden. Ein 1 proz. Hydrolysat entspricht also 0,05% Tyrosin; d. i. Ovalbumin enthält 5% Tyrosin. Weitere Resultate sind in Tab. II angeführt.

Tabelle II.

	Gehalt an Tyrosin in Prozenten						Colorimetrisches Diazo- Verfahren
	Verfahren nach Folin-Denis		Gravime- trische Bestim- mungen früherer Autoren	Brom- Additions- verfahren	Millonverfahren nach M. Weiss		
	Bestim- mungen ausgeführt von Folin und Denis	Eigene Bestim- mungen			Bestim- mungen ausgeführt von M. Weiss	Eigene Bestim- mungen	
Casein	6,5 6,5	6,5 6,2 6,1	4,5 4,5	5,3 5,2 4,7	4,5	3,5	5,5
Fibrin		7,5 8,5	3,3 3,5 3,8	4,7		4,0	4,4
Legumin	4,5	5,5 4,6 6,0	1,5— 2,4	2,1		3,5	
Conglutin		5,0		4,7		3,7	
Ovalbumin	5,0	6,0	1,1 1,8	6,0	1,5	4,0	5,0
Blutalbumin		6,5	2,0— 2,5	6,0 5,0		3,5	4,0 3,4
Keratin Probe A (Hornspäne)	6,5	6,5 6,7	4,6	7,1 9,4		7,7	6,0
Probe B		6,3 7,9	3,6	8,7 10,2			6,2
Gelatine	0	0	0	0		0	
Amyloid (H. Eppinger)				7,9			7,6
Seidenfibroin		11,0	10,5	11,0		8,0	10,0

<sup>1)</sup> Sulfanilsäure 4 g; konz. HCl 40 ccm,  $\text{H}_2\text{O}$  400 ccm.

### Zusammenfassung.

Überblicken wir nunmehr unsere Resultate, so gelangen wir etwa zu folgendem Ergebnisse:

Die bisher vorliegenden, auf Grund des gravimetrischen Verfahrens gewonnenen Werte bezüglich des Tyrosingehaltes von Proteinen sind offenbar in vielen Fällen zu niedrig und es bedarf eines ganz besonders sorgfältigen Vorganges, um das Tyrosin aus den Hydrolysaten auch nur zum größten Teile zum Auskrystallisieren zu bringen. Umgekehrt führt wieder das colorimetrische Verfahren von Folin und Denis offenbar sehr leicht zu einer Überschätzung der tatsächlich vorhandenen Tyrosinmenge. Die colorimetrischen Verfahren auf Grund der Millonschen sowie der Diazoreaktion ermöglichen zwar nur eine näherungsweise Schätzung, bilden aber einen recht brauchbaren Orientierungsbehelf. Am meisten Vertrauen scheint uns das Bromadditionsverfahren zu verdienen, mit der Einschränkung jedoch, daß manche Proteine (wie das Keratin) ein bisher nicht aufgeklärtes, weder durch das Tyrosin noch durch das Histidin noch durch das Tryptophan hinlänglich erklärtes hohes Bromadditionsvermögen ihrer Hydrolysate aufzuweisen scheinen. Für alle Fälle aber erscheint das Bromadditionsvermögen der von allen durch PWS fällbaren Bestandteilen befreiten Eiweißhydrolysate als ein bequemer und mit großer Schärfe feststellbarer neuer Behelf zur Charakterisierung von Proteinen. Ein weiteres Ziel der Untersuchungen dieses Laboratoriums soll es sein, das Diazoverfahren zu verfeinern und aus einem Schätzungsvorgange in ein wirklich exaktes Bestimmungsverfahren umzuwandeln. Vielleicht wird sich die Titration mit Titanchlorid, wie sie im Kosselschen Laboratorium für die Histidinbestimmung angewandt worden ist, auch hier als wertvoll erweisen. Dort, wo das Brom- und Diazoverfahren und überdies noch das gravimetrische und Folin-Denisverfahren, also vier auf grundverschiedenen Prinzipien basierende Methoden, übereinstimmende Werte ergeben, wie beim Seidenfibroin:

Gravimetrische Bestimmung . . . .	10,5%	Tyrosin
Folin-Denissche Bestimmung . . . .	11,0%	„
Bromadditionsbestimmung . . . . .	11,0%	„
Diazobestimmung . . . . .	10,0%	„

ist man heute schon vollauf berechtigt, den ermittelten Tyrosinwert als einen definitiven zu betrachten.

Es könnte auch heute schon, da wir uns über den Tryptophan<sup>1)</sup>, Tyrosin-, Cystingehalt der Proteine immerhin einigermaßen orientieren können, verlockend

<sup>1)</sup> O. Fürth und F. Lieben. Colorimetrische Untersuchungen über Tryptophan II. Diese Zeitschr. **109**, 146. 1921.

erscheinen, aus den vorliegenden (natürlich nur vorläufigen) Mittelzahlen die molekulare Relation Tryptophan : Tyrosin : Cystin wenigstens näherungsweise abzuschätzen.

Zum Beispiel:

	Prozentgehalt			Tryptophan: Tyrosin: Cystin		
	Tryptophan	Tyrosin	S			
Blutalbumin(Gemenge)	2,8	4,4	1,8	1	1,7	4,0
Fibrin . . . . .	5,3	4,3	1,1	1	0,9	1,3
Eieralbumin(Gemenge)	2,6	5,0	1,4	1	2,0	3,4
Casein . . . . .	2,2	5,1	0,8	1	2,5	2,3
Keratin . . . . .	1,2	7,0	2,0	1	6,5	10,3

Man wird also beispielsweise vermuten dürfen, daß im Fibrin auf je 1 Molekül Tryptophan 1 Molekül Tyrosin und  $1\frac{1}{2}$  Moleküle Cystin entfallen dürften; im Casein dagegen auf je 2 Moleküle Tryptophan etwa 5 Moleküle Tyrosin und 5 Moleküle Cystin.

# Über Protein-ionen-beweglichkeit.

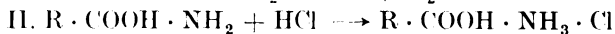
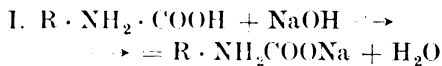
Von  
**Wolfgang Pauli.**

(Aus dem Laboratorium für physikalisch-chemische Biologie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 18. Oktober 1921.)

Unter den Fragen, welche das physikalisch-chemische Verhalten der Eiweißkörper und ihrer Salze in Lösungen betreffen, ist die der Protein-ionen-beweglichkeit eine der schwierigsten und wenig bearbeiteten. Sie konnte überhaupt erst näher ins Auge gefaßt werden, nachdem schärfere Vorstellungen von der Konstitution der Proteinionen gewonnen waren, die erst sichere Rückschlüsse auf die Konzentration einer Lösung an diesen Ionen gestatteten. Diese Konzentration ist es aber, deren Produkt mit der Beweglichkeit die am leichtesten der Messung zugängliche Größe, die elektrische Leitfähigkeit, ergibt.

Zwischen der älteren Auffassung [Bugarsky und Liebermann, Hardy, Pauli<sup>1)</sup>], daß die Proteinkörper mit Säuren und Laugen nach Art von Ammoniumbasen oder Carbonsäuren unter Salzbildung reagieren, und der späteren, von T. B. Robertson vertretenen, daß unter Aufnahme von Säure oder Lauge für je ein Molekül derselben ein Zerfall in zwei Proteinionen, ein positives und ein negatives, erfolgt, haben die Versuche an unserem Institute endgültig im Sinne der ersten Auffassung entschieden. — Dieser Nachweis wurde einerseits für Säureproteine durch die potentiometrische Messung der freien Anionen erbracht, wobei sich die Proteinsalze z. B. als typische Chloride erwiesen (Ma n a b e und Ma t u l a). An Alkaliproteinen fand sich andererseits das Verhalten der elektrischen Leitfähigkeit demjenigen der typischen Alkalisalze nach allen Richtungen homolog. (Pa u l i, Pa u l i und Ma t u l a.) Es entstehen also entweder nur positive Proteinionen (bei Reaktion mit Säure) oder nur negative (bei Reaktion mit Alkali). Allerdings die ursprüngliche Anschauung, daß die Reaktion jeweilig nach den zwei Schemen



<sup>1)</sup> Literatur bei Pauli, Kolloidchemie der Eiweißkörper I. S. 101ff. Steinkopf, Dresden 1920.

verläuft, kann heute nur als ein erster orientierender Behelf angesehen werden. Sie scheint am ehesten für das Verhalten der reinen Proteine in Lösung zu gelten, die mit großer Annäherung als amphotere Elektrolyte aus einer praktisch einbasischen Säure und einsäurigen Base betrachtet werden dürfen. In den Proteinsalzen kommen dagegen nach allen Erfahrungen anscheinend nur mehrwertige Proteinionen<sup>1)</sup> vor, und damit ergibt sich für die Beurteilung der Proteinnormalität und Ionenbeweglichkeit die Nötigung, diese Wertigkeit im Einzelfalle festzustellen.

Hier erheben sich nun neue Schwierigkeiten. Die Wertigkeit ist nämlich von den in das Eiweiß eintretenden Säure- oder Laugenmolekülen und, insoweit die gebundenen Anteile von der zugesetzten Säure- oder Laugenmenge bestimmt sind, mittelbar von dieser abhängig. Sie gibt erst nach Sättigung des Eiweißes im Überschuß von Alkali oder Säure ein konstantes Maximum. Diesem Maximum der Wertigkeit geht eine Zone des Säure- oder Alkalizusatzes voraus, in welcher Proteinionen verschiedener Wertigkeit in wechselnden Verhältnissen nebeneinander vorhanden sind, wobei mit steigendem Säure- oder Laugenzusatz die „mittlere Wertigkeit“ sich immer mehr dem Maximalwerte nähert. Die Untersuchung dieses Falles muß damit rechnen, daß hier neben dem Proteinsalze ein Überschuß von Alkali oder Säure vorliegt. Es können somit nur Methoden in Betracht kommen, die entweder eine direkte Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit der Proteinionen<sup>2)</sup> gestatten oder die Konzentration sämtlicher vorhandenen Ionenarten ergeben, und da die Beweglichkeit derselben bis auf die der Proteinionen bekannt ist, so ermittelt sich aus der bestimmbareren Gesamtleitfähigkeit die Beweglichkeit (in reziproken Ohm) oder Äquivalentleitfähigkeit der Proteinionen.

Diesen Weg haben Sven Odén und Pauli<sup>3)</sup> bei der Untersuchung von Säureproteinen, z. B. Chloriden, eingeschlagen. Hier liefert die potentiometrische Messung die Ionenkonzentrationen  $C_H$  und  $C_{Cl}$ . Von den freien Cl-Ionen ist die Konzentration  $C_H$  der Salzsäure und  $C_{Cl} - C_H$  dem Proteinsalz zuzuordnen, so daß  $C_{Cl} - C_H$  die Konzentration der freien Proteinionen bedeutet. Die Gesamtleitfähigkeit  $K$  ist die Summe aller Produkte der Beweglichkeiten ( $u$ ,  $v$ ) und der Konzentrationen  $C$  der verschiedenen Ionen und es bleibt als Unbekannte die

Beweglichkeit der Proteinionen  $u_{Prot.} = \frac{K - (C_H u_H + C_{Cl} v_{Cl})}{C_{Cl} - C_H}$  übrig.

<sup>1)</sup> Im Vergleiche mit den Proteinen schwachen Säuren wird die Bildung der mehrwertigen Proteinionen durch Hydrolyse stark beeinträchtigt und kann unter Umständen vernachlässigt werden.

<sup>2)</sup> Hier liegt nur der Versuch von W. B. Hardy am Globulin vor (Journ. of physiol. **33**, 251. 1905).

<sup>3)</sup> Vorläufige Mitteilung; Sitzung d. Akad. d. Wiss. (mathem.-naturwiss. Klasse) Wien, 20. XI. 1913. Akad. Anz. Nr. XXIV.

Dieses Verfahren ergab für das Albumin des Pferdeserums die in der folgenden Tabelle I verzeichneten Beweglichkeitswerte.

Tabelle I.  
PS Albumin 1,256 %,  $K = 6,77 \cdot 10^{-5}$ ,  $t = 18^{\circ}\text{C}$ .

Säuregehalt n	CH	CCl	K	Normalität d. Proteinionen	Beweglichkeit d. Proteinionen
0,0075	$0,238 \cdot 10^{-3}$	$5,386 \cdot 10^{-3}$	$4,489 \cdot 10^{-4}$	$5,148 \cdot 10^{-3}$	11,11
0,008	$0,240 \cdot 10^{-3}$	$6,071 \cdot 10^{-3}$	$5,494 \cdot 10^{-4}$	$5,831 \cdot 10^{-3}$	13,08
0,01	$0,427 \cdot 10^{-3}$	$6,887 \cdot 10^{-3}$	$7,152 \cdot 10^{-4}$	$6,460 \cdot 10^{-3}$	20,08
0,012	$0,668 \cdot 10^{-3}$	$8,367 \cdot 10^{-3}$	$9,275 \cdot 10^{-4}$	$7,699 \cdot 10^{-3}$	21,95
0,014	$1,082 \cdot 10^{-3}$	$9,502 \cdot 10^{-3}$	$11,761 \cdot 10^{-4}$	$8,420 \cdot 10^{-3}$	25,29
0,015	$1,292 \cdot 10^{-3}$	$9,873 \cdot 10^{-3}$	$12,818 \cdot 10^{-4}$	$8,581 \cdot 10^{-3}$	26,58
0,016	$1,392 \cdot 10^{-3}$	$11,333 \cdot 10^{-3}$	$14,614 \cdot 10^{-4}$	$9,939 \cdot 10^{-3}$	28,25
0,02	$3,043 \cdot 10^{-3}$	$14,786 \cdot 10^{-3}$	$22,909 \cdot 10^{-4}$	$11,443 \cdot 10^{-3}$	30,98

Danach steigt die mittlere Proteinionenbeweglichkeit mit wachsender Säureaufnahme bis zu einem Maximum, das sich graphisch mit rund 33 rec. Ohm für  $18^{\circ}$  ermittelt und für  $25^{\circ}$  mit 38 angenommen werden kann.

Ein solches Verhalten ist theoretisch unschwer verständlich, da mit jedem weiteren, in das Säureprotein eintretenden Säuremolekül ein lineares Ansteigen der Wertigkeit erfolgt, während das Ionenvolum sich durch das hinzukommende H praktisch kaum ändert. Nimmt man immerhin noch besondere (durch elektrostatische Ladungsbeeinflussung [Wegscheider] oder Hydratation) beweglichkeitsvermindernde Einwirkungen mit steigender Ladungszahl an, so ist dennoch mit Erhöhung der Wertigkeit die Ionenreibung vermindert, die Geschwindigkeit im gleichen Potentialgefälle vermehrt, was sich sehr deutlich in der Kurve der Beweglichkeitswerte ausdrückt, wenn als Abscisse die Normalität der Proteinionen aufgetragen wird.

Auch den folgenden, bisher unveröffentlichten Tabellen von Sven Odén und Pauli ist der Anstieg der Beweglichkeit mit steigender Säurebindung, also wachsender Wertigkeit des Proteinions, zu entnehmen. Die erste bezieht sich auf ein weitgehend durch Dialyse gereinigtes Glutin, die zweite auf ein daraus durch einstündiges Erhitzen im Autoklaven bei  $120^{\circ}$  gewonnenes Glutinpepton. Das letztere ist ein Gemenge stark abgebauter Glutosen, das also jede Erstarrfähigkeit vollständig eingebüßt hat.

Tabelle II.  
Glutin: Konzentration 1 %,  $K = 0,424 \cdot 10^{-4}$  f.  $18^{\circ}\text{C}$ .

Säuregehalt n	CH	CCl	K	Normalität d. Proteinionen	Beweglichkeit d. Proteinionen
0,0075	$0,209 \cdot 10^{-3}$	$6,292 \cdot 10^{-3}$	$5,411 \cdot 10^{-4}$	$6,083 \cdot 10^{-3}$	10,37
0,01	$0,447 \cdot 10^{-3}$	$8,235 \cdot 10^{-3}$	$8,296 \cdot 10^{-4}$	$7,798 \cdot 10^{-3}$	17,00
0,0125	$1,252 \cdot 10^{-3}$	$10,243 \cdot 10^{-3}$	$13,381 \cdot 10^{-4}$	$8,991 \cdot 10^{-3}$	30,32



Tabelle III.

Glucose: Konzentration 1%,  $K = 0,989 \cdot 10^{-4}$  f.  $18^\circ \text{C}$ .

Säuregehalt n	CH	CCl	K	Normalität d. Proteinionen	Beweglichkeit d. Proteinionen
0,015	$12,803 \cdot 10^{-3}$	$2,669 \cdot 10^{-3}$	$18,474 \cdot 10^{-4}$	$10,134 \cdot 10^{-3}$	16,60
0,025	$22,77 \cdot 10^{-3}$	$9,819 \cdot 10^{-3}$	$49,997 \cdot 10^{-4}$	$12,958 \cdot 10^{-3}$	32,01

Die Größenordnungen dieser Beweglichkeiten positiver Proteinionen liegen nicht weit auseinander. In jüngster Zeit hat Frau Dr. M. Adolf am Institute nach dem gleichen Prinzip die Beweglichkeit des positiven höchstwertigen Globulinions bei  $25^\circ$  mit 40, also sehr nahe der des Albumins, bestimmen können, worüber noch ausführlich berichtet werden soll.

Da sich aus den potentiometrischen H-Ionenbestimmungen die maximale, von 1 g Protein aufgenommene Säuremenge unmittelbar ableiten läßt, so wäre auch bei bekanntem Molekulargewicht des Eiweißkörpers die höchste Wertigkeit positiven Proteinions damit gegeben. Leider waren wir bisher in bezug auf das Molekulargewicht der hier gerade untersuchten Proteine und daher auch bezüglich der Höchstwertigkeit ihrer Ionen meist nur auf Mutmaßungen angewiesen.

Der einfachste Weg, zur Kenntnis von Proteinionenbeweglichkeiten zu gelangen, wäre die Herstellung streng neutraler Proteinsalze und die fortlaufende Bestimmung der Äquivalentleitfähigkeit mit fortschreitender Verdünnung. Dann würde die Extrapolation auf  $\lambda_\infty$  bei genügender Verdünnung unmittelbar die Summe der Ionenbeweglichkeiten  $u + v$  geben, von denen z. B. im Proteinchlorid  $v_{\text{Cl}}$  bekannt wäre, so daß  $u_{\text{Prot.}} = \lambda_\infty - v_{\text{Cl}}$ .

Dieser Weg ist bei den Säureproteinen im allgemeinen nicht gangbar. Denn dieselben sind wegen der zu schwachen Basenstärke der typischen Proteine allzu stark hydrolytisch dissoziiert und diese hydrolytische Dissoziation würde sich in den hohen Verdünnungen um so störender geltend machen. Das Verfahren von Odén und Pauli ist von einer solchen vollständig unabhängig und setzt lediglich voraus, daß bei maximaler Säuresättigung eine einzige Gattung von Proteinionen in der Lösung existiert und daß insbesondere keine innere Komplexionisation des Proteinsalzes stattfindet. Für eine solche bestehen in der Tat nach unseren bisherigen Untersuchungen keine Anhaltspunkte<sup>1)</sup>.

Im Gegensatz zu den positiven Proteinionen liegen bei einer Gruppe

<sup>1)</sup> Eine nähere Ausführung dieses Punktes würde den Rahmen dieser Mitteilung überschreiten. Über den experimentellen Nachweis solcher Komplexionisation bei anorganischen Kolloiden vgl. die eben erscheinenden Arbeiten von Adolf und Pauli, Beiträge zur allgemeinen Kolloidchemie III und IV in Kolloid-Zeitschr. **30**, Heft 3 und 4. 1921.

von Eiweißstoffen die Verhältnisse der negativen Proteinionen wesentlich einfacher, indem sich die direkte Bestimmung von  $V_{\text{Prot.}}$  und der Wertigkeit des Proteinions aus elektrischen Leitfähigkeitsmessungen als ausführbar und zulässig erwies.

Die Stoffe der Gruppe Casein, Globulin, Fibrin und gewisse denaturierte Albumine sind sämtlich für sich allein wasserunlöslich, bilden jedoch mit Basen und Säuren lösliche Salze. Schüttelt man einen Überschuß dieser Proteine mit verdünnter Lauge, so erhält man in der Lösung ein Eiweißsalz von gut reproduzierbarer Zusammensetzung, das sich mittels der elektrometrischen H-Ionenmessung als praktisch neutral erweist und, was entscheidend ist, auch bei sehr weitgehender Verdünnung mit Wasser keine störende hydrolytische Dissoziation erkennen läßt.  $\blacktriangleleft$   $\blacktriangleright$

Damit sind die Bedingungen erfüllt für die Anwendung der bei neutralen Metallsalzen gegebenen Serienbestimmung der Äquivalentleitfähigkeit  $\lambda$  in verschiedenen Verdünnungen von V-Litern. Die Extrapolation auf  $\lambda_{\infty}$  aus extremen Verdünnungen führt bei bekanntem  $u$  zur Kenntnis der Beweglichkeit des Proteinions  $v_{\text{Prot.}}$ . Dieser Weg setzt voraus, daß im Gegensatz zu der Anschauung von Robertson bei den Laugenproteinen typische Salze mit freien Metallionen, z. B. Na, K,  $\text{NH}_4$ , Ca, Ba usw. vorliegen, ein Beweis, der sich für diese Fälle mit Sicherheit hat erbringen lassen<sup>1)</sup>.

Auf diese Weise fand sich, daß zwei Alkalisalze des Caseins existieren, ein einfaches  $\text{Na}_3$  (Caseinat)''' (I) und ein komplexes  $\text{Na}_3$  (Caseinat [Casein])''' (II), denen die Beweglichkeiten der Caseinationen  $v_{\text{I}} = 32,5$  und  $v_{\text{II}} = 28$  bei  $25^\circ$  zukommen.

Zu der Wertigkeit der Caseinationen kann man aus dem Gange der Äquivalentleitfähigkeit mit der Verdünnung auf Grund der vielbewährten Ostwald-Waldenschen Regel gelangen, welche für die Wertigkeit ( $m$ ) organischer Anionen in Natriumsalzen die Formel  $\lambda_{1024} - \lambda_{32} = m_{\cdot 10}$  ergibt und für beiderlei Caseinationen eindeutig  $m = 3$  anzeigte.

In analoger Weise fand sich (M. Adolf<sup>2)</sup>) für das negative Globulation die Wertigkeit 4, die Beweglichkeit 50 rec. Ohm. Auch hier wurde das Bestehen der für diese Betrachtungen unerläßlichen Bedingungen: die typische Metallsalzkstitution und Wegfall störender Hydrolyse streng erwiesen. Im Gegensatz zum Casein konnte bisher kein komplexes, nur das einfache Globulation festgestellt werden. Nach den in neuesten Untersuchungen beigebrachten elektrochemischen Daten bestimmt sich das Molekulargewicht des Globulins zu 12000, das des Caseins zu 3000.

<sup>1)</sup> Vgl. die Übersicht in „Fortschritte der allgemeinen Eiweißchemie. Naturwissenschaften 8, 911. 1920.

<sup>2)</sup> Erscheint demnächst.

Man kann weiter aus diesen an negativen Proteinionen gefundenen Größen unter der mit keiner Tatsache in Widerspruch stehenden Annahme, daß kein konstitutiver Unterschied zwischen positiven und negativen Ionen besteht, welcher die Molekülgröße ändert, die Wertigkeit von solchen positiven Proteinionen aus der Säurebindung ermitteln, deren Beweglichkeit gleichzeitig nach Odén und Pauli bestimmt worden ist. Für solche Untersuchungen liegt am Globulin und Casein, wie sich in neuen Versuchen gezeigt hat, ein geeignetes Objekt vor.

Damit eröffnet sich die Möglichkeit, bei passender Auswahl große organische Ionen gleicher Konstitution und Atomzahl, die sich nur durch das Vorzeichen ihrer Ladung unterscheiden, hinsichtlich ihrer Beweglichkeit und anderer physikalisch-chemischer Eigenschaften zu vergleichen, Versuche, welche eine tiefere theoretische Einsicht in manche schwierige, experimentell noch nicht einer strengen Prüfung unterworfenen Frage anbahnen dürften.

---

# Die physiologische Wirkung der Metallammoniake und verwandter Verbindungen.

Von

Ad. Oswald (Zürich)

nach gemeinsam mit Dr. Lehrfeld angestellten Untersuchungen <sup>1)</sup>.

*(Eingegangen am 21. Oktober 1921.)*

Es sind nun 38 Jahre her, seit Fr. Hofmeister als erster das Studium der physiologischen Wirkung der Metallammoniake in Angriff genommen hat <sup>2)</sup>. Seither hat meines Wissens nur Bock <sup>3)</sup> sich mit diesem Studium befaßt. Hofmeister hat verschiedene Platinammoniakverbindungen geprüft, während Bocks Untersuchungen sich auf Kobalt-, Rhodium- und Chromverbindungen erstrecken. Im großen und ganzen decken sich die Resultate beider Autoren. Die Metallammoniakbasen ergreifen beim Warm- und beim Kaltblüter die motorischen Elemente des Nervensystems und rufen gesteigerte Erregbarkeit, Krampfbildung und Paralyse hervor. Unterschiede quantitativer Art finden sich zwischen den einzelnen Basen, und zwar sind parallele Unterschiede in den verschiedenen Reihen zu finden. So hat sowohl Hofmeister bei den Platinbasen wie Bock bei den Kobalt-, Rhodium- und Chromverbindungen eine Zunahme der Wirksamkeit mit steigender Zahl der angegliederten Ammoniakmoleküle feststellen können. Aus ihren Untersuchungen ergibt sich des ferneren, daß die Natur der Metallkomponente für die Wirksamkeit der Verbindungen von untergeordneter Bedeutung ist, indem eine Ionenwirkung der Metalle nicht zum Ausdruck kommt. Daraus müssen wir entnehmen, daß die Wirkung eine Funktion der Ammoniakreste ist. Dieser Schluß ist um so näher liegend, als in qualitativer Hinsicht die Wirkung mit der des Ammoniaks übereinstimmt, im wesentlichen also eine Erregung der motorischen Zentren bedeutet, welche bei stärkerer Einwirkung in Lähmung übergeht.

An die Beobachtungen der beiden Autoren knüpfen sich eine Reihe von Fragestellungen an. Einmal war es von Interesse, Verbindungen noch

---

<sup>1)</sup> Die Untersuchungen wurden im hiesigen Physiologischen Institut begonnen und im Pharmakologischen Institut vollendet.

<sup>2)</sup> Franz Hofmeister, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **16**, 393. 1883.

<sup>3)</sup> J. Bock, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **52**, 1. 1905.

anderer Metalle mit Ammoniak zur Untersuchung heranzuziehen, weiterhin nicht nur Verbindungen mit Ammoniak, sondern auch solche mit Ammoniakderivaten zu prüfen, etwa mit aliphatischen Aminen und cyclischen Basen, endlich um die Bedeutung der Ammoniakreste zu präzisieren, auch Komplexe zu untersuchen, die kein Ammoniak, sondern stickstofffreie Radikale enthalten. Die Gelegenheit, aus dem hiesigen Chemischen Institut reichlich Material zu solchen Untersuchungen zu bekommen, veranlaßt mich, diese Fragen in Angriff zu nehmen. Dabei leitete mich noch ein anderer Gesichtspunkt, auf den ich später zu sprechen kommen werde.

Um mich in die Technik einzuarbeiten und die bisherigen Resultate besser beurteilen zu können, stellte ich meine ersten Versuche mit den schon von Bock geprüften Verbindungen an. Dabei stieß ich auf Abweichungen, die mich veranlaßten, die gleichen Untersuchungen wieder aufzunehmen.

Ich will zunächst die Resultate meiner Untersuchungen darlegen und danach erst auf den Vergleich derselben mit den vorliegenden Beobachtungen eingehen.

Meine Versuche wurden an Fröschen, weißen Mäusen und weißen Ratten angestellt. Untersucht wurden Kobalt-, Nickel- und Chromammoniakbasen und gleichartige Verbindungen von Kobalt-, Eisen und Chrom mit Diäthylendiamin, Pyridin und Phenanthrolin. Ferner habe ich Metalloxalat- und Metallmalonatkomplexe geprüft. Die Substanzen wurden in wässriger Lösung bzw. aufgelöst in physiologischer Kochsalzlösung bei den Fröschen in den Rückenlymphsack, bei den Warmblütern subcutan beigebracht. Die wertvollen Metallverbindungen verdanke ich der Liebenswürdigkeit von Herrn Dr. Smirnoff, welcher einen Teil derselben selbst dargestellt hat. Andere sind von dem einen von uns (L.) hergestellt worden.

Es folgen nun unsere Untersuchungsergebnisse.

Zwecks Raumersparnis und der besseren Übersicht halber will ich dieselben nur knapp schildern. Ich behalte mir vor, die ausführlichen Protokolle bei einer späteren Gelegenheit in Zusammenhang mit noch anzustellenden Versuchen zu bringen.

Von Kobaltverbindungen wurden folgende untersucht:

Hexaminkobaltchlorid.  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ . Dasselbe verursacht beim Frosch in Gaben von 0,50 g auf das Kilo Tier berechnet allgemeine Lähmung<sup>1)</sup>, Zuckungen der Extremitäten, Atemstillstand, Aufhebung des Cornealreflexes und der spinalen Reflexe. Die Erregbarkeit der peripheren Nervenstämmen (N. Ischiadicus) für den faradischen Strom bleibt erhalten, selbst bei totaler allgemeiner, schlaffer Lähmung.

<sup>1)</sup> Die Symptome sind in allen Protokollauszügen in der Reihenfolge aufgezählt, in der sie sich chronologisch darboten.

ist aber schon nach wenigen Minuten abgeschwächt. Nach 23 Stunden ist sie beinahe aufgehoben. Die Zehen zeigen fortwährende spontane Bewegungen. Tod nach wenigen Tagen.

Den gleichen Effekt haben Gaben von 0,30 und 0,25 g auf das Kilo Tier. Bei 0,20 g erholen sich die Tiere nach 4—5 Tagen. Doch sind selbst nach 0,10 g Tiere nach 3 Tagen eingegangen.

Bei der weißen Maus verursachen 0,05 g auf das Kilo Mattigkeit, beschleunigte Atmung, klonische Krämpfe der Extremitäten und des Rumpfes, allgemeine Lähmung, Aufhebung des Cornealreflexes, Störungen der Herzstätigkeit (Adam-Stokesches Phänomen).

Bei der weißen Ratte bewirken 0,1 g auf das Kilo Mattigkeit und allgemeine Schwäche, Paresen, Abschwächung des Cornealreflexes, klonische Krämpfe und Tod nach ca. 12 Stunden.

Hexaminkobaltnitrat,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6](\text{NO}_3)_3$ , verursacht beim Frosch in Gaben von 0,70 g auf das Kilo allgemeine Lähmung, Atemstillstand, Aufhebung der Reflexe bei Erhaltenbleiben der peripheren Erregbarkeit der Nervenstämmе.

Aquopentaminkobaltchlorid,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{H}_2\text{O})]\text{Cl}_3$ , bewirkt beim Frosch in Gaben von 0,75 g auf das Kilo Tier Krämpfe und allgemeine Lähmung bei Erhaltenbleiben der peripheren Erregbarkeit der Nervenstämmе.

Auf Gaben von 0,45 g auf das Kilo erfolgen vorübergehende allgemeine Lähmung, Schleimabsonderung der Haut, Zuckungen der Extremitäten, Ataxie, klonische Krämpfe, leichte Ermüdbarkeit, Erholung. Doch besteht selbst nach 3 Wochen gesteigerte Reflexerregbarkeit und fortwährendes Flimmern in der Zehenmuskulatur.

0,30 g bewirken allgemeine Paresen, tonische Krämpfe, Zuckungen in den Zehen. Erholung bis auf die Zuckungen in den Zehen, die selbst nach 14 Tagen noch bestehen.

Bei der weißen Ratte bewirken 0,4 g auf das Körperkilo Paresen, allgemeine Schläffheit, starke Abschwächung des Cornealreflexes, Somnolenz. Tod nach ca. 12 Stunden.

0,2 g auf das Körperkilo bewirken Mattigkeit. Nach 24 Stunden starke, mehrere Minuten anhaltende reflektorische klonische Krämpfe am ganzen Körper. Ataxie, allgemeine Schwäche (liegt auf dem Bauch und zappelt mit den Beinen, ohne vorwärts zu kommen). Mühsames Atmen (Frequenz: 80 in der Minute). Zunehmende Somnolenz und Schlafzustand. in dem nach ca. 36 Stunden der Tod erfolgt. Die makroskopische Untersuchung ergab bei der Sektion nichts Pathologisches. Herz in Diastole.

Hydroxopentaminkobaltchlorid,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{HO})]\text{Cl}_3$ , bewirkt beim Frosch in Gaben von 1,25 g auf das Körperkilo Unruhe, leichte Paresen der hinteren Extremitäten, Schreien, Spreizen der Hinterbeine, Reflexschrei, allgemeine Lähmung, reflektorische Zuckungen der

vorderen Extremitäten und der Zehen, Aufhebung des Cornealreflexes. Erhaltenbleiben der peripheren Ischiadicuserregbarkeit durch den faradischen Strom. Allmähliche Abschwächung dieser Erregbarkeit und nach 2 Tagen Aufhebung derselben.

0,75 g auf das Körperkilo bewirken Schläffheit der Bewegungen bei gleichzeitigem Bewegungsdrang, Zuckungen in allen Fingern, allgemeine Mattigkeit. Später nur noch reflektorisches Zucken der Zehen. Erholung.

Chloropentaminkobaltchlorid,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$ , erzeugt beim Frosch in Gaben von 0,5 g auf das Körperkilo allgemeine Lähmung, Atemstillstand, Erlöschen der Reflexerregbarkeit. Anderntags Erholung. Periphere Nervenregbarkeit durch den faradischen Strom geschwächt, nicht aufgehoben.

0,3 g auf das Körperkilo bewirken allgemeine Lähmung, Zuckungen der Zehen. Nach 24 Stunden Erholung bis auf Parese der Hinterbeine. Nach 5 Tagen klonisch-tonische Krämpfe. Beim Versuch zu springen erfolgt Tetanus. Tod nach 10 Tagen.

0,14 g auf das Körperkilo verursachen vorübergehende allgemeine Lähmung. Parese der Hinterbeine, Zuckungen in den Hinterbeinen. Erholung nach einigen Stunden, nach 7 Tagen ist das Tier noch munter.

Diaquotetraminkobaltchlorid,  $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}_3$ , ruft beim Frosch in Gaben von 1,2 g Kilo nur leichte Ermüdbarkeit hervor. Tod nach 5 Tagen. Perikard echymosiert.

0,9 g auf das Körperkilo sind wirkungslos. Der Harn von der darin ausgeschiedenen Substanz rot gefärbt.

0,45 g auf das Kilo sind wirkungslos. Desgleichen 0,3 g auf das Kilo.

Bei der weißen Ratte sind 0,5 g auf das Körperkilo wirkungslos. Das Tier ist nach 14 Tagen noch völlig munter und symptomlos.

Karbonatotetraminkobaltinitrat,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{Co}_3]\text{NO}_3 + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ , bewirkt beim Frosch in Gaben von 1,0 g auf das Körperkilo Parese der Hinterbeine, Verwerfen der Glieder. Kurzdauernde tetanische Krämpfe der hinteren Extremitäten. Ataktische Bewegungen (fällt auf den Rücken beim Sprung). Vorübergehende allgemeine Lähmung, Tod nach 20 Tagen.

3,0 g auf das Kilo bewirken Parese der Hinterbeine, vorübergehende allgemeine Lähmung. Tod nach 4 Tagen.

4,0 g auf das Kilo bewirken allgemeine Lähmung, Zuckungen in den Zehen, Erhaltenbleiben der peripheren Ischiadicuserregbarkeit für den elektrischen Strom, wenn auch Abschwächung derselben.

Hydroxoatetraminkobaltbromid,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]\text{Br}_2$ , bewirkt beim Frosch in Gaben von 0,75 der cis-Form auf das Körperkilo allgemeine Lähmung, Aufhebung des Cornealreflexes, Erholung nach einigen Tagen.

1,50 g auf das Kilo bewirken Parese der Hinterbeine, Zuckungen in den Extremitäten, allgemeine Lähmung, klonische Krämpfe. Starrheit des ganzen Leibes. Tod nach 2 Tagen.

Dinitrotetra min kobaltichlorid,  $[\text{Co}(\text{NO}_2)_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}^{\ddagger}$  bewirkt beim Frosch in Gaben von 3,40 g auf das Körperkilo, wegen seiner Schwerlöslichkeit in Wasser in Gummiemulsion gereicht, allgemeine Lähmung unter Erhaltenbleiben der peripheren Ischiadicuserregbarkeit für den elektrischen Strom. Tod nach 7 Tagen.

Trinitrotria min kobalti  $[\text{Co}(\text{NO}_2)_3(\text{NH}_3)_3]$  bewirkt beim Frosch in Gaben von 0,28 g auf das Körperkilo allgemeine Lähmung, Schreien. Baldige Erholung, die nach 14 tägiger Beobachtung noch besteht.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß alle untersuchten Verbindungen qualitativ die gleiche Wirkung haben. Dieselbe besteht in Erregung der motorischen Zentren, die bei hoher Dosierung in Lähmung übergeht. Diese erstreckt sich sowohl auf das Gehirn, das verlängerte Mark wie das Rückenmark. Weniger stark affiziert werden die peripheren Nervenstämmen. Für die nähere Charakterisierung sei noch bemerkt, daß das Vergiftungsbild, namentlich bei hoher Dosierung, mit allgemeiner Lähmung eingeleitet wird. Erst darauf treten die excitomotorischen Symptome (klonische oder tonische Krämpfe) in die Erscheinung. Erfolgt Erholung, so verschwindet die allgemeine Lähmung, und es verbleiben nur die Krampferscheinungen, die lange Zeit (bis 14 Tage und noch mehr) anhalten können.

Die stärkste Wirksamkeit wohnt den Hexaminverbindungen inne, geringer ist die der Pentamine und noch geringer die der Tetramine. Eine weitere Abnahme zu den Triaminen scheint, soweit die bisherigen Untersuchungen reichen, nicht zu erfolgen, doch sind darüber noch genauere Untersuchungen im Gang. Jedenfalls läßt sich bisher behaupten, daß mit abnehmendem Gehalt an Ammoniakradikalen die Wirkungskraft abnimmt. Dosen, die bei den Hexaminverbindungen in wenigen Tagen tödlich wirken, führen beim Tetramin nur vorübergehende Störungen herbei. Damit ist man berechtigt, die Wirksamkeit der genannten Basen als eine Funktion der Ammoniakradikale anzusehen.

Es wurden nun Verbindungen untersucht, die an Stelle des Kobalts andere Metalle enthalten, und zwar:

Hexa min nickelbromid,  $[\text{Ni}(\text{NH}_3)_6]\text{Br}_3$ . Beim Frosch bewirken 0,26 g desselben auf das Körperkilo allgemeine Lähmung, Aufhebung des Cornealreflexes. Zuckungen, tonische Kontraktionen der Fingerextensoren, tonische Krämpfe in der Extremitätenmuskulatur, gesteigerte Reflexerregbarkeit. Anderntags Erholung, die bis auf gesteigerte Reflexerregbarkeit noch lange anhält.

Die Wirkung und Wirkungsintensität ist also der der entsprechenden Kobaltverbindung gleich.



Hexahydroxododekaminchromchlorid,  $[\text{Cr}(\text{OH})_2\text{Cr}(\text{NH}_3)_4]_3\text{Cl}_6$ , bewirkt beim Frosch in Gaben von 0,2 g auf das Körperkilo allgemeine Lähmung, Zuckungen in den hinteren Zehen. Nach einigen Stunden Aufhebung der peripheren Nervenerregbarkeit. Nach 24 Stunden Tod.

0,26 g auf das Kilo bewirken Parese der Hinterbeine, Zuckungen in den Hinterbeinen, allgemeine Lähmung, Aufhebung des Cornealreflexes. Nach einigen Stunden ist die periphere Nervenerregbarkeit abgeschwächt, später aufgehoben.

0,4 g auf das Kilo bewirken allgemeine Lähmung bei anfänglich erhaltener peripherer Nervenerregbarkeit. Tod nach 24 Stunden.

Die Wirkung der Chromverbindung ist somit die gleiche, wie die der Nickel- und Kobaltverbindungen. Sie ist aber wesentlich stärker als die der Hexaminverbindung, was man auf die größere Zahl der angegliederten Ammoniakmoleküle zurückführen kann.

In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, daß auch Oktamindioldikobaltchlorid,  $[\text{Co}_2(\text{NH}_3)_8(\text{OH})_2]\text{Cl}_4$ , an Wirksamkeit die Hexaminverbindung übertrifft. 0,26 g auf das Kilo bewirken beim Frosch Parese der Hinterbeine, Zuckungen in den Zehen der Hinterbeine, allgemeine Lähmung, Aufhebung des Cornealreflexes, Atemstillstand. Nach 2 Tagen Aufhebung der peripheren Nervenerregbarkeit, bei Erhaltenbleiben der direkten Muskeleerregbarkeit.

Auch hier ist man berechtigt anzunehmen, daß die Intensität der Wirkung eine Funktion der Zahl der angegliederten Radikale ist.

Zu bemerken ist, daß sowohl die Dodekamin- wie die Oktaminverbindung ein wesentlich stärkeres peripheres Lähmungsvermögen haben als die Hexaminverbindung. Hieraus möchte man schließen, daß mit steigender Zahl der angegliederten Ammoniake das periphere Angriffsvermögen wächst.

Um die Bedeutung der Ammoniakradikale für das Zustandekommen der Wirksamkeit der Metallammoniake näher zu charakterisieren, wurden in ganz gleicher Weise Versuche mit einem einfachen Ammoniak-salz angestellt. Dieselben sollten namentlich Aufschluß über die Qualität der Wirkung geben. Andererseits wurden Versuche vorgenommen mit Verbindungen, die den verwendeten Komplexen konstitutionell ähnlich sind, aber mit anderen als Ammoniakradikalen substituiert sind. Diese Versuche wurden im Hinblick auf den Umstand unternommen, daß die den Ammoniumbasen inhärenten physiologischen Eigenschaften sich auch bei entsprechenden Verbindungen finden, die an Stelle des Stickstoffes Phosphor, Arsen, Antimon usw. enthalten (Phosphonium-, Arsonium-, Stibonium- usw. -basen). Da bei diesen Verbindungen die Wirkung nicht als eine Funktion des Stickstoffes, sondern vielleicht der chemischen Konfiguration anzunehmen ist, war die Frage nicht un-

berechtigt, ob nicht auch bei Metallammoniaken ähnliche Verhältnisse obwalten mögen.

Die Versuche mit einem Ammoniaksalz (Chlorammonium) gaben beim Frosch ein ganz gleiches Vergiftungsbild wie die mit Metallammoniaken.

0,25 g Chlorammonium auf das Körperkilo verursachten vorübergehende Parese der hinteren Extremitäten. 0,5 g bewirkten verstärkte Reflexerregbarkeit, tonisch-klonische Krämpfe aller Extremitäten, Erholung am anderen Tag. Bei Wiederholung der Dosis das gleiche Bild. Doch tritt keine Erholung ein. Die gesteigerte Erregbarkeit persistiert, und es folgt allgemeine Lähmung, in der nach 14 Tagen der Tod eintritt.

2,0 g auf das Kilo bewirkten allgemeine Lähmung, tonisch-klonische Krämpfe der vorderen Extremitäten, gesteigerte Erregbarkeit. Tod nach 20 Stunden.

7,0 g auf das Kilo bewirkten allgemeine Lähmung, unterbrochen durch tonisch-klonische Krämpfe aller Extremitäten. Herzstillstand nach 40 Minuten.

Qualitativ ist also im großen und ganzen die Wirkung des Ammoniaks der der Metallammoniake gleich. Doch dürften letztere quantitativ dem ersten überlegen sein.

Von Metallkomplexen, die andere Radikale als Ammoniak enthalten, standen mir einmal Oxalatverbindungen zur Verfügung.

Natriumferritrioalat,  $[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]\text{Na}_3$ , bewirkte beim Frosch in Gaben von 1,0 g auf das Körperkilo allgemeine Lähmung, klonisch-tonische Krämpfe der Extremitäten, Aufhebung des Cornealreflexes. Tod nach 3 Tagen. Eechymosierung des Perikards.

2,0 g auf das Kilo bewirken Parese der Hinterbeine, Opisthotonus, Ataxie, Lähmung der vorderen Extremitäten, Spreizen und Zitterbewegungen der Finger. Allgemeine Lähmung, Aufhebung des Cornealreflexes. Tod nach 3 Tagen. Eechymosierung des Perikards.

Das gleiche Resultat lieferte Kaliumferritrioalat,  $[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]\text{K}_3$ . 1,0 g auf das Kilo Frosch bewirken Parese, allgemeine Lähmung, Aufhebung des Cornealreflexes, Tod nach 5 Stunden. Eechymosierung des Perikards.

Ferner lieferte qualitativ das gleiche Resultat, aber in weit geringem Grade, Kaliumrhodiumtrioalat,  $[\text{Rh}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]\text{K}_3$ .

1,0 g der Racemverbindung auf das Körperkilo bewirken beim Frosch Parese der Vorderbeine, motorische Unruhe, Erholung, die noch nach 7 Tagen anhält.

2,0 g auf das Körperkilo bewirken motorische Unruhe, nach 2 Stunden allgemeine Lähmung, Erholung nach 2 Tagen, die bleibend ist.

2,8 g auf das Kilo des d-Salzes bewirken leichte Parese der vorderen Extremitäten, Aufhebung des Cornealreflexes, leichte Ermüdbarkeit, Erholung und Normalsein 3 Wochen lang.

Es zeigen somit diese Oxalatverbindungen eine auffallende Ähnlichkeit in ihrem physiologischen Verhalten mit den Metallammoniakten.

Bevor ich auf die Deutung dieser Versuche eingehe, sei auf den quantitativen Unterschied in der Wirkung des Rhodiumsalzes im Vergleich zu den beiden Ferrisalzen hingewiesen, der zuungunsten jenes ausfällt. Nun ist zu bemerken, daß das Kaliumrhodiumtrioxalat sehr beständig ist, während die beiden Eisensalze in wässriger Lösung leicht zerfallen. Natrium- und Kaliumferritrioxalat geben in der Tat in wässriger Lösung einen Niederschlag mit Schwefelwasserstoff. Das Metall wird abgespalten und damit auch die Säurereste. Aus dem unterschiedlichen Verhalten der drei Verbindungen ergibt sich der Wahrscheinlichkeitschluß, daß das Vergiftungsbild, wie es Natrium- und Kaliumferritrioxalat darbieten, eine Oxalsäurevergiftung darstellt. Um Vergleichswerte zu besitzen, wurde deshalb Oxalsäure als Natronsalz in gleicher Weise geprüft. Die Versuchsergebnisse sind folgende:

1,025 g Natriumoxalat auf das Kilo Frosch bewirken Parese aller Extremitäten, Aufhebung des Cornealreflexes, allgemeine Lähmung, Spreizen der Zehen der hinteren Extremitäten. Fibrilläre Zuckungen am Rumpf. Tod nach 20 Stunden. Perikard ecchymosiert. In anderen Fällen Erholung.

1,7 g auf das Kilo bewirken Parese der Extremitäten, vorübergehende allgemeine Lähmung, Ataxie (fällt beim Sprung auf den Rücken). Aufhebung des Cornealreflexes, klonische Krämpfe der vorderen Extremitäten. Tod nach 6 Stunden.

Wir sehen somit, daß Oxalsäure die gleiche Wirkung hat, wie Natrium- und Kaliumferritrioxalat. Damit sind wir zur Annahme berechtigt, daß die Wirkung der letzteren an und für sich mit der Natur des Salzkompleses nichts zu tun hat, sondern als Oxalsäurevergiftung aufzufassen ist.

Zufälligerweise liefert nun die Oxalsäure ein äußerlich ähnliches Vergiftungsbild wie Ammoniak und die Metallammoniakbasen. Die Alkaliferritrioxalate konnten daher keinen Aufschluß darüber geben, ob und inwiefern den Ammoniakresten in den Metallammoniakten eine besondere Bedeutung für das Zustandekommen der physiologischen Wirksamkeit zukomme, namentlich war nicht zu entscheiden, ob nicht doch die Komplexe als solche, d. h. also die Strukturverhältnisse eine Rolle spielen. Das Verhalten des Kaliumrhodiumtrioxalates ließ gleichwohl vermuten, daß letzteres nicht der Fall sei, daß vielmehr der abgesprengte Anteil seinen physiologischen Charakter geltend mache.

Damit war die Bedeutung des Ammoniaks für die Wirksamkeit der Metallammoniake nicht demonstriert. Diese Entscheidung konnte erbracht werden, als ein komplexes Metallsalz untersucht wurde, dessen angegliederte Säurereste sich als physiologisch indifferent erwiesen. Das war der Fall mit Chromomalوناتatrium  $[\text{Cr}(\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4)_3]\text{Na}_2$ .

1,0 g auf das Körperkilo verursachten bei der weißen Ratte keine krankhaften Symptome. Das Tier verhielt sich völlig normal und zeigte während einer vierzehntägigen Beobachtungszeit nichts Auffälliges. Die ammoniakfreie komplexe Salzverbindung hatte also keine Spur der Wirkung der Metallammoniake.

Hieraus ist zu entnehmen, daß die motorische Wirkung der letzteren auf die Gegenwart der Ammoniakmoleküle zurückzuführen ist.

Wir haben weiter oben gesehen, daß mit der Anzahl der angegliederten Ammoniakreste die Wirksamkeit steigt. Die Hexaminverbindungen zeigen eine stärkere Wirksamkeit als die Pentaminverbindungen und diese eine stärkere als die Tetramine. Daraus könnte man entnehmen, daß die Zahl der Ammoniakmoleküle als solche das Maßgebende ist, wie z. B. bei den aliphatischen Kohlenwasserstoffen die Wirksamkeit wächst mit der Zahl der eingeführten Chloratome. In Wirklichkeit dürfte die Erklärung anderswo liegen. Die Verbindungen, die die stärkste Wirksamkeit besitzen, sind diejenigen, die in Wasser am leichtesten dissoziieren. Prüft man das Verhalten gegen Schwefelwasserstoff, so zeigt sich, daß Hexaminkobaltsalzlösungen damit momentan einen starken schwarzen Niederschlag geben. Auch Aquopentamin-, Chloropentamin- und Diaquotetraminkobaltchlorid tun es. Dinitrotetraminkobaltchlorid (roseo) dagegen gibt anfangs nichts, sondern erst, nachdem der Strom eine Weile durchgeleitet worden ist, während die Flavoverbindung wiederum momentan reagiert. Trinitrotetraminkobaltchlorid reagiert nicht, auch nicht Kaliumrhodiumtrioxalat, das sich ja physiologisch als schwach wirksam erwies, während die stark wirksamen Kalium- und Natriumferritrioxalate intensiv reagieren. Tripyridyl- und Triphenathrolinferrobromid reagieren nicht, wirken aber physiologisch doch ziemlich stark. Das hängt damit zusammen, daß die cyclischen Basen eben auch in fester Bindung ihre Wirksamkeit beibehalten. Alle diese Beobachtungen zeigen jedenfalls, daß die Dissoziierung der Metallammoniake an deren Wirkungsintensität einen beträchtlichen Anteil hat. Sie ist mit eine Hauptfunktion derselben.

Nachdem die Bedeutung der Ammoniakreste für die physiologische Wirksamkeit der Metallammoniake dargetan, war es von Interesse, zu untersuchen, wie sich komplexe Salze verhielten, die nicht Ammoniak als solches, sondern substituiertes Ammoniak in sich einschlossen. Es wurden geprüft solche mit aliphatischen Aminen und solche mit cyclischen Basen.

Unter den ersteren würden zur Untersuchung herangezogen:

Kobalttriäthylendiamintriiodid,  $[\text{Co}(\text{C}_2\text{H}_4(\text{NH}_2)_2)_3]\text{I}_3$ . Hier von wurde die r-Verbindung geprüft.

0,68 g auf das Kilo Tier bewirkten beim Frosch Somnolenz, Maulaufsperrn, Hypertonie der vorderen Extremitäten, Parese der hinteren.

Schwimmbewegungen, Atmungslähmung, allgemeine Lähmung. Steifheit des Nackens und des Rumpfes, danach des ganzen Tieres. Tot aufgefunden am anderen Tag.

d-Chromtriäthylendiaminjodid,  $[\text{Cr}(\text{C}_2\text{H}_4(\text{NH}_2)_2)_3]\text{J}_3$ , bewirkte in Gaben von 0,27 g auf das Kilo vorübergehende Paresen, gesteigerte Reflexerregbarkeit, Erholung.

Bei 2,7 g auf das Kilo erfolgte allgemeine Lähmung, gesteigerte Reflexerregbarkeit, Aufhebung des Cornealreflexes und Atemstillstand. Verminderung der Herztätigkeit, Aufhebung der peripheren Ischiadicus-erregbarkeit für den elektrischen Strom, Erholung.

Bei 3,0 g auf das Kilo das gleiche Bild.

Bei 6 g periphere Nervenregbarkeit vorübergehend aufgehoben. Nach 3 Tagen Tod.

e-Chromtriäthylendiaminjodid,  $[\text{Cr}(\text{C}_2\text{H}_4(\text{NH}_2)_2)_3]\text{J}_3$ , bewirkte bei 0,27 g auf das Kilo am Frosch nichts Auffälliges, außer etwas motorischer Unruhe.

Bei 2,8 g auf das Kilo allgemeine Lähmung, tonische Krämpfe, Aufhebung des Cornealreflexes und totale Unerregbarkeit des Ischiadicusstammes. Nach 2 Tagen sind die peripheren Nerven wieder erregbar.

Bei 6 g vorübergehende Unerregbarkeit der peripheren Nervenstämmen.

l-Chromtriäthylendiaminjodid,  $[\text{Cr}(\text{C}_2\text{H}_4(\text{NH}_2)_2)_3]\text{J}_3$ , bewirkt in Gaben von 0,26 g auf das Kilo beim Frosch nur motorische Unruhe, vorübergehenden Opisthotonus und Zwangsbewegungen.

Bei 2,4 g auf das Kilo erfolgt allgemeine Lähmung, Aufhebung des Cornealreflexes, Atemstillstand, Reflexkrämpfe, Abschwächung der peripheren Nervenregbarkeit.

Wie sich aus diesen Beobachtungen ergibt, gleicht das durch die Äthylendiaminverbindung hervorgerufene Vergiftungsbild dem der Metallammoniake. Ganz genau dasselbe Resultat lieferte nun die Vergiftung mit Äthylendiamin (als Chlorhydrat gereicht). Auch hier hat also das angegliederte Radikal seine dynamischen Eigenschaften beibehalten.

Wird nun das eine Diäthylendiaminmolekül durch ein stickstofffreies Radikal ersetzt, so bleibt die Wirkung die gleiche, wohl ist sie aber abgeschwächt.

l-Diäthylendiaminacetylacetonkobaltijodid,  $1-(\text{Co}(\text{C}_2\text{H}_4(\text{NH}_2)_2)_2(\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH} : \text{CO} \cdot \text{CH}_3))\text{J}_2$ , bewirkt in Gaben von 0,75 g auf das Kilo Frosch nur Paresen der Hinterbeine, von der sich das Tier tags darauf erholt hat. Am 13. Tage Tod.

0,43 g auf das Kilo ergeben außer Schleimabsonderung auf der Haut nichts Abnormes. Dasselbe gilt für 0,43 g der d-Verbindung. 0,42 g auf das Kilo der r-Verbindung bewirkt nur vorübergehende Apathie, von der sich das Tier völlig erholt.

d - Nitrobro modiäthylenkobaltipersulfat,  $[\text{Co}(\text{NO}_2) \cdot \text{Br} \cdot (\text{C}_2\text{H}_4(\text{NH}_2)_2)_2\text{S}_2\text{O}_8]$ , bewirkt in Gaben von 0,9 g auf das Kilo nur motorische Unruhe und 1 - Dinitrodiäthylen-diamin-cobaltibromid,  $[\text{Co}(\text{NO}_2)_2(\text{C}_2\text{H}_4(\text{NH}_2)_2)_2]\text{Br}_2$ , in solchen von 0,23 g auf das Kilo gesteigerte Reflexerregbarkeit und Zuckungen. Auch hier nimmt also mit der Zahl der angegliederten Stickstoffatome die Wirksamkeit ab.

Von Verbindungen mit einer cyclischen Base wurden untersucht:

Tridipyridylferrobromid,  $[\text{Fe}(\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2)_3]\text{Br}_2$ . Dasselbe bewirkte beim Frosch in der Gabe von 0,5 g auf das Kilo Mattigkeit, allgemeine Lähmung, Aufhebung des Cornealreflexes, Erlöschen der peripheren Ischiadicuserregbarkeit für den elektrischen Strom. Muskulatur und beide Corneae von der Substanz intensiv karminrot gefärbt. Tod nach 3 Tagen.

Bei der weißen Ratte bewirken 1,0 g auf das Kilo klonische Krämpfe aller Extremitäten, Reflexkrämpfe, Ermattung, Verlangsamung der Atmung, Tod nach 4 Stunden. Die Sektion ergibt makroskopisch nichts Besonderes. In der Blase roter (von der Substanz gefärbter) Harn, der sich mit Schwefelwasserstoff nicht färbt.

Triphenathrolin-ferrobromid,  $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]\text{Br}_2$ , bewirkt in Gaben von 0,5 g auf das Kilo beim Frosch Mattigkeit, allgemeine Lähmung. Parese der Hinterbeine, Zuckungen in den Hinterbeinen, Aufhebung des Cornealreflexes. Beide Corneae rosa gefärbt. Ischiadicus peripher total unerregbar. Tod nach 3 Tagen. Das ganze Tier ist rot gefärbt.

Bei der weißen Ratte bewirken 0,5 g allgemeine Mattigkeit, Somnolenz. Tod nach 10 Stunden.

Es mag bemerkt werden, daß, wie mich darauf gerichtete Versuche lehrten, sowohl Pyridin wie auch Phenathrolin die gleichen Vergiftungserscheinungen hervorruft, das heißt also, daß auch hier das angegliederte Radikal seine dynamischen Eigenschaften beibehalten hat.

Wir sehen somit, daß sowohl Metallammoniate wie Verbindungen von Metallen mit substituiertem Ammoniak die typischen Eigenschaften der angegliederten Radikale zeigen, d. h. Ammoniakwirkung, resp. Wirkung des substituierten Ammoniaks. Beide sind übrigens miteinander identisch. Sie beeinflussen beide die motorischen Zentren, zunächst im Sinne der Erregung, dann der Lähmung. Diese ist auch dann zu erkennen, wenn die Metallkomplexe in wässriger Lösung nicht dissoziieren, was z. B. deutlich aus dem Verhalten des Tridipyridylferrobromids und des Triphenathrolin-ferrobromids hervorgeht, die beide den Organismus undissoziiert verlassen. Damit gewinnen diese Versuchsergebnisse eine weitertagende Bedeutung, auf die ich kurz hinweisen will.

Ich habe in einer demnächst der Öffentlichkeit zu übergebenden monographischen Darstellung zu beweisen gesucht, daß die physiolo-

gischen Eigenschaften der organischen Verbindungen sich alle auf wenige Grundtypen zurückführen lassen. Solche Grundtypen sind der Methantypus, der Benzoltypus, der Ammoniaktypus. Diesen letzteren findet man bei allen stickstoffhaltigen Kohlenstoffverbindungen wieder, zu welcher Konfiguration der Kohlenstoff auch verbunden sein mag, wie auch alle stickstoffhaltigen Kohlenstoffverbindungen chemisch-strukturell sich vom Ammoniak ableiten lassen. Die hier dargelegten Untersuchungen zeigen, daß dies auch gilt für Metallammoniake, insofern als auch solche, die nur schwer oder gar nicht dissoziieren, dennoch Ammoniakwirkung zeigen. Dies gilt auch ganz besonders für die beständigen Verbindungen mit Ammoniakderivaten, wie die Pyridin- und Phenanthrolinverbindungen. Die Prüfung dieser Verhältnisse war für mich der eigentliche Ausgangspunkt dieser Untersuchungen gewesen.

### Anhang.

Bock<sup>1)</sup> gibt an, daß Hexaminkobaltchlorid in Dosen von 0,01 g auf einen Frosch (= ca. 0,30 bis 0,40 g auf das Kilogramm Tier) „typische Curarewirkung“ auslöse. Diese Behauptung kann ich nicht bestätigen. Ich habe niemals „typische“ Curarewirkung bei einem Metallammoniak gesehen. Wohl tritt Nervenendlähmung ein, doch stets im Anschluß an zentrale Lähmung, was also mit einer Curarewirkung nichts zu tun hat. Ich muß auch bemerken, daß viele andere Substanzen, wie Pyridin u. dgl., denen man von anderer Seite eine „Curarewirkung“ zuspricht, alle nur sekundäres Endlähmungsvermögen haben, d. h. nachdem sie das Zentralnervensystem, Gehirn, Rückenmark und das verlängerte Mark, affiziert haben. Es ist somit nicht angängig, von „Curarewirkung“ zu reden. Ich spreche in diesem Sinne stets von einer sekundären Endlähmung der motorischen Nerven.

Bock erwähnt, daß Hexaminkobaltchlorid fasciculäre Muskelzuckungen bewirke, und daß diese Eigenschaft nur diesem komplexen Salz und keiner anderen Kobaltammoniakverbindung zukomme. Hiergegen muß ich bemerken, daß ich sie auch beim Aquopentaminkobaltchlorid, Hydroxopentaminkobaltchlorid, Hexaminnickelbromid, Hexahydroxododekaminchromchlorid, Okatamindiodikobaltchlorid beobachtet habe. Es scheint mir, als ob sie den Ausdruck eines bestimmten Vergiftungsgrades darstelle.

---

<sup>1)</sup> l. c.

## Die Fettsäureverteilung des Butterfettes.

Von

**F. Frog und S. Schmidt-Nielsen.**

(Institut für Techn.-organische Chemie der Techn. Hochschule zu Drontheim.)

(Eingegangen am 28. Oktober 1921.)

Die Angaben über die Mengen der im Butterfett nachgewiesenen Fettsäuren sind bekanntlich recht wechselnd, sowohl was die niedrigen, flüchtigen Glieder wie was die höheren betrifft.

In bezug auf die flüchtigen Fettsäuren dürfte die allgemeine Auffassung sein, daß hauptsächlich Buttersäure und Capronsäure vorhanden sind, Capryl- und Caprinsäure dagegen nur als Spuren; die Anwesenheit von Capronsäure und Buttersäure wird oft als im Vergleiche mit anderen Fetten besonders charakteristisch angesehen. Erwähnt sei endlich, daß nach verschiedenen Angaben auch Ameisensäure und Essigsäure im Butterfett vorhanden sein sollen. — Was wiederum die höheren Fettsäuren betrifft, dürften Laurin-, Myristin-, Palmitin-, Stearin- und Ölsäure stets vorhanden sein. Dagegen sind die Angaben recht streitig, ob andere ungesättigte Säuren als die Ölsäure, und ebenfalls, ob Säuren mit 20 oder mehreren Kohlenstoffatomen im Molekül normal auftreten.

Durch die Milch wird bekanntlich, oft für längere Zeit, mehr Fett ausgeschieden, als mit dem Futter zugeführt wird. Es fragt sich dann, wieviel Fett aus Kohlenhydraten neu gebildet wird, und ob und wieviel aus den Vorräten der Gewebe genommen wird. Für das mit dem Futter zugeführte Fett fragt sich, ob es direkt mit der Milch ausgeschieden oder ob es zuerst in arteigenes Fett umgewandelt wird. Für die Glyceride der niedrigen Fettsäuren knüpft sich besonderes Interesse an die Frage, ob sie von den höheren gebildet werden. Eine offene Frage ist, ob die Fettsäuren mit 20 oder mehreren Kohlenstoffatomen im Molekül stets unverändert in der Milch erscheinen, oder ob sie sich verschieden verhalten, je nachdem sie gesättigt sind oder nicht.

Nach den vielen Versuchsreihen und Daten über die allgemeine analytische Zusammensetzung des Butterfettes (R.-M.-Zahl, Verseifungszahl, Jodzahl usw.) steht fest, daß das MilCHFett nach Rasse, Füt-



terung, Jahreszeit, Laktationsperiode usw. in recht weiten Grenzen variiert, aber es ist auf der anderen Seite auch unzweifelhaft, daß die Butterfette weit verschieden zusammengesetzt sein können, auch wenn diese analytischen Daten dieselben sind. Diese Analysenwerte geben nämlich nur die Gesamtsummen an, nicht die Menge der einzelnen Bestandteile, und eine Kenntnis von der wirklichen Zusammensetzung kriegt man gar nicht. Um den verschiedenen dunklen Fragen über die Entstehung des Milchfettes näher treten zu können, müssen unbedingt die Art und Menge der einzelnen Fettsäuren und ihre Beziehungen bekannt sein. Die hierzu notwendige Methodik ist bei weitem nicht hinreichend ausgearbeitet.

In den letzten 8 Jahren ist im hiesigen Institut mittels der quantitativen Fraktionierung der Methylester der Fettsäuren eine Reihe von marinen Fetten auf ihre Fettsäureverteilung untersucht worden<sup>1)</sup>. Wir können nicht behaupten, daß die Methode einwandfrei ist, sie hat aber unserer Meinung nach gute Vergleichswerte gegeben, die sich z. B. für ein Studium des Verlaufes der Hydrierung haben verwerten lassen, und die so gefundenen Werte scheinen uns auch für die physiologische Beurteilung der Fette wertvoll. Wir haben neulich in ähnlicher Weise mit der quantitativen Erforschung einiger Butterfette angefangen. Der 70jährige Geburtstag Franz Hofmeisters gibt einem von uns, Schmidt-Nielsen, Anlaß, seinem alten und lieben Lehrer aus dem Jahre 1901 kurz über die Untersuchung eines der Butterfette zu berichten.

#### Material und Arbeitsverfahren.

Die Butter wurde am 21. Januar 1921 im Laboratorium aus einem Rahme gebuttert, der aus einer großen Anzahl von Kühen stammte, welche längere Zeit täglich mit 6 kg Heu, 25 kg Rüben, 2 kg Halm, 1 kg Heringsmehl, 0,5 kg Baumwollsaatmehl und 0,5 kg Kornmehl pro Tier ausgefüttert waren. Die Kühe waren von der roten Drontheimer Rasse („Trönder“-Vieh), d. h. eine Kreuzung von der alten Drontheimer Rasse mit Ayrshire-Vieh. Ohne Auswaschen wurde die gewonnene Butter gut geknetet und sofort mit Äther kalt extrahiert. Nach dem Entfernen des Äthers im Vakuum, schließlich bei schwacher Erhitzung und Durchleiten trockenen Wasserstoffes zeigte das Butterfett die folgende Konstante:

Spezifisches Gewicht	$100^{\circ}$	
	$4^{\circ}$	0,8675
Schmelzpunkt		$28^{\circ}$
Erstarrungspunkt		$19,2^{\circ}$
Lichtbrechung $n_D^{40}$		1,4524

<sup>1)</sup> Die Arbeiten sind wegen des Weltkrieges bisher leider nur in norwegischer Sprache erschienen.

Säuregrade . . . . .	1,14	$\left( \frac{\text{ccm n-Lauge}}{100 \text{ g Fett}} \right)$	
Verseifungszahl . . . . .	424,1	$\frac{\text{ccm n-Lauge}}{100 \text{ g Fett}}$	(Köttsdorfer-Zahl = 237,9)
Reichert-Meißl-Zahl . . . . .	71,26	$\frac{\text{ccm n-Lauge}}{100 \text{ g Fett}}$	(= 35,63)
Polenske-Zahl . . . . .	6,38	$\frac{\text{ccm n-Lauge}}{100 \text{ g Fett}}$	(= 3,19)
Unverseifbares . . . . .	0,13 g / 100 g		
Glycerin (nach Zeisel-Fanto) .	13,05 g / 100 g		
Glycerin (Berechnung aus der Ätherzahl) . . . . .	12,94 g / 100 g		

Um die Methyl ester darzustellen, wurde das Butterfett in ätherischer Lösung kalt mit einem Überschuß an 5 normalem Natriummethylat (115 g Natriummethylat auf 11 absoluten Methylalkohol) behandelt, nach beendeter Reaktion mit der zur Auflösung des gebildeten Mononatriumglycerats notwendigen Wassermenge kräftig geschüttelt und nach Entfernen desselben mit kleinen Wassermengen ausgeschüttelt, bis das Wasser nicht mehr alkalisch reagierte.

Die fraktionierte Vakuumdestillation geschah mit Hilfe eines dem Kolben direkt angeschmolzenen Vigreuxdephlegmators von etwa 50 cm Länge. Die Destillation wird so lange wiederholt, daß ausgeprägte Maxima erhalten werden, was im allgemeinen nach drei Destillationen gelingt. Jede Fraktion wird getrennt und möglichst quantitativ gesammelt. Für die eigentliche Untersuchung wurde nur die Hauptfraktion verwendet, d. h. Fraktionen, welche Maxima für die pro Grad überdestillierte Menge zeigen. In den Hauptfraktionen wurden die verschiedenen Säuren durch die verschiedene Löslichkeit der Blei- oder Barytseifen weiter getrennt. Aus den Seifen wurde schließlich die Säuren freigemacht und ihre Identität resp. Reinheit, durch die Bestimmung von Schmelzpunkt, Lichtbrechung, Säurezahl, Jodzahl usw. festgelegt. Die Verhältnisse gestalteten sich in dem vorliegenden Butterfette so einfach, daß Elementaranalysen nicht erfordert waren. Unvermeidliche Verluste sind bei der Methode, teils daß ein Teil von den Estern mit dem Wasser gewaschen wird, teils, daß Ester in dem nicht flüchtigen Destillationsreste zurückbleiben.

Da das Ameisensäure Methyl schon bei 32° kocht, das essigsäure Methyl bei 57,5°, werden diese Ester beim Abdestillieren des Äthers nach dem Methylieren verflüchtigt. Um also die Anwesenheit dieser und anderer niedriger Säuren nachweisen zu können, müssen die Äthylester dargestellt werden. Das Ameisensäure Äthyl kocht nämlich bei 54,4° und das essigsäure Äthyl bei 77°; diese Ester der Buttersäure und der Capronsäure bei etwa 120° und etwa 167°. Die Darstellung der Äthylester geschieht ganz entsprechend der Methyl ester durch Verwendung von Natriumäthylat. Ihre Fraktionierung

geschieht aber zweckmäßig ohne Verwendung von Vakuum und mit Hilfe eines Birektifikators mit acht Kugeln. Von den Äthylestern werden nur die der Ameisensäure, Essigsäure, Buttersäure und teilweise der Capronsäure aufgesammelt und näher untersucht, während die höheren Säuren zweckmäßig durch die Methylester bestimmt werden.

**Versuchsergebnisse.**

Durch die Methylierung von 395 g des vorliegenden Butterfettes wurden im ganzen 353 g Methylester erhalten, d. h. eine Ausbeute von 90%. Die Details über ihre fraktionierte Destillation können kein weiteres Interesse beanspruchen. Wir führen in der untenstehenden Tabelle nur die Endresultate an, d. h. die Menge und Eigenschaften der Hauptfraktionen.

Nummer der Fraktion	Temperatur °C	Druck mm	Prozentische Menge des Destillats	Jodzahl der Ester (Winkler)	Verseifungszahl (nach Küttsdorfer) der Ester	Berechnete Verseifungszahlen
3	76—78	7,6	0,77		355,8	354,9 für C <sub>8</sub> Ester
5	98,5—99,5	5,9	1,21	12,26	304,4	301,6 „ C <sub>10</sub> Ester mit Jodzahl 12,26
7	126,5—128,5	5,7	1,37	6,85	263,3	262,5 „ C <sub>12</sub> Ester mit Jodzahl 6,85
10	153—155	5,9	4,50	7,72	230,9	231,7 „ C <sub>14</sub> Ester mit Jodzahl 7,72
16	176—177	5,4	5,64	15,21	207,3	207,8 „ C <sub>16</sub> Ester mit Jodzahl 15,21
21	192—194	4,2	12,00	69,01	191,3	189,2 „ C <sub>18</sub> Ester mit Jodzahl 69,01
24	216—225	4,7	2,62	106,20	170,75	173,4 „ C <sub>20</sub> Ester mit Jodzahl 160,20

Die Übereinstimmung der Verseifungszahlen der einzelnen Fraktionen mit den berechneten ist befriedigend, trotzdem man annehmen muß, daß es nicht gelingt, diese völlig rein zu erhalten, indem zu erwarten ist, daß sie sowohl von den höheren wie von den niedrigen verunreinigt sind, was übrigens auch aus den Jodzahlen ersichtlich sein dürfte.

Von den Detailuntersuchungen der Methylester führen wir an, daß Caprylsäure aus Fraktion 3 isoliert und identifiziert wurde, Caprinsäure aus Fraktion 5, Laurinsäure aus Fraktion 7, Myristinsäure aus Fraktion 10, Palmitinsäure aus Fraktion 16. In der Fraktion 21 wurde von gesättigten Säuren Stearinsäure nachgewiesen. Die flüssigen (d. h. ungesättigten) Säuren der ätherlöslichen Bleiseifen dieser Fraktion bestanden hauptsächlich aus Ölsäure; ein Teil derselben bildete benzolalkohollösliche Barytseifen, und die hieraus freigemachten Fettsäuren gaben eine positive Hexabromidreaktion, was die Anwesenheit von höheren ungesättigten Säuren anzeigt, vermutlich Linolensäure. Ihre Menge war jedoch zu gering, um die Identität derselben festzustellen. Sie stammt voraussichtlich aus dem verfütterten Leinsaatmehl.

Aus der Fraktion 24 wurde als ätherunlösliche Bleiseife eine Säure isoliert, die vermutlich Arachinsäure ist; die Menge war jedoch auch hier zu gering, um dies endgültig festzustellen. Die ätherlöslichen Bleiseifen dieser Fraktion gaben Säuren mit einer Jodzahl von 134,1 und eine Säurezahl von 169,8; sie enthalten eine Säure mit mehr als drei doppelten Bindungen. Ihre Menge war aber zu gering, um die Identifizierung ganz durchführen zu können, aber es handelt sich voraussichtlich hier um die Säure  $C_{20}H_{30}O_2$ , wie sie früher hier im Institute Bonnevies Svendsen für Heringsöl nachgewiesen hat; sie stammt dann aus dem verfütterten Heringsmehle. Es zeigte sich übrigens, daß schon in der Zwischenfraktion 20 (mit Jodzahl 62,2) kleine Mengen von einer Fettsäure vorhanden waren, die unlösliche Bromide gaben. Da die Fraktion 24 eine Verseifungszahl (nach Köttstorfer) von 170,75 aufweist gegen die berechnete 173,4 (für Methylester der  $C_{20}$ -Säuren und eine Jodzahl von 106,2) sind hier vermutlich kleine Mengen von  $C_{22}$ -Säuren vorhanden, und diese werden wohl dann auch dem verfütterten Heringsmehle zuzuschreiben sein.

Bei der Untersuchung der Äthylester zeigte sich, daß Ameisensäure nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden konnte. Die zwischen 77 und 78° verflüchtigte kleine Fraktion zeigte den Geruch des Äthylacetats, aber die Menge war jedoch für eine Analyse zu gering. In der zwischen 119 und 121° kochenden Fraktion wurde Buttersäure nachgewiesen und in der Fraktion 165–166° Capronsäure. Wir geben die Zahlen der Fraktionierung der Äthylester nicht an; bis 165° waren rund 5% der Ester verflüchtigt.

Für die Berechnung der Menge der Säuren in jeder Fraktion haben wir in dieser Arbeit für die gesättigten Säuren bis  $C_{18}$  die Werte der Verseifungszahlen derselben verwendet. Die Menge der Ölsäure jedoch, aus den Jodzahlen der Fraktionen 10–22 berechnet, fällt zu hoch aus, indem höher ungesättigte Säuren schon von Fraktion 20 ab auftreten. Die Mengen der letzteren sind nicht getrennt festgestellt worden, sondern sie sind mit den Säuren mit  $C_{20}$  (und mehreren C-Atomen) zusammen als Differenz aufgeführt. Eigentlich hätte die Menge der gesättigten Säuren mit Hilfe der ätherunlöslichen Bleiseifen und die Menge der Ölsäure als ätherunlösliche Barytseifen in jeder Fraktion bestimmt werden sollen, aber Mangel an Material hinderte uns bei dieser Butter daran. Von wesentlicher Bedeutung dürfte das jedoch nicht sein.

### Resultat.

Die Fettsäuren des untersuchten Butterfettes verteilen sich folgendermaßen:

Essigsäure . . . . .	Spuren	
Buttersäure . . . . .	3,4%	
Capronsäure . . . . .	3,3%	
Caprylsäure . . . . .	1,9%	
Caprinsäure . . . . .	3,0%	
Laurinsäure . . . . .	3,7%	
Myristinsäure . . . . .	12,9%	
Palmitinsäure . . . . .	20,8%	
Stearinsäure . . . . .	6,2%	
Ölsäure (Maximalwerte) . . . . .	27,0%	
Nicht sicher indentifizierte Säuren	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Gadoleinsäure?} \\ \text{Linolensäure?} \\ \text{Säure } C_{20} H_{30} O_2? \\ \text{Arachinsäure?} \\ \text{Behensäure?} \end{array} \right\}$	9,8%
Destillationsrest . . . . .		8,0%
	<u>Summe</u>	100,0%

Wie oben gesagt, ist die Menge der Ölsäure zu hoch berechnet. Wenn ungesättigte Säuren mit weniger als 16 Kohlenstoffatomen vorhanden sein sollten (worauf wir in späteren Arbeiten zurückkommen), können die Werte für die verschiedenen Säuren bis zu  $C_{14}$  nur als für die betreffenden C-Zahlen, nicht für die Individuen als richtig angesehen werden.

# Über Änderung des Cholingehaltes der Frostmuskulatur durch elektrische Reizung.

Von

**E. Geiger und O. Loewi.**

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Graz.)

(Eingegangen am 26. September 1921.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Anschließend an Versuche von Albanese<sup>1)</sup> haben Loewi und Gettwert<sup>2)</sup> bei nebennierenlosen Fröschen das Auftreten infolge von Nebennierenexstirpation eintretender Vergiftungssymptome von seiten des Herzens durch intensive elektrische Reizung des ganzen Tieres beschleunigen können und gelangten durch Analyse des Intoxikationsbildes zur Annahme, daß es sich hierbei möglicherweise um eine Cholinansammlung im Blute handle. Nach ihren Beobachtungen lag nun der Gedanke nahe, daß bei der Produktion des supponierten Giftes der Muskeltätigkeit eine Rolle zukommt, und da nicht anzunehmen ist, daß sich der Muskelchemismus von Tieren mit intakten Nebennieren qualitativ anders verhalte als der der nebennierenlosen, untersuchten wir zunächst, ob sich vielleicht in den Muskeln normaler Frösche eine durch intensive Muskelreizung bedingte Zunahme des Cholingehaltes nachweisen läßt.

## A. Methodik der Cholinbestimmung.

Von den verschiedenen, zur Darstellung des Cholins aus tierischen Geweben angegebenen Methoden schien die von Reid Hunt<sup>3)</sup> angegebene für die Versuche am geeignetsten zu sein. Nach mehreren methodischen Vorversuchen konnten wir sie noch etwas vereinfachen; auch benützten wir zur Extraktion an Stelle des von Hunt angegebenen Acetons absoluten Alkohol.

Das Darstellungsverfahren war folgendes:

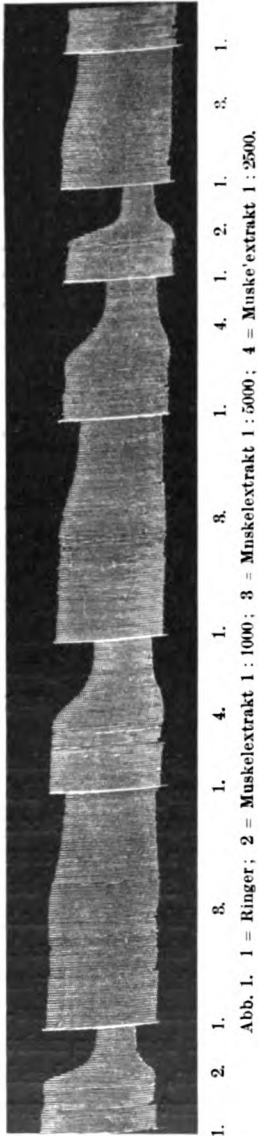
Gewogene Muskelpartien wurden in Zentrifugierröhrchen mit abs. Alkohol versetzt (pro Gramm Muskulatur je 2 ccm Alkohol); nach kurzem Stehen wurde der Muskel unter Vermeidung jedes Flüssigkeitsverlustes in eine Reibschale gebracht, mit der Schere zerkleinert und mit Seesand feinst zerrieben. Der so

gewonnene Brei wurde in die alkoholhaltigen Röhren zurückgebracht, mit 2 Tropfen verdünnter HCl angesäuert, im Wasserbade unter Benützung eines Steigrohres kurz aufgekocht, abzentrifugiert und der Alkohol danach vorsichtig in eine andere Eprouvette abgegossen. Der Bodensatz wurde nun noch 2 mal mit der gleichen Menge abs. Alkohol versetzt und wie oben behandelt. Das so gesammelte alkoholische Extrakt wurde bei vermindertem Drucke am Wasserbade bis zur Trockne abgedampft. Der Abdampfrückstand wurde zur Entfernung der Fette und Phosphatide mit heißem abs. Äther versetzt, zentrifugiert und der klare Äther abgegossen. Der so gereinigte Rückstand wurde 3 mal mit je 2 ccm salzsaurem abs. Alkohol bei einer Temperatur von ca. 70° extrahiert. Die gesammelten alkoholischen Extrakte wurden, da wir nach HUNTS Vorgang das Cholin in Form des bedeutend wirksameren Acetylesters nachweisen wollten, bei vermindertem Drucke bis zur absoluten Trockne abgedampft, der Rückstand mit 0,5 ccm Acetylchlorid (Kahlbaum) versetzt, die Röhren in der üblichen Weise zugeschmolzen und für eine Stunde ins kochende Wasserbad gestellt. Nach Öffnung der Röhren\*) wird das Acetylchlorid bis auf die letzten Spuren abgedampft und der Rückstand mit 10 ccm NaHCO<sub>3</sub>-freier Ringerlösung (0,6% NaCl, 0,02% CaCl<sub>2</sub>, 0,01% KCl) aufgenommen. Die so erhaltene Lösung reagiert amphoter, wird aber nach längerem Stehen durch Hydrolyse des Esters sauer.

Die quantitative Einstellung der so erhaltenen Lösung nahmen wir in der von HUNT<sup>3)</sup> und FÜHNER<sup>4)</sup> angegebenen Weise am Herzen vor. Die von uns verwendete Ringerlösung enthielt NaCl 0,6%; CaCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O 0,02 %; KCl 0,01%; NaHCO<sub>3</sub> 0,02%; Natr. oleicum 0,0005%; der im hiesigen Laboratorium übliche Seifenzusatz erweist sich als sehr günstig, da das Herz bei dem häufigen Wechsel der Speiseflüssigkeit durch Lipoidverarmung sonst sehr leidet. Die obige Stammlösung wurde mit der gleichen Ringerlösung verdünnt.

Im Gegensatz zu HUNT und FÜHNER benützten wir zur Titration Konzentrationen, die bloß zur negativ-inotropen Wirkung führen. Bei stärkeren Konzentrationen tritt entweder völliger Stillstand oder Block ein. Beide Wirkungen sind aber nach unserer Erfahrung als Indikatoren für feinere Konzentrationsunterschiede nicht geeignet. Sie können bei demselben Herzen, bei gleicher Giftkonzentration, ungleiche Zeit nach der Füllung von ganz verschiedener Pulshöhe aus akut eintreten. Auch leidet das Herz durch starke Konzentrationen erheblich. Bei den von uns zur Titration angewendeten kleinen Dosen trat eine merkliche chronotrope Beeinflussung der Herztätigkeit fast nie ein. Wir begannen meist mit erfahrungsgemäß kaum wirksamen Konzentrationen, entsprechend einer Acetylcholinlösung 1 : 1 Milliarde und gingen erst nach einiger Konstanz der Reaktion zu stärkeren über. Die Konstanz stellt sich, wie auch FÜHNER<sup>4)</sup> angibt, nach der vierten bis fünften Vergiftung fast immer ein. Zwischen den einzelnen Vergiftungen wurde das Herz solange mit Ringerlösung gewaschen, bis vollkommene Erholung eintrat; hierzu genügten fast immer 5 Minuten mit dreimaligem Wechsel des Herzinhaltes.

\*) Die Röhren sollen erst knapp vor Beginn des Herzversuches geöffnet werden.



Die Konzentrationsunterschiede zeigen sich am besten bei mittleren Dosen entsprechend Acetylcholin 1:100 Millionen bis 1:1 Milliarde. Abbildung 1 zeigt, daß ein besonders empfindliches Herz auch auf Konzentrationsunterschiede wie 1:2 reagiert. Gleichzeitig illustriert sie die gleichmäßige Reaktion bei wiederholter Applikation der gleichen Konzentrationen; die meisten Herzen zeigen aber erst das Verhältnis 1:5 bis 1:10 an. Deutlich zeigen sich Konzentrationsunterschiede auch bei Aufeinandersetzen verschieden starker Lösungen ohne Zwischenschaltung von Ringerperioden (Abbildung 3 und 4).

Die Versuche wurden an Herzen von seit März in Gefangenschaft befindlichen Esculenten in den Monaten Juni und Juli 1921 ausgeführt.

## B. Versuche.

### 1. Vorversuche.

Es sollen zunächst die Ergebnisse einiger Vorversuche mitgeteilt werden, die sich zum Teil auf die Methodik, zum Teil auf die Bestimmung des Cholingehaltes von Muskeln beziehen.

a) Wir überzeugten uns wiederholt davon, daß Acetylchlorid (Kahlbaum), abgedampft und mit Ringerlösung aufgenommen, sowie der acetylierte Trockenrückstand einer Ringerlösung, in destilliertem Wasser gelöst, die Herztätigkeit in keiner Weise beeinflussen.

b) Das aus den Muskeln mittels der oben beschriebenen Methode gewonnene acetylierte Produkt konnte als Acetylcholin identifiziert werden; und zwar erstens durch die Art der Herzwirkung, die der durch Acetylcholin (Kahlbaum) verursachten absolut gleich, zweitens

durch Aufhebbarkeit der Wirkung mit Atropin; schließlich hat sich das aus Muskeln gewonnene, ebenso wie das käufliche Acetylcholin in alkalischer Lösung innerhalb einiger Stunden zersetzt.

c) Was den Cholingehalt der Muskeln anbelangt, so fanden wir in den Versuchen 4, 5, 10, 12, 16, 17, 18 die Verdünnung 1:100 des Muskelextraktes in der Wirkung gleich mit einer Acetylcholinlösung 1:10



Millionen. Die Muskulatur enthielt also in diesen Versuchen 0,001% Cholin.

In den Versuchen 13 und 19 fanden wir den Muskelextrakt in der Verdünnung 1 : 100 entsprechend Acetylcholin 1 : 1 Million, demnach einen 0,01% Cholingehalt der Muskulatur [Reid Hunt<sup>3)</sup> fand 0,001%, Kinoshita<sup>5)</sup> bei Warmblütern 0,012—0,032%].

d) Der Cholingehalt verschiedener Oberschenkel- und Unterschenkel-Muskelpartien derselben Esculenta war stets gleich.

e) In den Muskel injiziertes Cholin konnte mit der angegebenen Methode wiedergefunden werden (Abb. 2), d. h. das Extrakt eines Muskels, in den Cholin injiziert wurde, wirkt auch noch in zehntausendfacher Verdünnung stärker als Muskelextrakt allein. Vergleicht man andererseits die Wirkungsstärke des Extraktes des Muskels, dem Cholin injiziert war, mit der der injizierten Cholinlösung, so

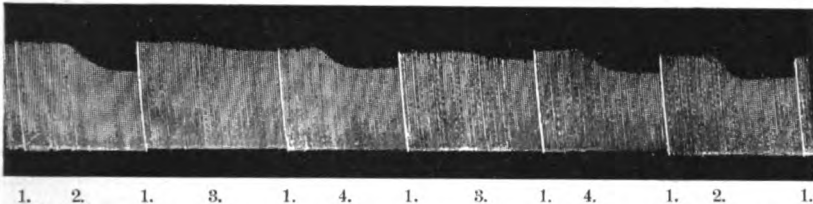


Abb. 2. (Vers. Nr. 16.) 1=Ringer; 2=Acetylcholin  $\frac{1}{100}$  Millionen; 3=Extrakt normalen Muskels 1 : 10000; 4=Extrakt normalen Muskels dem Cholin 0,1 mg injiziert wurde  $\frac{1}{10000}$ .

findet sich kein Unterschied zwischen beiden. Das sieht auf den ersten Blick wie ein Cholinverlust der Muskelprobe aus. Tatsächlich aber liegt es daran, daß, wie wir sahen, die Herzen in der Regel nur Konzentrationsunterschiede 1 : 5 anzeigen, in unserem Fall handelt es sich aber um das Verhältnis 1 : 1,1.

## II. Hauptversuche.

Bei Durchführung der Reizversuche wurde folgendermaßen verfahren: Mittelgroßen Esculenten wurde der Plexus ischiadicus beiderseits hoch durchtrennt; nach Unterbindung der einen Art. iliaca wurde der *M. gastrocnemius* herauspräpariert und mit Alkohol versetzt. Sodann wurde der *Gastrocnemius* der anderen Seite jede Sekunde faradisch abwechselnd direkt und indirekt bis zur vollen Ermüdung gereizt. (In der Regel eine Stunde hindurch.) Am Ende der Reizung wurde nach Unterbindung der Aorta abdom. auch der ermüdete Muskel ausgeschnitten, und nunmehr wurden beide Muskeln gleich weiterbehandelt. Während des Versuches wurde stets auf ungestörte Zirkulation im gereizten Beine geachtet.

Es wurden insgesamt elf derartige Versuche ausgeführt, die eindeutig verliefen (Tabelle I).

Tabelle I.

Nummer des Versuchs	Verdünnung des Extraktes	Abfall des Pulses in % der Anfangshöhe		Abfall von b tiefer als a in %	Anmerkungen
		a) ungereizt	b) gereizt		
7 A	1 : 1000	30	43	24	
7 B	1 : 1000	61	68	12	
12 A	1 : 10 000	22	39	77	
12 B	1 : 10 000	17	28	65	
13	1 : 10 000	40	57	42	
17 A	1 : 10 000	32	72	125	
17 B	1 : 10 000	43	64	49	Abb. 3 und 3 a
18 A	1 : 1000	30	63	111	} Abb. 4
18 B	1 : 1000	30	60	100	
19 A	1 : 1000	35	58	60	
19 B	1 : 1000	—	—	—	Unterschied gering, aber deutlich.

Zur Illustration der Versuche dienen die Abbildungen 3 und 4. Abbildung 3 und 3 a zeigt, daß die Wirkung des gereizten Muskels annähernd der einer Acetylcholinlösung 1 : 100 Millionen entspricht. Die Wirkung des ungereizten liegt zwischen dieser und der Konzentration 1 : 1 Milliarde. Abbildung 3 a zeigt die quantitativ verschiedene Wirkung der beiden Muskelextrakte ohne zwischengesetzte Ringerwaschung.

In Abbildung 4 ist die Wirkung der Extrakte der gereizten Muskeln (1 : 1000) genau gleich der einer Acetylcholinlösung 1 : 100 Millionen, die Wirkung der ungereizten liegt zwischen einer Milliarde und hundert Millionen.

Aus Tabelle I geht hervor, daß die Wirksamkeit des Extraktes des gereizten Muskels regelmäßig größer ist als die des ungereizten. Die Zunahme der Wirksamkeit kann ausschließlich auf Zunahme des Cholin gehaltes bezogen werden, da die Art der Vorbehandlung, die verwendeten Verdünnungen und der Umstand, daß sich die Wirkung durch Atropin aufheben läßt, andere Möglichkeiten ausschließen.

Was die Quantität der Zunahme anbetrifft, so beträgt sie ungefähr das Fünf- bis Zehnfache des normalen Wertes.

Was nun die Frage nach der Ursache der Cholinzunahme anbelangt, so kann zunächst nur ausgeschlossen werden, daß sie auf den Blutmehrgehalt des gereizten Muskels zu beziehen ist. Einmal beträgt die Gewichtszunahme des gereizten Muskels nur ca. 5—10%, andererseits enthält das Blut nach Hunt nur den dritten Teil, nach Kinoshita nur  $\frac{1}{10}$  der im Muskel vorhandenen Cholinmenge.



Es liegt nahe, bei der relativen Anoxybiose des Muskels während der Kontraktion, mit ihren Folgen, in Analogie der sich auch sonst bei der Contractur vollziehenden Spaltungen an eine Spaltung des Lecithins zu denken. Wir beabsichtigen, die Untersuchungen auch in dieser Richtung fortzusetzen.

#### Zusammenfassung.

1. Es wird eine Modifikation der Methode von Reid Hunt<sup>3)</sup> zur Bestimmung des Cholingehaltes der Muskulatur beschrieben.

2. Mittels dieser Methode wird nachgewiesen, daß bei der Reizung von Froschmuskeln deren Cholingehalt zunimmt.

#### Literatur.

<sup>1)</sup> Albanese, Arch. ital. di biol. **17**, 239. 1892. — <sup>2)</sup> Loewi - Gettwert. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **158**, 29. 1914. — <sup>3)</sup> Reid Hunt, Journ. of pharmacol. a. exp. therap. **7**, 301. 1915. — <sup>4)</sup> Fühner, diese Zeitschr. **77**, 408. 1916. — <sup>5)</sup> Kinoshita, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **132**, 607. 1910.

(Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt.)

## Über die Bildung anorganischer Phosphorsäure bei der Kontraktion des Froschmuskels.

Von

Gustav Emden und Heinz Lawaczeck.

(Ausgeführt mit Unterstützung der Manfred Bernhard Schiff-Stiftung.)

(Eingegangen am 28. Oktober 1921.)

In früher veröffentlichten Untersuchungen konnte der Nachweis geführt werden, daß, entsprechend dem Auftreten äquimolekularer Mengen von Phosphorsäure und Milchsäure beim kurzen Erwärmen von frisch gewonnenem Preßsaft aus der Skelettmuskulatur von Hunden<sup>1)</sup>, sich in den quergestreiften Muskeln nicht nur dieser Tierart, sondern ebenso auch beim Kaninchen und Frosch eine hexosephosphorsäureartige Substanz<sup>2)</sup> findet.

Aus den genannten drei Muskelarten konnte eine charakteristische Osazonverbindung dieser Substanz gewonnen werden, welche sich als völlig identisch mit dem bereits früher dargestellten Phenylhydrazinsalz des Phenylsazons der bei der Hefegärung auftretenden Zuckerphosphorsäureverbindung erwies.

Ebenso wie für die alkoholische Hefegärung ist offenbar auch für den Abbau der Kohlehydrate in der Muskulatur — und auch wohl in anderen tierischen Organen — ihre vorherige Bindung an Phosphorsäure eine notwendige Voraussetzung.

Auf Grund dieser Tatsachen und Vorstellungen schien es von vornherein als recht möglich, daß die bei der Muskeltätigkeit und offenbar als deren wesentlichste Ursache auftretende Säurebildung nicht nur, wie das bereits nach früheren Untersuchungen wahrscheinlich war, und wie wir es mit Bestimmtheit aus einer Arbeit von Fletcher und Hopkins<sup>3)</sup> wissen, in dem Freiwerden von Milchsäure besteht, sondern daß

<sup>1)</sup> Emden, Griesbach und Schmitz, Zeitschr. f. physiol. Chem. **93**, 1. 1914.

<sup>2)</sup> Emden und Laquer, Zeitschr. f. physiol. Chem. **93**, 94. 1914; **98**, 181. 1917; **113**, 1. 1921.

<sup>3)</sup> Fletcher und Hopkins, Journ. of physiol. **35**, 247. 1906—1907.

außerdem auch im Augenblick der Kontraktion Phosphorsäure aus dem Lactacidogenmolekül frei wird.

So viele Tatsachen für die nahen Beziehungen der Phosphorsäurebildung zur Muskeltätigkeit sprechen, — wir erinnern nur an den engen Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit der Muskelkontraktion und Lactacidogengehalt der Muskulatur, wie sie beim Kaninchen an den weißen und roten Muskeln aufs deutlichste in die Erscheinung tritt<sup>1)</sup>, an den in der Froschschenkelmuskulatur entsprechend dem verschiedenen biologischen Verhalten des Frosches zu verschiedenen Jahreszeiten gesetzmäßig erfolgenden Wechsel in dem Gehalt an der eben erwähnten Tätigkeitssubstanz<sup>2)</sup>, an die über das bisher bekannte Maß weit hinausgehenden Phosphorsäureverluste durch den Harn bei anstrengender Muskelarbeit<sup>3)</sup>, und nicht zuletzt auch an die starke Steigerung der Muskelleistungsfähigkeit, die durch Phosphatzufuhr an Menschen hervorgerufen werden kann<sup>4)</sup>, — so konnte doch der ganz unmittelbare Beweis dafür, daß neben Milchsäure bei der Muskeltätigkeit auch anorganische Phosphorsäure auftritt, bisher nur in vereinzelten Fällen geführt werden: In der Muskulatur von Kaninchen findet sich, wenn deren Tötung unmittelbar nach sehr anstrengender Muskelarbeit erfolgt, eine Verminderung des Lactacidogens und eine entsprechende Vermehrung der anorganischen Phosphorsäure<sup>5)</sup>.

Die genauere Verfolgung dieses Befundes ergab, daß das Auftreten vermehrter Mengen anorganischer Phosphorsäure nach anstrengender Arbeit auf die rasch arbeitende und leicht ermüdbare weiße Muskulatur beschränkt ist, hingegen an den langsam und dauerhaft arbeitenden roten Muskeln der gleichen Tierart völlig ausbleibt<sup>6)</sup>.

Überdies wurde gezeigt, daß außer nach angestrenzter Muskeltätigkeit auch im Verlaufe verschiedener pathologisch-physiologischer Vorgänge, nämlich bei der Phosphorvergiftung<sup>7)</sup> und bei länger anhaltendem Naganafieber<sup>8)</sup> eine Vermehrung der Phosphorsäure auf Kosten von Lactacidogen in der weißen Kaninchenmuskulatur auftritt, so daß also die Lactacidogenspaltung unter Freiwerden von Phosphorsäure jedenfalls nicht ausschließlich ein Folgezustand starker Arbeitsleistung ist.

<sup>1)</sup> Embden, G. und E. Adler, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **113**, 201. 1921.

<sup>2)</sup> E. Adler, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **113**, 174 u. 193. 1921. — E. Adler und L. Günzburg, *dasselbst* S. 187.

<sup>3)</sup> G. Embden und E. Grafe, *dasselbst* S. 198.

<sup>4)</sup> G. Embden, E. Grafe und E. Schmitz, *dasselbst* S. 67.

<sup>5)</sup> Embden, Schmitz und Meincke, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **113**, 10. 1921.

<sup>6)</sup> F. Cohn, *dasselbst* S. 253.

<sup>7)</sup> G. Embden und S. Isaac, *dasselbst* S. 263.

<sup>8)</sup> A. Adam, *dasselbst* S. 281.

Außer an Kaninchenmuskulatur konnte an derjenigen von Hunden, freilich nicht wie beim Kaninchen nach willkürlicher Muskelarbeit, sondern nur nach Strychninkrämpfen Verminderung des Lactacidogens unter entsprechender Phosphorsäurevermehrung beobachtet werden.

Hingegen blieben bisher alle Versuche, auch am Froschmuskel nach der Arbeit eine Vermehrung der anorganischen Phosphorsäure zu erzielen, erfolglos. Weder Laquer<sup>1)</sup>, noch Parnas und Wagner<sup>2)</sup> sahen nach andauernder Reizung bis zur völligen Erschöpfung einen Anstieg der anorganischen Phosphorsäure, während doch unter den gleichen Umständen eine sehr erhebliche Vermehrung der Milchsäure (Fletcher und Hopkins, l. c.) auftritt<sup>3)</sup>.

Embden, Schmitz und Meincke<sup>4)</sup> haben dies Verhalten durch die Annahme zu erklären versucht, daß auch am isoliert gereizten Froschmuskel der charakteristische Zerfall des Lactacidogens in Milchsäure und Phosphorsäure eintritt, daß aber die auftretende freie Phosphorsäure in demselben Maße, in dem sie sich bildet, durch Synthese mit Kohlehydrat zu Lactacidogen regeneriert wird, während die Milchsäure, die im isolierten Muskel nicht genügend rasch beseitigt werden kann, sich anhäuft.

Wenn die eben besprochene Deutung zutrifft, so kann die Ermüdung des Froschmuskels nicht durch einfachen Verbrauch der Tätigkeitssubstanz, als welche wir das Lactacidogen betrachten, bedingt sein, sondern sie muß in anderen Umständen ihre Ursache haben. Daß dies tatsächlich der Fall ist, konnte in neuerlichen Untersuchungen von Embden und Adler gezeigt werden<sup>5)</sup>.

Die bisherigen Versuche an der Froschmuskulatur wurden ganz entsprechend den an Kaninchen vorgenommenen derart ausgeführt, daß die Muskeln intensiv (meist bis zur völligen Erschöpfung) gereizt wurden und erst nach Unterbrechung der Reizung die chemische Verarbeitung begann.

Streng genommen kam also die Muskulatur nicht im Augenblick der Tätigkeit, sondern erst nach dem Aufhören der Tätigkeit — im Zustande der Ermüdung — zur chemischen Verarbeitung.

<sup>1)</sup> F. Laquer, Zeitschr. f. physiol. Chem. **93**, 60. 1914.

<sup>2)</sup> S. Parnas und R. Wagner, diese Zeitschr. **61**, 387. 1914.

<sup>3)</sup> Erst in neuerer Zeit ist es in unserm Institut Riesser und Neuschloss gelungen, eine Verminderung des Lactacidogens unter entsprechender Vermehrung der anorganischen Phosphorsäure während der Einwirkung der Coffeinstarre festzustellen. Freilich erwies sich diese Art der Lactacidogenspaltung als nicht reversibel. (Im Druck befindliche Arbeit.)

<sup>4)</sup> Embden, Schmitz und Meincke, a. a. O. S. 65.

<sup>5)</sup> Embden und Adler, im Druck befindliche Arbeit (Zeitschr. f. physiol. Chem. **118**, 1. 1922); s. auch Embden, Vortrag auf der Tagung der Deutschen physiologischen Gesellschaft in Hamburg 1920. Ber. über d. ges. Physiol. **2**, 2.1920.

Dieser Umstand mußte als ein sehr wesentlicher Mangel der bisherigen Versuchsanordnung angesehen werden, und wir haben uns daher in der vorliegenden Untersuchung bemüht, nicht, wie in den bisher ausgeführten, den chemischen Zustand des Muskels erst nach dem Ablauf länger andauernder Kontraktionsarbeit, sondern schon während der Kontraktion selbst so gut wie möglich zu fixieren und analytisch zur Darstellung zu bringen.

#### Methodisches.

Es mußte hierbei alles darauf ankommen, die im Muskel während der Kontraktion sich abspielenden chemischen Vorgänge so plötzlich wie möglich zu unterbrechen. Zu diesem Zwecke wandten wir flüssige Luft an, die sich uns schon in früheren Untersuchungen an Kaninchen<sup>1)</sup> und namentlich an Vögeln<sup>2)</sup> zur Hintanhaltung der postmortalen Lactacidogenspaltung bewährt hatte.

Eine von dem einen von uns neuerlich ausgearbeitete gravimetrische Bestimmungsmethode für kleine Phosphorsäuremengen<sup>3)</sup> gestattete, an einzelnen Froschmuskeln, jeweils dem rechten und linken Gastrocnemius auch kleinerer Frösche, oder an den Semimembranosi unter Verwendung von größeren Tieren zu arbeiten.

Im Prinzip gestaltete sich die Ausführung unserer Versuche folgendermaßen:

Die beiderseitigen Gastrocnemien oder Semimembranosi wurden so rasch wie möglich nach der Präparation zwischen Kupferelektroden befestigt und unmittelbar danach faradisch gereizt, wobei sie im gleichen Stromkreise hintereinander geschaltet waren. Der eine der Muskeln (*A*) wurde, während er sich noch in maximal kontrahiertem Zustande befand, in flüssige Luft getaucht, in der er rasch erstarrte. Der andere (*B*) wurde verschieden lange weiter gereizt, wobei freilich die Kontraktion bald nachließ, teils durch Ermüdung des Muskels, teils durch Vermehrung des Stromwiderstandes beim Gefrieren des Muskels *A* und die damit auftretende Abschwächung des Reizstromes.

Der Muskel *B* wurde verschieden lange Zeit nach seiner Wiedererschaffung genau in der gleichen Weise wie Muskel *A* zum Erfrieren gebracht.

Wir hofften so, eine etwa während der Kontraktion vorübergehend auftretende Vermehrung der anorganischen Phosphorsäure in dem Muskel *A* zum Nachweis bringen zu können, während wir erwarteten, daß Muskel *B* innerhalb der ihm gelassenen Erholungszeit die ursprüngliche Lactacidogenmenge zurückbilden würde.

<sup>1)</sup> G. Embden und E. Adler, Zeitschr. f. physiol. Chem. **113**, 201. 1921.

<sup>2)</sup> G. Lyding, daselbst S. 223.

<sup>3)</sup> G. Embden, daselbst S. 138.



Die weitere Verarbeitung beider Muskeln und die Bestimmung der anorganischen Phosphorsäure erfolgte natürlich stets beiderseits in ganz gleicher Weise.

Im einzelnen wurden die Versuche folgendermaßen ausgeführt:

Von den Gastrocnemien wurden stets die Achillessehnen entfernt und die zugespitzten Kupferdrahtelektroden oben und unten unmittelbar in die Muskulatur eingehakt. Die Semimembranosi wurden in der von Behrend<sup>1)</sup> beschriebenen Weise präpariert und gerade so wie die Gastrocnemien zwischen Elektroden befestigt. Niemals wurde bei der Präparation Ringerlösung oder dergleichen angewendet.

Bis zum Versuchsaugenblick wurden die auf Glasplatten gelagerten Muskeln durch Überdecken mit Uhrschälchen vor Eintrocknen geschützt.

Die untere Elektrode war unbeweglich, die obere mit einem Schreibhebel verbunden, der vor Beginn der Reizung wagerecht ausgerichtet wurde, und an dessen Ausschlag der Verlauf der Kontraktion verfolgt werden konnte.

Die Belastung der Muskeln schwankte, von wenigen Versuchen mit isometrischer Anordnung abgesehen, zwischen 2 und 52 g. In den späteren Versuchen verwandten wir stets 25 g.

Die Schließung des starken, faradischen Reizstromes erfolgte durch einen Quecksilberschlüssel; der Augenblick des Stromschlusses wurde durch einen Beobachter mit der Stoppuhr fixiert. Verschieden lange Zeit, nachdem die Kontraktion des Muskels *A* eingetreten war, wurde ein Dewargefäß mit flüssiger Luft, das unter dem frei aufgehängten Muskelpräparat gestanden hatte, plötzlich angehoben und dadurch der Muskel samt den Elektroden in flüssige Luft versenkt.

Beim Muskel *B* wurde verschieden lange nach Rückkehr des Schreibhebels in die Horizontale genau in der gleichen Weise vorgegangen.

Jeder Muskel wurde nunmehr zunächst in einer mit flüssiger Luft gekühlten Porzellanreischale unter Verwendung eines in gleicher Weise vorbereiteten Pistills möglichst gut zerkleinert, wobei der Muskel in eine einfache Schicht allerbesten Verbandgaze, Kambrik oder festes Nesseltuch eingewickelt war; am besten bewährte sich Verbandgaze, doch war sie in genügend guter Qualität bei unseren späteren Versuchen nicht erhältlich.

Das entstandene Pulver, das beim Gastrocnemius mit einigen, von der Aponeurose herrührenden, feinfaserigen Elementen untermischt war, wurde mittels eines in flüssiger Luft gekühlten Nickellöffels in ein etwa 20 cm hohes Wägeröhrchen geschüttet. Dieses war mit genau 5 ccm einer Flüssigkeit beschickt, die durch Sättigen einer wässrigen

<sup>1)</sup> H. Behrendt, im Druck befindliche Arbeit. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 118, 123. 1922.

Salzsäurelösung von 4% HCl mit Kochsalz in Substanz hergestellt war<sup>1)</sup> Das analytisch gewogene Wägeröhrchen wurde vor Beginn des Versuches in Kältemischung auf etwa  $-15^{\circ}$  abgekühlt.

Um ein Anhaften von Muskelteilchen an den oberen Wandteilen des Wägeröhrchens und namentlich am Schliff zu vermeiden, verwandten wir Fülltrichter, die einige Zentimeter über dem Flüssigkeitsspiegel endeten. Sofort nach Einfüllen des Muskelpulvers wurde das Wägegöläschen mit seinem Schliffdeckel verschlossen und die Muskulatur durch vorsichtig schwenkende Bewegungen so vollständig wie möglich in die Flüssigkeit versenkt.

Auch die an der Wand über der Flüssigkeit haften bleibenden Teile wurden hierbei gründlich mit der sauren Lösung durchtränkt. Bei Verwendung etwas größerer Muskelmengen — es kamen in unseren Versuchen solche zwischen 0,35 und 1,5 g in Betracht — gefror hierbei öfters die kochsalzgesättigte Salzsäurelösung.

Die fest verschlossenen Gefäße wurden alsbald in die Kältemischung zurückgebracht, in der sie etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde verblieben, wobei die Muskulatur unter der Einwirkung der Säure stark aufquoll. Nunmehr wurden die Gefäße aus der Kältemischung entfernt, außen gründlich gesäubert, und, nachdem sie unter wiederholter Beseitigung des anhaftenden Kondenswassers die Temperatur des Wägeraumes angenommen hatten, analytisch gewogen. Die verwandte Muskelmenge ergab sich als Differenz dieser Wägung und der vorangegangenen des flüssigkeitsbeschickten Wägeröhrchens. Die weitere Verarbeitung (Fällung mit genau 5 ccm destillierten Wassers und 5 ccm Sublimatlösung von 5%. Stehenbleiben über Nacht, Filtration, genaue Abmessung eines möglichst großen aliquoten Teils des Filtrates [meist 13 ccm], Entquecksilberung mit frisch bereitetem Schwefelwasserstoffwasser, Abtrennung des Quecksilbersulfids durch Filtration unter gründlichem Auswaschen mit kaltem Wasser, wobei die Flüssigkeit in ein Erlenneyerkölbchen abfloß, das bei 60 ccm eine Eichmarke trug, Auffüllen bis zu dieser Eichmarke, Beseitigung des überschüssigen Schwefelwasserstoffwassers und Fällen mit dem von Embden angegebenen Reagens) erfolgte ganz in der früher beschriebenen Weise<sup>2)</sup>. Das schließlich gewogene Strychninphosphormolybdat entspricht der 39fachen Menge des vorhandenen  $P_2O_5$ - oder der 28,24fachen Menge des vorhandenen  $H_3PO_4$ -Gewichtes.

Die sämtlichen Versuche dieser Arbeit sind auf  $H_3PO_4$  in Prozenten der frischen Muskulatur berechnet, wobei wir von der praktisch sehr annähernd richtigen Annahme ausgingen, daß bei Verwendung von  $a$  g

<sup>1)</sup> Die Sättigung mit Kochsalz erfolgte zur Herabsetzung des Gefrierpunktes der Salzsäurelösung.

<sup>2)</sup> C. Wechselmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. **113**, 146. 1921. — E. Adler, daselbst S. 174.

Muskulatur die gesamte, ursprünglich vorhandene Flüssigkeitsmenge 15 + a ccm betrug. Bei der Berechnung der Flüssigkeitsmenge wurden nur die beiden ersten Stellen nach der Dezimale in Betracht gezogen.

**Versuchsergebnisse.**

Da wir bei unseren Untersuchungen Unterschiede im Phosphorsäuregehalt zweier gleichartiger Muskeln in verschiedenem, physiologischem Zustande aufzufinden hofften, mußten wir zunächst feststellen, inwieweit der Phosphorsäuregehalt derartiger Muskeln unter gleichen physiologischen Bedingungen übereinstimmt. Absichtlich haben wir die Ausführung dieser Versuche nicht auf einmal vorgenommen, sondern zu dauernder Kontrolle unserer Methodik auf verschiedene Versuchstage verteilt<sup>1)</sup>. Stets führten wir am gleichen Versuchstage eine größere Anzahl (6–10) Einzelversuche aus, von denen öfters mehrere Kontrollversuche in dem eben besprochenen Sinne waren. Das Ergebnis der 15 auf diese Weise ausgeführten Kontrollversuche ist in Tabelle I zusammengestellt.

**Tabelle I.**

1	2	3	4	5	6	7	8
Nr.	Datum	Froschart	Muskelart	Zeit der Verarbeitung d. B-Muskels nach der des A-Muskels Sek.	Anorgan. Phosphorsäure des Muskels A %	Anorgan. Phosphorsäure des Muskels B %	Unterschied von A in % von B
1	29. IV.		Gastrocnem.		0,2776	0,2755	+0,76
2	29. IV.		"		0,2767	0,2789	-0,79
3	23. VI.		"	0	0,2850	0,2824	+0,92
4	27. VI.	Esc. ♀	"	120	0,3459	0,3483	-0,69
5	27. VI.	Esc. ♀	Semimembr.	120	0,3247	0,3265	-0,55
6	27. VI.	Eis-schrank-frosch	Gastrocnem.	120	0,3268	0,3292	-0,73
7	4. VII.	Esc. ♀	"	120	0,3450	0,3392	+1,71
8	4. VII.	Esc. ♂	Semimembr.	120	0,3408	0,3420	-0,36
9	4. VII.	Esc. ♂	Gastrocnem.	120	0,3399	0,3429	-0,88
10	11. VII.	Esc. ♀	"	60	0,3716	0,3641	+2,06
11	11. VII.	Esc. ♀	"	60	0,3339	0,3305	+1,03
12	18. VII.		"	50	0,3438	0,3456	-0,52
13	18. VII.		"	25	0,3495	0,3444	+1,48
14	25. VII.	Escul. ♂	Semimembr.	0	0,3759	0,3769	-0,27
15	25. VII.	Escul. ♂	Gastrocnem.	0	0,3640	0,3655	-0,41

Nur die beiden ersten Versuche wurden ohne Verwendung von flüssiger Luft ausgeführt.

In den meisten folgenden Versuchen wurden beide Muskeln, um die Versuchsbedingungen denen der Hauptversuche möglichst ähnlich zu gestalten, zwischen Elektroden befestigt. In der Regel kam Muskel B, wie in den Hauptversuchen, später als Muskel A in flüssige Luft, wie das

<sup>1)</sup> Die sämtlichen im nachfolgenden zu schildernden „Hauptversuche“ wurden genau in der Reihenfolge ihrer Darstellung ange stellt.

im einzelnen aus Reihe 5 der Tabelle I hervorgeht. Aus derselben Tabelle ist ersichtlich, wie außerordentlich genau die Phosphorsäurewerte beider Muskeln miteinander übereinstimmen. Bald ist der Phosphorsäuregehalt in *A*, bald der in *B* um ein ganz geringes höher.

Der Genauigkeitsgrad der Methode geht am besten aus Reihe 8 hervor, in welcher der Unterschied zwischen beiden Bestimmungen in Prozenten des *B*-Wertes errechnet ist. Man sieht, daß diese Unterschiede in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle unter 1% gelegen sind. In den 13 unter Anwendung von flüssiger Luft vorgenommenen Versuchen übersteigt die Differenz der beiden Werte nur viermal diese Größe. Der Höchstwert dieser Unterschiede beträgt gerade 2% (Versuch 10). Hierbei fällt auf, daß in diesen vier Versuchen übereinstimmend ein Mehrgehalt von *A* an anorganischer Phosphorsäure vorhanden ist. Wir werden auf diesen Punkt später noch zurückkommen.

Die sämtlichen in dieser Tabelle zusammengestellten Versuche wurden von Ende April bis Ende Juli 1921 ausgeführt.

Die in den verschiedenen Versuchen beobachteten Werte für anorganische Phosphorsäure unterscheiden sich wesentlich voneinander. Sie sind bei Sommerfröschen im allgemeinen um so höher, je frischer gefangen und lebendiger die Tiere sind. Wir werden übrigens auf die Bedeutung der absoluten Zahlen dieser Tabelle später nochmals eingehen müssen.

Tabelle II.

1 Nr.	2 Datum	3 Frosch- art	4 Muskelart	5 Be- lastung  gr	6 Roll- ab- stand  cm	7 Dauer d. fara- disch. Stroms  Sek.	8 9 Zeit vom Be- ginne der Reizung bis zum Verbringen von		10 Anorgan. Phos- phorsäure des Muskels <i>A</i>  %	11 Anorgan. Phos- phorsäure des Muskels <i>B</i>  %	12 Zunahme der <i>A</i> -Phosphorsäure in % von <i>B</i>
							A in fl. Luft Sek.	B in fl. Luft Min.			
16	7. III.		Gastrocnem.	2			3?	2	0,2902	0,2806	3,42
17	10. III.		"	2	0		3	4	0,2768	0,2612	5,97
18	10. III.		"	2	5		4	5	0,2845	0,2753	3,34
19	10. III.		"	2	10		4	5	0,3113	0,3059	1,73
20	26. IV.		"	40	5-0		5	4	0,3067	0,2991	2,54
21	26. IV.		"	40	5-0		5	5	0,3073	0,2909	5,63
22	27. IV.		"	Isome- trisch- Hebel	0		5	5	0,3105	0,3139	-1,08
23	9. V.		"		5-0		5	5	0,2925	0,2844	2,85
24	9. V.		"	13	5-0		5	5	0,3149	0,3115	1,09
25	9. V.		"	13	5-0		3		0,3220	0,3079	4,58
26	18. V.	Esc. ♂ (Bayern)	Semimembr.	13	5-0	50	3	4	0,3111	0,3117	-0,19
27	18. V.		Gastrocnem.	13	5-0	55	3	4	0,3149	0,3165	-0,51
28	18. V.	Esc. ♀ (Bayern)	Semimembr.	13	5-0	50	3-4	5	0,3117	0,3071	1,50
29	18. V.		Gastrocnem.	13	5-0	50	3	5	0,3037	0,3021	0,53
30	18. V.	Esc. ♀ (Bayern)	Semimembr.	13	5-2	50	3	5	0,2867	0,2735	4,83
31	30. V.		"	"	13	5-2	30	3-4	4	0,2744	0,2786
32	30. V.	Esc. ♀ (Bayern)	"	13	5-2	30	3	4	0,2870	0,2763	3,87
33	30. V.		Gastrocnem.	13	5-2	30	2	4	0,2811	0,2605	7,91
34	30. V.	Esc. ♀ (Bayern)	"	13	5-2	30	3-4	4	0,2187	0,2196	-0,41

In Tabelle II sind die 19 ersten von uns vorgenommenen „Hauptversuche“ zusammengestellt. Hierbei kam der Muskel *A* nach einer 2–5 Sekunden langen Dauer der Reizung in flüssige Luft. (Reihe 8), Muskel *B* wurde noch längere Zeit (etwa  $\frac{1}{2}$  Minute) weitergereizt, wobei der Strom sich aus den oben erwähnten Gründen abschwächte. Häufig erschlaffte dieser Muskel schon vor Unterbrechung des Reizstromes. In flüssige Luft kam er in Versuch 16 2 Minuten, in allen übrigen erst 4–5 Minuten nach Beginn der Reizung. Ein Vergleich der für Muskel *A* und *B* ermittelten Phosphorsäurewerte in den Reihen 10 und 11 zeigt, daß zwischen beiden Muskeln sich zum Teil weitaus größere Unterschiede finden als in den vorangegangenen Kontrollversuchen. 14 mal ist der Phosphorsäuregehalt in Muskel *A* ein höherer als in Muskel *B*, und nur 5 mal trifft das umgekehrte Verhalten zu. Die Differenzen zugunsten des Muskels *A* in den genannten fünf Versuchen liegen übrigens durchweg in den früher ermittelten Fehlergrenzen der Bestimmung. (Siehe Reihe 12, Versuche 22, 26, 27, 31, 34.) Von den 14 Versuchen, in denen der *A*-Wert für anorganische Phosphorsäure überwiegt, liegen 10 sicher außerhalb der Bestimmungsfehler.

Während in den Kontrollversuchen der größte Fehler 2% des gefundenen *B*-Wertes gerade erreichte, finden wir in den genannten 10 Versuchen (16, 17, 18, 20, 21, 23, 25, 30, 32, 33) nur 2 mal (Versuche 20 und 23) Differenzen unter 3%, 3 mal (Versuche 16, 18, 32) liegen sie zwischen 3 und 4%, 2 mal (Versuche 25 und 30) zwischen 4 und 5% und 3 mal (Versuche 17, 21, 33) über 5%. Der höchste Unterschied zugunsten von *A* (7,9%) wurde in Versuch 33 beobachtet.

Fraglos war also in der Mehrzahl der Versuche der Phosphorsäuregehalt in jenem Muskel, der in kontrahiertem Zustande zum raschen Erfrieren gebracht wurde, höher, als in dem erst mehrere Minuten nach seiner Wiedererschaffung verarbeiteten. Dieses Verhalten ist nur so zu deuten, daß es während der Kontraktion zum vermehrten Auftreten von anorganischer Phosphorsäure kommt und daß nach der Erschlaffung die abgespaltene Phosphorsäure rasch wieder in organische Bindung übergeht.

Weswegen nicht in allen Fällen die Versuche positiv ausfielen, wird zweckmäßig erst später erörtert werden.

In den Versuchen 22 und 23 war der Muskel durch eine starke Feder an wesentlicher Verkürzung verhindert; in dem einen dieser isometrischen Versuche zeigt sich kein außerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung liegender Unterschied in den Phosphorsäurewerten, in dem anderen ist ein solcher zugunsten des *A*-Wertes vorhanden.

Charakteristische Unterschiede in dem Verhalten des Semimembranosi und Gastrocnemii lassen sich nicht feststellen.

Die 25 Versuche der nunmehr folgenden Reihe (Tabelle III) waren in zweifacher Hinsicht gegenüber den vorangehenden abgeändert. Ein-

mal wurde der Muskel *A* bis zur Versenkung in flüssige Luft wesentlich kürzere Zeit gereizt (etwa 0,2 bis höchstens 0,8 Sekunden gegenüber 2—5 Sekunden in den vorangehenden Versuchen [Reihe 8 der Tabelle]) und zweitens wurde die Erholungszeit des Muskels *B* nach Abschluß der Reizung etwas abgekürzt (1—2 Minuten, gegenüber meistens 4—5 Minuten in den Versuchen der Tabelle II).

Die Angaben der Reizungszeit des Muskels *A* bis zum Versenken in flüssige Luft (Reihe 8) sind übrigens nur annähernd richtig. Es wurde hierbei in der Art vorgegangen, daß der Versuchsansteller mit der linken Hand den in den Reizstrom eingeschalteten Quecksilberschlüssel schloß und, sobald er die Kontraktion des Muskels wahrnahm, mit der rechten Hand das bis dahin unmittelbar unter dem Präparat stehende Dewarsche Gefäß mit flüssiger Luft anhub, wodurch der Muskel in flüssige Luft versenkt wurde. Die in Spalte 8 angegebene Reizdauer wurde durch einen Beobachter ermittelt, der in dem Augenblicke, indem er die Schließung des Schlüssels bemerkte, und dann wieder in dem Moment, in dem er die Hebung des Dewargefäßes wahrnahm, die Stoppuhr betätigte.

Von 25 Versuchen dieser Reihe ist in 24 der Gehalt des Muskels *A* an Phosphorsäure höher als jener des Muskels *B*. Nur in einem (Versuch 52), ist der *B*-Wert höher und zwar innerhalb der in den Kontrollversuchen ermittelten Fehlergrenzen der Bestimmung.

Von den 24 Versuchen mit überwiegendem Phosphorsäuregehalt des Muskels *A* liegen 17 (Versuche 35, 36, 37, 38, 42, 43, 45, 46, 47, 49, 50, 53, 54, 55, 56, 58, 59) außerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmung, und zwar gehören in der Mehrzahl dieser Versuche diese Unterschiede geradezu einer anderen Größenordnung als der in den Kontrollversuchen ermittelten an. Der höchste beobachtete Unterschied (Versuch 55) liegt nur wenig unter 10% des *B*-Wertes und in 12 weiteren Versuchen erreicht dieser Unterschied 5% oder er übertrifft diesen Wert, zum Teil in beträchtlichem Maße.

Es zeigt sich also, daß die Versuche der Tabelle III mit einer Ausnahme Unterschiede des Phosphorsäuregehaltes zugunsten des Muskels *A* aufweisen, und daß diese Unterschiede in der Überzahl der Fälle weit außerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmung gelegen sind.

Welche von den beiden in den Versuchen der Tabelle III gegenüber jenen der Tabelle II vorgenommenen Abänderungen den so viel einheitlicheren Verlauf der Versuche bedingte, soll an dieser Stelle noch nicht erörtert werden.

In weiteren sieben Versuchen, die in Tabelle IV (Versuche 60—66) zusammengestellt sind, wurde Muskel *A* bis zum Versenken in flüssige Luft annähernd ebensolange gereizt wie in den vorangehenden Versuchen der Tabelle III, Muskel *B* hingegen, unmittelbar nachdem seine

Table III.

1 Nr.	2 Datum	3 Froschart	4 Muskel	5 Be- lastung g	6 Rollen- Ab- stand cm	7 Dauer des farad. Stromes Sek.	8 Zeit vom Beginne der Reizung bis zum Ver- bringen von		9 %	10 Anorgan. Phosphor- säure des Muskels A %	11 Anorgan. Phosphor- säure des Muskels B %	12 Zunahme der A- Phosphor- säure in % von B.
							A in fl. Luft Sek.	B in fl. Luft Sek.				
35	6. VI.	Esc. ♀ Warmfrosch, bei	Seminembr.	13	5	20	0,2	1:0	0,2668	0,2543	4,92	
36	6. VI.	hoch. Zimmertemp. gehalt.	Gastrocn.	13	5	30	0,2	120	0,2947	0,2416	5,42	
37	6. VI.	Esc. ♀, Eisschrankfrosch	Seminembr.	13	5	30	0,2	120	0,2926	0,2849	2,70	
38	6. VI.	Esc. ♀, Warmfrosch	Gastrocn.	13	5	20	0,8	120	0,2963	0,2731	8,50	
39	6. VI.	Esc. ♂, Warmfrosch	Seminembr.	13	5	30	0,2	120	0,3379	0,3323	1,69	
40	6. VI.	Esc. ♂, Warmfrosch	Gastrocn.	13	5	30	0,2	120	0,3161	0,3140	0,67	
41	10. VI.	Esc., Warmfr., nicht lebh.	"	52	5	30	0,3	120	0,3271	0,3226	1,40	
42	10. VI.	Esc. ♂, recht lebhaft.	"	52	5	30	0,4	120	0,3044	0,3441	5,90	
43	10. VI.	Esc., lebhaftes Warmtier	"	52	5	30	0,4	120	0,3135	0,3053	2,69	
44	10. VI.	Esc., lebhaft	"	52	5	30	0,6	120	0,2924	0,2894	1,04	
45	20. VI.	Esc. ♂, frisch gefangen	"	50	5	20	0,5	120	0,2854	0,2660	7,29	
46	20. VI.	Esc. ♀, frisch gefangen	Seminembr.	25	5	20	0,5	120	0,3566	0,3393	5,10	
47	20. VI.	Esc. ♀, frisch gefangen	Gastrocn.	50	5	20	0,4	120	0,3360	0,3117	7,80	
48	20. VI.	Esc. ♂, frisch gefangen	Seminembr.	25	5	20	0,4	120	0,3250	0,3231	0,59	
49	20. VI.	Esc. ♂, frisch gefangen	Gastrocn.	50	5	20	0,4	120	0,3250	0,3032	7,19	
50	20. VI.	Esc. ♂, Eisschranktier	Gastrocn.	50	5	20	0,5	120	0,3291	0,3173	3,72	
51	27. VI.	Esc. ♂, Warmfrosch	Seminembr.	25	5	20	0,4	120	0,3471	0,3411	1,76	
52	27. VI.	Esc. ♂, Warmfrosch	Gastrocn.	50	5	30	0,4	120	0,3343	0,3395	-1,56	
53	27. VI.	Esc. ♂, Warmfrosch	"	50	5	30	0,6	120	0,3488	0,3274	6,54	
54	4. VII.	Esc. ♀, ziemlich lebhaft	Seminembr.	25	5	20	0,6	60	0,3192	0,3040	5,00	
55	4. VII.	Esc. ♀, ziemlich lebhaft	Gastrocn.	50	5	20	0,6	60	0,3152	0,2874	9,67	
56	4. VII.	Esc. ♀, ziemlich lebhaft	"	50	5	30	0,5	120	0,3122	0,2901	7,62	
57	11. VII.	Esc. ♀	Seminembr.	25	5	20	0,4	60	0,3132	0,3077	1,79	
58	11. VII.	Esc. ♀	Gastrocn.	50	5	20	0,4	60	0,3269	0,3096	5,59	
59	11. VII.	Esc. ♀	"	50	5	6	0,5	40	0,3126	0,3000	4,20	

Erschlaffung sichtbar wurde, in flüssige Luft gebracht, was nach 8 bis 18 Sekunden der Fall war. In sämtlichen Versuchen überwiegt die Menge der A-Phosphorsäure, wobei allerdings 2 mal (Versuche 63 und namentlich 66) die Unterschiede durchaus innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung gelegen sind.

Tabelle IV.

1 Nr.	2 Datum	3 Froschart	4 Muskel	5 Belastung g	6 Rollenabstand cm	7 8 Zeit vom Be- ginn der Reizung bis zum Verbringen von		9 Anorgan. Phos- phorsäure des Muskels A	10 Anorgan. Phos- phorsäure des Muskels B	11 Zunahme der A- Phosphorsäure in % von B
						A in fl. Luft Sek.	B in fl. Luft Sek.			
60	18. VII.	Esc. ♀	Semimembr.	25	5	0,4	8	0,3548	0,3389	4,69
61	18. VII.		Gastrocnem.	50	5	0,7	7	0,3368	0,3289	2,59
62	18. VII.	Esc. ♂	"	50	5	1	10	0,3246	0,3111	4,34
63	18. VII.		"	"	50	5	0,4	18	0,3341	0,3287
64	26. VII.	"	"	25	5	0,4	15	0,3414	0,3318	2,89
65	26. VII.	Esc. ♀	"	25	5	0,4	7	0,3495	0,3334	4,83
66	26. VII.		"	"	25	5	0,8	6	0,3570	0,3565

Aus diesen Versuchen geht mit Sicherheit hervor, daß die im Augenblicke der Kontraktion gebildete Phosphorsäure außerordentlich rasch wieder in organische Bindung übergehen kann.

Der Mehrgehalt an anorganischer Phosphorsäure in Muskel A ist auch in den sicherlich positiv ausgefallenen Versuchen dieser und der vorangehenden Tabellen ein recht verschieden großer, und es war von vornherein natürlich nicht möglich, zu entscheiden, ob diese Verschiedenheit durch eine bald stärkere, bald schwächere Bildung von Phosphorsäure im Muskel A oder durch ihre mehr oder weniger vollkommene Rückbildung zu Lactacidogen im Muskel B (oder aber auch durch die beiden eben genannten Momente) bedingt war.

Wir änderten nun unsere Versuchsanordnung folgendermaßen ab: Muskel A wurde 5–6 Sekunden lang gereizt und kam in den meisten Fällen etwa 30 Sekunden nach seiner Erschlaffung zugleich mit Muskel B, der von vornherein überhaupt nicht in den Stromkreis eingeschaltet war, in flüssige Luft. Wir hofften auf diese Weise für Muskel B den normalen Ruhewert für Phosphorsäure ermitteln zu können und wollten durch einen Vergleich dieses Wertes mit dem an dem gereizten Muskel A festgestellten ein Urteil über die Vollständigkeit der Rückbildung des Lactacidogens gewinnen.

Schon bei der Fixation dieses Muskels in flüssiger Luft beobachteten wir nun aber in der überwiegenden Mehrzahl der Versuche ein sehr auffälliges Verhalten:



Muskel *A*, der etwa 30 Sekunden nach dem Aufhören einer recht starken faradischen Reizung, also im Zustande einer gewissen Ermüdung, in flüssige Luft kam, zeigte beim Einbringen in die letztere entweder keine oder doch nur ganz geringfügige Kontraktionserscheinungen.

Muskel *B* verkürzte sich dagegen überaus deutlich und gefror stets in stärker kontrahiertem Zustande als Muskel *A*.

Eine Ausnahme hiervon machte nur Versuch 67. Es handelte sich um die Semimembranosi eines offenbar erkrankten Frosches. Die Muskeln enthielten kleine Blutungen. Muskel *A* kontrahierte sich auf den elektrischen Reiz gut. Schon vor der Reizunterbrechung, die nach 6 Sekunden erfolgte, erschlaffte der Muskel; er zeigte, als er 30 Sekunden später gleichzeitig mit *B* in flüssige Luft gebracht wurde, keine Kontraktionserscheinungen, aber auch Muskel *B* blieb völlig unkontrahiert.

Es wurde also in den Versuchen 68—76 der Muskel *B* in stärker kontrahiertem Zustande zum Erfrieren gebracht als Muskel *A*. Dem entspricht es völlig, daß in 8 von diesen 9 Versuchen (Versuche 68 bis 75) der im Muskel *B* ermittelte Phosphorsäuregehalt größer war als der im Muskel *A*. Wenn wir von Versuch 68 absehen, der an den Gastrocnemien desselben kranken Tieres vorgenommen wurde, dessen Semimembranosi zum Versuch 67 dienten, sind diese Unterschiede überall außerordentlich beträchtlich. Die geringste Steigerung des *B*-Wertes gegenüber *A*, die in Versuch 71 beobachtet wurde, beträgt 6,8%, die höchste in Versuch 75 berechnete 26,9%. In diesem Versuche ist sicherlich ein großer Teil der vorhandenen Lactacidogenphosphorsäure bei der unter der Einwirkung des Kältereizes erfolgenden Kontraktion des Muskels *B* zur Abspaltung gelangt.

In Versuch 76 war das Verhalten beider Muskeln beim Einbringen in flüssige Luft dem in den vorangehenden Versuchen beobachteten durchaus ähnlich. Trotzdem zeigt sich in diesem Falle ein starker Mehrgehalt von *A* an anorganischer Phosphorsäure. Worauf dies von allen anderen Versuchen mit deutlichen Kontraktionserscheinungen an Muskel *B* völlig abweichende Verhalten beruht, vermögen wir nicht anzugeben. Dafür, daß es sich um einen Analysenfehler handelt, konnten wir Anhaltspunkte nicht gewinnen. Freilich war es auch hier, wie in allen anderen Fällen, nicht möglich, Doppelbestimmungen auszuführen.

Zweimal (Versuche 67 und 68, 73 und 74) wurden an den beim Einbringen in flüssige Luft keine erheblichen Kontraktionserscheinungen zeigenden Muskeln *A* die Phosphorsäuregehalte des Semimembranosus und des Gastrocnemius vom gleichen Tier miteinander verglichen. In beiden Fällen zeigte sich ein deutlicher Mehrgehalt des Semimembranosus anorganischer Phosphorsäure, ein Befund, der mit den von

Tabelle V.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nr.	Datum	Froschart	Muskel	Belastung	Rollenabstand	Reizzeit des A-Muskels	Erholungszeit des A-Muskels	Anorgan. Phosphorsäure des A-Muskels	Anorgan. Phosphorsäure des B-Muskels	Zunahme der B-Phosphorsäure in % von A	Verhalten der Muskeln beim Einbringen in flüssige Luft
				g	cm	Sek.	Sek.	%	%	%	
67	1. VIII.	Esc. ♂	Semimembr.	25	5	6	30	0,2834	0,2699	-4,76	Beide Muskeln gefrieren ohne Kontraktionerscheinungen.
68	1. VIII.		Gastrocnem.	25	5	5	30	0,2548	0,2610	2,43	Geringe Reizerscheinungen, bei B eher etwas stärker.
69	1. VIII.	Esc. ♀	"	25	5	6	30	0,3152	0,3378	7,17	Geringe Kontraktionerscheinungen, bei B deutlicher ausgeprägt.
70	1. VIII.		"	25	5	6	35	0,3197	0,3633	13,64	B gefriert unter größeren Kontraktionerscheinungen.
71	1. VIII.		"	25	5	6	30	0,3182	0,3400	6,85	Raschere Kontraktion bei B.
72	1. VIII.	Temp. ♀	"	25	5	6	30	0,3384	0,3703	12,38	B gefriert unter ziemlich viel stärkeren Kontraktionerscheinungen als A.
73	4. VIII.		Semimembr.	25	5	6	40	0,3251	6,3493	7,44	B kontrahiert sich sehr viel rascher und stärker.
74	4. VIII.	Gastrocnem.	25	5	6	80	0,2988	0,3592	20,3	A zeigt nicht die geringste, B deutliche, aber nicht sehr starke Kontraktion.	
75	4. VIII.	Esc. ♀	"	25	5	6	27	0,3084	0,3914	26,9	A zeigt kaum erkennbare Kontraktionerscheinungen, B sehr deutliche und rasche.
76	4. VIII.		"	25	5	6	36	0,3661	0,3302	-9,81	A zeigt geringfügige, B sehr deutliche Kontraktion.

H. Behrendt<sup>1)</sup> kürzlich im hiesigen Institut gewonnenen Untersuchungsergebnissen übereinstimmt.

Die aus einem Vergleich der Tabelle V einerseits mit den Tabellen III und IV andererseits hervorgehende Tatsache, daß Muskeln, die im ungereizten Zustande in flüssige Luft gelangen und sich unter der Einwirkung des Kältereizes kontrahieren, eine stärkere Steigerung des Phosphorsäuregehaltes aufweisen, als solche, welche weniger als eine Sekunde nach Beginn einer starken faradischen Reizung in flüssige Luft versenkt werden, beweist, daß die Phosphorsäurebildung bei der Kontraktion außerordentlich rasch erfolgt, und weist darauf hin, daß das Verschwinden der gebildeten Phosphorsäure unter Rückbildung des Lactacidogens schon während des Kontraktionszustandes beginnen kann.

Es scheint demnach so, als ob die Menge der bei der Kontraktion abgespaltenen Phosphorsäure um so größer ist, je rascher nach Kontraktionsbeginn die biochemischen Veränderungen des Muskels zum Stehen gebracht werden.

Um die im Anfange der Kontraktion auftretenden Veränderungen so gut wie möglich zu fixieren, haben wir daher in einer weiteren Versuchsreihe, die in Tabelle VI niedergelegt ist, den Muskel *A* in ungeretztem Zustande in flüssige Luft gebracht, wobei sich sofort die für den unermüdeten Muskel charakteristische Kältekontraktion zeigte. Durch faradische Reizung unmittelbar nach dem Einbringen in flüssige Luft konnte die Kontraktionshöhe noch ganz erheblich gesteigert werden.

Muskel *B* wurde in zweien der Versuche (78 und 79) im gleichen Stromkreise wie Muskel *A* gereizt und kurze Zeit nach Unterbrechung der Reizung ebenfalls in flüssige Luft gebracht. In den übrigen Versuchen nahmen wir die Reizung beider Muskeln gesondert vor, wobei immer Muskel *A* unmittelbar nach dem Einbringen in flüssige Luft gereizt wurde, Muskel *B* erst nach einer faradischen Reizung, deren Dauer ebenso wie die darauffolgende Erholungszeit im einzelnen aus den Spalten 8 und 9 der Tabelle VI hervorgeht, in flüssige Luft gebracht wurde.

Von den 9 Versuchen dieser Tabelle (Versuche 77–85) zeigt nur Versuch 84 Gleichheit des Phosphorsäuregehaltes der Muskeln *A* und *B*. In allen übrigen Fällen ist ein weit außerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmung gelegener Mehrgehalt des Muskels *A* an anorganischer Phosphorsäure vorhanden. Der höchste Wert wurde in Versuch 78 beobachtet, wo sich in Muskel *A* 22% Phosphorsäure mehr als in Muskel *B* fanden.

Inwieweit übrigens an der Zunahme der Phosphorsäure in Muskel *A* die elektrische Reizung mitbeteiligt ist, inwieweit diese Zunahme

<sup>1)</sup> H. Behrendt, a. a. O.

lediglich auf den Reiz der flüssigen Luft zurückzuführen ist, vermögen wir nicht zu entscheiden.

Jedenfalls geht aus der Tabelle VI, namentlich in Vergleich mit den Tabellen II–IV, mit besonderer Deutlichkeit die Phosphorsäureabspaltung zu Beginn der Muskelkontraktion hervor, und gerade die Tatsache, daß die gebildete Phosphorsäure so rasch wieder verschwindet, scheint uns auf die hohe physiologische Bedeutung dieses Abspaltungsvorganges hinzuweisen.

Ehe wir in eine weitere Erörterung unserer vergleichenden Untersuchungen an gereizten und ungereizten, beziehungsweise ermüdeten und nicht ermüdeten Muskeln eintreten, möchten wir nunmehr nochmals zu den in Tabelle I beschriebenen „Kontroll“-Versuchen zurückkehren.

In diesen Versuchen brachten wir, wie oben geschildert, unermüdete Muskeln in flüssige Luft. Es ist daher auf Grund der zuletzt besprochenen, in den Tabellen V und VI zusammengefaßten Versuche anzunehmen, daß, wenigstens soweit beim Einbringen in flüssige Luft deutliche Kontraktionserscheinungen auftraten, der gefundene Phosphorsäuregehalt gegenüber den wahren Ruhewerten erhöht ist.

In der Tat finden sich in allen Versuchen der Tabelle I, die unter Anwendung von flüssiger Luft ausgeführt wurden, auffällig hohe Phosphorsäurewerte, außer in Versuch 3. In diesem wurde, im Gegensatz zu allen späteren Versuchen, ein Frosch verarbeitet, der längere Zeit im Eisschrank aufbewahrt worden war.

Wir haben schon früher hervorgehoben, daß in den 4 Versuchen der Tabelle I, in denen die Unterschiede im Phosphorsäuregehalt 1% des in dem später verarbeiteten Muskel *B* gefundenen Wertes überschritten, der in dem früher verarbeiteten Muskel *A* gefundene Wert überall der höhere war. Es ist vielleicht nicht ausgeschlossen, daß dies Verhalten durch die höhere Erregbarkeit des in frischerem Zustande verarbeiteten Muskels *A* bedingt ist.

Aus der Gesamtheit unserer Untersuchungen geht mit Sicherheit hervor, daß die Muskeltätigkeit nicht nur, wie wir endgültig seit Fletcher und Hopkins wissen, mit einer Abspaltung von Milchsäure, sondern auch mit einer solchen von anorganischer Phosphorsäure verbunden ist.

Fraglos entstammen beide Säuren ein und derselben Quelle, dem Lactacidogen.

Die bei der Muskelkontraktion entstehende Phosphorsäure geht außerordentlich rasch wieder in organische Bindung über. Allem Anschein nach beginnt dieser Vorgang bei faradischer Reizung des Muskels schon während des Tetanus. Hierfür spricht jedenfalls die Tat-

Tabelle VI.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Nr.	Datum	Frosch- art	Muskel	Belastung g	Rollenab- stand bei der Reizung des A-Muskels cm	Rollenab- stand bei der Reizung des B-Muskels cm	Reizzeit des B-Muskels Sek.	Erholungs- zeit des B-Muskels Sek.	Anorgan. Phosphor- säure des A-Muskels %	Anorgan. Phosphor- säure des B-Muskels %	Zunahme der A-Phosphor- säure in % von B	Bemerkungen
77	4.VIII.	Esc. ♂	Gastrocnem.	25	0	5	6	40	0,3181	0,2819	12,8	A gefriert in maximaler Kontraktion, B reißt gegen Ende der Reizzeit aus der Elektrode aus.
78	4.VIII.	Temp. ♀	"	25	4	4	13	40	0,2772	0,2273	22,0	Reizung in gleichem Stromkreise. A gefriert in maximaler Kontraktion. Bei B kaum Kontraktionser-scheinungen.
79	8.VIII.	Temp. ♂	"	25	4	4	15	36	0,3237	0,2832	14,3	Reizung in gleichem Stromkreise. A erstarrt in maximaler Kontraktion, B unter deutlichen, aber nicht sehr starken Kontraktionser-scheinungen.
80	8.VIII.	Esc. ♀	"	25	4	4	10	—	0,3455	0,3249	6,34	A erstarrt in Kontraktionsstellung, B unter kaum erkennbaren Kon-traktionser-scheinungen.
81	8.VIII.	Temp. ♀	"	25	4	4	6	30	0,3243	0,3022	7,31	A erstarrt maximal kontrahiert.
82	8.VIII.	Esc. ♂	"	25	4	4	6	20	0,3439	0,3190	7,8	A erstarrt maximal kontrahiert. Bei B läßt sich keine Kontraktion erkennen.
83	8.VIII.	Esc. ♀	Semimembr.	25	4	4	6	14	0,3460	0,3103	11,50	A erstarrt in starker Kontraktions-stellung, B ohne irgendwelche Reiz-erscheinungen.
84	8.VIII.		Gastrocnem.	25	2	5	8	20	0,3103	0,3108	-0,016	A erstarrt maximal kontrahiert, B in leichter Kontraktionsstellung.
85	8.VIII.	Esc. ♀	"	25	2	5	6	9	0,3576	0,3252	9,96	A erstarrt maximal kontrahiert; bei B kaum Kontraktionser-scheinungen.

sache, daß unter sonst gleichen Bedingungen die Phosphorsäureabspaltung um so stärker ist, je rascher nach Beginn der Reizung der Muskel in flüssige Luft kommt.

Die stärkste Phosphorsäurebildung wird durch die bloße Wirkung des Kältereizes beim Einbringen frischer Muskeln in flüssige Luft oder dann erzielt, wenn der elektrischen Reizung die Versenkung des Muskels in flüssige Luft vorausgeht.

Zahlreiche Tatsachen sprechen dafür, daß es im Kontraktionsaugenblick neben der exothermen chemischen Reaktion der Lactacidogenspaltung zu einem ebenfalls exotherm verlaufenden physikochemischen Prozeß kommt. Wenn, wie es durch die neueren chemischen und thermodynamischen Untersuchungen verschiedener Forscher immer wahrscheinlicher geworden ist, diese physicochemisch bedingte exotherme Reaktion in quellungsartigen Vorgängen unter der Einwirkung plötzlich gesteigerten H-Ionengehaltes erfolgt, so dürfen wir vielleicht schon deswegen der stärker dissoziierten Phosphorsäure eine noch höhere Bedeutung für den Vorgang der Muskelkontraktion zusprechen als der schwächer dissoziierten Milchsäure.

Namentlich aber wird die besondere Bedeutung gerade der Phosphorsäurebildung für die Muskelkontraktion durch die Tatsache ihres raschen Verschwindens wahrscheinlich gemacht.

Während bei jeder länger andauernden Reizung eines isolierten Froschmuskels sich die Milchsäure bis zu einem gewissen Maximum anhäuft, kommt es — wenigstens im Froschmuskel unter normalen Bedingungen — nicht zu einer die Kontraktion merklich überdauernden Vermehrung der anorganischen Phosphorsäure. Die Phosphorsäurebildung ist also weit mehr als die der Milchsäure zeitlich an die Kontraktion gebunden.

Hill und Hartree<sup>1)</sup> haben in einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung gezeigt, daß von der während der Gesamtdauer einer Kontraktion gebildeten Wärme ein besonders großer Anteil gerade in der ersten Zeit nach Beginn der Muskelreizung frei wird. Es liegt die Vermutung nahe, eben diese starke initiale Wärmebildung einmal mit dem an sich exothermen chemischen Prozeß der Lactacidogenspaltung in Milchsäure und Phosphorsäure und zweitens mit einem unter Einwirkung der hierdurch hervorgerufenen Steigerung der H-Ionenkonzentration ebenfalls unter positiver Wärmetönung verlaufenden physikochemischen Prozeß in Zusammenhang zu bringen.

Es wäre ferner auch denkbar, daß gelegentlich die im Augenblick der Muskelkontraktion erfolgende Spaltung des Lactacidogenmoleküls nicht unter Bildung von Milchsäure und Phosphorsäure, sondern

<sup>1)</sup> A. V. Hill und W. Hartree, Journ. of physiol. 44, 84. 1920.

unter Bildung von Kohlehydrat und Phosphorsäure erfolgt. In diesem Falle würde also die Steigerung der H-Ionenkonzentration ausschließlich durch die Phosphorsäureabspaltung hervorgerufen werden.

Es liegt nahe, an eine derartige Möglichkeit gerade für den stärker ermüdeten Muskel zu denken, weil nach früheren Erfahrungen mit zunehmendem H-Ionengehalt die fermentative Milchsäurebildung aus Lactacidogen früher als die Phosphorsäurebildung gehemmt wird.

Wie dem aber auch sein mag, jedenfalls wird durch die vorliegende Untersuchung bewiesen, daß es bei der Kontraktion des isolierten Froschmuskels nicht nur, wie das bereits bekannt war, zur Bildung von Milchsäure, sondern auch zum Freiwerden anorganischer Phosphorsäure aus Lactacidogen kommt, und daß die abgespaltene Phosphorsäure sehr rasch nach der Kontraktion, ja allem Anschein nach schon während des Fortbestehens des Kontraktionszustandes, wieder in Lactacidogen übergeführt wird.

Angesichts der auch bei Anwendung von flüssiger Luft bestehenden Unmöglichkeit, die Stoffwechselfvorgänge im Muskel wirklich momentan zu unterbrechen, und der Geschwindigkeit, mit der das Lactacidogermolekül wieder aufgebaut wird, muß damit gerechnet werden, daß die Phosphorsäurebildung bei der Tätigkeit in Wahrheit noch viel größer ist, als es in unseren Untersuchungen in mit verbesserter Technik steigendem Maße hervortritt.

# Über Reduktionen und Oxydationen und eine gekoppelte Reaktion im intermediären Stoffwechsel des Tierkörpers.

Von

**F. Knoop.**

(Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Freiburg.)

(Eingegangen am 31. Oktober 1921.)

Physiologische Reduktionen verdienen das Interesse der Biologen in ganz besonderem Maße. Während die organischen Substanzen dauernd, auch ohne Beteiligung einer Zelltätigkeit, durch fortschreitende Ab-sättigung mit Sauerstoff allmählich aller chemischen Spannkraft entkleidet werden und zerfallen, ist die endothermische Synthese von Kohlenstoffverbindungen durch Reduktion in der freien Natur ausschließ-lich Funktion der lebenden Zelle. Sie allein baut — unter den jetzigen physikalischen Bedingungen der Erdoberfläche — in das organische Material die Energie ein, die sie der Sonne abgewinnt. — Summarisch sind uns diese Prozesse seit langem geläufig: Die ganze Produktion der Pflanzenwelt ist ihr Ausdruck. Aber auch mancher physiologische Pro-zeß im Tierkörper verläuft im Prinzip gleich, so daß die grundsätzliche Scheidung von Pflanzen- und Tierchemismus längst einer mehr quan-titativen Gegenüberstellung hat weichen müssen.

Wie sieht es nun mit dem Stande unserer Kenntnisse aus, wenn wir den Reaktionsmechanismus solcher Vorgänge genau in allen Teilen übersehen möchten? Das zeigen am besten die Untersuchungen Will-stätters über die erste Phase des gewaltigsten dieser Reduktionspro-zesse: der Assimilation der Kohlensäure in der Pflanze. Wir stehen vor ganz anderen Problemen, als wie sie das Laboratorium des Chemikers sonst aufwirft. Und wenn man die ungeheuren Erfolge, die die organi-sche Synthese ihren Meistern gebracht hat, vergleicht mit der Be-scheidung, die die Verfolgung solcher biologischen Probleme von ihren Bearbeitern verlangt, so wird man sich erst so recht der Schwierigkeiten bewußt, denen physiologische Arbeit auf Schritt und Tritt begegnet.

Das Studium der chemischen Pflanzenphysiologie hat in dieser Rich-tung bisher wenig ergeben. Wir können in ihren intermediären Stoff-wechsel fast an keiner Phase klar hineinschauen und gleichgültig, ob er



endothermisch verläuft oder ob wir einen Moment vornehmen, in dem auch dort Abbau vorherrscht — es gelingt kaum, dem pflanzlichen Chemismus der Vielzelligen trotz seiner riesigen Leistungen beizukommen. Viel eher bei den einzelligen. Hier sind namentlich in letzter Zeit z. B. im Gebiete der Gärungen und Fäulnisprozesse wertvolle Resultate gewonnen, die Schlaglichter in manches Gebiet der gesamten Biochemie geworfen haben. Und doch sind auch ihnen meist Ergebnisse vorangegangen, die im Tierkörper gefunden wurden. Dieser erlaubt durch die Arbeitsteilungen seiner Organsysteme und die Zugänglichkeit mancher künstlich isolierten Funktion Einblicke, die Zerlegungen bekannter Gesamtreaktionen ermöglicht haben. Und das nicht nur in der Richtung, die in seinem Chemismus überwiegt, dem oxydativen Abbau — auch die Paradigmata für den Ablauf klarer Reduktionsprozesse sind hier gefunden worden. Wenn z. B. der Säugetierorganismus Benzallävulinsäure in Phenyl- $\alpha$ -oxydbuttersäure überführt, so ist damit die Hydrierung einer Doppelbindung und die Reduktion eines Carbonyls zum Alkohol in einem Beispiel bündig belegt. Und bildet der Tierkörper aus Benzoylpropionsäure Phenylelessigsäure, so reduziert er hier sogar Carbonyl zu Methylen, also zwei Oxydationsstufen auf einmal. — Derartig werden die Wege sein, die der tierische Chemismus auch bei physiologischen Objekten geht, und wenn wir Schweine mit Kartoffeln mästen und Fett aus Kohlenhydrat gebildet wird, so ist eine Aldolkondensation von Acetaldehyd (oder Brenztraubensäure)molekülen die wahrscheinlichste Form solcher Synthesen, denen dann umfangreiche Reduktionen von  $\text{CHOH-}$  zu  $\text{CH}_2$ -Gruppen folgen müssen<sup>1)</sup>.

Reduktionen gehen im Tierkörper gewiß nicht vor sich, wie wir sie meist im Laboratorium realisieren, z. B. mit Wasserstoff in statu nascendi, den wir aus Wasser oder Säuren entwickeln oder durch Übertragung des elementaren Gases durch Katalysatoren. Freier Wasserstoff ist im Tierkörper nie nachgewiesen und sein Vorkommen nicht wahrscheinlich. Auch kann der Tierkörper nicht wie die Pflanze Sonnenlicht direkt zu Reduktionsprozessen verwerten. Den Energiefixierungen müssen Oxydationsprozesse von mindestens äquivalenten Wärmetönungen gegenüberstehen. Als Paradigma kann die Cannizzarosche Umlagerung gelten, die der Tierkörper nach den Befunden von Parnas im Hofmeisterschen Laboratorium in viel weiterem Umfange verwirklichen kann, als wir es in vitro vermögen. Allgemein betrachtet, brauchen in solchem Falle aber nicht immer zwei gleiche Molekel so verändert zu werden, daß das eine unter Oxydation soviel an Energie hergibt, wie das andere speichert. Es könnte ebensogut z. B. ein Carbonyl zum Carboxyl oxydiert werden, indem zugleich in einer anderen Substanz eine Doppelbindung reduziert wird, und ähnliches mehr. Man

<sup>1)</sup> Vgl. Neuberg und Arinstein, diese Zeitschr. **117**, 269. 1921.

hat für die unbekanntenen Reagenzien, die solche Prozesse vermitteln, schöne Worte geprägt in der Annahme, daß es sich hier um ganz spezifische Wirkungen handelt; man spricht von „hydroklastischen Fermenten“, die Wasser angeblich so aufspalten, daß in der einen Richtung Sauerstoff, in der anderen Wasserstoff wirksam werden soll. Wenn diese wenig glückliche Charakterisierung bestenfalls summarisch den Endeffekt trifft, so verläuft der Hergang für diejenigen Fälle, die bisher aufgeklärt werden konnten, jedenfalls ganz anders. — Ich vermute, daß mehr für das Verständnis solcher Prozesse gewonnen würde, wenn in der organischen Chemie systematische Untersuchungen über reduzierende oder oxydierende Einwirkungen aller in Betracht kommenden organischen Atomgruppen angestellt würden in ihren Beziehungen zueinander. In den organischen Laboratorien sind die Einwirkungen der anorganischen Substanzen sehr sorgfältig studiert worden: Man hat sehr genau das Verhältnis von Permanganat oder Ozon zu Doppelbindungen erforscht, von Chromsäure oder Jodwasserstoff zu Alkoholen, von Schwefelwasserstoff oder Silber- und Kupferoxyd zu Carbonylen usw. Demgegenüber sind solche Beziehungen zwischen zwei organischen Komplexen zueinander wenig bearbeitet worden. — Man kennt zwar hier viele Einzeltatsachen. Aber sie sind Stückwerk geblieben und es fehlen systematische Durchprüfungen. — Vielfach sind gegenseitige Einwirkungen bestimmter Gruppen im gleichen Molekül untersucht und als „intramolekulare Umlagerungen“ beschrieben worden. So muß uns die Tatsache interessieren, daß Ölsäure mit Kali geschmolzen fast quantitativ Palmitinsäure und Essigsäure liefert: neben einer Oxydation also, die dem physiologischen Säureabbau zu entsprechen scheint, findet Reduktion einer Doppelbindung statt. Mit den Bedingungen der Kalischmelze haben freilich physiologische Verhältnisse wenig gemein und die Oxydation überwiegt hier auch um ein Sauerstoffatom. Aber in der Richtung dieser Reaktion liegt auch das oben zitierte Beispiel der physiologischen Überführung der Benzallävulinsäure in Phenyl- $\alpha$ -oxybuttersäure:



Hier ist in  $\beta$ -Stellung Methylen zu Carboxyl oxydiert, zugleich aber vier Wasserstoffatome zur Reduktion von Carbonyl und Doppelbindung verwandt, eine Menge, die äquivalent der Oxydation wäre, wenn wir auch hier eine Abspaltung von Essigsäure annehmen wollten. Doch wissen wir darüber ebensowenig sicheres, wie darüber, ob beide Prozesse überhaupt ursächlich miteinander verknüpft sind.

Solche gegenseitigen Beeinflussungen organischer Komplexe spielen aber zweifellos in biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Sie sind durch die Beobachtungen Neubergs über die Gärungen mit wertvollen

und klaren Beispielen aus diesem Gebiet belegt worden, und haben inzwischen durch die Arbeiten Wielands und Thunbergs, von denen nachher noch zu sprechen sein wird, ein besonderes Interesse gewonnen.

Die Untersuchungen, über die hier zu berichten ist, waren schon vor den obigen Befunden über Reduktionen (1913) begonnen worden und schlossen sich an die Beobachtungen über die Aminosäuresynthese im Tierkörper an. Wie die Pflanze den Stickstoff in die Eiweißspaltstücke einbaut, wissen wir vorderhand nicht — die vielen Theorien darüber zeigen nur, wie wenig Tatsächliches festgestellt worden ist. Die Aminosäuren sind mit den Kohlenhydraten verglichen, jedenfalls Produkte weitgehender Reduktion, denn im allgemeinen trägt keines der C-Atome außer den Carboxylgruppen noch den Sauerstoff, den alle C-Atome der Zuckermoleküle aufweisen. Ein Weg der Synthese, den der Tierkörper einschlägt, geht über die  $\alpha$ -Ketonsäuren, und dieser Vorgang ist jedenfalls ein Reduktionsprozeß, der mit der Eliminierung eines O-Atoms einhergeht. Hier ließ sich nun in einem Falle beobachten, daß die gebildete Aminosäure nicht als solche erschien, sondern in Form eines Acetylproduktes. Dieser Befund legte, da Essigsäure das Oxydat anderer Moleküle ist, die Frage nahe, ob hier, eben weil der Reduktionsprozeß und die Anlagerung des Stickstoffs sich mit der Kuppelung eines dritten durch Oxydation entstandenen Körpers verband, Oxydation und Reduktion als durcheinander bedingt erweisen ließen. Ich habe diese Frage schon bei der ersten Veröffentlichung<sup>1)</sup> diskutiert und auf die Analogie hingewiesen, die in den rein chemischen Befunden von Erlensmeyer und de Jong bestanden, wenn sie Brenztraubensäure mit Ammoniak *in vitro* behandelten. Bald darauf begann ich Versuche mit dem Ziel, festzustellen, ob hier eine derartige gekoppelte Reaktion vorlag, und welche Substanz die Essigsäurekomponente stellte. Es kommen dafür alle Hauptnährstoffgruppen in Betracht: Eiweiß, Fette und Kohlenhydrate können nach den bekannten Abbauregeln Essigsäure bilden. Neubauer und Warburg denken zunächst an die Fettsäuren. Mir schien die Brenztraubensäure wahrscheinlicher. Ich habe vor allem diese beiden untersucht und folgende Versuchsanordnung angewandt:

Wenn man einem Hund  $\gamma$ -Phenyl- $\alpha$ -amidobuttersäure in immer gleicher Weise bei völlig konstanter Kost verabfolgt, so scheidet er eine gewisse Menge der Substanz als Acetylprodukt aus, die, wenn man günstige Verhältnisse trifft, innerhalb kleiner Grenzen schwankt, bei verschiedenen Tieren allerdings recht verschieden groß sein kann. Ist eine befriedigende Konstanz erreicht, so setzt man dem Futter zugleich den zweiten Körper zu, den man untersuchen möchte, und bestimmt die jetzt ausgeschiedene Menge Acetylprodukt. Sie schwankt in etwas

<sup>1)</sup> H. S. 67, 489 u. 71, 252.

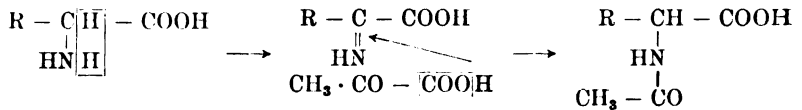
größeren Umfange, als ohne die gewählten Zusätze, aber die absolute Vermehrung war so bedeutend, daß ein Zweifel über den Einfluß der Beigaben ganz außer Diskussion steht; Brenztraubensäure vermehrte um rund 50%, Buttersäure um ca. 18%; Essigsäure zeigte dagegen in einem Kontrollversuch gar keinen Einfluß. Gerade der letztere Befund beweist m. E., daß es sich nicht um eine einfache Acylierung handelt, etwa nach Art der Benzoylierung des Glykokolls zu Hippursäure durch fertige Benzoesäure, sondern daß Vorstufen der Essigsäure die Acetylierung bewirken müssen.

Damit habe ich das wesentliche Ergebnis der Versuche eigentlich genannt. Sie scheinen einfach gefunden und vielleicht manchem einfach zu deuten. Das erstere ist keineswegs der Fall. Und die richtige Auslegung stößt ebenfalls auf solche Schwierigkeiten, daß ich umfangreichere Versuche für wünschenswert halte. Ich habe jahrelang die Versuche gar nicht publizieren wollen, weil ich selbst die notwendigen Ergänzungen nicht beschaffen kann: Die Schwierigkeiten, Versuchstiere und geeignetes Futter zu bekommen, scheinen für die jetzigen Arbeitsverhältnisse auch hier in Freiburg unüberwindlich. Aber die aufgeworfenen Fragen kreuzen sich inzwischen so bedeutungsvoll mit immer neuen anderen Ergebnissen der letzten Jahre, daß mir die Publikation notwendig erscheint, auch wenn sie fast mehr Fragen aufwirft, als beantwortet. Ich müßte sonst wahrscheinlich die bisherigen Ergebnisse noch lange zurückstellen und damit das Gebiet definitiv anderen überlassen. Das wird auch so nötig werden — aber es ist wenigstens ein Anfang gemacht.

Was zunächst die technischen Schwierigkeiten anbetrifft, so waren die Versuche ungemein mühevoll und zogen sich mit vielen Enttäuschungen sehr lange hin — die Erreichung einer hinreichenden Konstanz in der Acetylkörperausscheidung ist fast eine Glückssache zu nennen. Sie konnte nur mit ganz konstanter Pferdefleischfütterung erzielt werden. Auch dabei versagten viele Hunde. Einige brachen sehr bald Futter und Aminosäure wieder aus und waren auch nach Tagen nicht dazu zu bringen, zu fressen, wenn die an sich geschmacklose Säure beigemischt war. Bisweilen half hier Fleischextrakt. Aber auch, wenn die Aminosäure mit der Schlundsonde in Milch oder Bouillon beigebracht war, wurde oftmals alles wieder erbrochen. Subcutane Injektion ist unmöglich wegen der Unlöslichkeit. So gelangen die verwertbaren Versuchsreihen nur vor dem Kriege oder in einem Versuche, der im Anfang noch ermöglicht wurde. Nach dem Kriege habe ich es erst mit gemischtem Futter aus dem Abfall der Kliniken versucht — ohne Erfolg; dann mit Milch allein — nicht anders. Dann benutzte ich Kaninchen: bei denen war überhaupt keine Konstanz zu erreichen. Einige schieden gar kein Acetylprodukt aus, andere sehr schwankend neben oft großen Mengen

von Benzoesäure und anderen Derivaten. Hinreichend Pferdefleisch zu beschaffen, war ausgeschlossen. Ein Leberdurchblutungsversuch hatte überhaupt kein Ergebnis, es ließ sich kein Acetylprodukt nachweisen, wenn ich ohne Zusatz arbeitete — auch Neubauer und Warburg haben nur Spuren in ihrem analogen Fall gewinnen können. Einen Selbstversuch schließlich mußte ich abbrechen, weil nach einiger Zeit sich ein so widerlicher Geschmack ähnlich dem nach Zimtaldehyd einstellte, daß ich meine Hunde zu verstehen begann. — Es hätte vielleicht näher gelegen, die Ketonsäure zu verwenden, weil für sie der Übergang in Aminosäure eine Reduktion darstellt, der nichts Hypothetisches anhaftet. Indessen eignet sich die Substanz dazu wenig, einmal, weil sie viel stärker zum Brechen reizt, und subcutan (wie früher) beigebracht, keinen Vergleich ermöglicht, da die Resorptionszeiten zu sehr variieren können. Zudem ist die Ausbeute an Acetylprodukt zu gering und abhängig von der Ammoniakkonzentration, die für die Iminosäuren vermutlich nicht so ins Gewicht fällt. Aber der Prozeß der Acetylierung geht, wie schon unabhängig von mir mit Neubauer und Warburg ausgeführt haben, mit so großer Wahrscheinlichkeit über die Aminosäuren (bzw. die gleichwertige Oxyaminosäure), daß dieses Bedenken wegfallen kann. Von den Zusätzen wurde die Brenztraubensäure stets frisch rektifiziert. — Buttersäure wurde gewählt, weil die Acetessigsäure als solche immer als ein etwas zweifelhaftes Material erscheint, als Ester aber etwas ganz anderes darstellt, was für Vergleiche kaum in Betracht kommt. Viel geeigneter wäre mir  $\beta$ -Oxybuttersäure erschienen. Leider stand mir die aktive Modifikation nicht zur Verfügung. Aceton habe ich auch einmal zugegeben: es hatte einen so geringen Effekt, daß ich ihn damals als Null betrachtete — die Zahlen kann ich nicht angeben, da mir das zugehörige Protokoll samt dem Material beim Umzug in das jetzige Institut im Kriege verloren wurde.

Aus den beobachteten Tatsachen geht mit Sicherheit hervor, daß Brenztraubensäure die Ausscheidung des Acetylkörpers am stärksten vermehrt. Wenn wir demgemäß als wahrscheinlich annehmen können, daß hauptsächlich diese Substanz, die sich beim physiologischen Abbau der Kohlenhydrate vermutlich in großen Mengen bildet, die Acetylierung auch dann veranlaßt, wenn wir die Aminosäure ohne Beigaben zuführen, so ist also der Prozeß nach den Befunden von Neubauer und Warburg und den eigenen über die Phenylketobuttersäure folgendermaßen aufzufassen: Die Aminosäure wird zur Iminosäure (oder Oxyaminosäure) und geht als solche mit Brenztraubensäure eine Reaktion ein, die in einer Disproportionierung der beiden verschiedenen Moleküle derart besteht, daß die Brenztraubensäure zu Essigsäure oxydiert, die Iminosäure aber zur Aminosäure zurückreduziert wird, und beide Moleküle dann zur Acetylaminosäure zusammentreten.



Will man sich dieser Auffassung anschließen, so stellt diese Synthese eine gekoppelte Reaktion dar, bei der Reduktionsprodukt und Reduktionsmittel wohldefiniert sind, und der Vorgang einer physiologischen Reduktion im Tierkörper sich in allen Teilen wirklich übersehen läßt.

Diese Reaktion wird auch von einer anderen Seite betrachtet, das Interesse der Physiologen erregen: Man muß annehmen, daß eine wichtige Funktion des Stickstoffes der Eiweißkörper in der Abfangung stark saurer Produkte des intermediären Stoffwechsels besteht. Von allen organischen Säuren, die da in Betracht kommen, ist nun die Brenztraubensäure die stärkste: Sie ist weit über 100 mal so stark wie die Fettsäuren und noch fast 10 mal so stark wie die Milchsäure. Diese starke Säure wird nun durch den vorliegenden Prozeß praktisch unschädlich gemacht, indem die Iminosäure sie in die schwache Essigsäure überführt und an den Stickstoff kuppelt. — Wenn die Aminosäure zur Oxyamino- oder Iminosäure oxydiert werden und diese unter Festhaltung von Ammoniak erneut reduziert werden kann, indem sie den gebundenen Sauerstoff (oder ihr höheres Oxydationspotential) auf anderes leicht oxydables Material überträgt, so wirken dieselben Aminosäuren, die als solche mit ihrem Stickstoff nach Siegfried einmal Kohlensäure binden können, ein andermal als Sauerstoffüberträger. Die alte Redensart von der „Verbrennung des Eiweißes im Feuer der Kohlenhydrate“ scheint danach für solche Fälle gerade umgekehrt zu liegen. Man könnte eher an die Wirkung von Fermenten erinnert werden, wenn man sich vorstellt, daß ein Molekül Aminosäure immer von neuem Sauerstoff aufnehmen, übertragen und dabei wieder zur Aminosäure zurückgebildet werden kann.

Schließlich möchte ich noch kurz hinweisen auf den Zusammenhang dieser Befunde mit den Anschauungen Wielands. Wieland hat für eine ganze Anzahl von Fällen zunächst gezeigt, daß das, was wir als Oxydation bezeichnen und als Effekt eines primären Sauerstoffangriffes anzusehen gewohnt waren, in seiner ersten Phase eine Wasserstoffabspaltung unter Bildung ungeättigter Verbindungen darstellt, bei der Sauerstoff nur sekundär die Rolle spielt, den Wasserstoff zu beseitigen, indem er ihn zu Wasser bindet. Statt seiner können auch organische Verbindungen, wie Metylenblau, Chinone usw. eintreten, die dann in gleichem Umfange reduziert, wie Alkohole, Aldehyde usw. oxydiert werden. Hier sind Oxydationen und Reduktionen einander äquivalent und stehen in dem ganz übersichtlichen Verhältnis

von Ursache und Wirkung zueinander. Ich möchte auf die grundsätzliche Bedeutung dieser Arbeiten, die durch die wertvollen Untersuchungen von Thunberg Bestätigung und Ergänzung gefunden haben, hier nur in dem Sinne hinweisen, wie hier auf ganz anderem Wege über das physiologische Hand-in-Hand-gehen von Oxydationen und Reduktionen Anschauungen gewonnen sind, die sich mit denen weitgehend decken, die uns schon früher (1912) zu dieser Arbeit bestimmt haben, die aber über die Art, wie physiologische Oxydationsprozesse überhaupt ablaufen, grundlegend Neues bringen. Die Unklarheit unserer alten Vorstellungen über die Art der Sauerstoffeinwirkung geht besonders deutlich aus den Einleitungen der alten Lehrbücher hervor, die immer wieder mit der „Aktivierung“ des Sauerstoffes als einer „vitalen“ Funktion in ihren Anfangskapiteln die gewilltesten Leser abschrecken. Wieviel einleuchtender sind diese neuen Vorstellungen! Und wenn nicht nur Alkohole und Aldehyde durch solche Dehydrierung abgebaut werden, sondern nach den Befunden von Thunberg auch Säuren, so müssen wir unsere Anschauungen über diesen Säureabbau vermutlich ebenfalls ändern. Thunberg hat gezeigt<sup>1)</sup>, daß Bernsteinsäure in Fumarsäure übergeht. Batelli und Stern geben an, daß diese Wasser anlagert und zu Apfelsäure wird. Was hier für Atomgruppen erwiesen scheint, die unter der Einwirkung von zwei Carboxylgruppen stehen, gilt wahrscheinlich auch für die einbasischen Fettsäuren. Dann würde die Bildung z. B. von  $\beta$ -Oxybuttersäure nach diesem Muster aufzufassen sein, zumal wenn sich für die Befunde Dakins, der mit Wasserstoffsuperoxyd aus Fettsäuren die den  $\beta$ -Oxosäuren entsprechenden Ketone erhielt, analoge Tatsachen finden ließen. Wir würden uns damit Vorstellungen nähern, wie Ernst Friedmann sie vertrat, wenn er, allerdings ohne experimentelle Belege wie die jetzigen von Wieland und Thunberg, auf die Möglichkeit der intermediären Bildung von ungesättigten Säuren hinwies. 1910 habe ich meinen Standpunkt so präzisiert: „Es ist nicht auszuschließen, daß die Bildung von  $\beta$ -Oxydationsprodukten ein Prozeß ist, der sich für manche Fälle vielleicht noch weiter zerlegen lassen wird und zu der Annahme einer intermediären Bildung von  $\alpha$ - $\beta$  ungesättigten Säuren führt.“ „Eine solche weitere Zerlegung des Reaktionsmechanismus würde an der obigen Auffassung nichts ändern, da die ungesättigten Säuren bei der Anlagerung von Wasser nur  $\beta$ -Oxysäuren bilden können oder bei weiterer Oxydation nach den bisherigen Erfahrungen Carbonyl oder Carboxyl nur am  $\beta$ -Kohlenstoffatom entstehen lassen<sup>2)</sup>.“ Die Befunde Wielands und der genannten Forscher werden uns im weiteren Verfolg vermutlich zu solchen Anschauungen führen. Dafür sind weitere Tatsachen abzuwarten.

<sup>1)</sup> Skand. Arch. **35**, 63 (1918) u. **40**, 1 (1920).

<sup>2)</sup> H. S. **67**, 491. 1910.

Wenn der Abbau der Aminosäuren ebenso durch Dehydrierung vor sich geht, so wäre die erste Oxydationsstufe nicht eine Ketonensäure, sondern eine Iminosäure, in der der Stickstoff am Kohlenstoff gebunden bliebe, wie es das obige Schema anzeigt. Dafür ist in dem hier beschriebenen Befund vielleicht eine Stütze gegeben<sup>1)</sup>.

#### Experimentelles.

Die Hunde erhielten täglich  $\frac{1}{2}$  Pfund Pferdefleisch, das ausgekocht und fein gemahlen wurde. Dahinein wurde die Substanz — jedesmal 6 g Phenylaminobuttersäure — in feinsten Pulverform eingerührt und das ganze auf einmal verabreicht und meist sofort verschlungen. Wurden Beigaben zugefügt, so wurde etwas von dem Fleisch zurückbehalten, die 6 g Aminosäure in gleicher Weise mit der Hauptportion gegeben, die Beigabe aber nur zur Hälfte sofort nach dem Fraß mit Schlundsonde eingeführt, die andere Hälfte nach Verfütterung des Fleischrestes 2 Stunden später. Diese Anordnung blieb stets die gleiche. Der Harn von 2 Tagen wurde genau verarbeitet, wie das früher angegeben. Die glänzende Krystallisationsfähigkeit der Acetylaminosäure erleichterte die quantitative Gewinnung in 3—4 Krystallisationen außerordentlich.

Ohne Beigaben wurde an Acetylprodukt gewonnen in vier Verfütterungen:

1,16 g  
1,36 g  
1,30 g  
1,22 g

zusammen 5,07 g: 4 = 1,27 g im Durchschnitt.

Ein weiteres Mal am Schluß der Versuche ergab 1,19 g.

Mit Zugabe von 6 g Brenztraubensäure, von 6 g Buttersäure wurden erhalten:

1,74 g  
1,95 g  
1,76 g  
2,11 g

1,57 g  
1,44 g  
zusammen 3,01 g: 2 = 1,5 g

zusammen 7,56 g: 4 = 1,89 g

Demgegenüber lieferte der Versuch mit Essigsäure 1,13 g Acetylkörper. Bei der Zugabe von Brenztraubensäure wurden je 3 g unmittelbar vor der Eingießung mit Soda fast neutralisiert und in 20 ccm Wasser eingegeben. die Sonde nachgespült. — Von Buttersäure wurde die äquivalente Menge in Form des käuflichen Natronsalzes (7,5 g) in gleicher Weise gegeben. Von Essigsäure wurden 4 g Eisessig mit Soda neutrali-

<sup>1)</sup> Ich bin auf die schönen Untersuchungen von M. Hensel über die Acetylierung von Anilinderivaten nicht eingegangen, weil jene Prozesse ohne Reduktion einhergehen und Amin am Kern für unsere Fragestellung keine physiologische Analogie darstellt.



siert, ebenfalls die äquivalente Menge. — Die prozentualen Vermehrungen waren im Durchschnitt aller Versuche bei Brenztraubensäure 48,8%, bei Buttersäure 18,1%.

Alle diese Ergebnisse wurden an dem gleichen Hunde erzielt. Bei einem zweiten Hund schwankten die Zahlen in Versuchen ohne Beigabe stärker, nämlich zwischen 0,9 und 1,54 g. Mit Brenztraubensäure lieferte er 1,95 g. Ein Versuch mit Aceton und ein solcher mit Essigsäure bewegten sich innerhalb der Zahlen der Versuche ohne Beigaben — die Daten kann ich nicht mehr beibringen. Der Hund starb ohne jeden Befund. Ich vermute, daß er vergiftet wurde. — Bei allen Ergebnissen wurden nur einwandfreie Versuche verwertet. Als der erste Hund einmal Durchfall hatte, wurde der ganze Versuch abgesetzt, da die Resorption gestört sein konnte. Sonst war der Stuhl ein stets gleichmäßiger Fleischstuhl.

Zu den Kosten trug eine Zuwendung der Wissenschaftlichen Gesellschaft in Freiburg bei, für die auch an dieser Stelle gedankt sei.

## Die Lipide der Linse.

Von

M. Goldschmidt (Leipzig).

(Aus der Universitäts-Augenklinik, Leipzig.)

(Eingegangen am 1. November 1921.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Bei der wichtigsten pathologischen Veränderung der Krystalllinse des Menschen, der *Cataracta senilis*, ist das Auftreten von Cholestearin sehr häufig und makroskopisch leicht erkennbar. Aus Gründen der rein-deskriptiv-chemischen Betrachtungsweise, aber später auch in Verfolgung physiologischer Fragestellungen entstanden einige Arbeiten, die sich mit den quantitativen und qualitativen Verhältnissen der Fette und der fettähnlichen Bestandteile der normalen und pathologisch veränderten Linse beschäftigten. Die Resultate der älteren Arbeiten sind außerordentlich verschieden, zum Teil widersprechend; eine kritische Beurteilung der Ergebnisse ist zum Teil nicht möglich, da Angaben über die Methode, wie z. B. in der Publikation von Zehender, Matthiessen und Jakobsen (*Klin. Monatsbl. f. Augenheilk.* 1879, S. 307f.), überhaupt fehlen. Auch die Arbeiten von Laptschinsky (*Pflügers Archiv f. d. ges. Physiol.* 13, 631), Cahn (*Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem.* 5, 228), Knies, Kühne leiden an der Unzulänglichkeit der Methode. Bei Knies (Untersuchungen aus dem *Physiol. Institut der Universität Heidelberg* 1, 114) fehlt der kaltalkohollösliche Bestandteil, dessen Bedeutung aus den mitzuteilenden eigenen Untersuchungen hervorgehen wird. Von neueren Arbeiten seien die Publikationen von Gross (*Arch. f. Augenheilk.*, 57, 107) und von Jess (*Habilitationsschrift, München* 1913) erwähnt, die aber, da die bisher übliche Ätherextraktion beibehalten wurde, quantitativ ebenfalls nicht verwendbar sein dürften. Es läßt sich nämlich zeigen, daß es ganz unmöglich ist, die Gesamtmenge des Cholestearins durch Äther zu extrahieren, auch dann nicht, wenn man die Extraktionsdauer erhöht. Und was für das Cholestearin gilt, trifft erst recht für die übrigen Lipide zu.

Versuch: Menschenlinsen bei 37° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (1,5017 g) ergaben nur 0,35% in Äther lösliche Lipide, von denen der größte Teil aus Cholestearin bestand. Hingegen betrug die Gesamtlipoidmenge, die durch Alkohol-, Benzol- und Acetonextraktion gewonnen wurde, 4,39% des Trockengewichts; die Gesamtcholestearinmenge selbst betrug 0,83%.

Auch die Erhitzung des Ausgangsmaterials auf 105°, wie dies von Gross und Jess ausgeführt wurde, übt, wie a priori zu erwarten ist,

eine weitgehende und tiefgreifende Veränderung der Lipoide aus (Oxydationen, Spaltungen usw.), die in einer außerordentlichen Gewichtsvermehrung ihren markantesten Ausdruck findet.

In den folgenden Untersuchungen ist der Versuch unternommen worden, unter möglichster Berücksichtigung der Labilität der Lipoide und der dadurch bedingten Schwierigkeiten beim Arbeiten einen Einblick in die quantitativen Verhältnisse zu gewinnen, und zwar in bezug auf das Lebensalter der Linsen. Es mag aber nicht unerwähnt bleiben, daß die biochemische Bedeutung der Lipoide für die Linse, vor allem ihre Stellung zum Stoffwechsel, die Problemstellung der vorliegenden Arbeiten beeinflußt hat.

### **Wahl und Vorbehandlung des Materials.**

Zu sämtlichen Untersuchungen wurden menschliche Linsen verwandt. Sie entstammten Augen soeben Verstorbener. Aus dem Augapfel wurden sie nach Anlage eines äquatorien Schnittes mit einem scharfen Löffel in der Kapsel extrahiert. Auf diese Weise gelang es, ein Ausgangsmaterial zu erhalten, das Rinde und Kern der Linse vollständig enthielt. Die so gewonnenen Linsen wurden in absolutem Alkohol, nach Jahresklassen geordnet, aufbewahrt. Waren auf diese Weise für die einzelnen Jahresklassen, meist Zeiträume von je 10 Jahren, genügend Material gesammelt, dann wurde der Alkohol durch ein entfettetes Filter abfiltriert und die Linsen mit absolutem Alkohol gewaschen. Der Konservierungsalkohol wurde mit dem Waschalkohol vereinigt, um weiter verarbeitet zu werden (siehe weiter unten). Die Linsen wurden im Achatmörser fein zerrieben und dann im Vakuum über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Da diese Art der Trocknung des Materials sehr lange dauerte, bis zu einem Vierteljahr, wurde ein Teil derselben bei 37° vorbehandelt. Es soll jedoch hervorgehoben werden, daß vor dem Extraktionsverfahren nie eine höhere Temperatur als 37° einwirkte. Die Extraktion wurde in kleinen Soxhletapparaten vorgenommen. Kühler und Kölbchen waren derart eingeschliffen, daß eine Einfettung nicht nötig war. Die Filtrierhülsen waren entfettet. In Vorversuchen war festgestellt worden, daß die Extraktionsmittel am besten nach folgender Ordnung angewandt wurden: Alkohol, Petroläther, Aceton, Benzol. Jede einzelne Extraktion war, wie die Vorversuche ebenfalls gezeigt hatten, nach 36 Stunden beendet. Die Lösungsmittel wurden auf dem Wasserbad stark eingeeengt. Dieselben wurden im Vakuum vollständig entfernt und der Rückstand im dunkeln Exsiccator zur Gewichtskonstanz gebracht. Die Resultate sind in der Tabelle I dargestellt.

Bei der weiteren Verarbeitung der einzelnen Substanzen zeigte es sich, daß ein Teil derselben nicht einheitlich war. Die ursprünglich in kaltem Alkohol lösliche Fraktion konnte durch heißen Alkohol getrennt

Tabelle I.

Alter	Stückzahl	Trockengewicht in g	Kalt Alkohol-löslich *)	Petroläther-löslich	Aceton-löslich	Benzol-löslich
0—1	24	0,7039	0,0029 g 0,41%	0,0118 g 1,712%	—	—
1—10	36	1,5017	0,0733 g 4,88%	0,0049 g 0,335%	0,0084 g 0,57%	0,0052 g 0,356%
12—20	31	1,5063	0,0994 g 6,59%	0,0028 g 0,195%	0,0193 g 1,34%	0,0022 g 0,151%
20—30	64	3,4376	0,2275 g 6,6%	0,0033 g 0,099%	—	0,0033 g 0,098%
40—50	62	3,8188	0,2190 g 5,73%	0,0110 g 0,299%	0,0313 g 0,856%	—
61—71	76	5,2144	0,2591 g 4,96%	0,0325 g 0,634%	0,0337 g 0,657%	0,0134 g 0,257%
71—75	21	1,5204	0,1073 g 7,05%	0,0083 g 0,56%	0,0010 g 0,6%	0,0021 g 0,14%

\*) Auf das Gewicht der zerkleinerten Substanz bezogen.

werden: in eine Substanz A, die dadurch charakterisiert ist, daß sie sich in keinem der lipoidlösenden Mittel mehr löste, und in eine Substanz B, die durch die Windaussche Digitoninfällung in Cholestearin und eine Substanz C zerlegt wurde. Letztere konnte durch den qualitativen Nachweis von Phosphor als Phosphatid charakterisiert werden. Die petrolätherlösliche Substanz war hingegen einheitlich und bestand aus Cholestearin, nachweisbar durch die typische Krystallform, den Schmelzpunkt und die bekannten Reaktionen. Die quantitativen Verhältnisse dieser zum Teil direkt, zum Teil durch weitere Zerlegung gewonnenen Substanzen sind die folgenden:

Tabelle II.

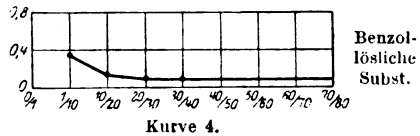
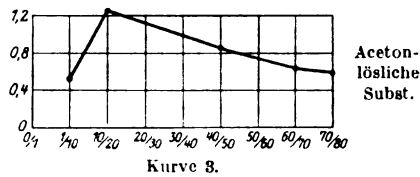
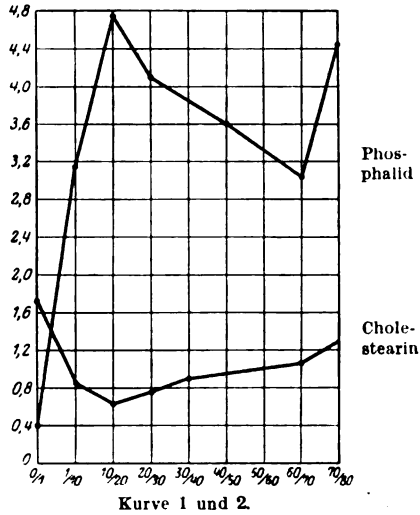
Alter	In kaltem und heißem Alkohol nicht löslich	Cholestearin	Phosphatid	Gesamt-Cholestearin
0—1	—	—	0,0029 g 0,41%	0,0118 1,71%
1—10	0,0189 g 1,25%	0,0074 g 0,49%	0,0470 g 3,13%	0,83%
10—20	0,0227 g 1,51%	0,0048 g 0,32%	0,0719 g 4,77%	0,52%
20—30	0,0635 g 1,86%	0,0211 g 0,64%	0,1419 g 4,13%	0,74%
40—50	0,0589 g 1,54%	0,0226 g 0,59%	0,1375 g 3,6%	0,89%
60—70	0,0774 g 1,47%	0,0234 g 0,43%	0,1583 g 3,04%	1,06%
70—75	0,0286 g 1,88%	0,0113 g 0,74%	0,0674 g 4,43%	1,3%

Stellt man die quantitativen Werte der einheitlichen Substanzen zusammen (s. Kurve 1, 2, 3 und 4), dann konstatiert man, daß die totale Menge der Lipide mit zunehmendem Alter ansteigt. Im ersten Lebens-

jahr beträgt dieselbe 2,12%, im ersten Dezennium 6,14% und im zuletzt untersuchten 8,35%. Die Verteilung der einzelnen Lipoide auf die Gesamtmenge ist die folgende: Das Cholestearin macht größere Schwankungen durch. Das erste Maximum der Cholestearinmenge liegt im ersten Lebensjahr, das Minimum im zweiten Dezennium und das zweite Maximum wird im siebenten bis achten Dezennium erreicht. Das Phosphatid bleibt im ersten Lebensjahr unter 0,4% des Linsentrockengewichts (der genaue Wert wurde nicht festgestellt, sondern nur der Bruttowert der kaltalkohollöslichen Fraktion, in der das Phosphatid enthalten ist). Es erreicht im zweiten Dezennium sein erstes Maximum, also in einer Periode des Cholestearinminimums. Vom zweiten Dezennium bis zum siebenten Dezennium erfolgt eine allmähliche Abnahme des Phosphatidgehaltes, der im letzten untersuchten Dezennium wieder einem Anstieg Platz macht. Dieser letzte Anstieg dürfte bereits auf pathologische Veränderungen der Linse zurückzuführen sein, die in diesen Jahren nicht auszuschließen sind.

Die acetonlösliche Fraktion hat ihr Maximum im zweiten Dezennium und die benzollösliche Fraktion erleidet im zweiten Dezennium eine schärfere Abknickung.

Die biologische Bedeutung der Befunde dürfte einesteils in der Rolle zu suchen sein, die die Lipoide als Sauerstoffatoren, d. h. für die Atmung der Linse spielen (Ciaccio, diese Zeitschr. 60, 313. Vernon, ebd. 47, 374; 51, 1; 60, 202). Andererseits scheint nach den Untersuchungen von Brinkmann und E. van Dam (diese Zeitschr. 108, 61) die Resistenz der Zelle, deren elektrische Isolation und die Ionenpermeabilität von dem Verhältnis des Lecithins zum Cholestearin abhängig zu sein. Versuche, die sich auf die pathologisch veränderte Linse erstrecken und die unter diesem angedeuteten biologischen Gesichtspunkt durchgeführt werden, sollen an anderer Stelle veröffentlicht werden.



## Über die Chemie des artefiziellen Ikterus\*).

Von  
Egmont Münzer (Prag).

(Eingegangen am 1. November 1921.)

Durch die Arbeiten Naunyns und Minokowskis<sup>1)</sup> schien es sichergestellt, daß eine Umwandlung von Blutfarbstoff in Gallenfarbstoff außerhalb der Leber innerhalb der Blutbahn nicht stattfindet, und damit war der Lehre vom hämatogenen Ikterus der Boden entzogen. Aber diese Lehre lebt nach den Untersuchungen der letzten Jahre in der Form des hämolytischen, anhepathogenen Ikterus wieder auf.

Es ist interessant zu sehen, daß der Anstoß zu diesen neuen Ansichten zum großen Teil von einer anfangs wenig beachteten Probe ausging. vom Nachweis des Urobilinogens im Harn durch das Aldehydreagens. Diese Reaktion, durch ihren Entdecker P. Ehrlich<sup>2)</sup> nicht aufgeklärt, bekam ihre besondere Bedeutung, als Neubaue<sup>3)</sup> zeigte, daß wir es hier mit einem allgemeinen „Reagens auf die Gruppe der Blut- und Blutfarbstoffe“ zu tun haben, und daß die Reaktion besonders intensiv sei „bei Erkrankungen, die mit Zerfall von Blutfarbstoff einhergehen“. Ich selbst habe in Übereinstimmung mit anderen Autoren, insbesondere mit Hildebrandt und Fischler<sup>4)</sup>, darauf hingewiesen, daß wir in der Aldehydprobe eine Reaktion auf feinste Störungen der Leberfunktion besitzen. Daß dies aber nicht nur im positiven, sondern auch im negativen Sinne gilt, möchte ich im Nachfolgenden in zwei Fällen künstlich hervorgerufener Gelbfärbung der Haut zeigen.

1. Herr P. E., 29 Jahre alter Drogist, wurde im Februar 1918 mit der Diagnose „Chronischer Ikterus“ in das Handelsspital transferiert.

Er gab an, im August 1916 an die Isonzofront abgerückt zu sein; hier wäre er an Gelbsucht und Hautgeschwüren, Diarrhöe und Erbrechen erkrankt und sei deshalb in das Hinterland rücktransportiert worden. Im Mai 1917 wäre er nach Prag gekommen, sei von einem Spital zum anderen verlegt worden, nachdem er in jedem einige Wochen zugebracht hätte, ohne sein Leiden zu verlieren. Einer der Ärzte hätte ihn eine Hg-Schmierkur durchmachen lassen und ihm Chinin gegeben, dann sei er, da sich der Zustand nicht besserte, nach Karlsbad transferiert worden; hier hätte man eine Choleccystitis konstatiert und ihm einen operativen Eingriff vorgeschlagen. Da er ihn ablehnte, habe man ihn nach 13 Wochen dauerndem Aufenthalte in Karlsbad nach Prag zurücktransferiert und dem Handelsspital zugeführt (das im Kriege eine Station zur Behandlung magen-darmkranker Soldaten war).

\*) Aus einem am 12. X. 1921 beim Fortbildungskurse der deutschen medizinischen Fakultät in Prag gehaltenen Vortrage: „Klinik der hepato-lienalen Erkrankungen mit besonderer Berücksichtigung des Ikterus“.

Die Hauptbeschwerden, über die Herr P. klagte, waren Schmerzen im Kreuze und in der Lebergegend, Appetitlosigkeit und ständiges Gefühl von Ameisenlaufen in Händen und Füßen. Stuhl ist wechselnd, meist angehalten; auf Abführmittel erfolgt breiiger Stuhl. Der Kranke, der sehr stark abgemagert war, zeigte eine schmutzig gelbe Hautfarbe; besonders auffallend war die intensive Gelbfärbung der Nägel und der Hohlhand. Lunge- und Herzbefund waren normal; der Blutdruck niedrig, 95—100 im Maximum. Das Blut zeigte eine leichte Anämie mit 68% Hämoglobin und  $3\frac{1}{2}$  Mill. roten Blutzellen, im übrigen normal; die  $\text{CO}_2$ -Spannung des Blutes nach Plesch ergab 6,2%. Der Kranke zeigte an beiden Beinen Spitzfußstellung (Folge der Kachexie). Die P.S.R. und A.S.R. waren normal, die Sensibilität der Haut nach allen Richtungen normal. Die elektrische Erregbarkeit der Muskeln normal. Der Harn zeigte ständig eine dunkelbraunrote Farbe, gab aber keinen gelben Schaum, enthielt kein Eiweiß, keinen Zucker, keinen Gallenfarbstoff, kein Urobilinogen und kein Urobilin. Dagegen war im Stuhle bei wiederholten Untersuchungen Urobilinogen normal nachweisbar.

Nach dem Ausfalle dieser Proben konnte es sich um keinen wirklichen Ikterus handeln und die weiteren Untersuchungen des Harnes ergaben, daß es sich um Gelbfärbung durch absichtlich immer wieder zugeführte Pikrinsäure handle. Der Ottische Versuch, mit dem Harn angestellt, fiel positiv aus, d. h. Seidenfäden wurden dunkelgelb gefärbt, Baumwollfäden blieben ungefärbt. Der Kranke gab später, als wir bei Untersuchung seiner Garderobe eine Büchse mit Pikrinsäure fanden, zu, die Gelbfärbung künstlich herbeigeführt zu haben. Er hatte seinerzeit die Webereifachschule besucht und dort die Bedeutung der Pikrinsäure für die Gelbfärbung des Körpers kennengelernt; als Drogist war es ihm später nicht schwer, sich dieses Mittel zu beschaffen.

In den Lehrbüchern wird die chronische Pikrinsäurevergiftung als wenig bedeutungsvoll hingestellt. Der vorliegende Fall zeigt, daß eine chronische Intoxikation mit diesem Körper doch zu schweren Ernährungsstörungen führen kann: die beim Kranken vorhandene Spitzfußstellung ist als Ausdruck der chronischen Vergiftung und Unterernährung und der monatelangen Bettruhe mit Herabsinken der Fußspitzen anzusehen. Mit Rücksicht auf diese Kachexie war der leitende Militärarzt genug einsichtsvoll, den Kranken als durch sein Vorgehen genügend gestraft anzusehen und als invalid zu entlassen.

Nicht minder interessant ist die zweite Beobachtung.

2. Am 27. I. 1921 konsultierte mich der 24jährige Hochschüler A. N. mit der Angabe, seit 5 Monaten an Gelbsucht zu leiden und trotz aller Medikationen sein Leiden nicht loswerden zu können. 4—5 mal habe er bereits schmerzhaft Anfälle in der Gallenblasengegend gehabt; er sei appetitlos und habe 4—5 kg an Gewicht abgenommen. Falls ich es für notwendig ansehen würde, wäre er auch zur Operation seines „Leberleidens“ entschlossen. Es handelte sich um einen kräftigen jungen

Mann mit normalem Befunde von Lunge, Herz und leichter Empfindlichkeit des ganzen Unterleibes und in der Gallenblasengegend. Die Haut und Bindehäute zeigten deutlich gelbe Verfärbung. Der Harn war dunkelgelbrot, enthielt kein Eiweiß, keinen Zucker, kein Urobilinogen; die Diazoreaktion war negativ. Die Diagnose wurde offengelassen und Herrn N. ein entsprechendes Verhalten, wie bei Erkrankungen der Gallenwege, vorgeschlagen.

25. II. kam der Kranke neuerdings zu mir, er habe sich einige Tage wohlgeföhlt, habe aber vor 4 Tagen neuerdings einen Anfall gehabt. Der nun entleerte Harn war wieder dunkelgelbrot, enthielt keinen Gallenfarbstoff, aber deutlich etwas Urobilinogen. Ich riet, das seinerzeit vorgeschriebene Verhalten fortzusetzen.

7. II. Wohlbefinden, Harn vollkommen licht;

9. II. Harn licht, enthält kein Urobilinogen.

11. II. Der Kranke föhlt sich wieder schlecht, Harn dunkelrot, hellt sich bei Zusatz von anorganischen Säuren deutlich auf, enthält keinen Gallenfarbstoff und kein Urobilinogen.

Schon bei der ersten Untersuchung durch das Fehlen von Gallenfarbstoff und Urobilinogen stutzig, erklärte ich nun dem Kranken, daß es sich um keine Gelbsucht, sondern um eine künstlich von ihm selbst hervorgerufene Gelbfärbung der Haut handle. Seine verlegene Antwort, welchen Grund er denn hierfür hätte, zeigte mir am besten die Richtigkeit meiner Diagnose. Zur Sicherung dieser bat ich den Herrn Prof. Wiechowski um genaue chemische Analyse des Harns; sie bestätigte meine Annahme vollinhaltlich. Der mir vom Herrn Ing. Melzer, Assistenten des Herrn Prof. Dr. Wiechowski, übergebene Befund lautete: Der schwach sauer reagierende Harn hat eine rotbraune Farbe und ist trüb. Ein Teil desselben wurde mit  $H_2SO_4$  (2 n) angesäuert und im Schacherl-Extraktionsapparat durch 48 Stunden ausgeäthert. Der deutlich gelbgefärbte Ätherextrakt wurde im Lichtbade vom Äther befreit; der Rückstand ist nur teilweise in Wasser löslich und wurde filtriert; das Filtrat ist deutlich sauer und rotbraun gefärbt. Dieses Filtrat färbt Wolle nach 24 Stunden stark gelb, Baumwolle nicht. Ein Teil des Filtrates im Wasserbade eingengt, gibt einen im  $NH_3$  löslichen Rückstand. Diese ammoniakalische Lösung und einige Tropfen KCN geben im Wasserbade einen roten Fleck, der sich rot auflöst (isopurpursaures Kalium).

Am 17. II. kommt der Kranke zu mir, er föhle sich andauernd wohl; sein Harn ist licht, enthält kein Urobilinogen.

Wir sehen also, daß in den vorliegenden Fällen zwei Menschen durch Monate hindurch Gelbfärbung der Haut zeigen und eine außerordentlich große Zahl hervorragender Ärzte den artefiziellen Charakter des Leidens nicht erkennen, den Kranken sogar zu operativen Eingriffen raten. Im zweiten Falle schützte auch die Untersuchung des Blutes nach Hijmans van den Bergh<sup>5)</sup> nicht vor der Fehldiagnose; im Gegenteil: Es wurde vermehrtes Vorhandensein von Bilirubin im Blute nachgewiesen. Ob die Ärzte die „Gelbsucht“ in diesem Falle dann als mechanischen oder dynamischen Ikterus auslegten, ist mir nicht bekannt. — In Wirklichkeit hat es sich überhaupt nicht um einen Ikterus gehandelt, sondern um eine künstliche Gelbfärbung durch Pikrinsäure. Die Fehldiagnosen in beiden Fällen hätten vermieden werden können, wenn die Ärzte die Bedeutung der so einfachen Urobilinogenreaktion kennen würden. Ich möchte an dieser Stelle darauf hinweisen, daß man mit ganz



wenig, etwa mit 8—10 ccm Harn die Proben auf Urobilin, Urobilinogen und Gallenfarbstoff anstellen kann. Ich gehe dabei (Münzer und Bloch, l. c. N. 4. c) so vor, daß ich die mir zur Verfügung stehenden 8—10 ccm Harn mit der gleichen Menge 10 proz. alkoholischer Zinkacetatlösung versetze. Das Filtrat, etwa 14—16 ccm, wird in zwei Teile geteilt, mit dem einen Teile sofort die Urobilinogenreaktion angestellt, der andere Teil zur Entwicklung des Urobilins (also zur Urobilinprobe [W. Schlesinger]) stehen gelassen, da das Urobilinogen nur allmählich in Urobilin übergeht. Der Filtrerrückstand enthält die Gallenfarbstoffe, die von dem Zinkphosphatniederschlag adsorbiert sind. Versetzt man diesen Rückstand mit ein paar Tropfen Boumaschem Reagens (20 Teile Obermeyer-Reagens plus 80 Teile Alkohol), dann geht der Gallenfarbstoff in Lösung und filtriert ab, während er gleichzeitig zu Biliverdin oxydiert wird, so daß das Filtrat bei Vorhandensein von Gallenfarbstoff grün erscheint.

Ich fasse zusammen: Es werden die Krankengeschichten zweier Menschen mitgeteilt, die an artefizieller Gelbfärbung litten, d. h. Gelbfärbung der Haut durch Genuß von Pikrinsäure, bzw. Pikrinsäurederivaten zeigten. Zur Feststellung dieser künstlichen Gelbfärbung wird darauf hingewiesen, daß bei Ikterus, d. h. Gelbsucht durch Lebererkrankung, stets Gallenfarbstoff oder Urobilinogen (Urobilin) oder beide zugleich im Harn vorhanden sind. Die Bedeutung der Aldehydreaktion in diesem Sinne wird eingehend betont.

#### Literatur.

<sup>1)</sup> Minkowski und Naunyn, Beiträge zur Pathologie der Leber. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., **21**, 1. 1886. — <sup>2)</sup> Ehrlich, P., Über die Dimethylamidobenzaldehydreaktion. Dtsch. med. Wochenschr. 1901, Nr. 15. — <sup>3)</sup> Neubauer, O., Über die neue Ehrlichsche Reaktion mit Dimethylaminobenzaldehyd. Sitzungsber. d. Ges. f. Morphol. u. Physiol., München 1903. — <sup>4)</sup> Hildebrandt, W., a) Studien über Urobilinurie und Ikterus. Zeitschr. f. klin. Med. **59**, 351. 1906; b) Über Urobilin im Blute. Münch. med. Wochenschr. 1910, Nr. 49; Fischler, F., a) Über die Wichtigkeit der Urobilinurie für die Diagnose von Leberaffektionen. Münch. med. Wochenschr. 1908, S. 1421; b) Physiologie und Pathologie der Leber. Berlin, J. Springer 1916; Münzer, E., a) Zur Diagnose des totalen Gallengangverschlusses mit besonderer Berücksichtigung der Untersuchungsmethoden. Fortschr. d. Med. 1909, Nr. 5; b) Über die Ehrlichsche Reaktion mit Dimethylaminobenzaldehyd. Fortschr. d. Med. 1910, Nr. 2; c) (mit Dr. Ferd. Bloch) Über den Nachweis des Urobilinogens und des Urobilins. Arch. f. Verdauungskrank. **17**, 1911; d) Kurze Bemerkungen zur differentiellen Diagnostik der Affektionen der Leber. Med. Klinik 1913, Nr. 15. — <sup>5)</sup> van den Bergh, Hijmans, Der Gallenfarbstoff im Blute. J. A. Barth, Leipzig, 1918.

# Versuche über den Gaswechsel und das Minutenvolumen des Herzens bei Massage und passiven Bewegungen.

Vorläufige Mitteilung.

Von

G. Liljestränd und N. Stenström.

(Aus dem Physiologischen Laboratorium des Karolinischen medico-chirurgischen Instituts zu Stockholm.)

(Eingegangen am 1. November 1921.)

Die Frage nach der Wirkung von Massage und passiven Bewegungen auf Gaswechsel und Minutenvolumen des Herzens beim Menschen, welche den Gegenstand der vorliegenden Arbeit bilden, sind früher nur sehr wenig untersucht worden. Bezüglich des Gaswechsels dürfte die Arbeit von Leber und Stüve<sup>1)</sup> die einzige sein. Diese Autoren fanden während Muskelmassage eine Vermehrung der O<sub>2</sub>-Aufnahme von 13,6 und der CO<sub>2</sub>-Abgabe von 12,9%; während der Bauchmassage waren die entsprechenden Werte 12,1 und 15,2%.

Über das Minutenvolumen des Herzens unter entsprechenden Verhältnissen scheinen überhaupt keine direkten Versuche zu existieren. Dagegen gibt es mehrere Beobachtungen über die Blutströmung in gewissen Gefäßgebieten bei Tieren während Massage sowie beim Menschen während passiver Bewegungen. Es dürfte aber vorläufig nicht nötig sein, hier auf die betreffenden Arbeiten einzugehen.

Durch Selbstversuche an uns beiden haben wir nun die erwähnten Fragen näher studiert. Die Versuche wurden so angeordnet, daß immer zuerst der respiratorische Gaswechsel sowie die Atmungsfrequenz während Standardbedingungen in kurz dauernden Versuchen (5 Minuten) festgestellt wurden. Da der persönliche schädliche Raum bei uns beiden in zahlreichen Versuchen nach der Methode von Krogh und Lindhard<sup>2)</sup> bestimmt worden und der extra schädliche Raum von Ventil und Mundstück bekannt war, konnte die alveolare Kohlensäurespannung aus den Respirationsversuchen berechnet werden. Unmittelbar nach

<sup>1)</sup> Berl. klin. Wochenschr. 1896, S. 337.

<sup>2)</sup> Journ. of physiol. 47, 1913, S. 30 und 51, 1917, S. 159.

dem letzten Respirationsversuch wurden einige Bestimmungen der venösen Kohlensäurespannung nach Fride-  
 ricia<sup>1)</sup> ausgeführt. Bei unvollständigem Ausgleich zwischen der Kohlen-  
 säure des venösen Blutes und der Lungenluft in diesen Fällen wurde eine  
 Korrektur nach besonderen Versuchen vorgenommen. Da die Kohlensäure-  
 absorptionskurve des Blutes für uns beide nach der Methode von Krogh  
 und Liljestrand<sup>2)</sup> ermittelt worden war, konnte der Kohlensäuregehalt  
 des Blutes bei der arteriellen bzw. venösen Kohlensäurespannung erhal-  
 ten werden. Das Minutenvolumen des Herzens konnte dann durch ein-  
 fache Division der Kohlensäureabgabe durch die Differenz zwischen venösem  
 und arteriellem Kohlensäuregehalt ermittelt werden.

Nach den Ruheversuchen wurden in genau derselben Weise Versuche mit  
 Muskelmassage (der unteren Extremitäten, vor allem der Schenkel) bzw.  
 Bauchmassage und passiven Bewegungen (der unteren Extremitäten,  
 vor allem in Hüft- und Kniegelenken) angestellt. Der betreffende Eingriff  
 wurde immer möglichst gleichmäßig ausgeübt, begann schon einige Minuten  
 vor dem Respirationsversuch und wurde bis Ende der letzten Bestim-  
 mung der venösen Kohlensäurespannung ununterbrochen fortgesetzt.

In der Tabelle I teilen wir das Mittel der Ergebnisse der Respirations-  
 versuche mit.

Aus der Tabelle geht hervor, daß während Muskelmassage sowohl  
 Frequenz wie Tiefe der Atemzüge

Tabelle I.  
 Respirationsversuche.

Art der Versuche	Zahl der Versuche	Ventilation pro Min. l. (0°, 760 mm. Trockenheit)	Atmungs- frequenz pro Min.	Atemtiefe cem (37°, vor- handener Druck, feucht)	O <sub>2</sub> -Aufnahme cem pro Min. (red.)	CO <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Alveolare CO <sub>2</sub> - Spannung mm Hg	Bemerkungen
Ruhe . . . . .	34	5,58 ± 0,06	10,3 ± 0,3	703 ± 13	261 ± 2,3	0,86 ± 0,01	39,7 ± 0,3	Versuchs- person N.S., (Gewicht netto 102 kg
Muskelmassage . . . . .	12	9,25 ± 0,58	12,6 ± 0,5	905 ± 29	322 ± 7,9	1,02 ± 0,03	33,0 ± 1,2	
Bauchmassage . . . . .	8	6,45 ± 0,23	8,9 ± 0,4	910 ± 55	285 ± 10,7	0,95 ± 0,05	36,8 ± 0,7	
Passive Bewegungen . . . . .	10	8,43 ± 0,37	12,7 ± 0,8	828 ± 28	379 ± 10,4	0,88 ± 0,01	37,5 ± 0,5	
Ruhe . . . . .	16	5,07 ± 0,12	8,6 ± 0,4	740 ± 96	215 ± 2,7	0,91 ± 0,01	38,8 ± 0,3	Versuchs- person G.L., Gewicht netto 61 kg
Muskelmassage . . . . .	6	9,37 ± 0,55	12,1 ± 0,8	943 ±	301 ± 3,9	1,04 ± 0,05	31,2 ± 0,4	
Bauchmassage . . . . .	3	16,30	11,0	1754	290	1,30	22,0	
Passive Bewegungen . . . . .	4	10,34	14,4	882	283	1,19	32,6	

1) Diese Zeitschr. 85, 307. 1918.

2) Diese Zeitschr. 104, 300. 1920.

wachsen. Der respiratorische Quotient steigt ja für beide Versuchspersonen über 1, und die alveolare Kohlensäurespannung sinkt entsprechend der Auswaschung. Die Sauerstoffaufnahme ist im Mittel um 23 bzw. 40% gestiegen. Interessant war die Feststellung, daß bei N.S., wo ja die Versuchsreihe ziemlich groß ist, mit zunehmender Übung eine Verminderung der Steigerung auftrat, die in den letzten Versuchen dieser Art nur 12% betrug. Höchstwahrscheinlich handelt es sich hier wie in den folgenden Versuchen um unbeabsichtigte, aktive Bewegungen der Versuchsperson, die zum Teil mit zunehmendem Training eliminiert werden konnten.

Auch während Bauchmassage ist die Ventilation vergrößert, bei G.L. sehr erheblich. In beiden Fällen kommt vertiefte Atmung vor, während die Zahl der Atemzüge nur bei G.L. vermehrt wird. Bei ihm war die Bauchmassage subjektiv sehr unangenehm, was die hohe Ventilation mit der sehr erheblichen Kohlensäureauswaschung erklären dürfte. Hierin dürfte auch die Ursache liegen, daß bei G.L. die Sauerstoffaufnahme ziemlich stark erhöht wurde (um 35%), während sie bei N.S. beinahe unverändert ist.

Bei den passiven Bewegungen sind in beiden Reihen sowohl Frequenz wie Tiefe der Atemzüge vergrößert, bei G.L. ist auch der Quotient erheblich gestiegen. Die Sauerstoffaufnahme ist bei dem schweren N.S. um 45% (118 ccm O<sub>2</sub>), bei dem leichteren G.L. nur um 32% (68 ccm O<sub>2</sub>) vermehrt.

Über das Verhalten des Minutenvolumens des Herzens gibt die Tabelle II Auskunft.

Tabelle II.  
Minutenvolumen des Herzens.

Art der Versuche	Zahl der Versuche	Minutenvolumen L.	O <sub>2</sub> -Verbrauch pro L. Blut ccm	Bemerkungen
Ruhe . . . . .	13	5,3 ± 0,3	51 + 2,5	} Versuchsperson N. S.
Muskelmassage . . .	6	4,5 + 0,4	76 + 6,6	
Bauchmassage . . .	4	4,8 + 0,3	62 ± 6,1	
Passive Bewegungen	4	5,0 + 0,4	76 + 4,3	
Ruhe . . . . .	8	4,6 + 0,2	47 + 2	} Versuchsperson G. L.
Muskelmassage . . .	3	4,2	75	
Bauchmassage . . .	2	4,4	68	
Passive Bewegungen	2	4,3	63	

Diese Versuche an beiden Versuchspersonen stimmen offenbar sehr gut überein. Das Minutenvolumen des Herzens ist in beiden Fällen innerhalb der Versuchsfehler von der Massage bzw. den passiven Bewegungen unabhängig. Da nun aber die Sauerstoffaufnahme während der untersuchten Eingriffe im Durchschnitt gestiegen ist, muß natür-

lich die Ausnützung des Blutes ( $O_2$ -Verbrauch pro Liter Blut) in entsprechendem Grade steigen.

Es sei darauf hingewiesen, daß eine gewisse Vermehrung der Blutströmung in den direkt beeinflussten Muskeln trotz des Gleichbleibens des Minutenvolumens nicht ausgeschlossen ist, indem eine kompensatorische Verminderung in anderen Gefäßgebieten möglich sein könnte. Aus den Versuchen geht aber offenbar hervor, daß eine eventuelle Wirkung der Massage und der passiven Bewegungen auf die Blutströmung in den Muskeln beim Gesunden nur verhältnismäßig klein sein kann.

# Über Fructosurie.

Von

**Hermann K. Barrenscheen.**

(Aus der Privatklinik von Prof. C. von Noorden in Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 2. November 1921.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Zu den seltenen Anomalien des Kohlenhydratstoffwechsels gehören die Fälle von reiner Fructosurie. Ist auch das praktische Interesse, das sie wegen etwaiger Verwechslung mit echtem Diabetes geben könnten, ihrer Seltenheit wegen kein allzu großes, so bieten sie um so mehr Interesse vom theoretischen Gesichtspunkte aus und weisen uns aufs eindringlichste auf die von Hofmeister<sup>1)</sup> betonte Wichtigkeit des Zusammenarbeitens der Theorie mit der Klinik und Pathologie hin.

Sehen wir von den Fällen der älteren Literatur<sup>2)</sup> ab, bei denen die Natur der linksdrehenden Substanz mit gewichtigen Gründen angezweifelt wird, so halten einer strengen Kritik nur die Fälle von Seegen<sup>3)</sup> und Külz<sup>4)</sup>, Rosin und Laband<sup>5)</sup>, W. Schlesinger<sup>6)</sup>, Lépine und Boulud<sup>7)</sup>, O. Neubauer<sup>8)</sup>, Moraczewski<sup>9)</sup>, O. Adler<sup>10)</sup>, Strouse und Friedmann<sup>11)</sup> stand. Als grundlegend für unsere heutige Auf-

<sup>1)</sup> Hofmeister, Der Kohlenhydratstoffwechsel der Leber. Nothnagel-Vortrag, Wien, 1913.

<sup>2)</sup> Bezüglich der älteren Literatur sei hier auf Neubergs Zusammenfassung im von Noordenschen Handbuch der Pathologie des Stoffwechsels verwiesen, ferner auf die ausführliche historische Darstellung in den Arbeiten von H. Koenigsfeld, Zeitschr. f. klin. Med. **69**, 290, und O. Adler, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **139**, 93.

<sup>3)</sup> Seegen, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1884, S. 753. Harnbefunde von Mauthner.

<sup>4)</sup> Külz, Zeitschr. f. Biol. **27**, 228.

<sup>5)</sup> Rosin und Laband, Zeitschr. f. klin. Med. **47**, 182; ferner Salkowski-Festschrift (Rosin).

<sup>6)</sup> W. Schlesinger, Arch. f. exp. Pathol. und Pharmokol. **50**, 1.

<sup>7)</sup> Lépine und Boulud, Rev. de méd. **24**, 185.

<sup>8)</sup> O. Neubauer, Münch. med. Wochenschr. 1905, S. 1525—27.

<sup>9)</sup> Moraczewski, Zeitschr. f. klin. Med. **64**, 503—8.

<sup>10)</sup> O. Adler, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **139**, 93.

<sup>11)</sup> Strouse und Friedmann, ref. Zentralbl. f. inn. Med. **1**, 180.

fassung muß die Arbeit Neubauers gelten, der an der Hand zweier sehr charakteristischer Fälle eine Trennung der reinen Fructosurie von den gemischten Mellituriën vornimmt. Auf die Frage der Fructoseausscheidung bei echtem Diabetes soll hier nicht eingegangen werden. Die eine Zeitlang recht lebhaft diskutierte Frage, die sich hauptsächlich um die Verwertbarkeit der Seliwanoffschen Reaktion und mehr weniger glückliche Modifikationen derselben drehte, hat meines Erachtens keine Entscheidung zu bringen vermocht und wäre einer Nachprüfung mit einwandfreien chemischen Methoden wert, schon wegen der Frage der Bildung von Fructose im Organismus.

Im folgenden soll über einen Fall von reiner Fructosurie berichtet werden, den ich als Assistent an der Privatklinik meines früheren Chefs, Professor von Noorden in Frankfurt, zu beobachten Gelegenheit hatte.

Es handelte sich um eine 22 Jahre alte jüdische Studentin, S. Suß. aus Kiew, welche Ende Juni 1914 die Klinik aufsuchte. Die Anamnese der intelligenten Patientin ergab folgendes:

**Familienanamnese:** Von väterlicher Seite war ein Bruder des Großvaters an Diabetes gestorben. Der Vater und des Vaters Bruder sind beide zuckerkrank. Es scheint sich um leichte Fälle zu handeln, die Erkrankung des Vaters besteht bereits seit 22 Jahren. Von mütterlicher Seite besteht starke Neigung zu Fettsucht, die Mutter selbst leidet an Fettsucht und Gicht. Die sechs lebenden Geschwister der Pat. zeigen sämtlich Neigung zu Fettsucht, bei einem Bruder wurde in Kiew alimentäre Fructosurie festgestellt.

**Pat. selbst** machte mit 2 Jahren Scharlach durch, später Masern. Sie litt, auch im späteren Alter, wiederholt an Anginen. Menses mit 11 Jahren, regelmäßig, beschwerdefrei, keine abnorm starke oder schwache Blutung.

Vor 4 $\frac{1}{2}$  Jahren traten bei der Pat. zum erstenmal stärkere Kopfschmerzen auf, außerdem neuritische Schmerzen in den Armen und Beinen, starkes Herzklopfen, auch ohne entsprechende körperliche Anstrengung. Die Harnuntersuchung in Kiew ergab damals Eiweiß und Zucker, der später als Fructose erkannt wurde. Angeblich bestand eine kontinuierliche Ausscheidung des Zuckers, auch bei ganzlichem Entzug der Kohlenhydrate aus der Nahrung wurden durchschnittlich 0,6% Fructose ausgeschieden. Zufuhr fruchtzuckerhaltiger Nahrungsmittel (Früchte) steigerte die Zuckerausscheidung erheblich. Auf gewöhnliche Stärke und auf Traubenzucker blieb eine Vermehrung des Zuckers aus.

Die somatische Untersuchung ergab: Kleine Patientin von beträchtlicher Adipositas. Körperlänge 161 cm, Körpergewicht 76 kg. Graziler Knochenbau, rachitisch plattes Becken. Auffallende Schweißsekretion. Ausgesprochen virile Behaarung. Der Befund an den inneren Organen — Herz, Lunge, Abdomen — normal. Die Röntgendurchleuchtung (Dr. Strassner) ergab normalen Herzbefund. Periphere Gefäße auffallend eng, Blutdruck (Riva-Rocci) 136 mm Hg. Ausgesprochene respiratorische Irregularität. Sehnen- und Muskelreflexe sehr lebhaft. Corneal- und Rachenreflexe herabgesetzt. Hysterische Druckpunkte vorhanden.

Die Resultate der Stoffwechseluntersuchung und die bemerkenswerteren klinischen Befunde sind in den Tabellen I und II kurz zusammengestellt. Zur Technik der Untersuchungen sei bemerkt, daß die Fructose nach der Linksdrehung, die nach Vergären verschwunden war.

(Fortsetzung auf S. 225.)

Tabelle I.

Datum	Zulagen zur strengen Diät	Harnmenge und spez. Gewicht	Fructose-ausscheidg.		Gesamt-N g	NH <sub>3</sub> -N		Eiweiß ‰	Aceton mg	Blut-zucker (nüch-tern)	Bemerkung
			%	absolut g		%	absolut g				
23. VI.	5 x 50 g Weißbrot	1000 ccm 1020	0	0	9,88	9,45	0,88	0,3	62	—	Im Harn Indik. + +. Sediment: reichlich hyaline und granuläre Zylinder, Leukocyten, Epithellen, Urate.
24. VI.	0	1045 ccm 1016	0	0	8,485 entwässert 8,821	9,21	0,782	0,6	85	0,115	Harn in einzelnen Portionen untersucht; in sämtlicher Reduktion u. Selivanoff 0. 0,5 g Kl. z. Nierenfunktionsprüfung innerlich.
25. VI.	5 x 50 g Weißbrot. Fröh, mittags, abends je 20 g Fructose	1080 ccm 1022	0,82	8,491	17,794	9,74	1,782	0,4	56	—	s. Tab. II.
26. VI.	Nüchtern 150 g Traubenzucker 5 x 50 g Weißbrot	1066 ccm 1018	0	0	9,965	9,87	0,984	0,6	48	—	In den nach Aufnahme d. Traubenzuckers stündlich entleerten Harnportionen keine Spur einer Reduktion. Jodausscheidung 60 Std.
27. VI.	Nüchtern 50 g Fructose, 5 mal 50 g Weißbrot	994 ccm 1021	—	4,588	—	—	—	0,3	—	0,118	s. Tab. II u. Kurve I.
28. VI.	5 x 50 g Weißbrot. 8h, 10h, 12h 30' je 200 g schwarze Kirschen	994 ccm 1018	—	6,021	—	—	—	0,6	—	—	s. Tab. II.
29. VI.	Fröh, mittags, abends je 40 g Rohrzucker. 5 x 50 g Weißbrot	866 ccm 1028	—	15,41	—	—	—	0,6	—	—	s. Tab. II.
30. VI.	Nüchtern 20 g Galaktose. 250 g Weißbrot	1085 ccm 1018	0	0	—	—	—	—	—	—	Phenolsulphophtalien intramuskulär. Ausscheidung nach 3h 64%. Von der zugeführten Galaktose wird keine Spur ausgeschied.
1. VII.	250 g Weißbrot, davon 100 g zum ersten Frühstück	650 ccm 1015	0	0	—	—	—	—	—	0,107	Harnmenge unvollständig. S. Tab. II und Kurve I.
2. VII.	Nüchtern 5 g Fructose	292 ccm	—	0,558	—	—	—	—	—	—	Pat. verläßt nachmittags die Klinik. S. Tab. II.



Tabelle II.

Datum	Versuch	Stunde bzw. Portion	Harn- menge ccm	Fructose- ausscheidung		Blut- zucker %	Bemerkungen
				%	g		
25. VI.	früh } mittag } je 20 g abends } Fructose	7 <sup>h</sup> (nüchtern)	250	0	0	—	Von der zugeführten Fructose ausgeschieden 8,491g = 14,15%
		7 <sup>h</sup> —12 <sup>h</sup>	40	1,74	0,696	—	
		12 <sup>h</sup> —4 <sup>h</sup>	50	1,22	0,610	—	
		4 <sup>h</sup> —7 <sup>h</sup>	95	1,40	1,332	—	
		7 <sup>h</sup> —9 <sup>h</sup>	95	1,04	0,988	—	
		Nachtportion	500	0,973	4,865	—	
27. VI.	Nüchtern 8 <sup>h</sup> a. m. 50 g Fructose	7 <sup>h</sup> 45' (nüchtern)	40	0	0	0,118	Von der zugeführten Fructose ausgeschieden 4,538 g = 9,07%
		8 <sup>h</sup> 15'	70	1,47	1,03	0,179	
		8 <sup>h</sup> 45'	40	4,82	1,93	0,208	
		9 <sup>h</sup> 15'	35	2,41	0,843	0,176	
		9 <sup>h</sup> 45'	225	0,288	0,735	0,154	
		10 <sup>h</sup> 15'	300	0	0	0,138	
		10 <sup>h</sup> 45'	123	0	0	0,126	
		11 <sup>h</sup> 15'	47	0	0	0,120	
		2 <sup>h</sup> 30' p. m.	114	0	0	0,116	
28. VI.	8 <sup>h</sup> } 10 <sup>h</sup> } je 200 g 12 <sup>h</sup> 30' } schwarze Kirschen	Nüchternharn	120	0	0	—	Gesamtausscheidung 6,021 g
		I. Portion	33	0	0	—	
		II. Portion	70	2,2	1,54	—	
		III. Portion	66	2,1	1,386	—	
		IV. Portion	153	1,7	2,601	—	
		V. Portion	130	0,38	0,494	—	
29. VI.	früh } mittags } je 40 g abends } Rohrzucker	I. Portion	140	2,4	3,36	—	Von der zugeführten Fructose ausgeschieden 15,41 = 24,85%
		II. Portion	74	1,6	1,204	—	
		III. Portion	170	2,8	4,76	—	
		IV. Portion	32	1,3	0,416	—	
		Nachtportion	450	1,26	5,67	—	
		1. VII.	I. Frühstück 100 g Weißbrot	8 <sup>h</sup> (nüchtern)		0	
8 <sup>h</sup> 30'	} 7 Por- tionen im ganzen } 650			0	0	0,106	
9 <sup>h</sup>				0	0	0,114	
9 <sup>h</sup> 30'				0	0	0,116	
10 <sup>h</sup>				0	0	0,118	
11 <sup>h</sup>				0	0	0,115	
12 <sup>h</sup>				0	0	0,110	
2. VII.		Nüchtern 8 <sup>h</sup> 30' 5 g Fructose	8 <sup>h</sup> 15' (nüchtern)	40	0	0	—
	9 <sup>h</sup>		30	1,31	0,393	—	
	9 <sup>h</sup> 30'		20	0,815	0,163	—	
	10 <sup>h</sup>		11	0	0	—	
	10 <sup>h</sup> 30'		90	0	0	—	

nach der einwandfreien Übereinstimmung der polarimetrischen mit der titrimetrischen Bestimmung (Titration nach Benedict<sup>1)</sup>], durch Darstellung des Methyl-phenylosazons nach Neuberg<sup>2)</sup>, durch die unter Einhaltung der entsprechenden Vorsichtsmaßregeln ausgeführte Seliwanoffsche Probe<sup>3)</sup> als solche sichergestellt wurde. Die Blutzucker-

<sup>1)</sup> Stanley R. Benedict, Journ. of biol. chem. **9**, 57.

<sup>2)</sup> Neuberg, Zeitschr. f. physiolog. Chem. **36**, 233, 1902.

<sup>3)</sup> R. und O. Adler, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **106**, 323.

bestimmung wurde nach der Bangschen Mikromethode ausgeführt. Ammoniak nach Folin. Sämtliche Werte sind Mittelwerte aus einwandfrei stimmenden Doppelbestimmungen.

In seinem ganzen Verhalten zeigt der vorliegende Fall weitgehende Ähnlichkeit mit dem Falle von O. Neubauer<sup>1)</sup>. Zunächst besteht eine vollkommene Abhängigkeit der Fructoseausscheidung von alimentären Einflüssen. Belastung mit 150 g Traubenzucker nüchtern wird anstandslos vertragen, ebenso 20 g Galaktose nüchtern oder 250 g Weißbrot täglich. Dagegen erfolgt bereits nach der geringen Menge von 5 g Fructose eine nicht unbeträchtliche Ausscheidung dieses Zuckers (s. Tab. I und II). Betrachtet man die Tage, an welchen die Fructose als einmalige Gabe nüchtern verabreicht wurde, so beträgt die Menge des ausgeschiedenen Zuckers bei so verschiedenen Mengen wie 5 und 50 g rund 10%, bei Zufuhr von 5 g 11,1%, bei Zufuhr von 50 g 9,07%. Diese auffallende Gleichheit der prozentuellen Zuckerausscheidung bei so verschiedenen Mengen eingeführten Zuckers findet sich auch im Falle Neubaue's. Anders liegen die Verhältnisse an den Versuchstagen, an welchen Fructose, sei es in reiner Form, sei es in Rohrzucker oder in Früchten, in mehreren Portionen über den Tag verteilt gegeben wurde. Hier erreicht die Ausscheidung absolut und prozentuell viel höhere Werte. bei  $3 \times 20$  g Fructose werden 8,491 g = 14,15% ausgeschieden, bei  $3 \times 40$  g Rohrzucker, entsprechend 62 g Fructose, 15,41 g = 24,85%. Besonderes Interesse beansprucht das Verhalten des Blutzuckers. Blutzuckerwerte bei Fructosurie finden sich in der Literatur nur in der Arbeit von Rosin und Laband<sup>2)</sup>, die in ihrem Fall die Fructose im Blut auch chemisch nachwiesen und den ungeheuerlichen Wert von mindestens 1,5% Fructose für das Serum berechnen. Der Nüchternwert des Blutzuckers lag in unserm Fall zwischen 0,107% und 0,118%. Werte, die nach meiner Erfahrung den Durchschnitt der Normalzahlen etwas überschreiten, doch dürfte diese geringfügige Erhöhung in der gleichzeitig betehenden chronischen Nephritis der Patientin ihre zwanglose Erklärung finden. Auf 50 g Fructose nüchtern steigt nun der Blutzuckerspiegel im Verlauf von 45 Minuten von 0,118% auf den hohen Wert von 0,208%, fällt dann anfangs steil ab und erreicht nach  $6\frac{1}{2}$  Stunden den Anfangswert. Parallel mit der Blutzuckerkurve verläuft die Ausscheidung der Fructose im Harn, hört jedoch nach 2 Stunden bei einem Blutzuckerwert, der zwischen 0,154% und 0,138% liegt, auf, so daß wir innerhalb dieser Werte den „Schwellenwert“ für die Fructoseausscheidung durch die Niere annehmen müssen (s. Kurve).

Dieses Verhalten des Blutzuckers — man vergleiche dagegen die Blutzuckerkurve nach 100 g Weißbrot — erinnert lebhaft an die namentlich

<sup>1)</sup> Neubauer, l. c.

<sup>2)</sup> Rosin und Laband, l. c.

von amerikanischer Seite in den letzten Jahren publizierten Kurven bei echtem Diabetes nach Glucosedarreicherung. Es gibt uns aber auch eine Erklärung für die vermehrte Ausscheidung an den Versuchstagen vom 25. und 29. VI., an welchen der Zucker in drei über den Tag verteilten Portionen gegeben wurde<sup>1)</sup>. Hier mußte jede neue Zufuhr des Zuckers auf einen eventuell schon unterschwelligen, aber noch erhöhten Blutzuckerspiegel stoßen und so eine Summation ergeben, die sich in einer gesteigerten Ausscheidung widerspiegelte. Für die besonders hohe Fruchtzuckerausscheidung nach Rohrzucker dürfte jedoch diese Er-

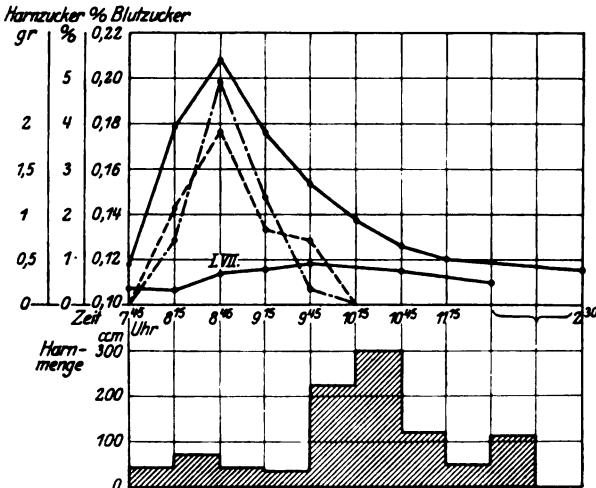


Abb. 1.

klärung allein nicht hinreichen, vielmehr dürfte hier noch ein anderes Moment heranzuziehen sein, das ich als eine Blockierung der Leberzellen durch den gleichzeitig angebotenen Traubenzucker bezeichnen möchte<sup>2)</sup>. Bemerkenswert sind auch die relativ hohen Werte des  $\text{NH}_3\text{N}$  im Vergleich zur Gesamt-N-Ausscheidung, die durchschnittlich rund 10% des Gesamtstickstoffs betragen und durch die geringen Acetonmengen — 43–85 mg, letzterer Wert bei gänzlich kohlenhydratfreier Diät — keine zureichende Erklärung finden. Ob hier eine Störung der Harnstoffbildung in der Leber vorliegt, wie sie sonst bei Leberaffektionen beschrieben wurde, wage ich nicht zu behaupten. Versuche über die

<sup>1)</sup> Der Versuch vom 28. VI. —  $3 \times 200$  g Kirschen — findet hier keine Berücksichtigung, da eine Berechnung der zugeführten Fructosemenge ohne Analyse der Früchte unstatthaft wäre.

<sup>2)</sup> Auch der Fall von Schlesinger (l. c.) zeigt dieses auffällige Verhalten: nach 90 g Fructose Ausscheidung von 11,3 g = 12,56%, nach 100 g Rohrzucker 10,9 g = 21,1% der eingeführten Fructosemenge.

Verteilung des Stickstoffs im Harn, speziell nach Aminosäurefütterung, waren wohl beabsichtigt, konnten jedoch wegen der Abreise der Patientin nicht durchgeführt werden<sup>1)</sup>).

Mit diesen Feststellungen kommen wir auf die Frage nach der Rolle der Leber in der Pathogenese der Fructosurie. Bevor ich jedoch darauf näher eingehe, möchte ich kurz auf die Bedeutung hinweisen, welche der Heredität und konstitutionellen Faktoren zukommen, die in dem vorliegenden Fall besonders schön hervortreten<sup>2)</sup>. Hereditäre Belastung mit Diabetes ist bei Fructosurie auffallend häufig. Unter den sieben Fällen, die O. Adler<sup>3)</sup> zusammenstellt, finden sich drei, in deren Familienanamnese echter Diabetes vorkommt. In zwei Fällen — Neubauer<sup>4)</sup>, Moraczewski<sup>5)</sup> — ist eine neuropathische Konstitution erwähnt, der Fall von Strouse und Friedmann<sup>6)</sup> zeigt nervöse Störungen und Zeichen einer Anomalie der innersekretorischen Drüsen. In unserem Falle findet sich von väterlicher Seite — Bruder des Großvaters, Vater und des Vaters Bruder — Diabetes, von mütterlicher Seite Fettsucht und Gicht. Die Fructosurie ist auch bei einem Bruder der Patientin festgestellt, bisher wäre das der erste Fall von familiärem Vorkommen dieser seltenen Stoffwechselstörung. Die Patientin selbst zeigt ausgesprochene Adipositas und Zeichen einer neuropathischen Konstitution. Nach allem dürfte das konstitutionelle Element bei der Fructosurie eine hervorragende Rolle spielen. Ob wir es mit einer kongenitalen Störung in der Wechselwirkung der Drüsen mit innerer Sekretion zu tun haben, oder ob es sich um eine angeborene funktionelle Minderwertigkeit der Leber allein handelt, darüber läßt sich ein abschließendes Urteil bei der geringen Zahl der bekannt gewordenen Fälle nicht abgeben.

Daß der Leber bei der Verwertung der Fructose im Organismus eine ausschlaggebende Bedeutung zukommt, ist eine Tatsache, die durch zahlreiche experimentelle und klinische Beobachtungen gestützt wird.

So konnte H. Sachs<sup>7)</sup> in Versuchen an Fröschen zeigen, daß nach Exstirpation der Leber aus Fructose im Gegensatz zur Glucose kein Glykogen mehr gebildet wird, und schloß daraus, daß Fructose nur in der Leber zu Glykogen synthetisiert

<sup>1)</sup> Etwas rätselhaft bei den N-Befunden ist das Emporschnellen des Gesamt-N am 25. VI. (Zulage von  $3 \times 20$  g Fructose bei sonst gleicher Diät) um rund 100% gegen die übrigen Tage, für das eine Erklärung schwer zu finden ist.

<sup>2)</sup> Über die Bedeutung der Heredität und Konstitution bei Diabetes vgl. von Noorden, Zuckerkrankheit. VII. Aufl. 1917. S. 75ff.

<sup>3)</sup> O. Adler, l. c.

<sup>4)</sup> Neubauer, l. c.

<sup>5)</sup> Moraczewski, l. c.

<sup>6)</sup> Strouse und Friedmann, l. c.

<sup>7)</sup> H. Sachs, Inaugural-Diss., Leipzig, 1900; ferner Zeitschr. f. klin. Med. 38. 87—126.

werden kann. Sehrt<sup>1)</sup> fand in Versuchen mit den verschiedenen Organen, daß, entgegen dem Verhalten des Traubenzuckers, Fruchtzucker außer von Speicheldrüse nur von Lebergewebe in geringem Ausmaß hydrolytisch gespalten wird. Versuche von Conrad Jacobson<sup>2)</sup> zeigen, daß bei Ableitung des Portalblutes in die Vena cava die Toleranz für Fructose erheblich abnimmt, während die Verwertung der Glucose nur wenig beeinträchtigt ist. Zu analogen Ergebnissen kamen Franke und Rabe<sup>3)</sup> in ihren Versuchen beim Hunde mit Eckscher Fistel. Auf die systematischen Untersuchungen über alimentäre Fructosurie bei Leberkranken durch Strauss<sup>4)</sup> und seine Mitarbeiter, die vielfach bestätigt wurden, sei hier nur kurz hingewiesen, ebenso auf die bei Graviden beobachteten Störungen in der Verwertung des Fruchtzuckers, die mit anderen Funktionsstörungen der Leber im Aminosäure-, Harnstoff- und Acetonstoffwechsel parallel gehen<sup>5)</sup>.

Es war naheliegend, diese Befunde auch für die Pathogenese der Fructosurie heranzuziehen, und wir finden diese Frage fast in sämtlichen Arbeiten über diesen Gegenstand diskutiert. Einen gesicherten Fortschritt für unsere Auffassung der Fructosurie und des Fructosestoffwechsels überhaupt bedeutet jedoch die Arbeit von S. Isaac<sup>6)</sup>, der zeigte, daß bei Durchblutung der isolierten Hundeleber zugesetzte Fructose in kürzester Zeit fast vollständig in Glucose umgewandelt wird. Die gegenseitige Umwandlung von Glucose, Fructose und Mannose in verdünnter alkalischer Lösung geht nach den bekannten Untersuchungen von Lobry de Bruyn und Alberda von Ekenstein<sup>7)</sup> namentlich bei höheren Temperaturen sehr rasch vonstatten und wurde von Wohl und Neuberg<sup>8)</sup> mit der intermediären Bildung der allen drei Zuckern gemeinsamen Enolform erklärt. Die Feststellung von Harden und Young<sup>9)</sup>, daß bei der alkoholischen Gärung der genannten Zucker das gleiche Hexosephosphat entsteht, welches bei der Hydrolyse Fructose liefert, legte den Gedanken nahe, daß es sich auch hier um eine Reaktion der Zucker in der gemeinsamen Enolform handelt. Isaac nimmt analog eine Umwandlung der Fructose über die — reaktionsfähigere — Enolform in Glucose durch die Leber an, durch welche erst eine Synthese zu Glykogen bzw. eine Verwertung des Ketonzuckers ermöglicht wird<sup>10)</sup>. Diese Umwandlung der Fructose in Glucose ist nach den in jüngster Zeit veröffentlichten Versuchen von Isaac und Adler<sup>11)</sup> an die intakte Leberzelle gebunden und kann nicht von Muskel oder Blut durchgeführt werden.

Nach den vorliegenden experimentellen Ergebnissen dürfte demnach das Wesen der Fructosurie in einer Unfähigkeit der Leber zu suchen

1) E. Sehrt, Zeitschr. f. klin. Med. **56**, 509—19.

2) Conrad Jacobson, Amer. Journ. of Physiol. **52**, 233—47.

3) Franke und Rabe, cit. nach Fischler, Physiologie und Pathologie der Leber. Berlin, Springer. 1916.

4) H. Strauss, Dtsch. med. Wochenschr. 1901.

5) Vgl. dazu Falk und Hesky, Zeitschr. f. klin. Med. **71**, 261.

6) S. Isaac, Zeitschr. f. physiol. Chem. **89**, 78.

7) Lobry de Bruyn und A. van Ekenstein, Ber. **28**, S. 3078—82.

8) A. Wohl und C. Neuberg, Ber. **33**, 3099. 1900.

9) Harden und Young, diese Zeitschr. **32**, 173.

10) Eine Stütze für die Annahme einer intermediären Enolbildung ist auch in den Befunden Embdens (Zeitschr. f. physiol. Chem. **113**, 1) zu sehen, nach welchen das aus der quergestreiften Muskulatur dargestellte Osazon des Lactacidogens mit dem von Harden und Young bei der alkoholischen Gärung gefundenen Hexosediphosphorsäuresazon identisch ist.

11) S. Isaac und E. Adler, Zeitschr. f. physiol. Chem. **115**, 105—29.

sein, den für das übrige Gewebe schwer oder gar nicht angreifbaren Ketonzucker in die dem Organismus adäquate Aldose überzuführen und als Glykogen zu fixieren. Diese Unfähigkeit der Umlagerung dürfte nach den klinischen Erfahrungen durch eine konstitutionelle Minderwertigkeit bedingt sein. Für eine solche Annahme sprechen außer den experimentellen Befunden auch die Ergebnisse der Blutzuckeruntersuchung im vorliegenden Falle. Diese zeigen aber meines Erachtens auch, daß in dem Verhalten der Leber kein prinzipieller Unterschied zwischen Fructosurie und Diabetes besteht. Es liegt nahe, für den echten Diabetes eine analoge Störung in der intermediären Umwandlung der Glucose in die — zur Glykogenbildung notwendige ? — Endform anzunehmen, wie sie von Isaac für die Fruktosurie angenommen wurde. Mit einer solchen Annahme ließe sich auch die von mir am Institut von Hofmeister gefundene Tatsache erklären, daß die isolierte Leber von pankreasextirpierten Hunden die Fähigkeit zur Glykogenbildung verloren hat<sup>1)</sup>.

---

<sup>1)</sup> H. K. Barrenscheen, diese Zeitschr. 58, 277.

## Zur physikalischen Chemie der „Lipoide“.

Die Durchwanderung von Methyleneblau durch organische Lösungen.

Von

S. Loewe (Dorpat).

(Eingegangen am 3. November 1921.)

In einer früheren Mitteilung<sup>1)</sup> wurde zur Kennzeichnung physikalisch-chemischer Eigentümlichkeiten einiger Gehirnlipoide deren Verhalten zu Methyleneblau beschrieben. Zur Prüfung diente der „3-Phasenversuch“. An eine wässrige Methyleneblaulösung (1. Phase = 1. Ph.) wurde eine Lipoidlösung in organischem Lösungsmittel (2. Phase = 2 Ph.), hinter diese reines Wasser (3. Phase = 3. Ph.) geschaltet. In dieser Versuchsanordnung wurde dann die Einwanderung des Farbstoffs in die Lipoidlösung und durch diese hindurch in die 3. Ph. beobachtet. Dabei konnte die eigenartige Fähigkeit von Phosphatid- und Cerebrosidgemischen festgestellt werden, den Eintritt des Farbstoffs in die Phase des organischen Lösungsmittels, das ihn in reinem Zustande nicht löst, und die Weitergabe des Farbstoffs an die 3. Ph. zu bewirken. Die Ursache der ungewöhnlichen Lösungsvermittlung wurde mit Wahrscheinlichkeit in der kolloiden Zerteilung des Lipoids im organischen Lösungsmittel gefunden.

Die damaligen Versuche beschränkten sich auf die Lösungen einiger Gehirnlipoidfraktionen in Tetrachlorkohlenstoff und trugen dazu bei, den Verfasser eine scharfe Grenze zwischen Cholesterin und den übrigen Lipoiden ziehen zu lassen. Zur Vervollständigung der Vorstellung von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der als Lipoide bezeichneten Stoffe war eine Ausdehnung der Prüfung im 3-Phasenversuch auf möglichst viele „fettartige“ Stoffe wünschenswert sowie die Verwendung anderer organischer Lösungsmittel. Zu diesem Zwecke wurden die nachfolgenden Versuche angestellt. Sie mußten im Jahre 1916 wegen der Schwerbeschaffbarkeit der erforderlichen Materialien abgebrochen werden, geben aber doch schon einen gewissen Einblick in das Verhalten der geprüften Stoffgruppe, der ihre Veröffentlichung erlaubt erscheinen läßt, sei es auch nur, um andere unter günstigeren Bedingungen Arbeitende zu ihrer Fortsetzung zu ermuntern.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. **42**, 180, 1912.

### Versuchsordnung.

Das gemeinsame Kriterium bei der Auswahl der Prüfungsstoffe konnte nur ihre gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln (o. L.) bei gleichzeitiger Unlöslichkeit in Wasser sein. Stets mußten wegen der Ungleichartigkeit der einzelnen o. L. gleichzeitig mehrere solche bei der Prüfung verwendet werden. Als Lösungsmittel wurden benutzt: Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Toluol und Äther. Chloroform diente jedoch nur zu Vorversuchen; denn in ihm ist Methylblau (verwendet: Methylblau med. Merck) von vornherein schwach löslich. Die Prüfung sollte durchgehends mit 3proz. Lösungen vorgenommen werden. Wo die Löslichkeit der „Lipide“ geringer war, mußten die weniger konzentrierten, filtrierten Lösungen verwendet werden, bei voller Unlöslichkeit in einem der Lösungsmittel fiel der Versuch in diesem aus. Auf chemisch reine Stoffe konnte sich die Prüfung nicht beschränken. Die nach früheren Erfahrungen interessantesten Substanzen waren Gemische. Daher erstreckte sich die Prüfung außer auf käufliche oder selbst hergestellte Reinsubstanzen auf verschiedene Materialien biologischer Herkunft, wie z. B. Pflanzenharze, Verarbeitungsprodukte des Wollfettes und Lipoidextrakte aus Gehirn.

Im einzelnen wurden die folgenden 29 Substanzen geprüft:

Ceresin,

Cholesterin, Cholesterinacetat, Cholesterinstearat,

Lecithin, Rohcephalin, Rohcerebrosid,

Walrat, Cetin, Cera alba und flava,

Acidum stearinicum,

Tristearin, Tripalmitin, Triolein,

Mastix, Dammarharz, Euphorbium,

Rohwollfett, Neutralwollfett, Wollfettettsäure, Adeps lanae cum aqua und anhydricum, Wollwachs I, Wollwachs II, Wollfettstearin, Oleostearin aus Wollfett, Wollfettolein, Wollpech<sup>1)</sup>.

Die Aneinanderschaltung der drei Phasen geschah in verschiedener Weise. Entweder wurde ein in der Mitte mit einer feinen Öffnung versehenes Reagensglas oder ein U-röhr verschiedener Form benutzt. Eine der beiden wässerigen Lösungen wurde durch einen möglichst schwachen Gelatinezusatz verfestigt; so machte man sich von dem spezifischen Gewicht der zweiten Phase unabhängig. Am zweckmäßigsten und sparsamsten erwies sich schließlich eine Versuchsordnung, die aus der Abbildung 1 hervorgeht: Als Aufnahmegefäß diente ein kleines Y-förmiges Röhrchen mit etwa 25 mm langen Schenkeln. In den einen dieser Schenkel wurde bis zu etwa zwei Drittel seiner Länge Methylblaugelatine, in den anderen ebensoweit ungefärbte Gelatine eingegossen. Nach deren Erkalten wurde dann der Rest des Röhrchens mit der zu prüfenden organischen Lösung gefüllt und das Röhrchen durch Kork und Siegellack verschlossen. Diese kleinen Röhrchen konnten in

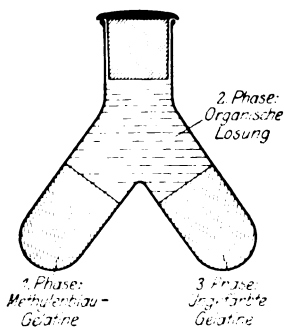


Abb. 1.

<sup>1)</sup> Das Cholesterin wurde von Herrn Prof. Windaus in dankenswerter Weise überlassen, die Cholesterinester wurden daraus selbst hergestellt und gereinigt. Die Wollfettderivate waren von der Wollwäscherei und -kämmerei Döhren bei Hannover freundlichst zur Verfügung gestellt. Alle übrigen Substanzen waren Handelspräparate der Firmen Merck oder Kahlbäum.



großer Zahl auf weiße Papptafeln übersichtlich zur bequemen Ablesung beim Versuchsforgange aufgenäht werden.

Da Fäulnis der Gelatine oder Reduktion des Farbstoffs nicht beobachtet wurde, konnten die einzelnen Versuche über viele Monate ausgedehnt werden. Anfangs wurde in möglichst kurzen, später in ein- oder mehrwöchigem Abstand die Farbstoffwanderung abgelesen.

### Versuchsergebnisse.

Die Auswahl umfaßt also recht verschiedenartige Stoffe. Schon unter den sieben Reinsubstanzen sind ein Alkohol (Cholesterin), eine Säure (Stearinsäure), drei Triglyceride, zwei Cholesterinester vertreten. Die Gemische zerfallen in vier recht verschiedene Gruppen: 1. die 3 Rohlipoide, 2. die 3 Harze, 3. Ceresin, Walrat und sein Reinigungsprodukt Cetin sowie Wachs, 4. die Wollfettprodukte. Als chemisch besonders unscharf definierte, weil besonders inkonstante Gemische sind wohl der größere Teil der Wollfettprodukte sowie die Lipoide zu bezeichnen. Auch in physikalisch-chemischer Hinsicht zeigen die Stoffe große Ungleichheit. Schon ihr gemeinsames Kriterium, ihre Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, ist in wechselndem Grade entfaltet. Manche von ihnen sind zwar in allen fünf Lösungsmitteln gut löslich, wenigstens in der geprüften Höchstkonzentration von 3%. Andere lösen sich jedoch nur in einem Teil der Lösungsmittel ausreichend.

Viele von ihnen lösen sich in der Wärme vollständig; filtriert man nach dem Erkalten von dem ausfallenden Niederschlag, so bilden die Lösungen mitunter noch sehr spät weitere Trübungen. Das Ceresin erstarrt sogar mit seinem o. L. zu einem gelartigen Gebilde. Zum Teil hängt das nachträgliche Auftreten von Trübungen in der aus unseren Lösungen bestehenden zweiten Phase der 3 Phasenversuche wohl auch mit den besonderen Beziehungen der geprüften Stoffe zum wässerigen Lösungsmittel zusammen. Ein Teil derselben fungiert ja als Ganzes oder vermöge eines Bestandteiles seines Gemisches als Emulgens, so daß entweder Wassertröpfchen in der organischen Lösungsmittelphase oder aber Tröpfchen der organischen Lösung in der wässerigen Phase emulgiert werden können. Dieser letztere Fall liegt wohl dem vereinzelt beobachteten Auftreten einer in die Gelatineschicht einwandernden sehr feinen Trübung zugrunde. Einem der angegebenen Gründe ist jedenfalls das in der Mehrzahl unserer Versuche beobachtete Auftreten von Trübungen verschiedener Art in der 2. Ph., teils großflockig, teils äußerst fein, teils aufwirbelbar, teils auch unter sich oder mit den Gefäßwänden verklebend, teils niedersinkend, teils aufrahmend, zuzuschreiben. Beachtenswerterweise verhalten sich auch hier die verschiedenen organischen Lösungsmittel nicht immer gleich, manchmal trübt sich auch bei Versuchen mit dem gleichen Stoff nur die Lösung in einem Lösungsmittel, nicht in anderen. Eine gewisse Vorzugsstellung schien hierbei der Tchl.<sup>1)</sup> einzunehmen, in welchem die Trübung häufig allein auftrat. Auch hiervon gibt es allerdings Ausnahmen, beim Tristearin trübte sich nur die Tol.-Lösung, die Tchl.-Lösung nicht. Daß die vermöge dieser Trübung in der 2. Ph. auftretenden Oberflächen für die Aufnahme und den Weitertransport des Farbstoffs besonders günstige Verhältnisse darstellen, ist von vornherein klar. In der Tat sind auch diese Trübungen meistens besonders stark angefärbt, so sind

<sup>1)</sup> Im weiteren werden für die fünf Lösungsmittel nur die Abkürzungen Chl., Tchl., Bz., Tol. und Äth. geschrieben werden.

sie z. B. im Falle der Harze die einzig gefärbten Stellen in der 2. Ph. Es gibt jedoch auch hiervon Ausnahmen; manchmal sind die Niederschläge, auch innerhalb einer im übrigen gut angefärbten Lösung, nicht sichtlich gefärbt.

Inwieweit der Färbbarkeit, der Emulsionsbildung und dem Auftreten von Ausflockungen kolloidchemische Besonderheiten der organischen Lösungen zugrunde liegen, konnte meist nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Daß die Auflösungen der Lipoidgemische (nicht des Cholesterins) im o. L. von kolloiddisperser Größenordnung sind, hat schon früher allerhand Hinweise erfahren<sup>1)</sup>. Von den neu geprüften Stoffen zeigt insbesondere das Wollpech kolloidchemische Eigentümlichkeiten; es erweist sich im Ultramikroskop sehr deutlich als ein Organosol in allen geprüften Lösungsmitteln, und zwar von recht gleichmäßiger Teilchengröße.

Kurze Erwähnung verdient, daß in manchen Fällen die Anfärbung der 2. Ph. entweder der Lösungen im ganzen oder der Trübungen allein, einen rötlichen Farbenton aufwies. In manchen Fällen, in denen die Färbung besonders schwach ausfiel, war dieser Farbenton von zartem Rosa ohne bläuliche Töne, so z. B. bei Stearinsäure (in Tchl. und Bz), bei Cholesterinacetat (Bz.), bei Cetin (nur in Tchl. geprüft), bei Tristearin und Tripalmitin (Tchl., Bz.), bei Mastix (Tchl.) und bei Wachs. Wollwachs I, Tripalmitin, Adeps lanae und Oleostearin nahmen in Tchl. den Farbstoff mit rotvioletter Färbung an, Wollfettstearin in allen Lösungsmitteln. Diese Farbenänderung ist wohl mit dem Auftreten von Methylenazur in Zusammenhang zu bringen. Warum es gerade in diesen Fällen entsteht, ist nicht ersichtlich. Jedenfalls aber bedeutet die Bildung dieses im Gegensatz zum Methylenblau selbst in den o. L. löslichen Farbstoffs eine Störung des Versuchsergebnisses. In allen diesen Fällen ist das Auftreten von Farbstoff in der 3. Ph. mit dieser Unstimmigkeit zu erklären; ohne Methylenazurbildung wären wohl beide Phasen ganz ungefärbt geblieben.

Von einer genauen Wiedergabe der einzelnen Versuchsprotokolle kann zur Raumersparnis füglich abgesehen werden, es mag die folgende Zusammenstellung der Versuchsergebnisse in Tabellenform genügen. Die Tabelle I gibt eine Gesamtübersicht über das Verhalten der einzelnen Substanzen in den verschiedenen geprüften Lösungsmitteln, wobei der Gruppierung der Färbungsgrad der beiden zu färbenden Phasen zugrunde gelegt ist.

Schon aus der Tabelle I geht als wesentliches allgemeines Resultat der Versuche hervor, daß nur in außerordentlich wenigen Fällen die mit der gleichen Substanz in verschiedenen o. L. angestellten Parallelversuche unter sich übereinstimmend ausfielen. Unter diesem Gesichtspunkt steht das Ceresin als einziger in allen Lösungsmitteln sich vollständig gleichbleibender Stoff allein da. Cephalin allein kann dem Ceresin noch in gewissem Grade an die Seite gestellt werden, wiewohl zwischen den verschiedenen Lösungsmitteln doch bereits Unterschiede beobachtet wurden; sechs andere Substanzen: Cholesterin, Triolein, Wollfettolein.

<sup>1)</sup> Vgl. z. B. diese Zeitschr. 12. 207. 1912.

Tabelle I.

	2 und 8. Ph. schwach oder negativ			2 Ph. > 8. Ph.			2 Ph. = 8. Ph.		3 Ph. > 2 Ph.
	2 und 8 negativ	2 negativ, 8 Spur	2 Spur, 8 negativ	2 stark, 8 schwächer	2 kräft., 8 Spur oder negativ	2 mäß., 8 Spur oder negativ	2 stark, 8 stark	2 mäßig, 8 mäßig	
Ceresin . . . . .	in allen 4	—	—	—	—	—	—	—	—
(Cholesterin *)	o. L.	—	—	—	—	—	—	—	—
Triolein **)	in Öl	—	—	—	—	—	—	—	—
Wollfettolein **)	—	Tchl.	—	—	—	—	—	—	—
Oleostearin **)	—	Tchl.	—	—	—	—	—	—	—
Cetin **)	—	—	Tchl.	—	—	—	—	—	—
Wollfettstearin **)	—	—	Tchl.	—	—	—	—	—	—
Cephalin . . . . .	—	—	—	alle 4 o. L. in allen 4 o. L.	—	—	—	—	—
Acidum stearicum . . . . .	Äth.	Tol.	—	Tchl., Bz.	—	—	—	—	—
Tristearin . . . . .	Äth.	—	Bz.	Tchl., Tol.	—	—	—	—	—
Tripalmitin . . . . .	Äth.	Tol.	Bz.	Tchl.	—	—	—	—	—
Cera . . . . .	Äth., Bz.	—	—	Tchl., Tol.	—	—	—	—	—
Wollwachs I . . . . .	Äth.	Bz.	—	Tchl., Tol.	—	—	—	—	—
Cetaceum . . . . .	Äth.	—	Tchl.	Bz., Tol.	—	—	—	—	—
Euphorbium . . . . .	—	—	Tol.	Bz., Tchl., Äth.	—	—	—	—	—
Mastix . . . . .	—	Tchl.	Äth.	—	—	—	—	—	Bz., Tol.
Dammarharz . . . . .	Äth., Tchl.	Bz.	—	—	—	—	—	—	—
Rohwollfett . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Wollwachs II . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Wollfettäure . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Neutralwollfett . . . . .	—	Tchl.	—	—	—	—	—	—	—
Cholesterinstearat . . . . .	Äth., Tchl., Tol.	—	—	Tol., Äth. Bz.	—	—	—	—	Bz.
Cholesterinacetat . . . . .	—	Äth., Tchl., Tol.	—	Bz.	—	—	—	—	—
Adeps lanae . . . . .	—	—	—	Äth.	—	—	—	—	—
Lecithin . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Rohcerebrosid . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Wollpech . . . . .	—	—	—	Tchl. Bz. Tchl., Äth.	Tol., Äth.	—	—	—	—
									Bz., Tol.

\*) Nur in Solutio oleosa Merck geprüft. \*\*) Nur in Tchl. geprüft.

Oleostearin, Wollfettstearin und Cetin fallen außer Betracht, da sie nur in einem Lösungsmittel geprüft wurden; vom Cholesterin kann nach früheren Erfahrungen ausgesagt werden, daß es sich dem Ceresin wohl recht eng anschließt, es ist in keinem bisher untersuchten Lösungsmittel färbbar oder farbstoffübertragend gefunden worden. Alle übrigen Substanzen stützen die Erkenntnis, daß die verschiedenen o. L. untereinander keineswegs gleichwertig sind. Dabei bilden Mastix, Dammar, Rohwollfett, Neutralwollfett, Wollfettfettsäure, Wollwachs II, Adeps lanae<sup>1)</sup>, Lecithin, Rohcerebrosid und Wollpech eine Gruppe, in welcher ganz besonders deutliche Unterschiede in den verschiedenen o. L. zutage treten; diese Stoffe färbten sich wenigstens in einzelnen Lösungsmitteln kräftig an. Ihnen können als eine dritte Gruppe alle übrigen Substanzen, also Stearinsäure, Tristearin, Tripalmitin, Wachs<sup>1)</sup>, Wollwachs I, Walrat und Euphorbium gegenübergestellt werden: diese verhalten sich zwar gleichfalls in den verschiedenen o. L. verschieden, aber die Färbung geht in keinem Fall über einen äußerst schwachen Grad heraus. Sehr häufig überschreitet der Färbungsgrad nicht die Fehlerbreite, mit der auch die vorliegenden Versuche zu rechnen haben (neben kleinen technischen Verstößen beim Füllen der Versuchsgefäße liegt eine Fehlerquelle vor allem in dem Auftreten von Methylenazur, s. oben; der rötliche Farbenton ist bei den schwachen Färbungen dieser dritten Gruppe ganz besonders häufig).

Die Farbstoffübertragung durch eine die Farbstoffe nicht lösende Lösungsmittelschicht hindurch, jene Beobachtung, die bei den früher berichteten ersten Versuchen mit den drei Lipoidfraktionen als so auffällig verzeichnet wurde, läßt sich also bei der vorliegenden Vermehrung der Zahl unserer Prüfungssubstanzen in ausgeprägterem Maße nicht allzu häufig wiederfinden. Nur eine kleine Zahl der 24 (bzw. 26, s. die untenstehende Fußnote) neu in die Prüfung einbezogenen Stoffe zeigt ein ähnliches Verhalten. Am nächsten stehen den drei Lipoidfraktionen einige Rohstoffe der Wollfettverarbeitung, vor allem Wollpech und Wollwachs II, ferner Wollfettfettsäure, schließlich Rohwollfett; Neutralwollfett ist nur in Bz. wirksam, reiht sich also nur in diesem Lösungsmittel hier an; das gereinigte Wollfett, Adeps lanae, würde hierhinter mit einer sehr unbedeutenden Färbung, die in Äther überhaupt fast fehlt, noch zu erwähnen sein. Von sonstigen Substanzen steht dem Rohwollfett, allerdings nur in zwei Lösungsmitteln, der Mastix ungefähr gleich; hinter dem Neutralwollfett wäre, wenn auch mit schwächerem Resultat und nur in Tol., Dammar einzureihen.

<sup>1)</sup> Adeps lanae anhydric. und cum aqua verhielten sich ebenso wie Cera alba und flava vollständig gleich, es ist daher künftig nur von „Adeps lanae“ und „Wachs“ die Rede.

Bei den Wollfettprodukten sind, wenn man ihre fabrikatorische Gewinnung betrachtet, Wollpech und Wollwachs II offensichtlich die Träger der Erscheinung. Beseitigung der sogenannten Wollfettfettsäure, aus welcher dann als Rückstand nach Abdestillieren der unwirksamen Fettsäurefraktionen (Stearin, Oleostearin, Olein) das Wollpech zurückbleibt, setzt die Färbbarkeit auf das schwache Maß herab, welches bei Neutralwollfett, noch geringer bei dem gereinigten und gebleichten Produkt desselben, dem *Adeps lanae*, zu beobachten ist. Der Unterschied zwischen diesen beiden wiederum ist offensichtlich dem beim Bleichen zurückbleibenden „harzartigen“ Körper, dem Wollwachs II, zuzuschreiben. Ob dessen Wirksamkeit mit derjenigen des Wollpechs (bzw. der Wollfettfettsäure) identisch ist, ist schwer zu entscheiden. Auf jeden Fall geht aus dieser ganzen Prüfung wiederum die Sonderstellung der Cholesterine und Cholesterinester hervor. Sie sind in reinem Zustande geprüft unwirksam; je mehr im Reinigungsprozeß das Rohwollfett in den Vordergrund tritt, desto geringer wird die Färbbarkeit. Das Wollwachs I, das sich auf die unverseifbaren Alkohole beschränkt, läßt die Färbbarkeit gleichfalls vermissen.

Den als „harzartig“ bezeichneten Körpern des Rohwollfetts schließen sich die drei geprüften Pflanzenharze an. Ihre Wirksamkeit nimmt nur in den Bz.- und Tol.-Lösungen des Mastix beträchtlichere Grade an. Euphorbium hat eine deutliche Sonderstellung; seine Färbung ist stets verschwindend. Nun ist Euphorbium das säureärmste der drei Harze. Sieht man von den kleinen Mengen Euphorbinsäure ab, so ist die einzige in größerer Menge in ihm enthaltene Säure nach den vorliegenden Untersuchungen die Apfelsäure. Abgesehen von ihren sonstigen Unterschieden gegenüber den eigentlichen Harzsäuren ist sie aber im Euphorbium gar nicht frei, sondern nur als Kalksalz vorhanden. Die beiden in unseren Versuchen wirksamen Harze enthalten dagegen beträchtliche Mengen freier Harzsäure, und beachtenswerterweise das wirksamere von ihnen, Mastix, bedeutend mehr als das unwirksamere, Dammar (42 gegenüber 23%). Auch in diesem Fall besteht eine beträchtliche Differenz zwischen den einzelnen Lösungsmitteln, die wohl durch Versuche mit fraktioniertem Harz aufzuklären wären.

Von allen genannten Substanzen gehen am engsten parallel mit den 3 Gehirnlipoiden nur Wollpech in Tchl. und Äth., Wollfettfettsäure außerdem noch in Bz.; anzureihen wären höchstens noch trotz aller Intensitätsunterschiede Dammar (Tol.) und *Adeps lanae* mit Ausnahme seiner Ätherlösung. Sie alle speichern nämlich wie die Lipide in der 2. Ph. unter Benachteiligung der Wiederabgabe an die 3. Ph., alle anderen geben an die 3. Ph. verhältnismäßig reichlich den in die 2. Ph. aufgenommenen Farbstoff wieder ab; auch Mastix unterscheidet sich hierdurch von Dammar. Eine starke Entziehung des Farbstoffs aus der

1. Ph. ohne merkliche Wiederabgabe an die 3. Ph. wäre der Gleichgewichtszustand, wenn die hier vorliegende Eigenschaft in ihren höchsten Graden entfaltet wäre. Zuweilen, so z. B. bei manchen Lipoid- und Wollpechlösungen, ist dieser Zustand auch in unseren Versuchen verwirklicht. Dieses gegenseitige Verhalten der beiden Phasen spricht stets für eine besonders hohe Affinität der 2. Ph. zum Farbstoff.

Die Farbstoffverteilung kann durchaus in den Gesetzen des Henry - Satzes begründet sein oder aber auch durch eine chemische Affinität — Bildung von Farblacken — oder Adsorption zustande kommen. Je inhomogener die 2. Ph., desto wahrscheinlicher die letztgenannte Ursache. In der Tat sind alle Substanzen, die sich in unseren Versuchen so verhalten, in ihren o. L. in inhomogener Lösung vorhanden.

Die Inhomogenitäten, die dem beobachteten Vorgange zugrunde liegen, können A grobe Trübungen geringen Dispersitätsgrades sein, — entweder a) vorgebildete oder b) erst während des 3 Ph.-Versuchs entstehende. Die Entstehung (nach A, b) kann wiederum 1. durch Fällung aus echter Lösung bedingt sein oder 2. durch Zustandsänderung eines zwar feinen, aber doch kolloiden Dispersitätsgrades. Es kann aber auch eine bleibende Inhomogenität höheren Dispersitätsgrades, also B ein Solzustand der Lösungen allein genügen. Diese letzteren Verhältnisse (nach B) wurden in der früher gegebenen Erklärung des Verhaltens der Lipoide als wahrscheinlich angenommen. Verhältnisse nach A, a liegen in manchen anderen unserer Lösungen vor, welche, beim Erkalten wieder ausfallend, nicht ganz klar zu erhalten waren; es verdient jedoch Hervorhebung, daß keineswegs alle dieser getrühten Lösungen Färbbarkeit besaßen. Nach A, b können in manchen anderen unserer Lösungen gleichfalls recht gut Niederschläge entstehen; und zwar können Fällungen durch chemische Vorgänge, also auch aus echter Lösung, dann eintreten, wenn der basische Farbstoff eine organische Säure vorfindet, wenn mit ihr Farblacke in Schwebefällung oder in Form grober Niederschläge entstehen können. Daran ist vor allem bei den Harzsäuren zu denken. Die Vermutung erhält besonders Bestätigung dadurch, daß in der Tat die sauren Harze bessere Färbbarkeit aufweisen. Auch das „harzartige“ beim Bleichen (oxydativ!) entstehende Wollwachs II könnte wohl dank solcher saurer Körper seine Färbbarkeit besitzen. Nach A, b, 2 können verschiedene Vorgänge Fällung, und zwar in diesem Fall aus kolloider Lösung, erzeugen; unter anderem muß hier auch an den Einfluß des Wassers aus den beiden angrenzenden Phasen gedacht werden. Manche früheren Beobachtungen deuten darauf hin, daß auf Grund des „amphophylen“<sup>1)</sup> Charakters der im o. L. kolloid gelösten Stoffe Wasser — adsorptiv — in das o. L. aufgenommen werden kann. Dies kann eine Verminderung der Lyophilie des Stoffes in seinem o. L., also Vergrößerung seines Dispersitätsgrades, bewirken. Es können aber auch auf Grund der gleichen Eigenschaft mit Wasser beladene Anteile des im o. L. gelösten Stoffes als Emulgens dienen und so z. B. auch noch gröber disperse Wassertropfen in die o. L. eintreten lassen.

Daß die präformierten oder auf dem angegebenen Wege entstehenden Oberflächen innerhalb der o. L. einen besonders günstigen Boden für den Eintritt des Farbstoffs in die 2. Ph. schaffen, ist klar. Es ist auch bei allen Vorgängen dieser Art ein Gleichgewichtszustand denkbar, bei welchem sehr viel Farbstoff in die 2. Ph. eintritt und nur sehr wenig

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. 42, S. 217, 1912.

wieder an die 3. Ph. abgegeben wird. Und gerade die wichtigsten unserer Fälle zeigen ja dieses offenkundige Übergewicht der 2. Ph. gegenüber der 3. Ph.

Wenn die Erörterung einer Farbstoffaufnahme auf dieser Grundlage in den Vordergrund gestellt wird, so geschieht dies, weil Farbstoffaufnahme durch einfache Auflösung des Farbstoffs in einer als echten Lösung betrachteten — molekulardispersen — 2. Ph. so sehr wenig Wahrscheinlichkeit für sich hat.

Das ist früher schon ausführlich dargelegt worden. Eine gelöste Substanz oder eine Komponente einer Mischung, die nur 3% oder weniger der ganzen Phase ausmacht, während mindestens 97% aus einem den dritten Stoff nicht lösenden Lösungsmittel bestehen, kann die Lösefähigkeit für diesen dritten Stoff nur in bescheidenem Umfange verändern. Bei uns sind es aber oft sehr starke Einflüsse, die durch diese kleinen Mengen der Lösungskomponente entfaltet werden. Ein solcher Grad von Löslichkeitserhöhung, wobei also äußerst kleine Mengen des Zusatzes die Löslichkeit von unendlich niedrigen Werten so sehr hoch treiben können, wäre ein äußerst seltener Fall. Auf eine Löslichkeitsbegünstigung, welche bei der Suche nach einer Erklärung der hier beobachteten Erscheinungen nicht unberücksichtigt bleiben darf, hat vor einigen Jahren *Neuberg*<sup>1)</sup> nachdrücklich aufmerksam gemacht. Er hat eine überraschend große Reihe von Substanzen studiert, die die Löslichkeit eines zweiten Stoffes in Wasser erhöhen. Die Löslichkeitserhöhungen belaufen sich bis aufs Hundertfache der ursprünglichen Löslichkeit<sup>1)</sup>. Auf eine endgültige Erklärung seiner Erscheinungen verzichtet auch *Neuberg*, er denkt, wenigstens für viele seiner Fälle, an Doppelverbindungen, Komplexverbindungen u. dgl. Auch er hält also, ebenso wie wir in unseren Fällen, einfache physikalische Lösungsprozesse für unwahrscheinlich. Leider erstreckt sich die reiche Fülle seiner Untersuchungen nur auf die Löslichkeitsbegünstigung in wäßrigem Lösungsmittel. Da er selbst hervorhebt, wie wenig die von ihm studierten Erscheinungen zuvor beachtet worden sind, so ist leider noch weniger zu erwarten, daß für die vorliegend beschriebenen Erscheinungen in organischen Lösungsmitteln Analoga in der Literatur zu finden sind. Die von *Neuberg* geschaffene Bezeichnung „hydrotropische Erscheinungen“ läßt sich leider für unsere Beobachtungen nicht sinngemäß verwerten; sowohl „organotrop“ als auch ganz allgemein „lyotrop“ würden zu Mißverständnissen führen; vielleicht könnte man diese noch der Aufklärung bedürftigen Erscheinungen als „Auxolyse“ zusammenfassen.

Alles in allem machen unsere Versuche auf physikalisch-chemische Eigenschaften der „Lipoide“ aufmerksam, die auf die Notwendigkeit und Möglichkeit einer präziseren Begriffsfassung hinweisen. Die „Löslichkeit im o. L. bei geringer oder fehlender Löslichkeit in Wasser“ ist ein besonders schlechtes Kriterium, das diejenigen Stoffe, auf welche es vor allem ankommt, nur höchst ungenügend abgrenzt. Zum mindesten wäre wohl noch die besondere physikalisch-chemische Beziehung der ins Auge gefaßten Stoffe zum wässerigen Lösungsmittel, ihre Neigung, in ihm in kolloiddispersen Zerteilungsgrad aufzutreten, hydrophile Sole oder sogar Gallerten zu bilden, mit in die Definition einzuschließen,

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. 70, 107. 1916.

wobei das Cholesterin schon aus der Definition herausfällt. Die generelle Gleichstellung aller o. L. muß umgekehrt, soweit deren Fähigkeit zu molekulardisperser Auflösung der „Lipoide“ ins Auge gefaßt ist, unbedingt unterbleiben. Gerade die Farbstoffaufnahme im 3-Phasenversuch zeigt aber, daß außerdem noch eine Besonderheit des Verhaltens im o. L. vorliegt, die sonst, neben den eigentlichen Lipoiden, nur noch sehr wenige Stoffe verwirklichen. Unsere Versuche lassen auch hier an eine kolloidchemische Besonderheit denken; wenn diese aus den hier wiedergegebenen Versuchen noch nicht mit Sicherheit erschlossen werden kann, so dürfte der hier angebahnte Weg doch wohl bei weiterer Verfolgung zu einer Klärung führen.



# Vergleichende Untersuchungen über Viscosität und Ultrafiltrationsgeschwindigkeit von Serum.

Von

**Alexander Ellinger und S. M. Neuschlosz.**

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 9. November 1921.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

In mehreren Veröffentlichungen hat der eine von uns (Ellinger) gemeinsam mit Heymann und Klein den Nachweis erbracht, von wie großer Bedeutung für den Flüssigkeitsaustausch zwischen Blut und Gewebe und für die Harnabsonderung das Wasserbindungsvermögen der gelösten Eiweißkörper in der Blut- und Gewebeflüssigkeit ist. Dieser Einfluß konnte sowohl im Froschdurchspülungsversuche, wie in Modellversuchen am Ultrafilter gezeigt und bis zu einem gewissen Grade auch quantitativ verfolgt werden. In den Versuchen wurde die bis dahin unbekannte oder zum mindesten unbeachtete Tatsache festgestellt, daß bestimmte pharmakologisch wirksame Substanzen bekannter und unbekannter Konstitution das Wasserbindungsvermögen der Serumeiweißkörper in Konzentrationen vermindern oder vermehren, wie sie annähernd bei pharmakologischen Wirkungen am Tier und Menschen in Betracht kommen. So ließen sich im Ultrafiltrationsversuche physikalisch-chemische Einflüsse von Substanzmengen nachweisen, deren Wirksamkeit bis dahin höchstens durch biologische Prüfungsmethoden an ausgeschnittenen Organen anschaulich gemacht werden konnten. Allein die Ultrafiltrationsversuche — namentlich in der ursprünglich verwandten Anordnung — hatten Mängel. Die Verwendung des Bechhold'schen Ultrafilters, daß für andere Zwecke (hohe Drucke) konstruiert ist, erforderte für jeden Versuch relativ große Flüssigkeitsmengen. Die Veränderung der Filterdurchlässigkeit machte häufig langwierige Versuchsreihen unbrauchbar, und die häufige Wiederholung von Versuchen mit dem Zusatz der gleichen Substanz führte zuweilen zu abweichenden Resultaten. Teils um die Fehlerquellen der Methode genauer kennen zu lernen, teils um festzustellen, welche Beziehungen zwischen der Ultrafiltrationsgeschwindigkeit und der Viscosität kolloider Lösun-

gen bestehen, und endlich, um möglichst mit einer präziseren und zugleich schneller ausführbaren Methode die Beeinflussung des Kolloidzustandes durch die erwähnten Angriffe festzustellen, wurden Viscositätsbestimmungen im Ostwaldschen Viscosimeter ausgeführt und mit den Ergebnissen des methodisch abgeänderten Ultrafiltrationsversuches verglichen.

### Methodik.

Aus der beigefügten Skizze (Abb. 1) ist die bei der Ultrafiltration verwandte Versuchsanordnung ohne weiteres zu übersehen. Der Druck, unter dem die Filtration stattfand, wurde durch ein Wasser-

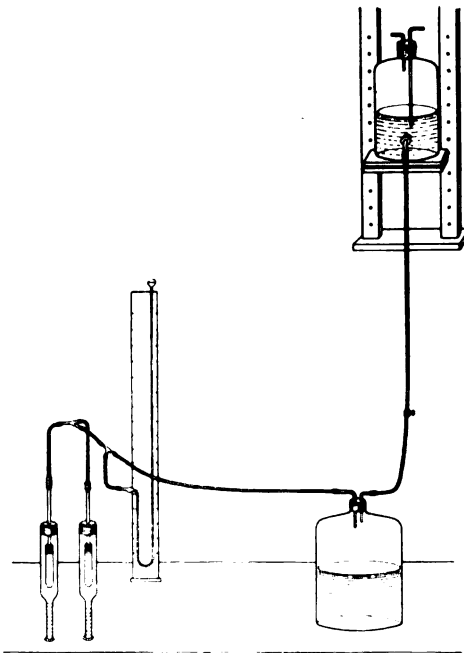


Abb. 1.

gefälle hergestellt, wie das auch in einer früheren Arbeit<sup>1)</sup> beschrieben ist; er wechselte bei den verschiedenen Versuchen zwischen 75–85 mm Hg und blieb während des Versuchs innerhalb 1–2 mm Hg konstant. Die Filter wurden stets auf folgende Weise hergestellt: Soxhlet-hülsen von 10 oder 40 mm Durchmesser werden mit 7 proz. Eisessigkollodiumlösung bis fast zum Rande gefüllt und die Lösung so lange in der Hülse belassen, bis die Hülse gleichmäßig durchtränkt erscheint und am Boden einige Flüssigkeitstropfen durchgetreten sind. Die durchtränkte Hülse darf keine weißen Flecken zeigen, wie sie anscheinend an nicht ganz trockenen Stellen des Papiers auftreten. Es wird deshalb

jedes Anfassen der lufttrockenen Hülse mit der Hand vermieden. Die Füllung erfolgt am besten an der an einem Faden aufgehängten Hülse, die in einem Glase frei schwebt und nicht etwa den Boden berührt. Der vom Faden durchlöchernde obere Rand wird vor Gebrauch abgeschnitten. Die Durchtränkung pflegt meist nach 2–5 Minuten vollständig zu sein. Dann wird die Füllung ausgegossen, die Hülse umgestülpt zum Abtropfen der Flüssigkeitsreste und zuerst mit destilliertem Wasser mehr-

<sup>1)</sup> Ellinger, Heymann und Klein, Arch. f. exper. Path. und Pharmak. 91, 28. 1921.

mals gefüllt, dann in ein Gefäß mit fließendem Leitungswasser gebracht und darin etwa 24 Stunden gewässert. Das Hülsenfilter ist alsdann gebrauchsfähig, es wird auf einem passenden Glasrohrstutzen mit geringer Erweiterung über dem unteren Ende mittels eines übergestülpten gut festklemmenden Stückes Gummischlauch montiert.

In dem Glasrohrstutzen sitzt ein einfach durchbohrter Gummistopfen, durch den ein Glasrohr in den oberen Teil der Hülse hineinragt. Weiter oben trägt das Glasrohr einen seitlich etwas eingekerbten Korkstopfen (Luftaustritt!), mittels dessen das Filter in dem Auffanggefäß einem gewöhnlichen 10 ccm-Meßzylinder mit angeschmolzenem weiten Glasrohr, befestigt werden kann. Durch diese Art des Auffangens wird Verdunsten von Filtrat auch während länger dauernder Versuche ausgeschlossen.

Die in der beschriebenen Weise hergestellten Filter zeigen sich in bezug auf ihre Durchlässigkeit für die Versuche ausreichend konstant. So wurden durch eine Hülse im Laufe von 4 Tagen 14 Serum-Ringer-mischungen verschiedener Konzentration je 100 Minuten durchfiltriert. Bei der ersten Filtration der Serum-Ringer Mischung (1 : 1) passierten 4,7 ccm, bei der fünften 4,8 ccm, bei der vierzehnten 4,95 ccm. Durch Filter 15 passierten bei der ersten Filtration 3,35 ccm, bei der fünften 3,3; durch Filter 16 bei der ersten Filtration 3,6, bei der fünften 3,65 ccm. In einer anderen Versuchsreihe gingen durch Filter 18 bei der ersten Filtration von Serum-Ringer (1 : 3) 4,5 ccm, bei der achtzehnten 4,45 ccm, während Filter 17 4,4 bzw. 4,0 ccm durchließ. Größere Abweichungen als etwa 10% wurden in derartig langen Versuchsreihen nicht beobachtet, wenn das Filtrat eiweißfrei war und nicht zwischendurch Filtrationen mit Zusätzen von Substanzen, die leicht adsorbiert werden, vorgenommen wurden; in den weitaus meisten Versuchen, die im Ganzen an etwa 60 gut gelungenen Filtern ausgeführt wurden, waren die Fehlergrenzen erheblich geringer. Man findet überdies meist eine bei der einfachen Herstellungsweise der Filter erstaunlich gleichmäßige Filtrationsgeschwindigkeit, wenn in zwei Filtern gleicher Größe gleiche Mengen der gleichen Serum Mischung filtriert werden.

Die Viscositätsmessungen wurden im Ostwaldschen Viscosimeter in einem großen Wasserbad vorgenommen, dessen Temperatur während einer Versuchsreihe höchstens um  $\frac{2}{10}^{\circ}$  schwankte. Da nicht sämtliche Versuchsreihen bei der gleichen Temperatur ausgeführt werden konnten, wurde, um die Wirkung der letzteren auszuschalten, innerhalb einer jeden Serie, in der Zusätze zum Serum gemacht wurden, auch die Viscosität des mit reiner Ringerlösung verdünnten Serums mitbestimmt. Auf diese werden dann alle Glieder der betreffenden Reihe als relative Viscositäten berechnet. Die weitaus größte Zahl der Versuche wurde in einem Viscosimeter angestellt, dessen Durchlaufzeit

für Wasser bei 20° 55 Sekunden betrug. Eine Ausnahme bildeten nur die Versuche, bei welchen die Wirkung höherer Drucke untersucht wurde. Hier kam ein Viscosimeter zur Verwendung, dessen Durchlaufzeit bei atmosphärischem Druck und 20° 120 Sekunden betrug.

### Vergleichende Versuche über Viscosität und Ultrafiltrationsgeschwindigkeit.

#### 1. Serum verschiedener Verdünnung.

Mischungen von 30' bei 56° inaktiviertem Pferdeserum mit carbonatfreier Säugetier-Ringerlösung.

##### a) Viscosität.

Tabelle I.

Gehalt an Serum	Durchlaufzeiten in Sekunden		Relative Durchlaufzeiten, bezog. auf Ringerlösung = 100	Reziproke Werte der relativen Durchlaufzeiten	Temperatur
(Reine Ringerlösung)	59,2	59,3	100	100	17,4°
6,25%	61,0	61,0	103	97	17,4°
12,5%	63,0	63,0	108	93	17,4°
20,0%	65,5	65,4	110	91	17,4°
25,0%	67,1	67,2	113	88	17,4°
33,3%	71,0	71,0	119	84	17,4°
50,0%	80,6	80,6	136	74	17,4°
66,67%	89,0	89,0	150	67	17,4°
75,0%	94,5	94,7	160	63	17,4°
90,0%	112,5	112,5	188	53	17,4°
100,0%	135,6	135,6	229	43	17,4°

Da bei den Ultrafiltrationsversuchen vorzugsweise mit Serum-Ringermischungen 1 : 1 (50%) gearbeitet wurde, so wurden die Viscositäten von 40—60 proz. Serum-mischungen besonders geprüft.

Tabelle II.

Gehalt an Serum	Durchlaufzeiten		Relative Durchlaufzeiten, bezogen auf Ringerlösung	Reziproke Werte der relativen Durchlaufzeiten	Temperatur
0	58,2	58,2	100	100	18,5°
40%	73,2	73,3	125	80	18,5°
45%	74,9	75,0	128	78	18,5°
50%	77,0	77,2	133	75	18,5°
55%	80,8	81,0	139	72	18,5°
60%	84,8	85,0	144	68	18,5°

b) Ultrafiltrationsgeschwindigkeit.

Tabelle III.

Filter 19. Füllung 10 ccm			Filter 20. Füllung 10 ccm	
Gehalt an Serum	Menge Filtrat in 60'	Menge bezogen auf reine Ringerlösung = 100	Menge Filtrat in 60'	Menge bezogen auf reine Ringerlösung = 100
0	8,5	100	9,8	100
10%	5,25	62	5,5	56
20%	4,45	52	4,65	47
40%	2,95	36	3,25	33
50%	2,75	32	2,95	30
60%	2,25	28	2,55	26
80%	2,3 (?)	—	2,1	21
100%	1,9	21	2,0	20

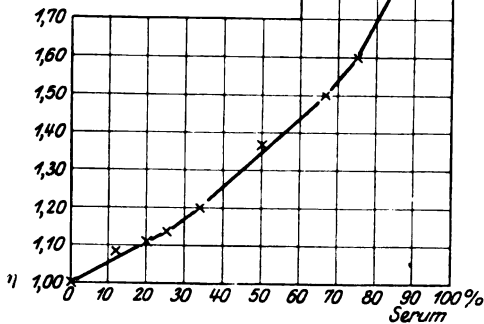
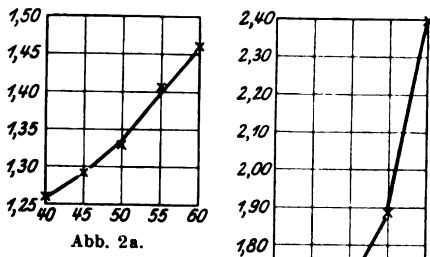


Tabelle IV.

Filter C (große Hülse). Füllung 20 ccm		
Gehalt an Serum	Menge Filtrat in 60'	Menge bezogen auf reine Ringerlösung
0	6,9	100
10	5,5	80
20	5,0	73
25	4,5	65
33 $\frac{1}{3}$	3,8	55
50	3,15	46
100	1,8	26

Tabelle V.

Filter 2 b Füllung 15 ccm (kleine Hülse)			Filter A (große Hülse) Füllung 30 ccm	
Gehalt an Serum	Menge Filtrat in 60'	Relative Filtratmenge	Menge Filtrat in 60'	Relative Filtratmenge
0	8,4	100	8,9	100
40	4,8	57	5,3	60
50	4,5	54	4,8	54
60	4,25	51	4,2	47
100	2,45	30	2,5	28

Betrachten wir die Kurven der relativen Durchlaufzeiten und der Ultrafiltrationsgeschwindigkeiten als Funktionen der Serumverdünnungen, so sehen wir, daß zwischen den beiden Funktionen ein Zusammenhang besteht, wie das

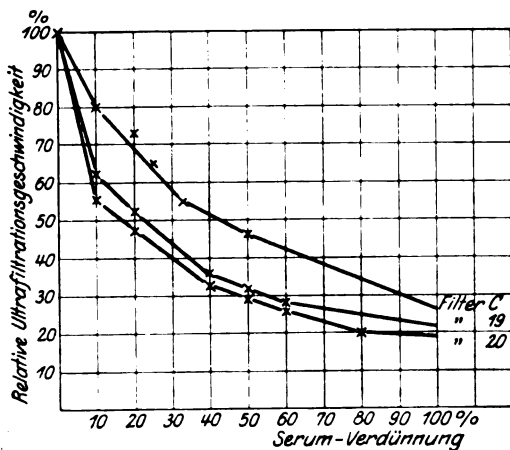


Abb. 8.

der eine von uns<sup>1)</sup> schon an anderer Stelle angenommen hat. Aber die Ultrafiltrationsgeschwindigkeiten sind nicht einfach den Durchlaufgeschwindigkeiten proportional. Die Kurve der relativen Viscositäten steigt bei geringen Kolloidkonzentrationen flach, bei hohen steil an, wie das für Sera anderer Tiere auch Blunschy<sup>2)</sup> und Bircher<sup>3)</sup> festgestellt

haben, während umgekehrt die Ultrafiltrationsgeschwindigkeiten bei geringen Konzentrationen steil, bei hohen flach abfallen. Es kommt darin wohl die Tatsache zum Ausdruck, daß die Ultrafiltrationsgeschwindigkeit zwar von den Faktoren, die die innere Reibung bestimmen, beeinflusst wird, aber nicht ausschließlich von diesen. Der typische Kurvenverlauf für die Änderung der Ultrafiltrationsgeschwindigkeiten mit der Konzentration zeigt sich in allen Versuchen, auch zahlreichen aus Raumangel nicht in den Tabellen angeführten, obwohl die Ordinatenwerte für die einzelnen Versuche nicht übereinstimmen. Diese hängen, wie schon die wiedergegebenen Versuche zeigen, unter anderem von der Füllung der Filterhülsen, von dem Verhältnis der Filteroberfläche

<sup>1)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1920. S. 1399.

<sup>2)</sup> F. Blunschy, Beiträge zur Lehre von der Viscosität des Blutes. Inaug. Diss. Zürich 1908.

<sup>3)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 182, 1. 1920.

zur Menge der filtrierenden Flüssigkeit, von der Durchlässigkeit der Filter ab.

Aus dem Gesagten ergibt sich, daß zum vergleichenden Studium von Beeinflussungen der Viscosität und Ultrafiltrationsgeschwindigkeit durch zugesetzte Substanzen, wie sie für das Studium des Flüssigkeitsaustausches im Körper notwendig sind, am besten Serum-Ringergemische zu gleichen Teilen benutzt werden.

Die Kurven gestatten uns, auch von der Größe solcher Einwirkungen vergleichbare Vorstellungen zu bekommen. Vermindern wir z. B. die Serumkonzentration von 50% auf 45%, so sinkt die Viscosität um 2—3% (gemessen an der Durchlaufzeit), bei 40% um etwa 5%. Die Ultrafiltrationsgeschwindigkeit steigt um etwa 10%. Wenn ein Coffeinzusatz die Viscosität um 5% herabsetzt oder die Ultrafiltrationsgeschwindigkeit um 10% erhöht, so läßt sich das also so ausdrücken: Die Viscosität ist in demselben Maße verringert, als wenn der Gehalt an Kolloiden in dem Serum-Ringergemisch um 10%, bezogen auf Serum selbst, um 20% herabgesetzt wäre, d. h. als ob der Eiweißgehalt eines Serums von 8% auf 6,4% herabgesetzt wäre, also eine gewaltige Hydrämie bestände. Es müssen auf Grund dieser Überlegung geringe Änderungen der Viscosität des Serums bei der Blutuntersuchung des gesunden und kranken Menschen und unter dem Einfluß von Arzneimitteln ganz anders in ihrer Bedeutung für den Flüssigkeitsaustausch bewertet werden, als das bisher geschehen ist.

Es ergeben sich somit für die Methode der klinischen Viscositätsbestimmungen im Serum und Plasma neue Gesichtspunkte, die an anderer Stelle erörtert werden sollen. Die größeren Ausschläge, die die Ultrafiltrationsmethode gegenüber der Viscosimetrie gibt, sprechen an sich zugunsten der ersteren, aber ihre sehr viel weiteren Fehlergrenzen (s. o.) und die schnellere und bequemere Ausführbarkeit der Viscositätsmessung räumen ihr den Vorrang ein. Aus diesem Grunde haben wir auch zur Untersuchung der Physiologie, Pathologie und Pharmakologie des Flüssigkeitsaustauschs, wie ebenfalls anderwärts ausgeführt werden soll, in unseren weiteren Arbeiten in erster Linie die Viscositätsbestimmungen benutzt.

Nach den methodisch wichtigen Untersuchungen von Rothlin<sup>1)</sup> u. a. aus dem Institut von Hess in Zürich, wonach beim Blutserum bei der Viscosimetrie nach Ostwald eine Abweichung vom Poiseuilleschen Gesetz in einem unteren Druckgebiet, d. h. bei langsamstem Durchfließen, nicht aber in einem oberen Druckgebiet — etwa bei 20 mm Hg — besteht, mußte noch in besonderen Versuchen festgestellt werden, ob unsere Anordnung für die vergleichenden Veruche zulässig ist oder ob-

<sup>1)</sup> Rothlin, diese Zeitschr. 98, 34, 1919 und Zeitschr. f. klin. Med. 89, 3/4.

bei Anwendung eines konstanten Überdrucks abweichende Resultate erhalten werden. Die folgende Tabelle gibt darüber Auskunft, daß die Resultate hinsichtlich der relativen Durchlaufgeschwindigkeiten mit ganz geringen Abweichungen die gleichen sind, ob mit oder ohne Überdruck gearbeitet wird, und daß auch die Dimensionen des Viscosimeters und die Temperatur, bei der die Viscosität bestimmt wird (wenigstens innerhalb der Grenzen 17° und 20°) ohne Einfluß auf die Werte der relativen Durchlaufgeschwindigkeiten sind.

Tabelle VI.

Durchlaufgeschwindigkeiten verschiedener Serumverdünnungen unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

Gehalt an Serum	Druck 20 mm Hg.		Temperatur 20°.		Kein Überdruck.		Temp. 20°.		Anderes Viscosimeter, kein Überdruck. Temp. 17,7°.		
	Durchlaufzeiten	Relative Durchlaufzeiten	Durchlaufzeiten	Relative Durchlaufzeiten	Durchlaufzeiten	Relative Durchlaufzeiten	Durchlaufzeiten	Relative Durchlaufzeiten	Versuch aus Tabelle I.	Relative Durchlaufzeiten	
0	45,9	46,0	100	100	135,0	135,0	100	100	59,2	59,2	10°
5%	47,4	47,6	103	103	139,2	139,4	103	103	—	—	—
10%	49,0	49,0	106	106	142,0	142,2	106	106	—	—	—
20%	51,0	50,8	109	109	149,0	149,0	110	110	65,5	65,4	110°
30%	53,2	53,1	115	115	152,8	153,0	113	113	—	—	—
40%	59,0	59,0	128	128	174,8	174,6	129	129	—	—	—
50%	63,2	63,4	137	137	186,2	186,2	138	138	80,6	80,6	136°
60%	66,0	66,1	145	145	195,0	195,2	144	144	—	—	—
70%	70,0	70,0	152	152	207,0	207,2	153	153	—	—	—
80%	76,5	76,6	165	165	225,2	225,4	166	166	—	—	—
90%	83,4	83,6	182	182	248,0	248,0	183	183	112,5	112,5	189°
100%	104,2	104,2	228	228	308,4	308,5	228	228	135,6	135,6	229°

## 2. Vergleichsversuche von Serum-Ringergemischen von verschiedenem $p_H$ .

Tabelle VII.

	Ultrafiltration		Durchlaufzeiten im Viscosimeter	
	Menge in 60'	Filtrat in 100'		
10 cem Ser. Ringer aa . . . . . $p_H = 7,7$	2,7 cem	3,9 cem	146,0''	146,2''
5 cem Ser. + 4,5 cem Ringer . . . . . + 0,5 $\frac{n}{10}$ -NaOH ( $\frac{n}{200}$ ) . . . . . $p_H = 8,2$	3,15 cem	4,4 cem	126,4''	126,0''
5 cem Ser. + 4,8 cem Ringer + 0,2 cem $\frac{n}{1}$ -NaOH ( $\frac{n}{50}$ ) . . . . . $p_H = 8,75$	2,8 cem	4,1 cem	149,2''	150,0''
5 cem Ser. + 4,8 Ringer + 0,2 cem 10 % NaOH (ca. $\frac{n}{20}$ ) . . . . . $p_H = 8,9$	2,55 cem	3,60 cem	161,0''	161,4''

Die wenigen Zahlen zeigen wiederum ein gleichsinniges Verhalten in der Zunahme der Viscosität bzw. der Abnahme der Filtrationsgeschwindigkeit. Die Vermehrung der OH-Ionen



führt bei  $p_H = 8,2$  zu einer Verminderung der Viscosität und Beschleunigung der Ultrafiltration, weitere Erhöhung auf  $p_H = 8,75$  gibt nur wenig andere Werte als das auf  $\frac{1}{2}$  verdünnte Normalserum, und bei Erhöhung der Alkaleszenz auf  $p_H = 8,9$  steigt die Viscosität um etwa 10%, und die Ultrafiltrationsgeschwindigkeit sinkt um nicht ganz den gleichen Betrag. Das Resultat, daß die Ultrafiltrationsgeschwindigkeit bei geringerem NaOH-Zusatz stieg, war zunächst unerwartet, aber die nachträglich an der gleichen Mischung vorgenommene Viscositätsbestimmung bestätigte das gleichsinnige Verhalten. Mit einem anderen Serum wurde dann die gleiche Mischung hergestellt und es ergab sich:

Tabelle VIII.

	Ultrafiltratmenge				Durchlaufzeiten im Viscosimeter	
	in 60'		in 100'			
	Filter 1	Filter 2	Filter 1	Filter 2		
10 ccm Ser. Ringer aa. . . . .	2,3	2,0	3,25	2,9	72,2"	72,4"
10 ccm Ser. Ringer aa $\frac{1}{200}$ -NaOH . . . . .	2,3	1,9	3,35	2,85	73,1"	73,3"

Es blieben also die Filtrationsgeschwindigkeiten annähernd unverändert, während die Viscosität sich um 1% erhöhte — also auch hier eine befriedigende Übereinstimmung. Daß bei Zufügung von Alkali zu Pferdeserum unregelmäßig eine Erniedrigung oder Erhöhung der Viscosität eintreten kann, hat, wie wir nachträglich fanden, schon Frei<sup>1)</sup> in einer uns im Original nicht zugänglichen Arbeit beobachtet.

### 3. Vergleichsversuche über den Einfluß von Salzen.

Die Versuche wurden so angestellt, daß die relativen Durchlaufgeschwindigkeiten bestimmt wurden für Gemische von gleichen Teilen Serum und  $\frac{1}{6}$  molaren Salzlösungen (bezogen auf Serum  $\frac{\text{mol}}{6}$  NaCl = 100) und für die gleichen Serumsalzlösungsgemische die relativen Ultrafiltrationsgeschwindigkeiten gemessen wurden.

In den folgenden Tabellen sind die Salze nach der Größe der relativen Durchlaufgeschwindigkeiten angeordnet. Die Anionen wurden in Form der Natriumsalze geprüft mit Ausnahme des Rhodan, das als Kaliumsalz zur Verwendung kam. Da aber KCl- und NaCl-Zusatz zum Serum genau die gleichen Durchlaufzeiten ergab (s. Tab. X), können zum Vergleich auch die Zahlen für NaCl benutzt werden. Die Kationen wurden als Chloride mit NaCl verglichen. Die Mengen der Ultrafiltrate sind für 60 und 100 Minuten bei Filtration durch die gleiche Hülse angegeben. In Klammern ist neben jeder Zahl die Menge des Ultrafiltrats einer Serum-NaCl-Lösung angegeben, die sich als Mittel

<sup>1)</sup> W. Frei, On Surface Tension of Serum. The Transvaal med. Journ. 1908, zit. nach M. E. Bircher, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 182, 1. 1921.

eines vorher und eines nachher angestellten Versuchs ergab. Die in einzelnen Fällen untereinander abweichenden Versuchszahlen sind einzeln mit Nummern angegeben. Von einer Berechnung der relativen Ultrafiltrationsgeschwindigkeiten wurde Abstand genommen, weil bei der Größe der Fehlerquellen der Methode solchen Vergleichszahlen nur ein sehr bedingter Wert zukommt.

Tabelle IX.

Einfluß von Anionen auf Viscosität und Ultrafiltrationsgeschwindigkeit.

Anion	Gefundene Durchlaufzeiten		Rel. Durchlaufzeiten ber. auf Cl = 100	Ultrafiltratmengen	
				in 60'	in 100'
CSN . . . . .	75,8	75,8	97	(1) 2,9 (2,8) (2) 2,85 (2,7)	4,35 (4,15) 4,3 (4,1)
J . . . . .	76,2	76,2	98	9,3 (8,7)	13,4 (12,8)
Br . . . . .	77,5	77,5	100	(1) 4,65 (4,4) (2) 2,6 (3,1) (!)	7,2 (7,0) 4,2 (4,5) (!)
Cl . . . . .	77,8	77,8	100	(1) 3,5 (3,6) (2) 3,8 (3,6)	4,8 (4,9) 5,25 (5,2)
Acetat . . . . .	80,2	80,2	103	2,3 (2,4)	3,0 (3,6)
Sulfat . . . . .	81,2	81,2	104	(1) 4,05 (4,4) (2) 2,55 (3,5)	5,3 (5,75) 4,4 (5,05)
				(3) 3,6 (3,7)	4,95 (5,2)
Citrat . . . . .	83,5	83,6	107	(1) 2,4 (2,7) (2) 2,65 (2,85)	3,75 (4,0) 4,15 (4,4)

Tabelle X.

Einfluß von Kationen.

Kation	Gefundene Durchlaufzeit		Relative Durchlaufzeit bezogen auf Na = 100	Ultrafiltratmengen	
				in 60'	in 100'
I. Na . . . . .	77,8	77,7	100	—	—
K . . . . .	77,8	77,7	100	2,65 (2,85)	4,15 (4,4)
II. Na . . . . .	81,2	81,2	100	(1) 4,1 (4,2)	6,4 (6,6)
Mg . . . . .	80,8	80,8	99,5	(2) 3,3 (2,9)	3,8 (4,3)
Ca . . . . .	79,9	79,8	98,3	(1) 2,7 (2,7) (2) 7,4 (7,95)	3,6 (4,05) 11,05 (11,8)

Ordnet man die Anionen nach dem Grade, in dem sie die Viscosität des inaktivierten Pferdeserums erhöhen, in einer Reihe, so ergibt sich

Citrat > Sulfat > Acetat > Cl > Br > I > CNS.

Wenn in der Viscosität sich der Quellungsgrad der Sole ausdrückt, so würde also eine glatte Umkehrung der Reihenfolge gegeben sein, in der die Anionen nach M. H. Fischer<sup>1)</sup> auf die Quellung von alkalisch gemachter Gelatine wirken. Solche Umkehrungen oder Verschiebungen in der Hofmeisterschen Salzreihe sind bekanntlich auch

<sup>1)</sup> zit. nach Höber, Physikal. Chemie d. Zelle u. Gewebe. 4. Aufl. 1914, S. 337.

bei anderen Gelegenheiten beobachtet, z. B. von Lenk<sup>1)</sup> bei der Quellung neutraler Gelatine, wenn die Salzkonzentrationen geändert wurden. Der veränderten Viscosität entspricht die veränderte Ultrafiltrationsgeschwindigkeit: Wenn die Viscosität gegenüber Kochsalzserum erhöht ist, so geht weniger durch das Filter und umgekehrt. Nur bei NaBr-Serum weicht der 60 Minutenversuch 2 von der Regel ab.

Unsere Resultate über die Beeinflussung der Ultrafiltration von Serum durch Salze stehen also zu den jüngst von M. Richter - Quittner<sup>2)</sup> mitgeteilten in schroffstem Widerspruch. Aber in dieser Arbeit werden die Ultrafiltrationsgeschwindigkeiten in einer anderen Weise bestimmt. Es wird die Zeit festgestellt, in der eine Lösung vollständig durchfiltriert ist. Bei solcher Versuchsanordnung kommt eine Veränderung der Durchlässigkeit des Filters innerhalb des Versuchs in ganz anderem Maße zum Ausdruck als bei den von uns verwandten. Es läßt sich aus den Angaben von Richter - Quittner nicht ersehen, ob Veränderungen dieser Art eingetreten sind, ob in Kontrollversuchen mit dem gleichen Filter die Vergleichsflüssigkeit die gleiche Filtrationsgeschwindigkeit zeigte. Endlich muß nach den Zahlenangaben (namentlich in Tabelle I und II) bezweifelt werden, ob äquimolekulare Lösungen verwandt wurden.

In den Versuchen mit wechselnden Kationen kommt namentlich in den 100 Minutenfiltrationen bei Mg und Ca eine auffallende Diskrepanz zwischen Viscosität und Ultrafiltrationsgeschwindigkeit zum Ausdruck: Verringerte Viscosität und verlangsamte Ultrafiltration. Hier macht sich wahrscheinlich eine Änderung in der Membrandurchlässigkeit geltend. Dafür spricht einmal, daß die Verlangsamung um so deutlicher wird, je länger und je mehr Flüssigkeit filtriert wird, und weiter die Tatsache, daß bei Wiederholung der Ultrafiltration einer Serum-NaCl-Mischung durch die gleiche Hülse, durch die die Mg- oder Ca-Mischung filtriert war, auch die NaCl-Mischung langsamer durchging, was wohl am ehesten durch Dichtung des Filters zu erklären ist.

#### 4. Einwirkung von Coffein auf Viscosität und Ultrafiltrationsgeschwindigkeit.

Von den zahlreichen pharmakologisch wirksamen Substanzen, die in ihrer Wirkung untersucht wurden, soll hier nur das Coffein als Beispiel angeführt werden. Die übrigen werden in den fortlaufenden Untersuchungen über den Flüssigkeitswechsel im Tierkörper besprochen werden. Über die Ultrafiltrationsversuche mit Coffeinzusatz ist schon früher<sup>3)</sup> berichtet worden. Bei Benutzung des Bechhold'schen Ultrafilters, in dem verhältnismäßig große Flüssigkeitsmengen durch eine relativ kleine Filterfläche filtriert werden, ergab sich fast ausnahmslos eine erhebliche Beschleunigung der Filtrationsgeschwindigkeit. In dem

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. **73**, 15. 1915/16.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. **121**, 274. 1921.

<sup>3)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **91**, 30 ff.

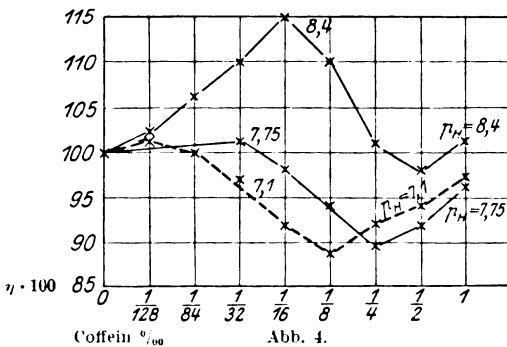
vorhergehenden und nachfolgenden Kontrollversuch mit Serum-Ringerlösung aa waren die Filtrationsgeschwindigkeiten im ganzen recht gleichmäßig, so daß eine wesentliche Veränderung der Filtermembran ausgeschlossen werden konnte. Bei der abgeänderten Ultrafiltrationsmethode konnten diese Versuche auch vielfach bestätigt werden. Es kamen aber auch Abweichungen vor, derart, daß eine Verlangsamung eintrat, oder daß ganz vereinzelt kein deutlicher Einfluß nachweisbar war. Das legte die Vermutung nahe, daß Coffein in verschiedener Konzentration den Zustand der Kolloide im entgegengesetzten Sinne beeinflusse und infolge von Adsorptionsvorgängen am Filter die durchtretende Schicht ihre Konzentration ändere, so daß ein Umschlag in der Wirkung eintreten konnte. Für solche Adsorptionsvorgänge wechselnder Größe sprechen Coffeinbestimmungen in Filtrat und Filtrat, die in verschiedenen Versuchen stark voneinander abweichende Konzentrationsänderung ergaben.

Die Viscositätsmessungen haben diese Vermutungen bestätigt und überdies gezeigt, von wie großer Bedeutung die H-Ionenkonzentration des angewandten Serums für die Änderung der Viscosität ist.

Tabelle XI.

Viscosität von Serum-Ringerlösung aa mit Zusatz von Coffein.

Coffein-Konzentration	Durchlaufzeiten		Relative Durchlaufzeiten		Durchlaufzeiten		Relative Durchlaufzeiten	
	$p_H = 7,75$		Temp. 20°		$p_H = 8,4$		T. unt. 0°	
0	204,6	205,0	100	217,4	218,0	100	224,8	225,0
$\frac{1}{128000}$	205,0	205,2	100	222,2	222,7	102	226,5	227,0
$\frac{1}{64000}$	203,8	203,8	100	231,0	230,6	106	224,2	223,8
$\frac{1}{32000}$	206,8	207,2	101	240,8	241,2	110	218,2	218,8
$\frac{1}{16000}$	200,8	201,0	98	251,0	251,2	115	208,4	207,8
$\frac{1}{8000}$	192,6	192,8	94	239,8	239,2	110	202,6	201,9
$\frac{1}{4000}$	184,6	184,5	90	221,4	221,2	101	207,6	207,4
$\frac{1}{2000}$	188,6	189,2	92	214,6	214,8	98	212,4	212,6
$\frac{1}{1000}$	196,4	196,8	96	220,6	220,4	101	217,8	217,6



Die Kurve des Serums normaler Reaktion zeigt innerhalb der beobachteten Werte ein Maximum bei  $\frac{1}{32000}$  Coffein, ein Minimum bei  $\frac{1}{4000}$  und dann wieder einen Anstieg. Bei stark alkalisch gemachtem Serum ( $p_H = 8,4$ ) liegt das Maximum viel höher und bei einer Konzen-

tration von 1 : 16 000, das Minimum nicht so tief und erst bei 1 : 2000, worauf wieder der Anstieg folgt, bei saurer Reaktion ist das wenig ausgesprochene Maximum schon bei 1 : 118 000 erreicht, das Minimum bei 1 : 8000, dann erfolgt auch hier Anstieg.

Die Kurven verschieben sich mit ihren Maxima und Minima bei verschiedenen Reaktionen des Serums also dermaßen, daß bei Beobachtung eines engeren Coffeinkonzentrationsbereichs der Eindruck entstehen kann, als ob das Coffein nur steigernd oder nur mindernd auf die Viscosität wirkte. Solche stetige Kurven hat Handovsky<sup>1)</sup> in der Tat erhalten, als er den Einfluß von im Vergleich zu unseren sehr hoch konzentrierten Coffeinelösungen auf dialysiertes Serum (neutrale Albuminlösung) und auf Säurealbumin untersuchte.

### Schlußbetrachtungen.

Der Vergleich der Viscosität und Ultrafiltrationsgeschwindigkeit von Pferdeseren, die verschiedenartigen Einwirkungen auf den Kolloidzustand ausgesetzt wurden, lehrt, daß beide Methoden für die Beurteilung einer Änderung des Kolloidzustandes verwertet werden können, wenn die Kontrollversuche mit Serum ohne Zusatz vorher und nachher im Ultrafilter die gleichen Werte ergeben. Zeigen sich erhebliche Abweichungen innerhalb der Kontrollversuche, so läßt das auf Adsorptionen in der Membran mit eventuell veränderter Durchlässigkeit schließen. Urstimmigkeiten zwischen den Resultaten der Ultrafiltrations- und Viscositätsversuche werden sich in solchen Fällen namentlich dann ergeben, wenn die zugesetzte Substanz in verschiedenen Konzentrationen den Kolloidzustand entgegengesetzt beeinflußt, wie es am Beispiel des Coffeins ausgeführt wurde.

Die Beeinflussungen der Viscosität — um nunmehr nur noch von dieser zu sprechen —, die wir in unseren Versuchen fanden, sind zum Teil schon von anderen Beobachtern festgestellt (Serumverdünnung, Blunsky und Bircher), zum Teil unbekannt und überraschend (Anionen, Coffein). Eine Erklärung für die Gründe der beobachteten Gesetzmäßigkeiten zu geben, sind wir nicht imstande. Zweifellos eignen sich zum Studium mit solchem Endziel einheitlichere Kolloidlösungen, wie sie andere Forscher, namentlich Pauli und seine Mitarbeiter verwandt haben, besser. Aber gerade Abweichungen in dem Verhalten des Serums gegenüber salzfreien Albuminlösungen (dialysiertem Serum) und Glutininlösungen weisen darauf hin, wie große Vorsicht in der Verwertung der Versuchsergebnisse, die an solchen Lösungen gewonnen sind, für biologische Schlußfolgerungen geboten ist. Dagegen lassen sich Erfahrungen, die am Serum (als vorläufigem Ersatz für das unverändert nicht zugäng-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. 25, 510. 1910.

liche Plasma) gemacht sind, eher für Fragen wie die des Flüssigkeitsaustauschs zwischen Blut und Gewebe benutzen.

Für die Frage der diuretischen Wirkung des Coffeins sind die Veränderungen des Kolloidzustandes der Plasmaeiweißkörper bereits verwendet worden, und die Verhältnisse, die sich beim Serum des in der Coffeindiurese befindlichen Menschen darbieten, werden zur Zeit geprüft.

Dagegen möchten wir es als gewagt ansehen, die Wirkung von Salzen auf die Diurese zum Teil dadurch erklären zu wollen<sup>1)</sup>, daß sie eine „Entquellung“ des Blutplasmas herbeiführen, so lange nicht für solche Konzentrationen, wie sie bei der Salzdiurese im Plasma vorkommen, eine Änderung in der Viscosität oder in der Ultrafiltrationsgeschwindigkeit festgestellt ist.

### Zusammenfassung.

1. Mit zunehmender Verdünnung von inaktiviertem Pferdeserum durch karbonatfreie Ringerlösung fällt die Viscosität und steigt die Ultrafiltrationsgeschwindigkeit, jede nach besonderem Typus.

2. Die gleichen Beziehungen zwischen Viscosität und Ultrafiltrationsgeschwindigkeit zeigen sich bei der Änderung der H-Ionenkonzentration des Serums.

3. Bei der Einwirkung von Neutralsalzen ergaben die untersuchten Anionen wiederum die gleichen Beziehungen. Die Reihenfolge, in der die Anionen quellungsfördernd wirken, nach der Zunahme der Viscosität aufgestellt, stellt in den angewandten Konzentrationen eine Umkehrung der Hofmeisterschen Reihe dar. Bei den untersuchten Kationen wird eine Unstimmigkeit in den Beziehungen unter dem Einfluß von Mg und Ca beobachtet, die auf Veränderungen in der Durchlässigkeit der Filtermembran zurückgeführt wird.

4. Coffein wirkt in verschiedenen Konzentrationen (Untersuchungsgrenzen  $1/128000$  —  $1/1000$ ) in entgegengesetztem Sinne auf die Viscosität des Serums, dem es zugesetzt ist.

Die Maxima und Minima der Kurven, die die Viscosität als Funktion der Coffeinkonzentration darstellen, verschieben sich in den Ordinaten und Abszissenwerten je nach dem H-Ionengehalt des untersuchten Serums. Mit der Verminderung der Viscosität geht in der Regel eine Erhöhung der Ultrafiltrationsgeschwindigkeit einher. Ausnahmen werden mit Adsorptionen von Coffein am Filter erklärt, die zu Änderungen der Konzentration in der durch das Filter tretenden Schicht, vielleicht auch in Veränderungen der Filterdurchlässigkeit führen.

<sup>1)</sup> s. Meyer-Gottlieb, Exp. Pharmacol. 5. Aufl., S. 402. 1921.

# Phosphatwirkung am Herzen<sup>1)</sup>.

Von  
H. Staub.

(Aus der Physiologisch-Chemischen Anstalt und der Medizinischen Klinik der  
Universität Basel.)

(Eingegangen am 9. November 1921.)

Mit 27 Abbildungen im Text.

Die allgemeine Muskelphysiologie hat sich jahrzehntelang fast nur darauf beschränkt, die Einwirkung elektrischer Ströme auf kontraktile Gewebe zu studieren, wie man jetzt wohl sagen kann, ohne damit einen der aufgewendeten Mühe entsprechenden Erfolg für das biologische Verständnis der normalen Leistung dieser Organe zu erreichen. Um so größer ist der Fortschritt in den letzten Jahren, und zwar kann ein solcher nach dreierlei Richtungen hin festgestellt werden.

Zunächst anatomisch-physiologisch bezügl. der Innervation der Muskeln. Durch den Utrechter Anatomen J. Boeke<sup>2)</sup> wissen wir, daß die Skelettmuskulatur neben den markhaltigen Spinalnerven auch eine akzessorische Innervation aus den marklosen Sympathicusnerven erhält. Ferner brachte derselbe Forscher den Nachweis, daß auch eine heterogene Nervenregeneration möglich ist, so, daß z. B. die motorischen Nerven ungehindert in die sensiblen einwachsen und umgekehrt und im Endorgan typische Endapparate (motorische Endplatten und Schmeckbecher) bilden.

Von ebenso großer Bedeutung war der Nachweis, der zuerst von J. v. Uexküll<sup>3)</sup> und von A. Bethe<sup>4)</sup> gebracht wurde, dann besonders von A. F. Fröhlich und Hans Horst Meyer<sup>5)</sup> auch in pathologischen und pharmakologischen Versuchen bestätigt werden konnte, daß es neben dem echten Tetanus auch eine tonische Kontraktion gibt, d. h. eine Dauerverkürzung ohne innere Arbeit, ohne Sauerstoffkonsumption, ohne Aktionsstrom und ohne Muskelton.

Der dritte große Fortschritt endlich, den das letzte Jahrzehnt brachte, betrifft die Energieumwandlung des Muskels. Er beginnt mit der klassischen Arbeit von Fletcher und F. G. Hopkins<sup>6)</sup> über die Milchsäurebildung im arbeitenden

<sup>1)</sup> Teilweise vorgetragen auf der Tagung der Schweiz. med. biolog. Gesellschaft, August 1921, Schaffhausen.

<sup>2)</sup> Internat. Monatsschr. f. Anat. u. Physiol. **28**, 394, und Verhandl. Kon. Akad. v. Wetenschappen, Amsterdam **18**. 1916 u. **19**. 1917.

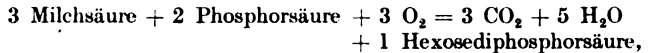
<sup>3)</sup> Zeitschr. f. Biol. **56**, 139. 1911.

<sup>4)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **94**, 441. 1910.

<sup>5)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **87**, 173. 1920.

<sup>6)</sup> Journ. of Physiol. **35**, 247. 1907.

Muskel und knüpft sich weiter, um nur einige zu nennen, an die Namen A. V. Hill<sup>1)</sup>, G. Embden<sup>2)</sup>, F. Verzár<sup>3)</sup>, O. Fürth<sup>4)</sup> und namentlich O. Meyerhof<sup>5)</sup>. Die Arbeitsleistung des Muskels beruht nicht, wie man früher annahm, auf einer Oxydation, sondern auf einer anoxybiotischen Zerlegung von Zucker. Wie genauere Versuche gelehrt haben, bildet sich während der Arbeit Milchsäure aus Kohlenhydrat, und erst während der Erholung kommt es zur Sauerstoffbildung, indem ein Teil der gebildeten Milchsäure verbrannt wird. Das thermodynamische Verhalten studierte besonders O. Meyerhof. Er fand an anaeroben Froschgastrocnemien einen weitgehenden Parallelismus zwischen Milchsäurebildung und Arbeitsleistung und Milchsäureschwung und Erholung. Bei Milchsäurebildung nehmen die Kohlenhydrate im Muskel, vorwiegend das Glykogen, entsprechend ab, und bei Milchsäureschwund in der Erholungsperiode nimmt der Glykogengehalt zu. Milchsäureproduktion und Wärmebildung gingen einander parallel. Die im Muskel bei Kontraktion gefundene Wärmetönung stimmte mit der aus thermo-chemischen Daten (Glykogenmilchsäure + Neutralisationswärme der Milchsäure durch Bicarbonat) berechneten überein. In der Erholungsphase des Muskels verschwindet O<sub>2</sub> mit der Milchsäure. Der Mehrverbrauch an O<sub>2</sub> beträgt aber nur  $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{4}$  des zur Oxydation der verschwindenden Milchsäure erforderlichen. 3 Mol O<sub>2</sub> sind mit dem Verschwinden von 3—4 Molen Milchsäure verknüpft oder anders ausgedrückt: von 3—4 Molen Milchsäure verbrennt eines, während 2 bis 3 Mole anaerob verschwinden. Diese letzte Tatsache ist mit dem Befund G. Embdens, daß der Abbau der Kohlenhydrate zur Milchsäure über die Hexosediphosphorsäure geht, sehr gut vereinbar. Der Vorgang ist dann chemisch so zu formulieren:



d. h. 2 Mole Milchsäure, die anaerob verschwinden, werden mit Phosphorsäure zu Hexosediphosphorsäure restituiert. Embden und Mitarbeiter haben aus Preßsaft frischer Hundemuskulatur das sogen. Lactacidogen dargestellt, eine Hexosediphosphorsäureverbindung, welche im Muskel unter fermentativem Einfluß in Milchsäure und Phosphorsäure gespalten wird. Embden bezeichnet das Lactacidogen als die Tätigkeitssubstanz des quergestreiften Muskels. Das Lactacidogen zerfällt bei der Muskeltätigkeit in Milchsäure und Phosphorsäure (dissimilatorische Phase), die Phosphorsäure bildet mit vorhandenen Hexosemolekülen wieder Hexosephosphorsäure oder Lactacidogen (assimilatorische Phase) und zerfällt wieder unter Bildung von Milchsäure und Phosphorsäure. Demnach kann der Abbau der Hexosen im tierischen Organismus nur erfolgen unter intermediärer Bindung an Phosphorsäure.

Die Ansicht, daß das Lactacidogen die Tätigkeitssubstanz der quergestreiften Muskulatur darstellt, hat Embden mit seinen Mitarbeitern durch zahlreiche Versuche am Mensch und Tier gestützt. Durch perorale Zufuhr von Mononatriumphosphat wurde die körperliche Leistungsfähigkeit von Mensch und Tier gesteigert. Die rasch und intensiv arbeitenden weißen Tiermuskeln besitzen einen höheren Lactacidogengehalt als der langsame rote Muskel. Nehmen wir mit Laquer<sup>6)</sup> an

<sup>1)</sup> Asher-Spiro, *Ergebn. d. Physiol.* **15**, 340. 1916.

<sup>2)</sup> Diese *Zeitschr.* **45**, 45. 1912; *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **93**, 1, 94 u. 124. 1914 und **113**, 1921.

<sup>3)</sup> Asher-Spiro, *Ergebn. d. Physiol.* **15**, 1. 1916.

<sup>4)</sup> Asher-Spiro, *Ergebn. d. Physiol.* **11**, 363. 1917.

<sup>5)</sup> *Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol.* **182**, 232 u. 284. 1920.

<sup>6)</sup> *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **93**, 60. 1914 15.



daß die Kontraktion durch eine bestimmte H-Ionenkonzentration im Muskel ausgelöst wird, so tritt die Bedeutung der Hexosephosphorsäure ( $C_6H_{10}O_4(H_2PO_4)_2$ ) noch mehr hervor; denn bei jedem Zerfall werden vier Säureäquivalente frei, welche als H-Ionen wirksam sein können.

Die erwähnten Untersuchungen haben unzweifelhaft gezeigt, daß die Phosphorsäure bei den Energieumwandlungen im Muskel von hervorragender Wichtigkeit ist. Unter den mannigfachen Formen, unter denen die Phosphorsäure im Organismus vorkommt, spielt nun jedenfalls das Calciumphosphat eine besondere Rolle, und es war daher die Frage naheliegend, ob vielleicht Beziehungen zwischen Muskeln und Calciumwirkung nachgewiesen werden konnten. Wir kennen eine Beziehung des Kalkes zur Muskelkontraktion speziell genauer bei einem Muskel, nämlich dem des Herzens. Bekanntlich bewirken Kalksalze am Herzen nach anfänglicher Steigerung der Kontraktionsgröße Unvollkommenheit der Diastole, d. h. der Erholungsphase. Ebenso ist es bekannt, daß die Kontraktion des Herzmuskels, wie sie nach toxischen Dosen von Digitalis-Glykosiden einzutreten pflegt, besonders beschleunigt werden kann durch Zufügen von Kalk. Es lag die Möglichkeit vor, daß hier gewissermaßen eine Bindung der Phosphorsäure, die sonst sich mit Glucose paart, an den Kalk stattfindet, und daß sie damit ihrer eigentlichen Funktion für die Muskelerholung entzogen wird. Gleich die ersten tastenden Versuche, die auf Veranlassung von Professor Spiro im Laboratorium der Medizinischen Klinik und später im Pharmakologischen Laboratorium der chemischen Fabrik Sandoz angestellt wurden, ergaben in der Tat, daß ein durch Digitalis stillstehendes Herz durch Phosphorsäure wieder zum Schlagen gebracht werden kann (vgl. Kurve 10 b), und waren der Anlaß zu den folgenden pharmakologischen Versuchen über die allgemeine Einwirkung des Phosphations auf das Herz, speziell das Froschherz.

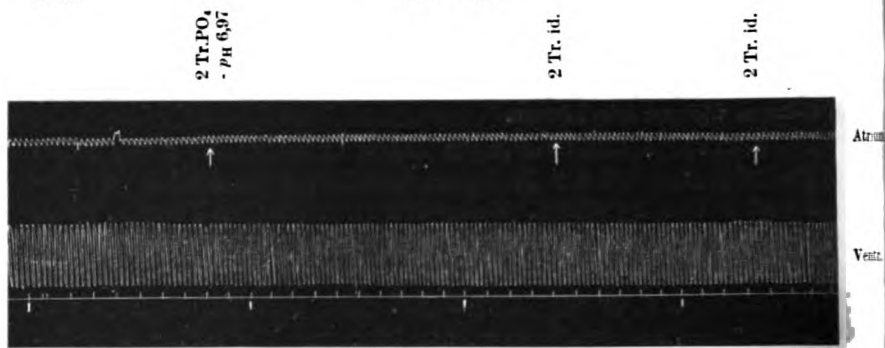
### A. Versuche am Froschherzen<sup>1)</sup>.

Es wurde die Wirkung von Phosphaten auf das gesunde, das insuffiziente und das vergiftete Herz untersucht.

#### 1. Phosphatwirkung am suffizienten und insuffizienten isolierten Froschherzen.

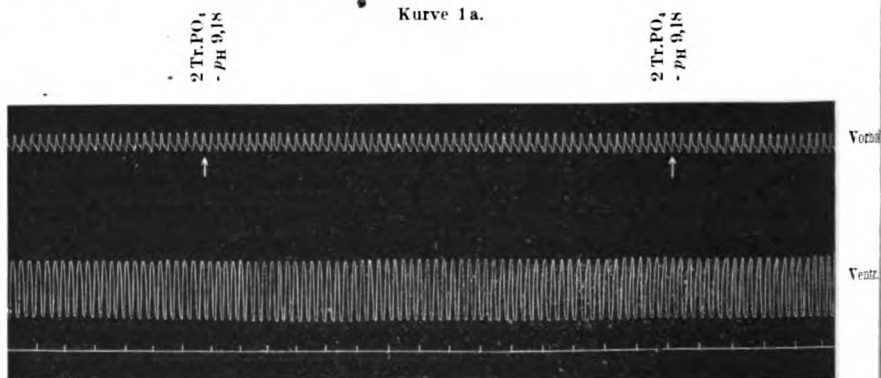
Auf das optimal und regelmäßig schlagende Herz, das mit „Sommer-Ringerlösung“ gespeist ist, sind weder  $\frac{n}{100}$ -saures Phosphat ( $p_H$  4,97), noch  $\frac{n}{100}$ -alkalisches ( $p_H$  9,18) akut wirksam (vergl. Kurven 1 a und b). Froschherzen, die nach längerer Zeit unter Ringer allmählich immer kleinere Exkursionen aufweisen und langsamer schlagen, erreichen nach Phosphatzufuhr die früheren ausgiebigen systolischen und diasto-

<sup>1)</sup> Straubsche Versuchsanordnung.



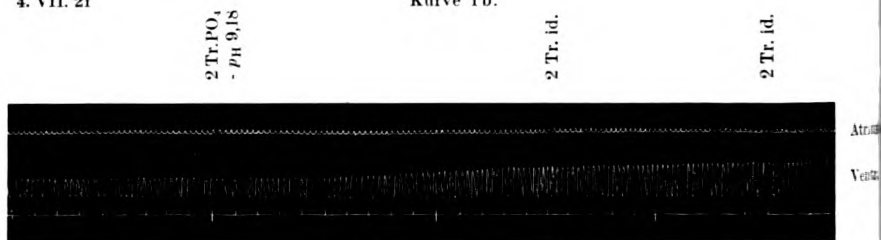
6. VII. 21 42 45 46

Kurve 1a.



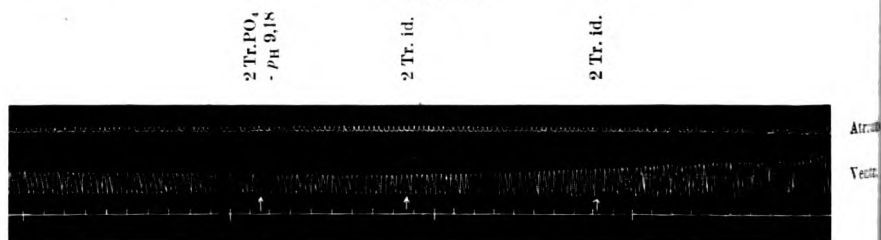
4. VII. 21

Kurve 1b.



5. VII. 21

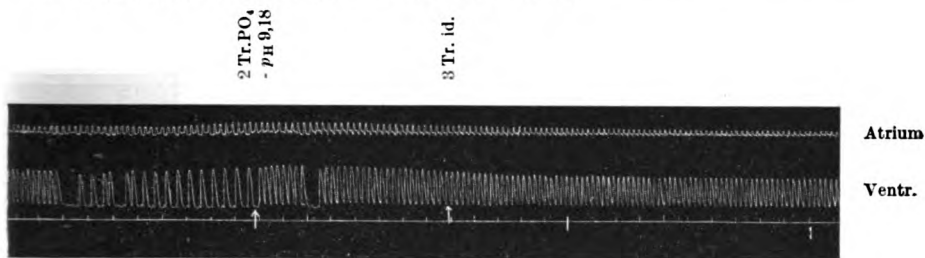
Kurve 2a.



5. VII. 21

Kurve 2b.

lischen Exkursionen und die normale Frequenz wieder (vergl. Kurven 2a und b). Überleitungsstörungen verschwinden unter  $\text{PO}_4$ -Zufuhr (vergl. Kurven 3a und b). Das alkalische Phosphat  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $p_{\text{H}}$  9,18) wirkt anscheinend günstiger auf das insuffiziente Herz als das saure ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $p_{\text{H}}$  4,97) (vergl. Kurven 4a und b).

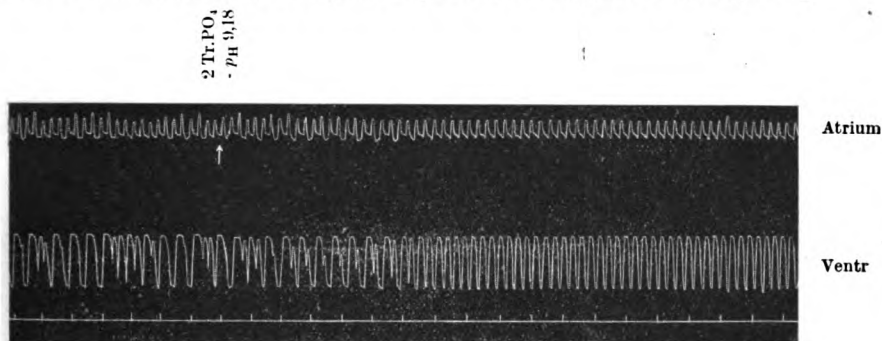


Kurve 3a.

41

46

Da die Hexodiphosphorsäure als Tätigkeitssubstanz für den Muskel angesehen wird, haben wir in zahlreichen Versuchen Phosphat und Glukose zur durchströmenden Ringerlösung zugegeben. Glukose allein zugegeben, machte das insuffiziente Herz nicht besser; wurde aber kurz vor- oder nachher noch Phosphat zugesetzt, so stieg die Leistungsfähig-



Kurve 3b.

keit des Froschherzens für lange Zeit bedeutend und konnte durch weitere Glucosegaben länger hoch gehalten werden. Das sek. Natriumphosphat übertraf auch in Kombination mit Glucose das primäre  $\text{PO}_4$  in der günstigen Wirkung auf das insuffiziente Herz (vergl. Kurven 4—5).

## 2. Phosphatwirkung auf das vergiftete Froschherz.

Mit Adrenalin bis zum Stillstand vergiftete Herzen erreichten nach  $\text{PO}_4$ -Applikation wieder den Zustand von optimaler Funktion wie vor der Intoxikation (vergl. Kurven 6a und b).

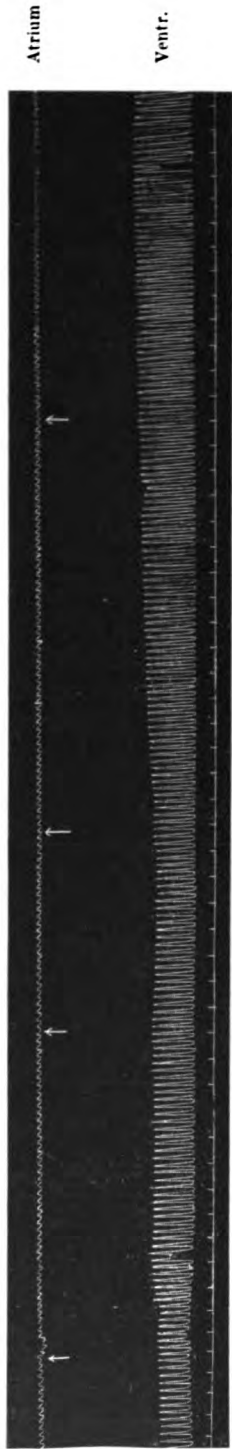


2 Tr. id.

2 Tr. 9% Glucose

3 Tr. id.

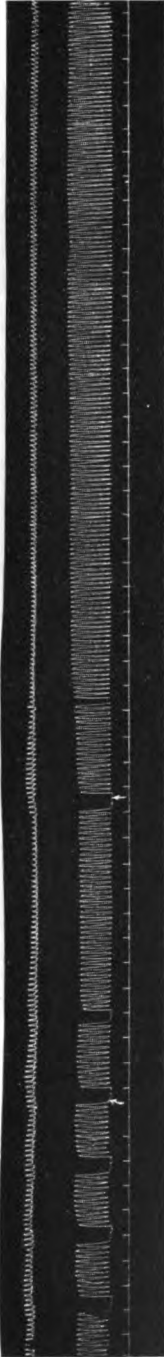
3 Tr. PO<sub>4</sub> - pH 9,18



Atrium  
Ventr.

2 Tr. 9%  
Glucose

3 Tr.  $PO_4$   
- pH 9,15



Kurve 5b.

5. VII. 21

2 Tr.  $PO_4$   
- pH 9,18

Ringer

3 Tr.  $PO_4$   
- pH 9,18

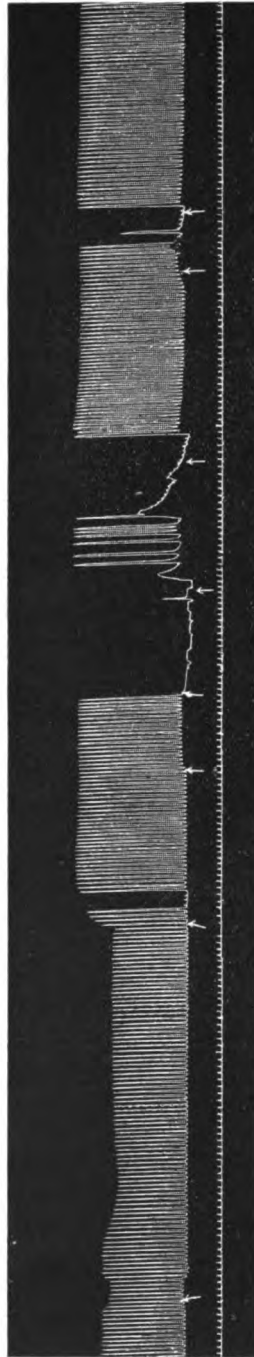
Ringer

1 Tr.  
Adrena-  
lin  $1/100$

Ringer

1 Tr.  
Adrena-  
lin  $1/100$

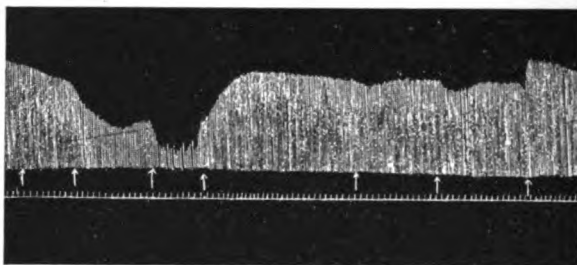
3 Tr.  $PO_4$   
- pH 9,18



Kurve 6a.

13. IX. 21

1 Tr. Adrenal.  
 1 Tr. id.  
 1 Tr. id.  
 2 Tr. PO<sub>4</sub> - pH 9,18  
 1 Tr. id.  
 4 Tr. id.  
 Ringer

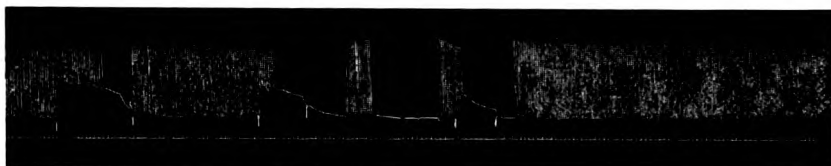


Ventrikel

19. IX. 20

Kurve 6b.

← Scilla  
 Ringer  
 Ringer ohne Ca + PO<sub>4</sub>  
 Ringer  
 Ringer ohne Ca  
 Ringer  
 Ringer ohne Ca + PO<sub>4</sub>

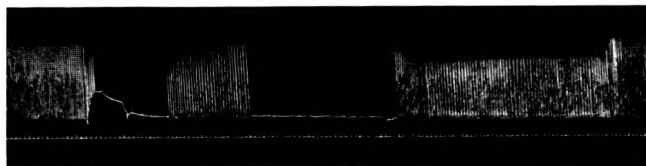


Vent

19. XI. 20

Kurve 7a.

← Scilla  
 Ringer  
 Ringer ohne Ca  
 Ringer ohne Ca + PO<sub>4</sub>  
 Scilla

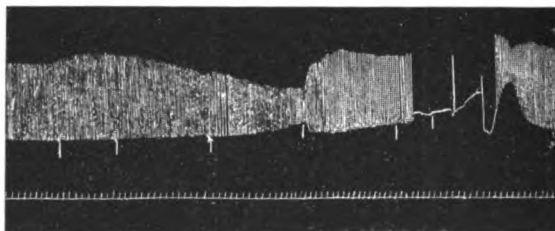


Ventrikel

19. XI. 21

Kurve 7b.

8 Tr. Strophanthin 1:10  
 1 Tr. id.  
 1 Tr. NaFl. n/100  
 2 Tr. PO<sub>4</sub> - pH 9,18  
 1 Tr. NaFl. n/100  
 8 Tr. PO<sub>4</sub> - pH 9,18



Ventrikel

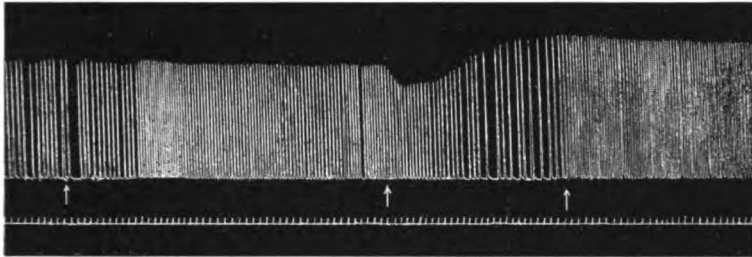
16. XI. 20

Kurve 8a.

CaCl<sub>2</sub>  
m/100  
1 Tr. PO<sub>4</sub>  
- pH 9,18

1 Tr.  
CaCl<sub>2</sub>  
m/100

1 Tr. PO<sub>4</sub>  
- pH 9,18



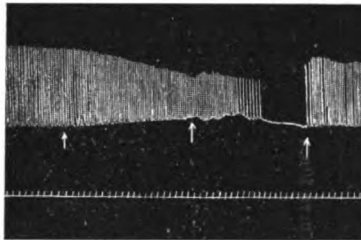
12. XI. 20

Kurve 8b.

2 Tr.  
Stro-  
phan-  
thin 1:10

Ringer

3 Tr. PO<sub>4</sub>  
- pH 9,18



Ventrikel

8. XI. 20

Kurve 9a.

2 Tr.  
Stro-  
phan-  
thin 1:10

2 Tr. PO<sub>4</sub>  
- pH 6,97

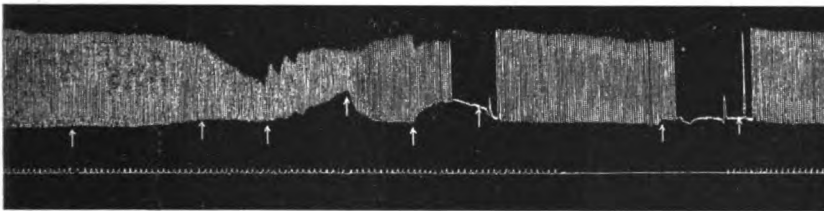
2 Tr. PO<sub>4</sub>  
- pH 6,97

Ringer

4 Tr. PO<sub>4</sub>  
- pH 9,18

Ringer

4 Tr. PO<sub>4</sub>  
- pH 9,81



Ventr.

16. XI. 20

Kurve 9b.

Scilla vergiftete Herzen wurden durch Phosphatgabe wieder zu normaler Tätigkeit gebracht (vergl. Kurven 7a und b).

Unter Na - Fluorid oder Ca - Chlorid schlecht gewordene Froschherzen erholen sich mit PO<sub>4</sub> wieder (vergl. Kurven 8a und b).

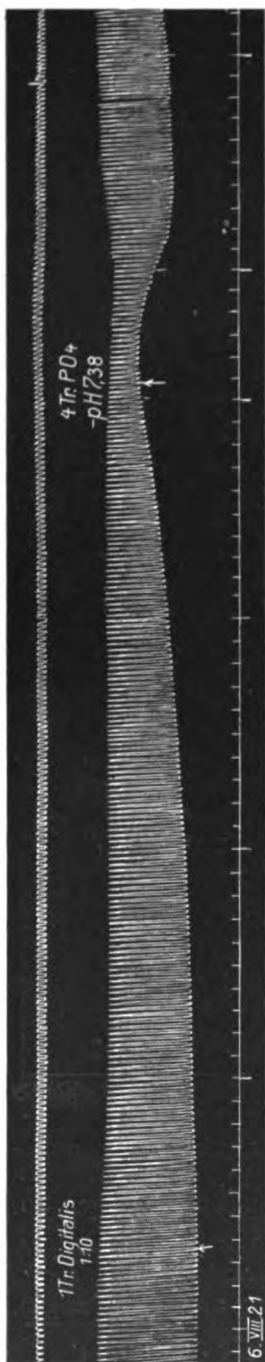
Diuretinvergiftung wird durch PO<sub>4</sub> nicht rückgängig gemacht.

Ganz besonders läßt sich die Phosphatwirkung an Herzen zeigen, die mit Körpern aus der Digitalisgruppe vergiftet sind.

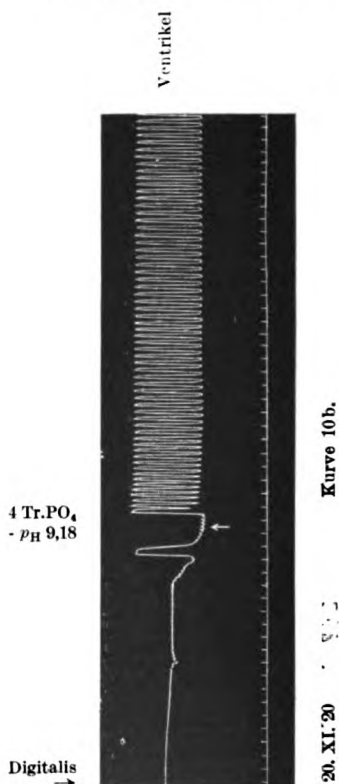
Mit Strophanthin vergiftetes Herz wird unter Phosphat wieder gut (vergl. Kurven 9a und b).

Digitalisstillstand des Herzens wird durch Phosphatzugabe zur Durchströmungsflüssigkeit aufgehoben, und wenn wir nur eine leichte Digitalisintoxikation setzen, so, daß die Diastolen allmählich kürzer und weniger ausgiebig werden, bringt Phosphatapplikation das Herz wieder zum normalen Schlagen mit ausgiebigen Diastolen und hoher Kontraktionsgröße (vergl. Kurven 10a und b).

Froschherzen, die durch Chinidindosen zu völlig unregelmäßiger Schlagfolge gebracht worden sind, werden durch Phosphat nicht wesentlich beeinflusst, manchmal scheint es, als ob die Unregelmäßigkeit reguliert würde, oder als ob Phosphat die Chinidinwirkung



Kurve 10a.



Kurve 10b.



Atrium

Ventr.

3 Tr. id.

3 Tr. PO<sub>4</sub>  
- pH 7,98

1 Tr. id.

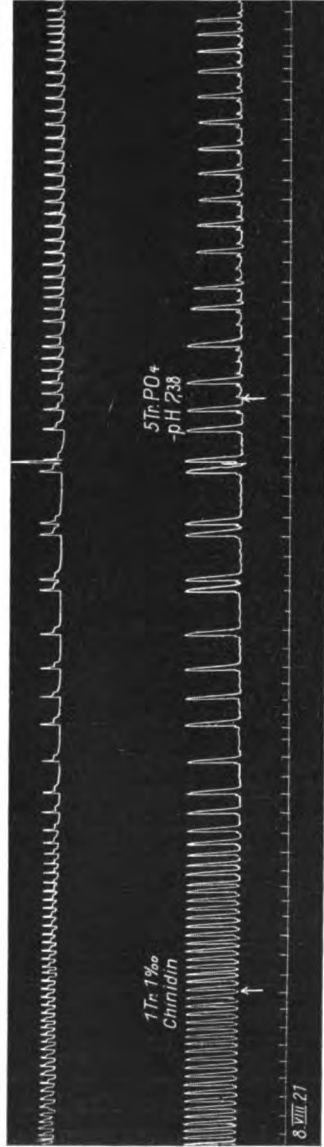
1 Tr. id.

1 Tr. 1‰  
Chinidin



Kurve 11 a.

8. VIII. 21



Kurve 11 b.

8. VIII. 21

verstärkte und nicht toxische Gaben zu toxischer Wirkung gelangen läßt (vergl. Kurven 11a und b).

Auch auf die vergifteten Herzen zeigte sich das alkalische Phosphat wirksamer als das saure.

Da sich bei der Alkaleszenz der normalen Ringerlösung der Kalk bei Phosphatzusatz teilweise unlöslich abscheidet, bestand die Möglichkeit, daß die  $\text{PO}_4$ -Wirkung nur eine Ca-Entziehung wäre. Gegen diese Vermutung spricht aber schon die Erfahrung, die man mit Calciumphosphat normalerweise macht, indem im kolloidal gelösten Ca-Phosphat auch das Ca-Ion noch zur Wirksamkeit gelangen kann. Ferner zeigten Versuche mit Citrat, daß die charakteristische Einwirkung z. B. auf ein mit Digitalis vergiftetes Herz nicht zu erreichen war.

Das Gemeinsame aller dieser Versuche ist, daß in ihrer Tätigkeit geschädigte Herzen durch Phosphat wieder suffizient werden. Wir brauchen bei den toxisch vergifteten Herzen keine spezifisch entgiftende Funktion der Phosphorsäure anzunehmen, sondern können die Wirkung auf das mechanisch wie toxisch insuffizient gewordene Herz von einheitlichem Gesichtspunkt aus erklären: das Phosphat als wichtiges Bindeglied im Kohlenhydratstoffwechsel des Muskels erhöht dessen dynamische Leistungsfähigkeit und damit auch die Widerstandsfähigkeit gegen irgendwelche Schädigungen, sei es mechanischer oder toxischer Art. Die umgekehrte Versuchsanordnung als die oben beschriebene zeigt dieser Phosphatwirkung noch deutlicher, indem z. B. nach vorangegangener Phosphatapplikation die dreifache Dosis Adrenalin nötig ist bis zur Vergiftung, wie beim nicht mit Phosphat gespeisten Herzen.

### B. Versuche mit Phosphat am herzkranken Menschen.

Nach den günstigen Wirkungen von Phosphaten auf das insuffiziente Froschherz war die natürliche Folge, zu untersuchen, ob auch das insuffiziente menschliche Herz durch Phosphatzufuhr irgendwie beeinflußt wird. Nachdem bereits von Embden<sup>1)</sup> am Menschen die leistungssteigernde Wirkung des Phosphates auf die Muskelarbeit und die gute Wirkung auf das Allgemeinbefinden mannigfach bewiesen worden war, lag es sehr nahe, anzunehmen, daß Phosphat auch auf den insuffizienten Herzmuskel des Menschen leistungssteigernd wirkt.

Die Versuche am Froschherzen zeigten das Resultat, daß ein alkalisches Phosphat günstigere Wirkungen auf die Herztätigkeit entfaltet, als das schwach saure. Bei den Versuchen am herzkranken Menschen in der Medizinischen Klinik Basel verwendete ich deshalb zuerst eine alkalische Dinatriumphosphatlösung.

Diese Phosphatlösung enthielt in 100 ccm 2 g krystall.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. **113**, 1921.

(12 H<sub>2</sub>O). Die  $p_H$  der Lösung betrug rund 9,0, war also ausgesprochen alkalisch. Von dieser Lösung wurden 200 ccm intravenös gegeben. Diese Dosis wurde bis jetzt in sechs Fällen 16 mal ohne die geringsten unangenehmen Nebenwirkungen injiziert.

Im Anschluß an die Versuche mit der alkalischen Phosphatlösung wurden auch intravenöse Injektionen mit Phosphatgemischen gemacht, um festzustellen, ob eine spezifische PO<sub>4</sub>-Wirkung vorlag, oder ob die günstige Wirkung der Dinatriumphosphatlösung auf ihre alkalische Reaktion zurückzuführen war. Nach den Angaben Sörensens<sup>1)</sup> wurde eine Phosphatmischung mit einem Wasserstoffionenexponent  $p_H$  ca. 7,0 (bestimmt mit der Indikatorenreihe) dargestellt. Ihre Zusammensetzung war:

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) . . . . .	3,8 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (12 H <sub>2</sub> O) . . . . .	27,0 g
Aq. ad . . . . .	1000,0 g

Von dieser Phosphatmischung wurden im ersten Versuch 200 ccm, nachher 100 ccm intravenös gegeben. Die Dosis von 200 ccm war vielleicht zu hoch, die betreffende Patientin kollabierte nach anfänglicher auffallend günstiger Wirkung (s. Fall 7). Auf Gaben von 100 ccm der Phosphatmischung blieben aber bei anderen Fällen unangenehme Nebenwirkungen aus.

Vor und nach den Injektionen wurden Puls, Blutdruck, Atmung und Sphygmogramm während längerer Zeit beobachtet und die subjektiven Angaben registriert. Ich führe im Folgenden die Fälle an.

Fall 1. F. Chr., 38 J., ♂

Diagnose: Myodegeneratio cordis nach Grippe. Seit 3 Monaten Dyspnöe, Stauungsleber und Stauungsbronchitis. Arythmia perpetua; Vorhofflattern, Frequenz um 400. Herz nach rechts und links verbreitert. Tr. 16,5 cm. Bettruhe während 8 Tagen bessern die Dyspnöe und die Stauungserscheinungen nicht.

Am 9. Tage des Spitalaufenthaltes (12. VII. 1921) erhält er 4 g Dinatriumphosphat<sup>2)</sup> intravenös. 5 Min. nach der Injektion gibt Pat. spontan an: „Es ist mir wohliger auf der Brust, das Engigkeitsgefühl ist weg. Es ist mir wohler als die ganzen Tage vorher.“

15 Min. nach der Injektion äußert Pat.: „Es ist mir gerade so, als ob ich mich auf etwas freuen würde, ich möchte aufstehen.“

Während ca. 10 Stunden nach der Phosphatapplikation war dem Pat. „übermütig wohl“. An Blutdruck oder Pulsfrequenz und Irregularität war objektiv keine nennenswerte Veränderung zu konstatieren. Am folgenden Tage (13. VII.) war das „übermütige Gefühl“ verschwunden, das Allgemeinbefinden aber weitaus besser als die Tage vorher, die Atemnot blieb aus.

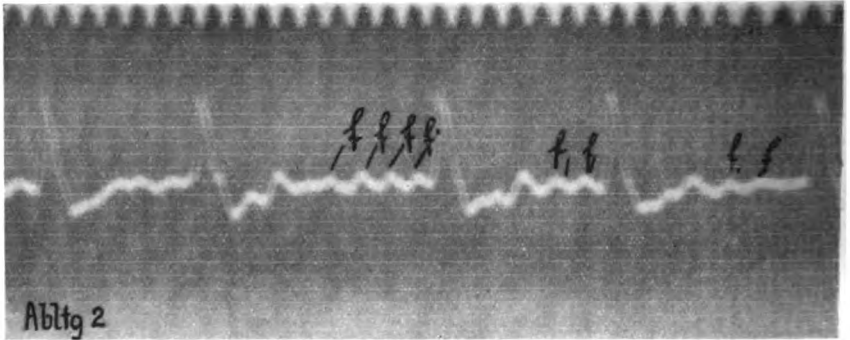
Vom 13. bis 15. VII. erhielt der gleiche Pat. am einen Tage 20 g Glucose, am anderen 4 g primäres Natriumphosphat und am dritten 4 g Dinatriumphosphat + 13 g Glucose intravenös, ohne daß aber nach diesen Injektionen

<sup>1)</sup> Asher - Spiro, *Ergebn. d. Physiol.* **12**, 437. 1912.

<sup>2)</sup> Es handelt sich um das käufliche Dinatriumphosphat mit 12 Mol. H<sub>2</sub>O kryst. (s. oben).

eine subjektive oder objektive Änderung im Befinden eintrat. Auch eine dritte Injektion von Dinatriumphosphat am 18. VII. war ohne Wirkung. Pat. fühlte sich seit der ersten Phosphatgabe so wohl, daß er über nichts zu klagen hatte.

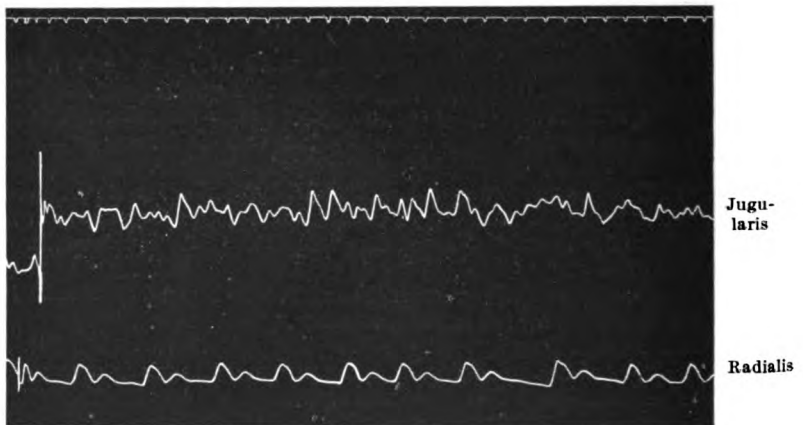
Am 19. VII., 24 Stunden nach der letzten Dinatriumphosphatinjektion, erhielt er 0,5 g Chinidin p. os. 5 Stunden nachher war das Vorhofflattern ver-



Kurve 12a.

schwanden, der Radialpuls regelmäßig und äqual. Die E. K.-Kurven und Sphygmogramme Nr. 12a—d zeigen das Vorhofflattern vor der Chinidingabe und den regelmäßigen Erregungsablauf nachher.

Am 21. VII., während die Herzaktion noch regelmäßig war, erhielt der Pat. nochmals 4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4(12 \text{ H}_2\text{O})$  ohne subjektive und objektive Wirkung.



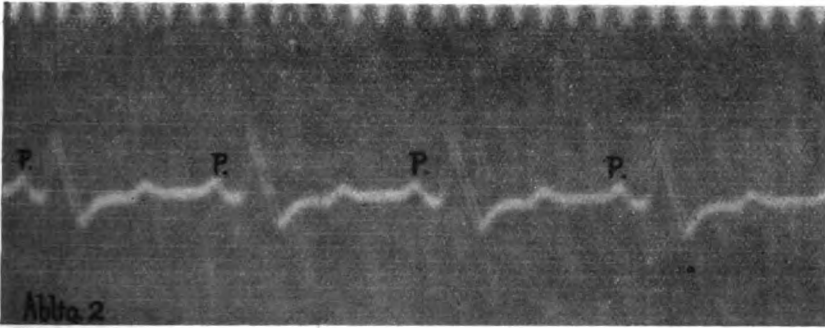
Kurve 12b.

23. VII., 3 Tage nach der Chinidinzufuhr, trat das Vorhofflattern wieder auf. Am folgenden Tag wurden 2 mal 0,5 g Chinidin gegeben ohne  $\text{PO}_4$ . Der Puls wurde nicht regelmäßig. Erst 10 Stunden nach der dritten Dosis von 0,5 g Chinidin am 25. VII. wurde die Herzaktivität für 2 Stunden regelmäßig, um nachher wieder in Arythmie umzuschlagen. Nachdem der Puls während 2 Tagen unregelmäßig

gewesen war, wurden am 27. VII. 0,5 g Chinidin p. os und 4 g Dinatriumphosphat intravenös gegeben. 2 $\frac{1}{4}$  Stunden nachher war die Arythmie wieder weg und die regelmäßige Schlagfolge hat ohne weitere Medikation 14 Tage angehalten.

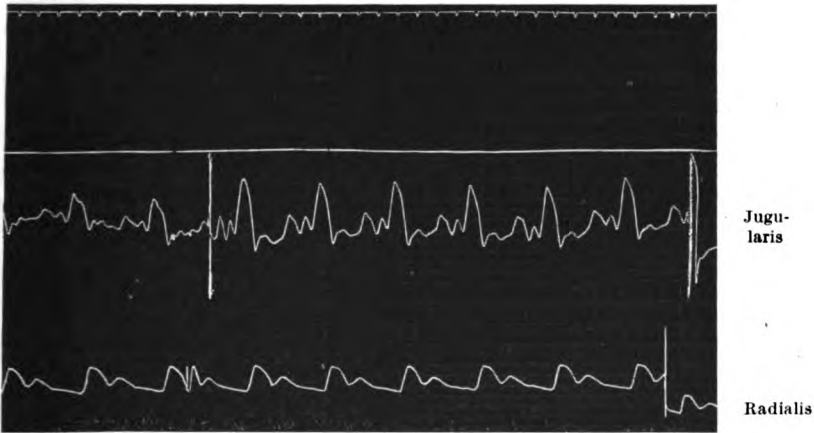
Fall 2: J. Fr., 70 J. ♂

Diagnose: Myodegeneratio cordis, Arteriosklerose. Seit 4 Jahren



Kurve 12c.

herzkrank, Anfälle von Asthma cardiale in letzter Zeit gehäuft trotz Digitalis-medikation. Cyanose; Dyspnöe; Cheyne-Stockes. Herz nach rechts und links hochgradig verbreitert. Tr. röntgenologisch 18,5 cm. Herzaktion bis auf vereinzelte Extrasystolen regelmäßig. Stauungsleber, Stauungsbronchitis, Ascites, Unterschenkelödem.

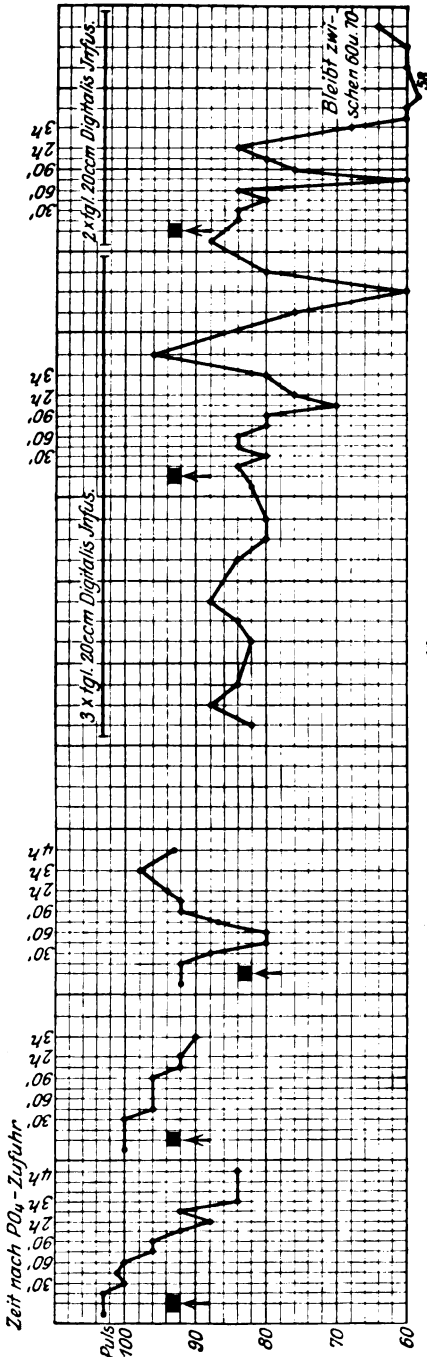


Kurve 12d.

Einige Stunden nach Eintritt in das Spital (25. VII. erhält Pat. 4 g Dinatriumphosphat intravenös.

10 Min. nach der Injektion gibt er auf Befragen an: „Ich fühle mich ein wenig besser als vorher.“

15 Min. nach Phosphatinjektion äußert er spontan: „Es ist mir wohler; ich bin munterer, ich wäre jetzt aufgelegt eine Geschichte zu erzählen; jetzt kann ich



Kurve 13.

wieder atmen, vorher war mir das Leben verleidet.“ Objektiv ist die Atemnot erheblich geringer. Der systolische und diastolische Blutdruck, fortlaufend kontrolliert, blieben unverändert. Dagegen trat in den der Injektion folgenden 4 Stunden eine deutliche allmähliche Pulsverlangsamung von 104 auf 84 Schläge pro Minute ein. Während der auf die Injektion folgenden Nacht schläft Pat. einige Stunden ruhig, was schon lange nicht mehr der Fall gewesen war. Gegen Morgen nimmt aber die Atemnot allmählich wieder zu.

Am folgenden Mittag (26. VII.) erhält er neuerdings 4 g Dinatriumphosphat intravenös.

3 Stunden nachher ist die Cheyne-Stockessche Atmung verschwunden.

4 Stunden später äußert Pat. „Mir ist kannibalisch wohl.“ Die Atmung ist tief und regelmäßig. Auch nach dieser zweiten Injektion tritt eine deutliche Pulsverlangsamung im Verlauf der folgenden 2 Stunden auf. Die Frequenz sinkt allmählich von 100 auf 90.

Der gleiche günstige Einfluß der Phosphatinjektion zeigte sich am 28. VII., als Pat. wieder mehr dyspnoisch wurde und wieder Cheyne-Stockes auftrat. Auch diesmal folgte der Injektion eine kurze Periode von Pulsverlangsamung (vergl. Kurve 13).

Vom 29. VII. bis 3. VIII. erhielt Pat. täglich 3 mal 20 ccm Digitalis-Infus. Am 2. VIII. erhielt er neben Digitalis 4 g Dinatriumphosphat intravenös ohne unmittelbare nennenswerte Wirkung. Am folgenden Tag aber sank die Pulsfrequenz, die bis jetzt unter Digitalis keine nennenswerte Tendenz zum Sinken gehabt hatte, plötzlich auf 60 p. Min. Am 4. VIII. war die Pulsfrequenz wieder etwas gestiegen. Nach erneuter Applikation von 4 g Dinatriumphosphat fiel sie aber plötzlich bis zu 58 ab. Die Pulsfrequenz blieb darauf während 14 Tagen ohne Digitalis zwischen 60 und 80 p. Min. Pat. fühlte

sich während dieser Zeit recht wohl und war tagsüber ohne Atemnot mehrere Stunden außer Bett.

Vom 20. VIII. stieg die Pulsfrequenz allmählich wieder. Pat. wurde kurzatmiger. Nachts traten wieder Anfälle von Asthma cardiale auf. Trotz Scillamedikation nahmen die Dekompensationsstörungen zu.

3. IX. wurden 100 ccm des Phosphatgemisches<sup>1)</sup> intravenös verabreicht. Unmittelbar nach der Injektion trat subjektiv und objektiv keine Änderung im Befinden ein. Während der folgenden Nacht aber blieben die Anfälle von Asthma cardiale aus. Pat. fühlte sich während 3 Wochen wieder wohl, stand täglich 7 bis 10 Stunden auf und schlief abends ruhig. Zu erwähnen ist, daß Pat. während dieser Zeit noch täglich eine kleine Dosis Scilla erhielt.

Fall 3. Frau J., 53 Jahre.

Diagnose: Myodegeneratio cordis. Herz nach rechts und links verbreitert, Vorhofflimmern. Bei früherem Spitalaufenthalt gelang es einmal, mit Chinidin die Arythmie für kurze Zeit zum Verschwinden zu bringen. Nachher und auch beim jetzigen Spitalaufenthalt trotzte die Arhythmia perpetua jeder Therapie. Pat. klagte vor der  $PO_4$ -Injektion über Engigkeit beim Liegen auf dem Rücken.

1. VIII. 1921, 12<sup>h</sup> 25' 0,5 g Chinidin p. os. 12<sup>h</sup> 50' 4 g Dinatriumphosphat intravenös. 15 Min. später äußert Pat. auf Befragen: „Es ist mir, das Herz klopfe stärker; ich kann jetzt besser atmen; ich kann jetzt gut auf dem Rücken liegen ohne eng zu bekommen. Es ist mir leichter.“

Dieses Besserbefinden gegenüber früher hielt den ganzen Nachmittag an. Die Arythmie verschwand nicht.

Weitere Chinidin- und Phosphatgaben am 2. und 3. VIII. waren ohne Wirkung auf die Arythmie.

Die Pulsfrequenz sank nach zweiter und dritter Phosphatgabe geringgradig. Blutdruck unverändert.

Fall 4: V., 61 Jahre. ♂

Diagnose: Aortitis luetica. Kompensiert, keine Beschwerden.

4 g Dinatriumphosphat intravenös führen zu keiner Änderung im Befinden.

Pulsfrequenz unverändert.

Fall 5: L., 64 Jahre. ♂

Diagnose: Insufficiencia cordis. Klagt über Engigkeit und Druck auf der Brust. Arhythmia perpetua und Asthma card. nachts.

Erhält kurz nach Spitaleintritt 4 g Dinatriumphosphat intravenös. 10 Min. nach der Injektion gibt er an: „Der Druck auf der Brust ist weg.“ Die folgende Nacht war gut. Am andern Tage fühlte sich Pat. wieder so wohl, daß er das Spital verließ.

Pulsfrequenz sank während der ersten halben Stunde nach  $PO_4$ -Applikation von 120 auf 100 und stieg später wieder auf 112 p. Min. Der Blutdruck blieb unverändert.

Fall 6: M., 19 Jahre. ♂

Diagnose: Mitralinsuffizienz. Herz nach links verbreitert. Seit 14 Tagen hatte er täglich 3 mal 20 g Digit. infus., klagte aber immer noch über Druck auf der Brust.

<sup>1)</sup>  $p_H$  ca. 7,0.

8. VIII. 1921, 11<sup>h</sup> 10—15' 4 g Dinatriumphosphat intravenös. 10 Min. später gibt Pat. an: „Ich habe keinen Druck mehr auf der Brust, kann besser atmen.“ Das Beengungsgefühl bleibt auch am folgenden Tage weg und eine weitere Injektion von 4 g Dinatriumphosphat am 9. VIII. ist ohne subjektive Wirkung.

Die Pulsfrequenz sank unmittelbar nach der ersten Injektion etwas.

Fall 7: Sch. P., 66 Jahre. ♀.

Diagnose: Herzinsuffizienz. Seit  $\frac{1}{2}$  Jahr immer Husten und Atemnot bei Anstrengungen. Seit einigen Wochen Erstickungsanfälle mit schwerem Angstgefühl.

Befund am 17. VIII. 1921: Orthopnoisch, cyanotisch, keine Ödeme. Herz: nach rechts und links verbreitert, keine Geräusche. Arythmia perpet. (E. K.) Stauungsbronchitis, Leberschwellung.

18. VIII., 6<sup>h</sup> 25' p. m. erhält Pat. 200 ccm der Phosphatmischung intravenös. Sofort nach der Injektion äußert Pat. spontan: „Jetzt ist mir viel leichter.“ Objektiv war die schwere Dyspnöe, die vor der Injektion bestanden hatte, verschwunden. Die Pat., die vorher unter ihrer Atemnot schwer zu leiden hatte, machte jetzt einen ruhigen, zufriedenen Eindruck. Die Respirationsfrequenz sank von 36 auf 28 p. Min. Die Pulsfrequenz wurde nicht beeinflusst.

1 Stunde nach der Injektion wurde Pat. plötzlich schwerer cyanotisch und dyspnoisch; der Puls war kaum fühlbar, Frequenz 200 p. Min. Der bedrohliche Zustand hielt etwa  $\frac{1}{4}$  Stunde an und besserte nach Kampher rasch.

Daß die allerdings große Dosis des Phosphatgemisches diesen Anfall verursachte, scheint nicht wahrscheinlich, vielmehr wird es sich wohl um einen Anfall von Stenocardie gehandelt haben, wie sie Pat. schon die Wochen vorher hatte. Eine nachhaltige Wirkung durch  $PO_4$  war in diesem Falle nicht festzustellen.

Fall 8: H. Th., 56 Jahre. ♂.

Diagnose: Aortitis luetica, Insufficiencia cordis. Seit 14 Jahren zunehmende Herzbeschwerden, schon öfters dekompensiert. Seit 3 Wochen schwere Atemnot.

Befund: Hochgradiger allgemeiner Hydrops, Cyanose, Dyspnöe. Herz: Nach rechts und links hochgradig verbreitert. Tr. röntgenologisch 18,0 cm. Aktion regelmäßig. Blutdruck 140 mm Hg. Stauungsbronchitis. Hydrothorax. Ascites, Leberschwellung. Wassermann: ++

20. VIII., 4 Tage nach Spitaleintritt, erhält Pat. 100 ccm der Phosphatmischung ( $p_H$  7,0) intravenös. Sofort nach der Injektion verspürte er Erleichterung im Atmen. Die Pulsfrequenz sank im Verlauf der ersten Viertelstunde nach der Injektion von 104 auf 92. Die günstige  $PO_4$ -Wirkung hielt nur wenige Tage an.

Fall 9: B. L., 73 J. ♀.

Diagnose: Dekompensierte Aorteninsuffizienz, Arthritis deformans. Seit 16 Jahren Herzbeschwerden und anfangs seltene, in letzter Zeit häufigere Anfälle von Angina pectoris.

Befund: Cyanose, Orthopnöe. Herz: Nach rechts und links verbreitert, diastolisches Geräusch über dem oberen Brustbein. Aktion regelmäßig. Leberschwellung.

Mehrmalige Injektion von 100 ccm des Phosphatgemisches ( $p_H$  7,0) an verschiedenen Tagen waren jedesmal von unmittelbar günstigem Einfluß. Pat. fühlte sich kurz nach der Injektion „viel leichter“ und „beruhigt“.

Respirations- und Pulsfrequenz sanken nach den Injektionen.

Welche Phosphatwirkungen zeigen uns diese klinischen Beobachtungen an Herzkranken?



Zunächst haben wir bei sämtlichen Kranken, die Beschwerden von seiten ihres Herzens hatten, z. B. Druck auf der Brust, Engigkeit und Dyspnöe, ein völliges Verschwinden oder erhebliches Nachlassen dieser unangenehmen Sensationen innerhalb der ersten Viertelstunde nach der Phosphatapplikation. Der Phosphatinjektion folgt während der nächsten Stunden ein Gefühl großen Wohlbehagens nach, was besonders in den Fällen 1, 2, 5 und 9 zutage trat. Das objektive Besserbefinden hielt stunden- oder tagelang an. Es ist zu vermuten, daß sich die Wirkungsdauer ausdehnen läßt bei Injektion solcher Phosphatlösungen, welche langsamer ausgeschieden werden und daher länger im Blut kursieren. Versuche mit Anwendung kolloider Phosphatlösungen sind daher von uns bereits in Aussicht genommen.

Sowohl das alkalische Dinatriumphosphat wie die neutrale Phosphatmischung zeigen den guten Einfluß auf Herzkranken, so daß spezifische  $\text{PO}_4$ -Ionwirkung anzunehmen ist.

Die erste Phosphatinjektion erwies sich am wirksamsten; am nächsten Tag oder mehrere Tage später folgende Injektionen waren oft weniger wirksam. Es scheint sich hier nicht nur um den allgemein anregenden Einfluß des Phosphates, wie ihn Embden und Mitarbeiter an Gesunden festgestellt haben, zu handeln, sondern in Analogie mit den Versuchen am insuffizienten Froschherzen um eine spezifische Wirkung auf das geschädigte menschliche Herz selbst. Dafür spricht, daß nur diejenigen Fälle günstig reagierten, die Beschwerden von seiten ihres Herzens hatten, während Fall 4, der beschwerdefrei war, oder Fälle, die bereits unter günstiger Phosphatwirkung standen, eine Phosphatwirkung vermissen ließen.

Fall 1, 2 und 8 zeigten noch besondere Wirkungen des Phosphates: Im Fall 1 trat bei Kombination von Chinidin mit Phosphat eine auffallend prompte Chinidinwirkung auf. Im Fall 2 stellte sich, nachdem einige Tage Digitalis gegeben worden war, und dann eine Phosphatgabe zugefügt wurde, eine prompte Digitaliswirkung mit rascher Pulsverlangsamung ein. Im Fall 8 kam eine günstige Wirkung bei Kombination von Scilla mit  $\text{PO}_4$  zustande, während Scilla allein ohne Einfluß gewesen war. Es hat den Anschein, wenn aus diesen drei Fällen etwas geschlossen werden darf, daß das Phosphat den Herzmitteln den Weg zu ihrer Wirkung bahnt.

Allgemein haben wir uns, sowohl bei der günstigen Wirkung des Phosphates auf das subjektive Befinden des Herzkranken, als auch bei der zuletzt angeführten therapeutisch wichtigen Feststellung, daß  $\text{PO}_4$  Herzmittelwirkungen fördert, die Wirkung des Phosphates so vorzustellen:

$\text{PO}_4$  benötigt der Herzmuskel als Betriebssubstanz, um mit Hilfe der Kohlenhydrate seine dynamischen Leistungen aufzubringen. Glucose

wird im Körper bei normaler Ernährung stets genügend zur Verfügung stehen. Vielleicht aber mangelt es absolut oder infolge verschobenen Gleichgewichtes an Phosphat. Sei es, daß der Herzmuskel, welcher beim Kompensieren z. B. von Vitien vermehrte Arbeit aufbringen sollte, größerer Mengen Phosphat bedarf, sei es, daß der Abbau der Hexosediphosphorsäure im Stoffwechsel des ernährungsgestörten oder degenerierten Herzmuskels nicht genügend rasch vor sich geht, und deshalb ein beständiger Mangel an freien Phosphorsäureionen zur Nutzbarmachung neuer Glukosemoleküle herrscht. Fügen wir dann Phosphat zu, so steht dem Herzmuskel auch für vermehrte Leistungen genügend Betriebsmaterial zur Verfügung. Er kann erhöhten Ansprüchen genügen und wird auch befähigt auf Reize, die Herzmittel auf ihn ausüben, zu reagieren.

Phosphat ist kein Herztonicum. Es regt die Herztätigkeit nicht an, sondern entfaltet seine Wirksamkeit in der Erholungsphase des Herzmuskels. Das geht besonders schön aus den Versuchen am digitalisvergifteten Froschherzen hervor. Wenn unter der Digitalisintoxikation die Diastolen immer kleiner werden, führt Phosphatzusatz zur Durchspülungsflüssigkeit wieder zu tiefen ausgiebigen Diastolen. In gleicher Weise wird die öfters am herzkranken Menschen beobachtete Pulsverlangsamung zu deuten sein.

Die Rolle der Phosphationen im intermediären Stoffwechsel ist eine eigentümliche: wir nehmen in überwiegender Menge organischen Phosphor auf, scheiden aber, und selbst bei lange dauerndem Hunger, ständig anorganische Phosphate aus. Dabei ist, im Gegensatz zu dem ein ähnliches Schicksal zeigenden Schwefel, das Phosphation, also die aus dem organischen Phosphor gebildete anorganische Form, nicht nur eine Schlacke, sondern ein grundlegender Bestandteil des Knochengewebes. Die Beziehungen der Pathologie des Phosphorstoffwechsels zum Knochenwachstum sind dementsprechend viel erörtert worden — Embdens Untersuchungen haben nun aber eine neue Beziehung, und zwar gerade der anorganischen Phosphorsäure, gezeigt, nämlich die zum Skelettmuskel, und die obigen Untersuchungen decken eine solche auch zum Herzmuskel auf. Man hat die Wirkung des wichtigsten Herzmittels der Digitalis kolloidchemisch als Quellungsphänomen zu deuten versucht, man könnte entsprechend im quellenden Phosphation den Antagonisten des entquellenden Strophanthins sehen. Einleuchtender zur Erklärung der  $PO_4$ -Wirkung ist der Hinweis auf das einwandfrei nachgewiesene und offenbar im Tier- und Pflanzenreich allgemein bedeutungsvolle Gleichgewicht: Hexosediphosphorsäure  $\rightleftharpoons$  Glukose + Phosphorsäure.

# Zur Lokalisation des Fettsäureabbaues im Organismus.

Von

**Julius Baer** (früher Straßburg i. Els.).

(Aus dem Institut für vegetative Physiologie in Frankfurt.)

(Eingegangen am 11. November 1921.)

Um die Bedeutung eines Organs für die Umwandlung chemischer Substanzen zu erkennen, stehen uns zwei Wege zur Verfügung: Die Ausschaltung des Organs aus dem im übrigen möglichst unbeschädigten Organismus und die Einwirkung isolierter Organe bei Durchblutung oder verschieden tiefgehender Zerstörung ihrer Struktur.

Bei der ersten Versuchsanordnung konnten weitgehende Schlüsse auch auf die chemischen Fähigkeiten anderer Organe gezogen werden; wir sehen z. B. durch die Leberexstirpation bei Gänsen<sup>1)</sup>, daß die Harnsäurebildung an die Funktion der Leber gebunden ist, zugleich auch, daß ohne Leber noch Milchsäure und Ammoniak entstehen, aus denen sie sich bilden könnte. Bei der Durchblutung, die ja noch den Vorgängen im lebenden Organismus am nächsten kommt, kann wohl der positive Ausfall eines Versuches beweisen; bleibt die chemische Umwandlung aus, so kann das außer an der Unfähigkeit des Organs an Mängeln der Technik im weitesten Sinne oder daran liegen, daß die Mitwirkung noch weiterer Organe nötig ist. So gelang z. B. Friedmann und Mandel<sup>2)</sup> die Harnsäurebildung in der Vogelleber bei Durchblutung aus Milchsäure und Malonsäure + Harnstoff nicht, die Wiener<sup>3)</sup> bei Einspritzung an lebenden Hühnern nachgewiesen hatte.

Embden und seine Mitarbeiter hatten Aceton- oder Acetessigsäurebildung nur in der Leber nachweisen können, bei der Durchblutung von Muskel, Niere und Lunge blieb sie aus<sup>4)</sup>, sogar aus  $\beta$ -Oxybuttersäure, dem besten Acetonbildner, entstand im Muskel keine Acetessigsäure<sup>5)</sup>. Man hat sich auf Grund dieser Versuche an die Anschauung gewöhnt, daß die Oxydation von Fettsäuren ausschließlich in der Leber stattfindet. Auf Grund der Arbeiten Embdens und seiner Mitarbeiter<sup>6)</sup> sowie Meyerhofs<sup>7)</sup> schien sich beinahe die These herauszubilden, daß die Leber das vielseitige chemische Laboratorium sei, die Muskeln und übrigen Organe ihre Arbeit im wesentlichen nur auf Kosten von Milchsäure

1) Minkowski, Arch. f. exp. Pathol. u. Therap. 21 u. 31.

2) Arch. f. exp. Pathol. u. Therap., Suppl. 1908.

3) Hofmeister, Beitr. 2.

4) Embden und Kalterlah, Hofmeister Beitr. 8, 121.

5) Embden, Salomon und Schmidt, Hofmeister Beitr. 8, 146.

6) Zeitschr. f. physiol. Chem. 93 u. 113.

7) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. S. 175, 182, 185.

und Kohlenhydraten leisten. Zwar hatten bereits Embden und Michaud<sup>1)</sup> gefunden, daß zugesetzte Acetessigsäure nicht nur in der Leber, sondern auch in Milch, Niere und Muskel bei Digestion bei 40° zersetzt wird; doch kann es nach den Versuchen von Neubauer<sup>2)</sup>, Blum<sup>3)</sup>, Friedmann<sup>4)</sup> zweifelhaft erscheinen, ob es sich da um einen Spaltungs- oder Oxydationsprozeß und nicht um Reduktion zu  $\beta$ -Oxybuttersäure handelt. Ein sicherer Oxydationsprozeß dürfte dagegen nach den Versuchen Meyerhofs die Zersetzung zugesetzter Bernsteinsäure, Fumarsäure, Citronensäure und Apfelsäure durch Muskelgewebe sein. Übrigens ließ sich auch da eine Zersetzung der  $\beta$ -Oxybuttersäure nicht nachweisen<sup>5)</sup>. Dafür, daß auch wohl im Muskel Fettsäuren zersetzt werden, sprechen nach den Erwägungen Rosenfelds<sup>6)</sup> auch die Fettanhäufungen in muskulösen Organen bei Störungen, die zur sogenannten fettigen Degeneration führen; er faßt sie, da Zuckerfütterung ausblieben, als Hinweis auf, daß bei Kohlenhydratmangel die Organe in stärkerem Maße auf Kosten des Fettes arbeiten.

Meine Fragestellung lautete: Findet nach Ausschaltung der Leber noch ein Abbau von Fettsäuren statt?

Als noch leicht zugängliches Versuchstier, bei dem die Leberexstirpation möglich ist, wählten wir den Frosch. Wichtig ist bei der Operation, daß der Haut- und Muskelschnitt möglichst klein gehalten wird; die Leberlappen werden durch leichten Druck eventriert und einzeln nahe der Wurzel nach Abbindung der Porta unterbunden und der geringe Rest Lebergewebe mit einer Pinzette ausgedrückt. Sorgfältige Bauchnaht in zwei Etagen.

Nach geläufigen Überlegungen wählte ich zu den Untersuchungen die niedrigste Fettsäure vom Typus der Stearin-Palmitinsäure, die einen Abbau oder eine Oxydation in  $\beta$ -Stellung ermöglichte, die n-Buttersäure.

### Bildung von Acetessigsäure aus Buttersäure beim Frosch.

Die nächste Frage war, ob sie auch von unserem Versuchstier, dem Frosch, in der beim Säugetier bekannten Weise zu Oxybuttersäure und Acetessigsäure oxydiert, oder ob ein anderer Abbauweg eingeschlagen wird.

Als normales Ausscheidungsprodukt ließ sich beim Frosch Acetessigsäure, d. h. Aceton nach Messinger, nicht nachweisen. An drei Tagen fand sich in dem Wasser, in dem sich 26 Frösche aufhielten, auch keine Spur Aceton. Auch als ich Fröschen Milchsäure — aus anderen Gründen — in den Lymphsack spritzte (0,4 g und NaOH neutralisiert für jeden Frosch), ließ sich in den vereinigten Flüssigkeiten von 20 großen Esculenten kein Aceton nachweisen, ebenso als 26 kleineren Temporarien je

<sup>1)</sup> Hofmeister Beitr. **11**, 332.

<sup>2)</sup> Arch. f. klin. Med. **95**, 246.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschr. **27**, 474.

<sup>4)</sup> Münch. med. Wochensch. 1910.

<sup>5)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **175**, 67.

<sup>6)</sup> Ascher-Spiro II. **1**, 74 ff.

54 mg Milchsäure eingespritzt wurden. Ein dritter Versuch mit 15 Esculenten, die je 0,4 g Milchsäure erhielten, ergab das gleiche Resultat.

Die gleichen 26 Frösche erhielten am 18. X. 1920 je 0,2 g mit NaOH neutralisierte Buttersäure in 4 ccm Wasser in den Lymphsack; sie schieden an den beiden nächsten Tagen Acetessigsäure, entsprechend  $20,7 \frac{n}{10}$ -J. Die gleichen Frösche erhielten am 2. XI. 1920 nochmals die gleiche Menge Buttersäure. Sie schieden am ersten Tage mehr Aceton, als  $2,75 \frac{n}{10}$ -J entspricht, aus<sup>1)</sup>; am zweiten Tage  $5,25 \frac{n}{10}$ -J entsprechend; am dritten Tag 0,15 ohne Jodoformtrübung, also keine Acetessigsäure mehr. In acht weiteren Versuchen, in welchen Frösche bei Zimmertemperatur 0,15–0,3 Buttersäure erhielten, fand sich keine Acetessigsäure. Eine Regelmäßigkeit ließ sich nicht feststellen; weder von der Menge der injizierten Buttersäure, noch von der Art der Frösche, noch von ihrem Zustand oder ihrer Munterkeit war die Ausscheidung der Acetessigsäure abhängig. Ein Tier schied bei Einspritzung von 0,2 g Buttersäure am 16. XII. 1920 am 17. XII. 1920,  $0,65 \frac{n}{10}$ -J entsprechend, Aceton aus, an den nächsten Tagen noch 0,325; 5 Tage später auf 0,23 Buttersäure kein Aceton. Sicher schien nur, daß bei Aufenthalt im Eisschrank keine oder nur viel weniger Acetessigsäure gebildet wurde. Auffallend war auch, daß Buttersäure in der Kälte stärker narkotisch wirkte als bei Zimmertemperatur. Die Ausscheidungszahlen beziehen sich auf  $\frac{n}{10}$ -J ccm. Ich gebe in einer Tabelle eine Anzahl Versuche wieder.

Frosch	Zimmer 20°	Eisschrank	Zimmer 20°	Eisschrank	Eingespritzt
	6. I. 0,266 g	10. I. 0,266 g	25. I. 0,266 g	7. II. 0,4 g	
I.	0,55	0,2*)	1,45	0,25**)	Ausgeschieden
II.	0,5	0,2*)	0,2*)	0,1*)	„
III.	0,4	0,15*)	0,3	0,1*)	„
IV.				0,1*)	„
V.				0,1*)	„

\*) Keine Jodoformtrübung, also keine sichere Acetonbildung.

\*\*\*) Trübung, also auch in der Kälte geringe Acetonbildung.

Als sicheres Resultat erhielten wir also, daß auch beim Frosch aus Buttersäure Acetessigsäure gebildet werden kann, wir finden aber stets nur sehr geringe Bruchteile der theoretisch möglichen Menge Acetessigsäure.

Daß zwei Frösche nach Leberexstirpation auf Buttersäurezufuhr keine Acetessigsäure ausschieden, wollen wir nur erwähnen; bei dem wechselnden Verhalten von Normalfröschen können daraus keine Schlüsse gezogen werden. Die Vermutung lag nahe, daß, wie beim Säugetier, die Acetessigsäure sehr leicht zerstörbar ist und deshalb nur in geringen Mengen oder gar nicht nach Buttersäurezufuhr in den Ausscheidungen nachgewiesen werden kann. Eine zweite Erklärungsmög-

<sup>1)</sup> Der größte Teil der Flüssigkeit ging verloren.

lichkeit wäre, daß die Buttersäure nur in geringen Mengen entweder in Acetessigsäure übergeht oder überhaupt abgebaut wird. Wir prüften zunächst die erste Frage.

### Abbau der Acetessigsäure beim normalen Frosch und nach Leberexstirpation.

Am 24. XI. Acetessigsäurelösung 4 ccm, entsprechend 124  $\frac{n}{10}$ -I, am 11. XII. 4,5 ccm, entsprechend 127  $\frac{n}{10}$ -J in den Lymphsack. Die Tiere wurden am 10. XII. operiert<sup>1)</sup>.

	26. XI.	28. XI.	27. XI.	Ausgeschieden insgesamt	12. XII.	18. XII.	14. XII.	Ausgeschieden insgesamt
III	59,3	5,2	0	64,5 ccm von 124,4	55,8	0	0	55,8 ccm von 127,0
IV	60,7	5,25	0	65,9 ccm von 124,0	41,8	20,4	0,3	62,5 ccm von 127,0

#### 15. II. Leber exstirpiert, 16. II. injiziert.

	10. II. inj.	11. II.	12. II.	18. II.	Ausgeschieden insgesamt	17. II.	18. II.	19. II.	Ausgeschieden insgesamt
IIA	65,5	6,35	0,0	0,0	71,9 ccm von 121,0	59,5	5,0	0,0	64,5 ccm von 118,0
IIIA	74,36	1,8	0,0	0,0	76,2 ccm von 121,0	72,1	0,0	—	72,1 von 118,0

Injiziert	17. IV.	18. VI.	Ausgesch. insgesamt	21. VI.	22. VI.	23. VI.	Ausgesch. insgesamt	24. VI.	25. VI.	26. VI.
1,7 ccm = 40,8 $\frac{n}{10}$ -I	5,94	0,85	6,8 ccm von 40,8	—	—	—	—	—	—	—
1,7 ccm = 40,8 $\frac{n}{10}$ -I	8,8	0,25	4,05 ccm von 40,8	—	—	—	—	—	—	—
0,86 ccm = 20,4 $\frac{n}{10}$ -I	1,1	0,0	1,1 ccm*) von 20,4	Injiziert 0,86 ccm = 20,4 $\frac{n}{10}$ -I	1,43	0,35	1,78 ccm von 20,4	Injiziert 1,7 ccm = 40,8 $\frac{n}{10}$ -I	5,2	+

\*) 20. VI. Leber exstirpiert.

Acetessigsäure wird an Fröschen in recht beträchtlicher Menge zerstört. Es scheint durchaus möglich, daß sie deshalb im Fall, daß sie langsam bei der Oxydation der Buttersäure entsteht, vollständig weiter umgewandelt wird und nicht zur Ausscheidung gelangt, wie ja auch in unseren Versuchen geringere Mengen vollständiger zerstört werden als große. Nach der Leberexstirpation wurde sie nicht schlechter verwertet als zuvor. (Wir geben hier von zahlreicheren nur einzelne Versuche wieder, in denen uns Parallelversuche am gleichen Tier gelungen waren.) Von der Körperoberfläche der Frösche wurde weder vor noch nach der Leberexstirpation Acetessigsäure deutlich resorbiert oder zerstört<sup>2)</sup>, auch blieb die Menge der Acetessigsäure unverändert, wenn sie 4 Stunden

<sup>1)</sup> Um ein Herauslaufen der Flüssigkeit aus der Operationswunde zu verhindern, wurde sie von diesem Versuche ab immer in die Rückenmuskulatur, nicht in den Lymphsack gespritzt.

<sup>2)</sup> Die geringen Differenzen fallen wohl noch innerhalb der Fehler- und Meßgrenzen, da stets die Bestimmung in  $\frac{1}{15}$  der Flüssigkeit erfolgte.

in Kaltblüter-Ringerlösung mit frischer, grob zerriebener Froschleber oder Muskeln bei Zimmertemperatur (19–20°) digeriert wurde<sup>1)</sup>.

Bei Frosch vom 14. XII. nach 24 Stunden wiedergefunden

				91,6 $\frac{n}{10}$ -J von 95,0
„	„	„	11. I.	„
				103,3 $\frac{n}{10}$ -J von 107,8
„	„	„	10. II.	„
				114,5 $\frac{n}{10}$ -J von 121,0
Gleicher	„	„	16. II.	„
				119,2 $\frac{n}{10}$ -J von 118,0

(15. II. Leber extirpiert)

Die Zerstörung der Acetessigsäure ist also jedenfalls bei den für das Leben des Frosches in Betracht kommenden Temperaturen noch ein Prozeß von einer gewissen Empfindlichkeit, der nicht bei Berührung mit der Körperoberfläche oder Zusammenbringen mit Muskel oder Leber ohne weiteres erfolgt. — Wir erwähnen noch, daß die Rückstände der Destillate von etwa zehn Acetessigsäurefröschchen bei der Verarbeitung auf Oxybuttersäure im 20 cm-Rohr keine Linksdrehung erkennen ließen.

Zwischenprodukt bei der Oxydation der Buttersäure zu Acetessigsäure beim Säugetier ist die  $\beta$ -Oxybuttersäure.

#### Findet diese Oxydation der $\beta$ -Oxybuttersäure zu Acetessigsäure beim entlebten Frosch noch statt?

Nach Einspritzung von Oxybuttersäure beim normalen Frosch erscheint bei Mengen über 0,1 g regelmäßig Acetessigsäure in der Flüssigkeit. Verwendet wurde eine 10 proz.  $\beta$ -Oxybuttersäurelösung mit NaOH neutralisiert; sie wurde intra muskulär eingespritzt.

X.		Eingespritzt	Ausgeschieden
I.	2. III.	0,5 ccm (0,05 g)	0,1 $\frac{n}{10}$ -J
II.	2. III.	1,0 ccm (0,1 g)	0,6 $\frac{n}{10}$ -J
	3. III.		0,1 $\frac{n}{10}$ -J
III.	4. III.	2 ccm (0,2 g)	0,95 $\frac{n}{10}$ -J
	5. III.		0,1 $\frac{n}{10}$ -J
IV.	1. III.	2 ccm (0,2 g)	2,5 $\frac{n}{10}$ -J
	2. III.		0,1 $\frac{n}{10}$ -J
V.	1. III.	3 ccm (0,3 g)	2,1 $\frac{n}{10}$ -J
	2. III.		0,1 $\frac{n}{10}$ -J
VI.	1. III.	4 ccm (0,4 g)	1,0 $\frac{n}{10}$ -J
	2. III.		0,8 $\frac{n}{10}$ -J
VII.	1. III.	4 ccm in die Außenflüssigkeit	0,15 $\frac{n}{10}$ -J (Keine Trübg.)

<sup>1)</sup> Wir verzichten auf die Wiedergabe der Versuche; erwähnt sei nur, daß in vier Versuchen 0,5–0,82 g Leber mit 27–29  $\frac{n}{10}$ -I Acetessigsäure und Ringerlösung auf 60 ccm aufgefüllt wurden, die Muskelmenge betrug je 5–6 g.

Frosch II am	7. III.	Leber exstirpiert.	
	8. III.	2 ccm (0,2 g)	0,3 $\frac{n}{10}$ -J (Trübung)
	9. III.		0,1 $\frac{n}{10}$ -J
VIII.	7. III.	Leber exstirpiert	
	9. III.	2 ccm (0,2 g)	1,1 $\frac{n}{10}$ -J
	10. III.		0,1 $\frac{n}{10}$ -J
	11. III.	2 ccm (0,2 g)	0,25 $\frac{n}{10}$ -J (Trübung)
	12. III.	Frosch bewegungslos, Herz schlägt noch	
IX.	14. III.	Leber exstirpiert	
	15. III.	2 ccm (0,2 g)	0,25 $\frac{n}{10}$ -J (Trübung)
	Am 16. III.	früh Frosch tot	
X.	14. III.	Leber exstirpiert	
	15. III.	2 ccm (0,2 g)	0,45 $\frac{n}{10}$ -J (früh tot)

Es fand sich bei allen Fröschen kein oder nur geringer unterbundener und erweichter Leberrest. Wir hatten während dieser Zeit nur sehr hinfällige Frösche, so daß es nur einmal gelang, Versuche mit und ohne Leber am gleichen Tier auszuführen.

Es ist also der Frosch auch noch ohne Leber imstande,  $\beta$ -Oxybuttersäure zu Acetessigsäure zu oxydieren und diese, wie wir in der vorigen Versuchsserie gesehen haben, weiter zu verändern.

#### Verbrennung der Buttersäure beim entlebten Frosch.

Wie wir schon oben erwähnten, kann aus dem Ausbleiben der Acetessigsäureausscheidung bei entlebten Fröschen, da sie auch bei normalen Tieren häufig nach Buttersäurezufuhr ausbleibt, nicht geschlossen werden, daß kein Abbau der Buttersäure mehr stattfindet. Die leicht zersetzliche Acetessigsäure könnte zu schnell verschwinden; der Abbau könnte aber auch auf anderem Wege stattfinden. Auf die Untersuchung der zweiten Möglichkeit verzichtete ich zunächst und suchte zu bestimmen, wieviel von eingespritzter Buttersäure beim normalen und entlebten Frosch verschwindet oder zur Ausscheidung gelangt. Als Methode erwies sich die Oxydation der Buttersäure mit Chromsäure und Schwefelsäure brauchbar, die ich mir im Anschluß an Bangs<sup>1)</sup> Fettbestimmungsmethode im Blut zu diesem Zweck ausarbeitete.

Die Flüssigkeit von 24 Stunden im Froschglas (meist 100 ccm) wird mit 4 ccm  $\frac{n}{10}$ -Na OH versetzt und auf dem Wasserbad eingedampft. Der Rückstand wird mit 5 ccm Wasser aufgenommen und in einem Meßkölbchen mit 92 proz. Alkohol auf 50 ccm gebracht. Je nach dem Gehalt an Buttersäure werden 1,0 oder 4,0 ccm nach 24 Stunden vom Bodensatz in gezeichnete Reagensgläser abpipettiert (ich nahm immer drei Proben) und im Dampfbad, dann im Trockenschrank bei 110° bis 120° eine Stunde getrocknet. Der Rückstand wird mit 0,5 ccm gesättigter  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Lösung mit 20% konzentrierter Schwefelsäure versetzt, 3 ccm Benzol (über Natronlauge destilliert) hinzugefügt, 100 mal energisch hin und her geschwenkt. Die Natriumsulfatlösung setzt sich schnell klar ab und adhärirt dem Glas, so daß das Benzol leicht in ein zweites gezeichnetes Reagensglas abgegossen werden kann. Es wird darin 30 mal mit 1,0 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH geschwenkt, das Benzol

<sup>1)</sup> Mikromethoden zur Blutuntersuchung. 1920.



im Dampfbad verjagt; der Natriumsulfatrückstand wird dann nochmals in gleicher Weise behandelt. Nach Verjagen des Benzols im Dampfbad kommen die Gläser wieder für 3 Stunden in den Trockenschrank; sie müssen dort auf Asbest stehen. Der Rückstand wird mit 2,0 oder 4,0 ccm  $\frac{n}{10}$ -Chromsäurelösung und 7,5 ccm chemisch reiner konzentrierter Schwefelsäure versetzt, bleibt 24 Stunden<sup>1)</sup> stehen, wird dann mit 100 ccm Wasser übergespült, mit 0,5 oder 1,0 ccm 5proz. KJ-Lösung versetzt und nach 1 Minute das freie Jod mit  $\frac{n}{10}$ -Thiosulfat zurücktitriert. — Natürlich müssen die Reagentgläser sorgfältig mit Bichromat-Schwefelsäure gereinigt sein. Von Zeit zu Zeit, selbstverständlich bei Benutzung neuer Schwefelsäure, ist der Titer in den jeweils benutzten Zusammensetzungen des Oxydationsgemisches mit dem Thiosulfat neu zu stellen. Es empfiehlt sich nicht, wenn sonst im Laboratorium mit differenten Substanzen gearbeitet wird, die Gläser mit der Oxydationsmischung dort stehen zu lassen; mir färbten sie sich dann mehrmals von der Oberfläche her einige Millimeter blaugrün.

Ich lasse als Beispiel folgen, wie ich vorgeh. 2,0  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure + 7,5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zurücktitriert 1,78  $\frac{n}{10}$ -Thiosulfat. 1 ccm (=  $\frac{1}{2}$  mg Buttersäure + 2,0  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure + 7,5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zurücktitriert 0,91  $\frac{n}{10}$ -Thiosulfat.  $\frac{1}{2}$  mg Buttersäure = 1,09 — 0,22 = 0,87  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure. (Für mehr als 1 ccm Flüssigkeit reicht die Schwefelsäure nicht mehr zur Verbrennung; wir benutzten darum zur weiteren Titerstellung stärkere Buttersäurelösung.)

0,05 (= 1 mg Buttersäure = 1,73  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure

0,1 (= 2 mg Buttersäure) = 3,52  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure

1,0 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH + 4 ccm Benzol = 0,38  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure

1,0 ccm  $\frac{n}{10}$ NaOH + 7 ccm Benzol = 0,36  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure.

Normale Froschflüssigkeit in der oben angegebenen Weise verarbeitet:

I  $\frac{4}{50}$  = 0,43  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure

II  $\frac{4}{50}$  = 0,44

Desgl. + 0,02 g Buttersäure  $\frac{4}{50}$  = 2,5  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure.

Das ergibt für 0,0016 g Buttersäure einen Verbrauch von 2,06  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure statt dem aus den oben angegebenen Zahlen berechneten Wert von 2,82  $\frac{n}{10}$  oder dem für 0,08 ccm (0,0016 g) nochmals direkt bestimmten Wert von 2,91  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure. Da in zahlreichen Kontrollbestimmungen dieses Verhältnis konstant blieb und uns eine brauchbarere Methode nicht zur Verfügung stand, mußten wir mit dieser relativen Methode, die für unsere Zwecke vollständig ausreichte, arbeiten. Übrigens entspricht auch der Chromsäureverbrauch für reine Buttersäure<sup>2)</sup> nicht der vollständigen Oxydation zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O. (Für 1 mg Buttersäure 1,73  $\frac{n}{10}$  statt 2,27  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure.)

Bei normalen Tieren fanden sich bei der angegebenen Methode meist nur Spuren von Chromsäure reduzierender Substanz, wie oben etwa 0,06 ccm  $\frac{n}{10}$  entsprechend im Durchschnitt mehr als in blinden Versuchen. Wir verarbeiteten weiter die Flüssigkeiten von je zwei Tagen, dem 7. und 8. V., sowie dem 9. und 10. V. 1921 von drei Tieren und erhielten von je dem gleichen Tier 0,00 und 0,03, 0,00 und 0,01, von einem dritten aber 0,28 und 0,09. Es scheinen also ausnahmsweise auch höhere Normalwerte an Substanzen vorzukommen, die aus saurer Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung in Benzol übergehen.

<sup>1)</sup> Nach 2—3 Stunden sind die Werte bis zu 12% niedriger.

<sup>2)</sup> Präparat Kahlbaum, nach Verdünnung mit Phenolphthalein titriert.

Ausgehungerten Temporarien wird eine Buttersäurelösung intramuskulär eingespritzt. Die in der Tabelle angegebenen Zahlen  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure beziehen sich stets auf  $\frac{4}{50}$  der Gesamtflüssigkeit von einem Tage (oder, wo angegeben, 2 Tagen) und sind berechnet, falls wegen zu hoher Konzentration an Buttersäure weniger Kubikzentimeter (1 oder 2) zur Bestimmung genommen wurden. Auch bei der eingespritzten Menge ist der Wert in  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure angegeben, den wir erhalten hätten, wenn die Buttersäure mit Froschwasser in der angegebenen Weise verarbeitet worden und  $\frac{4}{50}$  der alkoholischen Lösung zur Bestimmung genommen worden wären. Die Differenz zwischen dieser Zahl und den gefundenen Werten läßt den Bruchteil und die Menge Buttersäure berechnen, die im Organismus verschwunden sind.

Von einer Berechnung und Angabe der absoluten Werte sah ich ab, da durch diese Zahlen die Fehlergrenzen der Methode verschleiert worden wären. Kontrollbestimmungen stimmten meist bis auf weniger als 0,06 ccm überein, sehr selten betrug bei buttersäurereichen Bestimmungen die Differenzen bis 0,15 (etwa 5%); gelegentlich fiel bei 9—18 Bestimmungen, die meist auf einmal ausgeführt wurden, eine aus der Reihe. Dafür waren außer den oben angegebenen Fehlerquellen besonders feine Sprünge im Boden der häufiger getrockneten Reagensgläser verantwortlich.

	Injiziert	Ausgeschied.	Injiziert	Ausgeschied.	Injiziert	Ausgeschied.	Injiziert	Ausgeschied.
I.	11. V. 1,0 = 0,02 Butter- säure = 2,1 $\frac{n}{10}$ -Chrom- säure	11.u.12. V. 18.u.14. V. 0,15 0,086	24. V. 2,0 = 0,04 Butter- säure = 4,1 $\frac{n}{10}$ -Chrom- säure	24.u.25. V. 26.u.27. V. 0,20 0,08	2. VI. 0,5 = 0,08 Butter- säure = 8,8 $\frac{n}{10}$ -Chrom- säure	2. u. 3. VI. 4. u. 5. VI. 1,07 0,11	8. VI. 1,0 = 0,16 Butter- säure = 16,8 $\frac{n}{10}$ -Chrom- säure	8. u. 9. VI. 10. u. 11. VI. 4,4 0,24
II.	11. V. 1,0 = 0,02 Butter- säure = 2,1 $\frac{n}{10}$ -Chrom- säure	11.u.12. V. 18.u.14. V. 0,15 0,10	24. V. 2,0 = 0,04 Butter- säure = 4,1 $\frac{n}{10}$ -Chrom- säure	24.u.25. V. 26.u.27. V. 0,90 0,02	2. VI. 0,5 = 0,08 Butter- säure = 8,8 $\frac{n}{10}$ -Chrom- säure	2. u. 3. VI. 4. u. 5. VI. 2,47 0,25	8. VI. 1,0 = 0,16 Butter- säure = 16,8 $\frac{n}{10}$ -Chrom- säure	8. u. 9. VI. 10. u. 11. VI. 4,4 0,32 12. V. tot
III.	11. V. in die Außen- flüssig- keit (150 ccm Wasser) 0,02 Butter- säure = 2,1 $\frac{n}{10}$ -Chrom- säure	11.u.12. V. 18.u.14. V. 0,09 0,07	In der Außen- flüssig- keit (150 ccm Wasser) 0,04 Butter- säure = 4,1 $\frac{n}{10}$ -Chrom- säure	24.u.25. V. 26.u.27. V. 1,84 0,02	In der Außen- flüssig- keit (150 ccm Wasser) 0,08 Butter- säure = 8,8 $\frac{n}{10}$ -Chrom- säure	2. u. 3. VI. 4. u. 5. VI. 5,40 0,08	In der Außen- flüssig- keit (150 ccm Wasser) 0,16 Butter- säure = 16,8 $\frac{n}{10}$ -Chrom- säure	8. u. 9. VI. 10. u. 11. VI. 10,9 0,4

Geringe Mengen eingespritzte Buttersäure verschwinden also fast vollständig im Froschorganismus; wie wir später sehen werden, ist die Ausscheidung des nicht verbrennbaren Überschusses meist schon am ersten Tage beendet. Bei größeren Mengen Buttersäure nimmt der Bruchteil der wieder ausgeschiedenen Säure stark zu, während absolut eine sehr viel größere Menge verschwindet. — Sehr auffällig ist das Verschwinden der Buttersäure aus der Außenflüssigkeit. Es dürfte sich um eine Resorption, nicht etwa um bakterielle Zersetzung handeln, da die Buttersäure überhaupt recht resistent ist, auch nicht abnahm,

wenn wir einen abgetöteten Frosch in die buttersäurehaltige Außenflüssigkeit brachten (siehe auch die späteren Versuche).

Frosch vom 10. VIII. 1921 bei der Leberextirpation gestorben, Bauchwunde wieder sorgfältig vernäht. — Dem Frosch vom 31. VIII. war 0,01 Cyankali in 0,2 Wasser eingespritzt worden, nach 1½ Stunden war er tot.

10. VIII. In die Außenflüssigkeit 0,25 Lös. von butters. Na = 3,16  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure

11. VIII. Wiedergefunden 3,16  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure

31. VIII. In die Außenflüssigkeit 0,125 Lös. von butters. Na = 1,58  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure

1. IX. Wiedergefunden 1,48  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure

Erwähnen müssen wir hier zunächst, daß bei entleberten Fröschen am Tage des Todes die Chromsäure reduzierende Substanz fast regelmäßig vermehrt ist, im übrigen auch äußerlich der beim Abdampfen des Alkohols bleibende Rückstand. Es ist für die Bewertung von Versuchen wichtig, in denen der Frosch am Nachttag starb. Ein großer Teil unserer Versuche konnte deshalb nicht verwertet werden. Wir erhielten bei drei entleberten Fröschen am letzten Tag ohne vorhergehende Einspritzung die Werte 0,50, 0,56 und 0,88  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure.

Frosch I. 6. IX. 0,375 Lösung von butters. Na = 4,74  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure intra-  
7. IX. Ausgeschieden 0,51  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure muskulär  
8. IX. Ausgeschieden 0,0  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure  
16. IX. Leber extirpiert.  
17. IX. Gleiche Einspritzung = 4,74  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure  
18. IX. (Munter) Ausgeschieden 0,38  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure.  
19. IX. (Munter) Ausgeschieden 0,0  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure.  
Abends tot.

Frosch II. 6. IX. 0,375 Lösung von butters. Na = 4,74  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure intra-  
7. IX. Ausgeschieden 0,97  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure. muskulär.  
8. IX. Ausgeschieden 0,00  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure.  
16. IX. Leber extirpiert, 17. IX. gleiche Einspritzung =  
18. IX. Ausgeschieden 1,66  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure. 4,74  $\frac{n}{10}$ -Chroms.  
19. IX. Ausgeschieden 0,02  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure.  
Eingespritzt 0,25 Lösung von butters. Na = 3,16  $\frac{n}{10}$ -Chrom  
20. IX. Ausgeschieden 1,14  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure. säure.  
21. IX. Ausgeschieden 0,02  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure.  
27. IX. Gestorben, nachdem er etwas geblutet hatte, kein Ödem in  
der Bauchhöhle, minimaler, zerfallener, unterbundener  
Leberrest.

Frosch III. 6. IX. 0,25 Lösung von butters. Na = 3,16  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure intra-  
7. IX. Ausgeschieden 0,05  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure. muskulär.  
8. IX. Ausgeschieden 0,00  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure.  
16. IX. Leber extirpiert, 17. IX. gleiche Einspritzung =  
3,16  $\frac{n}{12}$ -Chromsäure.  
18. IX. Ausgeschieden 0,00  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure.  
19. IX. Ausgeschieden 0,00  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure.  
19. IX. Gleiche Einspritzung = 3,16  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure.  
20. IX. Ausgeschieden 0,70  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure.  
21. IX. Ausgeschieden 0,12  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure.  
27. IX. abends tot, unter Streckkrampf gestorben. Unterbundener,  
zerfallener, halberbsengroßer Leberrest.

Es verschwindet auch beim Frosch nach Entfernung der Leber noch eingespritzte Buttersäure, anscheinend wohl in etwas geringerem Maß als beim normalen Tier<sup>1)</sup>. Da am Nachtag die Chromsäurereduktion wieder auf normale Werte sinkt, bei späteren Einspritzungen (20. IX.) mehr von der Substanz wieder erscheint als in den ersten Versuchen, kann es sich nicht etwa um eine Erschwerung der Ausscheidung handeln, sondern die Buttersäure muß auch beim entlebten Frosch weitere Veränderungen erlitten haben, die also in anderen Organen als in der Leber vor sich gehen. — Bei Versuchen, die wir weiter unternahmen, um zu untersuchen, ob nach Leberexstirpation auch die Resorption von Buttersäure durch die Haut aufgehoben ist, ergaben sich ziemlich verwickelte Verhältnisse. Bei geringen Buttersäurekonzentrationen resorbiert der Frosch, der einmal in Lösung von buttersaurem Natron saß, kaum mehr nennenswerte Mengen Säure aus der Außenflüssigkeit, wohl aber bei stärkeren Konzentrationen, wie in unserem ersten Versuch, mit Buttersäure (S. 282). — Wir durften also, um den Einfluß der Leberexstirpation auf diese Hautfunktion zu prüfen, nicht Frösche zum zweiten Mal in Lösung von buttersaurem Na setzen.

Die gleichen Tiere erhielten am 23. VIII. und 31. VIII. buttersaures Natron entsprechend 1,58  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure in 100 ccm Außenflüssigkeit.

	23. VIII.	31. VIII.
1. Rest	0,17	1,48
2. „	1,15	1,44
3. „	0,55	1,20

Nach der Leberexstirpation findet bei geringen Buttersäurekonzentrationen keine oder nur noch sehr geringe Resorption von Säure aus der Außenflüssigkeit statt, bei stärkeren Konzentrationen, wir haben allerdings nur einen brauchbaren Versuch, scheint wohl beträchtliche Resorption möglich zu sein. (Weitere Untersuchungen über diese Vorgänge sind im Gange.)

Über den Zusammenhang dieser Funktionsänderung mit der Leberexstirpation möchte ich hier keine Deutungsversuche machen.

13. IX. Leber exstirpiert. In 100 ccm Außenflüssigkeit am 14. IX. buttersaures Natron entsprechend 1,58  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure.

- I. 15. IX. Rest 1,32.  
 16. IX. Ausgeschieden 0,00 — Injiziert buttersaures Natron = 3,16  $\frac{n}{10}$ -Chromsäure intramuskulär.  
 17. IX. Ausgeschieden 0,24.  
 18. IX. Ausgeschieden 0,00.  
 19. IX. Munter.

<sup>1)</sup> Siehe auch die späteren Versuche.

- II. 15. IX. Rest 1,46.  
 16. IX. Ausgeschieden 0,00 — Injiziert buttersaures Na = 3,16  $^{n}/_{10}$ -Chromsäure intramuskulär.  
 17. IX. Ausgeschieden 0,12.  
 18. IX. Ausgeschieden 0,15.  
 Tot.  
 10. VIII. Leber exstirpiert, 11. VIII. buttersaures Natron = 3,16  $^{n}/_{10}$ -Chromsäure in der Außenflüssigkeit.  
 12. VIII. Rest 2,82.  
 13. VIII. Ausgeschieden 0,24.  
 Tot.  
 24. VI. Leber exstirpiert, 25. VI. buttersaures Natron = 8,3  $^{n}/_{10}$ -Chromsäure in 100 ccm Außenflüssigkeit.  
 26. VI. Rest 4,36.  
 27. VI. Rest 0,44.  
 28. VI. Ausgeschieden 0,66.  
 28. VI. Tot.

### Zusammenfassung.

1. Auch beim Frosch, der normalerweise kein Aceton ausscheidet, wird Buttersäure zu Acetessigsäure oxydiert.

2. Acetessigsäure wird von normalen und entlebten Fröschen in recht großen Mengen zerstört.

3. Oxybuttersäure wird vom normalen und entlebten Frosch in Acetessigsäure umgewandelt.

4. Buttersäure wird vom normalen und auch noch vom entlebten Frosch in beträchtlicher Menge zerstört oder umgewandelt.

5. Während eine Zerstörung oder Resorption von Acetessigsäure oder Oxydation von Oxybuttersäure zu Acetessigsäure an der Haut des Frosches nicht nachweisbar ist, findet anscheinend eine Resorption von Buttersäure durch die Haut statt, die beim entlebten Frosch, aber auch unter anderen Bedingungen, gestört ist.

6. Einer Übertragung der Versuchsergebnisse auf das Säugetier können natürlich Einwendungen gemacht werden, die Ergebnisse gelten zunächst nur für den Frosch.

# Die Ausfärbung der Puppenkokone gewisser Schmetterlinge (Eriogaster, Saturnia) eine typische Dopareaktion.

Von

**Hans Przibram**

(Leiter der biologischen Versuchsanstalt d. Ak. d. Wiss. in Wien).

(Eingegangen am 12. November 1921.)

In Hofmeisters Laboratorium zu Straßburg habe ich eine Anregung Fürths, seines damaligen Assistenten, erhalten, die Entstehung der Sepia im Tintenbeutel der Cephalopoden auf enzymatische Umsetzung von Tyrosin hin zu untersuchen. Tatsächlich konnte ich bald nach Straßburg melden, daß mir gelegentlich eines Aufenthaltes an der zoologischen Station in Triest die Extraktion einer Tyrosinase aus dem zerkleinerten, gut ausgewaschenen Tintenbeutel von *Sepia officinalis* gelungen war, welche in Tyrosin eine schön kirschrote Vorstufe des später violetten und endlich tief schwarz sich absetzenden Melanins hervorrief. Im Laufe der Jahre hat es sich dann gezeigt, daß eine ganze Reihe von Tönen des tierischen Farbkleides ebenfalls auf die Oxydation von Tyrosin durch eine Tyrosinase zurückzuführen ist, wobei die Farb-anpassung gewisser Tagfalterpuppen besonderes Interesse bot. In einer Reihe von Veröffentlichungen haben Frl. Dr. Leonore Brecher und ich den Beziehungen zwischen der Beleuchtung und der Farbmodifikation solcher Puppen und anderer stark variabler Tiere nachzugehen versucht. Wir fanden die Tyrosinase im Blute solcher Formen lichtempfindlich, ähnlich wie es Wo. Ostwald für andere Fermente bereits beschrieben hatte. Zu den stark variierenden Färbungen gehören auch jene der Kokone von Nachtschmetterlingen, wie *Eriogaster lanestris*, Wollfalter, und *Saturnia pavonia*, kleines Nachtpfauenauge. Es lag nahe, die von mehreren früheren Autoren beschriebene Anpassung dieser Kokonfarbe an die Untergrundfarbe nun ebenfalls auf eine Wirkung lichtempfindlicher Tyrosinase zurückzuführen. Demgegenüber stießen wir jedoch auf die bündigen Angaben Batesons für *Eriogaster* über die Unabhängigkeit der Farbmodifikationen dieser Kokone von der Umgebungsfarbe und die weitergehenden Versuche von Julius Dewitz (5, 366, 1921 mit früherer Literatur), welcher in mehreren Abhandlungen als allein wirksamen Faktor die Feuchtigkeit hinstellte. Nach seinen an Erio-

gaster, Saturnia und anderen Nachtfaltern wiederholt angestellten und vielfach variierten Versuchen spinnen die Raupen bei großer Trockenheit ganz helle, bei großer Feuchtigkeit ganz dunkle Kokone. Der helle Kokon läßt sich auch nachträglich durch Einlegen in Wasser dunkel färben. Ich habe diese Versuche mehrere Jahre nachgeprüft und zwar an den beiden genannten Gattungen von Schmetterlingen (sowie an zwei Blattwespengattungen, über welche spätere Publikation erfolgt), und fand die genannten Angaben Dewitzs auf das schlagendste bestätigt. Es zeigte sich nicht der geringste Einfluß farbiger Umgebung, als welche die bei den modifizierbaren Tagfalterpuppen so wirksamen mit gelbem, weißem, grauem, schwarzem Papier oder Stoff ausgekleideten Kästchen dienten. Hingegen trat prompt eine Dunkelfärbung der Kokone ein, gleichgültig, welcher Art oder welcher Beleuchtung sie zugehörten, sobald die Kokone auf feuchtes Flußblatt oder in Wasserschälchen gelegt wurden. In seinen neuesten Publikationen sucht nun Dewitz die Ausfärbung der Kokone durch Feuchtigkeit mit der Einwirkung von Tyrosinase auf ein Chromogen zu erklären, welche durch das rasche Austrocknen des Gespinstes in der Trockenheit verhindert wird, hingegen durch das Befeuchten in Gang gebracht werden kann. Auf Grund dieser Hypothese forschte er dann weiter nach dem Orte im Raupenkörper, der das notwendige Chromogen und Ferment für die Gespinstmasse liefern könnte, und findet beide in den Spinndrüsen vor, da diese zerschnitten im destillierten Wasser sich schwärzten. Hingegen erhielt Dewitz 1919 aus Malpighischen Gefäßen (und Darm) durch Zusatz von Tyrosin Schwärzung, die er im gleichen Versuche 1918 vermißt hatte. Da eine Reinigung innerer Organe von der sicher Tyrosinase (und Tyrosin) enthaltenden Blutflüssigkeit kaum durchführbar und jedenfalls nicht immer von Dewitz durch bloßes Auswaschen erreicht sein dürfte, so schien es mir der Mühe wert, nachzusehen, ob in den noch nicht dunkel verfärbten Kokonen, denen kein flüssiges Blut anhaftet, sich ein bestimmtes Chromogen und ein spezifisches Ferment nachweisen ließen. Wenn überhaupt ein organisches Enzym bei der Dunkelfärbung eine Rolle spielt, so müßte Erwärmung der Kokone auf einen das Ferment schädigenden, „abtötenden“ Grad eine nachfolgende Verdunkelung durch Feuchte verhindern. Nach unseren bisherigen Erfahrungen wirkt eine Erhitzung des Tyrosinase in ihrer Lösung von 90° durch 5 Minuten auf diese so stark vernichtend ein, daß sie auf Tyrosin kaum mehr eine Wirkung ausübt, höchstens eine schwachrosa Tingierung nach längerer Zeit hervorruft. Nach Dewitz (1911, Congrès, S. 134) bleibt nach Eintauchen des Saturniakokons in kochendes Wasser jede Verfärbung aus; er hält selbst den Schluß auf Zerstörung eines Enzymes nicht für eindeutig, da die Kokonmasse sich zu lösen beginnt. Ich habe nun Kokone der bezeichneten Arten

in einer Eprouvette auf dem Wasserbade dieser Prozedur unterworfen, da jedoch Feuchte vermieden werden mußte, in trockenem Zustande. Die Erhitzung ruft keine wesentliche Farbveränderung hervor (bei Blattwespen tritt ein etwas rötlicher Stich auf). Legt man aber die wieder abgekühlten Kokone in Wasser, so tritt nun ebenso und in derselben Zeit die Dunkelfärbung auf, wie an den nicht mit Hitze vorbehandelten Kokonen. Wenn eine Fermentwirkung im Spiele ist, muß es sich also um einen gegen  $90^\circ$  unempfindlichen Zustand des Enzymes handeln. Man könnte daran denken, daß gerade die Trockenheit einen Schutz gegen die Hitzeschädigung des Fermentes abgebe, wie sie den Eiweißkörper einer solchen gegen Koagulation und Tod bietet, was für Peroxydasen, wie mir Fürth mitteilt, tatsächlich beschrieben worden ist.

Ich habe Puppen von *Saturnia pavonia* einer möglichsten Austrocknung auf dem  $90^\circ$ gradigen Wasserbade und andererseits im Exsiccator bei normaler Temperatur unterzogen. In Tyrosin eingebracht, entfaltete die in die Hälfte geschnittene Puppe aus dem Exsiccator eine starke schwärzende Wirkung, die erhitzte brachte kaum einen rosa Stich hervor. In der bei  $90^\circ$  ausgetrockneten Puppe ist also die Tyrosinaseabschwächung sehr deutlich, im Gegensatz zum Fehlen eines Unterschiedes beim  $90^\circ$  erhitzten Kokon. Die Austrocknung der Puppen ist jedoch nach diesem Verfahren keine vollständige. Ich habe mich durch Versuche mit getrocknetem Hallimasch überzeugt, daß tatsächlich ein hoher Grad, aber keine vollständige Immunität der Tyrosinase gegen Erwärmung durch die Trockenheit hervorgerufen wird. Wäre im Kokon eine genügend starke Tyrosinase vorhanden, so sollte sie auf eine Tyrosinlösung färbend einwirken. Um dies zu prüfen, wurden zwei Wege eingeschlagen. Es wurden ganze helle Kokone oder entzweigeschnittene, aber nicht weiter zerkleinerte, von allen den behandelten Arten in Eprouvetten mit destilliertem Wasser, Tyrosin oder n-Natronlauge eingetragen, so daß der Flüssigkeitsstand den obersten Rand der Kokone noch bedeckte. Oder es wurden Kokone fein zerschnitten, in der Porzellanreibschale mit dem Stößel möglichst pulverisiert, dann gleiche Pulvermengen in gehärtete Filter eingeschlossen, diese zusammengerollt in Eprouvetten mit denselben Flüssigkeiten eingesenkt, so daß sie mit der Pulvermasse eintauchten. Ohne Ausnahme färbten sich die Flüssigkeiten in der Natronlauge zuerst, dann im Wasser und erst zuletzt im Tyrosin. Man könnte nun gegen den Schluß, es sei keine zur Schwärzung genügend starke Tyrosinase in den Kokons vorhanden, einwenden, daß sie eben nur zur Ausfärbung der Kokonchromogenes, nicht aber von anderen Chromogen ausreiche. Aber in derselben Reihenfolge trat auch die Verfärbung an den Kokons selbst auf, wenngleich nicht so ausgesprochen, was, wie wir sehen werden, dem Vorhandensein einer schwachen Tyrosinase entspricht. Analoge Versuchsreihen mit



den auf 90° erhitzten Kokonen und Kokonpulvern lieferten genau das gleiche Resultat. Welches ist aber das Chromogen, das auch ohne Tyrosinase angehen kann? Diese Frage läßt sich nicht so leicht beantworten, wohl aber die, ob Tyrosin bei der Dunkelfärbung der Kokone die Hauptmasse des Chromogens ausmache. Dazu verhilft uns der stark färberische Erfolg der Natronlauge, den auch Dewitz (1911, S. 627) beschrieben hat. Auf Tyrosin = Oxyphenylalanin übt der Zusatz von Alkali an sich keine färbende Wirkung aus, wohl aber auf das durch Blochs Arbeiten bekannt gewordene 3,4-Dioxyphenylalanin, das wir kurzweg nach seiner Bezeichnung „Dopa“ nennen können. Die Dopa nimmt auch ohne Anwesenheit von Ferment oder mit schwacher Tyrosinase bei Zusatz von Natronlauge zu ihrer Lösung sogleich dunklere, in verschiedenen Tönen variierende Färbung an, und es konnte daher nicht unwahrscheinlich sein, daß der Farbstoff der Kokone aus dem Dopachromogene ohne Fermenteinwirkung zustande kommen könne. Das Chromogen wird durch 5 Minuten lange Erhitzung auf 90° nicht wesentlich verändert, daher der gleiche Ausfall aller Versuche, ob mit oder ohne Erhitzung. Wir haben in den schon beschriebenen Experimenten noch einen weiteren Anhaltspunkt für die Identifizierung des Kokonchromogenes mit Dopa. Es ist dies die von Tyrosin gegenüber destilliertem Wasser auf die Ausfärbung ausgeübte Hemmnis. Tyrosin übt nämlich eine schwache Reduktionswirkung aus, wie eine schwache Säure. Es zeigt sich nun bei Aufstellung einer Reihe, die mit  $\frac{1}{40}$  Salzsäure beginnt und über destilliertes Wasser bis  $\frac{1}{40}$  Natronlauge führt, daß der Zusatz von je zwei Tropfen dieser Flüssigkeiten zu 1 ccm einer mit gesättigter Tyrosinlösung äquimolekularen, 0,00045% Dopalösung, in den Säuregraden  $\frac{1}{40}$ ,  $\frac{1}{80}$ ,  $\frac{1}{160}$  gar keine Färbung, in destilliertem Wasser eine schwache, mit  $\frac{1}{160}$ ,  $\frac{1}{80}$ ,  $\frac{1}{40}$  ansteigende Dunkelfärbung gibt. Tyrosin reiht sich zwischen  $\frac{1}{160}$  HCl und  $H_2O$  ein, seiner schwach sauren Wirkung entsprechend. Meine bisher vorgebrachten Argumente machen es aber noch nicht möglich, das Chromogen wirklich als Dopa zu identifizieren. Wir können aber weiter jene Reaktionen zu Hilfe ziehen, welche das Vorhandensein einer zweiwertigen Phenolverbindung mit Orthostellung der beiden Hydroxyle geben, denn zu dieser Gruppe gehört ja auch das 3,4-Dioxyphenylalanin.

Von diesen Reaktionen habe ich die beiden schlagendsten an den genannten Kokonarten durchprobiert und bestätigt gefunden. Bringt man Stücke der Kokone in eine sehr verdünnte Eisenchloridlösung, so tritt eine grüne Farbe auf, die, im Falle sie nicht gleich intensiv ist, bei Zusatz von einer Spur Essigsäure in ein tiefes smaragdgrün übergeht. Diese grüne Lösung schlägt bei tropfenweisem Zusatz gesättigten Natriumcarbonates in eine hochrote Farbe um, welche sich bis zu einem Kardinalviolett verändert. Werden die Kokone in eine, falls nötig durch

Zusatz weniger Tropfen verdünntes Ammoniak gelblich gefärbte, 2 proz. Silbernitratlösung eingebracht, so tritt rasch eine Schwärzung auf, die bald zur Tintenschwärze sich steigert (und aus dem reduzierten Silber besteht), wie ebenfalls schon Dewitz (1911, S. 626) berichtete. So unzweideutig diese Reaktionen sind, ist mit deren positiven Ausfalle doch unsere Frage noch nicht entschieden, weil auch alle übrigen Orthodioxypheyle, z. B. Brenzkatechin, dasselbe Resultat liefern würden. Wir brauchen noch eine Eigenschaft, welche das Dioxypheylalanin vor den übrigen Orthodioxypheolen auszeichnet. Eine solche ist das rasche und starke Ansprechen auf Tyrosinasezusatz, was nach Blochs Prüfung und unseren eigenen Versuchen (vgl. Przibram, Mitw. v. Dembowski und Brecher, Arch. f. Entwicklungsmech. d. Organismen 1921) Brenzkatechin und andere Phenole nicht tun, wenn von allen äquimolekulare Lösungen verwendet werden. Auch die Natronlauge verändert das Brenzkatechin erst bei hoher Konzentration und die für Dopa charakteristische stärkere Schwärzung bei Verwendung niedrigerer Konzentration tritt nicht auf. Sehr deutlich läßt sich dieser Unterschied im Angehen von Dopa und Brenzkatechin durch eine kombinierte Einträufelung von Tyrosinase (z. B. aus Halimasch) und  $\frac{n}{10}$ -Natronlauge (je 2 Tropfen in 1 ccm Chromogen) darstellen. Auf Brenzkatechin hat die Kombination kaum eine andere Wirkung als jedes der beiden Mittel allein, die äquimolekulare Dopalösung ein Maximum an Tintenschwärze erreicht, während jedes Mittel für sich in ihr bloß eine rot- bis schwarzbraune Farbe hervorgerufen haben würde.

Dürfen wir also die Hauptmasse des Chromogens der Kokone mit Dopa identifizieren, so liegt doch noch die Möglichkeit vor, daß daneben Tyrosin und evtl. Tyrosinase vorkommen. Prüfen wir die Kokone durch das Millonsche Reagens, so tritt auf Erwärmung eine weitergehende Lösung der Hüllen ein, wodurch eine gelbliche Substanz frei wird (die in manchen Fällen einen geringen roten Niederschlag ausfallen läßt). Bei *Saturnia* färbt sich der in Wasser eingebrachte Kokonfetzen bei Zusatz von Millonschen Tropfen auf Erwärmung rot. Es läßt sich ohne weiteres nicht entscheiden, ob diese Farbe von dem im Eiweiß gebundenen oder von freiem Tyrosin allein herrührt, doch spricht die anfänglich gelbe Farbe für ersteres (deckende Xanthoproteinreaktion). Die Flüssigkeiten selbst bleiben anfangs klar, werden aber bei längerer Erwärmung oder Stehen nach derselben rosa. Die Eiweißmenge konnte übrigens sicher nur gering sein, da Essigsäure keine voluminöse Fällung bewirkt. Dopa gibt mit Millons Reagens bei Erwärmung einen fleischroten Niederschlag, wie er überall bei den Kokons auch auftrat, während Brenzkatechin schmutziggrünen Satz ausfällt. Es wurde dann getrachtet, nach der Methode Fürths, die wir auch bisher stets zur Herstellung von Tyrosinasen verwendet hatten, aus den frischen Kokons

von *Saturnia pavonia* Tyrosinase und Chromogen zu extrahieren. Die gut zerkleinerten Kokons wurden mit physiologischer Kochsalzlösung verrieben, mit gleichem Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, der sich nach einigen Stunden bildende Niederschlag auf Filter gebracht und mit Ammonsulfat nachgewaschen. Das chromogenhaltige Ammonsulfatfiltrat wurde mit Halimaschtyrosinase,  $\frac{n}{10}$ -Natronlauge und der Kombination beider geprüft, als Kontrolle auch eine aus Puppenblut von *Saturnia pavonia* analog dargestellte Ammonsulfatlösung. Während beim Puppenblutchromogen die Tyrosinase starke Wirkung ausübte, die Natronlauge keine Schwärzung und ihre Kombination keine verstärkende Wirkung ausüben konnten, veränderten sich die Kokonchromogene weniger bei Tyrosinasezusatz als bei Natronlauge, am stärksten bei der Kombination beider. In diesem Versuche kam abermals sehr deutlich der Unterschied des Puppenblutes mit starkem Tyrosin Gehalt, der Kokonfasern mit vorwiegend Orthophenylstoffen zum Ausdruck. Die Filterrückstände haben die etwa vorhandene Tyrosinase angereichert. Behufs Prüfung ihrer Wirksamkeit wurden gleichgroße Sektoren der Filter ausgeschnitten, in frische Filter eingewickelt und in Tyrosin eingehängt. Die verwendeten Saturniakokone ergaben nun eine schwache Färbung der Lösung, zuerst rosa, dann grau. Auf 90° durch 5 Minuten erhitzte Sektoren zeigten dasselbe, aber mit deutlicher Abschwächung. Starke Schwärzung, wie sie analoge Sektoren von Saturniablutfiltern, namentlich ohne Erhitzung, hervorrufen, trat nicht auf. Sucht man durch Übergießen der Kokonstücke mit heißem Wasser die Tyrosinase zu zerstören, so zeigt doch das wieder abgegossene Wasser alle oben beschriebenen Orthophenyl- und speziellen Dopareaktionen. Übrigens ist die Tyrosinasewirkung bei Eintropfung des abgegossenen Wassers in Tyrosin unter Verwendung von kaltem Wasser gegenüber heißem Wasser nur wenig gesteigert, was wieder die geringe Wirksamkeit der Tyrosinase anzeigt. Auf die von mir höchstwahrscheinlich gemachte Identität von Tyrosinase und Dopase (vgl. Przißram 1921) sei im Hinblick auf die noch in deren Unkenntnis erfolgte Veröffentlichungen Hasebrocks (1921) aufmerksam gemacht. Werden bereits geschwärzte Kokons mit Wasser extrahiert, so gibt die abgegossene Flüssigkeit nur mehr geringe Andeutung der Dopareaktionen, was beweist, daß die Schwärzung tatsächlich einem aus Dopa umgesetzten Melanin zuzuschreiben ist. Es ist nicht etwa das größere Alter der geschwärzten Kokone gegenüber den frischen weißen, welches das Schwinden der Dopareaktionen bedingt, denn weißgebliebene zeigen bei Extraktion nach Jahren noch alle typischen Dopareaktionen. Die Extrakte gestatten es auch sehr schlagend, den Unterschied gegen Brenzkatechinlösung zu demonstrieren. Es werden drei Reihen von Epruvetten aufgestellt, deren eine mit Dopalösung (0,0004 g auf 1 ccm), die

zweite mit Extraktflüssigkeit, die dritte mit Brenzkatechinelösung (0,0004 g auf 1 ccm) gefüllt; sodann in jeder Reihe je eine Epruvette mit  $\frac{n}{160}$ ,  $\frac{n}{80}$ ,  $\frac{n}{60}$  und  $\frac{n}{40}$  (2 Tropfen auf 1 ccm) Natronlauge beschickt, so tritt überall in den letzten Proben stärkster Alkalinität fast sofort eine gelbe bis gelbrote Farbe auf, die sich auch weiter nicht wesentlich verändert. In Dopa und Kokonextrakt entwickelt sich mit  $\frac{n}{40}$ -Natronlauge braune Färbung, die zu starker, mit zunehmender Verdünnung der Natronlauge verlangsamer Melaninbildung führt. Abweichend hiervon bleibt die in den Brenzkatechinelösungen niedrigerer Alkaligrade auftretende Farbe an Tiefe gegen das Gelb der  $\frac{n}{10}$ -Natronlauge zurück und blaßt weiterhin immer mehr zu einem Lichtgrau ohne deutliche Melaninabscheidung ab. Zweifellos wird in den Kokons die rasche Schwärzung bei Wasserzusatz durch den alkalischen Zustand der von der Raupe abgeschiedenen Spinnsäfte sehr unterstützt. Dewitz hat sowohl (1911, S. 617) den färbenden Einfluß der Natronlauge als auch die Alkalinität der Raupenabsonderung (S. 620) und das Vorhandensein von kohlensaurem Natron (S. 628) hervorgehoben. Auch die von Dewitz (1911, Congrès Intern. 1911, S. 134; 1921, S. 370) beobachtete Schwärzung von Spinndrüsenstücken der *Saturnia pavonia* ist bei der Dopalösung und dem Kokonextrakte rasch zu erhalten, wenn ein Tropfen lichtgelber Chromsäure zu einem Kubikzentimeter der betreffenden wasserklaren Flüssigkeit zugesetzt wird, die sie kaum färbt. Die Reaktion ist auch für Brenzkatechin gültig. In wenigen Minuten tritt orangefarbene Farbe ein, die sich bis zu schwarzbraun vertieft. Es freut mich, die trefflichen Beobachtungen von Dewitz in allen wesentlichen Punkten bestätigen, Chromogen und Enzym angeben und nun zum Schlusse auch den Grund namhaft machen zu können, weshalb die farbveränderlichen Kokons auf Feuchtigkeit und nicht, wie manche Puppen, auf Licht reagieren. Es ist dies offenbar die geringe Rolle, welche der sehr schwachen, lichtempfindlichen Tyrosinase in den Kokons für die Melaninbildung zukommt, die vielmehr hier im Gegensatz zur enzymatischen Melanisierung von Tyrosin in den farbenempfindlichen Puppen, auf der durch Wasser und Alkali geförderten raschen Oxydierung von Dopa beruht.

#### Literatur.

- Bloch, Br., Zeitschr. f. physiol. Chem. **48**, 226. 1917; Arch. f. Dermatol. u. Syphilis, Orig. **124**, 129. 1917. — Dewitz, Jul., Arch. f. Entwicklungsmech. d. Organismen **31**, 617. 1911; 1<sup>er</sup> Congrès International d'Entomologie, Bruxelles (Aout 1910), Hayez, S. 133. 1911; Zool. Anz. **49**, 169. 1917; Naturwissensch. Wochenschr., N. F. **17**, 685. 1918; Zool. Jahrb., Abt. f. Zool. u. Physiol. **38**, 365. 1921. — Fürth, O. und H. Schneider, Hofmeister Beitr. **1**, 229. 1901. — Hasebrock, K., Biol. Zentralbl. **51**, 367. 1921. — Hasebrock, K., Fermentforschung **5**, 1. 1921. — Przibram, H. und L. Brecher, Arch. f. Entwicklungsmech. d. Organismen **55**, 83, 199, 260. 1919; **98**, 140. 1921.

# Über einen Fall von ungewöhnlicher Acetonurie.

Von  
**Otto Porges.**

(Aus der I. medizinischen Klinik in Wien.)

(Eingegangen am 29. November 1921.)

Es gehört zu den gesicherten Tatsachen der Biochemie, daß jede Acetonurie in letzter Linie auf absoluten oder relativen Kohlenhydratmangel im Organismus zurückzuführen ist. Es ist auch bekannt, daß der Grad der Acetonurie unter gleichen Bedingungen von Disposition und Kondition abhängig ist. So wissen wir z. B. daß die Disposition zur Acetonurie mit dem Lebensalter abnimmt, daß die Gewöhnung an eine kohlenhydratarme Kost die Intensität der Acetonurie herabsetzt. Wir kennen individuelle Differenzen im Grade der Acetonurie, wie namentlich die Erfahrungen bei Diabetes gezeigt haben<sup>1)</sup>. Im Zusammenhang mit der individuellen Intensität der Acetonurie steht die Neigung zur Acetonurie, die erkennbar ist an dem Minimum an Kohlenhydratzufuhr, das eben noch eine Acetonurie hintanhält. Wie weit jedoch Neigung zur Acetonurie und Intensität derselben bei bestimmten Bedingungen zusammenfallen, ist bis jetzt noch nicht ausreichend untersucht. Fraglich ist auch der Zusammenhang der individuellen Intensität der Acetonurie und der Zeit, die es dauert, bevor bei kohlenhydratarmer Kost eine Acetonurie auftritt. Porges und Novak<sup>2)</sup> konnten für die Schwangerschaft eine gesteigerte Disposition zur Acetonurie nachweisen und insbesondere zeigen, daß Schwangere nach wenigen Stunden kohlenhydratarmer Kost bereits eine positive Legalische Reaktion im Urin aufweisen. Diese Tatsache erlaubt sogar, wie Porges und Novak bereits ausgeführt haben, bis zu einem gewissen Grade eine Verwendung für die Diagnose der Schwangerschaft. Wir haben seit dem Jahre 1911 wiederholt in fraglichen Fällen mit Hilfe der seinerzeit empfohlenen Versuchsanordnung eine Schwangerschaft diagnostizieren können, bevor noch eine gynäkologische Untersuchung ein sicheres Urteil ermöglicht hatte. Zur Kontrolle dieser Schwanger-

<sup>1)</sup> Lit. s. Magnus - Levy, *Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk.* **1**, 404. 1908.

<sup>2)</sup> Porges und Novak, *Berl. klin. Wochenschr.* 1911, Nr. 39.

schaftsreaktion haben wir die verschiedenartigsten pathologischen Zustände, wie sie eine medizinische Klinik bietet<sup>1)</sup>, untersucht und die Reaktion immer negativ gefunden. Erst im letzten Jahre fand sich ein Fall, der sich ähnlich wie die Schwangerschaft verhielt und auch noch in anderer Hinsicht interessante Symptome zeigte. Die ausführliche klinische Verarbeitung des Falles wird Herr cand. med. Herzig an anderer Stelle veröffentlichen. Daher sei hier das Krankheitsbild nur mit wenigen Worten skizziert.

Der Fall betrifft eine 19jährige Patientin, die wegen Hungerosteopathie im Juni 1921 an der Klinik zur Aufnahme gelangte. Die Pat. zeigte nebst den charakteristischen Symptomen dieses Zustandes Zeichen einer Tetanieerkrankung, wie tetanische Anfälle, positives Chvostek'sches und Trousseau'sches Symptom. Außerdem bestand ein latenter Hydrops, der während des Spitalaufenthaltes unter beträchtlicher Gewichtsabnahme schwand. Von besonderem Interesse für die behandelte Frage ist aber der Magenbefund. Die Pat. hatte schon seit Monaten an Appetitlosigkeit, Magendruck nach dem Essen und häufigem Erbrechen gelitten und diese Beschwerden durch Gebrauch von Speisesoda zu bekämpfen gesucht. Sie hatte durch viele Monate täglich mehrere Kaffeelöffel von Natrium bicarbonicum eingenommen. Die Untersuchung mit dem Probefrühstück ergab subaciden Mageninhalt mit enormer Schleimbeimengung, demnach die Zeichen eines Magenkatarrhs. Zur Vervollständigung des Krankheitsbildes sei noch erwähnt, daß die Pat. auch an Cystitis litt.

Zu Beginn der Spitalsbehandlung zeigte die Pat. eine positive Reaktion auf Aceton und Acetessigsäure im Harn, was der Anstoß zur genaueren Untersuchung wurde. Zunächst war es notwendig, Art und Menge der aufgenommenen Nahrungsmittel zu kontrollieren, denn bei der geringen Nahrungsaufnahme und bei dem häufigen Erbrechen der Pat. konnte es sich um einfache Inanitionsacetonurie handeln. In der Tat gelang es auch, durch reichliche Kohlenhydratzufuhr die Acetonurie zu beseitigen. Es wurde nunmehr untersucht, in welcher Zeit nach Einleitung einer kohlenhydratfreien Kost eine Acetonurie auftritt. Über diese Versuche gibt die folgende Tabelle Aufschluß.

Tabelle I.

Datum	Stunde	Diät	Urinbefund			
			Harnmenge	Legal-Reaktion	Gerhardt-Reaktion	Aceton g
23. V.	—	Gemischte kohlenhydratreiche Kost	—	0	0	—
24. V.	8—10	Kohlenhydratfr. Kost	120	0	0	0,012
—	10—6	„	170	+	0	0,053
—	6— $\frac{1}{2}$ 10	„	200	+	+	0,120

Es war somit am ersten Tage strenger kohlenhydratfreier Diät zu einer beträchtlichen Acetonurie gekommen, wie wir sie bisher nur in der Gravidität beobachten konnten. Damit war der Nachweis erbracht, daß die Patientin auf Kohlenhydrat-

<sup>1)</sup> Bezüglich der gynäkologischen Erkrankungen vgl. Novak und Porges, Berl. klin. Wochenschr. 1912, Nr. 48.

entziehung in ungewöhnlich kurzer Zeit mit Acetonurie reagierte. Andere analoge Versuche hatten dasselbe Ergebnis.

So war vom 13.—17. VI. bei gemischter kohlenhydratreicher Kost negative Legalsche Reaktion im Urin. Am 17. VI. blieb die Pat. bis 12 Uhr Mittags nüchtern, um mittels der Duodenalsonde untersucht zu werden. Der um 12 Uhr Mittags gelassene Harn gab bereits positive Acetonreaktion. Am Abend desselben Tages war auch die Eisenchloridreaktion bereits positiv.

Vom 28. VI. bis 30. VI. erhielt die Pat. eine gemischte Kost mit ca. 300 g Kohlenhydraten täglich. Die Legalsche Reaktion war am 29. VI. und 30. VI. negativ. Am 1. VII. wurde kohlenhydratarme Kost eingeleitet. Die Acetonuntersuchung hatte das in nachstehender Tabelle verzeichnete Ergebnis.

Tabelle II.

Stunde	Harn- menge	Legal- Reaktion	Gerhardt- Reaktion	Aceton g
9	—	0	0	—
9—12	200	Spur	0	0,028
12—6	120	+	0	0,030
6—6 (2. VII.)	280	+	+	0,123

Somit war auch hier am ersten Tage kohlenhydratarmer Kost bereits Aceton in vermehrter Menge aufgetreten, allerdings nicht in solcher Intensität wie im Versuche vom 24. V.

Die weiteren Versuche galten der Frage, wieviel Kohlenhydrat in der Nahrung gegeben werden muß, um die Acetonurie hintanzuhalten. Naturgemäß ist die zur Verhütung der Acetonurie dazureichende Mindestmenge von Kohlenhydraten auch abhängig von der gleichzeitig dargereichten Eiweißmenge. Die Patientin erhielt im allgemeinen wenig Eiweißkörper mit der Nahrung, denn Fleisch wies sie zurück, Eier und Milch standen nur in geringer Menge zur Verfügung. Im allgemeinen betrug die Stickstoffzufuhr 8—10 g täglich. Beifolgende Tabelle zeigt die Größe der Kohlenhydratzufuhr und die gleichzeitig ausgeschiedene Acetonmenge.

Wir sehen somit, daß bei Zufuhr von 150 g Zucker noch Acetonurie vorhanden war und erst 200 g Zucker die Acetonurie zu beseitigen vermochten.

Am 9. VII. hatte die Pat. 0,3 g Aceton, obzwar tags vorher 253 g Kohlenhydrate dargereicht worden waren. Allerdings war hier die Kohlenhydrataufnahme erst in den späteren Vormittagstunden erfolgt. Aber auch am 10. VII. zeigte sich noch spurenweise Legalsche Reaktion.

In der Literatur wird im allgemeinen die Menge von 50—100 g Kohlenhydraten bei eiweißreicher Kost als ausreichend bezeichnet, die Acetonurie zu verhüten. Jedoch hat Hirschfeld<sup>1)</sup> auch einige Versuche mitgeteilt, in denen bei minimaler Stickstoffzufuhr nur ca. 50

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. klin. Med. 28, 198. 1895.

Tabelle III.

Datum	Kohlenhydratmenge in der Kost	Legal- Reaktion	Aceton g	Bemerkung
23. V.	reichlich	0	—	—
24. V.	Kohlenhydratarmer Kost	+	0,185	—
25. V.	+ 100 g Saccharose	+	0,410	—
26. V.	+ 150 g „	+	0,151	—
27. V.	+ 200 g „	0	—	—
28. VI.	251 g	+	0,100	—
29. VI.	296 g	0	—	—
30. VI.	280 g	0	—	—
8. VII.	237 g	0	—	—
9. VII.	250 g	+	0,300	Am Morgen kohlenhydratfreies Frühstück
10. VII.	250 g	Spur	—	—
11. VII.	270 g	0	—	—

bis 80 g Kohlenhydrate erforderlich waren, um die Acetonurie auf das normale Maß zu reduzieren. Vielleicht wird in unserem Falle die Neigung zur Acetonurie nur vorgetäuscht durch die beschleunigte Auslösbarkeit derselben. Wenn wir sehen, daß schon ein kohlenhydratfreies Frühstück von Acetonurie gefolgt sein kann<sup>1)</sup>, so erlauben unsere Versuche die Deutung, daß es die ungleichmäßige Verteilung der Kohlenhydrate auf die Mahlzeiten ist, die bei Darreichung beschränkter Mengen von Kohlenhydraten für die Acetonurie verantwortlich zu machen wäre.

Die dritte Frage betrifft die Intensität der Acetonurie bei kohlenhydratarmer Kost. Die Patientin erhielt eine sogenannte strenge Diabeteskost, die jedoch erheblich stickstoffärmer war als die obligate strenge Diät. An Kohlenhydraten enthielt diese Kost ca. 5—10 g. Folgende Tabelle belehrt über den Verlauf der Acetonurie. An den letzten beiden Tagen dieser Periode verweigerte die Patientin, bei der sich eine Periostitis des Oberkiefers infolge Zahnkaries entwickelt hatte, nahezu gänzlich die Nahrungszufuhr.

Tabelle IV.

Datum	Diät	Aceton g	Bemerkung
30. VI.	Gemischte kohlenhydratreiche Kost	normal	—
1. VII.	Kohlenhydratarmer Kost	0,180	—
2. VII.	„ „	0,380	—
3. VII.	„ „	0,452	—
4. VII.	Hunger	0,483	—
5. VII.	„	1,71	Temperatursteigerung

<sup>1)</sup> Seither konnten wir zu wiederholten Malen die gleiche Beobachtung machen.



Wir sehen, daß schon am ersten Tage der kohlenhydratarmen Kost eine gesteigerte Acetonurie besteht; jedoch steigt die Acetonmenge im weiteren Verlaufe der Diätperiode verhältnismäßig nur wenig an. Am vierten Tage sehen wir trotz nahezu vollständiger Nahrungsenthaltung 0,483 g Aceton, erst am fünften Tage erscheint 1,713 g Aceton, doch war es an diesem Tage zu Temperatursteigerung infolge der Periostitis gekommen, was wohl die Acetonmenge vermehrt haben mag. Die Acetonurie bleibt somit durchaus in den Grenzen, die wir auch bei anderen Individuen unter analogen diätetischen Bedingungen sehen. Ein gleichzeitig mit einer ähnlichen Diät bei einer anderen Patientin (Muskeldystrophie) angestellter Versuch zeigte erst am zweiten Tage Acetonurie, dagegen waren bereits am vierten Tage 2 g Aceton vorhanden. Ebenso finden wir in der Literatur bei analogen Versuchen fast immer Acetonwerte, welche den bei unserer Patientin gefundenen nicht nachstehen oder dieselben sogar übersteigen. Es ergibt sich demnach, daß unser Fall bei kohlenhydratarmer Kost keineswegs eine gegenüber der Norm gesteigerte Acetonurie zeigt.

Wie sind nun die beobachteten Stoffwechselanomalien zu deuten? Zunächst ist die Frage zu beantworten, ob wir es hier mit einer Besonderheit des Individuums, der Konstitution oder mit dem Folge- oder Begleitzustand einer speziellen Erkrankung oder bestimmten Lebensweise zu tun haben. Es wäre denkbar, daß die Hungerosteopathie als solche oder die vorangegangene Unterernährung die Ursache darstellt. In dieser Richtung unternommene Kontrolluntersuchungen anderer Fälle von Hungerosteopathie, die ebenfalls unterernährt waren, hatten jedoch ein negatives Ergebnis. Wir dachten daran, daß der monatelang fortgesetzte Gebrauch von Natrium bicarbonicum die Stoffwechselanomalie nach sich gezogen haben mochte. Eine einwöchige Darreichung von großen Mengen von Natrium bicarbonicum bei einer Kontrollperson zog jedoch keine Änderung in der Auslösbarkeit der Acetonurie nach sich. Weiter wäre in Analogie zu der ähnlichen Stoffwechselanomalie bei Gravidität an innersekretorische Störungen zu denken. Unsere Patientin zeigte keine Störung der Menses, der Genitalbefund war normal. Anomalien anderer innersekretorischer Drüsen, die zur Keimdrüse in Korrelation stehen, anzuschuldigen, fehlte uns jede tatsächliche Grundlage. Bei Tetanie haben wir jedenfalls keine Stoffwechsellerscheinungen dieser Art beobachten können. Endlich wäre eine Beziehung zu den Magenbeschwerden der Patientin denkbar, denn Magnus-Levy<sup>1)</sup> berichtet über 2 Fälle von Magenerkrankung ähnlicher Art (Gastritis) mit häufigem Erbrechen, bei denen relativ große Mengen von Kohlenhydraten (bis zu 200 g) nicht imstande waren, eine Acetonurie zu unterdrücken. Magnus-Levy verzichtet darauf, aus

<sup>1)</sup> Magnus - Levy, *Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk.* 2, 402. 1908.

diesen isolierten, nicht näher verfolgten Beobachtungen weiterreichende Schlüsse zu ziehen. Es wäre von großem Interesse, Krankheitszustände dieser Art in analoger Weise zu untersuchen. Leider hatten wir bisher keine Gelegenheit, solche Fälle in klinische Beobachtung zu bekommen.

Wenn wir uns Vorstellungen über die Pathogenese der beobachteten Erscheinungen bilden sollen, so müßten wir annehmen, daß die Leber bei unserer Patientin ein abnorm geringes Stapelungsvermögen für Glykogen hat, denn der Glykogenvorrat der Leber ist es in erster Linie, der bei Einleitung kohlenhydratfreier Kost in der ersten Zeit die Acetonurie verhütet. Jedoch scheint zugeführtes Kohlenhydrat in normaler Weise zunächst als Glykogen in der Leber deponiert zu werden, denn eine Glykosurie wurde nie beobachtet, nur die Assimilationsgrenze für Zucker war herabgesetzt<sup>1)</sup>. Ebenso erfolgte der Nachschub von Zucker in das Blut bei kohlenhydratfreier Kost in normaler Weise, denn der Blutzucker zeigte bei kohlenhydratarmer Kost und Acetonurie einen normalen Wert. Wir müssen also annehmen, daß die Leber aus zugeführtem Kohlenhydrat Glykogen bildet, während bei Bedarf auch aus Nichtkohlenhydraten Zucker gebildet wird. Einer gesonderten Erörterung bedarf noch die Tatsache, daß bei unserer Patientin die Intensität der Acetonurie bei kohlenhydratarmer Kost den bei normalen Personen zu beobachtenden Grad nicht übertrifft. Fassen wir die Acetonkörper als normale intermediäre Produkte bei der Zuckerbildung aus Fett auf<sup>2)</sup>, dann bedeutet die Acetonurie ein Überschreiten der Assimilationsgrenze dieser intermediären Produkte. Da nach unserer Anschauung<sup>3)</sup> Zucker die einzige direkte Kraftquelle der Muskelarbeit bildet, so muß bei verringerter Kohlenhydratzufuhr Eiweiß und Fett in Kohlenhydrate umgewandelt werden, wodurch Acetonkörper auftreten und bei Überschreitung der Leistungsfähigkeit des die Weiterverarbeitung dieser Substanzen vollziehenden Apparates Acetonurie verursacht wird. Die Intensität der Acetonurie bei Kohlenhydratkarenz ist daher ein Maß für die Leistungsfähigkeit dieses Apparates (Leber). Bei unserer Patientin war diese Leistung nicht herabgesetzt.

Fassen wir die Ergebnisse unserer Untersuchung zusammen, so zeigt unser Fall ein ungewöhnlich beschleunigtes Auftreten von Acetonurie nach Einleitung eines kohlenhydratarmen Regimes bei normalen Acetonmengen während einer solchen Diätperiode. Es ist von allgemeinem Interesse, daß beschleunigtes Auftreten und Intensität der Acetonurie nicht parallel laufen.

<sup>1)</sup> Von 20 g auf nüchternen Magen zugeführter Galaktose wurden 0,2 g ausgeschieden.

<sup>2)</sup> Porges, *Ergebn. d. Physiol.* **10**, 45. 1910.

<sup>3)</sup> Porges, *diese Zeitschr.* **27**, 131. 1910.

# Zur lyotropen Reihe und zur $\beta$ -Oxydation.

Von  
**K. Spiro.**

(Aus der Physiologisch-Chemischen Anstalt der Universität Basel.)

(*Eingegangen am 9. Dezember 1921.*)

Mit 5 Abbildungen im Text.

## I.

Die Arbeit des Meisters, dem dieser Band einen Gruß dankbarer Schüler, bringen soll, hat allen Zweigen der vielgestaltigen chemischen Physiologie in wunderbar reichem und umfassendem Maße gegolten. Wer das Glück gehabt hat, mehr als zwei Dezennien ihm bei dieser Arbeit an die Hand gehen zu dürfen, mußte immer wieder über die Fülle der Gesichte dieses Meisters staunen, der dem einen Schüler dies, dem andern jenes Gebiet zur Bearbeitung überwies. Neben seiner reichen Persönlichkeit, über die zu schweigen eine uns von ihm immer wieder auferlegte Pflicht ist, liegt wohl in diesem weiten Umfang der behandelten Probleme die Erklärung dafür, daß er, vielfach gehemmt, jedenfalls nicht gefördert durch äußerlich günstige Verhältnisse — doch an zwei Grenzpunkten deutschen Geisteslebens — in Prag und vor allem in Straßburg, recht eigentlich Schule machen konnte!

Wenn ich im folgenden in gebotener Kürze an zwei Forschungsergebnisse F. Hofmeisters einige physikalisch-chemische Beobachtungen und Betrachtungen anknüpfe, so geschieht es, weil Hofmeister, ohne eigentlich eine spezielle Technik auf diesem Gebiet zu pflegen, doch in seinem ganzen Denken ein ausgesprochener Physikochemiker ist und alle Lebensprobleme auch unter diesem Gesichtspunkt ansieht. Die meisten Errungenschaften seines Instituts überließ er seinen Schülern zur alleinigen Veröffentlichung, sie gehen unter deren Namen in der Literatur weiter, nur mit einem allerdings fundamentalen Funde ist sein Name dauernd verknüpft, und das ist ein physikalisch-chemischer, zu dem er bei biologischen Untersuchungen eben durch seine induktive Geistesrichtung kam, die lyotrope Reihe. Auch wenn dieses Phänomen infolge neuerdings erworbener Methoden und Kenntnisse heute anders als zur Zeit seiner Entdeckung vor einem Dritteljahrhundert erklärt

werden kann, Hofmeisters Arbeiten auf diesem Gebiet werden immer gerade durch die für ihren Meister charakteristische hypothesenfreie Darstellung ihren klassischen Charakter behalten.

## II.

Wir setzen die Reihe selbst und ihre Begründung durch Hofmeister als bekannt voraus und weisen nur kurz darauf hin, daß die wesentlichsten Eigenschaften der Salzlösungen von ihrem hydrophilen Charakter, d. h. ihrer Wirkung auf das Wasser bedingt sind, für die ihrerseits wieder Größe, Ladung und Struktur der Ionen maßgebend sind. Bei der Wechselwirkung der Salze mit dem Wasser spielt das Kation, wie das z. B. die Strukturformeln der komplexen Salze A. Werners darlegen, eine Hauptrolle. Unzweifelhaft findet aber auch eine Einwirkung des Anions auf das Wasser statt: beide Ionenarten konkurrieren um das Wasser, nicht nur die Summe ihrer hydrophilen Wirkung, sondern auch deren Differenz ist von Bedeutung<sup>1)</sup>.

In physiologischen Versuchen haben bisher die Kationen die Hauptrolle gespielt, weil ihre Menge und ihr Mengenverhältnis, z. B. das von Kalium und Calcium, wechseln. Bei den Anionen ist in den meisten Organflüssigkeiten das Cl'-Ion so überwiegend, daß die andern Anionen weniger Berücksichtigung fanden.

Ich will daher kurz einige Erfahrungen über Anionen im folgenden mitteilen, die einerseits die Wirkung dieser selbst von neuem dartun, andererseits auch an physiologischen Beispielen zeigen, daß sie durch ihren Einfluß auf den Lösungsvorgang, das heißt die Hydratation bzw. Solvatation der Ionen, überhaupt auch die Wirkung der Kationen beeinflussen. Man kann daher, streng genommen, so wenig von einer Calciumwirkung sprechen, wie von einer Calciumlöslichkeit, und nur das regelmäßige Überwiegen der Chlorionen unter den gleichzeitigen Anionen gibt dem üblichen Sprachgebrauch den richtigen Sinn, d. h. man meint Chlorcalciumwirkung.

Neben dem Chlor ist für das Blut und ähnliche Flüssigkeiten auch das Vorkommen von  $\text{CO}_3\text{H}$ -Ionen charakteristisch. Bicarbonat und freie Kohlensäure sind aber nicht nur wegen ihrer sauren Reaktion allein von Bedeutung, auch das  $\text{HCO}_3$ -Ion selbst spielt eine Rolle. Wegen des gleichzeitigen Vorkommens von Calcium und  $\text{HCO}_3$ -Ionen treten beim Kochen, Sterilisieren usw. der Ersatzflüssigkeiten die bekannten Schwierigkeiten ein und eine  $\text{HCO}_3$ -freie Nährlösung wäre darum sehr erwünscht. Trotz vielfältigen Herumprobierens ist es mir nicht gelungen, eine solche für das Froschherz z. B. zu finden, und ich möchte das allerdings nur negative Ergebnis doch mit der Unersetzbarkeit

<sup>1)</sup> Vgl. u. a. K. Fajans und K. v. Beckerath, Zeitschr. f. physikal. Chem. **97**, 484.

der  $\text{HCO}_3$ -Ionen deuten, für die ja verschiedene Möglichkeiten der Deutung vorliegen.

Von den auf der Rhodanseite der Reihe stehenden Anionen kommen wohl  $\text{CNS}'$  und  $\text{J}'$  regelmäßig im Tierkörper vor, aber nur in kleinen Mengen, sind also vielleicht katalytisch wirksam oder greifen auf spezielle Vorgänge ein und sind nicht von erkennbarem Einfluß auf den Solvatationszustand.

Wichtiger sind die auf der anderen Seite der Reihe vorkommenden Ionen, deren kalkfällende Eigenschaft Hofmeister zunächst zur Systematik verwandte, von denen aber auch wohl eine physiologische Bedeutung nur  $\text{SO}_4$  und  $\text{PO}_4$  haben.

Die Bedeutung des  $\text{PO}_4$ -Ions liegt wohl zum größten Teil darin, daß es leichter als die anderen Ionen mit organischen Molekeln im gebräuchlichen Sinne chemisch reagiert (auch die Hydratation freilich ist ein chemischer Vorgang), daß es leicht mit wichtigen Zellbestandteilen verestert wird (Glukose, Casein, Nuklein), also leicht aus der Lösung verschwindet und durch den umgekehrten Prozeß wieder auftritt (Iwanoff, Harden und Young sowie Embden für Naturstoffe, Neuberger und Mitarbeiter für synthetische Produkte). Ein Beitrag zur Beleuchtung der  $\text{PO}_4$ -Wirkung geben die Versuche meines Mitarbeiters Dr. H. Staub.

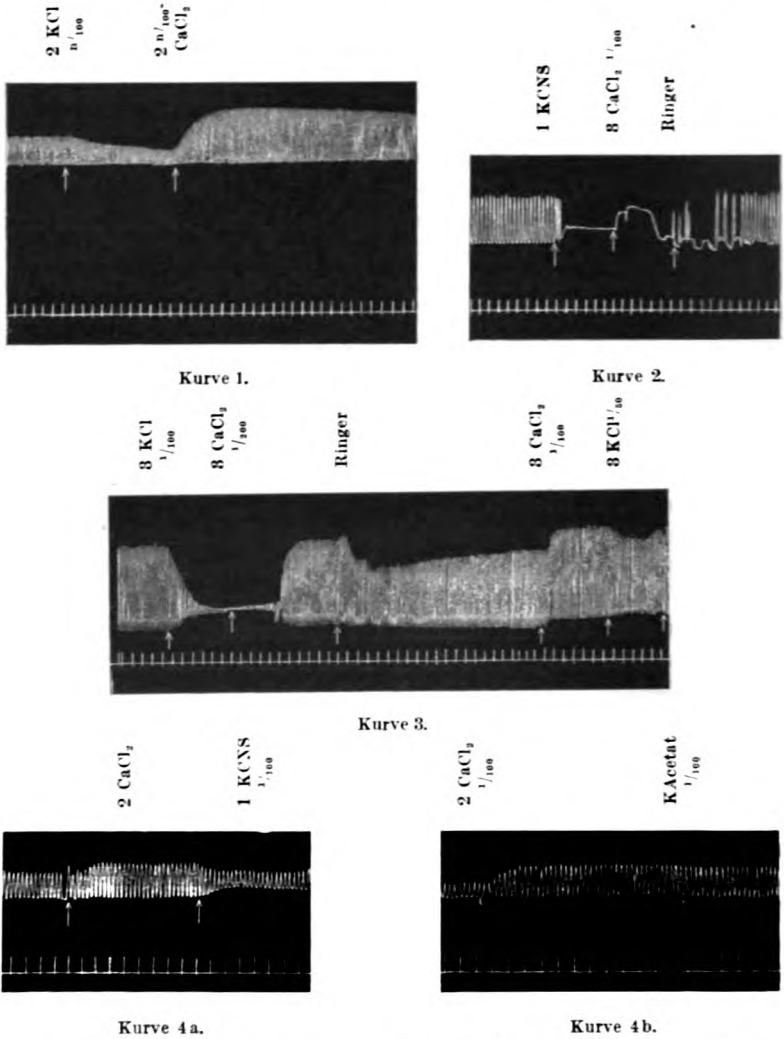
Über das  $\text{SO}_4$ -Ion möchte ich an dieser Stelle nur hervorheben, daß es entsprechend Versuchen, die ich im Straßburger Institut machte, auf die Hefegärung anregend wirkt, damit also die vermutete äußere Analogie zu dem ähnlich wirkenden  $\text{PO}_4$ -Ion zeigt. Gerade mit der Gärung kann man die lyotrope Anionen-Reihe sehr schön demonstrieren, indem verglichen zum Chlorion das Rhodanion andererseits hemmend wirkt<sup>1)</sup>.

An allgemeinen Hinweisen auf die Gültigkeit der Anionenreihe auf biologischem Gebiet fehlt es ja auch sonst freilich nicht; als Ergänzung aber zu den viel zahlreicheren Untersuchungen über die Bedeutung der Kationen im Blut und in den Ernährungsflüssigkeiten auf die Funktionen des Muskels und speziell auch des Herzmuskels sei hervorgehoben, daß sich ein sehr deutlicher Einfluß der Anionen auf die Kationenwirkung auch am Froschherzen demonstrieren läßt, z. B. bei der Wirkung des Kaliums. Gleiche Mengen von Kaliumionen als Rhodanid gegeben sind giftiger als das Chlorid, und dieses wiederum giftiger als das Acetat. Und dementsprechend kann zwar die Kaliumchloridvergiftung durch Calciumchlorid leicht aufgehoben werden, aber bei der Kaliumrhodanidvergiftung ist das sehr viel schwerer oder auch gar nicht möglich. Auch nach vorausgegangener Calciumchloriddosis wirkt das Kaliumacetat viel schwächer „antagonistisch“, als die entsprechende Menge

<sup>1)</sup> F. Boas, diese Zeitschr. **117**.

Kaliumrhodanid. Ähnliches findet man bei einem Vergleich von Calciumchlorid, Calciumacetat, Calciumsulfat.

Wenn man von Kaliumionenwirkung schlechtweg spricht, meint man die Verhältnisse, wie sie bei Verabreichung von Kaliumchlorid



eintreten, weil man unter gewöhnlichen Verhältnissen nur mit gleichzeitigen Chlorionen, als dem Hauptanion des Blutes, rechnet. Die Wirkung der Kationen ist aber, ganz in Übereinstimmung mit den Erfahrungen über Löslichkeit, in quantitativem Sinne abhängig von gleichzeitig in Konkurrenz vorhan-

denen Anionen, auch wenn es sich, wie in diesem Falle, nur um überraschend kleine Mengen von ihnen handelt.

Umgekehrt aber ist die Wirkung an den ionalen Zustand gebunden, das läßt sich besonders gut an den Anionen zeigen. Der Äthylester der Rhodanwasserstoffsäure wird beim Kaltblüter nur in minimalen Mengen oder gar nicht aufgespalten, er ist daher am Froschherz (Dr. W. Kussmaul) fast unwirksam und wirkt auch am ganzen Tier nicht in Dosen, deren äquivalente Natriumrhodanidmengen Krämpfe erzeugen.

### III.

Ein anderes Gebiet, dem Hofmeister dauernd sein Interesse zuwandte, weil es ein zentrales Problem der chemischen Physiologie darstellt, ist die Lehre von der Oxydation der Fettverbindungen. In Prag wie in Straßburg hat er durch seine Schüler J. Pohl<sup>1)</sup>, F. Knoop<sup>2)</sup>, G. Embden<sup>3)</sup>, E. Friedmann<sup>4)</sup>, J. Baer<sup>5)</sup>, L. Blum<sup>6)</sup>, die ihre Untersuchungen später in eigenen Instituten fortsetzten, zwei grundlegende Tatsachen feststellen lassen:

1. die Verschiedenheit der Wirkung von Methyl- und Äthylalkohol, was man allgemein ausdrücken kann, die Differenz im biologischen Verhalten der I. und II. Paraffinreihe; 2. die Oxydation der meisten Fettsäuren in  $\beta$ -Stellung bzw. Aufspaltung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kohlenstoff.

Zum ersten Befund möchte ich zunächst beitragen, daß das Verhalten beider Alkohole am nach Straub isolierten Froschherzen außerordentlich charakteristisch ist. Die primäre Giftwirkung ist zwar bei gleichen Dosen beider Alkohole prinzipiell gleich, der Äthylalkohol ist zunächst erheblich giftiger, was mit dem über die Giftwirkung der Alkohole Bekannten gut übereinstimmt. Versucht man aber auszuwaschen, so zeigt sich die wesentliche Differenz, daß das Auswaschen zwar zunächst beim Methylalkohol mehr Besserung schafft, daß aber dann die Erholung beim Äthylalkohol langsam zunimmt, beim Methylalkohol aber wieder abnimmt, so daß man bei den mit Äthylalkohol vergifteten Froschherzen einen dauernden Erfolg hat, bei den mit Methylalkohol aber nur einen vorübergehenden. Bei der Einfachheit der Versuchsbedingungen ist es wenig wahrscheinlich, daß eine Differenz im chemischen Verhalten der beiden Alkohole vorliegt, in der kurzen Zeit spielt z. B. die von J. Pohl nachgewiesene Verschiedenheit der

<sup>1)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **31**, 281. 1893.

<sup>2)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **6**, 150. 1905.

<sup>3)</sup> Ebenda **8**, 121, 129. 1906; **11**, 323, 332. 1908.

<sup>4)</sup> Ebenda **11**, 151, 158, 177, 202, 304, 365, 371. 1908; diese Zeitschr. **27**, 113, 119, 474. 1910; **35**, 40. 1911.

<sup>5)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **55**, 89; **56**, 92; **59**, 321. 1906—1908.

<sup>6)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1910, S. 683, 796.

Oxydationsgeschwindigkeit kaum eine Rolle, die Verschiedenheit der beiden Alkohole muß vielmehr auf physikalisch-chemischem Gebiet liegen. G. Tammann<sup>1)</sup> hat für die Ameisensäure als Glied der ersten Reihe auf eine interessante Eigenschaft aufmerksam gemacht, er hat aus den Zustandsdiagrammen der Ameisensäure und Essigsäure geschlossen, daß aus der Säure mit paarer C-Atomzahl zwei Molekülarten sich kristallbildend ausscheiden können, während bei Flüssigkeiten mit unpaarer C-Zahl dies nur eine tut, daß also die Verbindungen mit zwei (bzw. 2n) C-Atomen zwei isomere Molekülarten enthalten, die mit unpaarer nur eine allein oder in überwiegender Menge. Ich möchte Differenzen der Lösungsintensitäten als Grund für das verschiedene chemische Verhalten der beiden Alkohole heranziehen. Die Affinität zwischen Äthylalkohol und Wasser ist kleiner als die zwischen Methylalkohol und Wasser, verständlicher vielleicht ausgedrückt: der Äthylalkohol ist wasserfremder, während sich der Methylalkohol mit dem Wasser besser mischt, daher dringt er auch leichter in das wässrige Milieu der Zellen ein und wird schwerer aus ihnen verdrängt, langsamer und unvollständig ausgeschieden, d. h. der Methylalkohol haftet fester in der Zelle, und ist er einmal in die Zelle eingedrungen, so ist er mit Wasser schwerer zu verdrängen als der Äthylalkohol. Auf dieses eigentümliche Verhalten habe ich schon früher einmal hingewiesen<sup>2)</sup>, und ich glaube, daß dies sehr anschaulich hervortritt in zwei Versuchsreihen, die ich schon vor längerer Zeit in Straßburg gewonnen habe.

## I.

Bei 18° Methylalkohol + H<sub>2</sub>O  $\bar{a}a$  keine Fällung mit beliebig viel (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
 Äthylalkohol + H<sub>2</sub>O  $\bar{a}a$  mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Trübung, deutliche Schichtbildung.

## II.

Anm. Sulfat + H <sub>2</sub> O + Methylalkohol			+ Äthylalkohol	
gesättigt				
9	0	1 cem Niederschlag	1 cem	Niederschlag
8	1	1 „ Trübung, bald Ndsch.	1 „	nach einiger Zeit Ndsch.
7	2	1 „ klar	1 „	klar
6	3	1 „ „	1 „	„
5	4	1 „ „	1 „	„
4	5	1 „ „	1 „	„
3	6	1 „ „	1 „	„
2	7	1 „ „	1 „	„
1	8	1 „ „	1 „	„
8	0	2 „ stark. Nd. keine Schicht	2 „	Niederschlag, Schicht
7	1	2 „ „ „ „	2 „	„ „
6	2	2 „ etwas Niederschlag	2 „	Schicht, ohne Ndsch.
5	3	2 „ klar	2 „	klar
4	4	2 „ „	2 „	„
3	5	2 „ „	2 „	„

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. anorg. u. allg. Chem. **109**, 221. 1920.

<sup>2)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **4**, 322. 1904.



2	6	2 ccm klar	2 ccm klar
1	7	2 " "	2 " "
7	0	3 " Niederschlag, stark	3 " Niederschlag u. Schicht
6	1	3 " " "	3 " " "
5	2	3 " Niederschlag	3 " " "
4	3	3 " allmähl. Niederschlag	3 " Ndsch. ohne Schicht
3	4	3 " nach 24 Std. Ndsch.	3 " klar
2	5	3 " klar	3 " "
1	6	3 " "	3 " "
6	0	4 " Niederschlag	4 " "
5	1	4 " "	4 " Niederschlag u. Schicht
4	2	4 " Ndsch. abnehmend	4 " "
3	3	4 " " "	4 " Nd. abnehm. u. Schicht
2	4	4 " nach 24 Std. Ndsch.	4 " kein Nd., große Schicht
1	5	4 " klar	4 " noch größere Schicht
5	0	5 " dicke Fällung	5 " nur Niederschlag
4	1	5 " " "	5 " Niederschlag u. Schicht
3	2	5 " " "	5 " Schicht, wenig Ndsch.
2	3	5 " " "	5 " nur Schicht
1	4	5 " schwacher Niederschlag	5 " geringe Trübung
4	0	6 " dicke Fällung	6 " nur Niederschlag
3	1	6 " " "	6 " " "
2	2	6 " " "	6 " Schicht u. Niederschlag, nach 24 Std. Ver- schwinden der Schicht
1	3	6 " " "	6 " Schicht mit wenig Nd.
3	0	7 " Fällung	7 " Niederschlag
2	1	7 " "	7 " "
1	2	7 " "	7 " Niederschlag u. Schicht, nach 24 Std. Ver- schwinden der Schicht
2	0	8 " "	8 " Fällung
1	1	8 " "	8 " "
$\text{NH}_4\text{Cl}$ gesättigt	+ $\text{H}_2\text{O}$	+ Methylalkohol	+ Äthylalkohol
2	7	1 ccm klar	1 ccm klar
2	6	2 " "	2 " "
2	5	3 " "	3 " "
2	4	4 " "	4 " "
2	3	5 " "	5 " "
2	2	6 " "	6 " "
2	1	7 " "	7 " allmählich Niederschlag
2	0	8 " Spuren Niederschlag	8 " dicker Niederschlag

Äthylalkohol mengt sich nicht, fällt auch nicht aus.

Methylalkohol mengt sich, geht hinein, verdrängt das Salz.

Weitere gleichsinnige Ergebnisse über die beiden Alkohole sind der Kürze halber einer späteren Mitteilung vorbehalten.

#### IV.

In seinem abweichenden physiologisch-chemischen Verhalten ist der Methylalkohol aber nur ein typischer Vertreter der Methanreihe,

denn die Körper mit einem C-Atom zeigen, wie physiologisch auch bez. ihrer physikalisch-chemischen Konstanten, mannigfach ein abweichendes Verhalten. Vielfach wird aber (z. B. auch von Tammann) der Unterschied zwischen Methan- und Äthanderivaten nur als ein Beispiel der Differenzen angesehen, die sich zwischen Ketten mit gerader und mit ungerader Kohlenstoffatomzahl finden. Bekanntlich besteht bei den höheren Fettsäuren eine Regelmäßigkeit, auf die zuerst A. v. Baeyer<sup>1)</sup> hingewiesen hat, nämlich ein Hin- und Herschwanken (Oscillieren) der Konstanten, das jetzt außer für die Schmelzpunkte nunmehr auch für Siedepunkt, Löslichkeit, Molekularvolumen, Molekularwärme, Dissoziationskonstante und optische Drehung nachgewiesen ist.

Ich habe kürzlich<sup>2)</sup> die in diesem Oscillationsphänomen kenntlichen Differenzen der molekularen Struktur zur Deutung der  $\beta$ -Oxydation herangezogen, indem ich darauf hinwies, daß physikalisch-chemisch sich die Ketten mit gerader und die mit ungerader Anzahl von C-Atomen wie zwei konstitutiv vollkommen voneinander unabhängige, d. h. verschiedene Reihen verhalten, was vermutlich durch die auch sonst in der Natur eine große Rolle spielende „paarige Bindung“<sup>3)</sup> veranlaßt wird. Hierdurch erscheint es begründet, daß bei milden Oxydationen ein Glied der einen Reihe nur in ein anderes Glied derselben Reihe übergeführt wird, womit sich die Embdenschen Erfahrungen z. B. in bester Übereinstimmung befinden. Das vorhandene physikalisch-chemische Material ist, wie E. J. Cuy, H. Pauly<sup>4)</sup> jüngst gezeigt haben, viel reicher, als ich in meiner Arbeit angegeben habe. Vor allem aber entspricht auch den verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften ein differentes chemisches Verhalten der beiden Reihen, wie H. Meerwein gezeigt hat.

Über die Art, wie die als Grund der Oscillation angenommene „paarige Bindung“ zustande kommt, hatte ich nur einige allgemeine Annahmen gemacht, mich mit einem Hinweis auf in den üblichen Formeln nicht ausgedrückte Affinitätsreste begnügt; nach den gegenwärtig in der organischen Chemie allgemein gültigen Anschauungen kann man sich aber auch darüber bestimmtere struktur-chemische

1) B. B. **19**, 1286. 1877.

2) Helv. Chim. Act. **4**, 459. 1921. Daselbst Literaturnachweise.

3) Vergl. neuerdings P. Karrer, Helv. Chim. act. **4**, 812 über die Pringsheim'schen Di-, Tetra- und Octoamylosen. Auch C. Neubergs Carboligase (s. u.).

4) Cohn, Monatshefte f. Chemie **26**, 88. 1905. — H. Pauly, Ann. d. Chemie **383**, 260. 1911; Zeitschr. f. allg. u. anorgan. Chemie **119**, 271. 1921. — Falk und Nelson, Journ. f. prakt. Chem. **88**, 101. 1913. — G. Tammann, Zeitschr. f. allg. u. anorg. Chem. **109**, 221. 1920; **115**, 188. — E. J. Cuy, ebenda **115**, 273. 1921. — H. Meerwein, Ann. d. Chem. **419**, 121. 1921. — V. Meyer und P. Jacobson, Lehrbuch d. organ. Chem. I. **1**, 502, 586. — Henry, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **99**, 1157. 1884.

Vorstellungen machen, da die Periodizitätserscheinungen auch bei chemischen Umsetzungen zutage treten.

So hat z. B. besonders H. Meerwein<sup>1)</sup> bei seinen Untersuchungen über Pinakolinumlagerungen zeigen können, „daß mit wachsender C-Atom-Zahl die Valenzbeanspruchung der normalen Alkyle abnimmt. Diese Abnahme ist jedoch keine kontinuierliche, sondern eine periodisch wechselnde in dem Sinne, daß den Alkylen mit ungerader C-Atomzahl eine größere Affinitätsbeanspruchung zukommt, als denjenigen mit gerader C-Atomzahl.“

Nun tritt die Periodizität bei den uns hier interessierenden Fettsäuren in viel stärkerem Maße auf als bei den Paraffinen, das weist schon darauf hin, daß die Carboxylgruppe nicht nur ebenso wie nach H. Meerwein die Methylgruppe, sondern viel stärker als diese, durch Affinitätsbeanspruchung<sup>2)</sup>, eine festere Bindung an das benachbarte C-Atom zeigt, damit steht auch in Einklang, daß an den Dicarbonsäuren (Oxalsäurereihe), die die Carboxylgruppe zweimal enthalten, die Oscillation auch ganz besonders ausgeprägt ist. Hier zeigt sich auch die Lockerung der H-Atome durch die benachbarte Carboxylgruppe besonders deutlich: bei der Bernsteinsäure z. B. stehen beide  $\text{CH}_2$ -Gruppen unter einem solchen Einfluß, und gerade für diese haben ja F. Battelli und L. Stern<sup>3)</sup> schon vor Jahren in ihren bekannten Arbeiten gezeigt, daß sie durch die Oxydone der Gewebe leicht in Fumarsäure übergeht, die dann weiter glatt zu Kohlensäure und Wasser verbrennt. Eine chemische Erfahrung hierfür liegt in den Befunden Neubergs und seiner Schüler vor, die Bernsteinsäure einfach durch Belichtung oder mittels Wasserstoffperoxyd in Acetaldehyd überführen konnten<sup>4)</sup>. Über daran anschließende Untersuchungen soll demnächst berichtet werden.

Die sogenannte „spezifische Einstellung“ der Dehydrogenase ergibt sich also in diesem Fall ohne weiteres aus der chemischen Konstitution der Bernsteinsäure. Durch diese Untersuchungen aber, und die von F. Knoop, G. Embden, E. Friedmann, H. D. Dakin, neuerdings von T. Thunberg und Heinr. Wieland erscheint die  $\beta$ -Oxy-

1) Liebigs Annalen **419**, 121.

2) Beide Perioden von Valenzbeanspruchung, die durch die  $\text{CH}_3$ - und die durch die  $\text{COOH}$ -Gruppe werden sich normalerweise zu erkennen geben; bei den Ketten mit gerader C-Atomzahl addieren sie sich, bei denen mit ungerader ist es umgekehrt, was wieder zu einer Verschiedenheit beider Reihen führt. Doch ist, wie oben gezeigt, die vom endständigen Methyl (bzw. Phenyl) ausgehende Oscillation die schwächere und sie wird sich namentlich bei längeren Ketten an den der Carboxylgruppe benachbarten C-Atomen gegenüber dem Einfluß dieser Gruppe kaum bemerkbar machen und auf die  $\beta$ -Oxydation keinen Einfluß ausüben.

3) Diese Zeitschrift **34**, 263. 1911. Ergebnisse **12**, 215. 1912.

4) C. Neuberg, diese Zeitschrift, **67**, 59 und 71. 1914.

dation der Fettsäuren in dem Sinne geklärt, daß sie auf eine Dehydrierung (mit ev. nachfolgender HOH-Anlagerung) beruht. — Daß damit auch Vorkommen und Bedeutung der Katalase erklärt wird, sei nur beiläufig angefügt<sup>1)</sup>. Die Anlagerung der OH-Gruppe in die  $\beta$ -Stellung erscheint aus den mannigfachen von H. Pauly erörterten Gründen begünstigt. Auf eine Unbeständigkeit der  $\alpha$ -Oxysäuren weist u. a. die Tatsache hin, daß ich bei der Diazotierung des Leim-Hydrolysats größere Mengen Zimmtsäure (aus Phenylalanin) erhielt.

Im Sinne neuerer Anschauungen ist auch die stärkere Affinitätsbeanspruchung zwischen Carboxylgruppe und zugehörigem  $\alpha$ -C-Atom bei den Fettsäuren ohne weiteres verständlich. A. Hantzsch hat in richtunggebenden Versuchen den Unterschied zwischen den echten Carbonsäuren  $R \cdot C \begin{matrix} \diagup O \\ \diagdown O \end{matrix} H$  mit der Koordinationszahl 3 und den Pseudosäuren  $R \cdot C \begin{matrix} \diagup O \\ \diagdown OH \end{matrix}$  mit 4 Hauptvalenzen dargelegt. Bei den Verbindungen der ersten Art befindet sich das H-Atom in der zweiten Sphäre, in ionogener, d. h. indirekter Bindung, bei den uns interessierenden wenig ionisierten Fettsäuren aber zum größten Teil direkt an Sauerstoff gebunden. Durch diese relativ feste Bindung wird aber die Affinität des Sauerstoffatoms stark beansprucht<sup>2)</sup>, so daß die Bindung des Sauerstoffatoms an das Kohlenstoffatom schwächer ist und von der Valenz des Kohlenstoffatoms weniger gebunden wird; entsprechend dieser geringeren Beanspruchung durch die Hydroxylgruppe ist die Bindung des C-Atoms an das benachbarte C-Atom um so stärker. Im

Sinne der üblichen Formulierung hätten wir also  $CH_2 \begin{matrix} \diagup O \\ \diagdown \end{matrix} C - O - H$ . In weiterer Durchführung führt das, ebenso wie es H. Meerwein für die Alkyle gezeigt hat, zu der experimentell erwiesenen Periodizität, die freilich bei längeren Ketten infolge Schwindens des Einflusses und durch Valenzausgleich usw. immer weniger ausgesprochen sein wird. In gleichem Sinne sprechen neben dieser konstitutions-chemischen Auffassung auch räumliche Betrachtungen, die H. Pauly und J. Stark angestellt haben. Auch die durch Verknüpfung von C-Tetraedern bedingte Form der C-Ketten kann uns deren Oscillation, die Verschiedenheit der beiden Reihen und engere Verknüpfung einzelner C-Atome miteinander anschaulich machen (Pauly).

Vor allem aber konnte H. Pauly über die nun durch eine Überfülle von Beispielen belegte Baeyersche Oscillation hinaus gerade für die Fettsäuren noch eine neue wichtige Tatsache festlegen, näm-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift 93, 391. 1919. Genau die gleiche Auffassung (Rückgewinnung molekularen Sauerstoffs aus Wasserstoffsuperoxyd) unabhängig davon und experimentell weiterbegründet bei Heinr. Wieland, Berl. B. 1921.

<sup>2)</sup> Vgl. auch S. Skraup, Liebigs Ann. 419, 1. 1918.

lich eine doppelte Oscillation, d. h. ein Pendeln einer bereits pendelnden Reihe.  $\times$ !

Wenn meine Vermutung des Zusammenhangs zwischen Oscillation d. h. Konstitution und physiologischem Verhalten richtig war, so mußte es für die doppelte Pendelung auch physiologische Analoga geben. Herr Dr. Fr. Müller hat mir nun mitgeteilt, daß er in der Tat bezüglich der Geschmacksqualität einzelner substituierter Phenylfettsäuren in den in meiner früheren Mitteilung erwähnten Versuchen (bei Staudinger) eine derartige doppelte Oscillation bemerkt hat.

Im Sinne meiner letzten Ausführungen dürfte man auch dementsprechend annehmen, daß bei den einbasischen normalen Fettsäuren und einigen ihrer nächsten Abkömmlinge, aber nur bei diesen, entsprechend ihrer doppelten Pendelung auch eine Delta-Oxydation, d. h. Aufspaltung zwischen  $\gamma$ - und  $\delta$ -C-Atom, vorkommen kann. Die Erfahrungen sprechen jedenfalls nicht dagegen, freilich der Nachweis, daß die Entstehung der Benzoesäure aus der Phenylvaleriansäure, wie sie F. Knoop in seinen schönen Untersuchungen gelehrt hat, nicht durch zweimalige  $\beta$ -Oxydation, d. h. auf dem Zwischenweg über die Phenylpropionsäure, sondern direkt vor sich geht, wird sich wohl kaum erbringen lassen. Dabei würden dann nicht zwei Moleküle Essigsäure (oder Oxalsäure) sondern ein Molekül Buttersäure (bzw. Bernsteinsäure) entstehen; eine intermediäre Bildung von Buttersäure ist aber oft vermutet worden wegen des Auftretens der  $\beta$ -Oxybuttersäure.

Ich selbst habe vor 20 Jahren umgekehrt die Vermutung ausgesprochen, daß die  $\beta$ -Oxybuttersäure synthetisch entsteht, und zwar aus  $C_2$ -Ketten auf dem Wege über Acetaldehyd. Dafür spricht E. Friedmanns experimenteller Nachweis<sup>1)</sup> der Acetessigsäurebildung bei der Leberdurchblutung mit Acetaldehyd. Eine ganz neue Basis erhielt dieser ganze Komplex von Fragen durch die grundlegenden Untersuchungen C. Neubergs und seiner Schule, die uns die physiologische Bildung des Acetaldehyds und das häufige Vorkommen gekoppelter Reaktionen und dazu gehöriger Fermente (Carboligase) lehrten<sup>2)</sup> (in diesem Falle Reduktion zweier Moleküle Acetaldehyd ( $-O_2$ ) und Oxydation des Aldols zu Acetessigsäure ( $+O_2$ ) machen einen solchen Weg wahrscheinlich. Statt des Acetaldehyds kann nach C. Neuberg auch dessen Carbonsäure die Brenztraubensäure die Aldolbildung eingehen, was vom energetischen Standpunkt aus auch wohl wahrscheinlicher ist. Ob aber wirklich die 342 g  $\beta$ -Oxybuttersäure + Acetessigsäure, die A. Magnus-Levy<sup>3)</sup> in den Aus-

<sup>1)</sup> Hofmeisters Beitr. 11, 202. 1908.

<sup>2)</sup> C. Neuberg, diese Zeitschrift 78, 238. 1916; 89, 365. 1918; 115, 282; 121, 311, 1921.

<sup>3)</sup> Archiv f. exp. Path. u. Pharm. 42, 149. 1899.

scheidungen dreier Tage eines Diabetikers feststellte, alle auf diesem komplizierten Wege gebildet werden, erscheint doch fraglich. Außerdem haben Neuberg und Arinstein<sup>1)</sup> außer der Carboligase, die mehrgliedrige Kohlenstoffketten verknüpft, auch durch das Studium der Buttersäuregärung den Nachweis geliefert, daß auf biosynthetischem Wege unzweifelhaft ein paariger Aufbau erfolgt. Die Annahme eines ausschließlichen Freiwerdens von Ketten mit zwei C-Atomen, d. h. von Essigsäuremolekülen, bei der Fettoxydation wird zunächst nicht gerade wahrscheinlicher gemacht durch den Nachweis E. Freises<sup>2)</sup>, der eine Unverbrennbarkeit der Essigsäure bei Leberdurchblutungen feststellte, immerhin weist aber das Vorkommen von Acetylgruppen z. B. im Chitin, in der Furfuracrylsäure, in den Mercaptursäuren usw. darauf hin<sup>3)</sup>. Vor allen Dingen ist aber die  $\beta$ -Oxydation und der paarige Abbau der beste Hinweis auf die Entstehung von Ketten mit 2 C-Atomen.

Daß aber die Oxydation der Fettsäuren nur durch  $\beta$ -Oxydation restlos bis zur Essigsäure erfolgt, erscheint doch recht fraglich. So haben kürzlich K. Thomas<sup>4)</sup> und H. Schotte gezeigt, daß die  $\beta$ -Oxydation der mit Benzolsulfochlorid substituierten Methylaminocaprinsäure bei der entsprechenden Buttersäure Halt macht, ebenso daß auch das entsprechende Derivat der Buttersäure nicht mehr weiter der  $\beta$ -Oxydation unterliegt. Verglichen mit den Befunden gerade an der leicht weiter oxydierbaren Buttersäure selbst zeigt dies, wie vorsichtig man in der Übertragung der bei substituierten Fettsäuren erhaltenen Ergebnisse auf die freien Fettsäuren sein muß.

Wir haben also einerseits die Tatsache, daß die Essigsäure nach E. Freise in der Leber nicht oxydiert wird, andererseits entstehen nach G. Embden aus der Caprinsäure, Octylsäure, Decylsäure usw. die Oxydationsprodukte der Buttersäure. Danach ist doch zunächst nur anzunehmen, daß die paarigen Säuren bis zur C<sub>4</sub>-Stufe oxydiert werden. Daß dieser paarige Abbau auf dem Wege der  $\beta$ -Oxydation geschieht, ist nach Analogie-Versuchen mit substituierten Fettsäuren wohl wahrscheinlich, — aber es ist nicht bewiesen, daß dies der alleinige Weg ist. Ja wenn wir z. B. aus den Zahlen von G. Embden und A. Marx<sup>5)</sup> sehen, daß die Decylsäure so viel Aceton liefert, als ob sie ceteris paribus zu 97,7% bzw. 91% (bei dreimaliger  $\beta$ -Oxydation!) zu Buttersäure abgebaut würde, so ist, da derartige quantitative Ausbeuten immerhin doch unwahrscheinlich sind, eine Spaltung in zwei Moleküle Buttersäure (bzw. Butter- und Caprinsäure, wohl wahrscheinlicher, d. h.

<sup>1)</sup> C. Neuberg und B. Arinstein, diese Zeitschr. **117**, 269. 1921.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. **54**, 474. 1914.

<sup>3)</sup> Vgl. A. Ellinger und M. Hensel, Zeitschr. f. phys. Chem. **91**, 21. 1914.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. phys. Chem. **104**, 141. 1918.

<sup>5)</sup> Hofmeisters Beiträge **11**, 318. 1908.

nicht nur und ausschließlich  $\beta$ -Oxydation, sondern allgemein ein paariger Abbau auch mit 4 bzw. 6 C-Atomen.

Eine solche Bildung von Ketten mit vier C-Atomen bei gesteigerter Fettzersetzung erscheint auch physiologisch nicht unwahrscheinlich, denn L. Schwarz<sup>1)</sup> und A. Loeb<sup>2)</sup> haben große Mengen von  $\beta$ -Oxybuttersäure aus verfütterter Buttersäure gewonnen (33%), und eine solche Annahme für die Bildung der Oxysäure ist doch die einfachere, zumal ja Dakin und Wakeman<sup>3)</sup> die Oxydation der Buttersäure zur  $\beta$ -Oxybuttersäure durch Gewebsextrakte direkt zeigen konnten. Jedenfalls ist die Buttersäure und ebenso die Bernsteinsäure leichter verbrennbar als die Essigsäure und Oxalsäure (Pohl, Freise), und da gerade für die normalen Fettsäuren die doppelte Oscillation physikalisch-chemisch einwandfrei erwiesen ist, erscheint die Annahme einer direkten Abspaltung nicht nur von Essigsäure, sondern auch von Buttersäure beim Abbau der Fettsäuren auch physikalisch-chemisch wohl begründet.

F. Hofmeister und seine Schüler (J. Pohl, F. Knoop) haben gezeigt, daß die Oxydation der C-Ketten nicht, wie man zunächst annehmen mußte, C-Atom für C-Atom erfolgt, sondern paarweise (Prinzip des paarigen Abbaus, Friedmann). Mit diesem Prinzip ist aber ebenso die Abspaltung einfacher (Essigsäure, Oxalsäure) wie doppelter (Buttersäure, Bernsteinsäure) bzw. mehrfacher Paare wohl vereinbar, zumal die physikalisch-chemischen Regelmäßigkeiten der Reihe mit 2 nC-Atomen erst bei der Buttersäure beginnen. Auch eine Anzahl physiologischer Tatsachen (Krogh und Lindhard) weist darauf hin, daß neben der  $\beta$ -Oxydation, d. h. der Bildung von Ketten mit 2 auch eine solche mit 4 (bzw. 2 n) C-Atomen erfolgt.

Über anschließende experimentelle Befunde werden die Herren Dr. H. Müller und W. Jung berichten.

<sup>1)</sup> Dtsch. Arch. f. klin. Med. **76**, 233. 1903.

<sup>2)</sup> Zentralbl. f. d. ges. Phys. u. Path. d. Stoffwechsels **3**, 198. 1902.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. Chemistry **6**, 373. 1909.

# Eine neue Pepsinbestimmungsmethode.

Von

Karl Glässner (Wien).

(Aus der chemischen Abteilung des Physiologischen Instituts zu Wien.)

(Eingegangen am 19. Dezember 1921.)

Die Methoden für die Bestimmung des Pepsins im Magensaft kann man nach dem Vorgange von Fuld<sup>1)</sup> in 2 große Gruppen einteilen, indem entweder die Abnahme eines festen Eiweißkörpers unter dem Einfluß des Ferments gemessen oder die Fällbarkeit eines gelösten Eiweißstoffes als Maß der Pepsinmenge benutzt wird.

Repräsentanten der ersten Gruppe sind 1. die Grütznersche<sup>2)</sup> Carminfibrinmethode; Fibrin wird klein geschnitten, gewaschen, mit Carmin gefärbt, in Glycerin aufbewahrt; vor dem Gebrauche wird das Glycerin entfernt. Etwa gleiche Mengen Fibrin werden in 0,1% HCl gebracht, zu welcher man den verdünnten Magensaft hinzufügt. Nach einer bestimmten Zeit bestimmt man mittels einer Farbenskala die Intensität der Carminfärbung. Die Methode ist wohl nicht genau, gibt aber für grobe Bestimmungen brauchbare Werte; hinderlich ist die Ungleichmäßigkeit des Fibrinmaterials, die lange Dauer der Bestimmung und die Umständlichkeit der Ausführung. 2. Die Methode von Mett<sup>3)</sup>, modifiziert von Nierensteiner und Schiff<sup>4)</sup>. Diese sehr verbreitete Methode hat Nachteile physikalischer Natur, wie Hemmungsbildung bei stärkerer Konzentration, das Auftreten unscharfer Ränder bei der Andauung der Eiweißsäulchen, Schwierigkeiten der Ablesung usw. — 3. Die Methode von Jacoby und Solms<sup>5)</sup>: Aufhellung einer feine Trübung bildenden Ricinsuspension. Die Schwäche der Methode liegt in der Schwierigkeit der Herstellung gleichmäßiger Suspensionen. Dasselbe gilt auch von der 4. Methode von Michaelis<sup>6)</sup>: 12fach verdünntes menschliches oder 15fach verdünntes Hammelblutserum wird mit soviel 10proz. Sulfosalicylsäure versetzt, bis eine milchige Trübung entstanden ist und Kongopapier soeben violett wird. Die Aufhellung der Trübung gibt ein Maß für den Verdauungsgrad der zu untersuchenden Lösung. Nach dem Prinzip der Fällung arbeiten: 1. die Methode von Hammerschlag<sup>7)</sup>: Hühnereiweißlösung verliert durch Pepsin seine Fällbarkeit mit Esbachschem Reagens. Die Differenz zwischen verdaulichem und unverdaulichem Eiweiß soll der Pepsinmenge proportional sein. Lange Dauer der Bestimmung, große Mengen erforderlichen Magensaftes, Ungenauigkeiten der Ablesung sind Nachteile der Methode. 2. Die Fällungsmethode von Fuld und Lewison<sup>8)</sup>: Edestin fällt mit NaCl, während die Edestasen nicht gefällt werden. Schwierigkeiten ergeben sich aus der Darstellung des Ausgangsmaterials und der Herstellung klarer Lösungen. 3. Die Methode von Gross<sup>9)</sup>: Caseinlösungen reagieren mit Natriumacetat durch Fällung, ihre Verdauungsprodukte nicht. Auch hier ergeben sich gewisse Schwierigkeiten:



Reinstes Casein ist schwer erhältlich, klare Lösungen mit Hilfe des käuflichen Caseins sind nicht erzielbar, keine scharfe Fällungsgrenze.

Es ist daher ein Bedürfnis nach einer einfachen, schnell auszuführenden und scharfen quantitativen Pepsinbestimmung im Magensaft vorhanden, die sowohl für klinische als auch für wissenschaftliche Zwecke benützt werden kann.

Ich verwende nun gleichfalls eine Fällungsmethode, die mir vor den anderen Methoden den Vorzug der Einfachheit, Raschheit und Genauigkeit zu haben scheint. Es ist seit Schulz<sup>10)</sup> bekannt, daß das Globin, der Eiweißstoff des Hämoglobinkomplexes, sich in vielfacher Weise von den anderen Eiweißstoffen des Blutes unterscheidet. Hämoglobin kommt im Blute in größerer Menge vor als alle anderen Eiweißkörper zusammen (Verhältnis 13 : 4,5%). Die Darstellung des Globins aus Hämoglobin ist eben diesem Autor schon 1898 gelungen; der Weg ist recht umständlich. Nach Schulz ist Globin, wenn es salzfrei ist, in Wasser löslich, bleibt beim Kochen klar, durch Spuren von Ammoniak, Natriumhydroxyd, Natriumcarbonat entsteht ein flockiger dicker Niederschlag, der sich aber im geringsten Überschusse wieder auflöst; man vermeidet dies durch Zusatz von Ammoniumchlorid. Dieselben Verhältnisse ergeben sich bei Fällung des Globins aus salzsaurer Lösung: Das Globin wird aus salzsaurer Lösung mit  $\text{NH}_3$  gefällt und löst sich nicht im Überschusse von Ammoniak, besonders wenn man einige Tropfen einer  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung hinzufügt.

Diese Eigenschaften benütze ich nun, um in einer salzsauren Globinlösung durch verdünnten Ammoniak Fällungen zu erzeugen, die nach völliger Verdauung des Globins ausbleiben.

Die Schwierigkeit, die zu überwinden war, lag nur in der Darstellung der Globinlösungen, da, wie oben erwähnt, die Herstellung nach Schulz nicht immer gelingt. Schulz erzeugt in einer Hämoglobinlösung durch verdünnte  $\text{HCl}$  eine Fällung, die sich im Überschusse der Säure löst. Zur Trennung von Eiweißstoff und Hämatin setzt man  $\frac{1}{5}$  Volum Alkohol hinzu; schüttelt man mit Äther aus, so soll der Farbstoff in den Äther übertreten, während das Globin in die wässrig alkoholische Lösung übergeht und leicht abgetrennt werden kann, falls die Hämoglobinlösung salzfrei war. Dies ist nun leider selten der Fall; es gelingt wohl gelegentlich die Trennung glatt, häufig bilden sich aber Emulsionen, die eine Trennung vereiteln. Die Methode ist also zu unsicher, zu kostspielig und führt auch leicht zur Koagulierung des Globins, weil Alkohol die Eigenschaft hat, salzreichere Globinlösungen irreversibel zu koagulieren.

Nun beschreiben Strauss und Grützner<sup>11)</sup> eine recht expeditiv Methode der Globindarstellung, die ich in der von mir modifizierten Form so anwende: 100 ccm einer Hämoglobinlösung, die auf die Art

gewonnen wird, daß geschlagenes Rinderblut vom Serum befreit, mit Kochsalzlösung 3—5 mal gewaschen und die Blutkörperchenaufschwemmung so lange mit destilliertem Wasser versetzt wird, bis Lackfarbe auftritt, wird mit 200 ccm (96°) Eisessig versetzt, die Flüssigkeit in 2 Liter destillierten Wassers eingetragen, die tiefbraune Lösung wird mit stark aktiver Tierkohle eine Stunde lang in der Schüttelmaschine geschüttelt und auf einer Nutsche durch Papierwolle abgesaugt; nach 2—3 maliger Wiederholung dieser Behandlung erhält man so eine nur schwach gefärbte Lösung, aus der durch  $\text{NH}_3$ -Zusatz das Globin fast völlig weiß ausfällt. Das Eiweiß wird nun auf dem Filter mit ein wenig  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und in verdünnter  $\text{HCl}$  gelöst. Ich erhalte durch Verdünnen auf das ursprüngliche Volumen eine ca. 6proz. Globinlösung, welche für meine Zwecke auf 1% verdünnt werden soll. Praktisch gestaltet sich der Vorgang so, daß man den Niederschlag auf dem Filter gleich in 600 ccm  $\frac{1}{10}$  n-HCl löst. Diese Lösung ist für die Fermentbestimmung verwendbar, sie kann durch Kochen sterilisiert und monatelang aufbewahrt werden, ohne daß man irgendwelche Desinfizienzien verwendet.

Ich gehe nun nach den Angaben von Michaelis so vor: Man füllt in ein Reagensglas 2 ccm des filtrierte Magensaftes, in 9 weitere je 1 ccm  $\frac{1}{10}$  n-Salzsäure. In das 2. Glas kommt 1 ccm unverdünnten Magensaftes, man mischt, überträgt 1 ccm des Gemisches in Glas 3, mischt davon 1 ccm in das Glas 4 usw., bei der Probe 10 gießt man nach dem Mischen 1 ccm weg. So erhält man die geometrischen Reihen von

$\frac{1}{1}$   $\frac{1}{2}$   $\frac{1}{4}$   $\frac{1}{8}$   $\frac{1}{16}$   $\frac{1}{32}$   $\frac{1}{64}$   $\frac{1}{128}$   $\frac{1}{256}$   $\frac{1}{512}$

Zu jedem Röhrchen kommt nun 1 ccm der Globinlösung, es wird gut gemischt, die Gläser kommen auf 15 Minuten in ein Wasserbad von 40°. Nach dieser Zeit werden die Gläser herausgenommen und nach Zusatz von 3—5 Tropfen einer 10proz. Ammoniumchloridlösung mit je 1—2 ccm eines 1proz. Ammoniakessigs gefällt. Es entsteht ein feinflockiger Niederschlag in jenen Röhrchen, die noch Globin in unverdaulichem Zustande enthalten. Die Grenze zwischen globinhaltigen und globinfreien Lösungen ist sehr scharf. Kontrollversuche mit gekochtem Magensaft fallen negativ aus. Zur genaueren Bestimmung kann man dann eine feinere Abstufung in der Weise vornehmen, daß man zwischen der Verdünnung, bei welcher noch ein Präcipitat entstand, und jener die bereits klar blieb, eine Zwischenserie einfügt. Hat sich z. B. bei einem normalen Magensaft nach Probefrühstück die Verdünnungsmenge  $\frac{1}{128}$ — $\frac{1}{256}$  bei Verwendung einer 1proz. Globinlösung und 15 Minuten Dauer des Versuches als die richtige ergeben, so nehme ich die Verdünnung  $\frac{1}{128}$  und mache folgende Verdünnungen

Magensaft . . . . .	1,0	0,8	0,66	0,5
$\frac{1}{10}$ -HCl . . . . .	0	0,2	0,33	0,5

Diese Lösungen werden wieder mit 1 ccm Globinlösung versetzt und jene Verdünnung ermittelt, bei welcher noch nach 15 Minuten bei 40° und nach Ammoniakzusatz ein Niederschlag auftritt. Nimmt man z. B. die Verdünnungsgrenze des normalen Magensaftes gleich 200 und bezeichnet diese Zahl als 100%, so kann man den relativen Prozentgehalt einer Pepsinlösung gegenüber dem normalen Magensaft feststellen.

Vorstehende Methode hat sich mir bei Pepsinbestimmungen im Magensaft sehr bewährt; sie zeichnet sich durch Schnelligkeit der Ausführung — die ganze Bestimmung kann in ca. 30 Minuten beendet sein — durch die Billigkeit und leichte Beschaffung und Herstellung des Ausgangsmateriales aus. Letzteres soll in Bälde auch in geachteten Lösungen hergestellt werden.

---

#### Literatur.

1) Fuld, E., Prüfung der digestiven Tätigkeit des Magens, Spez. Path. u. Ther. inn. Krankh. von Kraus & Brugsch 1914. 2) Grützner, Über eine neue Methode, Pepsinmengen colorimetrisch zu bestimmen. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 1874, S. 452. — 3) Mett, Beitr. z. Physiol. der Absonderungen. Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. 1894, S. 64. — 4) Nierensteiner und Schiff, Über die Pepsinbestimmung nach Mett usw., Arch. f. Verdauungskrankh. 1902, S. 559. — 5) Jacoby und Solms, Über eine neue Methode zur quantitativen Pepsinbestimmung. Zeitschr. f. klin. Med. 1907, H. 1/2, S. 64. — 6) Michaelis, Practicum der physikalischen Chemie. J. Springer. Berlin 1921. — 7) Hammer-schlag, Neue Methode zur quantitativen Pepsinbestimmung. Internat. klin. Rundschau 1894, S. 1393. — 8) Fuld und Levison, Die Pepsinbestimmung mittels der Edestinprobe. Biochem. Zeitschr. 1907, S. 473. — 9) Gross, Die Wirksamkeit des Pepsins und eine einfache Methode zu ihrer Bestimmung. Berl. klin. Wochenschr. 1908, S. 6643. — 10) Schulz, Der Eiweißkörper des Hämoglobins. Zeitschr. f. physiol. Chem. 24, 449. 1898. — 11) Strauss und Grützner, Über Jodglobin. Zeitschr. f. physiol. Chem. 112, 1921, 167.

---

# Das Verhalten des Blutzuckers in verschiedenen Altersstufen nach Einnahme von Glucose per os.

Von  
Wilhelm Löffler.

*(Eingegangen am 15. Dezember 1921.)*

Mit 1 Abbildung im Text.

Der Blutzucker und der respiratorische Gaswechsel sind die beiden exakt meßbaren Größen, die uns beim Menschen einen gewissen Einblick in das unmittelbare Schicksal aufgenommener Kohlenhydrate gewähren.

Durch Johansson ist bekannt, daß beim gesunden Menschen die Mehrproduktion und Ausscheidung von Kohlendioxyd über den individuellen Grundumsatz proportional der eingenommenen Glucosemenge steigt, und zwar werden für je 20 g Glucose je 4 g Kohlensäure mehr ausgeschieden. Das Verhalten des Blutzuckers nach Glucoseeinnahme ist nicht so eindeutig festgelegt. Was endlich die Zuckerausscheidung im normalen Harn betrifft, so ist ihre Beziehung zum intermediären Kohlenhydratstoffwechsel ebenfalls noch nicht eindeutig geklärt, trotzdem der Tatsache des regelmäßigen Vorkommens von Traubenzucker im Urin gesunder Menschen seit ihrem Bekanntwerden ganz besondere Beachtung gewidmet worden ist.

Bis vor kurzem galt noch ziemlich allgemein die Auffassung, daß die physiologische Glucosurie von der Art und der Menge der aufgenommenen Nahrung weitgehend unabhängig sei, wie dies Breul in seiner sorgfältigen unter Naunyn ausgeführten Studie 1898 nachgewiesen hatte. Im Einklang mit dieser Anschauung schien auch die Tatsache zu stehen, daß Einnahme von Glucose per os in Mengen von 200, ja 400 g durchaus nicht regelmäßig Glucosurie erzeugt. Tritt dieselbe nach großen Dosen ein, so variiert sie individuell ziemlich erheblich, ist aber in der Regel nur geringfügig. Eine konstante quantitative Beziehung zwischen der alimentären Glucosurie und dem Blutzuckerniveau hat sich bis jetzt nicht feststellen lassen aus dem einfachen Grunde, weil für die Bestimmung der physiologischen und häufig auch der alimentären Zuckerausscheidung im Harn die Me-

thoden nicht fein genug waren, um die geringfügigen Schwankungen in genügend kurzen Intervallen scharf zu fassen, so daß die Assimilationsgrenze, nach Hofmeister, meist nur für Intervalle von mehrstündiger Dauer genau bestimmbar war. Zweitens, weil ein typisches Verhalten des Blutzuckers im normalen Ablauf der Verdauungsvorgänge nicht mit der erwünschten Regelmäßigkeit festzustellen gewesen ist.

Die folgende kurze Mitteilung bezieht sich auf das Verhalten des Blutzuckers unmittelbar nach Glucoseeinnahme, wie wir dieselbe in systematischen Versuchen im Laboratorium der medizinischen Klinik haben feststellen können, insbesondere auf das Verhalten des Blutzuckers bei alten Individuen gegenüber dem jugendlicher. Trotzdem von einer ganzen Reihe von Autoren ein Ansteigen des Blutzuckerspiegels nach Kohlenhydratzufuhr speziell nach Glucose festgestellt worden ist, wird doch in Arbeiten, die den letzten Jahren angehören — ich erwähne z. B. eine Arbeit der amerikanischen Autoren Taylor und Hulton (1916) —, ein stärkeres Ansteigen des Blutzuckers selbst nach Zufuhr von 400 g Glucose auf einmal vermißt. Damit schien die Hypothese bestätigt, die annimmt, daß die überwiegende Menge der vom Darmkanal aufgenommenen Glucose von der Leber unmittelbar zurückgehalten wird. Nur der geringe Glucoseanteil, der unter Umgehung der Leber in den Kreislauf gelangt, würde nach dieser Auffassung für die Entstehung der alimentären und ebenso der physiologischen Glucosurie in Frage kommen.

Unsere Erfahrungen über die Beeinflussung des Blutzuckerspiegels durch alimentäre Faktoren können nun mit dieser Hypothese kaum mehr in Einklang gebracht werden. Es ergab sich die Tatsache, daß nach Verabfolgung von Glucose bei gesunden Erwachsenen regelmäßig erhebliches Ansteigen des Blutzuckerspiegels stattfindet. In systematischen Untersuchungen hat Staub<sup>1)</sup> im Laboratorium der medizinischen Klinik Basel festgestellt, daß schon die geringe Glucosemenge von 20 g in 100 ccm Wasser gelöst und auf den nüchternen Magen eingenommen eine sehr deutliche, nach Bang bestimmbare und gesetzmäßige Steigerung des Blutzuckerspiegels bedingt. Diese Erhöhung der Blutzuckerwerte wird sozusagen ausnahmslos gefunden unter genauer Berücksichtigung gewisser Kautelen, wie vorangegangener Ernährung, Dauer der Nüchternperiode usf., Momente, die von Dr. Staub sorgfältig festgestellt worden sind in einer Arbeit, die im Druck liegt.

Aus einer großen Zahl von Untersuchungen ergab sich im Mittel ein Nüchtern-Blutzuckerwert von 0,096%; 20 g Glucose bedingten nun im Mittel einen Anstieg auf 0,137%. Im Maximum wurde ein An-

<sup>1)</sup> Staub, Zeitschr. f. klin. Med. 1921.

steigen um 49% bestimmt. Die Tatsache dieser erheblichen Blutzuckersteigerung mag befremden im Hinblick auf die Angaben einer ganzen Reihe von Autoren, daß (Wacker, 1910; Tylor und Hulton, 1916; Liefmann & Stern, 1906; Baudouin, 1908; Tachau, 1911) Glucoseeinnahme von 100—400 g keine oder nur geringe Anstiege der Blutzuckerwerte zur Folge habe. Die Verschiedenheit der Resultate liegt lediglich in einer unterschiedlichen Versuchsanordnung. In den erwähnten Versuchen von Staub wurde die Blutzuckerbestimmung nach Einnahme von 20 g Zucker in Zeitabständen von je 5—10 Minuten ausgeführt. Während die genannten Autoren z. T. erstmals nach 1—3 Stunden den Blutzucker wieder bestimmt haben. Durch die fortlaufende Bestimmung des Blutzuckers in ganz kurzen Intervallen werden Kurven erhalten, wie sie in den Tabellen dargestellt sind. Daraus ist ohne weiteres ersichtlich, daß, wenn erst nach Ablauf von 1—3 Stunden untersucht wird, in der Regel schon wieder normale oder nahezu normale Verhältnisse eingetreten sind.

Dieser Anstieg des Blutzuckerspiegels, der fast ausnahmslos schon 10 Minuten nach Einnahme der Glucose merklich ist, ist zunächst sehr überraschend. Tatsächlich ist die Resorption des zugeführten Traubenzuckers für den Anstieg verantwortlich zu machen, denn bei Zufuhr der Glucose mit der Duodenalsonde fällt der Anstieg der Kurve deutlich steiler aus; bei verlangsamter Magenentleerung dagegen wird eine sehr flache Kurve erhalten.

Es sei an dieser Stelle noch hervorgehoben, daß nach längerer Kohlenhydratkarenz (48 Stunden) durch 20 g Glucose beim gleichen Individuum ein erheblich stärkeres Ansteigen des Blutzuckers hervorgerufen wird als im nüchternen Zustand, d. h. nach 10—15stündigem Hungern<sup>1)</sup>. Die Kohlenhydratkarenz setzt also auch beim Menschen die Assimilationsfähigkeit für Glucose herab, ein Umstand, der im Hinblick auf den von Hofmeister bei Tieren beobachteten Hungerdiabetes von Bedeutung ist.

Die bekannte Tatsache, daß der Nüchternblutzucker im höheren Lebensalter<sup>2)</sup> anzusteigen pflegt und physiologischerweise Werte erhalten werden, die um 20—30% diejenigen jugendlicher Individuen überschreiten und therapeutische Gesichtspunkte gaben die Veranlassung, die Blutzuckerkurve bei Individuen jenseits des 50. Lebensjahres zu verfolgen, und zwar bei Individuen, die zur Zeit der Untersuchung keine schwereren Krankheitserscheinungen aufwiesen. Insbesondere wurden ausgeschlossen Stoffwechselstörungen, Fieber und Dyspnoe, andererseits auch Kachexie, Zustände, die bekanntlich in positivem

<sup>1)</sup> Staub, Helv. chim. acta IV, 281. 1921.

<sup>2)</sup> Bezüglich des gesamten Materials vgl. A. Punschel. J. D. Basel. 1922. Dasselbst auch vollständige Literatur.

oder negativem Sinne den Blutzucker merklich zu beeinflussen imstande sind.

Die Gruppe des Alters von 58—70 Jahren umfaßt 12 Individuen. Der Nüchternblutzucker beträgt im Durchschnitt 0,106%, der maximale Anstieg erreichte durchschnittlich 0,152%. Das Maximum liegt also um 43% höher als der Ausgangswert.

Die Kurve der Leute vom 71.—90. Jahre (10 Fälle) verläuft in ganz ähnlicher Weise. Der Nüchternblutzuckerspiegel liegt mit 0,111% wohl etwas höher, und das durchschnittliche Maximum des Anstieges erreicht 0,165%, was eine Steigerung des Nüchternwertes um 48% bedeutet. Die prozentuale Steigerung über den Nüchternblutzuckerspiegel der betreffenden Altersstufe ist also praktisch gleich, indem sie 44% für jugendliche und 43—48% für alte Individuen beträgt.

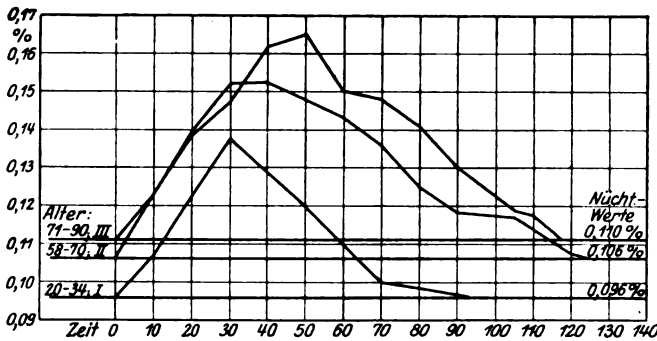


Abb. 1. Verhalten des Blutzuckers in den verschiedenen Lebensaltern und Einnahme von 20 g Glucose per os.

- I. Indiv. v. 20—34 Jahren; nücht. Blutzucker 0,096%; Max 0,137%; Steigerung ü. nücht. Wert 44%
  - II. „ „ 58—70 „ ; „ „ 0,106%; „ 0,152%; „ „ „ 43%
  - III. „ „ 71—90 „ ; „ „ 0,110%; „ 0,165%; „ „ „ 48%
- Bei Berechnung der Dauer und Höhe der Hyperglycämie, wie sie in den Flächen der Kurven (S) zum Ausdruck kommen, ist um den Kurvenabschnitt berücksichtigt, der oberhalb des Nüchternwertes der betreffenden Altersgruppe liegt.  $S_I = 149$  mg;  $S_{II} = 304$  mg;  $S_{III} = 317$  mg;  $S_I : S_{II} : S_{III} = 1 : 2,02 : 2,12$ .

Wird nur die Höhe des Blutzuckeranstieges berücksichtigt, so könnte der Schluß nahe liegen, daß die Erhöhung des Blutzuckerspiegels, wie sie durch 20 g Glucose bedingt wird, für ein junges wie für ein altes Individuum einfach proportional den Nüchternblutzuckerwerten verschoben ist. Außer diesem prozentualen Anstieg der Blutzuckerwerte über den Nüchternblutzucker muß aber noch die Dauer der Glykämie in Betracht gezogen werden.

Während bei den Jugendlichen der Nüchternwert durchschnittlich nach 70 Minuten wieder erreicht ist, erfolgt dies bei den alten Individuen erst nach beinahe der doppelten Zeit. Die Dauer der Hyperglykämie ist wohl für den Organismus ebenso wichtig, wenn nicht wichtiger, als die Höhe derselben. Auf Grund unserer Erfahrungen über Hyperglykämie, bedingt durch 20 g Glucosezufuhr bei Diabetes, können

wir sagen, daß zwar in der Regel die absolut erreichte Höhe erheblich größer ist als bei normalen Individuen, was aber die Kurve des Diabetikers besonders charakterisiert, das ist die ganz auffallend lange Dauer der Hyperglykämie und ihr sehr langsames Absinken auf den Nüchternwert des betreffenden Patienten. Es ist deshalb wohl der Dauer der Blutzuckersteigerung auch beim gesunden Menschen besondere Aufmerksamkeit zu schenken, und es ist nicht bedeutungslos, daß der individuelle Nüchternblutzucker bei alten Individuen durchschnittlich erst nach doppelt so langer Zeit wieder erreicht wird wie bei Jugendlichen.

Die Bedeutung der Glykämie für den Organismus wird aber doch wohl bestimmt durch die Vereinigung beider Faktoren, Höhe und Dauer, wie sie in den Flächen der Kurven, in deren Integralen, zum Ausdruck kommt.

Werden die Durchschnittskurven für die drei verschiedenen Altersstufen gezeichnet und durch Ausschneiden und Wägen desjenigen Kurvenabschnitts, der über dem Nüchternblutzuckerniveau der betreffenden Altersstufe liegt, die Integrale der Kurven gebildet, so verhalten sie sich wie 1 : 1,7 : 1,8. Die beiden letzteren Werte können praktisch wohl als gleich betrachtet werden.

Die Hyperglykämie kommt in ihrer Bedeutung für die Glucosurie natürlich erst von dem Augenblick an in Betracht, da der Schwellenwert überschritten ist. Da bei alten Leuten die relative Steigerung über den Nüchternwert ebenso groß ist wie bei Jugendlichen, der absolute Wert erheblich höher liegt, das Integral der Kurve aber fast den doppelten Wert erreicht, so ist zu vermuten, daß der Teil des Integrals, der oberhalb des Schwellenwertes liegt, ebenfalls größer ist als bei Jugendlichen. Tatsächlich ist auch bei alten Leuten nach Aldor durch verhältnismäßig geringe Glucosegaben schon in einem hohen Prozentsatz alimentäre Glucosurie hervorzurufen. Es ist danach zu vermuten, daß auch bei geringerer Glucosezufuhr die physiologische Glucosurie bei alten Leuten erheblicher ausfällt als bei jugendlichen, vorausgesetzt, daß die Dichtung der Nieren für Glucose mit dem Alter nicht stärker zunimmt als die Steigerung des Nüchternblutzuckerspiegels.

Höhe und Dauer der alimentären Glykämie wird naturgemäß auch durch die Menge der eingenommenen Glucose wesentlich beeinflusst. Werden in analoger Weise individuelle Blutzuckerkurven aufgezeichnet, wie sie nach Einnahme von 20, 40 und 100 g Glucose erhalten worden sind, so verhalten sich die Integrale dieser drei Kurven wie 2 : 3 : 8, während die zugeführte Glucosemenge im Verhältnis von 2 : 4 : 10 steht. Es besteht also nicht lineäre Proportionalität, indem das Integral der Blutzuckerkurve langsamer einem Maximum zuzustreben scheint, als die zugeführten Zuckermengen.

Aus den mitgeteilten Beobachtungen läßt sich also direkt ablesen, daß die durch 20 g bedingte Erhöhung des Blutzuckerspiegels über das



das alte Individuum zeigt also nach Einnahme von 20 g Glucose Veränderungen des Blutzuckers, wie jugendliche sie erst nach der ca. doppelt so großen oder noch etwas größeren Menge aufweisen.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß die beobachtete alimentäre Hyperglykämie eine wesentliche Bedingung der physiologischen Glucosurie darstellt. Untersuchungen über die gegenseitigen Beziehungen dieser Erscheinungen haben wir in Angriff genommen. Erst durch die systematische Verfolgung von Blut- und Harnzucker in ganz kurzen Intervallen wird es gelingen, den Einfluß der renalen Komponente festzusetzen.

Von Interesse sind in diesem Zusammenhang unsere allerdings wenig zahlreichen Beobachtungen von Graviden, bei denen in Übereinstimmung mit Salomon ein auffallend niedriger Blutzuckerwert gefunden wurde, bei denen der Anstieg des Blutzuckerspiegels nach 20 g Glucose erheblich hinter dem der Norm zurückblieb; dies ist als erhöhte Durchlässigkeit der Nierengraviden für Zucker zu deuten, so daß Frank und Nothmann die alimentäre renale Glucosurie direkt als eines der frühesten Zeichen bestehender Gravidität diagnostisch verwerten.

Daß die physiologische Glucosurie tatsächlich durch die Art der Nahrung beeinflußt werden kann, hat Schöndorff in seinen bekannten Untersuchungen an Soldaten in qualitativer Hinsicht gezeigt, quantitativ ist diese Frage von Nagasaki durch Vergärung des Urins mit *Torula monosa* nach Eingabe größerer Glucosemengen verfolgt worden. Erst in neuester Zeit haben S. R. Benedict, Osterberg und Neuwirth<sup>1)</sup> in Selbstversuchen die physiologische Glucosurie nach geringen Glucosegaben verfolgt. Es ist im Zusammenhang mit unseren Feststellungen über das Verhalten des Blutzuckers im Alter von Interesse, daß bei der ältesten Versuchsperson Benedicts (53 Jahre) die „Glucurese“, wie die Autoren die physiologische „Glucurese“ zu bezeichnen vorschlagen, bei weitem am stärksten ausgefallen ist. Die Blutzuckerwerte sind in keinem der erwähnten Fälle verfolgt worden.

In therapeutischer Hinsicht geben unsere Resultate den wichtigen Hinweis darauf, daß, wenn eine Erhöhung des Blutzuckers z. B. bei Herzkranken erwünscht ist, dies sehr einfach durch Verabreichung von Glucose per os erreicht werden kann. Wir haben tatsächlich bei gewissen Fällen cardial bedingter Dyspnöe erhebliche subjektive Besserung gesehen, ähnlich wie bei intravenöser Applikation des Traubenzuckers nach Büdingen. Die subjektive Besserung war in einem Fall immerhin derart, daß sich die Patientin gerne den fortgesetzten Blutentnahmen unterzogen hat, ein Umstand, der eher gegen eine suggestive Wirkung spricht. In geeigneten Fällen lassen sich also ähnliche Veränderungen des Blutzuckers und damit therapeutische Wirkungen erzielen, wie nach dem Verfahren von Büdingen. Die durchaus physiologische Traubenzuckerzufuhr per os hat neben dem Vorteil völliger Gefährlosigkeit denjenigen allgemeinsten Anwendbarkeit.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. **34**, 217. 1918.

# Zur Wasser- und Ionenverteilung im Organismus.

Von  
**Heinrich Reichel.**

(Aus dem hygienischen Institute der Universität Wien.)

(Eingegangen am 24. Dezember 1921.)

Es erscheint heute, hauptsächlich dank den Forschungen Franz Hofmeisters und seiner Schule (Spiro, Pauli u. a.), nicht mehr zweifelhaft, daß die den lebenden Zelleib charakterisierenden Zustände als mikroheterogene Gleichgewichte wässriger und anderer Phasen vorzustellen sind, in denen sich die ungeheure Mannigfaltigkeit der Konzentrationsverhältnisse der gar nicht sehr zahlreichen vorhandenen Stoffe vorwiegend durch ihre Lösungsverteilung herstellt und erhält. Daneben sind naturgemäß die durch Flächenkräfte hervorgerufenen Abweichungen von der Gleichmäßigkeit der Konzentration innerhalb der einzelnen Phasen von Bedeutung, doch sind es eben doch die Lösungskräfte, die das Bild beherrschen. Die für die ganze Physiologie so beachtenswerten elektromotorischen Phasengrenzkräfte (Haber, Beutner) erscheinen unmittelbar als durch die Beziehungen der Lösungsverteilung bestimmt.

Als der wichtigste Stoff, dessen eigene Verteilungsgleichgewichte das wesentliche Gefüge des lebenden Plasmas ausmachen und fast alle anderen entscheidend beherrschen, tritt das Wasser auf; sowohl das Wasser als Ganzes, als  $H_2O$ , als Lösungsmittel und als Lösungstoff, als auch in seinen, in ihren Konzentrationen durch die Dissoziationskonstante miteinander verknüpften elektrolytisch dissoziierten Teilen:  $H^+$  und  $OH^-$ , den beiden mit den weitaus größten bekannten Geschwindigkeiten wandernden, d. h. den beiden reaktionsfähigsten Ionen. Die überraschenden chemischen Leistungen der Zelle bei verhältnismäßig niedrigen Temperaturen werden, worauf schon Hofmeister<sup>1)</sup> hinwies, grundsätzlich verständlich, sobald wir uns diese mannigfachen, zum Teil gegenläufigen Vorgänge nicht als in einem Gefäße, einer Phase ablaufend zu denken haben, sondern annehmen dürfen, daß räumlich

---

<sup>1)</sup> Die chemische Organisation der Zelle. Braunschweig 1901.

nebeneinander ganz verschiedene Wassergehalte und ganz verschiedene  $H^+$ -Gehalte (und demgemäß auch  $OH^-$ -Gehalte) dauernd herrschen können. Starke Säuren und Laugen vermögen ja fast alle jene erstaunlichen Reaktionen zu leisten [Schade<sup>1)</sup>, C. E. Carlson<sup>2)</sup>].

Von diesem Gedanken führt nur ein Schritt zu dem anderen: daß eben der als verschieden anzunehmende Wassergehalt der Zellphasen vielleicht auch eine verschiedene Größe der elektrolytischen Dissoziationskonstante für die einzelnen Phasen mit sich bringen könnte, ja glaublich mit sich bringen dürfte. Damit wäre aber nicht weniger gesagt, als daß in irgendwelchen Phasen des Zelleibes die Koexistenzfähigkeit der beiden ausgezeichneten Ionenarten eine größere sein könnte und sein dürfte, als wir sie für das Gefüge des Wassers selbst kennen und als allgemeingültig anzusehen gewohnt sind, daß also eine nichtwässerige oder wasserarme Zellphase grundsätzlich zugleich starke Säure und starke Lauge sein könnte, so daß sich in ihr Reaktionen abzuspielen vermöchten, als deren Schauplatz wir bisher zwei räumlich getrennte Phasen anzunehmen uns genötigt glaubten.

Über die elektrolytische Dissoziation in nichtwässerigen Phasen ist bisher wenig bekannt. Erst in jüngster Zeit haben eben die schon oben erwähnten Beobachtungen über elektromotorische Phasengrenzkkräfte das Interesse für diese Frage wachgerufen. Es war aber schon vorher klar, daß die elektrolytische Dissoziation des Wassers offenbar eine Ausnahmestellung einnimmt; gerade sie muß in jenem phasenbildenden Stoffe fast verschwindend gering sein, in dem alle anderen Elektrolyte ihre höchste Ionisation erreichen: im Wasser. Die überschüssige Gegenwart des Grundstoffes drängt ja überall die Dissoziation zurück und so auch im Wasser. Die elektrolytische Dissoziation der Elektrolyte in nichtwässerigen Phasen ist erfahrungsgemäß so gering, daß sie durch lange Zeit der Beobachtung oder doch der Aufmerksamkeit entgehen konnte. Das beruht eben auf der Sonderstellung des Wassers unter allen Stoffen der Welt, dessen Dielektrizitätskonstante, ebenso wie alle seine anderen Naturkonstanten, von der der anderen Stoffe weit abweicht. Die elektrolytische Dissoziation des Wassers jedoch mag recht wohl anderswo größer, viel größer sein als im Wasser.

Es fragt sich nun: hat der Zelleib solche nichtwässerige, d. h. fast wasserfreie oder doch sehr wasserarme Phasen, für die solches zutreffen könnte? Die Frage ist unbedingt mit ja zu beantworten. Schon aus Hofmeisters Forschungen über Leimplattenquellung<sup>3)</sup> geht hervor, daß die große Hauptmenge des Quellungswassers von Gallerten als capillar imbibiert, d. h. als mechanisch festgehalten zu betrachten ist,

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. 7, 299. 1908.

<sup>2)</sup> H. 55, 260. 1908.

<sup>3)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 27, 395. 1890; 28, 210. 1891.

etwa wie das Wasser im nassen Badeschwamm, weil sich die Salzverteilung zwischen Gallerte und Flotte in erster Annäherung so berechnen läßt, als ob das Salz sich im Volumen des Gallertwassers, nicht im Volumen der Gallerte löste. Daneben sind dort immer nur kleine Mengen molekular imbibierten Quellungswassers, d. h. eines Wassers, das in der festen Gallertphase als gelöst, als der Flotte wirklich entzogen und als salzfrei zu betrachten ist, zu berechnen.

Die Untersuchungen von Bugarski und Liebermann<sup>1)</sup> sprechen in derselben Richtung und beweisen mit der noch strengeren Methode der Gefrierpunktserniedrigungsmessung die Nichtbindung der Neutralsalze an das organische Kolloid. Auch aus M. H. Fischers<sup>2)</sup> Untersuchungen geht hervor, daß keine anderen Ionenarten in die Kolloidphase einzudringen vermögen, als eben die des Wassers. Widersprechende Anschauungen, die in der Eiweiß- und Kolloidliteratur häufig vorkommen, erscheinen keineswegs als ausreichend gestützt.

In eigenen, älteren Untersuchungen<sup>3)</sup> konnte gezeigt werden, daß auch die Phänomene der Lösungsverteilung gewisser Gifte (Phenolkörper) über die Phasen des Zelleibes sich in einfacher Weise nur verstehen lassen, wenn die eiweißreichen Zellphasen als sehr wasserarm und als salzfrei angenommen werden. In einer späteren Arbeit [Gegenbauer und Reichel<sup>4)</sup>] wurde das schon so oft geprüfte Verhalten der Säuren zum Eiweiß zum Gegenstand neuer Überlegungen und Versuche gemacht mit dem Ergebnisse, daß auch hier überraschend einfache und für fast alle nachrechenbaren Literaturdaten gut übereinstimmende Bindungsverhältnisse eben unter Zugrundelegung derselben Annahmen über Wasserarmut und Salzfreiheit der Kolloidphasen abzuleiten waren. Daraus ergab sich dort eine hypothetische, doch wohl glaubliche Erklärung der physiologischen Quellungs-, Gift- und Ferment- (Pepsin-) Wirkungen von Säuren in Kombination mit Salzen, wobei dem an Eiweiß gebundenen Säureanteil eine elektrolytische Dissoziation in der kolloidalen Phase zugeschrieben wird.

Es sind mannigfache Wege denkbar und zum Teil schon betreten, auf denen über die Tragfähigkeit solcher Vermutungen Gewißheit gewonnen werden könnte. Zunächst war jedoch aufzuklären, warum die durch einen Indicator eben neutralfarbig erscheinenden Säureeiweißlösungen auf Zusatz von Neutralsalzen gegen den sauren Farbenton umfärben. Diese Erscheinung wurde nämlich wiederholt [Robertson<sup>5)</sup>,

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **72**, 51. 1898.

<sup>2)</sup> Das Ödem. Dresden 1910.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschr. **22**, 149, 177, 201. 1908.

<sup>4)</sup> Arch. f. Hyg. **78**, 1. 1912.

<sup>5)</sup> Ergebn. d. Physiol. **12**, 216. 1910.

Pauli und Handowsky<sup>1)</sup>, Pauli<sup>2)</sup>, Manabe und Matula<sup>3)</sup>] als ein Beweis einer Reaktion zwischen dem Kolloid und dem Salze gedeutet, was den entwickelten Vorstellungen widersprechen würde und auch sonst zu schwierigen Annahmen als Folgerungen führt.

Die Erscheinung kann deutlich beobachtet werden, wenn man zu der einen Hälfte einer Probe von 100 ccm Volumen, die 15 ccm dialysiertes Pferdeserum, also etwa 1,5% Eiweiß, 4 ccm  $n/2$ -Salzsäure, also 0,073% HCl und 10 Tropfen Methylorangelösung enthält, eine Kochsalzmenge von 0,2 g hinzufügt. Die salzfreie Hälfte erscheint gelb, die salzhaltige orange, so daß es den Anschein gewinnt, als wären durch das Neutralsalz der Flüssigkeit H-Ionen zugeführt worden.

Die Aufklärung bringt folgender Versuch: anstatt des flüssigen Pferdeserums wird hitzeokoaguliertes in feingehacktem Zustande der Probe zugeführt, die sonst die gleichen Bestandteile wie die eben beschriebene enthält. Anfangs rot gefärbt, wie vor dem Eintragen der Eiweißsuspensa, verliert die Flotte rasch an Farbenkräftigkeit, wird — ohne den Farbeton selbst zu ändern — rosarot. Die Suspensa färben sich dabei gelb, so daß die ganze Probe in umgeschüttelten Zustande und von einiger Entfernung betrachtet einen orangefarbigen Eindruck macht, ganz so ähnlich, wie die analoge Probe mit gelöstem Eiweiß. Teilt man nun die Probe in zwei Hälften, deren eine den Kochsalzzuschlag erhält, so tritt in dieser eine Umfärbung ein, die zunächst als Rötung erscheint, sich jedoch bei genauerer Betrachtung als dadurch bedingt erweist, daß die im Ton kaum geänderte Flottenfärbung wieder stärker geworden ist, während die Suspensa abgeblaßt sind. Eine genaue Titration der abfiltrierten Flotten mit  $n/10$ -Lauge ergibt sogar — in voller Übereinstimmung mit älteren Feststellungen [Gegenbauer und Reichel<sup>4)</sup>, Manabe und Matula<sup>5)</sup>] — immer eine etwas geringere Acidität der Salzflotte als der salzfreien. Es hat also in der Flotte nicht bloß keine Säuerung stattgefunden, sondern, wie zu erwarten, ein leichter Säureverlust und der gegenläufige Farbwechsel erscheint bedingt durch die Wiederabgabe des Farbstoffes aus den Suspensis an die Flotte unter der Einwirkung des Neutralsalzes. Die — immer — rote Flottenfarbe überwiegt im Gesamteindruck die nur mehr blaßgelbe-Farbe der Suspensa.

Ganz dieselbe Erklärung ist nun auch für das Umfärben durch Salz in der Probe mit flüssigem Serum zu geben. Die Säuerung ist nur eine scheinbare, durch die Zweiphasigkeit des Systems vorgetäuscht. Sie

---

1) Diese Zeitschr. 18, 340. 1909.

2) Abderhaldens Festschr. d. naturw. Forschung 5. 1912.

3) Diese Zeitschr. 52, 369. 1913.

4) l. c.

5) l. c.

bedarf also keiner Erklärung durch Reaktionen zwischen Neutralsalz und Kolloid. Das Phänomen der Beeinflussung der Farbstoffverteilung durch die Salzgegenwart in der Flotte hat nichts Überraschendes, beachtenswert erscheint vielleicht nur noch der gelbe Farbton des Indicators in der Kolloidphase: in dieser muß ja eine weit höhere Säurekonzentration und, nach den Quellungs-, Gift- und Fermentwirkungen der Säuren zu schließen, auch eine höhere  $H^+$ -Ionenkonzentration als in der Flotte vermutet werden; weil aber diese Phase praktisch als wasserfrei, d. h. als eine nichtwässerige zu denken ist, kann über den Farbenton des Indicators in ihr aus dessen Verhalten in wässrigen Phasen nichts abgeleitet werden.

Die ganze Erscheinung der Umfärbung von Säureiweißlösungen durch Neutralsalze bildet somit keinen Einwand gegen die entwickelten Vorstellungen der Wasserarmut und Salzfreiheit der Kolloidphasen, sondern kann sogar zu ihrer Bestätigung herangezogen werden.

## Zur Kenntnis der Carboligase.

### III. Mitteilung.

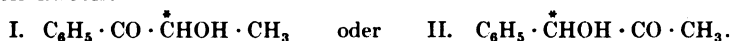
#### Der Bau der biosynthetisch verknüpften mehrgliedrigen Kohlenstoffketten.

Von

Carl Neuberg und Heinz Ohle.

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

Vor einiger Zeit haben C. Neuberg und J. Hirsch<sup>1)</sup> ein Ferment der Hefe beschrieben, das eine kernsynthetische Vereinigung von verschiedenen Kohlenstoffketten herbeiführt.<sup>2)</sup> Es erzeugt z. B., wenn man einer gärenden Lösung von Zucker oder Brenztraubensäure Benzaldehyd zusetzt, einen Ketonalkohol, für dessen Struktur die Autoren folgende beiden Möglichkeiten in Betracht gezogen haben:



Formal erscheint diese Verbindung zusammengefügt aus Benzaldehyd und Acetaldehyd zu gleichen Molekülen. Acetaldehyd kann in der Tat sowohl bei der Gärung von Brenztraubensäure als von Zucker auf den von Neuberg und seinen Mitarbeitern erkannten Wegen entstehen. Aber es ist nicht gelungen, für die biochemische Synthese fertigen Acetaldehyd zu verwenden; d. h. das Bittermandelöl und der Acetaldehyd selbst treten nicht unter dem Einflusse des Carboligase genannten Enzyms zusammen. Es muß daher irgendwie eine reaktionsbereite Form oder Vorstufe des Acetaldehyds, die bei der Gärung intermediär sich bildet, die Kohlenstoffkettenbrücke schlagen.

Durch diese und andere Eigenschaften ist die Carboligase von allen sonstigen Fermenten differenziert. Von den gewöhnlichen und zum Teil umkehrbar wirkenden hydrolysierenden Enzymen weicht die Carboligase dadurch ab, daß sie eine neue Kohlenstoff-Kohlenstoffkettenbindung herstellt. Die so erzielte Vereinigung mehrgliedriger Kohlenstoffketten ist zugleich durchaus verschieden von der Cyan-

<sup>1)</sup> C. Neuberg und J. Hirsch, diese Zeitschr. **115**, 282. 1921.

<sup>2)</sup> Vergl. auch C. Neuberg u. L. Liebermann, diese Zeitschr. **121**, 311. 1921.

hydrinreaktion, der bekannten, durch mannigfache Zusätze wie auch durch Fermente (Rosenthaler) katalysierbaren Anlagerung von Blausäure an Carbonylverbindungen. Denn — von anderen trennenden Merkmalen abgesehen — verläuft die Oxynitrilbildung mit den Komponenten von selbst und führt zu unschwer in die Bestandteile wieder zerfallenden Produkten. Die HCN-Reaktion ist — je nach der Gleichgewichtslage — in breiten Grenzen umkehrbar; dabei beeinflußt das Ferment oder ein in ihm enthaltener asymmetrischer Katalysator nicht enzymatischer Natur nach Fajans<sup>1)</sup> und Nordefeldt<sup>2)</sup> im wesentlichen die sterischen Verhältnisse des entstehenden Anlagerungsproduktes in Analogie zur entsprechenden Wirkung optisch aktiver Chemikalien (Bredig, Fajans, Fiske). Bei der Carboligase aber wird die Verbindung zwischen zwei Körpern hergestellt, die in meßbaren Zeiten keine Affinität zueinander bekunden und sich demgemäß, soweit bekannt ist, in der genannten Richtung auch nicht freiwillig vereinigen; ferner sind die carboligatischen Erzeugnisse fermentativ nicht wieder spaltbar befunden worden; auch sind sie recht beständige, nicht zum Selbstzerfall neigende Substanzen. Hinzu kommt weiter, daß das Substrat, das mit dem Benzaldehyd oder seinen Homologen verknüpft wird, der Acetaldehyd, an sich eine Kohlenstoffreihe darstellt, und daß er nicht — wie die lediglich ein Kohlenstoffatom enthaltende Blausäure bei der Cyanhydrinbildung — in fertigem Zustande vorhanden sein darf; vielmehr ist der Acetaldehyd überhaupt nur in Form einer Vorstufe oder in einer passageren Gestalt umsetzungsfähig, also unter Bedingungen, wie sie im Gärakte in irgendeiner Weise gegeben sind.

Um in den Mechanismus der Carboligasewirkung eindringen zu können, war es von hauptsächlicher Bedeutung, die Struktur des einfachsten Ketonalkohols festzustellen, der unter der Wirkung des genannten Ferments entsteht. C. Neuberg und J. Hirsch haben gefunden und C. Neuberg und L. Liebermann konnten bestätigen, daß sich diese Synthesen rein enzymatisch ausführen lassen, daß es aber weit bequemer ist, mit lebenden Erregern zu arbeiten. Deshalb wurde für die nachstehend beschriebenen Untersuchungen der Körper nur durch Zuckervergärungen mittels frischen Hefen bereitet.

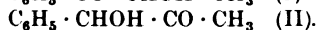
#### Konstitutionsbeweis.

Auf Grund der Bruttoformel, der Eigenschaften sowie der biochemischen Entstehungsweise hatten C. Neuberg und J. Hirsch, wie zuvor erwähnt, zunächst die beiden Formeln I und II zur Diskussion gestellt:

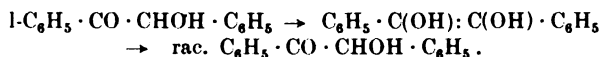
<sup>1)</sup> K. Fajans, Zeitschr. f. physikal. Chem. **73**, 25 u. **75**, 232. 1910.

<sup>2)</sup> E. Nordefeldt, diese Zeitschr. **118**, 15. 1921.

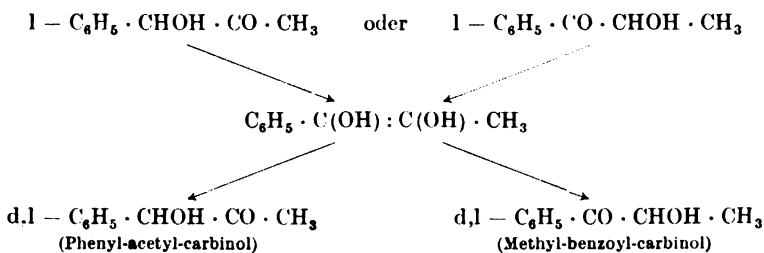




Die Racemformen beider Verbindungen sind bereits gewonnen worden, und zwar die erste von v. Auwers<sup>1)</sup>, die zweite von Carapelle<sup>2)</sup> und von Wren<sup>3)</sup>. Genau wie unser carbolygatisch erzeugter aliphatisch-aromatischer Ketonalkohol wird nun nach Wren das optisch aktive Benzoin  $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \overset{*}{\text{C}}\text{HOH} \cdot \text{CO} \cdot \text{C}_6\text{H}_5$  leicht racemisiert; dabei wird angenommen, daß dieser Prozeß über die Enolform, über das Dioxy-stilben, verläuft:



Da nun im Falle des gemischten Ketonalkohols die substituierenden Radikale der beiden mittleren Kohlenstoffatome verschieden sind, so braucht nicht ein Racemisierungsprodukt zu entstehen, sondern man darf nach Pseudomerisierung zum Dioxy-propenyl-benzol die beiden Isomeren



erwarten.

Damit entfiel die Möglichkeit, einfach durch Racemisierung unseres optisch aktiven Ketols und Überführung der inaktiven Form in ein am Carbonyl substituiertes wohldefiniertes Derivat die Beziehung des drehenden Ausgangsmaterials zu dem einen oder dem anderen der beiden isomeren Ketonalkohole abzuleiten. Zudem erschien es nicht ganz gewiß, ob die von den genannten Autoren erhaltenen Produkte tatsächlich den ihnen zugeschriebenen Formeln entsprechen. Daß diese Zweifel berechtigt waren, wird später besprochen werden. Wir mußten also andersartige und zugleich schonende Eingriffe am Molekül unseres Ketols vornehmen, die zu bekannten optisch-inaktiven Substanzen führten, ohne dabei die ursprüngliche unregelmäßige Verteilung der

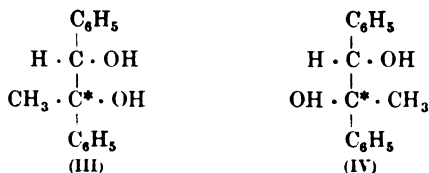
<sup>1)</sup> K. v. Auwers, B. **50**, 1180. 1917. Die von Th. Zinke und K. Zahn (B. **43**, 855. 1910) durch Oxydation des unsym. Methyl-phenyl-glykols gewonnene und von K. v. Auwers auf Grund der Molekularrefraktion von 42,18 als Verbindung I angesprochene Substanz scheint, jedenfalls nach einiger Zeit, beide Isomere zu enthalten. (Vgl. unsere in Kürze erscheinende Mitteilung IV.)

<sup>2)</sup> E. Caparelle, Gaz. chim. **33**, II, 261. 1903.

<sup>3)</sup> H. Wren, Journ. chem. soc. **95**, 1593. 1909.

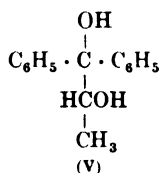
Radikale beim Ausgangsmaterial zu zerstören. Als geeignet erwies sich die Behandlung des Ketols mit Phenyl-magnesiumbromid. Dabei sind folgende Umsetzungen möglich:

a) Aus  $C_6H_5 \cdot CHOH \cdot CO \cdot CH_3$  können infolge der Neubildung eines zweiten (mit Stern bezeichneten) asymmetrischen Kohlenstoffatoms zwei optische Isomere (III und IV) entstehen:



Welches von beiden auftritt, war für unsere Zwecke ohne Belang, da ein aktives Glykol wohl in reinem Zustande abgetrennt wurde, nicht aber dadurch charakterisiert werden sollte; vielmehr wurde das von beiden Formen gemeinsam sich ableitende, jetzt optisch-inaktive Keton  $C_6H_5 \cdot CO \cdot CH(CH_3)(C_6H_5)$  bereitet.

b)  $C_6H_5 \cdot CO \cdot CHOH \cdot CH_3$  würde die ebenfalls noch optisch-aktive Verbindung



liefern.

Beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure gehen, wie gesagt, die Verbindungen III bzw. IV in Methyl-phenyl-acetophenon (Methyl-desoxy-benzoin)  $C_6H_5 \cdot CO \cdot CH(C_6H_5)(CH_3)$  über, dessen Semicarbazon bei  $194^\circ$  schmilzt<sup>1)</sup>.

Die Verbindung V liefert bei der entsprechenden Behandlung mit  $H_2SO_4$  unsym. Diphenyl-aceton  $(C_6H_5)_2CH \cdot CO \cdot CH_3$ , dessen Semicarbazon sich bei  $170^\circ$  verflüssigt<sup>2)</sup>.

Dieses Vorgehen besitzt den außerordentlichen Vorzug, daß man in der ersten Phase noch optisch-aktive Substanzen erhält und so eine Kontrolle darüber ausüben vermag, ob das Ausgangsmaterial ungeschädigt in die Reaktion eingetreten oder vorher racemisiert ist. Im letzteren Falle hätte sich natürlich die weitere Aufarbeitung erübrigt, da ja bei der Inaktivierung die beiden Isomeren I und II nebeneinander entstehen können, die dann ein Gemisch von Diphenyl-aceton und Methyl-phenyl-acetophenon ergeben würden. Ist aber erst einmal die Stellung der Carbonylgruppe durch die Einfügung

<sup>1)</sup> M. Tiffeneau und Dorlencourt, C. r. **143**, 126. 1906.

<sup>2)</sup> R. Stoermer, B. **39**, 2303. 1906; M. Tiffeneau und Dorlencourt, l. c.

des neuen Phenylrestes festgelegt worden, so kann die dann bewirkte Racemisierung sowie anhydrierende Umlagerung nur zu einem eindeutigen Produkte führen.

Auf diesem Wege konnte nun in der Tat aus unserem Ketonalkohol l- $\alpha$ ,  $\beta$ -Diphenylpropylenglykol<sup>1)</sup>  $C_6H_5 \cdot CH(OH) - C(OH)(CH_3)(C_6H_5)$  (Formel III bzw. IV) erhalten werden, das augenscheinlich identisch ist mit dem von A. Mc Kenzie und H. Wren<sup>2)</sup> aus l-Benzoin und Methyl-magnesiumjodid gewonnenen Präparat. Wir fanden den Schmelzpunkt allerdings etwas höher, nämlich bei 83–84° statt 81–82° und  $[\alpha]_{18}^D = +45,1^\circ$  in Alkohol und  $[\alpha]_{17}^D = +31,85^\circ$  in Aceton. (Die englischen Forscher gaben  $[\alpha]_{12,5}^D = +34,0^\circ$  für die acetonische Lösung an.) Die Ausbeuten an Glykol waren nicht groß, doch erklärt sich dies daraus, daß das Glykol eine geringere Neigung zur Krystallisation zeigte, indem es mit Biphenyl vermischt war. Ferner ist auch möglich<sup>3)</sup>, daß sich das andere Epimere gebildet hat, wodurch natürlich die Reingewinnung unseres Präparates beträchtlich erschwert wird. Daß aber die Anwesenheit des isomeren  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ ,  $\beta$ -diphenyl-äthylenglykols (Verbindung V) ausgeschlossen ist, folgt zunächst aus der Farbenreaktion des Rohproduktes mit konzentrierter Schwefelsäure, das in diese mit einem rein violetten Ton übergeht, während diese Lösung bei Gegenwart des Isomeren V rot tingiert ist, worauf wir weiter unten noch zurückkommen. Behandelt man andererseits die öligen Mutterlaugen des krystallisierten Glykols zwecks Ketonisierung mit verdünnter Schwefelsäure, so gewinnt man keinen Anhaltspunkt für die Entstehung von Diphenyl-aceton, das bei der großen Krystallisationsfähigkeit seines Semicarbazons leicht hätte gefaßt werden müssen; es wurden vielmehr aus der Mutterlauge (neben Biphenyl) nur geringe Mengen desselben Phenyl-methyl-acetophenons erhalten, das auch aus dem festen Anteil entsteht.

Aus alledem darf wohl die Folgerung gezogen werden, daß dem carboligatisch hervorgebrachten Ketol die Konstitution des am endständigen Kohlenstoffatom phenylierten Brenztraubenalkohols  $C_6H_5 \cdot CHO \cdot CO \cdot CH_3$  zukommt<sup>4)</sup>.

<sup>1)</sup> Dies Methyl-hydrobenzoin sei trotz seiner Rechtsdrehung als l-Verbindung bezeichnet, um den Zusammenhang mit seinen Muttersubstanzen, dem lävogyren Phenylacetyl-carbinol bzw. l-Benzoin, erkennen zu lassen.

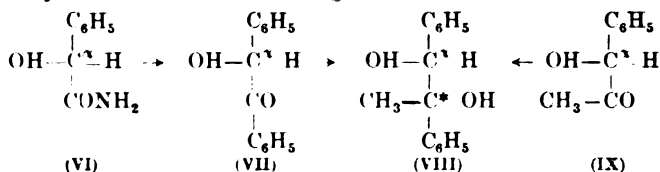
<sup>2)</sup> A. Mc Kenzie und H. Wren, Journ. chem. soc. **97**, 473. 1910.

<sup>3)</sup> Bei der Einwirkung von Methyl-magnesiumjodid auf l-Benzoin entsteht nach Mc Kenzie und Wren (l. c.) ausschließlich das eine Epimere; es brauchen jedoch beim Benzoin und dem aliphatisch-aromatischen Ketonalkohol die Verhältnisse bei der Behandlung mit einer Grignard-Verbindung nicht gleich zu liegen.

<sup>4)</sup> Auf die Möglichkeit der Tautomerie mit der Halbacetalform  $C_6H_5 \cdot CH \cdot C(OH) \cdot CH_3$  sei nur verwiesen.

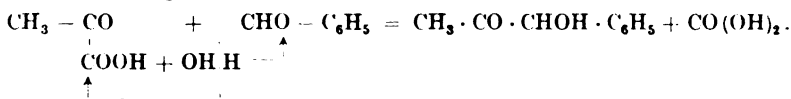


Die angewendete Methode ermöglicht auch gewisse Betrachtungen über die sterische Anordnung am asymmetrischen Kohlenstoffatom jenes Oxy-oxo-propyl-benzols. Wie wir oben bereits bemerkt haben, ist das aus ihm bereitete gemischte Glykol identisch mit dem von Wren aus l-Benzoin erhaltenen; dieses selbst hatte jener Autor aus l-Mandelsäureamid gewonnen. Schreibt man also letzterem die Konstitution VI und dem daraus erzeugten Benzoin die Formel VII zu, so kommt die Rechtsdrehung des Glykols VIII durch die Asymmetrie des mit \* bezeichneten C-Atoms zustande, die sich auch bei der Darstellung unseres Glykols aus der Verbindung IX erst einstellt:



Demnach dürfte die Anordnung der Substituenten am Kohlenstoffatom  $\alpha$  bei allen 4 Substanzen die gleiche sein.

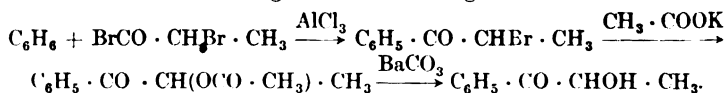
Die Resultate dieser Arbeit lassen es vielleicht als diskutabel erscheinen, daß die biochemische Synthese unter Mitwirkung von 1 Mol Wasser in folgendem Sinne zustande kommt:



Diese Formulierung würde auch die Tatsache zu beleuchten vermögen, daß freier Acetaldehyd unter dem Einflusse der Hefe nicht mit Benzaldehyd koppelt (Neuberg und Hirsch l. c.).

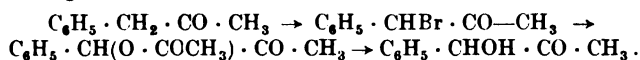
Wie im vorstehenden bereits erörtert wurde, können bei der Inaktivierung des optisch-aktiven Phenyl-acetyl-carbinols das racemische Phenyl-acetyl-carbinol und das racemische Methyl-benzoyl-carbinol entstehen. Die Vermutung lag nun nahe, daß auch die entsprechenden racemischen Verbindungen sich ineinander umlagern bzw. sich ins Gleichgewicht miteinander setzen würden. Da wir in der Literatur keine Hinweise auf diese Beziehungen gefunden haben, andererseits aber das Vergleichsmaterial so spärlich war, daß es keine sicheren Rückschlüsse in dieser Hinsicht gestattete, haben wir auch die racemischen Verbindungen dargestellt und untersucht.

Das d, l-Benzoyl-methyl-carbinol wurde nach der Anleitung von v. Auwers durch folgende Umsetzungen erhalten:

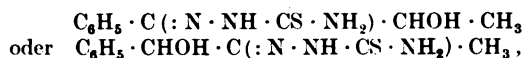


Wir können die Angaben des Autors durchaus bestätigen, doch zeigte es sich, daß das einige Tage aufbewahrte Präparat nicht mehr den anfänglichen Brechungsexponenten  $n_{20}^D = 1,5368$  hatte, sondern daß derselbe auf den Wert  $n_{20}^D = 1,5338$  gesunken war. Das aus diesem Produkt gewonnene Semicarbazon schmolz bei  $192^\circ$ , das Thiosemicarbazon bei  $208-209^\circ$  (unter Zersetzung).

Das d, l-Phenyl-acetyl-carbinol versuchten wir zunächst aus racem. Mandelsäureäthylester und Methyl-magnesium-jodid zu bereiten. Bei Anwendung von 1 Mol der Grignard-Verbindung auf 1 Mol des Esters erhielten wir indessen das Ausgangsmaterial unverändert zurück. Bei Anwendung von 2 Mol Magnesium-jodmethyl entstand nur  $\alpha$ -Phenyl- $\beta$ ,  $\beta$ -dimethyl-äthylenglykol, wie auch Wren und McKenzie<sup>1)</sup> beobachtet haben, aber keine Spur einer Substanz, die Fehlingsche Lösung wie das Ketol reduzierte. Die genannten Autoren sind zum d, l-Ketonalkohol vom Mandelsäureamid aus gelangt. Wir gingen auch von rohem Benzaldehyd-cyanhydrin aus, das ihn bei Behandlung mit Methyl-magnesium-jodid ebenfalls, allerdings in sehr geringer Ausbeute, lieferte. Zur Gewinnung größerer Mengen sind wir dem umständlicheren, von Cara pelle beschrittenen Weg gefolgt, der durch folgende Teilstrecken gekennzeichnet ist:



Das Benzyl-methyl-ke-ton haben wir nach der Vorschrift von H. Metzner<sup>2)</sup> durch Reaktion von Phenyl-acetylchlorid mit Natrium-malonester und darauffolgende Spaltung des Kondensationsproduktes durch Kochen mit 20 proz. Salzsäure gewonnen. Der Ketonalkohol selbst ging unter 31 mm Druck bei  $143-145^\circ$  über und besaß nach 24stündigem Aufbewahren den Brechungsexponenten  $n_{20}^D = 1,5331$ . Das Thiosemicarbazon schmolz bei  $201,5^\circ$ <sup>3)</sup>. Eine Mischung desselben mit dem Thiosemicarbazon, das in mäßiger Ausbeute aus aufbewahrttem Auwersschen Benzoyl-methyl-carbinol erhältlich war, verflüssigte sich bei  $201^\circ$ . Eine gleichzeitig miterhitzte Kontrollprobe des letzteren für sich schmolz bei  $200^\circ$ . Beide Substanzen sind also identisch. Die verhältnismäßig geringe Ausbeute an Thiosemicarbazon läßt jedoch darauf schließen, daß auch das andere Isomere in den Mutterlaugen vorhanden war; der Nachweis desselben in Substanz glückte jedoch nicht. Welche Formel diesem Thiosemicarbazon zukommt, ob



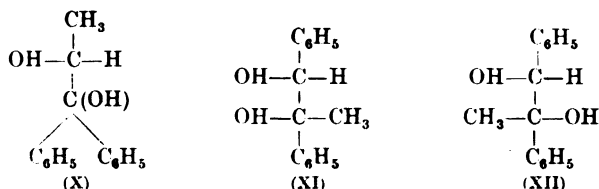
<sup>1)</sup> l. c.

<sup>2)</sup> H. Metzner, Ann. **298**, 374. 1897.

<sup>3)</sup> Der Schmelzpunkt der Thiosemicarbazidverbindung (wie auch des Semicarbazons) variiert etwas mit der Geschwindigkeit des Erhitzens.

läßt sich aus dem voranstehend beigebrachten Material nicht ableiten; ebensowenig gestattet dasselbe einen Rückschluß auf die Mengenverhältnisse, in denen die beiden Isomeren auftreten.

Wir versuchten nun durch geeignete chemische Umwandlungen einen Einblick in die Sachlage zu gewinnen und wählten dazu wieder die Einwirkung von Phenyl-magnesium-bromid auf den synthetisch aus Brompropiophenon bereiteten Ketonalkohol. Hier liegen die Dinge allerdings verwickelter als bei der Konstitutionsaufklärung des l-Acetyl-phenyl-carbinols; denn vorausgesetzt, daß unser synthetisch erhaltenes Produkt ein Gemenge von d, l-Phenyl-acetyl-carbinol und d, l-Methyl-benzoyl-carbinol ist, so können bei dieser Behandlung drei optisch-inaktive Isomere entstehen, die den angeführten Formeln X bis XII entsprechen. (Bei den Symbolen ist immer nur die eine Hälfte des Moleküls geschrieben.)



Die Aussicht, ein einzelnes dieser Reaktionsprodukte fassen zu können, war daher sehr gering, zumal sich zu diesen 3 Isomeren noch das als Nebenprodukt entstehende Biphenyl gesellt. Trotzdem gelang es uns, aus 4,5 g Ketol, das selbst nach seiner Synthese der Formel I entsprechen sollte (vgl. v. Auwers), 0,8 g einer krystallisierten Substanz zu gewinnen, die allerdings noch unscharf — zwischen 80 und 86° — schmolz, sich aber in konzentrierter Schwefelsäure mit rein violetter Farbe löste, während das Rohprodukt eine rote Schwefelsäurelösung gab, die sich bald verfärbte. Auf der Anwesenheit von Biphenyl beruht dieser Unterschied nicht, da das bei der Herstellung der entsprechenden optisch-aktiven Verbindung erhaltene Rohprodukt sich rein violett mit konzentrierter Schwefelsäure tingierte. Löste man dagegen ein Gemisch der Substanzen X und XI in konzentrierter Schwefelsäure, so erhielt man dieselbe tiefrote Farbe. Wenn es uns also auch nicht glückte, die Verbindung X zu isolieren, so läßt doch diese Farbenreaktion mit konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf seine Gegenwart schließen. Ob das krystallisierte Produkt der Formel XI oder XII entspricht, bleibt dahingestellt. Die aus racemischem Benzoin und Methyl-magnesium-jodid erhältliche Verbindung, der sicher die Konstitution XI oder XII zukommt, schmolz bei 106°<sup>1)</sup>. Obiges von uns dargestellte Präparat war zweifellos noch nicht ganz rein, schloß

<sup>1)</sup> A. McKenzie und H. Wren (l. c.) fanden den Schmelzpunkt bei 103,5 bis 104,5°.

aber nicht mehr die Verbindung X ein. Denn bei der Umlagerung mit verdünnter Schwefelsäure konnte nur das Methyl-phenyl-acetophenon erhalten werden, das als einheitliches Semicarbazon vom Schmelzpunkt 189—190° charakterisiert wurde. Die Mischprobe mit einem über d, l-Benzoin gewonnenen Semicarbazon des Methyl-phenyl-acetophenons schmolz bei 186—188°, die mit dem Semicarbazon des Diphenylacetons bei 145°. Reines Benzoyl-methyl-carbinol  $C_6H_5 \cdot CO \cdot CHOH \cdot CH_3$  hätte bei der beschriebenen Behandlung ausschließlich Di-phenyl-aceton ergeben müssen. Die Entstehung des Acetophenona-b-kömmli ngs aus der v. Auwersschen Verbindung, der auf Grund ihrer Synthese die Formel  $C_6H_5 \cdot CO \cdot CHOH \cdot CH_3$  zuzuschreiben ist, erscheint aber verständlich, wenn diese Substanz nicht einheitlich bleibt, sondern in ein Gemisch übergeht, das auch das isomere Phenyl-acetyl-carbinol  $C_6H_5 \cdot CHOH \cdot CO \cdot CH_3$  enthält. Man darf also annehmen, daß die durch die Synthese ursprünglich entstandene Verbindung  $C_6H_5 \cdot CO \cdot CHOH \cdot CH_3$  sich beim Aufbewahren zum Teil in das Isomere umlagert, wahrscheinlich infolge der Alkalinität des Glases. Zu demselben Resultat führt der Vergleich der Brechungsexponenten. Denn es ist für  $C_6H_5 \cdot CO \cdot CHOH \cdot CH_3$   $n_{20}^D = 1,5368$  und für l- $C_6H_5 \cdot CHOH \cdot CO \cdot CH_3$   $n_{20}^D = 1,5315$ , während wir als Gleichgewichtslage  $n_{20}^D = 1,5331$  bis 1,5338 gefunden haben; der Wert für  $n$  lag also etwa in der Mitte zwischen dem für Phenyl-acetyl-carbinol und dem für Methyl-benzoyl-carbinol.

Wie dem Brechungsexponenten zu entnehmen ist, erleidet auch das vom Benzyl-methyl-ke-ton ausgehend hergestellte d, l-Phenyl-acetyl-carbinol eine teilweise Umlagerung in das racem. Methyl-benzoyl-carbinol. Da aber nach den beim Methyl-benzoyl-carbinol vorgenommenen Versuchen nicht damit gerechnet werden konnte, das andere Isomere als Di-phenylacetone in Substanz abzuscheiden, so haben wir darauf verzichtet, die gleichen Umsetzungen mit dem d, l-Phenyl-acetyl-carbinol vorzunehmen.

### Experimentelles.

l- $\alpha$ -Methyl- $\alpha, \beta$ -biphenyl-äthylenglykol. Eine Lösung von 4,5 g des biosynthetisierten l-Phenyl-acetyl-carbinols (1 Mol), das unter 12 mm Druck bei 124—125° siedete, in 30 ccm Äther fügten wir tropfenweise zu einer im Kältegemisch gekühlten und aus 10 g Brombenzol und 1,6 g Magnesium (etwa 2 Mol) in 50 ccm Äther hergestellten Grignard-lösung, wobei sich eine reine weiße krystallinisch aussehende Masse abschied. Derselben kommt vermutlich die Zusammensetzung einer Additionsverbindung zu; denn sie regenerierte bei der Zersetzung mit Eis das Ausgangsmaterial. Erwärmte man jedoch 3 Stunden gelinde auf dem Wasserbade, so ging sie in einen zähen Sirup über, der beim Zerlegen mit kaltem Wasser und verdünnter Schwefelsäure das

Glykol lieferte. Man hob die Ätherschicht ab und schüttelte die wässrigen Mutterlaugen noch 2 mal mit Äther aus. Die vereinigten Ätherextrakte hinterließen nach Trocknen mit geglühtem Natriumsulfat beim Eindampfen ein dickes, farbloses Liquidum, das Fehlingsche Lösung nur noch spurenhafte reduzierte. Ausbeute 4,5 g. In konzentrierter Schwefelsäure löste sich die Substanz mit tief violetter Farbe. Beim Kochen mit ca. 45 ccm Petroläther ging ein Teil in Lösung, fiel jedoch als Öl wieder aus. Der Rückstand wurde abermals mit so viel heißem Petroläther, etwa 100 ccm, behandelt, daß beim Abkühlen keine ölige Ausscheidung mehr auftrat. Nach längerem Stehen kristallisierte daraus das 1- $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ ,  $\beta$ -diphenyl-äthylenglykol in langen glasklaren Nadeln vom Schmelzpunkt 83–84°. Dieses Produkt war bereits analysenrein. Die Ausbeute betrug 2 g, entsprechend 29% der Theorie.

0,1235 g Substanz : 0,3556 g CO<sub>2</sub> und 0,0788 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>. Ber. C = 78,95 %, H = 7,02 %;  
(228)

gef. C = 78,53 %, H = 7,14 %.

0,1605 g Substanz, in Alkohol zu 5 ccm gelöst, zeigten eine Drehung von  $\alpha = +1,45^\circ$  im 1-dcm-Rohr;  $[\alpha]_{17}^D +45,1^\circ$ .

0,1444 g Substanz, in Aceton zu 5 ccm gelöst, wiesen eine Drehung von  $\alpha = +0,92^\circ$  im 1-dcm-Rohr, also  $[\alpha]_{17}^D = +31,86^\circ$  auf.

Wir haben versucht, zur Konstitutionsbestimmung dieses Glykol mit Permanganat in kochender verdünnter Schwefelsäure zu Acetophenon zu oxydieren. Dabei trat zwar unverkennbar ein Geruch nach Acetophenon auf, doch gelang es nicht, dasselbe in Form eines Derivates zu isolieren, da die Umwandlung in das Methyl-phenyl-acetophenon allem Anscheine nach schneller verläuft. Zur Überführung in dieses Keton wurden 0,5 g des Glykols mit 100 ccm 10 proz. Schwefelsäure gekocht und die gebildete Carbonylverbindung abdestilliert. Sie ging als farbloses Öl über, das mit Äther ausgeschüttelt und mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet wurde. Nach Verdampfen des Äthers wurde sie in wenig Alkohol aufgenommen und mit einer Lösung von Semicarbazid-chlorhydrat und Natriumacetat versetzt; es fielen weiße Flocken aus, die nach einigem Stehen abfiltriert und aus Alkohol umkristallisiert wurden; dabei bilden sich Blättchen des Semicarbazons mit eigenartig gezacktem Rande, die bei 193–194° schmolzen.

In einem zweiten Versuche wurde das Keton durch direkte Aufarbeitung des aus der Grignard-Verbindung gewonnenen Rohproduktes dargestellt.

10 g Brombenzol und 1,6 g Magnesium wurden in 50 ccm Äther gelöst und dann tropfenweise und unter Eiskühlung mit 4,5 g einer unter 16 mm Druck bei 131–135° übergangenden Fraktion des Ketols,



die mit 30 ccm Äther verdünnt waren, versetzt. Die weitere Behandlung geschah wie im vorhergehenden Versuch; das erhaltene Rohprodukt machte 6,4 g aus. Dieses wurde mit 100 ccm 25 proz. Schwefelsäure unter Rückfluß erhitzt, nach dem Erkalten ausgeäthert und mit Natriumsulfat getrocknet. Der beim Verdampfen des Äthers hinterbliebene Rückstand von 5,3 g wurde mit in einigen Kubikzentimetern Alkohol gelöst und mit 3 g Semicarbazid-chlorhydrat und der gleichen Menge Kaliumacetat in 15 ccm Wasser versetzt. Nach Verjagen des Alkohols auf dem Wasserbade wurde das Wasser von der halbfesten Masse abgossen und das Material mit wenig Äther behandelt. Das anfänglich harzige Produkt ging dabei in weiße Krystalle über, die sich bei 186—187° verflüssigten. Nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol zeigte die Verbindung den Schmelzpunkt 193°. Die Ausbeute belief sich auf 1 g; aus den Mutterlauge wurden noch weitere 0,45 g gewonnen.

0,1538 g Substanz : 21,45 ccm N (25° und 761 mm).

$C_{16}H_{17}N_3O$ . Ber. N = 15,73 %; gef. N = 15,68 %.

(267)

Methyl-phenyl-acetophenon aus racemischem Benzoylmethyl-carbinol. 4,5 g eines nach der v. Auwersschen Vorschrift dargestellten und einige Tage aufbewahrten Ketols wurden wie oben mit einer Grignard-lösung aus 10 g Brombenzol und 1,6 g Magnesium in 50 ccm Äther behandelt. Das mit Eis und Schwefelsäure zerlegte Reaktionserzeugnis gab an Äther ein Öl ab, das durch Verjagen des Lösungsmittels gewonnen wurde. Dasselbe wurde von konz.  $H_2SO_4$  mit bordeauxroter Farbe aufgenommen. Aus diesem Rohprodukte erhielten wir durch fraktionierte Extraktion mit Petroläther 0,8 g eines Krystallpulvers von dem Schmelzpunkt 80—86°, das sich in Schwefelsäure dann mit rein violetter Farbe löste. 0,7 g dieser Substanz wurden mit 50 ccm 25 proz. Schwefelsäure etwa eine halbe Stunde unter Rückfluß gekocht, nach dem Erkalten mit Äther extrahiert und über Chlorcalcium getrocknet. Der Ätherrückstand wurde mit Alkohol aufgenommen und mit einer Lösung von salzsaurem Semicarbazid und Natriumacetat versetzt. Das dabei zunächst abgeschiedene Harz krystallisierte aus Alkohol und gab Tafeln des Semicarbazons vom Schmelzpunkt 185—186° (uncorr.).

Methyl-phenyl-acetophenon aus Benzoin. 6,3 g feingepulvertes Benzoin wurden in kleinen Portionen und unter guter Kühlung in eine Grignard-lösung von 13,5 g Methyljodid und 2,2 g Magnesium eingetragen. Die Reaktion verlief lebhaft. Nach 4stündigem Kochen zersetzte man wie üblich mit Eis und verdünnter Schwefelsäure, hob den Äther ab und extrahierte die wässrige Mutterlauge noch 3 mal mit Äther. Zur Entfernung nicht umgesetzten Benzoin schüttelten wir mit 100 ccm Bisulfitlösung aus und erhielten nach Verdampfung der mit Natriumsulfat getrockneten ätherischen Schicht 2,5 g einer farblosen

ölichen Substanz, die beim Abkühlen erstarrte und nach dem Umkristallisieren dann bei 106–107° schmolz. In konzentrierte Schwefelsäure ging sie mit tiefvioletter Farbe über. Durch Kochen mit 10 proz. Schwefelsäure wurde sie in  $\beta$ -Phenyl-propiophenon verwandelt, das als Semicarbazon isoliert wurde; letzteres schmolz bei 192–192,5°.

Di-phenyl-aceton.  $(C_6H_5)_2CH \cdot CO \cdot CH_3$ . Eine Lösung von 31 g Diphenylelessigsäure in 200 ccm Chloroform wurde unter Kühlung auf 30 g Phosphorpentachlorid getropft. Nach Beendigung der Reaktion erwärmten wir kurze Zeit auf 63°, wobei Chloroform abdestillierte, und entfernten das Phosphoroxychlorid durch Destillation in vacuo. Das entstandene Diphenyl-acetyl-chlorid wurde ohne weitere Reinigung in Äther gelöst und zu einer Suspension von Natriummalonester in derselben Flüssigkeit gegeben, der aus 23 g Malonester und 3,3 g Natrium bereitet worden war. Die ätherische Aufschwemmung wurde nach mehrtägigem Stehen mit verdünnter Essigsäure ausgeschüttelt, die ätherische Schicht mit Natriumcarbonatlösung gewaschen, getrocknet und dann eingedampft. Das hinterbliebene Öl — Ausbeute 40 g — stellte augenscheinlich den Diphenyl-acetyl-malonester dar, konnte aber durch Vakuumdestillation nicht gereinigt werden, da es dabei z. T. zerfiel. Es wurde daher als Rohprodukt weiter verarbeitet. Man kochte das Öl ca. 12 Stunden mit 400 ccm 20 proz. Salzsäure und nahm nach dem Erkalten mit Äther auf. Die ätherische Lösung wurde durch Ausschütteln mit Sodalösung von regenerierter Diphenylelessigsäure (7,8 g) befreit und ließ nunmehr nach dem Trocknen mit Chlorcalcium ein braunes Öl zurück, das nach völliger Beseitigung des Äthers erstarrte. Es wurde durch Destillation im Vakuum gereinigt und lieferte eine Krystallmasse vom Schmelzpunkte 46–48°. Nach Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol stieg der Schmelzpunkt auf 60°. Die Ausbeuten an reiner Substanz waren nicht sehr erheblich, da sich ein Teil des Ketons bei der Vakuumdestillation zersetzte. Es ging unter einem Druck von 33 mm bei 203–204° über. Das daraus gewonnene Semicarbazon verflüssigte sich nach Umkristallisieren aus Alkohol bei 168°.

0,1628 g Keton : 0,5096 g  $CO_2$  und 0,0983 g  $H_2O$ .

$C_{15}H_{14}O$ . Ber. C = 85,71%, H = 6,67%;

(210)

gef. C = 85,40%, H = 6,76%.

0,1573 g Semicarbazon : 21,65 ccm N (22° und 760 mm).

$C_{16}H_{17}N_3O$ . Ber. N = 15,73%; gef. N = 15,67%.

(267)

#### Darstellung von racemischem $\alpha$ -Methyl- $\beta$ - $\beta$ -diphenyl-äthylenglykol aus Lactid.

In eine Grignard-Lösung, die aus 9 g Brombenzol und 1,5 g Magnesium in 50 ccm Äther bereitet worden war, wurden 1,5 g d, l-Milchsäure-

anhydrid in einer Portion eingetragen. Die Umsetzung vollzog sich erst in der Wärme. Daher wurde das Reaktionsgemisch eine halbe Stunde auf dem Wasserbade erhitzt und nach Stehen über Nacht bei Zimmertemperatur aufgearbeitet. Die ätherische Lösung wurde mit Natriumbisulfit und dann mit Natriumbicarbonat ausgeschüttelt, über entwässertem Glaubersalz getrocknet und schließlich eingedampft. Der restierende schwach gelbgefärbte Sirup erstarrte beim Anreiben in der Kälte. Die Substanz wurde mit viel siedendem Petroläther behandelt, wobei der größte Teil ungelöst blieb. Dieser Rückstand zeigte den Schmelzpunkt  $92^{\circ}$ . Er wurde mit wenig Alkohol aufgenommen und in der Wärme mit Wasser bis zur Opalescenz versetzt. Beim Abkühlen krystallisierte die Substanz in feinen, zu Büscheln vereinigten Nadelchen vom Schmelzpunkte  $95,5^{\circ}$  aus<sup>1)</sup>; diese lösten sich in konzentrierter Schwefelsäure mit schwach orangefarbener Farbe. Von einem Gemisch ungefähr gleicher Teile dieser Substanz und der aus dem optisch aktiven Ketol erhaltenen  $l$ - $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ ,  $\beta$ -diphenyl-äthylenglykol wird konzentrierte Schwefelsäure bordeauxrot angefärbt. Denselben Farbton zeigte auch die schwefelsaure Lösung des aus racemischem Benzoyl-methylcarbinol mit Phenyl-magnesium-bromid gewonnenen öligen Produktes.

Das Ergebnis der eingehenden Untersuchungen läßt sich in Kürze wie folgt zusammenfassen:

Der unter dem Einflusse der Carboligase aus Benzaldehyd und Brenztraubensäure bzw. Zucker entstehende linksdrehende Phenylbrenztraubenalkohol  $C_6H_5 \cdot CHO \cdot CO \cdot CH_3$  liefert bei der Umsetzung mit Phenyl-magnesium-bromid aktives und zwar dextrogyres  $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ ,  $\beta$ -bi-phenyl-äthylenglykol  $C_6H_5 \cdot CHO \cdot C(OH)(CH_3) (C_6H_5)$ , das durch Behandlung mit verdünnter Schwefelsäure in Methyl-phenylacetophenon  $C_6H_5 \cdot CO \cdot CH(CH_3) (C_6H_5)$  übergeführt und als Semicarbazon identifiziert wurde.

Das Produkt der Biosynthese ist also  $l$ -Phenyl-acetylcarbinol.

Angaben über die verbesserte biosynthetische Bereitung des  $l$ -Phenylbrenztraubenalkohols (act. Oxo-oxypropyl-benzols) lassen wir demnächst in einer IV. Mitteilung folgen; sie ist, wie die II. und III., unter Beihilfe von Mitteln ausgeführt worden, für deren Gewährung wir dem wissenschaftlichen Ausschuß der Zentralstelle für Öl- und Fettforschung sehr zu Dank verpflichtet sind.

<sup>1)</sup> R. Stoermer (l. c.) hat den Schmelzpunkt zu  $96,5^{\circ}$  angegeben.

### **Berichtigung.**

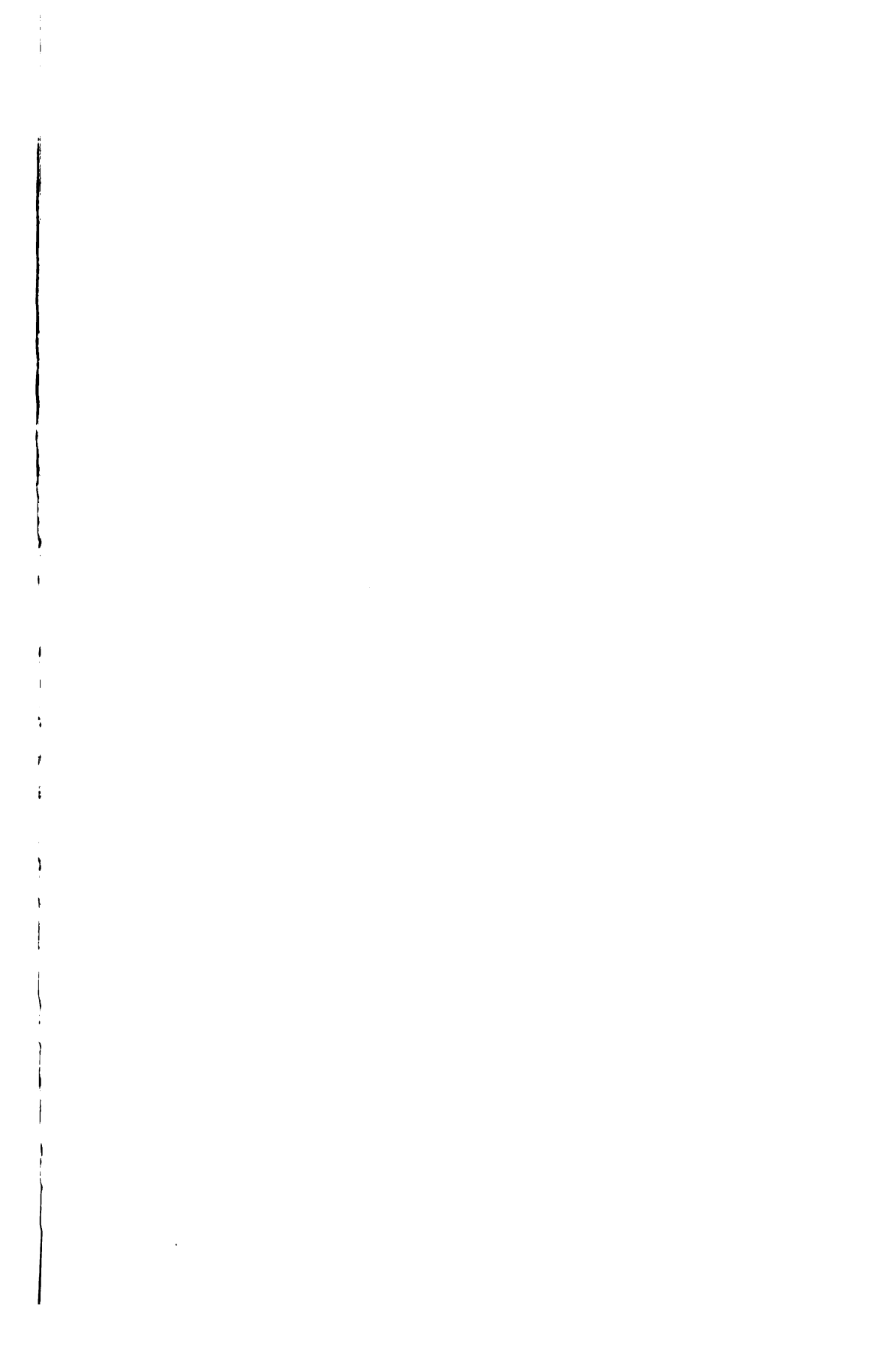
In Tabelle IV, Band 127, Seite 11, 5. Zahlenreihe von rechts, 2. Zahlenangabe von unten muß es heißen „38,7“ statt „38“.

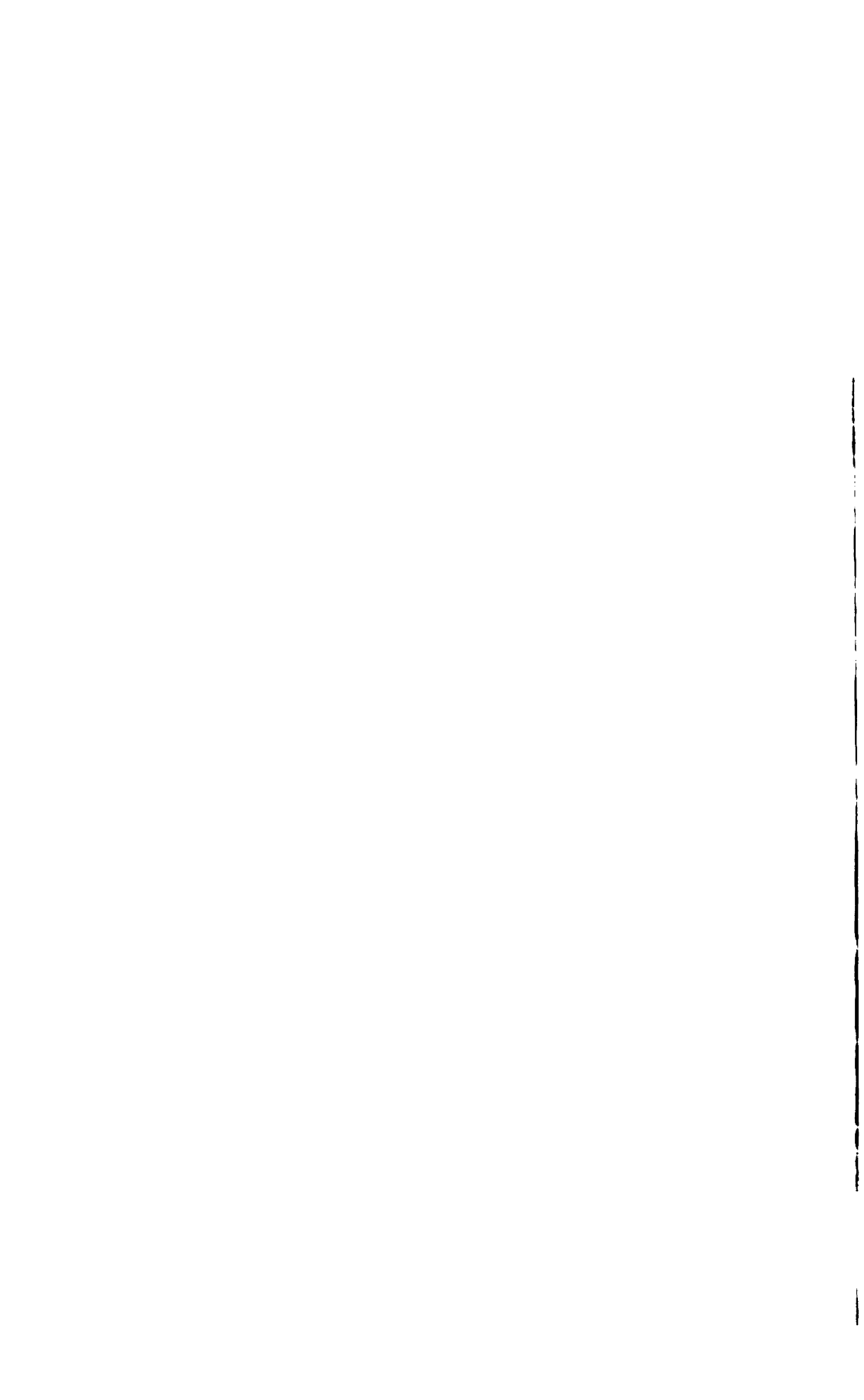
In der Fußnote derselben Tabelle IV lies „Gesamtkohlenhydratwertes“ statt „Gesamtglykogenwertes“.

## Autorenverzeichnis.

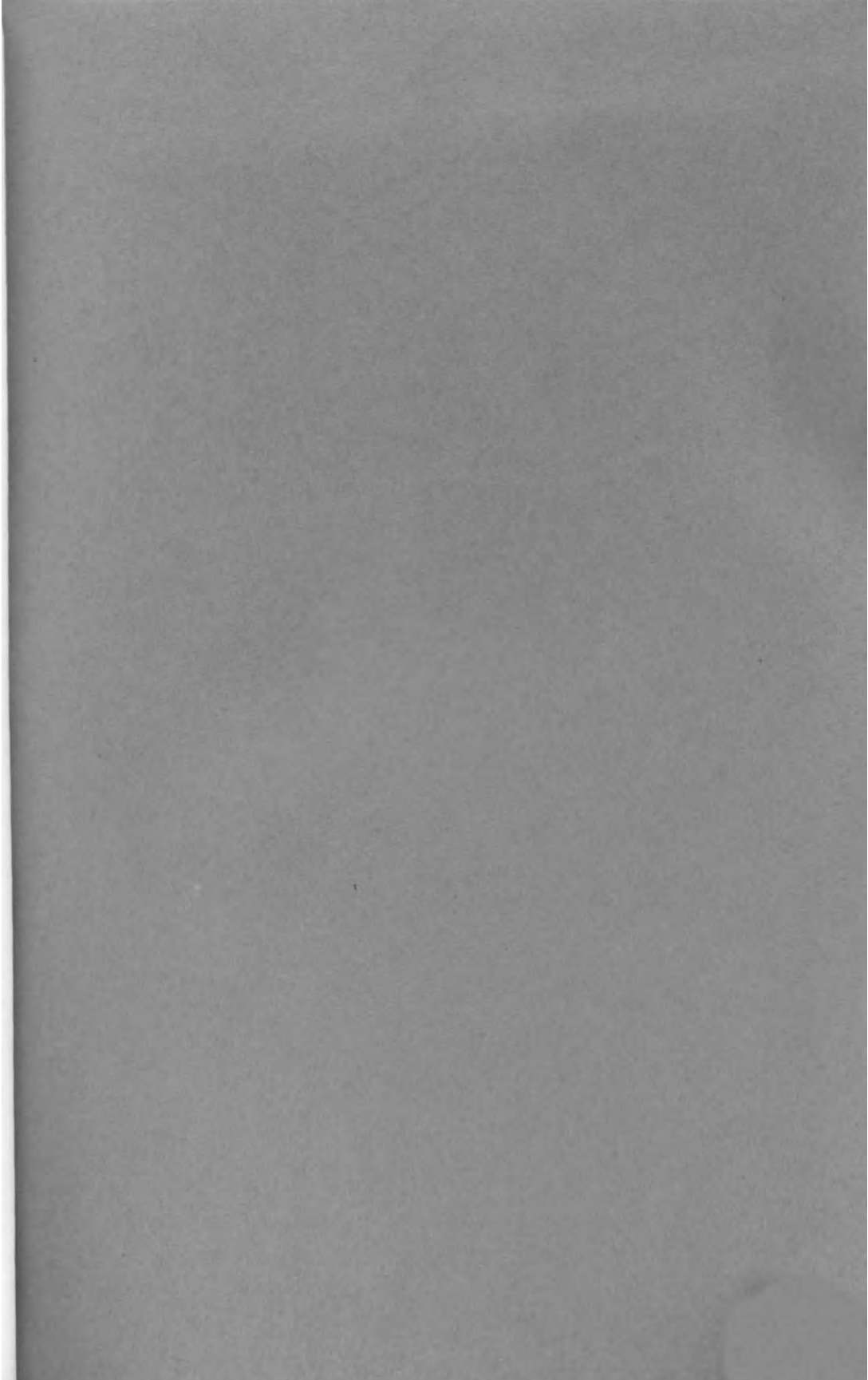
- Baer, Julius. Zur Lokalisation des Fettsäurenbaues i. Organismus. S. 275.
- Barrenscheen, Hermann, K. Über Fructosurie. S. 222.
- Bethe, Albrecht. Der Einfluß der H-Ionenkonzentration auf die Permeabilität toter Membranen, auf die Adsorption an Eiweißolen und auf den Stoffaustausch der Zellen und Gewebe. S. 18.
- Biedermann, W. Über die Wirkung von Pepsin und Trypsin auf Diastase. S. 38.
- Denecke, G. s. Morawitz.
- Elias, H. und St. Weiß. Über die Rolle der Säure im Kohlenhydratstoffwechsel. V. Mitteilung. Säure und Alkali in ihrer Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel der Hefezelle. S. 1.
- Ellinger, Alexander und S. M. Neuschlosz. Vergleichende Untersuchungen über Viscosität und Ultrafiltrationsgeschwindigkeit von Serum. S. 241.
- Embden, Gustav und Heinz Lawaczek. Über die Bildung anorganischer Phosphorsäure bei der Kontraktion des Frostmuskels. S. 181.
- Eppinger, Hans. Zur Chemie der amyloiden Entartung. S. 107.
- Fleischmann, Walter s. Fürth.
- Frog, F. u. S. Schmidt-Nielsen. Die Fettsäureverteilung des Butterfettes. S. 168.
- Fürth, Otto u. Walter Fleischmann. Über die Ermittlung des Tyrosingehaltes von Proteinen. S. 137.
- Geiger, E. und O. Loewi. Über Änderung des Cholingehaltes der Frostmuskulatur durch elektrische Reizung. S. 174.
- Glässner, Karl. Eine neue Pepsinbestimmungsmethode. S. 312.
- Goldschmidt, M. Die Lipoide der Linse. S. 210.
- Hoffmann, P. s. Magnus-Alsleben.
- Knoop, F. Über Reduktionen und Oxydationen und eine gekoppelte Reaktion im intermediären Stoffwechsel des Tierkörpers. S. 200.
- Langstein, Leo. Sind die bei der Säurehydrolyse des Blutglobulins nachweisbar werdenden Kohlenhydratgruppen ein Spaltungsprodukt des Eiweißmoleküls? S. 34.
- Lawaczek, Heinz s. Embden.
- Liljestrand, G. u. N. Stenström. Versuche über den Gaswechsel und das Minutenvolumen des Herzens bei Massage und passiven Bewegungen. Vorläufige Mitteilung. S. 218.
- Loewe, S. Zur physikalischen Chemie der „Lipoide“. Die Durchwanderung von Methylenblau durch organische Lösungen. S. 231.
- Loewi, O. s. Geiger.
- Löffler, Wilhelm. Das Verhalten des Blutzuckers in verschiedenen Altersstufen nach Einnahme von Glucose per os. S. 316.
- Magnus-Alsleben, E. u. P. Hoffmann. Über den Einfluß der nervösen Versorgung auf die vitale Färbbarkeit der Muskeln. S. 103.
- Mautner, Hans u. Ernst P. Pick. Über die durch Schockgifte erzeugten Zirkulationsstörungen. II. Das Verhalten der überlebenden Leber. S. 72.
- Morawitz, P. und G. Denecke. Über Quellungsvorgänge im subcutanen Gewebe. S. 47.
- Münzer, Egmont. Über die Chemie des artefiziellen Ikterus. S. 214.

- Neuberg, Carl und Heinz Ohle. Zur Kenntnis der Carboligase. III. Mitteilung. Der Bau der biosynthetisch verknüpften mehrgliedrigen Kohlenstoffketten. S. 327.
- Neuschlosz, S. M. s. Ellinger.
- Ohle, Heinz s. Neuberg.
- Oswald, Ad. Die physiologische Wirkung der Metallammoniake und verwandter Verbindungen. S. 156.
- Parnas, J. K. u. Richard Wagner. Beobachtungen über Zuckereubildung. Nach Versuchen, die an einem Falle besonderer Kohlenhydratstoffwechselstörung angestellt wurden. I. Mitteilung. S. 55.
- Pauli, Wolfgang. Über Proteinionenbeweglichkeit. S. 150.
- Pick, P. Ernst s. Mautner.
- Pohl, Julius. Zur Kenntnis des Methyl- und Isopropylalkoholschicksals. S. 66.
- Pollak, Leo. Über den Einfluß von Aminosäuren und Fettsäuren auf die Blutzuckerregulation. S. 120.
- Porges, Otto. Über einen Fall von ungewöhnlicher Acetonurie. S. 293.
- Przibram, Hans. Die Ausfärbung der Puppenkokone gewisser Schmetterlinge (*Eriogaster*, *Saturnia*) eine typische Dopareaktion. S. 286.
- Reichel, Heinrich. Zur Wasser- u. Ionenverteilung im Organismus. S. 322.
- Schmidt-Nielsen, S. s. Frog.
- Schulz, Fr. N. Über Farbstoff und Wachs der Blutlaus (*Schizoneura lamigera*). S. 112.
- Spiro, K. Zur lyotropen Reihe und zur  $\beta$ -Oxydation. S. 299.
- Staub, H. Phosphatwirkung am Herzen. S. 255.
- Stenström, N. s. Liljestränd.
- Stepp, Wilhelm. Zur Frage des Acetaldehydnachweises im Harn. S. 13.
- Wagner, Richard s. Parnas.
- Weiß, St. s. Elias.
- Wieland, Hermann. Über die Bedeutung des Calciums für die geringe Empfindlichkeit der Kröte gegen Herzgifte. S. 94.









**THE LIBRARY  
UNIVERSITY OF CALIFORNIA  
San Francisco Medical Center**

**THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE STAMPED BELOW**

**7 DAY LOAN**

**7 DAY  
RETURNED  
JUN 16 1963  
JUN 19 1963**

15m-12,'60(B5248s4)4315

STACKS

141725

5

